

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290759** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.24

(22) Дата подачи заявки
2020.07.27

(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)
A61K 31/5517 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

**(54) КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, СОДЕРЖАЩИЙ
АНТИТЕЛО К ROR1 ЧЕЛОВЕКА, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 10-2019-0109807; 10-2020-0041527

(32) 2019.09.04; 2020.04.06

(33) KR

(86) PCT/IB2020/000649

(87) WO 2021/044208 2021.03.11

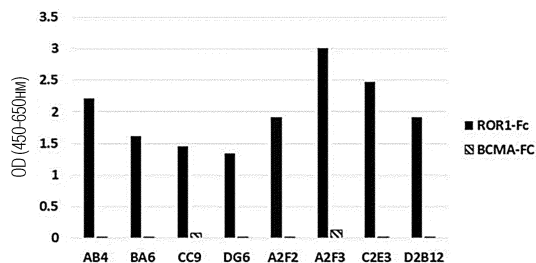
(71) Заявитель:
ЛЕГОКЕМ БАЙОСАЙЕНСИЗ, ИНК.;
АБЛ БАЙО, ИНК. (KR)

(72) Изобретатель:

Парк Юн Хи, Сонг Хо Йоунг, Рю Хюн
Мин, Ким Сунг Мин, Пэк Джу Юль,
Ох Дзи Хе, Хан Нара, Ким Хиоунг
Рэй, Парк Кен Ын, Ли Хиеун Дзоунг,
Ли Дзу Йоунг, Кан Дэ Хек, Янг Юнг-
Дзе, Ю Дзи-На, Ким Йонг Зу, Ли Чанг
Сун, Чае Джейвук, Джунг Джинвон,
Ким Джухи, Ли Бора, Сонг Дэхэ, Сунг
Пенгдже, Ем Донгхун, Ом Джехен,
Хон Йонгын, Ан Джинхен, Ли Янгсун,
Парк Кенгджин, Ю Джисон, Парк
Минджи (KR)

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

(57) Изобретение относится к новым конъюгатам антитело-лекарственное средство (ADC), таргетирующим ROR1, активным метаболитам таких ADC, способам получения таких ADC, применению таких ADC для лечения и/или профилактики заболеваний и применению таких ADC в производстве лекарственных средств для лечения и/или профилактики заболеваний, более конкретно заболеваний, связанных с суперэкспрессией ROR1, например рака. Более конкретно, настоящее изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, содержащему антитело, которое связывается с ROR1, или его антигенсвязывающий фрагмент, и к содержащей его фармацевтической композиции.



A1

202290759

202290759

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573423EA/032

КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, СОДЕРЖАЩИЙ АНТИТЕЛО К ROR1 ЧЕЛОВЕКА, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По этой заявки испрашивается приоритет заявки Республики Корея № 10-2019-0109807, поданной 4 сентября 2019 г., которая полностью включена в настоящее описание посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к новым конъюгатам антитело-лекарственное средство (ADC), тагетирующим ROR1, активным метаболитам таких ADC, способам получения таких ADC, применению таких ADC для лечения и/или профилактики заболеваний и применению таких ADC в производстве лекарственных средств для лечения и/или профилактики заболеваний, более конкретно, заболеваний, связанных с суперэкспрессией ROR1, например рака. Более конкретно, настоящее изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, содержащему антитело, связывающееся с ROR1 или его антигенсвязывающий фрагмент, и фармацевтической композиции, содержащей их.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Рак представляет собой заболевание, вызванное аномальным и неконтролируемым ростом клеток в тканях организма, и является результатом неконтролируемого роста клеток в различных тканях. Опухоли на ранних стадиях рака можно удалить с помощью хирургических и радиотерапевтических мер, и метастазированные опухоли обычно лечат паллиативно с помощью химиотерапии.

Большинство химиотерапевтических агентов, вводимых не перорально, могут вызывать нежелательные побочные эффекты или серьезную токсичность в результате системного введения. Соответственно, основное внимание в разработке было уделено разработке новых химиотерапевтических агентов для достижения повышенной эффективности и минимальной токсичности/побочных эффектов за счет улучшенного и селективного действия химиотерапевтических агентов на опухолевых клетках или непосредственно прилегающих тканях.

Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) представляет собой таргетную технологию, при которой токсин или лекарство связывается с антителом, которое, в свою очередь, связывается с антигеном, токсином или лекарством, высвобождаемым в опухолевой клетке, и т. д., вызывая гибель клетки. Технология обладает более высокой эффективностью по сравнению с препаратами на основе антител, способна существенно снизить риск побочных эффектов по сравнению с обычными противораковыми агентами, поскольку он специально доставляет лекарственные средства к раковым клеткам-мишеням с минимальным воздействием на здоровые клетки, и высвобождает лекарственные средства только в определенных условиях.

Базовая структура конъюгата антитело-лекарственное средство представляет собой «антитело - линкер - низкомолекулярный препарат (токсин)». Здесь линкер должен играть не только функциональную роль связывания антитела и лекарственного средства, но и обеспечивать высвобождение лекарственного средства должным образом, путем диссоциации антитело-лекарственное средство (например, в результате гидролиза ферментом) после циркуляции в организме и достижения клеток-мишеней, и проявлять эффективность против раковых клеток-мишеней. То есть, стабильность линкера играет очень важную роль в эффективности и системной токсичности конъюгата антитело-лекарственное средство (Discovery Medicine 2010, 10(53): 329-39) 85-8 2018-08-14).

Использование моноклональных антител для лечения рака имеет значительный успех. Моноклональные антитела подходят для таргетной адресации к опухолевой ткани и опухолевым клеткам. Конъюгаты антитело-лекарственное средство стали новым и мощным вариантом для терапии лимфом и солидных опухолей, и в последнее время, иммунорегуляторные антитела демонстрируют значительный успех в клинических испытаниях. Разработка терапевтических антител основана на глубоком понимании серологии рака, технологии конструирования, механизмов действия и резистентности белков, и взаимодействия между иммунной системой и раковыми клетками.

Антигены, которые экспрессируются на поверхности раковых клеток человека, охватывают широкий спектр мишеней, которые суперэкспрессируются по сравнению с нормальными тканями, мутируют или селективно экспрессируются. Ключевая проблема заключается в идентификации подходящих антигенов для терапии на основе антител. Такие терапевтические агенты опосредуют изменения в функции антигена или рецептора (например, в качестве стимулятора или антагониста), регулируют иммунную систему посредством активации Fc и T-клеток, и проявляют эффективность за счет доставки специфических лекарственных средств, которые связываются с антителами, таргетирующими специфические антигены. Молекулярные методы, которые могут изменять фармакокинетику, функцию, размер и иммунную стимуляцию антител, становятся ключевыми элементами в разработке новых методов лечения на основе антител. Данные клинических испытаний терапевтических антител у онкологических пациентов подчеркивают важность подходов к выбору оптимизированных антител, включая аффинность и связывание антигена-мишени и антитела, выбор структуры антитела и терапевтические подходы (блокировка передачи сигналов или иммунной функции).

ROR1 экспрессируется в процессе развития эмбриона и плода и контролирует полярность клеток, миграцию клеток, рост нейритов и т. д. Экспрессия постепенно снижается по мере развития, и почти не экспрессируется у взрослых. Он временно экспрессируется в процессе развития B-клеток, и сообщалось лишь о незначительной экспрессии в адипоцитах (Hudecek et al., 2010, Blood 116:4532, Matsuda et al., 2001, Mech. Dev. 105:153).

Однако, поскольку суперэкспрессия ROR1 наблюдается в различных раковых

клетках, он классифицируется как онкофетальный ген. В частности, ROR1 привлек внимание как мишень для противоракового антитела при открытии, что ROR1 суперэкспрессируется при хроническом лимфоцитарном лейкозе (CLL) (Klein et al., 2001, J. Exp. Med 194:1625). Сообщалось о его суперэкспрессии не только при раках крови, таких как В-клеточный лейкоз, лимфома, острый миелоидный лейкоз (AML), лимфома Беркитта, мантийноклеточная лимфома (MCL), острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL), фолликулярная лимфома (FL) и лимфома маргинальной зоны (MZL) и т. д., но также при солидных видах рака, включая рак молочной железы, рак почки, рак яичников, рак желудка, рак печени, рак легких, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак мочевого пузыря, рак яичек, рак матки, рак предстательной железы, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), нейробластома, рак головного мозга, рак толстой кишки, плоскоклеточная карцинома, меланома, миелома, рак шейки матки, рак щитовидной железы, рак головы и шеи и рак надпочечников, и т. д. Сообщается, что экспрессия ROR1 при таких видах рака коррелирует с плохим прогнозом у больных раком и влияет на метастазирование рака.

Такая специфичная для раковых клеток экспрессия ROR1 указывает на то, что ROR1 может быть эффективной мишенью рака, и вызывает необходимость разработки антитела, способного специфически распознавать его.

Патент США № 9316646 относится к анти-ROR1 антителу и описывает моноклональное антитело, специфически распознающее внеклеточный домен ROR1 человека.

Патент США № 9266952 относится к антителу к ROR1 и его применению, и описывает антитело, индуцирующее гибель CLL путем специфического связывания с клеткой CLL.

Поскольку различные противораковые антитела к одному и тому же антигену ROR1 могут быть разработаны в соответствии со свойствами или применением каждого антитела, при рассмотрении рак-специфической экспрессии ROR1 и его экспрессии при различных видах рака необходимо разработать различные антитела, которые могут заменить или дополнить существующие антитела.

ОПИСАНИЕ

При этом уровне техники, авторы настоящей заявки работали над созданием антител, которые специфически связываются с ROR1, в результате чего были разработаны анти-ROR1 антитела, демонстрирующие превосходное связывание с ROR1. Используя линкер, включающий эффективную саморазрушающуюся группу, который стабилен в плазме и в кровотоке, но позволяет лекарственному средству легко высвободиться и проявлять эффективность в раковой клетке, к анти-ROR1 антителу для дальнейшего усиления эффекта антитела, возможно предоставить полезный конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), который таргетирует ROR1 и эффективен при лечении и/или профилактике раковых заболеваний.

Настоящее изобретение относится к новым конъюгатам антитело-лекарственное средство, таргетирующим ROR1 или его соль.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к конъюгату лекарственное средство-антитело, включающему антитело, которое специфически связывается с ROR1, и связанное с ним лекарственное средство, а также к включающим его фармацевтическим композициям.

Кроме того, настоящее изобретение относится к системе антитело-линкер-лекарственное средство (токсин), которая позволяет лекарственному средству и/или токсину достигать клетки-мишени и эффективно проявлять эффективность при значительном снижении токсичности за счет технологии прививки линкера, включающего саморазрушающуюся группу, которая стабильна в плазме и в кровотоке, но позволяет лекарственному средству легко высвободиться в раковой клетке для проявления эффективности.

Техническое решение

В одном аспекте настоящего изобретения, представлен конъюгат антитела общей формулы I или его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

[Общая формула I]

$Ab - (X)_y$

Где:

Ab представляет собой антитело, специфически связывающееся с внеклеточным доменом ROR1, антитело, включающее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи или его антигенсвязывающий фрагмент,

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-5;

CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 6-13 и 96; и

CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 14-21 и 97; и

переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 22-29;

CDRL2, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 30-37; и

CDRL3, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 38-42;

X представляет собой химический остаток, который независимо включает по меньшей мере один активный агент и линкер;

линкер связывает Ab и по меньшей мере один активный агент; и

y представляет собой целое число от 1 до 20.

В некоторых вариантах осуществления, антитело специфически распознает

внечелочный домен, например, ROR1 человека, и проявляет перекрестную специфичность с ROR1 мыши.

В объем настоящего изобретения включена не только полная форма антитела, которая специфически связывается с ROR1, но также и антигенсвязывающие фрагменты молекулы антитела.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержит (i) определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3 и/или (ii) определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где CDRH1 содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-5; CDRH2 содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 6-13 и 96; CDRH3 содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 14-21 и 97; CDRL1 содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 22-29; CDRL2 содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 30-37; и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 38-42. CDRH означает CDR, включенную в вариабельную область тяжелой цепи, а CDRL означает CDR, включенную в вариабельную область легкой цепи.

С этой точки зрения, в других вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением включает (i) определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3 и/или (ii) определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где CDRH1 содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-5; CDRH2 содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 6-13 и 96; CDRH3 содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 14-21 и 97; CDRL1 содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 22-29; CDRL2 содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 30-37; и CDRL3 содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 38-42.

В других вариантах осуществления, CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 6 и 14, соответственно; SEQ ID NO: 2, 7 и 15, соответственно; SEQ ID NO: 1, 8 и 16, соответственно; SEQ ID NO: 3, 9 и 17, соответственно; SEQ ID NO: 1, 10 и 18, соответственно; SEQ ID NO: 4, 11 и 19, соответственно; SEQ ID NO: 5, 12 и 20, соответственно; SEQ ID NO: 3, 13 и 21, соответственно; SEQ ID NO: 2, 96 и 15, соответственно; или SEQ ID NO: 3, 9 и 97, соответственно.

В других вариантах осуществления, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, 30 и 38, соответственно; SEQ ID NO: 23, 31 и 39, соответственно; SEQ ID NO: 24, 32 и 40, соответственно; SEQ ID NO: 25, 33 и 41 соответственно; SEQ ID NO: 26, 34 и 41 соответственно; SEQ ID NO: 27, 35 и 42 соответственно; SEQ ID NO: 28, 36 и 41 соответственно; или SEQ ID NO: 29, 37 и 41 соответственно.

В других вариантах осуществления, антитело содержит ряд CDR: CDRH1, CDRH2,

CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3, в которых:

(a) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 с SEQ ID NO: 1, 6 и 14, соответственно и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 с SEQ ID NO: 22, 30 и 38, соответственно;

(b) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 7 и 15, соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, 31 и 39, соответственно;

(c) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 8 и 16, соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, 32 и 40, соответственно;

(d) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 9 и 17, соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, 33 и 41, соответственно;

(e) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 10 и 18, соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, 34 и 41, соответственно;

(f) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 11 и 19, соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, 35 и 42, соответственно;

(g) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, 12 и 20, соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, 36 и 41, соответственно;

(h) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 13 и 21, соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, 37 и 41, соответственно;

(i) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 96 и 15, соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, 31 и 39, соответственно, или;

(j) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 9 и 97, соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, 33 и 41, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением содержат переменную область тяжелой цепи i, содержащую: аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 43-50, 98 и 99; по меньшей мере 90% идентичность последовательности к аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 43-50, 98 и 99, или по меньшей мере 95% идентичность последовательности к аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 43-50, 98 и 99.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в соответствии с настоящим изобретением содержат переменную область легкой цепи, включающую: аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO:

51-58; по меньшей мере 90% идентичность последовательности к аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 51-58 или по меньшей мере 95% идентичность последовательности к аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 51-58.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержит комбинацию переменных областей тяжелой и легкой цепей, содержащих аминокислотную последовательность: последовательностей, обозначенных SEQ ID NO: 43 и 51, соответственно; SEQ ID NO: 44 и 52, соответственно; SEQ ID NO: 45 и 53, соответственно; SEQ ID NO: 46 и 54, соответственно; SEQ ID NO: 47 и 55, соответственно; SEQ ID NO: 48 и 56, соответственно; SEQ ID NO: 49 и 57, соответственно; SEQ ID NO: 50 и 58, соответственно; SEQ ID NO: 98 и 52, соответственно или SEQ ID NO: 99 и 54, соответственно; по меньшей мере 90% комплементарность с этими аминокислотными последовательностями или по меньшей мере 95% комплементарность с этими аминокислотными последовательностями.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению представляет собой антитело человека, полное антитело человека или антигенсвязывающий фрагмент, обладающие перекрестной специфичностью с ROR1 мыши.

В некоторых вариантах осуществления, антитело по настоящему изобретению представляет собой моноклональное антитело, в частности моноклональное антитело человека, обладающее перекрестной специфичностью с ROR1 мыши.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению специфически распознает и/или связывается с ROR1 человека и мыши.

В некоторых вариантах осуществления, антитело по настоящему изобретению относится к типу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

В некоторых вариантах осуществления, антитело по настоящему изобретению содержит комбинацию тяжелой цепи и легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность: SEQ ID NO: 59 и 67, соответственно; SEQ ID NO: 60 и 68, соответственно; SEQ ID NO: 61 и 69, соответственно; SEQ ID NO: 62 и 70, соответственно; SEQ ID NO: 63 и 71, соответственно; SEQ ID NO: 64 и 72, соответственно; SEQ ID NO: 65 и 73, соответственно или SEQ ID NO: 66 и 74, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут включать, но не ограничены ими: моноклональное антитело, доменное антитело (dAb), одноцепочечное антитело (scab), Fab фрагмент, Fab' фрагмент, F(ab')₂ фрагмент, scFab фрагмент, Fv фрагмент, dsFv фрагмент, одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), ScFv-Fc фрагмент, однодоменное антитело тяжелой цепи, однодоменное антитело легкой цепи, вариант антитела, мультимерное антитело, миниантитело, диатело, биспецифическое антитело или

мультиспецифическое антитело.

В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают специфичностью по меньшей мере еще к одному антигену в дополнение к ROR1 антигену. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере еще один антиген отличается от ROR1 и может включать, например, раковый антиген, и в этом случае антитело может обладать биспецифичностью. Специалист в данной области техники сможет выбрать подходящий раковый антиген в зависимости от конкретной цели биспецифического антитела.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид по настоящему изобретению представляет собой полинуклеотид, кодирующий CDR, описанный в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид по настоящему изобретению представляет собой полинуклеотид, кодирующий переменную область тяжелой цепи или легкой цепи, описанную в настоящем изобретении.

В еще других вариантах осуществления, полинуклеотид по настоящему изобретению представляет собой полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь или легкую цепь, раскрытые в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид по настоящему изобретению содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 75-82, 102 и 103, которая кодирует полноразмерную тяжелую цепь, описанную в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления, полинуклеотид по настоящему изобретению содержит последовательность любой из SEQ ID NO: 83-90, которая кодирует полноразмерную легкую цепь, описанную в настоящем изобретении.

Полинуклеотид, кодирующий CDR и переменную область по настоящему изобретению, может быть легко определен среди приведенных выше последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелую цепь и легкую цепь, на основе аминокислотных последовательностей CDR и переменной области, описанных в настоящем изобретении.

В другом аспекте изобретение относится к вектору, включающему полинуклеотид по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления, вектор по настоящему изобретению включает вектор экспрессии для продуцирования антител или вектор для CAR-T-клеток (Т-клеток, перенаправляемые химерным антигенным рецептором) или CAR-NK (естественных киллеров) клеток.

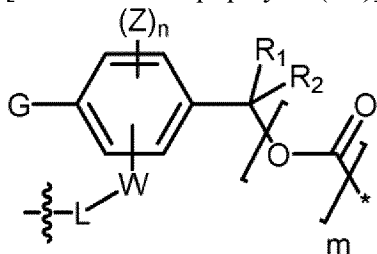
В другом аспекте изобретение относится к клеточной линии, трансформированной вектором по настоящему изобретению.

В еще одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения выделенного антитела, которое специфически связывается с ROR1 или его

антигенсвязывающим фрагментом, где способ включает стадию выделения антигена или его антигенсвязывающего фрагмента из клеточной линии согласно настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру, представленную общей формулой IIa:

[Химическая формула (IIa)]



или ее фармацевтически приемлемую соль, где

G представляет собой сахар, сахарную кислоту или производное сахара;

W представляет собой $-C(O)-$, $-C(O)NR'-$, $-C(O)O-$, $SO_2NR'-$, $-P(O)R''NR'-$, $-SONR'-$ или $-PO_2NR'-$; где C, S или P непосредственно связаны с фенильным кольцом;

каждый Z независимо представляет собой C_1-C_8 алкил, галоген, циано или нитро;

n представляет собой целое число от 0 до 3; и

m представляет собой 0 или 1;

L отсутствует, представляет собой C_1-C_{50} алкилен или 1-50-атомный гетероалкилен или L содержит по меньшей мере одну единицу разветвления (BR) и по меньшей мере одну единицу соединения;

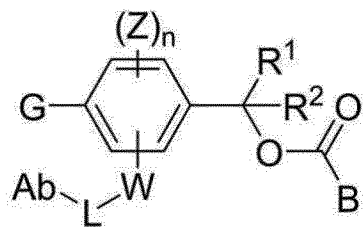
R^1 и R^2 независимо представляют собой водород, C_1-C_8 алкил или C_3-C_8 циклоалкил; или R^1 и R^2 , объединены с получением (C_3-C_8) циклоалкильного кольца;

* представляет точку присоединения к активному агенту; и

~~~~~ представляет точку присоединения к антителу.

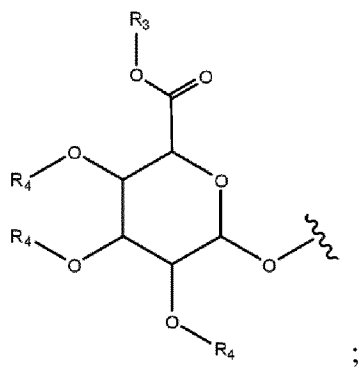
В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру, представленную общей формулой II:

[Общая формула II]



или ее фармацевтически приемлемую соль, где

G представляет собой группу глюкуроновой кислоты или



$R^3$  представляет собой водород или карбоксильную защитную группу;  
каждый из  $R_4$  независимо представляет собой водородную или гидроксильную защитную группу;

$W$  представляет собой активный агент;

$R^1$  и  $R^2$  представляют собой соответственно и независимо водород,  $C_1$ - $C_8$  алкил или  $C_3$ - $C_8$  циклоалкил;

$W$  представляет собой  $-C(O)-$ ,  $-C(O)NR'-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $SO_2NR'-$ ,  $-P(O)R''NR'-$ ,  $-SONR'-$  или  $-PO_2NR'-$ ; где  $C$ ,  $S$  или  $P$  напрямую связаны с фенильным кольцом;

$R'$  и  $R''$  каждый независимо представляет собой водород,  $C_1$ - $C_8$  алкил,  $C_3$ - $C_8$  циклоалкил,  $C_1$ - $C_8$  алкокси,  $C_1$ - $C_8$  алкилтио, моно- или ди-  $C_1$ - $C_8$  алкиламино,  $C_3$ - $C_{20}$  гетероарил или  $C_6$ - $C_{20}$  арил;

каждый  $Z$  независимо представляет собой  $C_1$ - $C_8$  алкил, галоген, циано или нитро;

$n$  представляет собой целое число 0-3; и

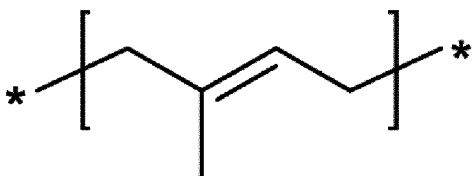
$L$  содержит:

A)  $C_1$ - $C_{50}$  алкилен или 1-50-атомный гетероалкилен, удовлетворяющий по меньшей мере одному из следующих:

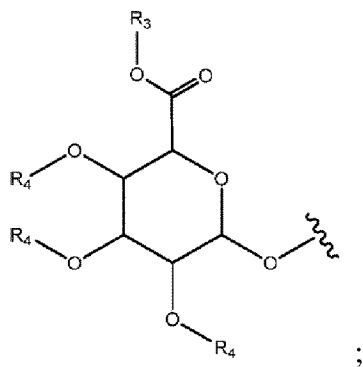
- (i)  $L$  содержит по меньшей мере одну ненасыщенную связь;
- (ii)  $L$  замещен двухвалентным заместителем, где 2 атома в  $L$  являются одинаковыми, как в заместителе, таким образом образуя гетероарилен;
- (iii)  $L$  прерывается двухвалентной гетероариленовой группой;
- (iv)  $L$  представляет собой 1-50-атомный гетероалкилен;
- (v)  $L$  замещен по меньшей мере одним  $C_{1-20}$  алкилом; или

B) по меньшей мере одна единица производного изопренила общей формулы III ниже, которая может быть распознана изопреноидтрансферазой:

[Общая формула III]



В некоторых вариантах осуществления,  $G$  представляет собой



$R^3$  представляет собой водород или карбоксильную защитную группу; и каждый  $R^4$  представляет собой, соответственно и независимо, водород или гидроксильную защитную группу.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления,  $R^3$  представляет собой водород, и каждый  $R^4$  представляет собой водород.

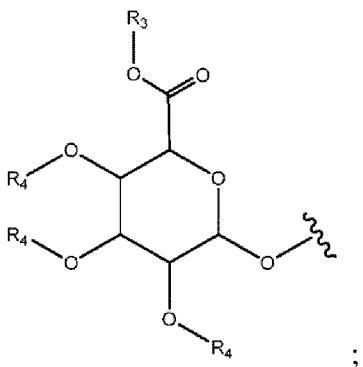
В некоторых вариантах осуществления,  $R^1$  и  $R^2$  представляют собой водород.

В некоторых вариантах осуществления, Z независимо представляет собой  $C_1$ - $C_8$  алкил, галоген, циано или нитро.

В некоторых вариантах осуществления, n равен 0.

В некоторых вариантах осуществления, W представляет собой  $-C(O)-$ ,  $-C(O)NR'-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $SO_2NR'-$ ,  $-P(O)R''NR'-$ ,  $-SONR'-$  или  $-PO_2NR'-$ ; C, S или P непосредственно связаны с фенильным кольцом;  $R'$  и  $R''$  представляют собой, соответственно и независимо, соединения, которые представляют собой водород,  $C_1$ - $C_8$  алкил,  $C_3$ - $C_8$  циклоалкил,  $C_1$ - $C_8$  алкокси,  $C_1$ - $C_8$  алкилтио, моно- или ди- $C_1$ - $C_8$  алкиламино,  $C_3$ - $C_{20}$  гетероарил или  $C_6$ - $C_{20}$  арил. В некоторых вариантах осуществления, W представляет собой  $-C(O)-$ ,  $-C(O)NR'-$  или  $-C(O)O-$ . В определенных предпочтительных вариантах осуществления, W представляет собой  $-C(O)NR'-$ ; и C(O) напрямую связаны с фенильным кольцом, и  $NR'$  связан с L.

В некоторых вариантах осуществления, G представляет собой



W представляет собой  $-C(O)NR'-$ , C(O) связан с фенильным кольцом,  $NR'$  связан с L; и

$R_3$  и  $R_4$  представляют собой водород.

В некоторых вариантах осуществления, L представляет собой  $C_1$ - $C_{50}$  алкилен или 1-50-атомный гетероалкилен, содержащий, по меньшей мере одно из:

- (i) ненасыщенной связи;
- (ii) двухвалентного заместителя, где 2 атома в L являются такими же, как заместитель, тем самым образуя гетероарилен;
- (iii) двухвалентной гетероариленовой группы, прерывающей L;
- (iv) 1-50-атомного гетероалкилена; или
- (v) по меньшей мере одного  $C_{1-20}$  алкильного заместителя.

В некоторых вариантах осуществления, L представляет собой  $C_1-C_{50}$  алкилен или 1-50-атомный гетероалкилен, содержащий по меньшей мере одно из:

- (i) ненасыщенной связи;
- (ii) гетероарилена (например, прерывающего L);
- (iii) 1-50-атомного гетероалкилена; или
- (iv) по меньшей мере одного  $C_{1-20}$  алкильного заместителя.

В некоторых вариантах осуществления, L представляет собой азотсодержащий 1-50-атомный гетероалкилен, линкер включает по меньшей мере 2 атома гидрофильной аминокислоты; и азот образует пептидную связь с карбонилем гидрофильной аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления, W представляет собой  $-C(O)NR'$ -, и азот W представляет собой атом азота гидрофильной аминокислоты. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, любая гидрофильная аминокислота выбрана из группы, включающей аргинин, аспартат, аспарагин, глутамат, глутамин, гистидин, лизин, орнитин, пролин, серин и треонин. В некоторых вариантах осуществления, аминокислота ковалентно связывает оксим линкера с полиэтиленгликолевой единицей линкера. В некоторых вариантах осуществления, аминокислота выбрана из аргинина, аспартата, аспарагина, глутамата, глутамина, гистидина, лизина, орнитина, пролина, серина и треонина. В некоторых вариантах осуществления, гидрофильная аминогруппа содержит боковую цепь, имеющую группу, которая имеет электрический заряд в водном растворе при нейтральном pH. В некоторых вариантах осуществления, гидрофильная аминокислота представляет собой аспартат или глутамат. В других вариантах осуществления, гидрофильная аминокислота представляет собой орнитин или лизин. В еще других вариантах осуществления, гидрофильная аминокислота представляет собой аргинин.

В некоторых вариантах осуществления, L дополнительно содержит пептид, и пептид содержит по меньшей мере одну гидрофильную аминокислоту и содержит боковую цепь, имеющую группу, которая имеет электрический заряд в водном растворе при нейтральном pH. В некоторых вариантах осуществления, каждая аминокислота пептида независимо выбрана из аланина, аспартата, аспарагина, глутамата, глутамина, глицина, лизина, орнитина, пролина, серина и треонина. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, пептид содержит по меньшей мере один аспартат или глутамат. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, W представляет собой  $-C(O)NR'$ -, и азот W представляет собой атом азота N-концевой аминокислоты пептида. В некоторых вариантах осуществления, пептид ковалентно связывает оксим линкера с

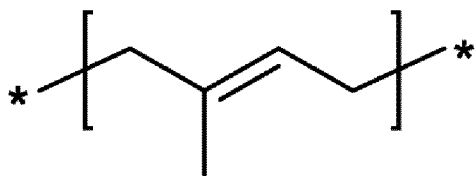
полиэтиленгликолевой единицей линкера. В некоторых вариантах осуществления, пептид содержит 2-20 аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления, L ковалентно связан с антителом тиоэфирной связью, и тиоэфирная связь содержит атом серы цистеина антитела. В некоторых вариантах осуществления, аминокислотный мотив представляет собой последовательность CYYX, C представляет собой цистеин; Y представляет собой алифатическую аминокислоту; X представляет собой любую аминокислоту, выбранную из глутамина, глутамата, серина, цистеина, метионина, аланина и лейцина; и тиоэфирная связь содержит атом серы цистеина антитела. В некоторых вариантах осуществления, кислотный мотив представляет собой последовательность CYYX; и Y представляет собой любую из аланина, изолейцина, лейцина, метионина и валина. В некоторых вариантах осуществления, аминокислотный мотив представляет собой последовательность CVIM или CVLL. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна из 1-20 аминокислот, предшествующих аминокислотному мотиву, представляет собой глицин. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере три из 1-20 аминокислот, предшествующих аминокислотному мотиву, представляют собой глицин или пролин. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна из 1-20 аминокислот, предшествующих аминокислотному мотиву, выбраны из глицина, аспарагиновой кислоты, аргинина и серина. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, предшествующих аминокислотному мотиву, представляет собой, соответственно, глицин.

В некоторых вариантах осуществления, L дополнительно содержит аминокислотную последовательность GGGGGGGCVIM на C-конце.

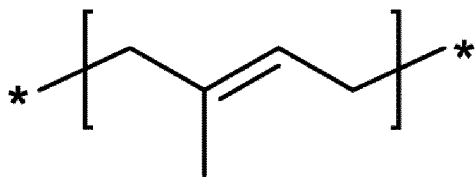
В некоторых вариантах осуществления, L дополнительно содержит по меньшей мере одну единицу производного изопренила общей формулы III:

[Общая формула III]



В некоторых вариантах осуществления, L дополнительно содержит по меньшей мере одну единицу производного изопренила общей формулы III, которая распознается изопреноидтрансферазой:

[Общая формула III]



В некоторых вариантах осуществления, L представляет собой 3-50 гетеролипен,

содержащий оксим, и атом кислорода оксима находится на стороне L, связанной с W, и атом углерода оксима находится на стороне L, связанной с Ab; или атом углерода оксима находится на стороне L, связанной с W, и атом кислорода оксима находится на стороне L, связанной с Ab.

В некоторых вариантах осуществления, L дополнительно содержит оксим и по меньшей мере одну единицу изопренила, ковалентно связывающую оксим с Ab.

В некоторых вариантах осуществления, L дополнительно содержит соединяющую единицу, представленную общей формулой VIII или общей формулой IX:

[Общая формула VIII]



[Общая формула IX]



где

V представляет собой одинарную связь, -O-, -S-, -NR<sup>21</sup>-, -C(O)NR<sup>22</sup>-, NR<sup>23</sup>C(O)-, NR<sup>24</sup>SO<sub>2</sub>- или -SO<sub>2</sub>NR<sup>25</sup>-;

X представляет собой -O-, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкилен или -NR<sup>21</sup>-;

R<sup>21</sup> - R<sup>25</sup>, независимо и соответственно, представляют собой водород, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) алкил, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) алкил (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>) арил или (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) алкил (C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub>) гетероарил;

r представляет собой целое число 0-10;

p представляет собой целое число 0-10;

q представляет собой целое число 1-20; и

w представляет собой целое число 1-20.

В некоторых вариантах осуществления, q представляет собой целое число 4-20. В некоторых вариантах осуществления, q представляет собой целое число 2-12. В некоторых вариантах осуществления, q представляет собой целое число 6-20. В определенных предпочтительных вариантах осуществления, q представляет собой целое число 2, 5 или 11.

В некоторых вариантах осуществления, r представляет собой целое число 2.

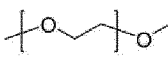
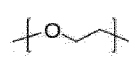
В некоторых вариантах осуществления, p представляет собой целое число 2.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления, V представляет собой -O-.

В некоторых вариантах осуществления, r представляет собой целое число 2; p представляет собой целое число 2; q представляет собой целое число 2, 5 или 11; и V представляет собой -O-.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления, X представляет собой -O-.

В некоторых вариантах осуществления, w представляет собой целое число 6-20.

В некоторых вариантах осуществления, L дополнительно содержит по меньшей мере одну единицу полиэтиленгликоля, представленную  или . В

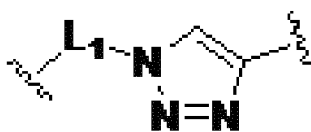
некоторых вариантах осуществления, L дополнительно содержит 1-12 единиц  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ . В некоторых вариантах осуществления, L дополнительно содержит 3-12 единиц  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ . В некоторых вариантах осуществления, 5-12 единиц  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ . В некоторых вариантах осуществления, L содержит 6-12 единиц  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ . В определенных предпочтительных вариантах осуществления, L дополнительно содержит 3 единицы  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ .

В некоторых вариантах осуществления, L дополнительно содержит оксим и по меньшей мере одну единицу полиэтиленгликоля, ковалентно связывающую оксим с активным агентом.

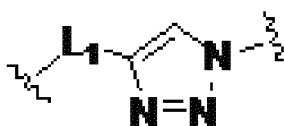
В некоторых вариантах осуществления, L дополнительно содержит единицу, сформированную 1,3-диполярными реакциями циклоприсоединения, реакциями гетеродиенов, реакциями нуклеофильного замещения, реакциями карбонила нонадиольного типа, добавлениями к множественным связям углерод-углерод, реакциями окисления или клик-реакциями. В определенных предпочтительных вариантах осуществления, единицы связывания образованы реакцией ацетилена и азиды или реакцией альдегидной или кетонной группы с гидразином или гидросиламином.

В некоторых вариантах осуществления, L дополнительно содержит единицу связывания, представленную общими формулами IV, V, VI или VII ниже:

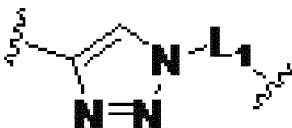
[Общая формула IV]



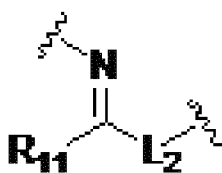
[Общая формула V]



[Общая формула VI]



[Общая формула VII]



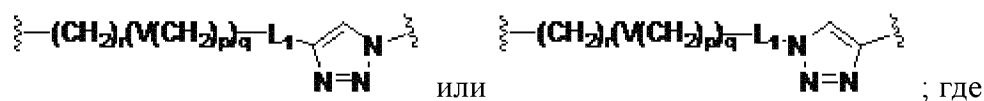
где

$L^1$  представляет собой одинарную связь или алкилен  $C_1-C_{30}$ ; и

$R^{11}$  представляет собой водород или алкил  $C_1-C_{10}$ .

В некоторых вариантах осуществления,  $L^1$  представляет собой одинарную связь. В других вариантах осуществления,  $L^1$  представляет собой  $C_{11}$ -алкилен. В других вариантах осуществления,  $L^1$  представляет собой  $C_{12}$ -алкилен.

В некоторых вариантах осуществления, L дополнительно содержит



V представляет собой одинарную связь, -O-, -S-, -NR<sup>21</sup>-, -C(O)NR<sup>22</sup>-, NR<sup>23</sup>C(O)-, NR<sup>24</sup>SO<sub>2</sub>- или -SO<sub>2</sub>NR<sup>25</sup>-;

R<sup>21</sup> - R<sup>25</sup>, независимо и соответственно, представляют собой, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> арил или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub> гетероарил;

г представляет собой целое число 1-10;

р представляет собой целое число 0-10;

q представляет собой целое число 1-20; и

$L^1$  представляет собой одинарную связь.

В некоторых вариантах осуществления, г представляет собой целое число 2 или 3.

В некоторых вариантах осуществления, р представляет собой целое число 1 или 2.

В некоторых вариантах осуществления, q представляет собой целое число 1-6.

В некоторых вариантах осуществления, г представляет собой целое число 2 или 3; р представляет собой целое число 1 или 2; и q представляет собой целое число 1-6.

В некоторых вариантах осуществления, изопреноидтрансфераза представляет собой фарнезилпротеинтрансферазу (FTase) или геранилгеранилтрансферазу (GGTase).

В некоторых вариантах осуществления, L дополнительно содержит один или более разветвленных линкеров, ковалентно связанных с Ab, где

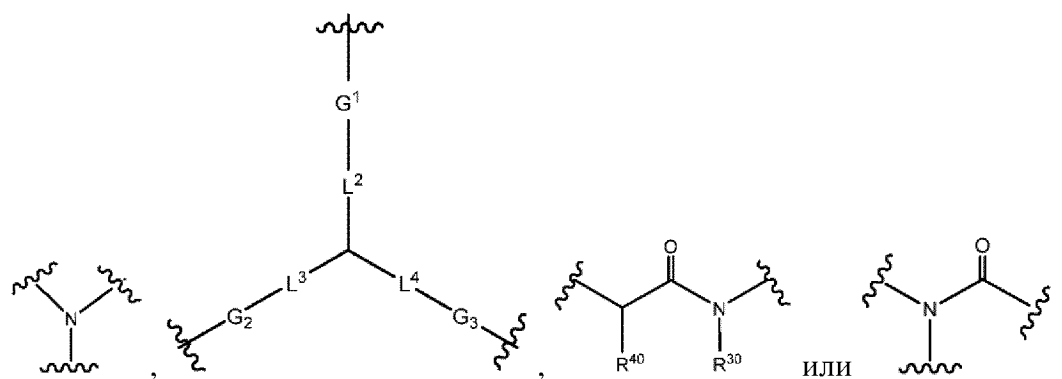
i) каждый разветвленный линкер содержит единицу разветвления (BR), ковалентно связанную с Ab первичным линкером (PL);

ii) каждый разветвленный линкер содержит первую ветвь (B1), в которой первый активный агент ковалентно связан с единицей разветвления вторичным линкером (SL) и группой расщепления (CG); и

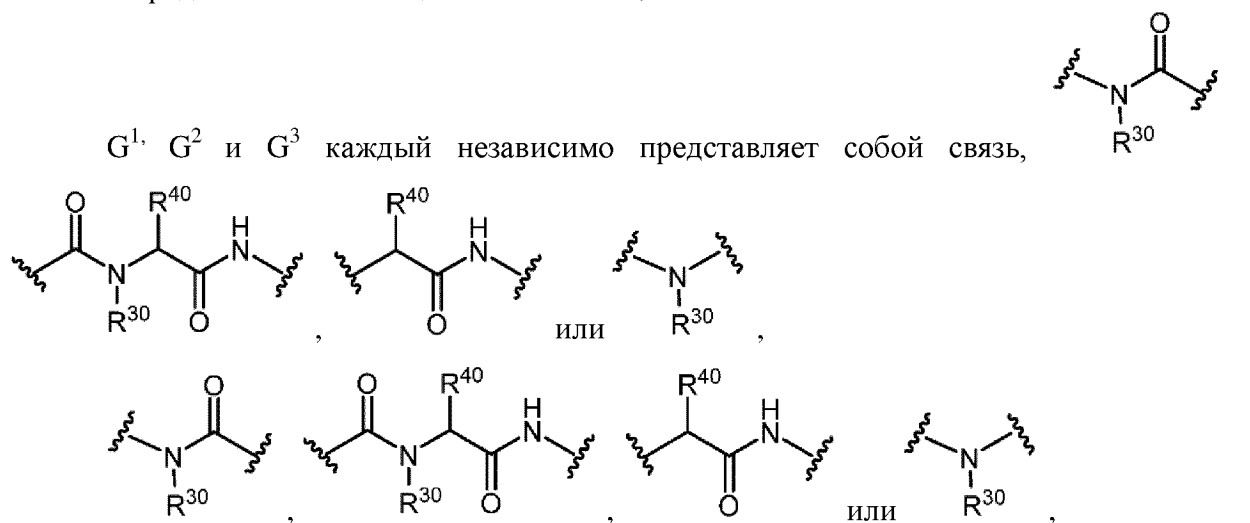
iii) каждый разветвленный линкер дополнительно содержит вторую ветвь (B2), в которой либо а) второй активный агент ковалентно связан с единицей разветвления вторичным линкером (SL) и группой расщепления (CG), либо б) полиэтиленгликолевая группа ковалентно связана с единицей разветвления,

где каждая группа расщепления может быть гидролизована для высвобождения активного агента из конъюгата антитело-лекарственное средство.

В некоторых вариантах осуществления единица разветвления представлена:



$L^2$ ,  $L^3$  и  $L^4$  каждый независимо представляет собой связь или  $-C_nH_{2n}-$ ;  
 $n$  представляет собой целое число 1-30;



$R^{30}$  представляет собой водород или  $C_{1-30}$  алкил;

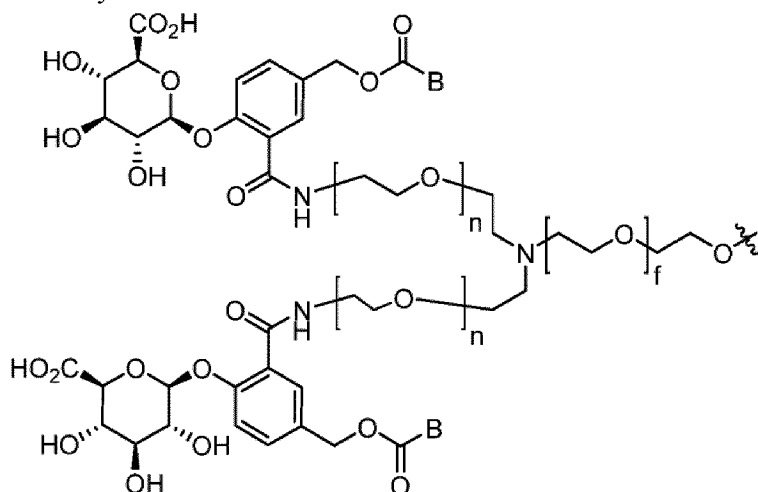
$L^5$  представляет собой прямую связь или  $C_{1-10}$  алкилен; и

$R^{50}$  представляет собой водород  $C_{1-30}$  алкил.

В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитела содержит по меньшей мере один разветвленный линкер, ковалентно связанный с Ab; и по меньшей мере два активных агента, ковалентно связанных с разветвленным линкером. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитела содержит два или более разветвленных линкеров, ковалентно связанных с Ab; и разветвленные линкеры связываются по меньшей мере с двумя активными агентами. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитела содержит 3 разветвленных линкера. В других вариантах осуществления, конъюгат антитела содержит 4 разветвленных линкера. В еще других вариантах осуществления, конъюгат антитела содержит 1 разветвленный линкер. В некоторых вариантах осуществления, каждый из соответствующих разветвленных линкеров связывается с двумя активными агентами. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат содержит по меньшей мере два различных активных агента. В некоторых вариантах осуществления, разветвленный линкер связан по меньшей мере с двумя активными агентами. В некоторых вариантах осуществления, активные агенты связываются с единицей разветвления через второй линкер; и единицы разветвления связаны с анти-ROR1 антителом первым линкером.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, единица разветвления представляет собой атом азота. В некоторых еще более предпочтительных вариантах осуществления, единица разветвления представляет собой амид, и первый линкер содержит карбонил амида. В наиболее предпочтительных вариантах осуществления, единица разветвления представляет собой единицу лизина.

В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитела содержит структуру, представленную:



где

каждый В представляет собой активный агент;

каждый n независимо представляет собой целое число от 0 до 30; и

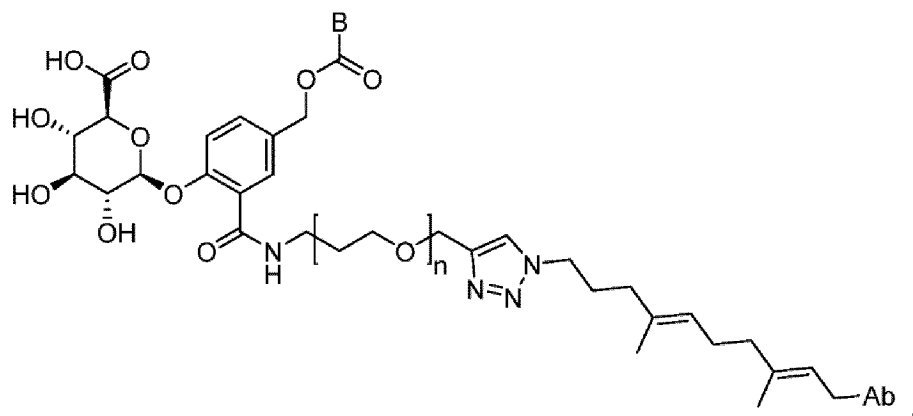
каждый p независимо представляет собой целое число от 0 до 30.

В некоторых вариантах осуществления, n представляет собой целое число 1-10. В других вариантах осуществления, n представляет собой целое число 4-20.

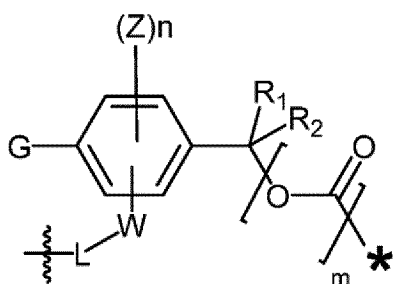
В некоторых вариантах осуществления, L содержит оксим, и по меньшей мере одна единица полиэтиленгликоля ковалентно связывает оксим с активным агентом.

В некоторых вариантах осуществления, расщепляемая связь расщепляется в клетке-мишени. В некоторых вариантах осуществления, расщепляемая связь расщепляется активатором (например, радиацией, кислотой, основанием или ферментом).

В некоторых вариантах осуществления, конъюгат представлен следующей структурой или ее фармацевтически приемлемой солью:



[Химическая формула (Па)]



Где

G представляет собой сахар, сахарную кислоту или производное сахара;

W представляет собой  $-C(O)-$ ,  $-C(O)NR'-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-S(O)_2NR'-$ ,  $-P(O)R''NR'-$ ,  $-S(O)NR'-$  или  $-PO_2NR'-$ ; где C(O), S или P связаны непосредственно с фенильным кольцом, R' и R'', соответственно и независимо, представляют собой водород,  $(C_1-C_8)$  алкил,  $(C_3-C_8)$  циклоалкил,  $(C_1-C_8)$  алкокси,  $(C_1-C_8)$  алкилтио, моно- или ди- $(C_1-C_8)$  алкиламино,  $(C_3-C_{20})$  гетероарил или  $(C_6-C_{20})$  арил;

каждый Z, соответственно и независимо, представляет собой  $(C_1-C_8)$  алкил, галоген, циано или нитро;

n представляет собой целое число 1-3;

m равно 0 или 1;

L отсутствует или содержит по меньшей мере одну единицу разветвления (BR) и по меньшей мере одну единицу соединения;

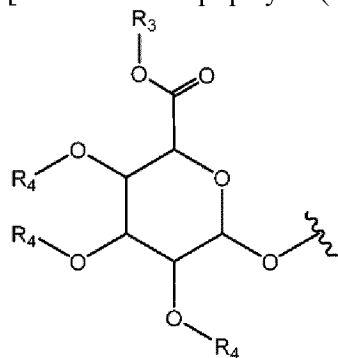
R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub>, соответственно и независимо, представляют собой водород,  $(C_1-C_8)$  алкил или  $(C_3-C_8)$  циклоалкил или R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub>, вместе с атомами углерода, с которыми они связаны, образуют  $(C_3-C_8)$  циклоалкильное кольцо; и

В указанной выше формуле, \* означает область, которая связана с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, и  означает область, которая связана с лекарственным средством или токсином.

В некоторых вариантах осуществления, сахар или сахарная кислота представляет собой моносахарид.

В некоторых вариантах осуществления, G представляет собой соединение структуры химической формулы (IIIa) ниже:

[Химическая формула (IIIa)]



где

R<sub>3</sub> представляет собой водород или карбоксильную защитную группу; и

каждый  $R_4$ , соответственно и независимо, представляет собой водород или гидроксильную защитную группу.

В некоторых вариантах осуществления,  $R_3$  представляет собой водород, и каждый  $R_4$  представляет собой водород.

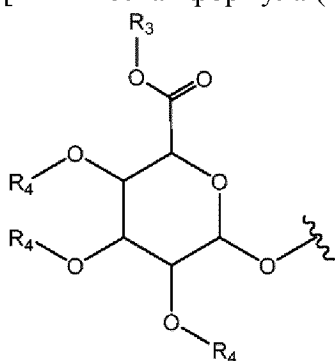
В некоторых вариантах осуществления,  $W$  представляет собой  $-C(O)NR'$ -, где  $C(O)$  связан с фенильным кольцом, и  $NR'$  связан с  $L$ .

В некоторых вариантах осуществления,  $Z$  представляет собой водород, и  $n$  равно 3.

В некоторых вариантах осуществления,  $R_1$  и  $R_2$  соответственно представляют собой водород.

В некоторых вариантах осуществления,  $G$  представляет собой соединение структуры химической формулы (IIIa) ниже:

[Химическая формула (IIIa)]



где

$R_3$  представляет собой водород или карбоксильную защитную группу;

каждый  $R_4$ , соответственно и независимо, представляет собой водород или гидроксильную защитную группу; и

$W$  представляет собой  $-C(O)NR'$ -, где  $C(O)$  связан с фенильным кольцом, и  $NR'$  связан с  $L$ , каждый  $Z$  представляет собой водород,  $n$  равно 3,  $m$  равно 1, и  $R_1$  и  $R_2$  соответственно представляют собой водород.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна единица разветвления представляет собой алкилен, имеющий 1-100 атомов углерода, где атомы углерода алкилена могут быть замещены одним или несколькими гетероатомами, выбранными из  $N$ ,  $O$  и  $S$ , и алкилен дополнительно может быть замещен одним или несколькими алкилами, имеющими 1-20 атомов углерода.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна единица разветвления представляет собой гидрофильную аминокислоту.

В некоторых вариантах осуществления, гидрофильная аминокислота может представлять собой аргинин, аспартат, аспарагин, глутамат, глутамин, гистидин, лизин, орнитин, пролин, серин или треонин.

В некоторых вариантах осуществления, гидрофильная аминокислота может представлять собой аминокислоту, содержащую боковую цепь с остатками, имеющими электрический заряд в водном растворе при нейтральном pH.

В некоторых вариантах осуществления, гидрофильная аминокислота представляет собой аспартат или глутамат.

В некоторых вариантах осуществления, гидрофильная аминокислота представляет собой орнитин или лизин.

В некоторых вариантах осуществления, гидрофильная аминокислота представляет собой аргинин.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна единица разветвления представляет собой  $-C(O)-$ ,  $-C(O)NR'-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $-S(O)_2NR'-$ ,  $-P(O)R''NR'-$ ,  $-S(O)NR'-$  или  $-PO_2NR'-$ , и  $R'$  и  $R''$ , соответственно и независимо, представляют собой водород,  $(C_1-C_8)$  алкил,  $(C_3-C_8)$  циклоалкил,  $(C_1-C_8)$  алкокси,  $(C_1-C_8)$  алкилтио, моно- или ди- $(C_1-C_8)$  алкиламино,  $(C_3-C_{20})$  гетероарил или  $(C_6-C_{20})$  арил.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна единица разветвления представляет собой  $-C(O)NR'-$ , и  $R'$  представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна единица соединения представляет собой  $-(CH_2)_r(V(CH_2)_p)_q-$ , где  $r$  представляет собой целое число или 0-10,  $p$  представляет собой целое число 0-12,  $q$  представляет собой целое число 1-20,  $V$  представляет собой одинарную связь,  $-O-$  или  $-S-$ .

В некоторых вариантах осуществления,  $r$  равно 2.

В некоторых вариантах осуществления,  $p$  равно 2.

В некоторых вариантах осуществления,  $q$  представляет собой целое число 6-20.

В некоторых вариантах осуществления,  $r$  равно 2,  $p$  равно 2,  $q$  равно 2, 4, 5 или 11, и  $V$  представляет собой  $-O-$ .

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна единица соединения представляет собой по меньшей мере одну единицу полиэтиленгликоля и имеет структуру



В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна единица соединения представляет собой 1-12 единиц  $-OCH_2CH_2-$  или 5-12 единиц  $-OCH_2CH_2-$  или 6-12 единиц  $-OCH_2CH_2-$ .

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна единица соединения представляет собой  $-(CH_2CH_2X)_w-$ ,

где  $X$  представляет собой одинарную связь,  $-O-$ ,  $(C_1-C_8)$  алкилен или  $-NR_{21}-$ ;

$R_{21}$  представляет собой водород,  $(C_1-C_6)$  алкил,  $(C_1-C_6)$  алкил  $(C_6-C_{20})$  арил или  $(C_1-C_6)$  алкил  $(C_3-C_{20})$  гетероарил; и

$w$  представляет собой целое число 1-20, более конкретно, 1, 3, 6 или 12.

В некоторых вариантах осуществления,  $X$  представляет собой  $-O-$ , и  $w$  представляет собой целое число 6-20.

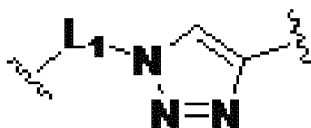
В некоторых вариантах осуществления линкер дополнительно включает единицу связывания, образованную реакцией 1,3-диполярного циклоприсоединения, реакцией

гетеро-Дильса-Альдера, реакцией нуклеофильного замещения, реакцией не-альдольного карбонила, присоединением к множественной связи углерод-углеродной, реакция окисления или клик-реакция.

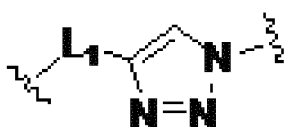
В некоторых вариантах осуществления, связывающая единица образуется в результате реакции между ацетиленом и азидом или реакции между альдегидной или кетонной группой и гидразином или алкоксиамином.

В некоторых вариантах осуществления, единица связывания представлена:

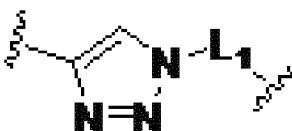
[Общая формула IV]



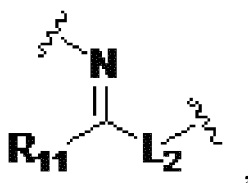
[Общая формула V]



[Общая формула VI]



[Общая формула VII]



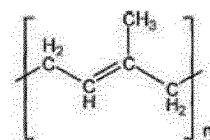
где

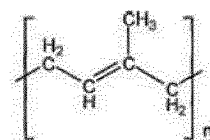
$L_1$  представляет собой одинарную связь или алкилен, имеющий 1-30 атомов углерода;

$R_{11}$  представляет собой водород или алкил, имеющий 1-10 атомов углерода, более конкретно, метила; и

$L_2$  представляет собой алкилен, имеющий 1-30 атомов углерода.

В некоторых вариантах осуществления, линкер может дополнительно содержать по



меньшей мере одну единицу изопренила, имеющую структуру , где  $n$  равно по меньшей мере 2.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна единица изопренила представляет собой субстрат или продукт изопреноидтрансферазы.

В некоторых вариантах осуществления, единица изопренила линкера ковалентно связана с антителом через тиоэфирную связь, и тиоэфирная связь включает атом серы цистеина. В некоторых вариантах осуществления, антитело включает аминокислотный мотив, распознаваемый изопреноидтрансферазой, и тиоэфирная связь включает атом серы цистеина аминокислотного мотива.

В некоторых вариантах осуществления, антитело, связывающееся с ROR1 или его антигенсвязывающим фрагментом, включает аминокислотный мотив, распознаваемый изопреноидтрансферазой, и тиоэфирная связь включает атом серы цистеина аминокислотного мотива.

В некоторых вариантах осуществления, аминокислотный мотив представляет собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из CXX, CXC, XCXC, XXCC и CYYX, где С обозначает цистеин; Y в каждом случае независимо обозначает алифатическую аминокислоту; X в каждом случае независимо обозначает глутамин, глутамат, серин, цистеин, метионин, аланин или лейцин, и тиоэфирная связь содержит атом серы цистеина аминокислотного мотива.

В некоторых вариантах осуществления, аминокислотный мотив представляет собой последовательность CYYX, и Y в каждом случае независимо представляет собой аланин, изолейцин, лейцин, метионин или валин.

В некоторых вариантах осуществления, аминокислотный мотив представляет собой последовательность CVIM или CVLL.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна из 1-20 аминокислот, предшествующих аминокислотному мотиву, представляет собой глицин.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна из 1-20 аминокислот, предшествующих аминокислотному мотиву, может быть, соответственно и независимо, выбрана из глицина, аргинина, аспарагиновой кислоты и серина.

В некоторых вариантах осуществления, от 1 до 20 аминокислот, предшествующих аминокислотному мотиву, представляют собой глицин. Более конкретно, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 из 20 аминокислот, предшествующих аминокислотному мотиву, представляют собой глицин.

В некоторых вариантах осуществления, антитело может содержать аминокислотную последовательность GGGGGGGCVIM.

В некоторых вариантах осуществления, линкер может содержать:

(a) по меньшей мере одну единицу разветвления; (b) по меньшей мере одну единицу соединения; (c) по меньшей мере одну единицу связывания (BU) и (d) по меньшей мере одну триггерную единицу (TU).

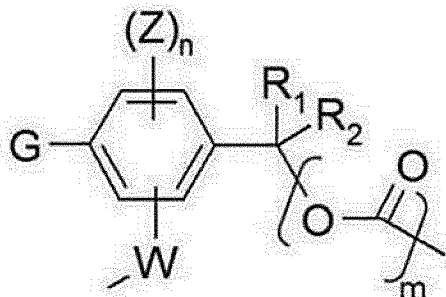
В настоящем изобретении, единица соединения соединяет триггерную единицу и единицу связывания, триггерную единицу и единицу разветвления или единицу разветвления и единицу связывания;

по меньшей мере одна триггерная единица может высвобождать, по меньшей мере одно лекарственное средство или токсин; и

единица разветвления связывает единицу соединения и триггерную единицу или единицу соединения и другую единицу соединения.

В некоторых вариантах осуществления, триггерная единица имеет структуру химической формулы (IIb) ниже:

[Химическая формула (IIb)]



Где

G представляет собой сахар, сахарную кислоту или производное сахара;

W представляет собой -C(O)-, -C(O)NR'-, -C(O)O-, -S(O)<sub>2</sub>NR'-, -P(O)R''NR'-, -S(O)NR'- или -PO<sub>2</sub>NR'-;

где C(O), S или P связаны непосредственно с фенильным кольцом, R' и R'', соответственно и независимо, представляют собой водород, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) алкил, (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>) циклоалкил, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) алкокси, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) алкилтио, моно- или ди-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) алкиламино, (C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub>) гетероарил или (C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>) арил, и W связан с единицей соединения или единицей разветвления;

каждый Z, соответственно и независимо, представляет собой (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) алкил, галоген, циано или нитро;

n представляет собой целое число 1-3;

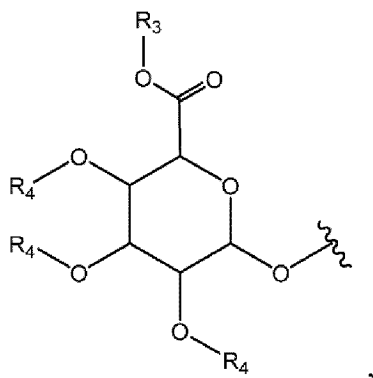
m равно 0 или 1; и

R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub>, соответственно и независимо, представляет собой водород, (C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>) алкил или (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>) циклоалкил или R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub>, вместе с атомом углерода, с которыми они связаны, образуют (C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>) циклоалкильное кольцо.

В некоторых вариантах осуществления, сахаром или сахарной кислотой является моносахарид.

В некоторых вариантах осуществления, G является соединением, имеющим структуру химической формулы (IIIa) ниже:

[Химическая формула (IIIa)]



где

$R_3$  представляет собой водород или карбоксильную защитную группу; и каждый  $R_4$ , соответственно и независимо, представляет собой водород или гидроксильную защитную группу.

В некоторых вариантах осуществления,  $R_3$  представляет собой водород, и каждый  $R_4$  представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления, W представляет собой  $-C(O)NR'$ -, где C(O) связан с фенильным кольцом, и  $NR'$  связан с L.

В некоторых вариантах осуществления, Z представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления,  $R_1$  и  $R_2$  соответственно представляют собой водород.

В некоторых вариантах осуществления, единица соединения представлена как  $-(CH_2)_g(V(CH_2)_p)_{q-}$ ,  $-((CH_2)_pV)_{q-}$ ,  $-(CH_2)_g(V(CH_2)_p)_qY-$ ,  $-((CH_2)_pV)_q(CH_2)_g-$ ,  $-Y((CH_2)_pV)_q-$  или  $-(CH_2)_g(V(CH_2)_p)_qYCH_2-$ ,

где:

g представляет собой целое число 0-10;

p представляет собой целое число 1-10;

q представляет собой целое число 1-20;

V и Y, независимо и соответственно, представляют собой одинарную связь, -O-, -S-,  $-NR_{21}-$ ,  $-C(O)NR_{22}-$ ,  $NR_{23}C(O)-$ ,  $NR_{24}SO_2-$  или  $-SO_2NR_{25}-$ , и,

$R_{21}$  -  $R_{25}$ , независимо и соответственно, представляют собой водород,  $(C_1-C_6)$  алкил,  $(C_1-C_6)$  алкил  $(C_6-C_{20})$  арил или  $(C_1-C_6)$  алкил  $(C_3-C_{20})$  гетероарил.

В некоторых вариантах осуществления, g равно 2.

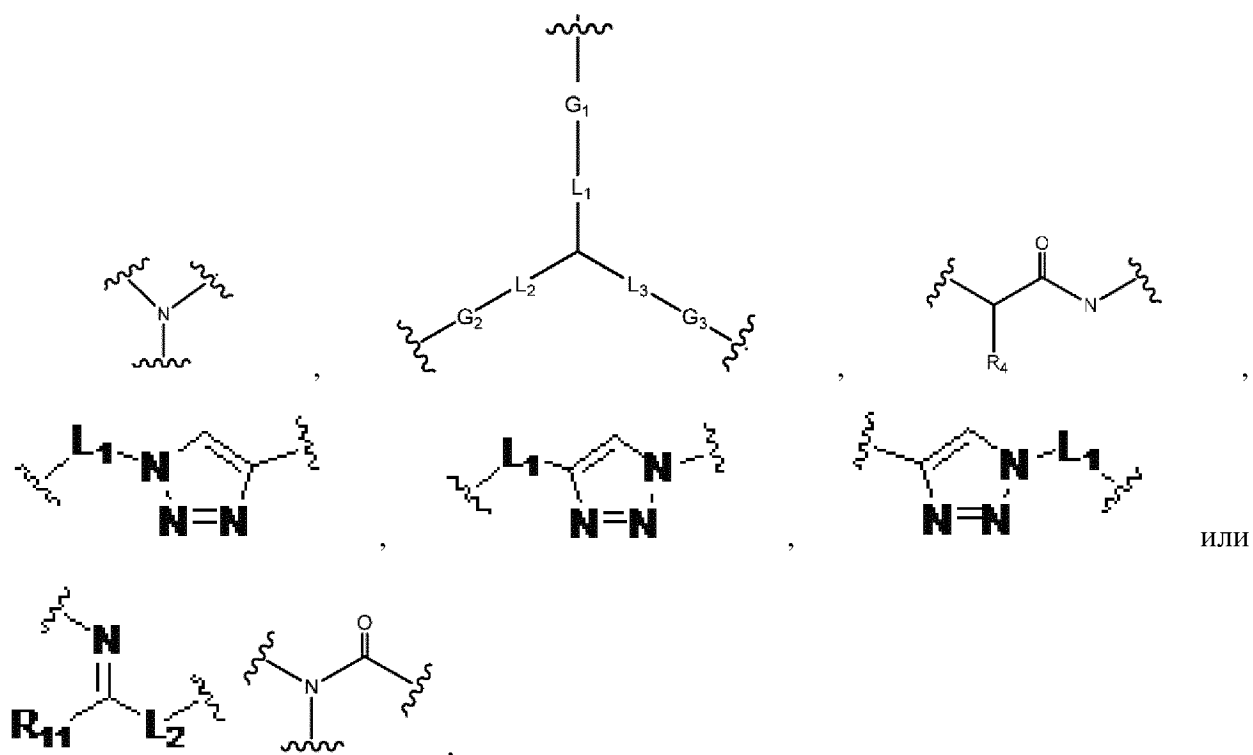
В некоторых вариантах осуществления, p равно 2.

В некоторых вариантах осуществления, q представляет собой целое число 6-20.

В некоторых вариантах осуществления, q равно 2, 5 или 11.

В некоторых вариантах осуществления, V и Y, соответственно и независимо, представляют собой -O-.

В некоторых вариантах осуществления, единица разветвления представляет собой:

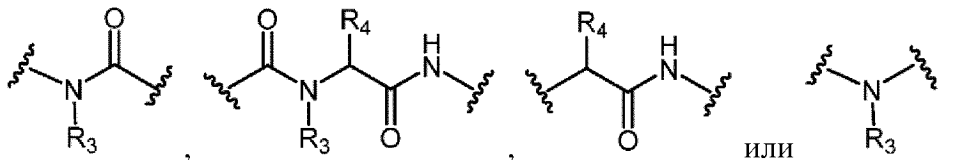


где

$L_1$ ,  $L_2$  и  $L_3$ , соответственно и независимо, представляют собой прямую связь или  $-C_nH_{2n}-$ ;

$n$  представляет собой целое число 1-30;

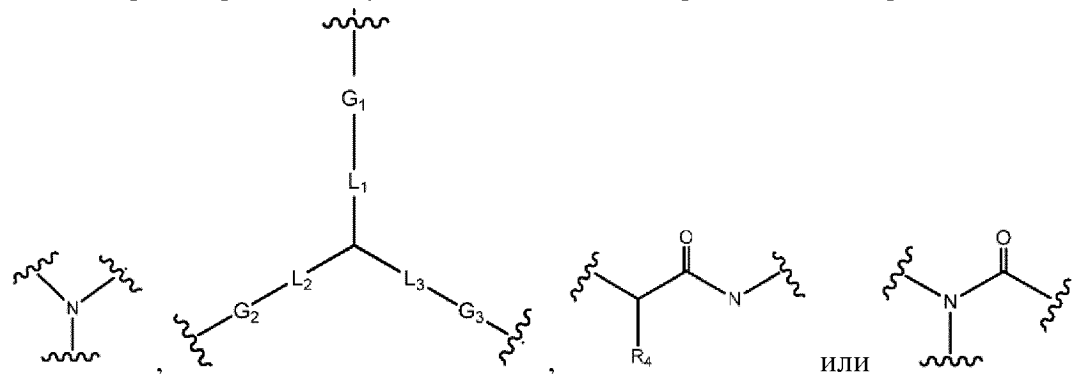
$G_1$ ,  $G_2$  и  $G_3$ , соответственно и независимо, представляют собой прямую связь,



$R_3$  представляет собой водород или  $C_1$ - $C_{30}$  алкил;

$R_4$  представляет собой водород или  $L_4-COOR_5$ ;  $L_4$  представляет собой прямую связь или  $-C_nH_{2n}-$ ;  $n$  представляет собой целое число 1-10, и  $R_5$  представляет собой водород или  $C_1$ - $C_{30}$  алкил.

В некоторых вариантах осуществления, единица разветвления представляет собой:



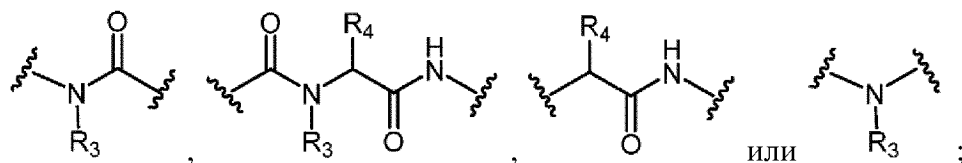
где

$L_1$ ,  $L_2$  и  $L_3$ , соответственно и независимо, представляют собой прямую связь или  $-C_nH_{2n}-$

$C_nH_{2n-}$ ;

$n$  представляет собой целое число 1-30;

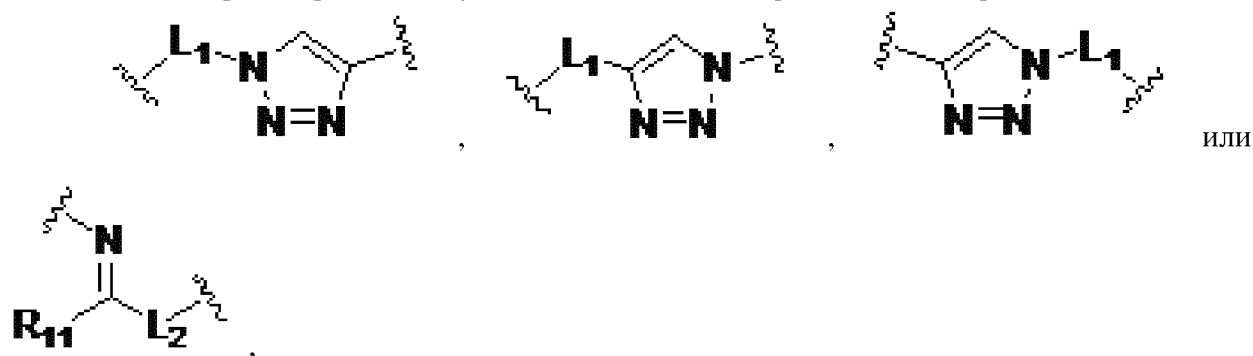
$G_1$ ,  $G_2$  и  $G_3$ , соответственно и независимо, представляет собой прямую связь,



$R_3$  представляет собой водород или  $C_1$ - $C_{30}$  алкил;

$R_4$  представляет собой водород или  $L_4$ - $COOR_5$ ;  $L_4$  представляет собой прямую связь или  $-C_nH_{2n-}$ ;  $n$  представляет собой целое число 1-10, и  $R_5$  представляет собой водород или  $C_1$ - $C_{30}$  алкил.

В некоторых вариантах осуществления, единица разветвления представляет собой



где  $L_1$  представляет собой прямую связь или алкилен, имеющий 1-30 атомов углерода;

$R_{11}$  представляет собой водород или алкил, имеющий 1-10 атомов углерода, в частности, метил;

$L_2$  представляет собой алкилен, имеющий 1-30 атомов углерода; и единица разветвления связывает единицу соединения и антители.

В некоторых вариантах осуществления,  $L_1$  представляет собой алкилен, имеющий 12 атомов углерода.

В некоторых вариантах осуществления,  $R_{11}$  представляет собой метил.

В некоторых вариантах осуществления,  $L_2$  представляет собой алкилен, имеющий 11 атомов углерода.

В некоторых вариантах осуществления, единица связывания ковалентно связана с антителом через тиоэфирную связь, и тиоэфирная связь содержит атом серы цистеина. В некоторых таких вариантах осуществления, антитело содержит аминокислотный мотив, распознаваемый изопреноидтрансферазой, и тиоэфирная связь содержит атом серы цистеина аминокислотного мотива.

В некоторых вариантах осуществления, аминокислотный мотив представляет собой последовательность, выбранную из группы, состоящей из CXX, CXC, XCXC, XXCC и CYYX, где C обозначает цистеин; Y в каждом случае независимо обозначает алифатическую аминокислоту; X в каждом случае независимо обозначает глутамин,

глутамат, серин, цистеин, метионин, аланин или лейцин, и тиоэфирная связь содержит атом серы цистеина аминокислотного мотива.

В некоторых вариантах осуществления, аминокислотный мотив представляет собой последовательность CYYX, и Y в каждом случае независимо представляет собой аланин, изолейцин, лейцин, метионин или валин.

В некоторых вариантах осуществления, аминокислотный мотив представляет собой последовательность CVIM или CVLL.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна из 1-20 аминокислот, предшествующих аминокислотному мотиву, представляет собой глицин.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере одна из 1-20 аминокислот, предшествующих аминокислотному мотиву, может быть соответственно и независимо выбрана из глицина, аргинина, аспарагиновой кислоты и серина.

В некоторых вариантах осуществления, от 1 до 20 аминокислот, предшествующих аминокислотному мотиву, представляют собой глицин, более конкретно, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 из 20 аминокислот, предшествующих аминокислотному мотиву, представляют собой глицин.

В некоторых вариантах осуществления, антитело может содержать аминокислотную последовательность GGGGGGGCVIM.

В некоторых вариантах осуществления, активный агент представляет собой иммунорегуляторное соединение, противораковый агент, противовирусное, антибактериальное, противогрибковое, противопаразитарное средство или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления, активный агент выбран из:

(а) эрлотиниба, бортезомиба, фулвестранта, сутента, летрозолола, мезилата иматиниба, РТК787/ZK 222584, оксалиплатина, 5-фторурацила, лейковорина, рапамицина, лапатиниба, лонафарниба, сорафениба, гефитиниба, AG1478, AG1571, тиотепа, циклофосфида, бусульфана, импросульфана, пипосульфана, бензодопа, карбоквина, метуредопа, уредопа, этиленимина, альтретамина, триэтиленмеламина, триэтиленфосфорида, триэтиленфосфорида, тейметилоломеламина, буллатина, буллатацинона, камптотецина, топотекана, бриостатина, каллистатина, CC-1065, адозелезина, карзелезина, бизелезина, криптофицина 1, криптофицина 8, доластатина, дуокармина, KW-2189, CB1-TM1, элеутеробина, панкреатистатина, саркодиктина, спонгистатина, хлорамбуцила, хлорнафазина, холофосфида, эстрамустина, ифосфида, мехлоретамина, мельфалана, новемибихина, фенестерина, преднимустина, трофосфида, урамустина, кармустина, хлорозотоксина, фотемустина, ломустина, нимустина, ранимустина, калихеамицина, калихеамицина гамма 1, калихеамицина омега 1, динемидина, динемидина А, клодроната, эспеперамина, неокарзиностатина хромофора, аклаиномицинов, актиномицина, антримицина, азазерина, блеомицинов, катциномицина, карабицина, карниномицина, карзинофилина, хромомицинов, дактиномицина, даунорубицина, деторубицина, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцина,

доксорубицина, морфолино-доксорубицина, цианоморфолино-доксорубицина, 2-пирролино-доксорубицина, липосомального доксорубицина, дезоксидоксорубицина, эпирубицина, эзорубицина, марцелломицина, митомицина С, микофеноловой кислоты, ногаламицина, оливомицинов, пепломицина, потфиروмицина, пурамицина, квеламицина, родорубицина, стрептомицина, стрептозоцина, тудерцидина, убенимекса, зиностатицина, зорубицина, 5-фторурацила, деноптерина, метотрексата, птеропретина, триметрексата, флударабина, 6-меркаптопурина, тиампирина, тигуанина, анцитабина, азацитидина, 6-азауридина, кармофура, цитарабина, дидезоксиуридина, доксифлуридина, эноцитабина, флоксуридина, калустерона, дромостанолон, пропионата, эпителиостанола, мепитиостана, тестолактона, аминоклутетимида, митотана, трилостана, фолиновой кислоты, ацеглатона, гликозида альдофосфамида, аминоклевулиновой кислоты, энилурацила, амсакрина, бестрабуцила, бисантрена, эдотрексата, дефофамина, демоколцина, диазиквона, элфорнитина, эллиптициума ацетата, этоглуцида, нитрата галлия, гидроксимочевина, лентинана, лонидаинина, майтанзина, ансамитоцинов, митогуазона, митоксантрона, мопиданмола, натриэрина, пентостатицина, фенамета, пирарубицина, лозоксантрона, 2-этилгидразида, прокарбазина, полисахарида-к, разоксана, сизофирана, спирогермания, теназоновой кислоты, триаквизона, 2,2',2''-трихлортриэтиламина, Т-2 токсина, верракурина А, роридина А, ангицина, уретана, виндезина, дакарбазина, манномустина, митобронитола, митолактола, пипобромана, гацитозина, арабинозида, циклофосфамида, тиотепа, паклитаксела, альбумин-сконструированного состава наночастиц паклитаксела, доцетаксела, хлорамбуцила, гемцитабина, 6-тиогуанина, меркаптопурина, цисплатина, карбоплатина, винбластин, платины, этопозид, ифосфамида, митоксантрона, винкристина, винорелбина, новантрона, тенипозид, эдотрексата, дауномицина, аминоптерина, кселода, ибандроната, СРТ-11, ингибитора топоизомеразы RFS 2000, дифторметилорнитина, ретиноевой кислоты, капецитабина или их фармацевтически приемлемых солей, сольватов или кислот;

(b) монокина, лимфокина, традиционного полипептидного гормона, паратиреоидного гормона, тироксина, релаксина, прорелаксина, гликопротеинового гормона, фолликулостимулирующего гормона, тиреотропного гормона, лютеинизирующего гормона, фактора роста печени, фактора роста фибробластов, пролактина, плацентарного лактогена, фактора некроза опухоли, фактора некроза опухоли- $\alpha$ , фактора некроза опухоли- $\beta$ , мюллеровского ингибирующего вещества, гонадотропин-ассоциированного пептида мыши, ингибина, активина, фактора роста эндотелия сосудов, тромбopoэтина, эритропоэтина, остеоиндуктивного фактора, интерферона, интерферона- $\alpha$ , интерферона- $\beta$ , интерферона- $\gamma$ , колониестимулирующего фактора (CSF), макрофагального CSF, гранулоцитарно-макрофагального CSF, гранулоцитарного CSF, интерлейкина (IL), IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, фактора некроза опухоли, полипептидного фактора, LIF, kit лиганда или их смеси;

(c) дифтерийного токсина, ботулинического токсина, столбнячного токсина,

дизентерийного токсина, холерного токсина, аманитина,  $\alpha$ -аматинина, пирролобензодиазепина, производного пирролобензодиазепина, индолинобензодиазепина, пиридобензодиазепина, тетродотоксина, бреветоксина, цигуатоксина, рицина, АМ токсина, ауристатина, тубулизина, гелданамицина, майтансиноида, калихеамицина, дауномицина, доксорубицина, метотрексата, виндезина, SG2285, доластатина, аналога доластатина, ауристатина, криптофицина, камптотецина, ризоксина, производных ризоксина, СС-1065, аналогов или производных СС-1065, дуокармицина, энедиинового антибиотика, эсперамицина, эпотилона, анатоксина или их смесей;

(d) аффинного лиганда, где аффинный лиганд представляет собой субстрат, ингибитор, активный агент, нейротрансмиттер, радиоактивный изотоп или их смесей;

(e) радиоактивной метки,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ , флуоресцентного красителя, электроноплотного реагента, фермента, биотина, стрептавидина, диоксигенина, гаптена, иммуногенного белка, молекулы нуклеиновой кислоты с последовательностью, комплементарной мишени или их смесей;

(f) иммуномодулирующего соединения, противоракового агента, противовирусного агента, антибактериального агента, противогрибкового агента, противопаразитарного агента или их смесей;

(g) тамоксифена, ралоксифена, дролоксифена, 4-гидрокситамоксифена, триоксифена, кеоксифена, LY117018, онапристона или торемифена;

(h) 4(5)-имидазола, аминоглутетимида, мегестрола ацетата, экземестана, летрозолола или анастрозолола;

(i) флутамида, нилутамида, бикалутамида, лейпролида, гозерелина или троксацитабина;

(j) ингибитора ароматазы;

(k) ингибитора протеинкиназы;

(l) ингибитора липидкиназы;

(m) антисмыслового олигонуклеотида;

(n) рибозима;

(o) вакцины; и

(p) антиангиогенного агента.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, Ab представляет собой анти-ROR1 антитело;

активный агент представляет собой димер пирролобензодиазепина;

линкер связывает Ab с положением N10 или N'10 димера пирролобензодиазепина;

и

y представляет собой целое число от 1 до 20.

В некоторых вариантах осуществления, активный агент представляет собой димер пирролобензодиазепина;

димер пирролобензодиазепина замещен X в положении N10 или X' в положении N'10, где X или X' связывает димер пирролобензодиазепина с линкером;

X и X', соответственно и независимо, представляют собой  $-C(O)O^*$ ,  $-S(O)O^*$ ,  $-C(O)^*$ ,  $-C(O)NR^{X-*}$ ,  $-S(O)_2NR^{X-*}$ ,  $-P(O)R'NR^{X-*}$ ,  $-S(O)NR^{X-*}$  или  $-PO_2NR^{X-*}$ ;

$R^X$  представляет собой  $C_{1-8}$  алкил,  $C_{3-8}$  циклоалкил,  $C_{3-20}$  гетероарил или  $C_{5-20}$  арил;

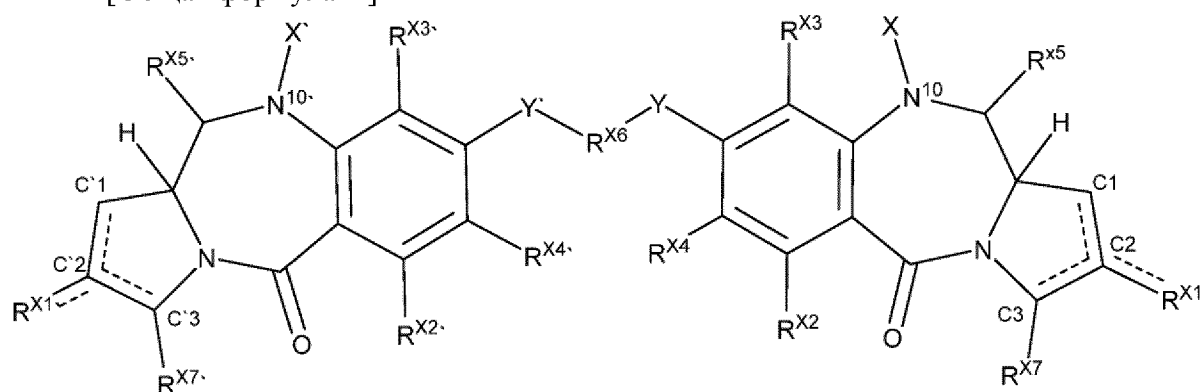
$R^{X'}$  представляет собой OH,  $N_3$ , CN, SH,  $C_{1-8}$  алкил,  $C_{3-8}$  циклоалкил,  $C_{1-8}$  алкокси,  $C_{1-8}$  алкилтио,  $C_{3-20}$  гетероарил,  $C_{5-20}$  арил или amino; и

\* представляет собой сайт связывания между димером пирролобензодиазепина и линкером.

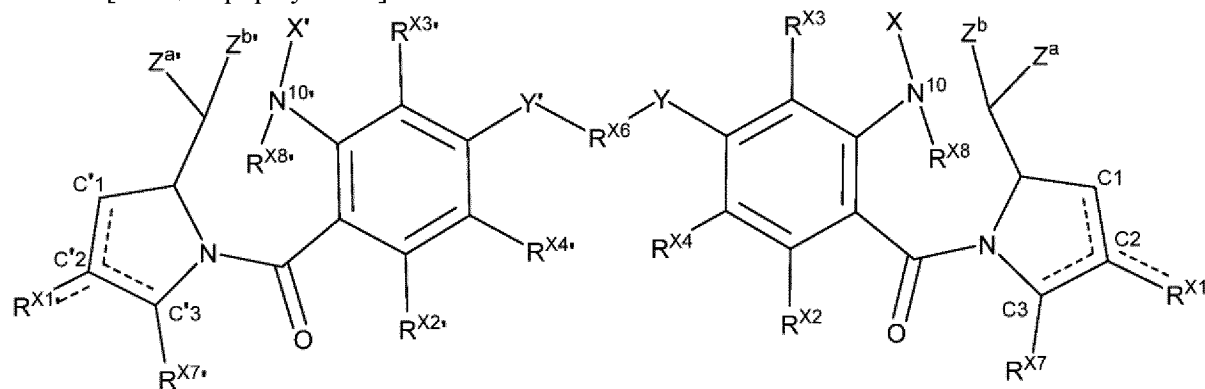
В некоторых вариантах осуществления, X и X' каждый независимо представляет собой  $-C(O)O^*$ ,  $-C(O)^*$  или  $-C(O)NR^{X-*}$ .

В некоторых вариантах осуществления, димер пирролобензодиазепина представлен общей формулой X или общей формулой XI ниже:

[Общая формула X]



[Общая формула XI]



где:

пунктирная линия представляет собой необязательную двойную связь, насколько это допустимо валентностью;

$R^{X1}$  и  $R^{X1'}$  независимо выбраны из H, OH, =O, =CH<sub>2</sub>, CN,  $R^m$ ,  $OR^m$ , =CH- $R^m$ , =C( $R^m$ )<sub>2</sub>,  $OSO_2R^m$ ,  $CO_2R^m$ ,  $COR^m$ , галогена и дигалогена;

$R^m$  выбран из  $R^m$ ,  $CO_2R^m$ ,  $COR^m$ , CHO,  $CO_2H$  и галогена;

каждый  $R^m$  независимо выбран из  $C_{1-12}$  алкила,  $C_{2-12}$  алкенила,  $C_{2-12}$  алкинила,  $C_{5-20}$  арила,  $C_{5-20}$  гетероарила,  $C_{3-6}$  циклоалкила, 3-7-членного гетероцикла, 3-7-членного гетероциклоалкила и 5-7-гетероарила; или  $R^m$  представляет собой X или X';

$R^{X2}$ ,  $R^{X2'}$ ,  $R^{X3}$ ,  $R^{X3'}$ ,  $R^{X5}$  и  $R^{X5'}$  независимо выбраны из H,  $R^m$ , OH,  $OR^m$ , SH,  $SR^m$ ,

$\text{NH}_2$ ,  $\text{NHR}^m$ ,  $\text{NR}^m_2$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{Me}_3\text{SN}$  и галогена;

$\text{R}^{X4}$  и  $\text{R}^{X4'}$  независимо выбраны из  $\text{H}$ ,  $\text{R}^m$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{OR}^m$ ,  $\text{SH}$ ,  $\text{SR}^m$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{NHR}^m$ ,  $\text{NR}^m_2$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{Me}_3\text{SN}$ , галогена,  $\text{C}_{1-6}$  алкила  $\text{C}_{1-6}$  алкокси,  $\text{C}_{2-6}$  алкенила,  $\text{C}_{2-6}$  алкинила,  $\text{C}_{3-6}$  циклоалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила,  $\text{C}_{5-12}$  арила, 5-7-гетероарила,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{NCO}$ ,  $-\text{OR}^n$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^n$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^n\text{R}^n$ ,  $-\text{OS}(\text{O})\text{R}^n$ ,  $-\text{OS}(\text{O})_2\text{R}^n$ ,  $-\text{SR}^n$ ,  $-\text{S}(\text{O})\text{R}^n$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^n$ ,  $-\text{S}(\text{O})\text{NR}^n\text{R}^n$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^n\text{R}^n$ ,  $-\text{OS}(\text{O})\text{NR}^n\text{R}^n$ ,  $-\text{OS}(\text{O})_2\text{NR}^n\text{R}^n$ ,  $-\text{NR}^n\text{R}^n$ ,  $-\text{NR}^n\text{C}(\text{O})\text{R}^o$ ,  $-\text{NR}^n\text{C}(\text{O})\text{OR}^o$ ,  $-\text{NR}^n\text{C}(\text{O})\text{NR}^o\text{R}^o$ ,  $-\text{NR}^n\text{S}(\text{O})\text{R}^o$ ,  $-\text{NR}^n\text{S}(\text{O})_2\text{R}^o$ ,  $-\text{NR}^n\text{S}(\text{O})\text{NR}^o\text{R}^o$ ,  $-\text{NR}^n\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^o\text{R}^o$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{R}^n$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^n$  и  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^n\text{R}^n$ ;

$\text{R}^X$  и  $\text{R}^{X'}$  каждый независимо выбран из  $\text{H}$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{N}_3$ ,  $\text{CN}$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{SH}$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{ONH}_2$ ,  $\text{NHNH}_2$ , галогена,  $\text{C}_{1-8}$  алкила,  $\text{C}_{3-8}$  циклоалкила,  $\text{C}_{1-8}$  алкокси,  $\text{C}_{1-8}$  алкилтио,  $\text{C}_{3-20}$  гетероарила,  $\text{C}_{5-20}$  арила или моно- или ди- $\text{C}_{1-8}$  алкиламино;

$\text{Y}$  и  $\text{Y}'$  каждый независимо выбран из  $\text{O}$ ,  $\text{S}$  и  $\text{N}(\text{H})$ ;

каждый  $\text{R}^{X6}$  независимо выбран из  $\text{C}_{3-12}$  алкилена,  $\text{C}_{3-12}$  алкенилена или  $\text{C}_{3-12}$  гетероалкилен;

$\text{R}^{X7}$  и  $\text{R}^{X7'}$  независимо выбраны из  $\text{H}$ ,  $\text{C}_{1-6}$  алкила,  $\text{C}_{2-6}$  алкенила,  $\text{C}_{2-6}$  алкинила,  $\text{C}_{3-6}$  циклоалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила,  $\text{C}_{6-10}$  арила, 5-7-гетероарила,  $-\text{OR}^r$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^r$ ,  $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}^r\text{R}^r$ ,  $-\text{OS}(\text{O})\text{R}^r$ ,  $-\text{OS}(\text{O})_2\text{R}^r$ ,  $-\text{SR}^r$ ,  $-\text{S}(\text{O})\text{R}^r$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^r$ ,  $-\text{S}(\text{O})\text{NR}^r\text{R}^r$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^r\text{R}^r$ ,  $-\text{OS}(\text{O})\text{NR}^r\text{R}^r$ ,  $-\text{OS}(\text{O})_2\text{NR}^r\text{R}^r$ ,  $-\text{NR}^r\text{R}^r$ ,  $-\text{NR}^r\text{C}(\text{O})\text{R}^s$ ,  $-\text{NR}^r\text{C}(\text{O})\text{OR}^s$ ,  $-\text{NR}^r\text{C}(\text{O})\text{NR}^s\text{R}^s$ ,  $-\text{NR}^r\text{S}(\text{O})\text{R}^s$ ,  $-\text{NR}^r\text{S}(\text{O})_2\text{R}^s$ ,  $-\text{NR}^r\text{S}(\text{O})\text{NR}^s\text{R}^s$ ,  $-\text{NR}^r\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^s\text{R}^s$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{R}^r$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^s$  или  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^r\text{R}^r$ ;

каждый  $\text{R}^r$ ,  $\text{R}^r$ ,  $\text{R}^s$  и  $\text{R}^{s'}$  независимо выбран из  $\text{H}$ ,  $\text{C}_{1-7}$  алкила,  $\text{C}_{2-7}$  алкенила,  $\text{C}_{2-7}$  алкинила,  $\text{C}_{3-13}$  циклоалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила,  $\text{C}_{5-10}$  арила и 5-7-гетероарила;

каждый  $\text{R}^{X8}$  и  $\text{R}^{X8'}$  независимо выбран из  $\text{H}$ ,  $\text{C}_{1-6}$  алкила,  $\text{C}_{2-6}$  алкенила,  $\text{C}_{2-6}$  алкинила,  $\text{C}_{3-6}$  гетероалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила,  $\text{C}_{5-10}$  арила, 5-7-гетероарила,  $-\text{S}(\text{O})\text{R}^m$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^m$ ,  $-\text{S}(\text{O})\text{NR}^m\text{R}^m$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^m\text{R}^m$ ,  $-\text{NR}^m\text{R}^m$ ,  $-\text{NR}^m\text{C}(\text{O})\text{R}^m$ ,  $\text{NR}^m\text{C}(\text{O})\text{OR}^n$ ,  $-\text{NR}^m\text{C}(\text{O})\text{NR}^n\text{R}^n$ ,  $-\text{NR}^m\text{S}(\text{O})\text{R}^n$ ,  $-\text{NR}^m\text{S}(\text{O})_2\text{R}^n$ ,  $-\text{NR}^m\text{S}(\text{O})\text{NR}^n\text{R}^n$ ,  $-\text{NR}^m\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^n\text{R}^n$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{R}^m$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^m$  и  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^m\text{R}^m$ ;

$\text{Z}^a$  выбран из  $\text{OR}^{X12a}$ ,  $\text{NR}^{X12a}\text{R}^{X12a}$  или  $\text{SR}^{X12a}$ ;

$\text{Z}^b$  выбран из  $\text{OR}^{X13a}$ ,  $\text{NR}^{X13a}\text{R}^{X13a}$  или  $\text{SR}^{X13a}$ ;

$\text{Z}^{a'}$  выбран из  $\text{OR}^{X12a}$ ,  $\text{NR}^{X12a}\text{R}^{X12a}$  или  $\text{SR}^{X12a}$ ;

$\text{Z}^{b'}$  выбран из  $\text{OR}^{X13a'}$ ,  $\text{NR}^{X13a'}\text{R}^{X13a'}$  или  $\text{SR}^{X13a'}$ ;

каждый  $\text{R}^{X12a}$ ,  $\text{R}^{X12a'}$ ,  $\text{R}^{X13a}$  и  $\text{R}^{X13a'}$  независимо выбран из  $\text{H}$ ,  $\text{C}_{1-6}$  алкила,  $\text{C}_{2-6}$  алкенила,  $\text{C}_{2-6}$  алкинила,  $\text{C}_{3-6}$  циклоалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила,  $\text{C}_{5-10}$  арила, 5-7-гетероарила,  $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{X15a}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^{X15a}$  и  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^{X15a}\text{R}^{X15a'}$ ;

каждый  $\text{R}^{X15a}$  и  $\text{R}^{X15a'}$  независимо выбран из  $\text{C}_{1-12}$  алкила,  $\text{C}_{2-12}$  алкенила,  $\text{C}_{2-12}$  алкинила,  $\text{C}_{5-20}$  арила,  $\text{C}_{5-20}$  гетероарила,  $\text{C}_{3-6}$  циклоалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила и 5-7-гетероарила;

каждый  $\text{R}^{X13a}$  и  $\text{R}^{X14a}$  независимо представляет собой  $\text{H}$  или алкил; или  $\text{R}^{X13a}$  и  $\text{R}^{X14a}$ , вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют 3-7-членный

гетероциклил, образуют 3-7-членный гетероциклоалкил или образуют 3-7-членный гетероарил, и  $R^{X13a'}$  и  $R^{X14a'}$  произвольно связаны с атомами, к которым они присоединены, с образованием 3-7-членного гетероциклила, 3-7-членного гетероциклоалкила или 3-7-членного гетероарила; и

каждый of  $R^n$ ,  $R^{n'}$ ,  $R^o$ ,  $R^{o'}$ ,  $R^p$  и  $R^{p'}$  независимо выбран из H,  $C_{1-7}$  алкила,  $C_{2-7}$  алкенила,  $C_{2-7}$  алкинила,  $C_{3-13}$  циклоалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила,  $C_{5-10}$  арила и 5-7-гетероарила.

В некоторых вариантах осуществления,  $R^m$  независимо выбран из  $C_{1-12}$  алкила,  $C_{2-12}$  алкенила,  $C_{2-12}$  алкинила,  $C_{5-20}$  арила,  $C_{5-20}$  гетероарила,  $C_{3-6}$  циклоалкила, 3-7-членного гетероциклила, 3-7-членного гетероциклоалкила и 5-7-гетероарила; и

$R^m$  представляет собой замещенный  $C_{1-12}$  алкил,  $C_{2-12}$  алкенил,  $C_{2-12}$  алкинил,  $C_{5-20}$  арил,  $C_{5-20}$  гетероарил,  $C_{3-6}$  циклоалкил, 3-7-членный гетероциклил, 3-7-членный гетероциклоалкил или 5-7-гетероарил.

В некоторых вариантах осуществления,  $R^{X4}$  и  $R^{X4'}$  независимо выбраны из H,  $R^m$ , OH,  $OR^m$ , SH,  $SR^m$ ,  $NH_2$ ,  $NHR^m$ ,  $NR^mR^m$ ,  $NO_2$ ,  $Me_3SN$ , галогена,  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{1-6}$  алкокси,  $C_{2-6}$  алкенила,  $C_{2-6}$  алкинила,  $C_{3-6}$  циклоалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила,  $C_{5-12}$  5-7-гетероарила, -CN, -NCO, - $OR^n$ , - $OC(O)R^n$ , - $OC(O)NR^nR^n$ , - $OS(O)R^n$ , - $OS(O)_2R^n$ , - $SR^n$ , - $S(O)R^n$ , - $S(O)_2R^n$ , - $S(O)NR^nR^n$ , - $S(O)_2NR^nR^n$ , - $OS(O)NR^nR^n$ , - $OS(O)_2NR^nR^n$ , - $NR^nR^n$ , - $NR^nC(O)R^o$ , - $NR^nC(O)OR^o$ , - $NR^nC(O)NR^oR^o$ , - $NR^nS(O)R^o$ , - $NR^nS(O)_2R^o$ , - $NR^nS(O)NR^oR^o$ , - $NR^nS(O)_2NR^oR^o$ , - $C(O)R^n$ , - $C(O)OR^n$  и - $C(O)NR^nR^n$ ; и

$R^{X4}$  или  $R^{X4'}$  представляет собой  $C_{1-6}$  алкил,  $C_{1-6}$  алкокси,  $C_{2-6}$  алкенил,  $C_{2-6}$  алкинил,  $C_{3-6}$  циклоалкил, 3-7-членный гетероциклоалкил,  $C_{5-12}$  арил или 5-7-гетероарил, и дополнительно замещен по меньшей мере одним  $C_{1-6}$  алкилом,  $C_{1-6}$  алкокси,  $C_{2-6}$  алкенилом,  $C_{2-6}$  алкинилом,  $C_{3-6}$  циклоалкилом, 3-7-членным гетероциклоалкилом,  $C_{5-10}$  арилом, 5-7-гетероарилом, - $OR^p$ , - $OC(O)R^p$ , - $C(O)NR^pR^p$ , - $OS(O)R^p$ , - $OS(O)_2R^p$ , - $SR^p$ , - $S(O)R^p$ , - $S(O)_2R^p$ , - $S(O)NR^pR^p$ , - $S(O)_2NR^pR^p$ , - $OS(O)NR^pR^p$ , - $OS(O)_2NR^pR^p$ , - $NR^pR^p$ , - $NR^pC(O)R^q$ , - $NR^pC(O)OR^q$ , - $NR^pC(O)NR^qR^q$ , - $NR^pS(O)R^q$ , - $NR^pS(O)_2R^q$ , - $NR^pS(O)NR^qR^q$ , - $NR^pS(O)_2NR^qR^q$ , - $C(O)R^p$ , - $C(O)OR^p$  или - $C(O)NR^pR^p$ .

В некоторых вариантах осуществления,  $R^{X1}$  и  $R^{X1'}$  оба представляют собой  $R^m$ ; и  $R^m$  представляет собой  $C_{1-6}$  алкил,  $C_{2-6}$  алкенил,  $C_{5-7}$  арил или  $C_{3-6}$  гетероарил.

В некоторых вариантах осуществления,  $R^{X2}$ ,  $R^{X2'}$ ,  $R^{X3}$ ,  $R^{X3'}$ ,  $R^{X5}$  и  $R^{X5'}$  независимо выбраны из H или OH.

В некоторых вариантах осуществления,  $R^{X4}$  и  $R^{X4'}$  оба представляют собой  $R^m$ ; и  $R^m$  представляет собой  $C_{1-6}$  алкокси. В определенных предпочтительных вариантах осуществления,  $R^{X4}$  и  $R^{X4'}$  каждый независимо выбран из метокси, этокси и бутокси.

В некоторых вариантах осуществления, Y и Y' представляют собой O.

В некоторых вариантах осуществления,  $R^{X6}$  представляет собой  $C_{3-12}$  алкилен,  $C_{3-12}$  алкенилен или  $C_{3-12}$  гетероалкилен, где  $R^{X6}$  замещен - $NH_2$ , - $NHR^m$ , - $NHC(O)R^m$ , - $NHC(O)R^m$ , - $NHC(O)CH_2-[OCH_2CH_2]_n-R^{XX}$  или - $[CH_2CH_2O]_n-R^{XX}$ ;

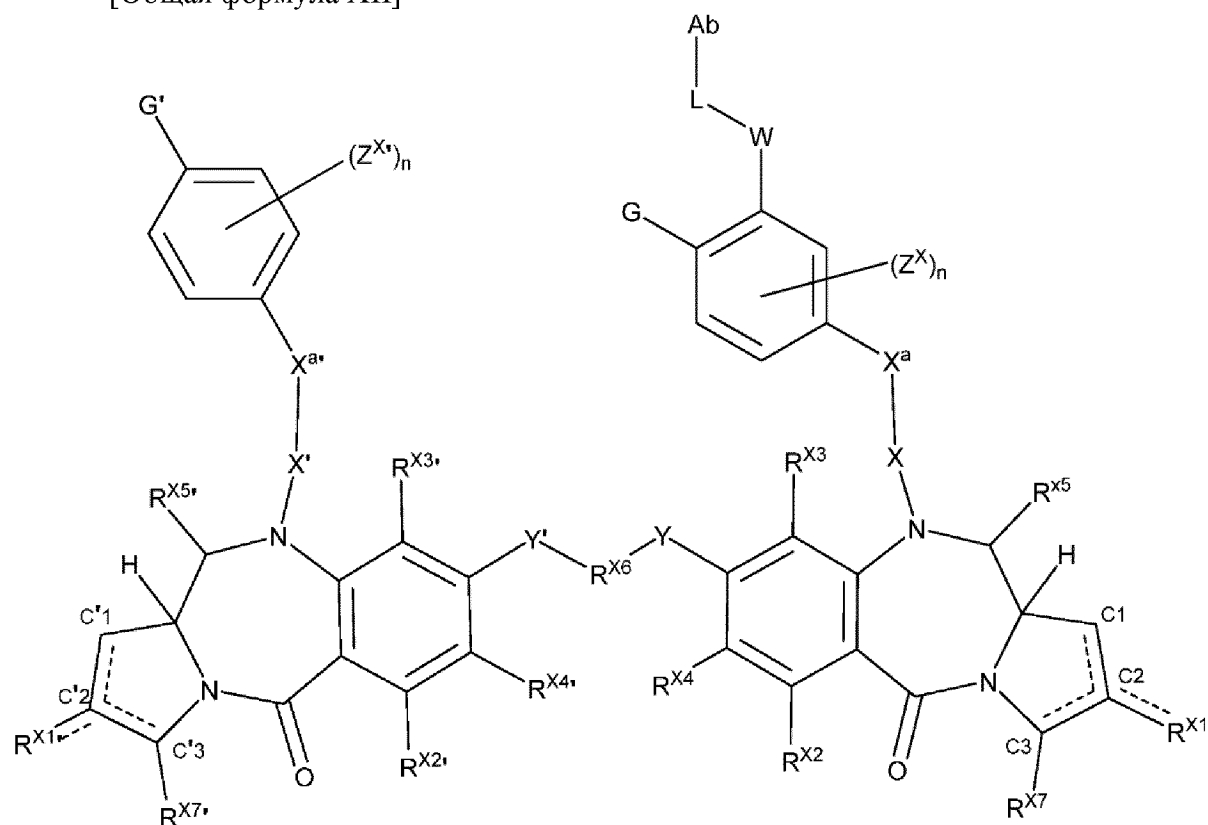
$R^{XX}$  представляет собой H, OH,  $N_3$ , CN,  $NO_2$ , SH,  $NH_2$ ,  $ONH_2$ ,  $NHNH_2$ , галоген,  $C_{1-8}$

алкил, C<sub>3-8</sub> циклоалкил, C<sub>1-8</sub> алкокси, C<sub>1-8</sub> алкилтио, C<sub>3-20</sub> гетероарил, C<sub>5-20</sub> арил или моно- или ди-C<sub>1-8</sub> алкиламино; и

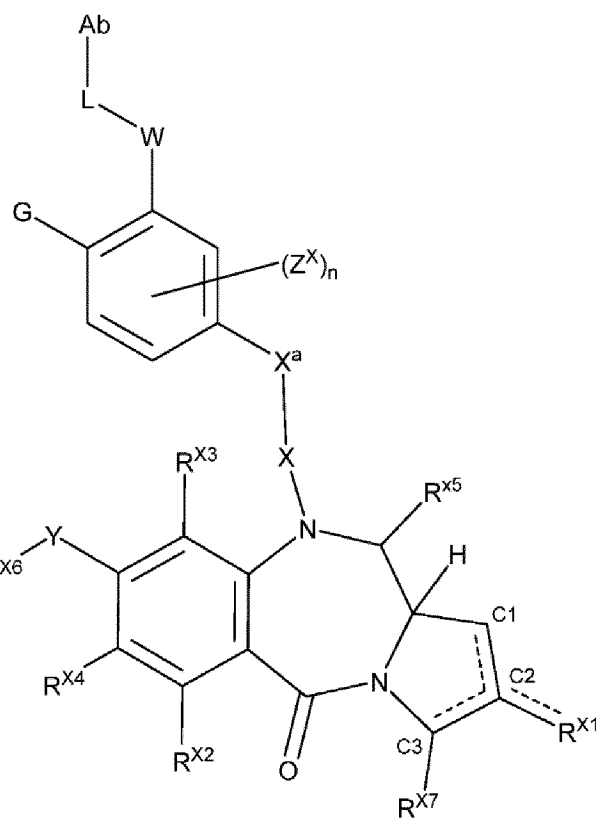
n представляет собой целое число 1-6.

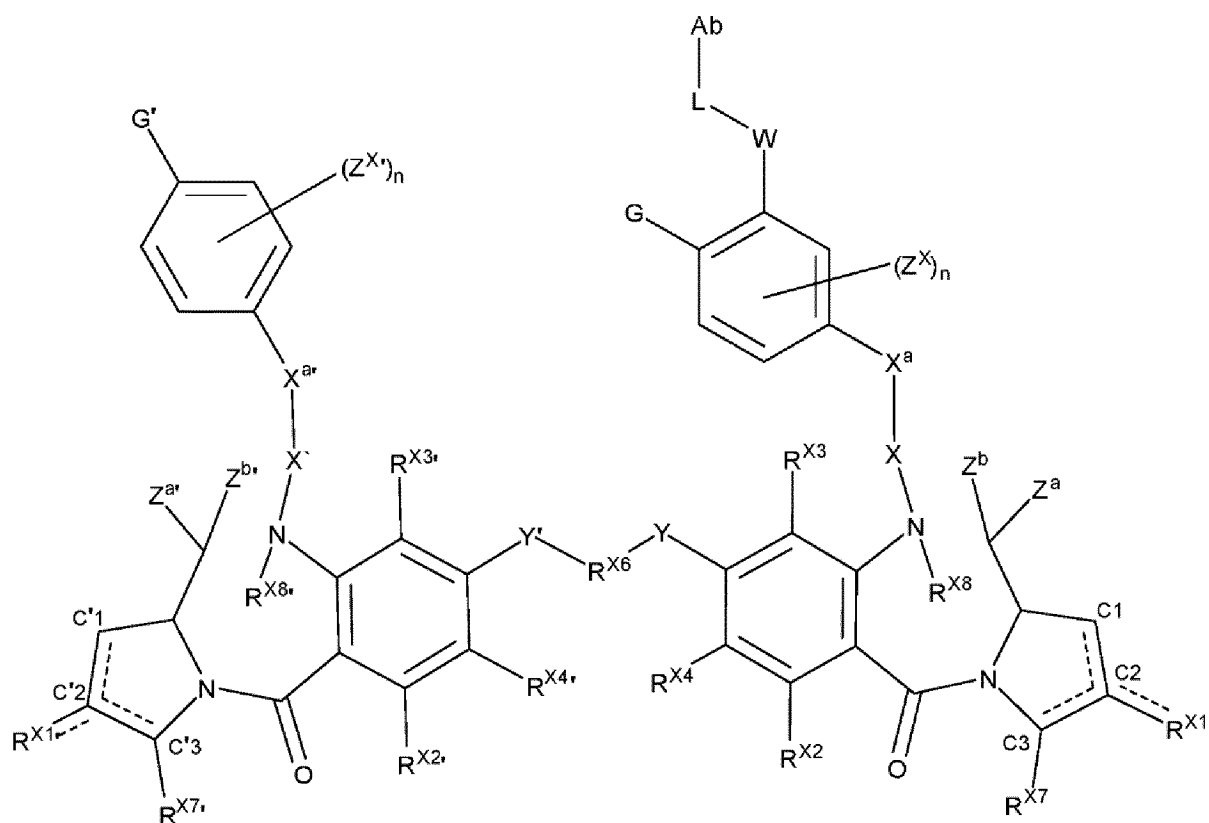
В некоторых вариантах осуществления, активный агент имеет структуру, представленную общей формулой XII или общей формулой XIII;

[Общая формула XII]



[Общая формула XIII]

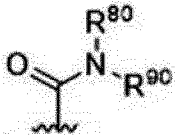
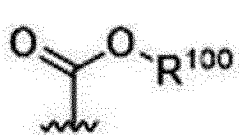




где

$X^a$  и  $X^{a'}$  каждый независимо представляет собой связь или  $C_{1-6}$  алкилен;

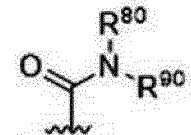
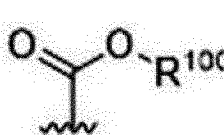
$Z^{X'}$  и  $Z^X$  каждый независимо выбран из водорода,  $C_{1-8}$  алкила, галогена, циано,

нитро, , , и  $-(CH_2)_m-OCH_3$ ;

каждый  $R^{80}$ ,  $R^{90}$  и  $R^{100}$  независимо выбран из водорода,  $C_{1-8}$  алкила,  $C_{2-6}$  алкенила и  $C_{1-6}$  алкокси; и

$m$  представляет собой целое число 0-12.

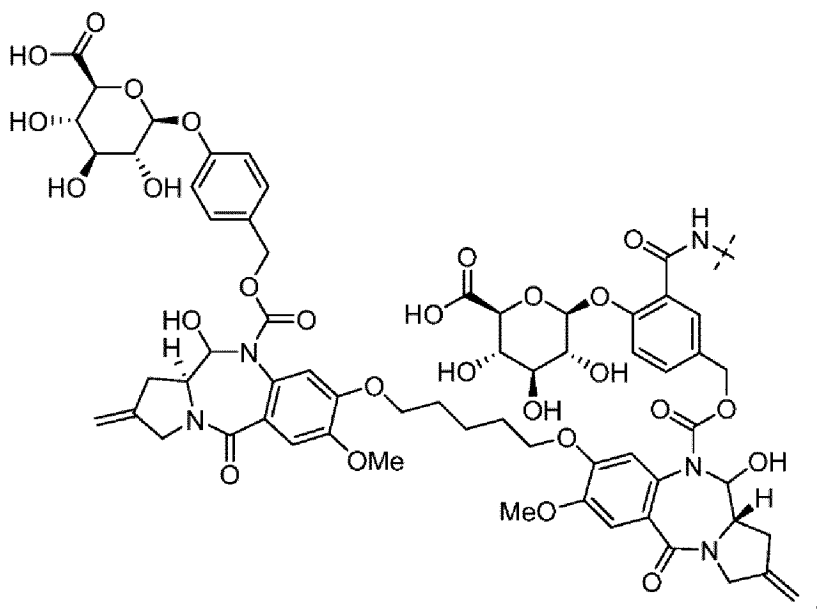
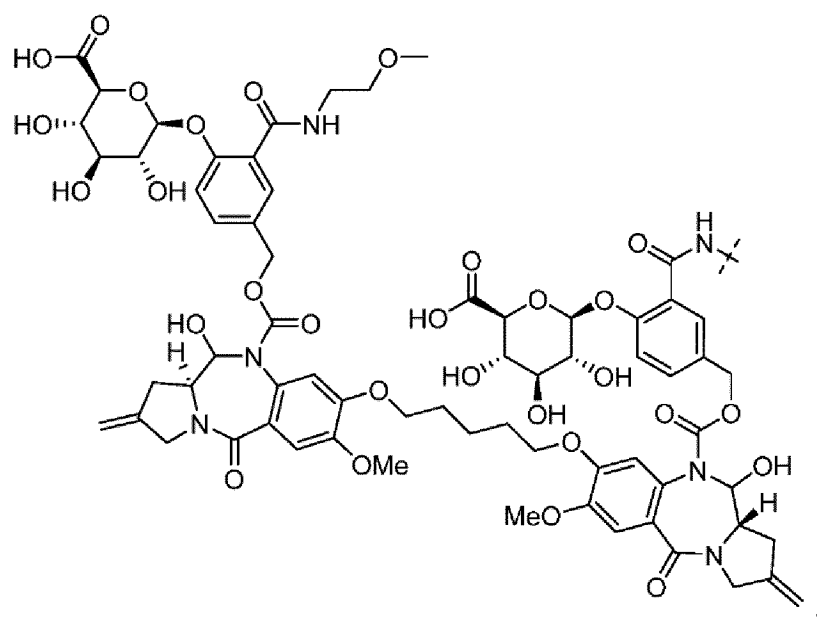
В некоторых вариантах осуществления,  $Z^{X'}$  и  $Z^X$  каждый независимо выбран из

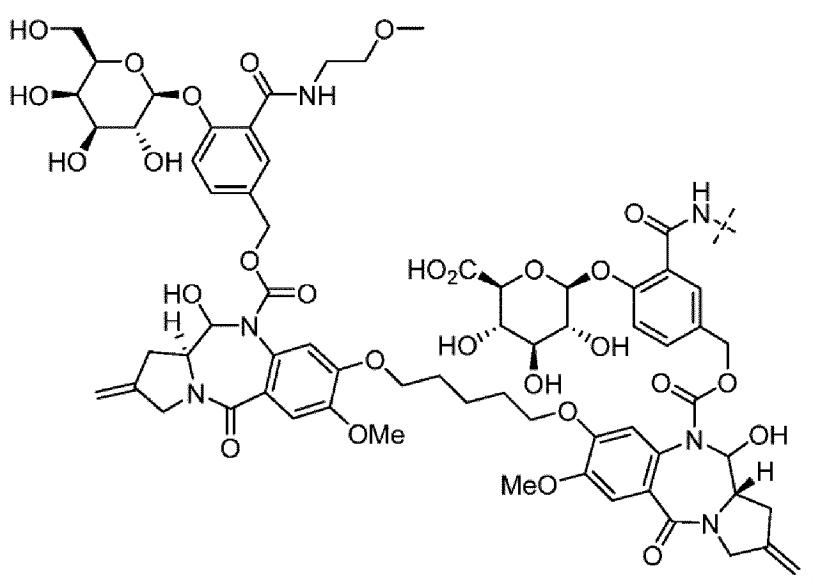
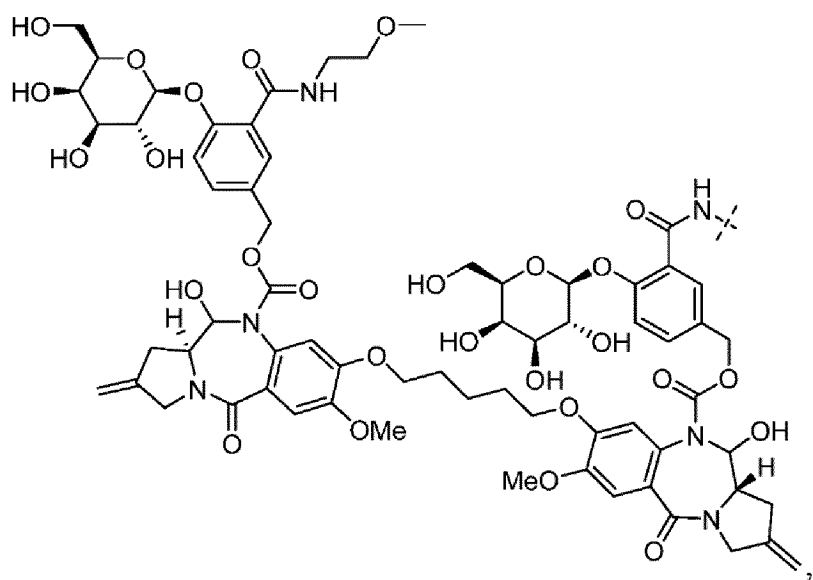
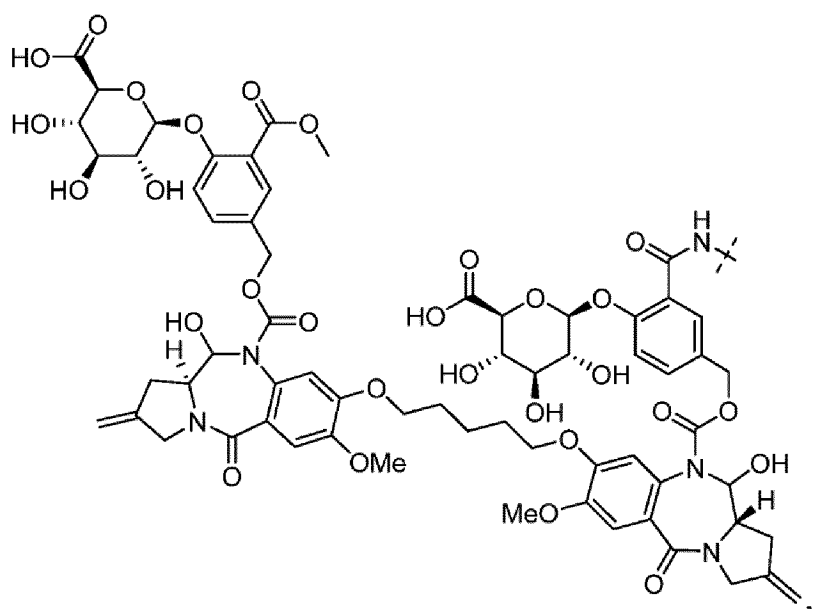
водорода, , , и  $-(CH_2)_m-OCH_3$ ;

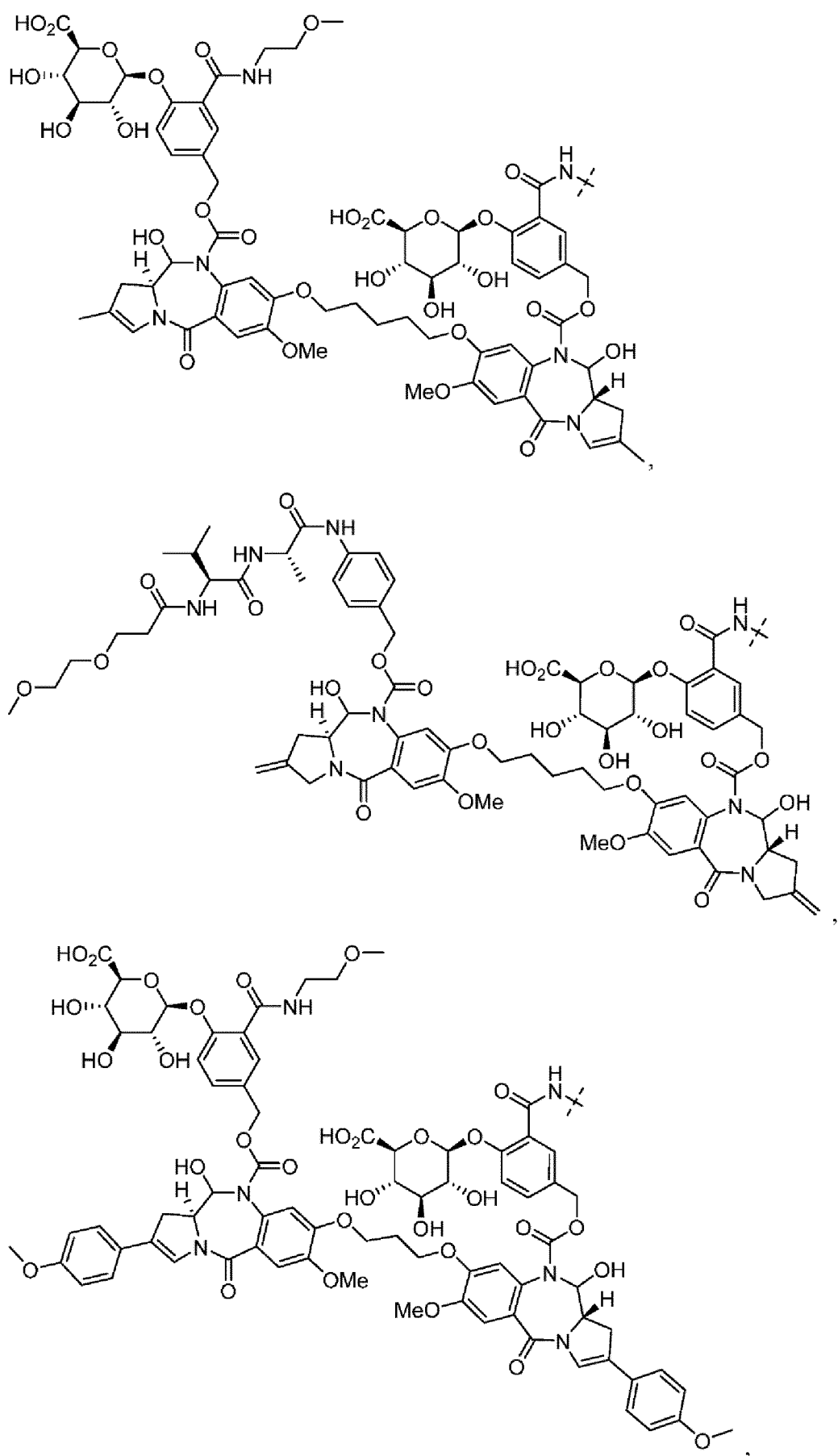
$R^{80}$ ,  $R^{90}$  и  $R^{100}$  каждый независимо выбран из водорода,  $C_{1-3}$  алкила и  $C_{1-3}$  алкокси; и

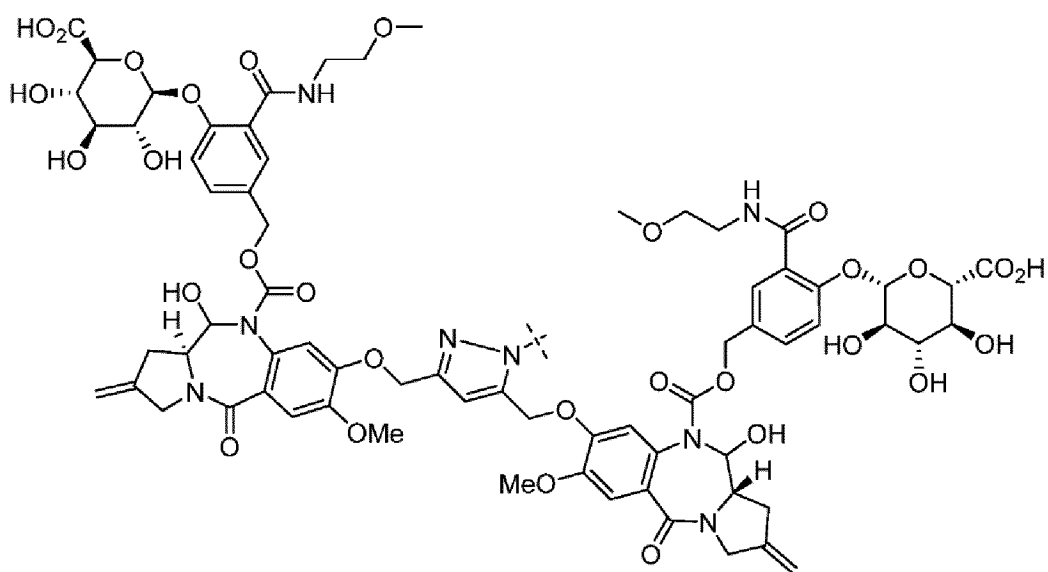
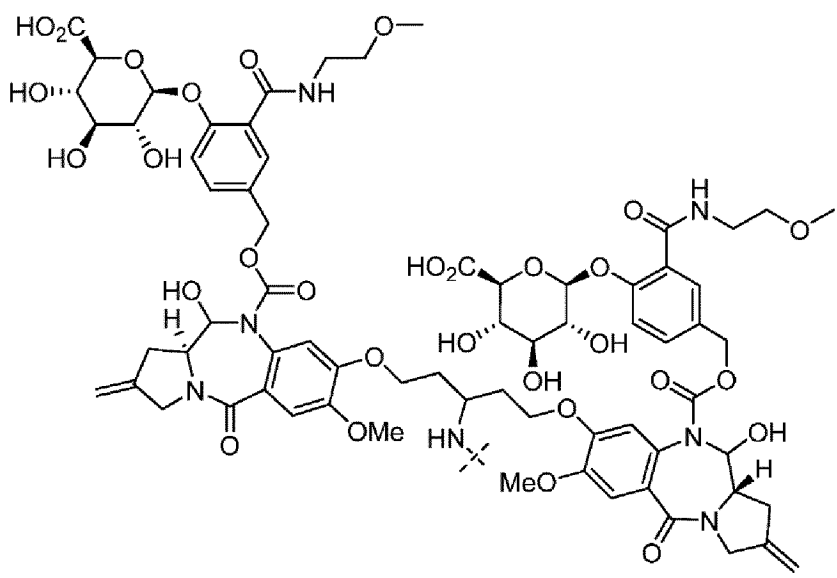
$m$  представляет собой целое число 1-6.

В определенных предпочтительных вариантах осуществления, активный агент выбран из:

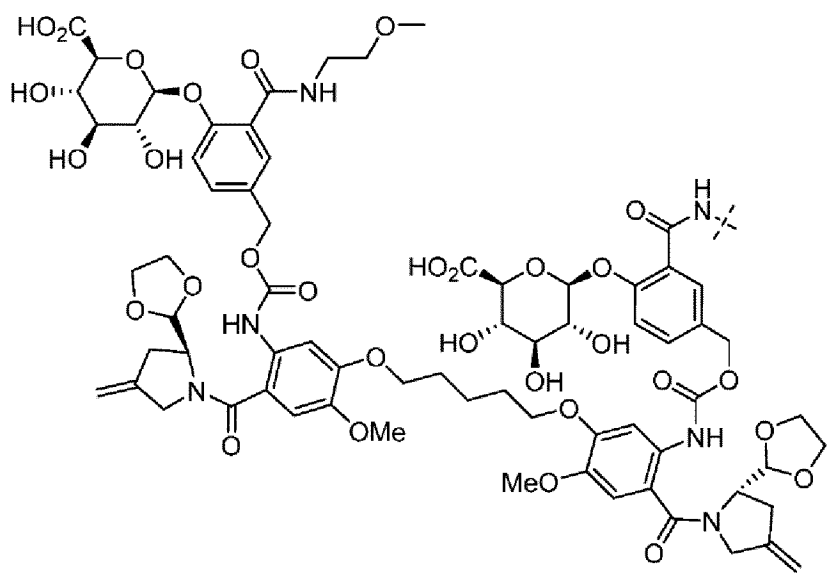








и



или их фармацевтически приемлемой соли; и  
 связь, наложенная с пунктирной линией, представляет собой точку соединения с L.  
 В еще одном аспекте, настоящее описание представляет способы лечения

заболевания или нарушения, связанного с суперэкспрессией ROR1 у субъекта, включающие введение конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему описанию или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления, заболевание или нарушение, связанное с суперэкспрессией ROR1, представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления, рак выбран из хронического лимфолейкоза (CLL), В-клеточного лейкоза, лимфомы, острого миелоидного лейкоза (AML), лимфомы Беркитта, мантийно-клеточной лимфомы (MCL), острого лимфобластного лейкоза (ALL), диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), фолликулярной лимфомы (FL) и лимфомы маргинальной зоны (MZL), рака молочной железы, рака почки, рака яичников, рака желудка, рака печени, рака легких, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака мочевого пузыря, рака яичек, рака матки, рака предстательной железы, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), нейробластомы, рака головного мозга, рака толстой кишки, плоскоклеточной карциномы, меланомы, миеломы, рака шейки матки, рака щитовидной железы, рака головы и шеи и рака надпочечников.

В дополнительном аспекте, настоящее описание относится к способам лечения рака у субъекта, включающим введение конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему описанию или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления, рак выбран из хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), В-клеточного лейкоза, лимфомы, острого миелоидного лейкоза (AML), лимфомы Беркитта, мантийно-клеточной лимфомы (MCL), острого лимфобластного лейкоза (ALL), диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), фолликулярной лимфомы (FL) и лимфомы маргинальной зоны (MZL), рака молочной железы, рака почки, рака яичников, рака желудка, рака печени, рака легких, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака мочевого пузыря, рака яичек, рака матки, рака предстательной железы, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), нейробластомы, рака головного мозга, рака толстой кишки, плоскоклеточной карциномы, меланомы, миеломы, рака шейки матки, рака щитовидной железы, рака головы и шеи и рака надпочечников.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство общей формулы Ia ниже:

[Общая формула Ia]

Ab-(линкер-D)<sub>n</sub>,

Где:

Ab представляет собой анти-ROR1 антитело;

Линкер представляет собой линкер;

D представляет собой димер пирролобензодиазепина в качестве активного агента;

и

Линкер и антитело связаны через N10 или N10' положение димера пирролобензодиазепина.

В настоящем изобретении, пролекарство димера пирролобензодиазепина, где в N10

и N10' положениях димера пирролобензодиазепина, соответственно и независимо, присоединен любой, выбранный из группы, состоящей из  $-C(O)O^*$ ,  $-S(O)O^*$ ,  $-C(O)^*$ ,  $-C(O)NR^*$ ,  $-S(O)_2NR^*$ ,  $-(P(O)R')NR^*$ ,  $-S(O)NR^*$  и  $-PO_2NR^*$  групп;

$R^X$  и  $R^{X'}$  независимо выбраны из H, OH,  $N_3$ , CN,  $NO_2$ , SH,  $NH_2$ ,  $ONH_2$ ,  $NHNH_2$ , галогена,  $C_{1-8}$  алкила,  $C_{3-8}$  циклоалкила,  $C_{1-8}$  алкокси,  $C_{1-8}$  алкилтио,  $C_{3-20}$  гетероарила,  $C_{5-20}$  арила или моно- или (ди)- $C_{1-8}$  алкиламино,

где \* является областью, где присоединен линкер;

R и R', соответственно и независимо, представляют собой H, OH,  $N_3$ , CN,  $NO_2$ , SH,  $NH_2$ ,  $ONH_2$ ,  $NHNH_2$ , галоген, замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкил, замещенный или незамещенный  $C_{3-8}$  циклоалкил, замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкокси, замещенный или незамещенный  $C_{1-8}$  алкилтио, замещенный или незамещенный  $C_{3-20}$  гетероарил, замещенный или незамещенный  $C_{5-20}$  арил или моно- или ди- $C_{1-8}$  алкиламино;

и

где, в случае, если  $C_{1-8}$  алкил,  $C_{3-8}$  циклоалкил,  $C_{1-8}$  алкокси,  $C_{1-8}$  алкилтио,  $C_{3-20}$  гетероарил или  $C_{5-20}$  арил замещен, замещение происходит замещающей группой, выбранной из группы, включающей H, OH,  $N_3$ , CN,  $NO_2$ , SH,  $NH_2$ ,  $ONH_2$ ,  $NNH_2$ , галоген,  $C_{1-6}$  алкил,  $C_{1-6}$  алкокси и  $C_{6-12}$  арил или его фармацевтически приемлемая соль или сольват могут применяться в качестве активного агента.

Более конкретно, замещение происходит с X в положении N10 или с X' в положении N'10 димера пирролобензодиазепина, где X или X' связывает димер пирролобензодиазепина с линкером;

X и X' выбраны, соответственно и независимо, из  $-C(O)O^*$ ,  $-S(O)O^*$ ,  $-C(O)^*$ ,  $-C(O)NR^X$ ,  $-S(O)_2NR^X$ ,  $-P(O)R'NR^X$ ,  $-S(O)NR^X$  или  $-PO_2NR^X$ ; и

$R^X$  и  $R^{X'}$  независимо выбраны из H, OH,  $N_3$ , CN,  $NO_2$ , SH,  $NH_2$ ,  $ONH_2$ ,  $NHNH_2$ , галогена,  $C_{1-8}$  алкила,  $C_{3-8}$  циклоалкила,  $C_{1-8}$  алкокси,  $C_{1-8}$  алкилтио,  $C_{3-20}$  гетероарила,  $C_{5-20}$  арила или моно- или ди- $C_{1-8}$  алкиламино.

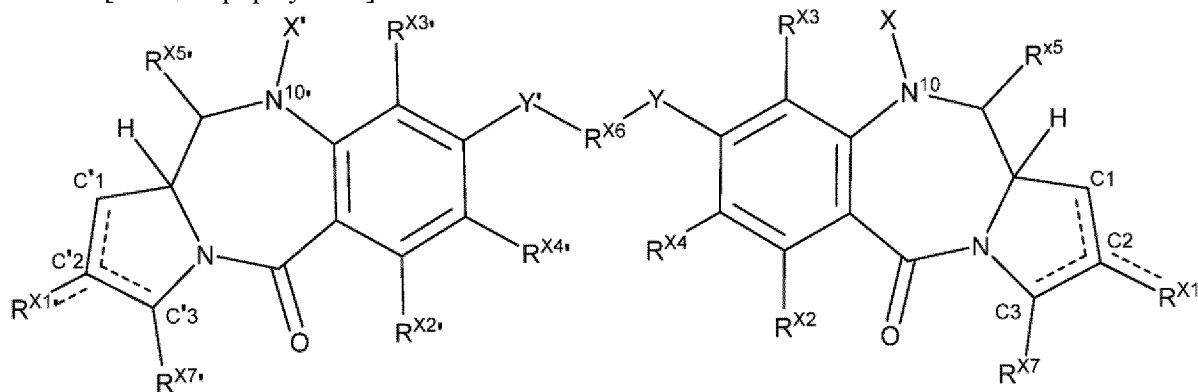
В некоторых вариантах осуществления, представлен предшественник димера пирролобензодиазепина. В случае введения в форме предшественника в соответствии с настоящим изобретением, существуют преимущества по сравнению с обычными препаратами PBD в том, что: необходимы дополнительные реакции для превращения в эффективное лекарство при воздействии крови, предотвращая потенциальные побочные реакции, которые могут возникнуть при преждевременном расщеплении линкера; при этом снижается токсичность для нормальных клеток и лекарственное средство становится более стабильным.

Кроме того, при получении конъюгатов антитело-лекарственное средство, конъюгат антитело-лекарственное средство, полученный с использованием обычных способов, имеет высокое содержание примесей, и открытая иминовая группа подвергается нуклеофильной атаке, что создает риск образования лекарственного средства нежелательной структуры. С другой стороны, конъюгат антитело-лекарственное средство, полученный с использованием способа в соответствии с настоящим изобретением, имеет

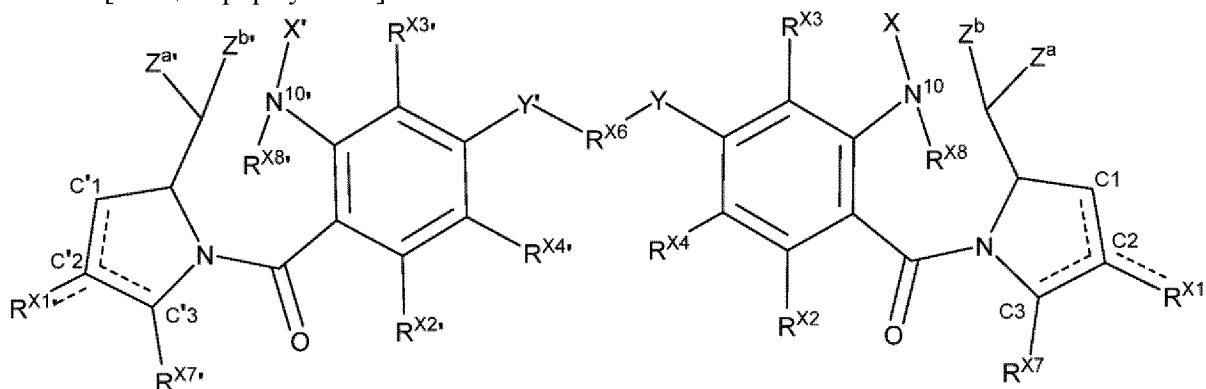
преимущество в простоте выделения благодаря высокой чистоте и дополнительным улучшенным физическим свойствам по сравнению с обычным PBD или димером PBD.

В некоторых вариантах осуществления предшественник димера пирролобензодиазепина представляет собой предшественник димера пирролобензодиазепина, в котором он имеет структуру общей формулы X или общей формулы XI, приведенной ниже или его фармацевтически приемлемую соль или сольват:

[Общая формула X]



[Общая формула XI]



В представленных выше формулах:

пунктирные линии означают селективное существование двойных связей между C1 и C2, между C2 и C3, между C'1 и C'2 или между C'2 и C'3;

R<sup>X1</sup> и R<sup>X1'</sup> независимо выбраны из H, OH, =O, =CH<sub>2</sub>, CN, R<sup>m</sup>, OR<sup>m</sup>, =CH-R<sup>m</sup>, =C(R<sup>m</sup>)<sub>2</sub>, O-SO<sub>2</sub>-R<sup>m</sup>, CO<sub>2</sub>R<sup>m</sup>, COR<sup>m</sup>, галогена и дигалогена;

R<sup>m</sup> выбран из R<sup>m</sup>, CO<sub>2</sub>R<sup>m</sup>, COR<sup>m</sup>, CHO, CO<sub>2</sub>H и галогена;

каждый R<sup>m</sup> независимо выбран из C<sub>1-12</sub> алкила, C<sub>2-12</sub> алкенила, C<sub>2-12</sub> алкинила, C<sub>5-20</sub> арила, C<sub>5-20</sub> гетероарила, C<sub>3-6</sub> циклоалкила, 3-7-членного гетероцикла, 3-7-членного гетероциклоалкила и 5-7-гетероарила;

R<sup>X2</sup>, R<sup>X2'</sup>, R<sup>X3</sup>, R<sup>X3'</sup>, R<sup>X5</sup> и R<sup>X5'</sup> независимо выбраны из H, R<sup>m</sup>, OH, OR<sup>m</sup>, SH, SR<sup>m</sup>, NH<sub>2</sub>, NHR<sup>m</sup>, NR<sup>m</sup><sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, Me<sub>3</sub>SN и галогена;

R<sup>X4</sup> и R<sup>X4'</sup> независимо выбраны из H, R<sup>m</sup>, OH, OR<sup>m</sup>, SH, SR<sup>m</sup>, NH<sub>2</sub>, NHR<sup>m</sup>, NR<sup>m</sup><sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, Me<sub>3</sub>SN, галогена, C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> алкокси, C<sub>2-6</sub> алкенила, C<sub>2-6</sub> алкинила, 3-7-членного гетероцикла, C<sub>5-12</sub> арила, 5-7-гетероарила, -CN, -NCO, -OR<sup>n</sup>, -OC(O)R<sup>n</sup>, -OC(O)NR<sup>n</sup>R<sup>n</sup>, -OS(O)R<sup>n</sup>, -OS(O)<sub>2</sub>R<sup>n</sup>, -SR<sup>n</sup>, -S(O)R<sup>n</sup>, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>n</sup>, -S(O)NR<sup>n</sup>R<sup>n</sup>, -S(O)<sub>2</sub>NR<sup>n</sup>R<sup>n</sup>, -OS(O)NR<sup>n</sup>R<sup>n</sup>, -

$\text{OS(O)}_2\text{NR}^n\text{R}^n$ ,  $-\text{NR}^n\text{R}^n$ ,  $-\text{NR}^n\text{C(O)}\text{R}^o$ ,  $-\text{NR}^n\text{C(O)}\text{OR}^o$ ,  $-\text{NR}^n\text{C(O)}\text{NR}^o\text{R}^o$ ,  $-\text{NR}^n\text{S(O)}\text{R}^o$ ,  $-\text{NR}^n\text{S(O)}_2\text{R}^o$ ,  $-\text{NR}^n\text{S(O)}\text{NR}^o\text{R}^o$ ,  $-\text{NR}^n\text{S(O)}_2\text{NR}^o\text{R}^o$ ,  $-\text{C(O)}\text{R}^n$ ,  $-\text{C(O)}\text{OR}^n$  и  $-\text{C(O)}\text{NR}^n\text{R}^n$ ;

X и X' независимо выбраны из  $-\text{C(O)}\text{O}^*$ ,  $-\text{S(O)}\text{O}^*$ ,  $-\text{C(O)}^*$ ,  $-\text{C(O)}\text{NR}^X^*$ ,  $-\text{S(O)}_2\text{NR}^X^*$ ,  $-\text{P(O)}\text{R}^*\text{NR}^X^*$ ,  $-\text{S(O)}\text{NR}^X^*$  или  $-\text{PO}_2\text{NR}^X^*$ ;

$\text{R}^X$  и  $\text{R}^{X'}$  независимо выбраны из H, OH,  $\text{N}_3$ , CN,  $\text{NO}_2$ , SH,  $\text{NH}_2$ ,  $\text{ONH}_2$ ,  $\text{NHNH}_2$ , галогена,  $\text{C}_{1-8}$  алкила,  $\text{C}_{3-8}$  циклоалкила,  $\text{C}_{1-8}$  алкокси,  $\text{C}_{1-8}$  алкилтио,  $\text{C}_{3-20}$  гетероарила,  $\text{C}_{5-20}$  арила или моно- или ди- $\text{C}_{1-8}$  алкиламино;

Y и Y' независимо выбраны из O, S и N(H);

$\text{R}^{X6}$  независимо выбран из  $\text{C}_{3-12}$  алкилена,  $\text{C}_{3-12}$  алкенилена или  $\text{C}_{3-12}$  гетероалкилена;

$\text{R}^{X7}$  и  $\text{R}^{X7'}$  независимо выбраны из H,  $\text{C}_{1-6}$  алкила,  $\text{C}_{2-6}$  алкенила,  $\text{C}_{2-6}$  алкинила,  $\text{C}_{3-6}$  циклоалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила,  $\text{C}_{6-10}$  арила, 5-7-гетероарила,  $-\text{OR}^r$ ,  $-\text{OC(O)}\text{R}^r$ ,  $-\text{OC(O)}\text{NR}^r\text{R}^r$ ,  $-\text{OS(O)}\text{R}^r$ ,  $-\text{OS(O)}_2\text{R}^r$ ,  $-\text{SR}^r$ ,  $-\text{S(O)}\text{R}^r$ ,  $-\text{S(O)}_2\text{R}^r$ ,  $-\text{S(O)}\text{NR}^r\text{R}^r$ ,  $-\text{S(O)}_2\text{NR}^r\text{R}^r$ ,  $-\text{OS(O)}\text{NR}^r\text{R}^r$ ,  $-\text{OS(O)}_2\text{NR}^r\text{R}^r$ ,  $-\text{NR}^r\text{R}^r$ ,  $-\text{NR}^r\text{C(O)}\text{R}^s$ ,  $-\text{NR}^r\text{C(O)}\text{OR}^s$ ,  $-\text{NR}^r\text{C(O)}\text{NR}^s\text{R}^s$ ,  $-\text{NR}^r\text{S(O)}\text{R}^s$ ,  $-\text{NR}^r\text{S(O)}_2\text{R}^s$ ,  $-\text{NR}^r\text{S(O)}\text{NR}^s\text{R}^s$ ,  $-\text{NR}^r\text{S(O)}_2\text{NR}^s\text{R}^s$ ,  $-\text{C(O)}\text{R}^r$ ,  $-\text{C(O)}\text{OR}^s$  или  $-\text{C(O)}\text{NR}^r\text{R}^r$ ;

каждый  $\text{R}^r$ ,  $\text{R}^s$  и  $\text{R}^{s'}$  независимо выбран из H,  $\text{C}_{1-7}$  алкила,  $\text{C}_{2-7}$  алкенила,  $\text{C}_{2-7}$  алкинила,  $\text{C}_{3-13}$  циклоалкила, 3-7-членного гетероциклила, 3-7-членного гетероциклоалкила,  $\text{C}_{5-10}$  арила и 5-7-гетероарила;

каждый  $\text{R}^{X8}$  и  $\text{R}^{X8'}$  независимо выбран из H,  $\text{C}_{1-6}$  алкила,  $\text{C}_{2-6}$  алкенила,  $\text{C}_{2-6}$  алкинила,  $\text{C}_{3-6}$  гетероалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила,  $\text{C}_{5-10}$  арила, 5-7-гетероарила,  $-\text{S(O)}\text{R}^m$ ,  $-\text{S(O)}_2\text{R}^m$ ,  $-\text{S(O)}\text{NR}^m\text{R}^m$ ,  $-\text{S(O)}_2\text{NR}^m\text{R}^m$ ,  $-\text{NR}^m\text{R}^m$ ,  $-\text{NR}^m\text{C(O)}\text{R}^m$ ,  $-\text{NR}^m\text{C(O)}\text{OR}^n$ ,  $-\text{NR}^m\text{C(O)}\text{NR}^n\text{R}^n$ ,  $-\text{NR}^m\text{S(O)}\text{R}^n$ ,  $-\text{NR}^m\text{S(O)}_2\text{R}^n$ ,  $-\text{NR}^m\text{S(O)}\text{NR}^n\text{R}^n$ ,  $-\text{NR}^m\text{S(O)}_2\text{NR}^n\text{R}^n$ ,  $-\text{C(O)}\text{R}^m$ ,  $-\text{C(O)}\text{OR}^m$  и  $-\text{C(O)}\text{NR}^m\text{R}^m$ ;

$\text{Z}^a$  выбран из  $\text{OR}^{X12a}$ ,  $\text{NR}^{X12a}\text{R}^{X12a}$  или  $\text{SR}^{X12a}$ ;

$\text{Z}^b$  выбран из  $\text{OR}^{X13a}$ ,  $\text{NR}^{X13a}\text{R}^{X13a}$  или  $\text{SR}^{X13a}$ ;

$\text{Z}^{a'}$  выбран из  $\text{OR}^{X12a'}$ ,  $\text{NR}^{X12a'}\text{R}^{X12a'}$  или  $\text{SR}^{X12a'}$ ;

$\text{Z}^{b'}$  выбран из  $\text{OR}^{X13a'}$ ,  $\text{NR}^{X13a'}\text{R}^{X13a'}$  или  $\text{SR}^{X13a'}$ ;

каждый  $\text{R}^{X12a}$ ,  $\text{R}^{X12a'}$ ,  $\text{R}^{X13a}$  и  $\text{R}^{X13a'}$  независимо выбран из H,  $\text{C}_{1-6}$  алкила,  $\text{C}_{2-6}$  алкенила,  $\text{C}_{2-6}$  алкинила,  $\text{C}_{3-6}$  циклоалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила,  $\text{C}_{5-10}$  арила, 5-7-гетероарила,  $-\text{C(O)}\text{R}^{X15a}$ ,  $-\text{C(O)}\text{OR}^{X15a}$  и  $-\text{C(O)}\text{NR}^{X15a}\text{R}^{X15a'}$ ; и

каждый  $\text{R}^{X15a}$  и  $\text{R}^{X15a'}$  независимо выбран из  $\text{C}_{1-12}$  алкила,  $\text{C}_{2-12}$  алкенила,  $\text{C}_{2-12}$  алкинила,  $\text{C}_{5-20}$  арила,  $\text{C}_{5-20}$  гетероарила,  $\text{C}_{3-6}$  циклоалкила, 3-7-членного гетероциклила, 3-7-членного гетероциклоалкила и 5-7-гетероарила, и:

$\text{R}^{X13a}$  и  $\text{R}^{X14a}$  произвольно связаны с атомами, к которым они присоединены, с образованием 3-7-членного гетероциклила, 3-7-членного гетероциклоалкила или 3-7-членного гетероарила, и  $\text{R}^{X13a'}$  и  $\text{R}^{X14a'}$  произвольно связаны с атомами, к которым они присоединены, с образованием 3-7-членного гетероциклила, 3-7-членного гетероциклоалкила или 3-7-членного гетероарила; и

каждый из  $\text{R}^n$ ,  $\text{R}^{n'}$ ,  $\text{R}^o$ ,  $\text{R}^{o'}$ ,  $\text{R}^p$  и  $\text{R}^{p'}$  независимо выбран из H,  $\text{C}_{1-7}$  алкила,  $\text{C}_{2-7}$  алкенила,  $\text{C}_{2-7}$  алкинила,  $\text{C}_{3-13}$  циклоалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила,  $\text{C}_{5-10}$  арила и

5-7-гетероарила.

Дополнительно,  $R^m$  независимо выбран из  $C_{1-12}$  алкила,  $C_{2-12}$  алкенила,  $C_{2-12}$  алкинила,  $C_{5-20}$  арила,  $C_{5-20}$  гетероарила,  $C_{3-6}$  циклоалкила, 3-7-членного гетероцикла, 3-7-членного гетероциклоалкила и 5-7-гетероарила; и

$R^m$  дополнительно замещен  $C_{1-12}$  алкилом,  $C_{2-12}$  алкенилом,  $C_{2-12}$  алкинилом,  $C_{5-20}$  арилом,  $C_{5-20}$  гетероарилом,  $C_{3-6}$  циклоалкилом, 3-7-членным гетероциклином, 3-7-членным гетероциклоалкилом или 5-7-гетероарилом.

Дополнительно,  $R^{x4}$  и  $R^{x4'}$  независимо выбраны из H,  $R^m$ , OH,  $OR^m$ , SH,  $SR^m$ ,  $NH_2$ ,  $NHR^m$ ,  $NR^mR^m$ ,  $NO_2$ ,  $Me_3Sn$ , галогена,  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{1-6}$  алкокси,  $C_{2-6}$  алкенила,  $C_{2-6}$  алкинила,  $C_{3-6}$  циклоалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила,  $C_{5-12}$  арила, 5-7-гетероарила, -CN, -NCO, - $OR^n$ , - $OC(O)R^n$ , - $OC(O)NR^nR^n$ , - $OS(O)R^n$ , - $OS(O)_2R^n$ , - $SR^n$ , - $S(O)R^n$ , - $S(O)_2R^n$ , - $S(O)NR^nR^n$ , - $S(O)_2NR^nR^n$ , - $OS(O)NR^nR^n$ , - $OS(O)_2NR^nR^n$ , - $NR^nR^n$ , - $NR^nC(O)R^o$ , - $NR^nC(O)OR^o$ , - $NR^nC(O)NR^oR^o$ , - $NR^nS(O)R^o$ , - $NR^nS(O)_2R^o$ , - $NR^nS(O)NR^oR^o$ , - $NR^nS(O)_2NR^oR^o$ , - $C(O)R^n$ , - $C(O)OR^n$  и - $C(O)NR^nR^n$ ; и

$R^{x4}$  или  $R^{x4'}$  представляет собой  $C_{1-6}$  алкил,  $C_{1-6}$  алкокси,  $C_{2-6}$  алкенил,  $C_{2-6}$  алкинил,  $C_{3-6}$  циклоалкил, 3-7-членный гетероциклоалкил,  $C_{5-12}$  арил или 5-7-гетероарил, и дополнительно замещен по меньшей мере одним  $C_{1-6}$  алкилом,  $C_{1-6}$  алкокси,  $C_{2-6}$  алкенилом,  $C_{2-6}$  алкинилом,  $C_{3-6}$  циклоалкилом, 3-7-членным гетероциклоалкилом,  $C_{5-10}$  арилом, 5-7-гетероарилом, - $OR^p$ , - $OC(O)R^p$ , - $OC(O)NR^pR^p$ , - $OS(O)R^p$ , - $OS(O)_2R^p$ , - $SR^p$ , - $S(O)R^p$ , - $S(O)_2R^p$ , - $S(O)NR^pR^p$ , - $S(O)_2NR^pR^p$ , - $OS(O)NR^pR^p$ , - $OS(O)_2NR^pR^p$ , - $NR^pR^p$ , - $NR^pC(O)R^q$ , - $NR^pC(O)OR^q$ , - $NR^pC(O)NR^qR^q$ , - $NR^pS(O)R^q$ , - $NR^pS(O)_2R^q$ , - $NR^pS(O)NR^qR^q$ , - $NR^pS(O)_2NR^qR^q$ , - $C(O)R^p$ , - $C(O)OR^p$  или - $C(O)NR^pR^p$ .

Дополнительно,  $R^{x7}$  и  $R^{x7'}$  независимо выбраны из H,  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{2-6}$  алкенила,  $C_{2-6}$  алкинила,  $C_{3-6}$  циклоалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила,  $C_{6-10}$  арила, 5-7-гетероарила, - $OR^r$ , - $OC(O)R^r$ , - $OC(O)NR^rR^r$ , - $OS(O)R^r$ , - $OS(O)_2R^r$ , - $SR^r$ , - $S(O)R^r$ , - $S(O)_2R^r$ , - $S(O)NR^rR^r$ , - $S(O)_2NR^rR^r$ , - $OS(O)NR^rR^r$ , - $OS(O)_2NR^rR^r$ , - $NR^rR^r$ , - $NR^rC(O)R^s$ , - $NR^rC(O)OR^s$ , - $NR^rC(O)NR^sR^s$ , - $NR^rS(O)R^s$ , - $NR^rS(O)_2R^s$ , - $NR^rS(O)NR^sR^s$ , - $NR^rS(O)_2NR^sR^s$ , - $C(O)R^r$ , - $C(O)OR^r$  или - $C(O)NR^rR^r$ ;

$R^{x7}$  и  $R^{x7'}$  независимо выбраны из  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{2-6}$  алкенила,  $C_{2-6}$  алкинила,  $C_{3-6}$  циклоалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила,  $C_{6-10}$  арила, 5-7-гетероарила, а также  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{2-6}$  алкенила,  $C_{2-6}$  алкинила,  $C_{3-6}$  циклоалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила,  $C_{6-10}$  арила, 5-7-гетероарила, - $OR^t$ , - $OC(O)R^t$ , - $OC(O)NR^tR^t$ , - $OS(O)R^t$ , - $OS(O)_2R^t$ , - $SR^t$ , - $S(O)R^t$ , - $S(O)_2R^t$ , - $S(O)NR^tR^t$ , - $S(O)_2NR^tR^t$ , - $OS(O)NR^tR^t$ , - $OS(O)_2NR^tR^t$ , - $NR^tR^t$ , - $NR^tC(O)R^u$ , - $NR^tC(O)OR^u$ , - $NR^tC(O)NR^uR^u$ , - $NR^tS(O)R^u$ , - $NR^tS(O)_2R^u$ , - $NR^tS(O)NR^uR^u$ , - $NR^tS(O)_2NR^uR^u$ , - $C(O)R^t$ , - $C(O)OR^t$  или - $C(O)NR^tR^t$ ; и

$R^r$ ,  $R^r$ ,  $R^s$ ,  $R^s$ ,  $R^t$ ,  $R^t$ ,  $R^u$  и  $R^u$  независимо выбраны из H,  $C_{1-7}$  алкила,  $C_{2-7}$  алкенила,  $C_{2-7}$  алкинила,  $C_{3-13}$  циклоалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила,  $C_{5-10}$  арила и 5-7-гетероарила.

Дополнительно,  $R^{x1}$  и  $R^{x1'}$  независимо выбраны из  $R^m$ ; и

$R^m$  выбран из  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{2-6}$  алкенила,  $C_{5-7}$  арила и  $C_{3-6}$  гетероарила.

Дополнительно,  $R^{X2}$ ,  $R^{X2'}$ ,  $R^{X3}$ ,  $R^{X3'}$ ,  $R^{X5}$  и  $R^{X5'}$ , независимо выбраны из H или OH.

Дополнительно,  $R^{X4}$  и  $R^{X4'}$  независимо выбраны из  $R^m$ , и

$R^m$  представляет собой  $C_{1-6}$  алкокси.

Дополнительно,  $R^{X4}$  и  $R^{X4'}$  независимо друг от друга выбирают из метокси, этокси и бutoкси-.

Дополнительно, Y и Y' представляют собой O.

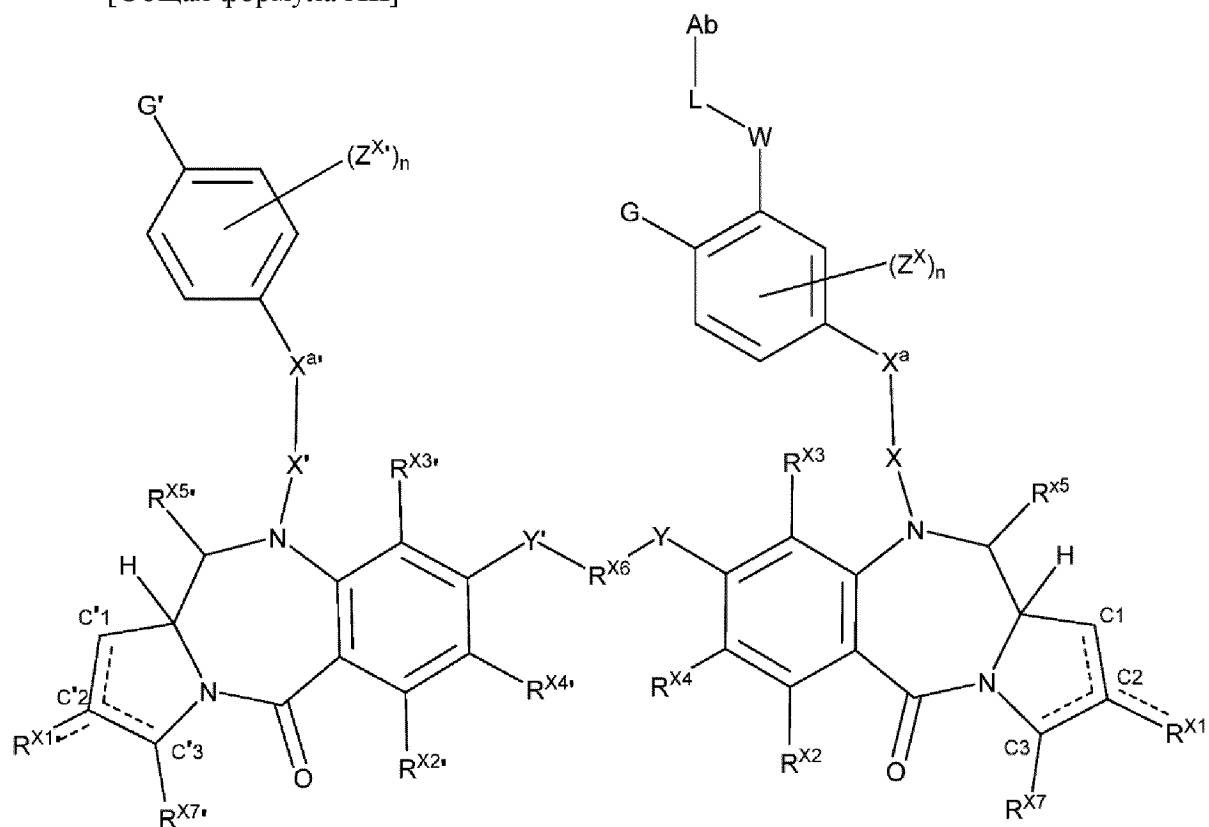
Дополнительно,  $R^{X6}$  представляет собой  $C_{3-12}$  алкилен,  $C_{3-12}$  алкенилен или  $C_{3-12}$  гетероалкилен, где  $R^{X6}$  замещен  $-NH_2$ ,  $-NHR^m$ ,  $-NHC(O)R^m$ ,  $-NHC(O)CH_2-[OCH_2CH_2]_n-R^{XX}$  или  $-[CH^2CH^2O]_n-R^{XX}$ ;

$R^{XX}$  представляет собой H, OH,  $N_3$ , CN,  $NO_2$ , SH,  $NH_2$ ,  $ONH_2$ ,  $NHNH_2$ , галоген,  $C_{1-8}$  алкил,  $C_{3-8}$  циклоалкил,  $C_{1-8}$  алкокси,  $C_{1-8}$  алкилтио,  $C_{3-20}$  гетероарил,  $C_{5-20}$  арил или моно- или ди- $C_{1-8}$  алкил amino; и

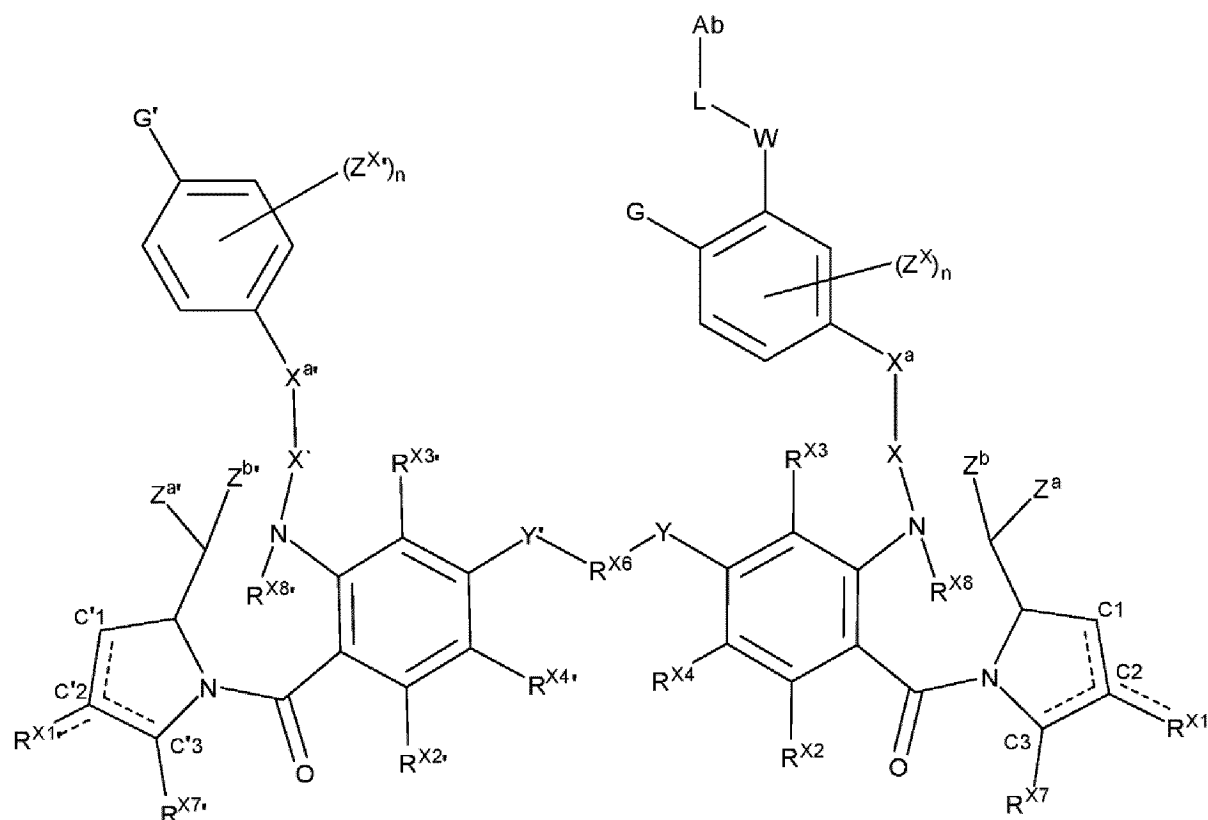
n представляет собой целое число 1-6.

Дополнительно, в некоторых вариантах осуществления, активный агент представляет собой димер пирролобензодиазепина, обозначенный общей формулой XII или общей формулой XIII;

[Общая формула XII]

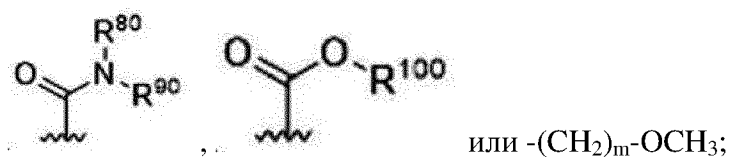


[Общая формула XIII]



$X^a$  и  $X^{a'}$  независимо выбраны из связи или  $C_{1-6}$  алкилена;

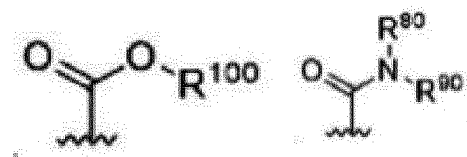
$Z^{X'}$  и  $Z^X$  независимо выбраны из водорода,  $C_{1-8}$  алкила, галогена, циано, нитро,



$R^{80}$ ,  $R^{90}$  и  $R^{100}$  каждый независимо выбирают из водорода,  $C_{1-8}$  алкила,  $C_{2-6}$  алкенила и  $C_{1-6}$  алкокси; и

$m$  представляет собой целое число 0-12.

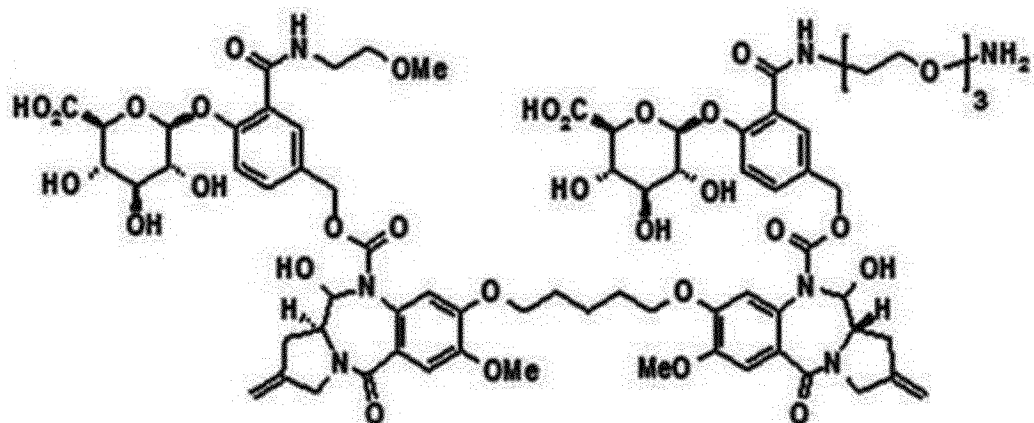
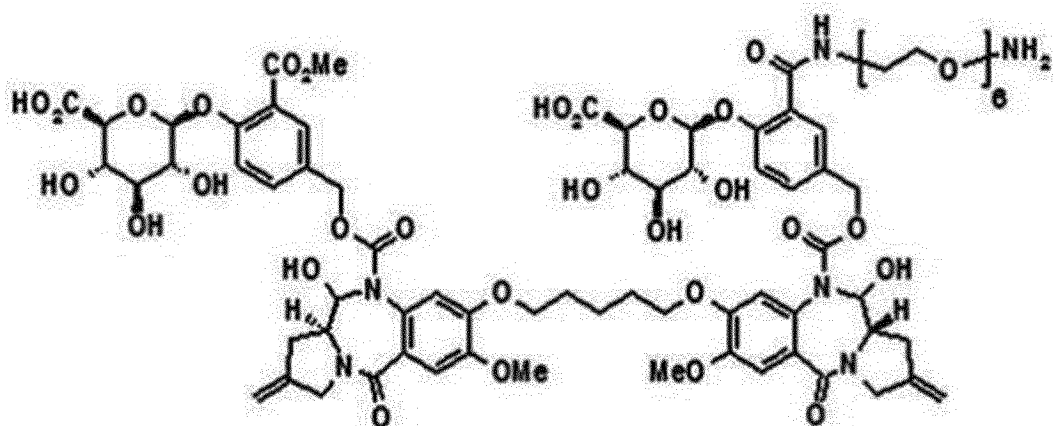
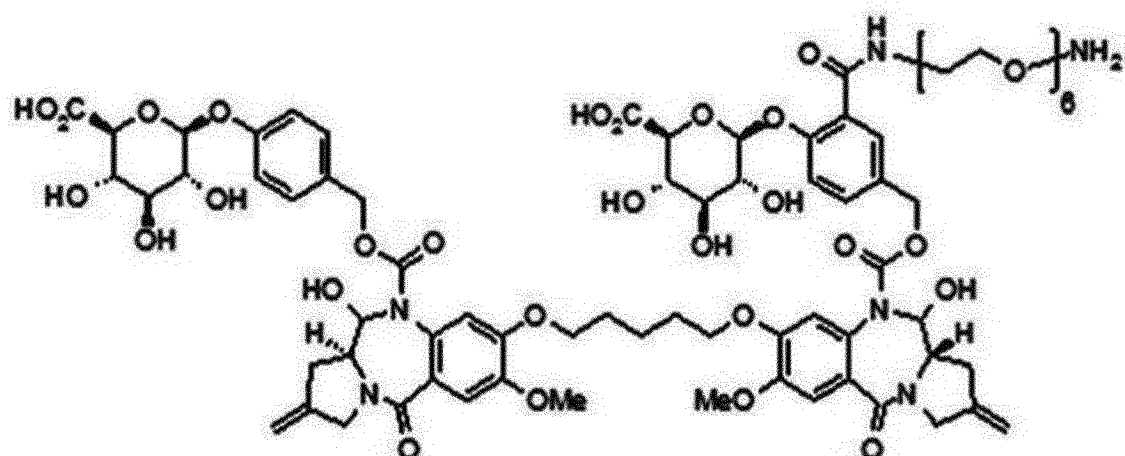
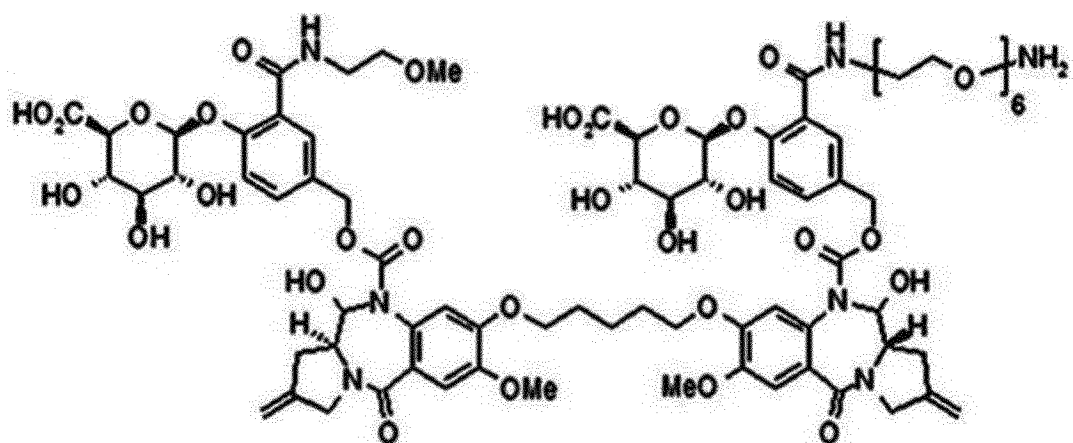
$Z^{X'}$  и  $Z^X$  независимо друг от друга выбирают из водорода и  $-(CH_2)_m-OCH_3$ ;

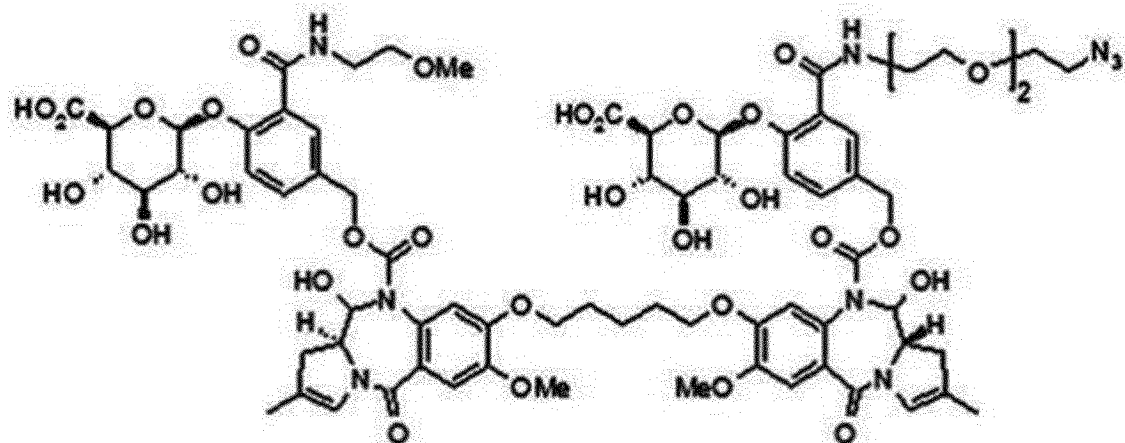
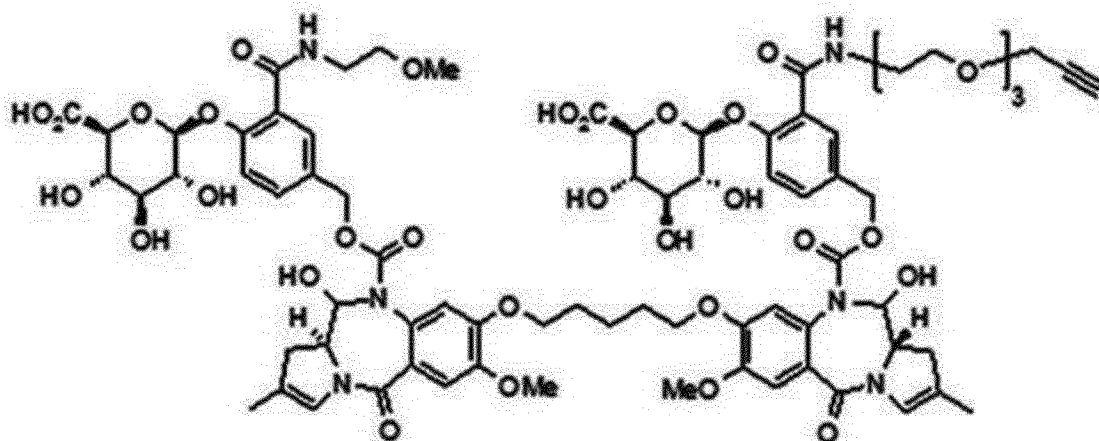
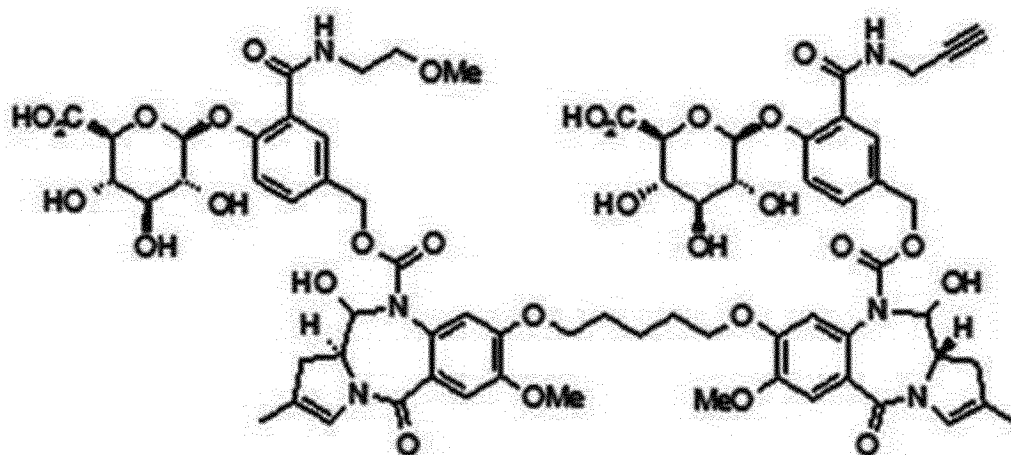


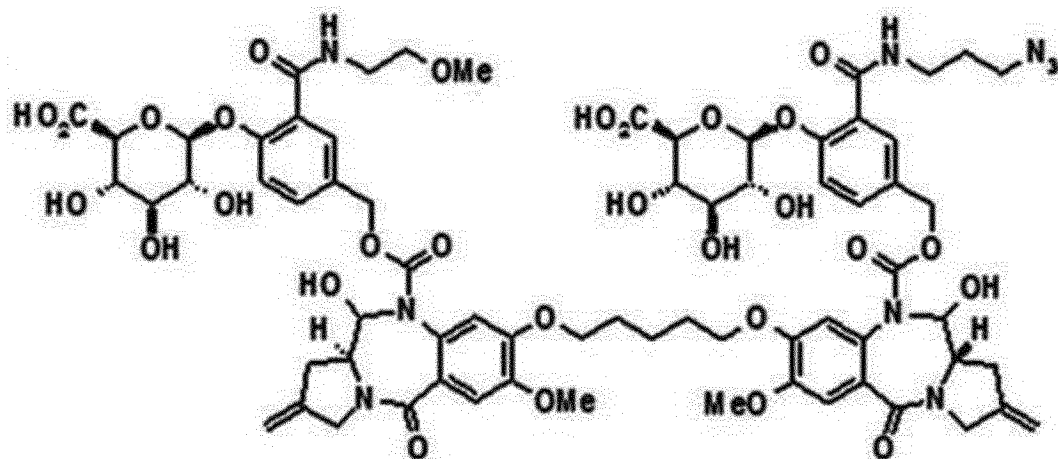
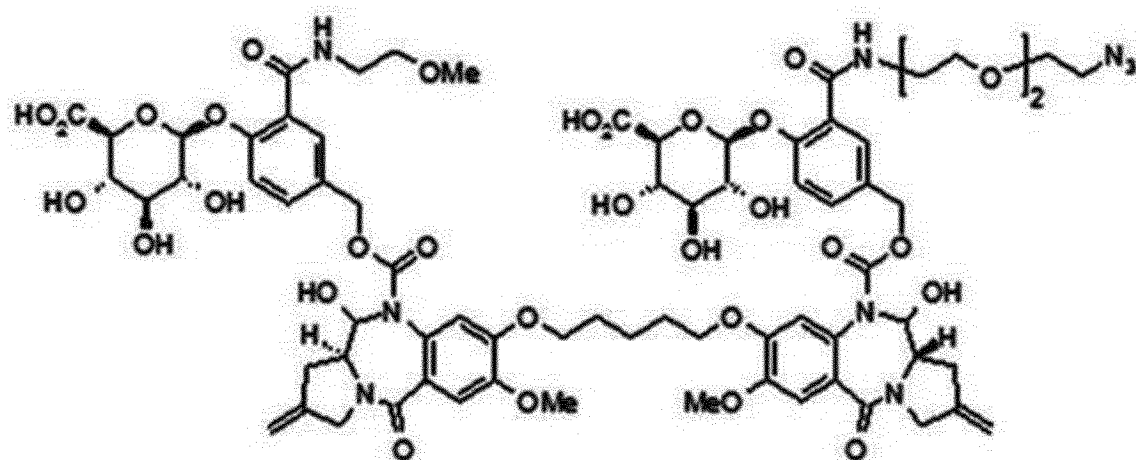
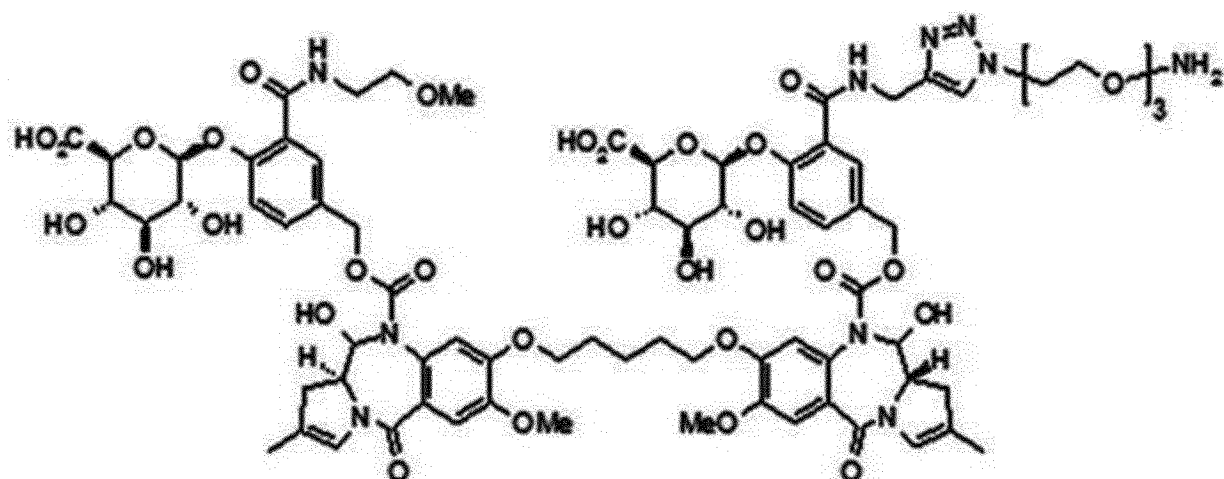
$R^{80}$ ,  $R^{90}$  и  $R^{100}$  каждый независимо выбран из водорода,  $C_{1-3}$  алкила и  $C_{1-3}$  алкокси;

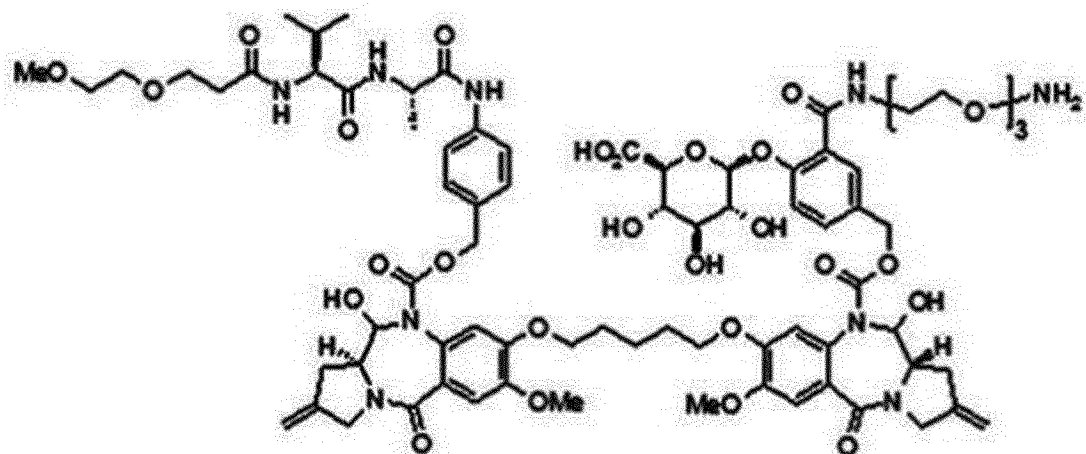
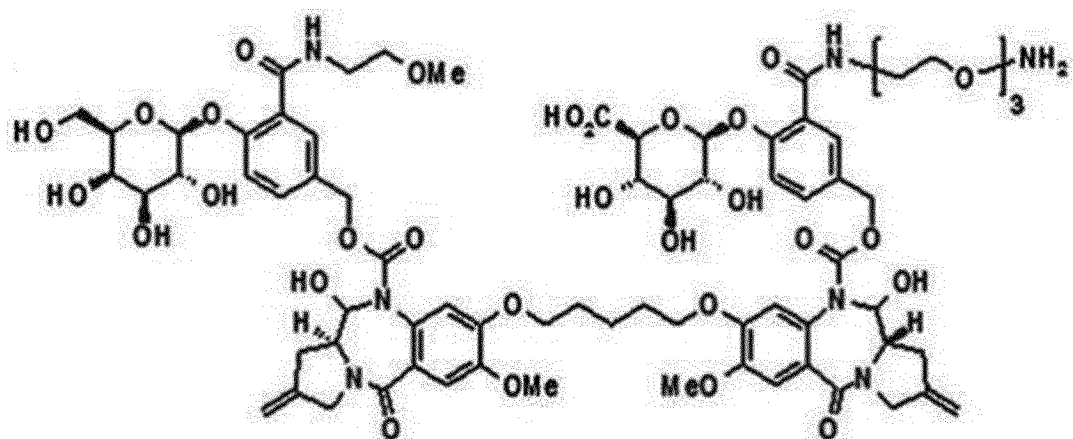
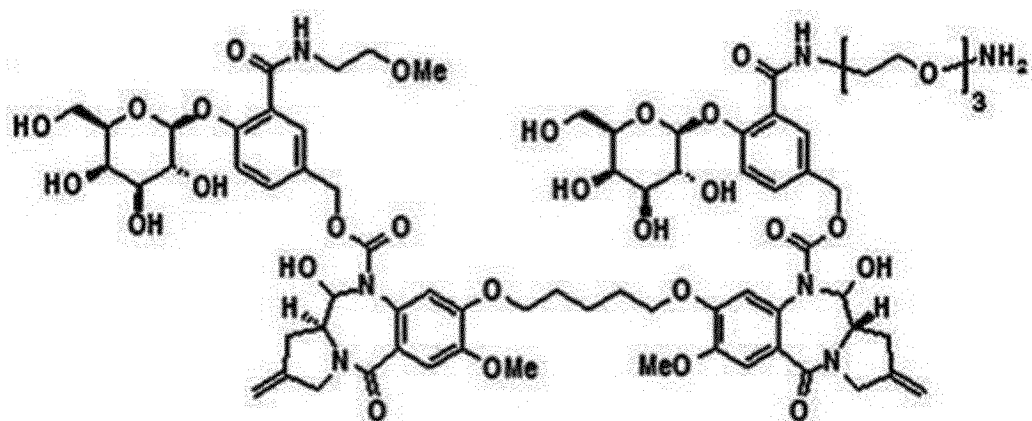
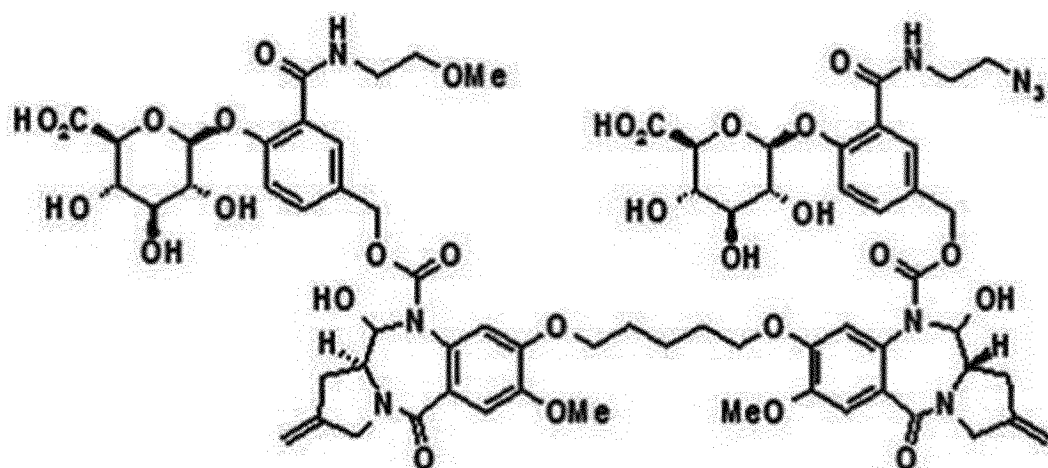
$m$  представляет собой целое число 1-6; и

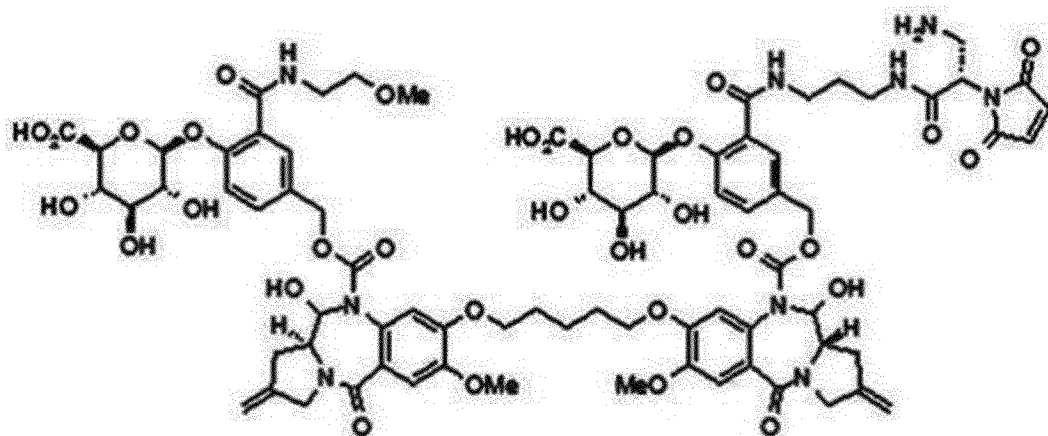
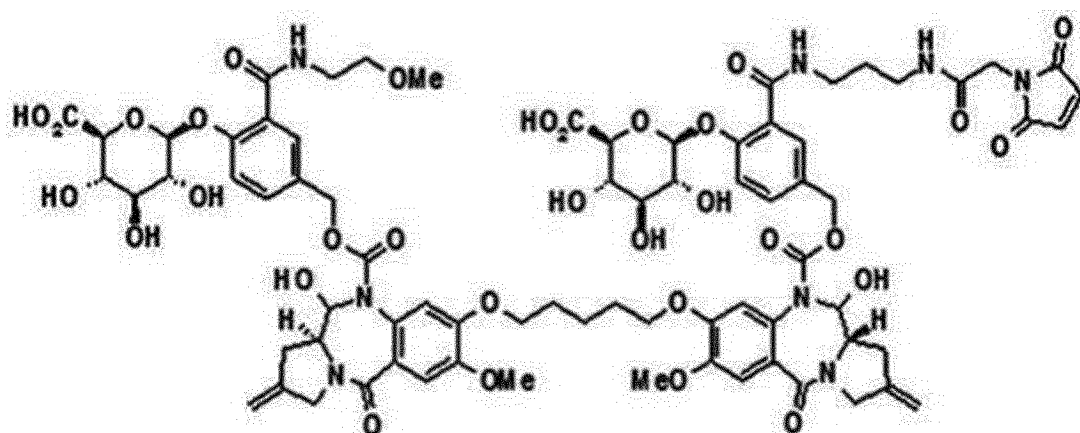
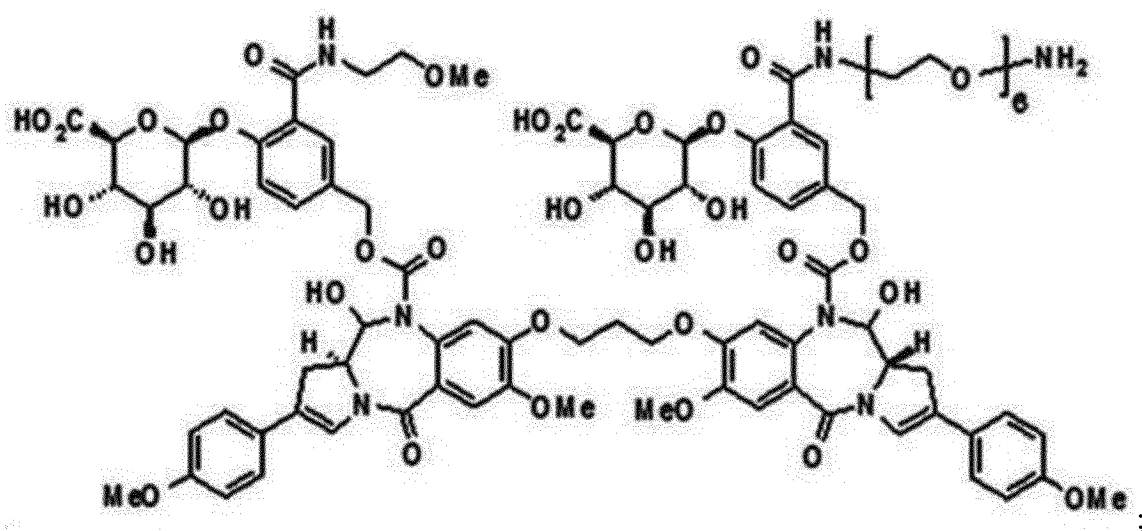
активный агент выбран из любого из:

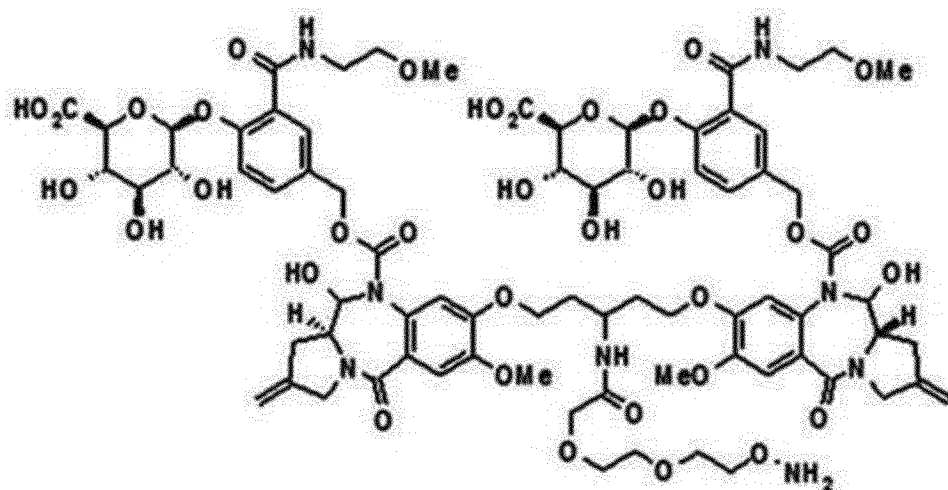
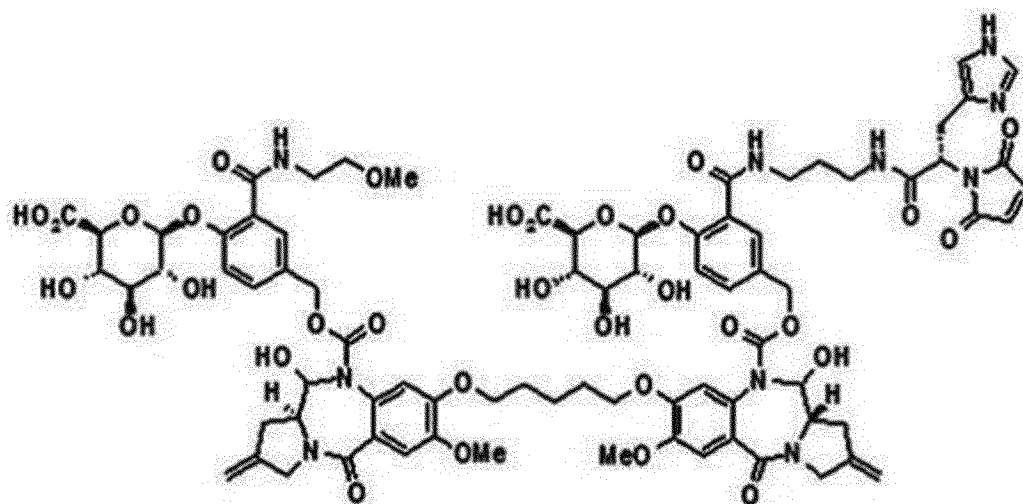
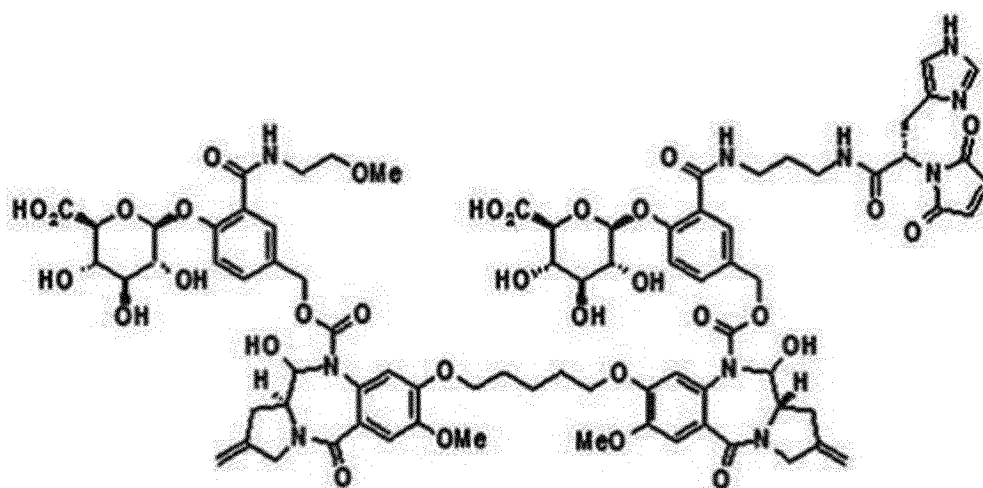


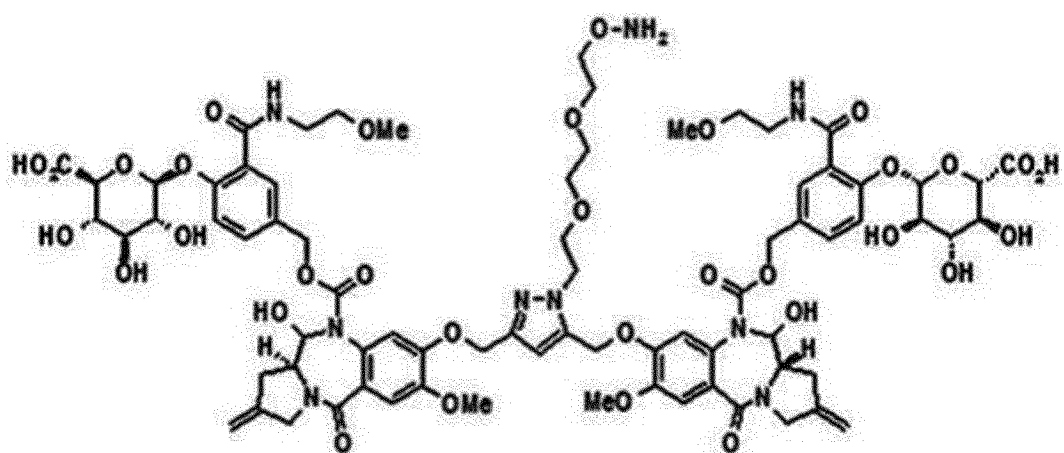




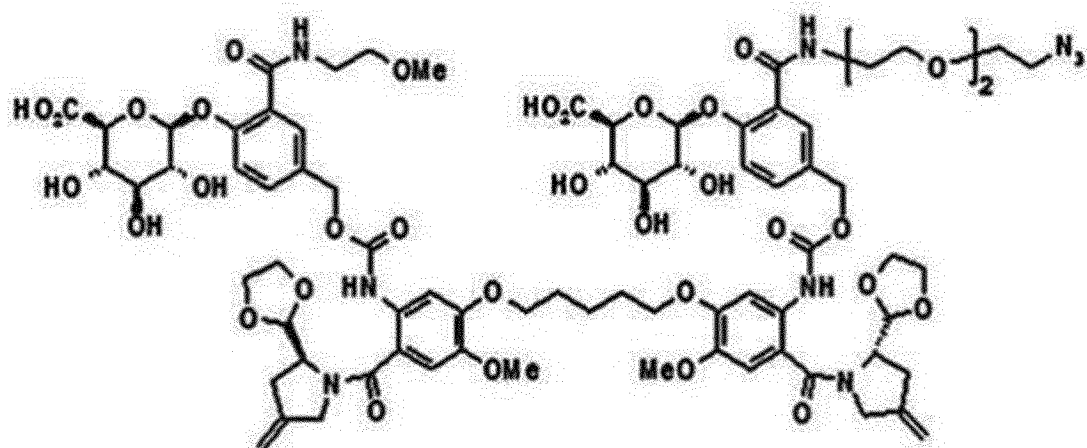




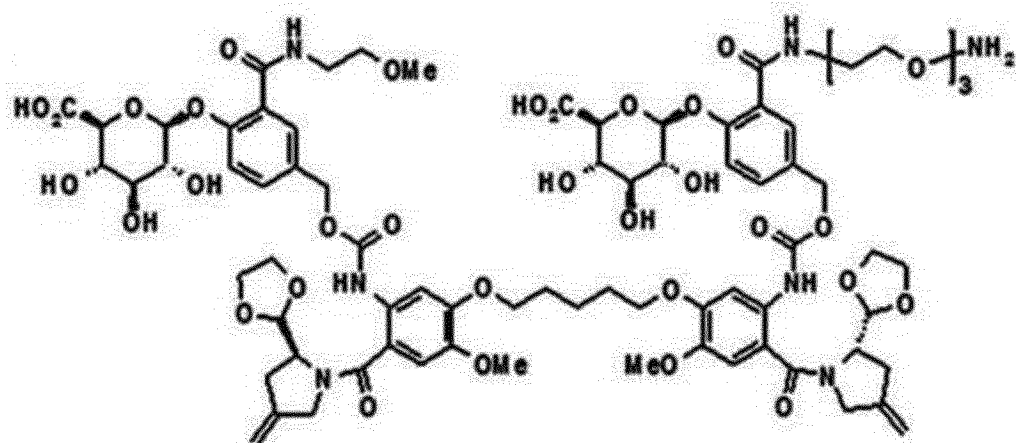




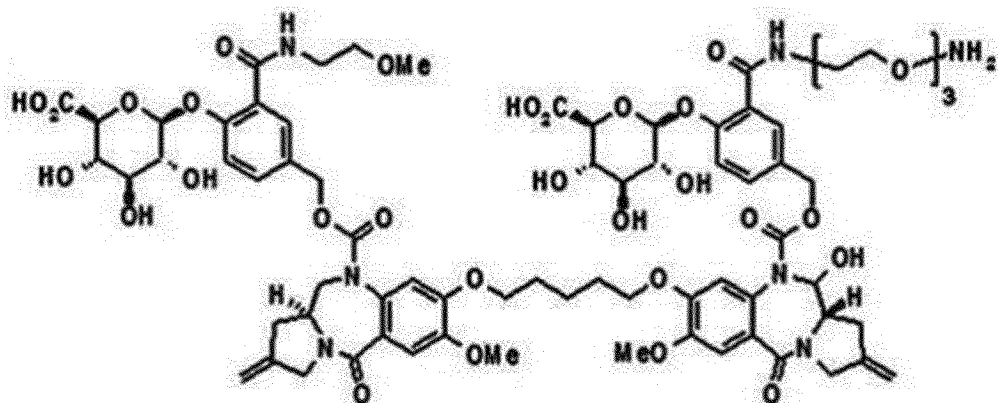
;



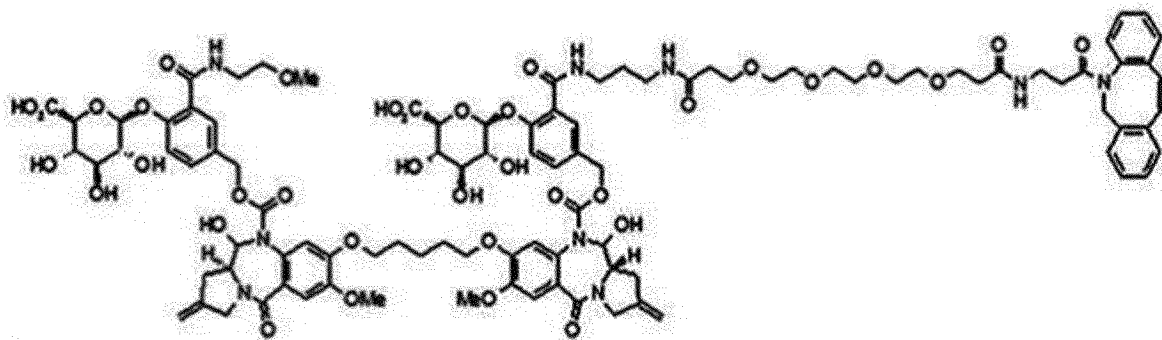
;



;



; И



В другом аспекте, настоящее изобретение относится относительно получения лекарственного средства для профилактики или лечения заболеваний, связанных с суперэкспрессией ROR1, к применению конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата.

В настоящем изобретении изобретении заболеванием, связанным с суперэкспрессией ROR1, является рак, примерами которого являются, но не ограничены ими: хронический лимфолейкоз (CLL), В-клеточный лейкоз, лимфома, острый миелоидный лейкоз (AML), лимфома Беркитта, мантийно-клеточная лимфома (MCL), острый лимфобластный лейкоз (ALL), диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL), фолликулярная лимфома (FL) и лимфома маргинальной зоны (MZL), рак молочной железы, рак почки, рак яичников, рак желудка, рак печени, рак легких, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак мочевого пузыря, рак яичек, рак матки, рак предстательной железы, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), нейробластома, рак головного мозга, рак толстой кишки, плоскоклеточная карцинома, меланома, миелома, рак шейки матки, рак щитовидной железы, рак головы и шеи и рак надпочечников.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для профилактики или лечения заболеваний, связанных с суперэкспрессией ROR1, композицию, содержащую конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль или сольват.

Кроме того, дополнительно могут быть включено фармацевтически эффективное количество химиотерапевтического агента, например, по меньшей мере одного типа терапевтического соагента, и фармацевтически приемлемые эксципиенты.

В некоторых вариантах осуществления, терапевтический соагент можно использовать с агентами, проявляющими профилактическое, улучшающее или терапевтическое действие в отношении заболеваний, связанных с суперэкспрессией ROR1, агентами, которые способны уменьшать неблагоприятные эффекты, проявляющиеся при введении терапевтических средств для лечения заболеваний, связанных с суперэкспрессией ROR1, или агентами, которые проявляют иммуностимулирующий эффект, но агентами, с которыми терапевтический соагент не ограничивается вышеперечисленным. Это означает, что терапевтический соагент можно использовать в комбинации с любым лекарственным средством, которое проявляет терапевтически полезные эффекты, дополнительно повышает стабильность

пирролобензодиазепина, снижает побочные эффекты, которые могут проявляться при введении пирролобензодиазепина, или повышает иммунитет для максимального терапевтического эффекта при применении в форме составного лекарственного средства с пирролобензодиазепином.

В другом аспекте настоящего изобретения, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания, связанного с суперэкспрессией ROR1, у субъекта, имеющего заболевание, связанное с суперэкспрессией ROR1, где способ включает стадию введения субъекту конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата в эффективной дозе для лечения заболевания, связанного с суперэкспрессией ROR1, и способ введения [конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли или его сольвата] путем смешивания с одним или несколькими антипролиферативными, цитостатическими или цитотоксическими веществами.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения рака, включающему стадию введения вышеуказанной фармацевтической композиции пациенту.

Конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению пригоден для использования для доставки активного агента, в частности, пирролобензодиазепина, в положение-мишень на объекте-мишени. Конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению выделяет активный пирролобензодиазепин, который не имеет линкеры и не содержит каких-либо модификаций, которые могут повлиять на реакционную способность соединения пирролобензодиазепина.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство, описанные в настоящем изобретении, за счет включения антитела, как описано выше, способны эффективно, специфически и селективно доставлять лекарственное средство в клетки, экспрессирующие ROR1. Благодаря тому, что антитело стабильно связано с лекарственным средством для сохранения стабильности *in vivo*, одновременно демонстрируя предполагаемую цитотоксичность и, в частности, более стабильно в сыворотке и стабильно в кровотоке, а также использует линкерную технологию, включающую саморазрушающуюся группу, которая позволяет лекарственному средству легко высвободиться внутри раковой клетки для достижения максимальной эффективности, эти конъюгаты демонстрируют преимущества предоставления системы лекарственное средство-линкер-лиганд, которая позволяет лекарственному средству и/или токсину безопасно достигать клетки-мишени и эффективно проявлять эффективность при значительном снижении токсичности.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

На **фиг. 1** представлены результаты анализа (ELISA) связывающей способности анти-ROR1 моноклонального фагового антитела, полученного в соответствии с одним из примеров настоящего изобретения, с антигеном ROR1. Показано, что соответствующие анти-ROR1 моноклональные антитела специфически связываются с внеклеточным

доменом антигена ROR1. BCMA-Fc представляет собой группу отрицательного контроля, и показано, что соответствующие анти-ROR1 моноклональные антитела специфически связываются только с антигеном ROR1 и не связываются с белком BCMA или Fc, используемыми в качестве метки.

На **фиг. 2** показаны результаты измерения (FACS) связывающей способности анти-ROR1 моноклонального фагового антитела в соответствии с одним из примеров настоящего изобретения с антигеном ROR1, экспрессируемым на клеточной поверхности, и клеточную линию JeKo-1 используют в качестве клеток, экспрессирующих ROR1 на клеточной поверхности. Показано, что каждое анти-ROR1 моноклональное антитело специфически связывается с ROR1, экспрессируемым на клеточной поверхности.

На **фиг.3А и В** показаны результаты анализа (ELISA) связывающей способности анти-ROR1 IgG-антитела, полученного в соответствии с примером настоящего изобретения, с антигеном ROR1 человека. Показано, что соответствующие антитела связываются с антигеном ROR1 человека в зависимости от концентрации. Результаты показывают, что связывающая способность к ROR1 сохраняется даже после того, как моноклональное фаговое антитело меняется на форму IgG.

На **фиг. 4** показаны результаты анализа (ELISA) связывающей способности анти-ROR1 IgG, полученного в соответствии с одним примером настоящего изобретения, с антигеном ROR1 мыши. Показано, что каждое антитело связывается с антигеном ROR1 мыши в зависимости от концентрации. В ходе этого эксперимента было подтверждено, что анти-ROR1 антитело по настоящему изобретению обладает перекрестной специфичностью с ROR1 мыши. Что касается антитела 2A2, используемого в качестве эталонной группы, было обнаружено, что хотя оно имеет перекрестную специфичность с ROR1 мыши, степень связывания была относительно слабой по сравнению с анти-ROR1 антителом по настоящему изобретению.

На **фиг. 5** показаны результаты измерения (FACS) связывающей способности анти-ROR1 антитела, полученного в соответствии с одним из примеров настоящего изобретения, с антигеном ROR1, экспрессируемым на клеточной поверхности, где ROR1 человека искусственно суперэкспрессирован в ROR1 клеточной линии CHO-человека, ROR2 человека суперэкспрессирован в ROR2 CHO-человека, и ROR1 мыши суперэкспрессирован в ROR1 CHO-мышь. Было показано, что соответствующие антитела специфически связываются с ROR1 человека, экспрессируемым на клеточной поверхности, а не с белком семейства ROR2 человека. Кроме того, путем подтверждения связывания с клеточной линией, в которой был искусственно суперэкспрессирован ROR1 мыши, было подтверждено, что анти-ROR1 антитело по настоящему изобретению обладает межвидовой перекрестной специфичностью по отношению к ROR1 мыши. Что касается 2A2, используемого в качестве эталонной группы, было обнаружено, что, хотя оно имело перекрестную специфичность с ROR1 мыши, степень связывания была относительно слабой по сравнению с анти-ROR1 антителом по настоящему изобретению.

На **фиг. 6** показаны результаты измерения (FACS) связывающей способности анти-

ROR1 антитела, полученного в соответствии с одним из примеров настоящего изобретения, с антигеном ROR1, экспрессируемым на клеточной поверхности, с использованием клеточных линий JeKo-1 и Mino в качестве положительных по экспрессии ROR1 клеточных линий, и клеточную линию MCF7 в качестве ROR1-отрицательной клеточной линии. Обнаружено, что соответствующие антитела специфически связываются с ROR1, экспрессируемым на клеточной поверхности, и не связываются с MCF7, клеточной линией, которая не экспрессирует ROR1.

На **фиг.7** показаны результаты измерения (FACS) связывающей способности анти-ROR1-антитела, полученного в соответствии с одним из примеров настоящего изобретения, с антигеном ROR1, экспрессируемым на клеточной поверхности. Используют клеточную линию MC38 ROR1 человека, где ROR1 человека искусственно суперэкспрессируют на клеточной линии рака толстой кишки мыши MC38. Было обнаружено, что соответствующие антитела связываются с клеточной линией с суперэкспрессией человеческого ROR1 в зависимости от концентрации.

На **фиг.8** показаны результаты измерения (FACS) связывающей способности анти-ROR1-антитела, полученного в соответствии с одним из примеров настоящего изобретения, с антигеном ROR1, экспрессируемым на клеточной поверхности, в различных линиях раковых клеток.

На **фиг. 9А и В** показаны результаты анализа эффективности подавления рака анти-ROR1 антителом согласно одному примеру настоящего изобретения в модели ксенотрансплантата опухоли у мышей.

На **фиг. 10** представлены результаты анализа механизма действия анти-ROR1 антитела, полученного по одному из примеров настоящего изобретения. Подавление роста рака антителом может проявляться в виде, например, индуцирования аутофагической гибели клеток, подавления деления раковых клеток, подавления ангиогенеза опухоли и/или активации иммунных клеток, и одинаковые или разные механизмы действия могут проявляться в зависимости от антитела. На **фиг. 10**, наличие или отсутствие гибели клеток анализируют с применением одного механизма действия, где это возможно. В результате обработки клеточной линии, экспрессирующей ROR1, анти-ROR1 антителом по настоящему изобретению было обнаружено, что антитело образует мультимер и способно индуцировать гибель клеток. Что касается антитела 2A2, используемого в качестве эталонной группы, было обнаружено, что гибель клеток не индуцировалась даже в тех случаях, когда образовывался мультимер.

На **фиг. 11a** представлен чертеж, показывающий характеристики конъюгата анти-ROR1 антитело-MMAE (DAR4), полученного в соответствии с одним из примеров настоящего изобретения.

На **фиг. 11b** представляет собой чертеж, показывающий характеристики конъюгата анти-ROR1 антитело-dPBD (DAR2), полученного в соответствии с одним из примеров настоящего изобретения.

На **фиг. 12** показаны результаты анализа эффективности подавления рака

конъюгатом анти-ROR1 антитело-dPBD (DAR2), полученным в соответствии с одним примером настоящего изобретения, в мышинной модели с трансплантированной линией клеток рака молочной железы MDA-MB-468. Показано, что конъюгат анти-ROR1 антитело-dPBD (DAR2) по настоящему изобретению эффективен в элиминации карциномы в мышинной модели с трансплантированной линией клеток рака молочной железы, экспрессирующей ROR1.

На **фиг. 13** показаны результаты анализа эффективности подавления рака конъюгатом анти-ROR1 антитело-dPBD (DAR2), полученным в соответствии с одним из примеров настоящего изобретения, в мышинной модели с трансплантированной линией клеток рака молочной железы MDA-MB-231. Показано, что конъюгат анти-ROR1 антитело-dPBD (DAR2) по настоящему изобретению эффективен в элиминации карциномы в мышинной модели с трансплантированной линией клеток рака молочной железы, экспрессирующей ROR1.

На **фиг. 14** показаны результаты анализа эффективности подавления рака конъюгатом анти-ROR1 антитело-dPBD (DAR2), полученным в соответствии с одним из примеров настоящего изобретения, в мышинной модели с трансплантированной линией клеток рака легкого HCC1187. Показано, что конъюгат анти-ROR1 антитело-dPBD (DAR2) по настоящему изобретению эффективен в элиминации карциномы в мышинной модели с трансплантированной линией клеток рака легкого, экспрессирующей ROR1.

На **фиг. 15** показаны результаты анализа эффективности подавления рака конъюгатом анти-ROR1 антитело-dPBD (DAR2) и конъюгатом анти-ROR1 антитело-MMAE (DAR4), полученных в соответствии с одним из примеров настоящего изобретения, в мышинной модели с трансплантированной линией клеток рака молочной железы Calu-3. Показано, что конъюгат анти-ROR1 антитело-dPBD (DAR2) и конъюгат анти-ROR1 антитело-MMAE (DAR4) согласно настоящему изобретению эффективны в элиминации карциномы в мышинной модели с трансплантированной линией клеток рака молочной железы, экспрессирующей ROR1.

На **фиг. 16** показаны результаты сравнения эффективности подавления рака конъюгатами анти-ROR1 антитела-лекарственного средства по настоящему изобретению в мышинной модели с трансплантированной линией клеток мантийноклеточной лимфомы Jeko-1.

На **фиг.17** показаны результаты для конъюгата анти-ROR1 антитело-dPBD (DAR2) и конъюгата анти-ROR1 антитело-MMAE (DAR4) в соответствии с настоящим изобретением. Показано, что конъюгат анти-ROR1 антитело-dPBD (DAR2) и конъюгат анти-ROR1 антитело-MMAE (DAR4) по настоящему изобретению эффективен в элиминации карциномы в мышинной модели трансплантированной клеточной линии мантийноклеточной лимфомы клеток, экспрессирующей ROR1.

Настоящее изобретение основано на разработке антител, способных специфически связываться с ROR1.

Заголовки, использованные в этом разделе, используются для удобства при

изложении описания, и настоящее изобретение ими не ограничивается.

Если в настоящем раскрытии не указано иное, научные и технические термины, используемые в настоящем изобретении, должны определяться так, как обычно понимаются специалистом в данной области техники. Кроме того, если конкретно не требуется в контексте, выражения в единственном числе включают выражения во множественном числе, а выражения во множественном числе включают в себя выражения в единственном числе.

### **[Определения]**

В настоящем описании используются следующие определения:

В настоящем описании «конъюгаты» относятся к клеточно-связывающим агентам, которые ковалентно связаны с одной или несколькими молекулами цитотоксического соединения. В настоящем изобретении «клеточно-связывающий агент» представляет собой молекулу, обладающую аффинностью к биологической мишени, например, лиганду, белку, антителу, конкретно, моноклональному антителу, фрагменту белка или антитела, и связывающий агент служит для направления биологически активного соединения к биологической мишени. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат может быть предназначен для таргетирования опухолевых клеток через антигены клеточной поверхности. Антиген может представлять собой антиген клеточной поверхности, который суперэкспрессируется или экспрессируется в аномальном типе клеток. В частности, антиген-мишень может экспрессироваться только на пролиферативных клетках (например, опухолевых клетках). Антигены-мишени могут быть выбраны на основе различной экспрессии, обычно между пролиферативными и нормальными тканями. В настоящем описании, лиганд связан с линкером.

В настоящем описании, «вариант» полипептида, такой как антигенсвязывающий фрагмент, белок или антитело, представляет собой полипептид, в котором по сравнению с последовательностью другого полипептида, вставка, делеция, добавление и/или замена имеются по меньшей мере в одном аминокислотном остатке, включая слитые полипептиды. Кроме того, варианты белка включают такие, которые были модифицированы протеолитическим расщеплением, фосфорилированием или другой посттрансляционной модификацией, но сохраняют биологическую активность описанного антитела, например, связывание и специфичность к ROR1. Вариант может быть приблизительно на 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%, 90%, 89%, 88%, 87%, 86%, 85%, 84%, 83%, 82%, 81% или 80% идентичным последовательности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем изобретении. Доля идентичности (%) или гомологии может быть рассчитана со ссылкой на следующее.

В одном примере, доля идентичности пептидных последовательностей может быть рассчитана, например, как  $100 \times [(\text{идентичные положения}) / \min(TG_A, TG_B)]$ , где  $TG_A$  и  $TG_B$  представляют собой сумму количества остатков и внутренних положений гэпов в пептидных последовательностях A и B в выравнивании, которое минимизирует  $TG_A$  и  $TG_B$  (Russell et al., J. Mol Biol., 244: 332-350 (1994)).

В настоящем описании, консервативная аминокислотная замена относится к замене, которая существенно не влияет на активность или антигенность полипептида. Полипептид может включать одну или несколько консервативных замен. Неограничивающие примеры описаны в Таблице 3 ниже.

В настоящем изобретении «производное» полипептида относится к полипептиду, в котором по меньшей мере один остаток был химически модифицирован посредством конъюгации с другой химической группой и отличается от варианта со вставкой, делецией, добавлением или заменой.

В настоящем раскрытии термин «найденный в природе», используемый в отношении полипептида, нуклеиновой кислоты, клеток-хозяев и т. д., означает, что материалы существуют в природе.

ROR1 (орфанный рецептор типа рецепторной тирозинкиназы), распознаваемый антителом по настоящему изобретению, относится к трансмембранному белку семейства RTK (рецепторной тирозинкиназы). В одном примере, в частности распознается внеклеточный домен. ROR1, распознаваемый антителом по настоящему изобретению, может быть внеклеточный домен, который существует на клеточной мембране или не существует на клеточной мембране. Белок ROR1 человека состоит из 937 аминокислот, где аминокислотная последовательность представляет собой NCBI эталонную последовательность ID: NP\_005003.2, и последовательность нуклеиновой кислоты представляет собой NM\_005012.3. Если иное не ясно из контекста, используемого в настоящем описании, ROR1 обозначает hROR1, но антитело по настоящему изобретению также обладает ROR1 мыши-специфичной связывающей способностью. Аминокислота ROR1 мыши представляет собой GenBank: BAA75480.1.

В настоящем описании «идентичность» означает сходство последовательностей двух или нескольких полипептидов или двух или нескольких полинуклеотидов, определенное путем выравнивания и сравнения двух или нескольких полипептидов или двух или нескольких полинуклеотидных последовательностей. Такая идентичность между последовательностями обычно выражается как «доля идентичности», что означает одинаковое соотношение аминокислот или нуклеотидов между сравниваемыми молекулами и рассчитывается на основе наименьшей молекулы из сравниваемых молекул. Способы, которые можно использовать для выравнивания нуклеиновых кислот или полипептидов для расчета мультимолекулярной идентичности, известны в данной области техники.

В настоящем описании, «аффинность» или [«аффинность»] представляет собой силу взаимодействия между антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и антигеном, и она определяется свойствами антигена, такими как размер, форма и/или заряд антигена, и последовательностями CDR антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Способы определения аффинности известны в данной области техники, и в качестве эталона можно использовать следующее.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент называют «специфически

связывающимся» с его мишенью, такой как антиген, когда константа диссоциации ( $K_D$ ) составляет  $<10^{-6}$  М. Антитело специфически связывается с мишенью с «высокой аффинностью», когда  $K_D$  составляет  $<1 \times 10^{-8}$  М.

В настоящем описании, «антигенсвязывающий фрагмент» цепи (тяжелой цепи или легкой цепи) антитела или иммуноглобулина включает часть антитела, в которой отсутствуют некоторые аминокислоты по сравнению с полноразмерной цепью, но которая может специфически связываться с антигеном. Этот фрагмент можно рассматривать как обладающий биологической активностью в том смысле, что он может специфически связываться с антигеном-мишенью или может конкурировать с другими антителами или антигенсвязывающим фрагментом за связывание со специфическим эпитопом. В некоторых вариантах осуществления, этот фрагмент содержит по меньшей мере одну CDR, присутствующую в полноразмерной легкой цепи или тяжелой цепи, и в некоторых примерах, он включает короткоцепочечные тяжелую цепь и/или легкую цепь или их часть. Этот биологически активный фрагмент может быть продуцирован с помощью технологии рекомбинантной ДНК или может быть получен, например, путем ферментативного или химического разрезания интактного антитела. Иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина включает Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFab, dsFv, Fv, scFv, scFv-Fc, диатело, минитело, scAb и dAb, но не ограничен ими, и может быть получен от любого млекопитающего, включая, но не ограничиваясь ими, человека, мышь, крысу, представителя верблюдовых или кролика. Функциональные части антител, такие как одна или несколько CDR, описанных в настоящем изобретении, могут быть связаны со вторичным белком или низкомолекулярным соединением ковалентной связью и, таким образом, использоваться в качестве таргетного терапевтического агента для конкретной мишени.

В настоящем описании, область «Fc» содержит два фрагмента тяжелой цепи, содержащие домены CH2 и CH3 антитела. Эти 2 фрагмента тяжелой цепи объединены друг с другом за счет гидрофобного взаимодействия двух или нескольких дисульфидных связей и домена CH3.

В настоящем описании «фрагмент Fab» состоит из 1 легкой цепи и 1 тяжелой цепи, содержащих только вариабельную область и CH1. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидную связь с другой молекулой тяжелой цепи. В scFab, две молекулы Fab связаны гибким линкером.

В настоящем описании «Fab' фрагмент» включает Fab фрагмент и дополнительно область между CH1 и CH2 доменами тяжелой цепи. Между двумя тяжелыми цепями Fab' фрагментов двух молекул может образовываться дисульфидная связь, образуя F(ab')<sub>2</sub> молекулы.

В настоящем описании, как упоминалось выше, «F(ab')<sub>2</sub> фрагмент» содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие вариабельную область CH1 и часть константной области между CH1 и CH2 доменами, с межцепочечной дисульфидной связью, образованной между двумя тяжелыми цепями. Соответственно, F(ab')<sub>2</sub> фрагмент

состоит из двух фрагментов Fab', и два фрагмента Fab' соединены друг с другом дисульфидной связью между ними.

В настоящем изобретении, «область Fv» представляет собой фрагмент антитела, который содержит каждую переменную область тяжелой цепи и легкой цепи, но не содержит константные области. В sdFV тяжелая цепь и легкая цепь связаны дисульфидной связью. В scFc, Fv связан гибким линкером. В scFv-Fc, Fc связан с scFV. В минителе, CH3 связана с scFV. Диатело содержит scFV двух молекул.

В настоящем описании, «одноцепочечный Fv» или «scFv» включает домены VH и VL антитела, где эти домены существуют в одной полипептидной цепи. Полипептид Fv может дополнительно содержать полипептидный линкер между доменом Vh, который позволяет scFv образовывать структуру-мишень для антигенного связывания, и доменом VL.

В настоящем изобретении, «короткоцепочечное антитело (scAb)» представляет собой единую полипептидную цепь, содержащую одну константную область легкой цепи или одну константную область тяжелой цепи, где переменные области тяжелой цепи и легкой цепи связаны гибким линкером. Ссылку на короткоцепочечное антитело можно найти в патенте США № 5,260,203, описанном в настоящем изобретении посредством ссылки.

В настоящем изобретении «доменное антитело (dAb)» представляет собой иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина, содержащий только переменную область тяжелой цепи или переменную область легкой цепи. В одном варианте осуществления, две или несколько областей VH связаны ковалентной связью пептидным линкером с образованием двухвалентного доменного антитела. Две области VH этого двухвалентного доменного антитела могут таргетировать один и тот же или разные антигены.

В настоящем описании, «определяющая комплементарность область» (CDR, то есть CDR1, CDR2 и CDR3) обозначает аминокислотные остатки переменного домена антитела, которые необходимы для связывания с антигеном. Каждый переменный домен обычно имеет три домена CDR., идентифицированные как CDR1, CDR2 и CDR3.

В настоящем описании, «каркасная область» (FR) относится к остаткам переменного домена, отличным от остатков CDR. Каждый переменный домен обычно имеет четыре FR, обозначенных как FR1, FR2, FR3 и FR4.

В настоящем изобретении «двухвалентный антигенсвязывающий белок» или «двухвалентное антитело» содержит 2 антигенсвязывающих сайта. Два антигенсвязывающих сайта, включенных в двухвалентное антитело, могут иметь одинаковую антигенную специфичность, или антитело может быть антителом с двойной специфичностью, где антигенсвязывающие сайты связываются с разными антигенами.

В настоящем описании, «мультиспецифический антигенсвязывающий белок» или «мультиспецифическое антитело» таргетируют два или более антигенов или эпитопов.

В настоящем изобретении «линкер» относится к соединению, которое ковалентно

связывает цитотоксическое соединение с лигандом или антителом. В некоторых вариантах осуществления может использоваться линкер, описанный в PCT/US2016/063564 и PCT/US2016/063595, оба из которых включены в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте, и в частности, для описанных в настоящем изобретении линкеров.

В настоящем описании «незамещенный или замещенный» используется для обозначения группы, которая может быть незамещенной или замещенной; «замещенный» относится к группе, имеющей по меньшей мере одну замещающую группу; и «замещающая группа» относится к химической части, ковалентно связанной с исходной группой или присоединенной к ней. Понятно, что заместители и схемы замещения в соединениях по настоящему изобретению могут быть выбраны специалистом в данной области техники для получения химически стабильных соединений, которые можно легко синтезировать способами, известными в данной области техники, а также способами, изложенными ниже, из легкодоступных исходных материалов. Если заместитель сам замещен более чем одной группой, понятно, что эти несколько групп могут быть на одном и том же атоме углерода или на разных атомах углерода, при условии, что в результате получается стабильная структура. Например, заместитель может быть, но не ограничен ими, гидроксильной, гидроксильной, алкокси, галогеном, алкилом, нитро, силилом, ацилом, ацилокси, арилом, циклоалкилом, гетероциклом, аминами, аминами, циано, галогеналкилом, галогеналкокси,  $-\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{алкилом}$ ,  $-\text{OP}(\text{O})(\text{O}-\text{алкилом})_2$  или  $-\text{CH}_2-\text{OP}(\text{O})(\text{O}-\text{алкилом})_2$ . В некоторых вариантах осуществления, группы (например, алкильные, циклоалкильные, гетероарильные, гетероциклические или арильные группы), указанные в структурных формулах в настоящем изобретении, необязательно замещены, т.е. не замещены или замещены. В некоторых вариантах осуществления, группы (например, алкильные, циклоалкильные, гетероарильные, гетероциклические или арильные группы), указанные в структурных формулах в настоящем изобретении, являются незамещенными.

Используемые в настоящем изобретении термины «необязательно замещенный» или «не замещенный или замещенный» относятся к замещению от одного до шести водородных радикалов в данной структуре радикалом определенного заместителя, включая, но не ограничиваясь ими: гидроксил, гидроксильный, алкокси, галоген, алкил, нитро, силил, ацил, ацилокси, арил, циклоалкил, гетероциклический, аминами, аминами, циано, галогеналкил, галогеналкокси,  $-\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{алкил}$ ,  $-\text{OP}(\text{O})(\text{O}-\text{алкил})_2$  или  $-\text{CH}_2-\text{OP}(\text{O})(\text{O}-\text{алкил})_2$ . Предпочтительно, термины «необязательно замещенный» или «не замещенный или замещенный» относятся к замещению от одного до четырех водородных радикалов в данной структуре заместителями, упомянутыми выше. Более предпочтительно, от одного до трех водородных радикалов замещены заместителями, как указано выше. Понятно, что заместители могут быть дополнительно замещены.

В настоящем описании «галоген» относится к фтору, хлору, бром или йоду, и т. д.

В некоторых вариантах осуществления настоящего описания, «алкил»

представляет собой одновалентную группу, полученную путем удаления атома водорода от атома углерода алифатического или алициклического, насыщенного или ненасыщенного (ненасыщенного, полностью ненасыщенного) углеводородного соединения. Примеры насыщенных алкилов включают метил, этил, бутил, н-пентил (амил), н-гексил, н-гептил и подобные, насыщенные циклические алкильные группы, такие как метил, этил, изопропил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, изопентил и неопентил, и т.д.

В других вариантах осуществления настоящего описания, термин «алкил» относится к насыщенным алифатическим группам, включая алкильные группы с прямой цепью, алкильные группы с разветвленной цепью, циклоалкильные (алициклические) группы, алкилзамещенные циклоалкильные группы и циклоалкилзамещенные алкильные группы. В предпочтительных вариантах осуществления, алкил с прямой или разветвленной цепью имеет 30 или менее атомов углерода в своей основной цепи (например,  $C_{1-30}$  для неразветвленных цепей,  $C_{3-30}$  для разветвленных цепей), и более предпочтительно, 20 или менее.

В обоих вышеприведенных вариантах осуществления и во всем описании, примерах и формуле изобретения подразумевается, что «алкил» включает как незамещенные, так и замещенные алкильные группы, последние из которых относятся к алкильным остаткам, имеющим заместители, замещающие водород на одном или нескольких атомах углерода углеводородной основной цепи, включая галогеналкильные группы, такие как трифторметил и 2,2,2-трифторэтил, и т.д.

В настоящем описании, «алкокси» относится к  $-OR$ , где R представляет собой алкильную группу, и примеры включают метокси, этокси, н-пропокси, изопропокси, н-бутокси, втор-бутокси, изобутокси и трет-бутокси и т. д.

В настоящем описании «алкенил» представляет собой алкил, имеющий по меньшей мере одну двойную связь углерод-углерод. Примерами ненасыщенных алкенильных групп являются этенил (винил,  $-CH=CH_2$ ), 1-пропенил ( $-CH=CHCH_3$ ), 2-пропенил, изопропенил, бутенил, пентенил и гексенил и т. д.

В настоящем изобретении, «алкинил» представляет собой алкильную группу, имеющую по меньшей мере одну тройную связь углерод-углерод, и примеры ненасыщенной алкинильной группы включают этинил и 2-пропинил, и т. д.

В настоящем описании «карбоксы» относится к  $-C(=O)OH$ .

В настоящем описании «формил» относится к  $-C(=O)H$ .

В некоторых вариантах осуществления настоящего описания, «арил» относится к одновалентной группе, полученной путем удаления атома водорода из атома ароматического кольца ароматического соединения. Например, « $C_{5-7}$  арил» представляет собой группу, имеющую от 5 до 7 кольцевых атомов, которая представляет собой одновалентную группу, полученную путем удаления атома водорода из ароматических кольцевых атомов ароматического соединения, и « $C_{5-10}$  арил» представляет собой группу, имеющую от 5 до 10 кольцевых атомов, которая представляет собой одновалентную

группу, полученную путем удаления атома водорода из ароматических кольцевых атомов ароматического соединения. В настоящем изобретении префиксы ( $C_{5-7}$ ,  $C_{5-10}$  и т. д.) относятся к числу кольцевых атомов или диапазону числа кольцевых атомов, независимо от того, являются ли они атомами углерода или гетероатомами. Например, « $C_{5-6}$  арил» относится к арильной группе, имеющей 5 или 6 атомов в кольце. В настоящем изобретении, кольцевыми атомами могут быть все атомы углерода, как в «карбоарильной группе». Примеры карбоарильной группы включают, но не ограничены ими, группы, полученные из бензола, нафталина, азулена, антрацена, фенантрена, нафтацена и пирена. Примеры арильных групп, которые включают конденсированное кольцо, в котором по меньшей мере одно является ароматическим кольцом, включают, но не ограничены ими, группы, полученные из индана, индена, изоиндена, тетралина, аценафтена, флуорена, феналена, ацесфенантрена и асеантрена. Альтернативно, кольцевые атомы могут содержать один или более гетероатомов, как в «гетероарильной группе».

В других вариантах осуществления настоящего изобретения, «арил», используемый в настоящем изобретении, включает замещенные или незамещенные ароматические группы с одним кольцом, в которых каждый атом кольца представляет собой углерод. Предпочтительно, кольцо представляет собой 5-7-членное кольцо, более предпочтительно, 6-членное кольцо. Термин «арил» также включает полициклические кольцевые системы, имеющие два или более циклических колец, в которых два или более атомов углерода являются общими для двух соседних колец, где по меньшей мере одно из колец является ароматическим, например, другими циклическими кольцами могут быть циклоалкилы, циклоалкенилы, циклоалкинилы, арилы, гетероарилы и/или гетероциклы. Арильные группы включают бензол, нафталин, фенантрен, фенол, анилин и подобные.

В настоящем изобретении «гетероарил» относится к арилу, содержащему один или более гетероатомов, такому как пиридин, пиримидин, бензотиофен, фурил, диоксоланил, пирролил, оксазолил, пиридил, пиридазинил, более конкретно, бензофуран, изобензофуран, индол, изоиндол, индолизин, индолин, изоиндолин, пурин (аденин или гуанин), бензимидазол, индазол, бензоксазол, бензизоксазол, бензодиоксол, бензофуран, бензотриазол, бензотиофуран, бензотиазол,  $C_9$ , имеющий два конденсированных кольца, полученных из бензотиазола, хромен, изохромен, хроман, изохроман, бензодиоксан, хинолин, изохинолин, хинолизин, бензоксазин, бензодиазин, пиридопиридин, хиноксалин, хиназолин, циннолин, фталазин, нафтиридин,  $C_{10}$ , имеющий два конденсированных кольца, полученных из птеридина,  $C_{11}$ , имеющий два конденсированных кольца, полученных из бензодиазепина, карбазол, дибензофуран, дибензотиофен, карболин, пиримидин,  $C_{13}$ , имеющий три конденсированных кольца, полученных из пиридоиндола, акридин, ксантен, тиоксантен, феноксатиин, феназин, феноксазин, фенотиазин, тиантрен, фенантридин, фенантролин и  $C_{14}$ , имеющий три конденсированных кольца, полученных из феназина.

В настоящем описании, «циклоалкил» относится к алкильной группе, которая представляет собой циклоалкильную группу, и относится к одновалентной группе,

полученной путем удаления атома водорода из алициклического кольцевого атома циклического углеводородного соединения. Примеры циклоалкильных групп включают, но не ограничены ими, такие, которые получены из:

насыщенных углеводородных соединений с одним кольцом, таких как: циклопропан, циклобутан, циклопентан, циклогексан, циклогептан, метилциклопропан, диметилциклопропан, метилциклобутан, диметилциклобутан, метилциклопентан, диметилциклопентан и метилциклогексан; или

ненасыщенных углеводородных соединений с одним кольцом, таких как: циклопропен, циклобутен, циклопентен, циклогексен, метилциклопропен, диметилциклопропен, метилциклобутен, диметилциклобутен, метилциклопентен, диметилциклопентен и метилциклогексен; и насыщенных гетероциклических углеводородных соединений: норкарана, норфенена и норборнена.

В настоящем описании «гетероциклил» относится к одновалентной группе, полученной путем удаления атома водорода из кольцевого атома гетероциклического соединения.

В настоящем описании префиксы (например, C<sub>1-12</sub>, C<sub>3-8</sub> и т. д.) относятся к числу атомов в кольце или диапазону количества атомов в кольце, независимо от того, являются ли они атомами углерода или гетероатомами. Например, термин «C<sub>3-6</sub> гетероциклил», используемый в настоящем описании, относится к гетероциклильной группе, имеющей от 3 до 6 атомов в кольце.

Примеры гетероциклильных групп с одним кольцом включают, но не ограничены ими, группы, полученные из:

1N: азиридина, азетидина, пирролидина, пирролина, 2Н- или 3Н-пиррола, пиперидина, дигидропиридина, тетрагидропиридина, азепина;

2N: имидазолидина, пиразолидина, имидазолина, пиразолина, пиперазина;

1O: оксирана, оксетана, оксолана, оксола, оксана, дигидропирана, пирана, оксепина;

2O: диоксолана, диоксана и диоксепана;

3O: триоксана;

1N1O: тетрагидрооксазола, дигидрооксазола, тетрагидроизоксазола, дигидроизоксазола, морфолина, тетрагидрооксазина, дигидрооксазина,

1S: тирана, тиетана, тиолана, тиана, тиепана;

1N1S: тиазолина, тиазолидина, тиоморфолина;

2N1O: оксадиазина;

1O1S: оксатиола, оксатиана; и

1N1O1S: оксатиазина.

В настоящем описании, «пролекарство» относится к соединениям, которые в физиологических условиях *in vivo* (например, ферментативное окисление, восстановление и/или гидролиз) могут под действием фермента или желудочной кислоты прямо или косвенно превращаться в пирролобензодиазепиновое лекарственное средство.

В настоящем описании, «фармацевтически приемлемая соль» может представлять собой кислотно-аддитивную соль, образованную фармацевтически приемлемой свободной кислотой, где свободная кислота представляет собой органическую кислоту или неорганическую кислоту.

Органические кислоты включают, но не ограничены ими, лимонную, уксусную, молочную, винную, малеиновую, фумаровую, муравьиную, пропионовую, щавелевую, трифторуксусную, бензойную, глюконовую, метансульфоновую, гликолевую, янтарную, глутаминовую и аспарагиновую кислоты. Также, неорганические кислоты включают, но не ограничены ими, хлористоводородную кислоту, бромноватую кислоту, серную кислоту и фосфорную кислоту.

Например, если соединение имеет функциональную группу, которая представляет собой анион или может быть инионом (например,  $\text{-COOH}$  может быть  $\text{-COO}^-$ ), для образования соли можно использовать подходящий катион. Примеры подходящих неорганических катионов включают, но не ограничены ими,  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , катионы щелочноземельных металлов, такие как  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , и другие катионы, такие как  $\text{Al}^{3+}$ . Примеры подходящих органических катионов включают, но не ограничены ими, ион аммония (т.е.  $\text{NH}_4^+$ ) и замещенные ионы аммония (например,  $\text{NH}_3\text{R}^+$ ,  $\text{NH}_2\text{R}_2^+$ ,  $\text{NHR}_3^+$ ,  $\text{NR}_4^+$ ).

Некоторые примеры подходящих замещенных ионов аммония получают из следующих соединений: этиламин, диэтиламин, дициклогексиламин, триэтиламин, бутиламин, этилендиамин, этаноламин, диэтанолламин, пиперазин, бензиламин, фенилбензиламин, холин, меглумин и трометамин, а также аминокислоты, такие как лизин и аргинин. Примером типового четвертичного иона аммония является  $\text{N}(\text{CH}_3)^{4+}$ .

Если соединение имеет функциональную группу, которая может быть катионом или катионом (например,  $\text{-NH}_2$  может быть  $\text{-NH}_3^+$ ), соль может быть образована с подходящим анионом. Примеры подходящих неорганических анионов включают, но не ограничены ими, такие, которые получены из следующих неорганических кислот: хлористоводородной кислоты, бромистоводородной кислоты, йодистоводородной кислоты, серной кислоты, азотной кислоты, азотистой кислоты, фосфорной кислоты и фосфористой кислоты.

Примеры подходящих органических анионов включают, но не ограничены ими, такие, которые получены из органических кислот, таких как: 2-ацетоксибензойная кислота, уксусная кислота, аскорбиновая кислота, аспарагиновая кислота, бензойная кислота, камфорсульфоновая кислота, коричная кислота, лимонная кислота, дисульфоновая кислота, этансульфоновая кислота, фумаровая кислота, глутароновая кислота, глюконовая кислота, глутаминовая кислота, гликолевая кислота, гидроксималеиновая кислота, гидроксинафталинкарбоновая кислота, изетионовая кислота, молочная кислота, но не ограничены ими, яблочная кислота, метансульфоновая кислота, mucilous (?) кислота, олеиновая кислота, щавелевая кислота, пальмитиновая кислота, палмовая кислота, пантотеновая кислота, фенилуксусная кислота,

фенилсульфоновая кислота, пропионовая кислота, пировиноградная кислота, салициловая кислота, стеариновая кислота, янтарная кислота, сульфаниловая кислота и винная кислота и т. д. Примеры подходящих мультимерных органических анионов включают, но не ограничены ими, такие, которые получены из следующих мультимерных кислот: дубильная кислота, карбоксиметилцеллюлоза и т. д.

В настоящем описании «сольват» относится к молекулярному комплексу между соединением по настоящему изобретению и молекулами растворителя, примеры которого включают, но не ограничены ими, воду, изопропанол, этанол, метанол, диметилсульфоксид, этилацетат, уксусную кислоту, этаноламин, или соединением по настоящему изобретению, связанному со смешанным растворителем.

Может быть удобно или желательно получать, очищать и/или обрабатывать сольваты, соответствующие активным соединениям. В настоящем описании, термин «сольват» используется в его обычном смысле для обозначения растворенных веществ (например, активных соединений и солей активных соединений) и комплексов растворителей. Когда растворителем является вода, сольват удобно называть гидратом, таким как моногидрат, дигидрат или тригидрат, и т. д.

В настоящем изобретении «эффективная доза» или «эффективная терапевтическая доза» относится к дозе, необходимой для достижения целевого терапевтического эффекта (в отношении дозы введения, периода введения и средств). Эффективная доза представляет собой минимально необходимое количество активирующего агента, чтобы дать объекту минимальную терапевтическую пользу, и является меньшей, чем токсическая доза. Например, доза введения может быть в диапазоне от приблизительно 100 нг до приблизительно 100 мг/кг на пациента, более типично, в диапазоне приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг. В случае, когда активирующее соединение представляет собой соль, сложный эфир, амид или пролекарство и т. д., дозу введения рассчитывают на основе исходного соединения, и, следовательно, фактическая используемая масса увеличивается пропорционально. Соединение пирролобензодиазепина по настоящему изобретению может быть составлено так, чтобы включать от 0,1 мг до 3000 мг, от 1 мг до 2000 мг или от 10 мг до 1000 мг активного ингредиента на стандартную дозированную форму, но не ограничивается ими.

Активный ингредиент может быть введен для получения пиковой концентрации активного соединения в плазме приблизительно от 0,05 мкМ до 100 мкМ, от 1 мкМ до 50 мкМ или от 5 мкМ до 30 мкМ. Например, раствор от 0,1% масс./об. до 5% масс./об. активного ингредиента в солевом растворе, необязательно, можно вводить внутривенной инъекцией.

Концентрация активного соединения в фармацевтической композиции может определяться скоростью абсорбции, инактивации и выведения лекарственного средства, и другими факторами, известными специалистам в данной области техники. Вводимая доза может отличаться в зависимости от тяжести симптомов или заболевания. Кроме того, доза и способ введения для данного пациента могут быть скорректированы в соответствии с

профессиональным мнением лечащего врача, принимая во внимание степень симптомов/заболевания пациента, необходимость, возраст и ответ на лекарственное средство, и т. д., и диапазон концентраций, указанный в настоящем изобретении, является только иллюстративным и не предназначен для ограничения настоящего изобретения представленными примерами заявленной композиции. Кроме того, активный ингредиент можно вводить за одно введение, или меньшие дозы можно вводить несколькими введениями.

### **Антитело или антигенсвязывающий фрагмент**

В настоящем изобретении описано антитело, которое специфически связывается с внеклеточным доменом белка ROR1. Как описано в настоящем описании, антитело по настоящему изобретению представляет собой полипептид, содержащий шесть определяющих комплементарность участков или областей, (CDR).

В некоторых примерах, CDR включена в «каркасную» область, и каркас ориентирует CDR таким образом, что CDR могут обладать соответствующими антигенсвязывающими свойствами.

Антитело по настоящему изобретению специфически связывается с внеклеточным доменом ROR1 человека и мыши, и может специфически связываться с внеклеточным доменом в выделенной форме, или с внеклеточным доменом ROR1, экспрессируемым на клеточной поверхности.

Антитело, описанное в настоящем изобретении, связывается с ROR1, в частности с ROR1 человека и ROR1 мыши. Антитело, описанное в настоящем изобретении, способное специфически связываться с внеклеточным доменом ROR1 человека или мыши или с ROR1, экспрессируемым на клеточной поверхности, может быть полезно для таргетного лечения рака через таргетирование ROR1. Например, антитело по настоящему изобретению может быть связано с противораковым лекарственным средством и использоваться для лечения конкретных видов рака.

Кроме того, поскольку антитело связывается с ROR1 мыши, специфическая в отношении мишени токсичность может быть подтверждена с помощью тестирования на мышцах, и эффективность *in vivo* может быть подтверждена с помощью сингенной модели с использованием линии раковых клеток мыши, суперэкспрессирующей ROR1 мыши. Таким образом, антитело может быть полезным в разработке различных лекарственных средств, связанных с ROR1.

Антитело может включать, но не ограничено ими, моноклональное антитело, антитело с двойной специфичностью, двойное антитело, мультиспецифическое антитело, множественное антитело, миниантитело, доменное антитело, миметик антитела (или синтетическое антитело), химерное антитело или слитое антитело (или конъюгат) и его фрагмент, и включает различные формы антител, описанных в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления, фрагмент антитела, описанный в настоящем изобретении, может включать Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, scFab, Fv, dsFv, scFV, scFV-Fc, минитело, диатело, scAb или dAb.

В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем изобретении, могут состоять из полипептида, состоящего только из легких цепей или только из тяжелых цепей, содержащих переменные области, описанные в Таблице 2a и Таблице 2b.

Одно антитело, описанное в настоящем изобретении, может иметь общую специфическую область или последовательность с другим антителом, описанным в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления, оно может иметь общую константную область антитела или антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления, оно может иметь общую Fc область. В некоторых вариантах осуществления, она может иметь общую рамку переменной области.

В некоторых вариантах осуществления, антитело имеет типовую структуру антитела, найденного в природе. Животные-представители верблюдовых продуцируют антитело, состоящее из одной тяжелой цепи, но структурная единица этого антитела обычно содержит тетрамерный полипептид, где тетрамер представляет собой пару из двух тел полипептидной цепи, состоящих из двух разных полипептидных цепей. В типовом антителе, одна пара тела полипептидной цепи включает одну полноразмерную легкую цепь (приблизительно 25 кДа) и одну полноразмерную тяжелую цепь (приблизительно от 50 до 70 кДа). Каждая цепь демонстрирует характерный паттерн укладки и состоит из нескольких доменов иммуноглобулина, состоящих примерно из 90-110 аминокислот. Эти домены являются основными единицами, составляющими полипептид антитела. Амино-концевая часть каждой цепи обычно содержит часть, называемую переменной областью или V областью, которая распознает антиген. Карбокси-концевая часть более консервирована эволюционно, чем амино-концевая, и включает часть, называемую константной областью или C областью. Легкая цепь человека обычно классифицируется как легкая цепь каппа (K) или лямбда ( $\lambda$ ), и она содержит одну переменную область и одну константную область, соответственно.

Тяжелая цепь обычно классифицируется как цепь мю ( $\mu$ ), дельта ( $\delta$ ), гамма ( $\gamma$ ), альфа ( $\alpha$ ) или эпсилон ( $\epsilon$ ), и они определяются как изотипы IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. IgG имеет множество подтипов, включая, но не ограничиваясь ими, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Подтипы IgM включают IgM1 и IgM2. Подтипы IgA включают IgA1 и IgA2. У человека, изотипы IgA и IgD включают 4 тяжелых цепи и 4 легких цепи;

Изотипы IgG и IgE содержат 2 тяжелые цепи и 2 легкие цепи, и изотип IgM включает 5 тяжелых цепей и 5 легких цепей. Константная область тяжелой цепи обычно включает по меньшей мере один домен, демонстрирующий эффекторную функцию. Количество доменов константной области тяжелой цепи варьирует в зависимости от изотипа. Например, тяжелая цепь IgG, например, содержит 3 C области домена, известных как CH1, CH2 и CH3, соответственно. Антитело, описанное в настоящем изобретении, может быть любым из этих изотипов и подтипов. В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой подтип IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления, антитело по настоящему изобретению представляет собой тип

IgG1 или IgG2. В другом варианте осуществления, антитело по настоящему изобретению представляет собой тип IgG1.

Вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи по настоящему изобретению могут быть связаны по меньшей мере с частью константной области человека. Выбор константной области может быть определен, частично, тем, требуется или нет антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, антителозависимый клеточный фагоцитоз и/или комплементзависимая цитотоксичность. Например, изотипы IgG1 и IgG3 человека обладают комплементзависимой цитотоксичностью, и изотипы IgG2 и IgG4 человека не обладают этой цитотоксичностью. Кроме того, IgG1 и IgG3 человека индуцируют клеточно-опосредованную эффекторную функцию, более сильную, чем у IgG2 и IgG4 человека. Константная область легкой цепи может быть лямбда или каппа.

В некоторых вариантах осуществления, антитело может представлять собой антитело человека, и константная область тяжелой цепи может относиться к типу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления, антитело по настоящему изобретению представляет собой антитело типа IgG1 или IgG2.

В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой антитело человека и специфически распознает ROR1 мыши.

В полноразмерной легкой цепи и тяжелой цепи вариабельная область и константная область связаны областью «J», которая имеет длину примерно 12 или более аминокислот, и тяжелая цепь содержит область «D» длиной примерно 10 или более аминокислот. Например, см. *Fundamental Immunology*, 2nd ed., Ch. 7 (Paul, W., ed.) 1989, New York: Raven Press. Как правило, вариабельная область пары легкая цепь/тяжелая цепь антитела образуют антигенсвязывающий сайт.

Вариабельная область цепи иммуноглобулина обычно имеет одинаковую общую структуру и содержит сравнительно консервативную каркасную область (FR), соединенную 3 гипервариабельными областями, называемыми «определяющими комплементарность сайтами или областями или доменами», или CDR (определяющая комплементарность область). CDR вариабельной области, полученная из каждой цепи, содержащей пару тяжелая цепь/легкая цепь, обычно компонуется каркасной областью с образованием структуры, специфически связывающейся со специфическим эпитопом белка-мишени (ROR1). Эти факторы областей существующей в природе легкой цепи и тяжелой цепи обычно содержатся от N-конца к С-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Положение аминокислотных последовательностей, соответствующих каждой вариабельной области, может быть определено по Kabat. CDR, определяемые каждым определением, при сравнении друг с другом, могут быть подмножествами, которые перекрываются или где одно включает другое. Однако в настоящем описании все CDR, которые должны быть определены каждым из вышеприведенных способов, включены в объем изобретения. Специалисты в данной области смогут легко выбрать последовательности CDR в соответствии с приведенными

выше определениями, учитывая последовательность вариабельной области антитела.

Последовательности CDR, которые могут быть включены в вариабельные области тяжелой и легкой цепей антитела или антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящего изобретения, описаны в таблице 1a - таблице 1f, соответственно.

[Таблица 1a]

| <b>CDR1 тяжелой цепи</b>  |                  |
|---------------------------|------------------|
| <b>Последовательность</b> | <b>SEQ ID NO</b> |
| SYDMS                     | 1                |
| DYYMS                     | 2                |
| NYDMS                     | 3                |
| NYAMS                     | 4                |
| DYDMS                     | 5                |

[Таблица 1b]

| <b>CDR2 тяжелой цепи</b>  |                  |
|---------------------------|------------------|
| <b>Последовательность</b> | <b>SEQ ID NO</b> |
| WISPDGSGSIYYADSVKG        | 6                |
| SISPDGSGNTYYADSVKG        | 7                |
| WISPGGGSKYYADSVKG         | 8                |
| AIYHSGSSKYYADSVKG         | 9                |
| GISHGSGNKYYADSVKG         | 10               |
| SISHNSGSTYYADSVKG         | 11               |
| VISPDGSGSIYYADSVKG        | 12               |
| SISPSSGSSIYYADSVKG        | 13               |
| SISPDASNTYYADSVKG         | 96               |

[Таблица 1c]

| <b>CDR3 VH</b>            |                  |
|---------------------------|------------------|
| <b>Последовательность</b> | <b>SEQ ID NO</b> |
| PTGRFDY                   | 14               |
| NLRAFDY                   | 15               |
| VNGRFDY                   | 16               |
| GGNGAWDTGFDY              | 17               |
| RLSLRRRPSYYSDNAMDV        | 18               |
| FISARKSLGRSYSNGMDV        | 19               |
| DVVECNMNPSCSYDNAMDV       | 20               |
| APGWCQAPSCYYDNAMDV        | 21               |
| GGNAAWDTGFDY              | 97               |

[Таблица 1d]

| <b>CDR1 легкой цепи</b>   |                  |
|---------------------------|------------------|
| <b>Последовательность</b> | <b>SEQ ID NO</b> |
| SGSSSNIGNNNVN             | 22               |
| SGSSSNIGSNTVY             | 23               |
| SGSSSNIGNNNVS             | 24               |
| SGSSSNIGSNDVS             | 25               |
| TGSSSNIGNNAVN             | 26               |
| TGSSSNIGSNDVT             | 27               |
| SGSSSNIGSNYVS             | 28               |
| SGSSSNIGNNDVS             | 29               |

[Таблица 1e]

| <b>CDR2 легкой цепи</b>   |                  |
|---------------------------|------------------|
| <b>Последовательность</b> | <b>SEQ ID NO</b> |
| YDNKRPS                   | 30               |
| ANSQRPS                   | 31               |
| ADSHRPS                   | 32               |
| YDNNRPS                   | 33               |
| YDSNRPS                   | 34               |
| ADSKRPS                   | 35               |
| DDSHRPS                   | 36               |
| DDSQRPS                   | 37               |

[Таблица 1f]

| <b>CDR3 легкой цепи</b>   |                  |
|---------------------------|------------------|
| <b>Последовательность</b> | <b>SEQ ID NO</b> |
| GTWDASLSGYV               | 38               |
| GSWDYSLSGYV               | 39               |
| ATWDYSLSGYV               | 40               |
| GAWDDSLSGYV               | 41               |
| GAWDDSLSGYV               | 41               |
| GTWDYSLSGYV               | 42               |

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, последовательности переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента, содержащие указанные выше последовательности CDR легкой цепи и тяжелой цепи, описаны в Таблице 2a и Таблице 2b ниже, соответственно

[Таблица 2a]

| Последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH)                                                                                  | SEQ ID NO |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVS<br>WISPDGSGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARP<br>TGRFDYWGQGTLVTVSS             | 43        |
| EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWVRQAPGKGLEWVS<br>SISPDGSGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKN<br>LRAFDYWGQGTLVTVSS             | 44        |
| EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVS<br>WISPGGGSKYIYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<br>VNGRFDYWGQGTLVTVSS             | 45        |
| EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYDMSWVRQAPGKGLEWVS<br>AIYHSGSSKYIYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<br>GGNGAWDTGFDYWGQGTLVTVSS        | 46        |
| EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYDMSWVRQAPGKGLEWVS<br>GISHGSGNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK<br>RLSLRRRPSYYSNDAMDVWGQGTLVTVSS   | 47        |
| EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVS<br>SISHNSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKFI<br>SARKSLGRSYSNGMDVWGQGTLVTVSS   | 48        |
| EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYDMSWVRQAPGKGLEWVS<br>VISPDGGSIIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD<br>VVECNMNPSCSYDNAMDVWGQGTLVTVSS | 49        |
| EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYDMSWVRQAPGKGLEWVS<br>SISPSSGSSIIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKA<br>PGWCQAPSCYYDNAMDVWGQGTLVTVSS | 50        |
| EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWVRQAPGKGLEWVS<br>SISPDASNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKN<br>LRAFDYWGQGTLVTVSS              | 98        |
| EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYDMSWVRQAPGKGLEWVS<br>AIYHSGSSKYIYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR<br>GGNAAWDTGFDYWGQGTLVTVSS        | 99        |

[Таблица 2b]

| Последовательность варибельной области легкой цепи (VL)                                                                 | SEQ ID NO |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNNVNWYQQLPGTAPKLLIYY<br>DNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDASLSGYVF<br>GGGTKLTVLG | 51        |
| QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVYWYQQLPGTAPKLLIYA<br>NSQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDYSLSGYVF<br>GGGTKLTVLG | 52        |
| QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNNVSWYQQLPGTAPKLLIYA<br>DSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDYSLSGYVF<br>GGGTKLTVLG | 53        |
| QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNDVSWYQQLPGTAPKLLIYY<br>DNNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGAWDDSLSGYVF<br>GGGTKLTVLG | 54        |
| QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGNNAVNWYQQLPGTAPKLLIYY<br>DSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGAWDDSLSGYVF<br>GGGTKLTVLG | 55        |
| QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNDVTWYQQLPGTAPKLLIYA<br>DSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDYSLSGYVF<br>GGGTKLTVLG | 56        |
| QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVSWYQQLPGTAPKLLIYD<br>DSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGAWDDSLSGYVF<br>GGGTKLTVLG | 57        |
| QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNDVSWYQQLPGTAPKLLIYD<br>DSQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGAWDDSLSGYVF<br>GGGTKLTVLG | 58        |

В некоторых вариантах осуществления, CDR соответствующих варибельных областей легкой цепи и CDR соответствующих варибельных областей тяжелой цепи, описанные выше в таблице 1a - таблице 1f, могут свободно комбинироваться.

В некоторых вариантах осуществления, варибельные области тяжелой цепи и легкой цепи, описанные в Таблице 2a и Таблице 2b, можно свободно комбинировать для получения различных форм антитела, и, например, может быть получено одно антитело, такое как ScFv, или доменное антитело или полноразмерное антитело.

Каждая из варибельных областей тяжелой цепи и легкой цепи, описанных в настоящем изобретении, может связываться с различными константными областями-мишенями тяжелой цепи и легкой цепи с образованием тяжелых цепей и легких цепей, соответственно, интактного антитела. Кроме того, соответствующие последовательности тяжелой и легкой цепей, связанные с константными областями, могут быть дополнительно скомбинированы с образованием интактной структуры антитела.

Любая варибельная область тяжелой цепи или легкой цепи антитела по настоящему изобретению может быть связана по меньшей мере с частью константной области. Константная область может быть выбрана в зависимости от того, требуется или нет антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, антителозависимый клеточный фагоцитоз и/или комплементзависимая цитотоксичность и т.д.

В зависимости от поставленной задачи, можно использовать любую подходящую константную область, например константную область человека или мыши. В некоторых вариантах осуществления, используют константную область тяжелой цепи IgG1 человека,

представленную SEQ ID No. 91. В некоторых вариантах осуществления, область лямбда человека, представленную SEQ ID No. 93, используют в качестве константной области легкой цепи.

Любая переменная область, описанная в настоящем изобретении, может связываться с константной областью с образованием последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления, переменная область тяжелой цепи, описанная в настоящем изобретении, может быть связана с константной областью IgG1 человека, представленной SEQ ID NO: 59-66, 100 и 101. В некоторых вариантах осуществления, переменная область легкой цепи, описанная в настоящем изобретении, может быть связана с константной областью лямбда человека, и они представлены соответственно SEQ ID NO: 67-74. Легкая цепь и тяжелая цепь по настоящему изобретению могут быть объединены в различных комбинациях с образованием интактных антител, содержащих две легкие цепи и две тяжелые цепи.

Однако эти последовательности константных областей, которые можно комбинировать с переменными областями, описанными в настоящем изобретении, предназначены для примера, и специалистам в данной области техники должно быть известно, что могут быть использованы другие переменные области, включая константные области тяжелой цепи IgG1, константные области тяжелой цепи IgG3 или IgG4, любую константную область легкой цепи каппа или лямбда или другие переменные области, модифицированные для придания целевых характеристик, таких как стабильность, экспрессия, технологичность или другие.

Настоящее изобретение также включает одну или несколько последовательностей нуклеиновых кислот, обладающих значительной идентичностью последовательностей с одной или несколькими последовательностями нуклеиновых кислот, описанными в настоящем изобретении. Существенная идентичность означает, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент, кодируемый нуклеиновой кислотой, сохраняет эффект, описанный в настоящем описании, даже с изменением последовательности. В некоторых вариантах осуществления, последовательность имеет примерно 90%, 95% или 99% идентичность к переменным областям тяжелой цепи, описанным в таблице 2a. В некоторых вариантах осуществления, последовательность имеет примерно 90%, 95% или 99% идентичность к переменным областям легкой цепи, описанным в таблице 2b. Например, в случае варианта, демонстрирующего 90%, 95% или 99% идентичность к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, описанному в настоящем изобретении, изменение происходит в каркасе переменной области, а не в CDR.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая антитело, описанное в настоящем изобретении, или его фрагмент, представляет собой нуклеиновую кислоту, которая кодирует CDR, описанные в настоящем описании, переменную область, включающую CDR, и полноразмерное антитело, включающее переменную область и константную область. При определении аминокислотной последовательности, последовательность нуклеиновой кислоты может быть легко

определена с использованием известных программ обратной транскрипции и с учетом использования кодонов и т. д. Пример последовательности нуклеиновой кислоты для константной области тяжелой цепи, кодирующей IgG1 человека, может быть представлен SEQ ID No. 92. Пример последовательности нуклеиновой кислоты для константной области легкой цепи, кодирующей лямбду человека, может быть представлен SEQ ID No. 94 или 95. Примеры последовательности нуклеиновой кислоты для полноразмерной тяжелой цепи, включая указанную выше константную область нуклеиновой кислоты, могут быть представлены SEQ ID NO: 75-82, 102 и 103 (тяжелая цепь, включая константную область IgG1 человека), и примеры последовательностей нуклеиновой кислоты для полноразмерной легкой цепи могут быть представлены SEQ ID No. 83-90 (легкая цепь, включая константную область лямбда человека).

Кроме того, включены последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие последовательности CDR из таблицы 1a - таблицы 1f и переменные области из таблицы 2a и таблицы 2b. Эти нуклеиновые кислоты включены в последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие полноразмерное антитело, описанное выше, и не указаны отдельно. Специалисты в данной области техники, на основании белковых последовательностей CDR и переменных областей, описанных в настоящем изобретении, легко идентифицируют среди SEQ ID No: 75-90 последовательности нуклеиновых кислот, которые их кодируют.

Настоящее изобретение дополнительно включает по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты, которая имеет существенную идентичность последовательности по меньшей мере с одной нуклеиновой кислотой, описанной в настоящем изобретении. По существу идентичность означает, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент, кодируемый нуклеиновой кислотой, сохраняет эффект, описанный в настоящем описании, даже в случаях, когда изменение нуклеиновой кислоты вызывает консервативную замену или изменение аминокислот, при котором изменение нуклеиновой кислоты не сопровождается аминокислотной заменой.

### **Специфичность и аффинность антитела к антигену**

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению обладают специфичностью, в частности, к ECD антигена ROR1, и аффинностью, подходящей для применения в качестве терапевтического или диагностического агента на основе антитела. В одном варианте осуществления, согласно таблице 6, аффинность агрегата имеет  $KD < 1,0 \times 10^{-9}$  М; и в другом варианте осуществления,  $KD \leq 1,0 \times 10^{-10}$  М. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, имеющее такую аффинность, имеет преимущество в том, что его можно вводить в меньших дозах по сравнению с антителами с более низкой аффинностью, например  $10^{-8}$  М или  $10^{-9}$  М. Хотя антитела не ограничиваются описанными выше, [описанные] имеют большое клиническое преимущество, поскольку достаточная эффективность может быть достигнута за счет более удобных способов введения, таких как подкожная инъекция.

### **Переменная область антитела**

Настоящее изобретение включает переменные области тяжелых цепей и легких цепей, описанные выше в Таблице 2a и Таблице 2b. Кроме того, настоящее изобретение включает антитело, включающее иммунологический функциональный фрагмент, производное, мутантный белок и вариант переменных областей легкой цепи и тяжелой цепи (и соответствующую последовательность нуклеиновой кислоты). Антитело, в котором переменные области тяжелых цепей и легких цепей по настоящему изобретению, объединены различными путями, может быть обозначено как «VHx/VLy», где «х» означает переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO., и «у» соответствует легкой цепи. В одном примере, переменная область может включать следующие комбинации: VH43/VL51, VH43/VL52, VH43/VL53, VH43/VL54, VH43/VL55, VH43/VL56, VH43/VL57, VH43/VL58, VH44/VL51, VH44/VL52, VH44/VL53, VH44/VL54, VH44/VL55, VH44/VL56, VH44/VL57, VH44/VL58, VH45/VL51, VH45/VL52, VH45/VL53, VH45/VL54, VH45/VL55, VH45/VL56, VH45/VL57, VH45/VL58, VH46/VL51, VH46/VL52, VH46/VL53, VH46/VL54, VH46/VL55, VH46/VL56, VH46/VL57, VH46/VL58, VH47/VL51, VH47/VL52, VH47/VL53, VH47/VL54, VH47/VL55, VH47/VL56, VH47/VL57, VH47/VL58, VH48/VL51, VH48/VL52, VH48/VL53, VH48/VL54, VH48/VL55, VH48/VL56, VH48/VL57, VH48/VL58, VH49/VL51, VH49/VL52, VH49/VL53, VH49/VL54, VH49/VL55, VH49/VL56, VH49/VL57, VH49/VL58, VH50/VL51, VH50/VL52, VH50/VL53, VH50/VL54, VH50/VL55, VH50/VL56, VH50/VL57, VH50/VL58, VH98/VL51, VH98/VL52, VH98/VL53, VH98/VL54, VH98/VL55, VH98/VL56, VH98/VL57, VH98/VL58, VH99/VL51, VH99/VL52, VH99/VL53, VH99/VL54, VH99/VL55, VH99/VL56, VH99/VL57 или VH99/VL58.

#### **Различные другие формы антитела**

Антитело, описанное в настоящем изобретении, также является вариантом антитела, описанным в настоящем изобретении. Например, часть антигена содержит консервативную аминокислотную замену в одном или нескольких остатках тяжелых цепей, легких цепей, переменных областях или последовательностях CDR, описанных выше. Консервативной аминокислотной заменой называют замену, которая существенно не влияет на активность полипептида или его антигенность. В некоторых вариантах осуществления, консервативная аминокислотная замена относится к замене другим остатком, попадающим в ту же категорию в следующей классификации аминокислот. Природные аминокислоты могут быть классифицированы следующим образом на основе общих свойств боковой цепи: 1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile; 2) нейтральные, гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; 3) кислые: Asp, Glu; 4) основные: His, Lys, Arg; 5) остатки, влияющие на направление цепи: Gly, Pro; и 6) ароматические: Trp, Tyr, Phe. Консервативная аминокислотная замена может также включать не встречающийся в природе аминокислотный остаток, такой как пептидный миметик, и этот остаток обычно вводят путем химического синтеза, не клетки.

Неограничивающие примеры консервативных аминокислотных замен показаны в Таблице 3, но не ограничены ими.

[Таблица 3] Консервативная аминокислотная замена

| Исходный остаток | Типовая замена |
|------------------|----------------|
| Ala              | Ser            |
| Arg              | Lys            |
| Asn              | Gln, His       |
| Asp              | Glu            |
| Cys              | Ser            |
| Gln              | Asn            |
| Glu              | Asp            |
| Gly              | Pro            |
| His              | Asn, Gln       |
| Ile              | Leu, Val       |
| Leu              | Ile, Val       |
| Lys              | Arg, Gln, Glu  |
| Met              | Leu, Ile       |
| Phe              | Met, Leu, Tyr  |
| Ser              | Thr            |
| Thr              | Ser            |
| Trp              | Tyr            |
| Tyr              | Trp, Phe       |
| Val              | Ile, Leu       |

Не консервативная замена включает замену остатком, который принадлежит к другим категориям в приведенной выше классификации. Такая замена может быть применена в области антитела, гомологичной антителу человека, или в его не гомологичной области.

#### **Получение антитела**

В настоящем изобретении антитело не человека может быть получено, например,

от любого животного, продуцирующего антитело, например, мыши, крысы, кролика, козы, осла или приматов, отличных от человека (например, обезьян, таких как яванский макак или макак резус) или человекообразных обезьян (например, шимпанзе). Антитело не человека может быть получено путем иммунизации животных с использованием способов, известных в данной области техники. Антитело может быть поликлональным или моноклональным, или может быть синтезировано в клетке-хозяине путем экспрессии рекомбинантной ДНК. Полностью человеческое антитело может быть получено путем введения антигена трансформированному животному, включая локус гена иммуноглобулина человека, или путем обработки антигеном библиотеки фагового дисплея, экспрессирующей репертуар антител человека с антигеном, с последующим выбором антитела-мишени.

Моноклональное антитело (mAb) может быть получено с использованием обычных способов получения моноклональных антител, например стандартного способа соматической гибридизации, описанного в литературе (см.: Kohler and Milstein, 1975, Nature 256:495).

Одноцепочечное антитело, описанное в настоящем изобретении, может быть получено с использованием аминокислотного мостика (короткого пептидного линкера) для связывания фрагментов вариабельного домена тяжелой цепи и легкой цепи (области Fv). Одноцепочечное антитело, описанное в настоящем изобретении, включает scFv, включая комбинации доменов вариабельных областей тяжелой и легкой цепей, перечисленных в таблице 1a - таблице 1f, или CDR, описанных в таблице 1a - таблице 1f, но не ограничиваясь ими.

Кроме того, антитело, описанное в настоящем изобретении, может быть модифицировано в антитело другого подтипа путем переключения подтипа. Соответственно, антитело IgG может быть получено, например, из антитела IgM, и обратное также возможно.

Соответственно, в антитела, описанные в настоящем изобретении, включены, например, антитела с комбинацией вариабельных доменов по настоящему изобретению, переключенные на изотип-мишень (например, IgA, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE и IgD).

### **Способ экспрессии антитела**

Настоящее изобретение дополнительно относится к системам экспрессии и конструкциям в форме плазмид, векторам экспрессии и кассетам транскрипции или экспрессии, включающим по меньшей мере один полинуклеотид, описанный выше; клетке-хозяину, содержащей такие системы или конструкции экспрессии; и способу получения антитела с использованием систем экспрессии или клеток-хозяев.

Антитело, описанное в настоящем изобретении, может быть экспрессировано в клеточной линии гибридомы или клеточной линии, отличной от гибридомы. Конструкции экспрессии, кодирующие антитело, могут быть использованы для трансформации клеток-хозяев млекопитающих, насекомых или микробов. Конструкции, такие как плазмиды, могут быть получены как описано выше, любым из различных известных способов

введения полинуклеотида в клетку-хозяина. Конкретный способ может варьироваться в зависимости от типа клетки-хозяина. Способы введения гетерогенного полинуклеотида в клетку млекопитающего широко известны в данной области техники, и включают, но не ограничены ими, например, декстран-опосредованный перенос, преципитацию фосфатом кальция, полибрен-опосредованный перенос, слияние протопластов, электрофорез, капсулирование перенесенного полинуклеотида с применением липосомы, смешивание нуклеиновой кислоты и положительно заряженного липида и прямой микроинъекцией ДНК в ядро.

### **Использование антитела ROR1 человека в терапевтических и лечебных целях**

При раке, ROR1 ассоциирован с неблагоприятным прогнозом для онкологических пациентов и, как сообщается, влияет на метастазирование. ROR1 суперэкспрессируется не только при гематологических злокачественных новообразованиях, таких как В-клеточный лейкоз, лимфома, острый миелоидный лейкоз (AML), лимфома Беркитта, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), мантийноклеточная лимфома (MCL), острый лимфобластный лейкоз (ALL), диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL), фолликулярная лимфома (FL) и лимфома маргинальной зоны (MZL) и т. д., но также при солидном раке, включая рак молочной железы, рак, рак почки, рак яичников, рак желудка, рак печени, рак легких, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак мочевого пузыря, рак яичек, рак матки, рак предстательной железы, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), нейробластома, рак головного мозга, рак толстой кишки, плоскоклеточную карциному, меланому, миелому, рак шейки матки, рак щитовидной железы, рак головы и шеи и рак надпочечников и т. д. Например, для терапии противораковыми антителами, например, антитело ROR1 может, как описано в настоящем описании, применяться в форме отдельного антитела или в форме, связанной с различными цитотоксическими агентами, для удаления раковых клеток, которые суперэкспрессируют ROR1. Соответственно, антитело, связывающееся с ROR1, может применяться отдельно или как связанное с противораковыми химиотерапевтическими агентами, цитотоксическими агентами или радиоактивными материалами, или может быть воплощено в виде цитотерапевтического агента, такого как CAR-T-клетки, например, для таргетирования противораковой мишени и, таким образом, применяться в качестве таргетного терапевтического агента, который направляет терапевтический агент, полученный из антитела, описанного в настоящем изобретении, в клетку, экспрессирующую ROR1.

### **Способ лечения: фармацевтический состав и путь введения**

Также изобретение относится к способу лечения с использованием антитела, конъюгата антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата. В некоторых вариантах осуществления, антитело, конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват представлено пациенту. Антитело, конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват связывается с ROR1 человека,

экспрессируемым на поверхности раковых клеток, тем самым подавляя метастазирование раковых клеток. В некоторых вариантах осуществления, антитело в форме, связанной с цитотоксическим агентом, связывается с ROR1 человека, экспрессированным на поверхности раковых клеток, специфически доставляя цитотоксический агент в раковые клетки, чтобы вызвать гибель раковых клеток. В некоторых вариантах осуществления, антитело в форме антитела, специфичного к той же или другой мишени, связывается с ROR1 человека, экспрессированным на поверхности раковых клеток, тем самым повышая специфичность мультиспецифического антитела к раковым клеткам или индуцируя соединение раковых клеток с другими типами клеток, такими как иммунные клетки, и индуцируя гибель раковых клеток. В некоторых вариантах осуществления, антитело экспрессируется на поверхности цитотерапевтических агентов, таких как CAR-T-клетки, связываясь с ROR1 человека и тем самым специфически доставляя цитотерапевтический агент к раковым клеткам, вызывая их гибель.

Также изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективную дозу конъюгата антитело-лекарственное средство и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель, солюбилизатор, эмульгатор, консервант и/или добавку. Кроме того, включен, например, способ лечения онкологического пациента введением такой фармацевтической композиции. Термин «пациент» включает пациента-человека.

Фармацевтическая композиция может содержать фармацевтически приемлемые носители. В настоящем изобретении, носители относятся к эксципиентам, разбавителям или адъювантам. Носитель может быть выбран из группы, состоящей из лактозы, декстрозы, сахарозы, сорбита, маннита, ксилита, эритрита, мальтита, крахмала, каучука аравийской камеди, альгината, желатина, фосфата кальция, силиката кальция, целлюлозы, метилцеллюлозы, микрокристаллической целлюлозы, поливинилпирролидона, воды, солевого раствора, PBS и других буферных растворов, метилгидроксibenзоата, пропилгидроксibenзоата, талька, стеарата магния и минерального масла. Композиция может включать наполнители, антикоагулянты, смазывающие агенты, смачивающие агенты, ароматизаторы, эмульгаторы, консерванты или их комбинации.

Фармацевтическая композиция может быть составлена в виде любой дозированной формы в соответствии с известными способами. Композиция может быть составлена в составы для перорального введения (например, порошки, таблетки, капсулы, сиропы, пилюли или гранулы) или не перорального введения (например, инъекции). Кроме того, композиция может быть приготовлена как системный или местный состав.

Фармацевтическая композиция может содержать конъюгат антитела, его антигенсвязывающий фрагмент, противораковые агенты или их комбинации в эффективных количествах. Термин «эффективное количество» относится к количеству, достаточному для проявления профилактического или терапевтического действия при введении индивидууму, нуждающемуся в профилактике или лечении. Эффективное количество может быть соответствующим образом выбрано PHOSITA в зависимости от

клетки или индивидуума, и может быть определено на основе таких элементов, как тяжесть заболевания, возраст пациента, масса тела, состояние здоровья, пол, чувствительность к лекарственным средствам, длительности введения, пути введения, коэффициента выведения, продолжительности терапии и лекарственных средств, смешанных с композицией или используемых одновременно с ней, и других элементов, хорошо известных в области медицины. Эффективное количество может составлять приблизительно от 0,1 мкг до приблизительно 2 г на [единица отсутствует] фармацевтической композиции.

Вводимая доза фармацевтической композиции может составлять, например, от 10 мкг/кг до приблизительно 30 мг/кг для взрослого человека, выборочно, от 0,1 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг, или альтернативно, от 0,3 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг. Введение может осуществляться один раз в сутки, несколько раз в сутки или один раз в неделю до четырех недель, или от одного до двенадцати раз в год.

Далее представлены предпочтительные варианты осуществления для облегчения понимания настоящего изобретения. Однако следующие варианты осуществления представлены для облегчения понимания настоящего изобретения, и настоящее изобретение не ограничивается этими вариантами осуществления.

### **Вариант осуществления 1: Получение антитела ROR1**

#### **Вариант осуществления 1-1: антиген**

В качестве антигена используют белок типа ROR1 ECD-Fc, в котором Fc соединен с С-концом внеклеточного домена (ECD) ROR1 человека.

В частности, для получения антигена используют остаток, включающий внеклеточный домен ROR1 и соответствующий аминокислоте 1-406 аминокислотной последовательности ROR1, представленной ссылочным номером NCBI NP\_0050032. Что касается гена, кодирующего внеклеточный домен ROR1, приобретают и используют кДНК от Origene (Origene, RC214967). Кроме того, для последующей очистки внеклеточного домена ROR1, синтезируют ген, кодирующий белок Fc, полученный из IgG1 человека, и связанный с 3' концом гена, кодирующего внеклеточный домен ROR1 (далее называемый «ROR1-Fc»). Путем введения гена в вектор pCDNA3.1 получают вектор, который кодирует нуклеиновую кислоту ROR1-Fc в клеточной линии млекопитающих.

Вектор экспрессии временно трансфицируют в клетки HEK 293E для экспрессии ROR1-Fc путем культивирования в среде DMEM-/F12 при 8% CO<sub>2</sub> и 37°C, и собирают среду каждые 72 ч. Аффинную хроматографию с белком А используют для очистки Fc-ROR1 ECD белка.

#### **Вариант осуществления 1-2: Селекция антитела путем скрининга фаговой библиотеки**

#### **Получение фаговой библиотеки**

*Escherichia coli*  $2 \times 10^{10}$  с библиотекой одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv), полученных от человека (Yang et. Al., 2009 Mol. Cells 27: 225) с потенциалом

связывания с различными антигенами культивируют в течение 2-3 часов при 37°C (OD<sub>600</sub>=0,5~0,7) в среде, содержащей 2X YT (Amresco, J902-500G), карбенициллин (Duchefa, C01090025 ) 100 мкг/мл и 2% глюкозы (sigma, G7021), затем инфицируют хелперным фагом и культивируют в течение 16 часов при 30°C в среде 2X YT [2X YT, карбенициллин, 70 мкг/мл канамицина (Duchefa, K0126), 1 mM IPTG (Duchefa, I1401)] для индукции упаковки фага. Затем культивируемые клетки центрифугируют (6000 об/мин, 15 минут, 4°C ), и затем 4% PEG8000 (sigma, P2139) и 3% NaCl (Samchun, S2097) добавляют к супернатанту и тщательно растворяют и оставляют реагировать в течение 1 часа на льду. После повторного центрифугирования (8000 об/мин, 20 минут, 4°C), к лепешке добавляют PBS (физиологический раствор с фосфатным буфером, Gibco 10010-023) для создания суспензии, которую снова центрифугируют (12000 об/мин, 10 минут, 4°C). Супернатант, содержащий фаговую библиотеку, помещают в новую пробирку и хранят при 4°C до использования.

### **Пэннинг через фаговый дисплей**

Для скрининга антител, связывающихся с белком ROR1 человека, белок ROR1-Fc, полученный в варианте осуществления 1-1, используют для проведения пэннинга всего три раза, как поясняется ниже.

В частности, в иммунопробирке (maxisorp 444202), ROR1-Fc в концентрации 10 мкг/мл и отрицательный контроль-Fc (BCMA-Fc) добавляют к PBS. Белку дают адсорбироваться на поверхности иммунопробирки в течение ночи при 4°C, после чего в иммунопробирку добавляют 3% раствор BSA (бычьего сывороточного альбумина) для защиты поверхностей, на которые не адсорбировался ROR1-Fc. Иммунопробирку опустошают, и 10<sup>12</sup> КОЕ фаговой библиотеки антитела, диспергированной в 3% растворе BSA, помещают в иммунопробирку, где адсорбирован контрольный белок Fc, затем оставляют реагировать в течение 1 часа при комнатной температуре (отрицательная селекция). Затем фаги, которые не связаны с отрицательным контролем Fc, восстанавливают и связывают с иммунопробиркой, в которую адсорбирован ROR1-Fc. Неспецифически связанные фаги удаляют путем 5-30-кратной промывки раствором PBS-T (физиологический раствор с фосфатным буфером - 0,05% Tween 20), затем оставшиеся антигенспецифические фаговые антитела восстанавливают с использованием 100 mM раствора триэтиламина. Восстановленные фаги нейтрализуют 1M Tris буфером (pH 7,4). ER2537 E.coli инфицируют в течение 1 часа при 37°C, и инфицированные штаммы E.coli высевают на 2X YT агарную среду и культивируют в течение ночи при 37°C. На следующий день, культивированную E.coli суспендируют в 4 мл 2X YT карбенициллиновую культуру и добавляют 15% глицерина. Некоторое количество хранят при -80°C, и остальное используют для получения фагов для следующего эксперимента. Этот процесс повторяют в общей сложности три раза для амплификации и концентрирования пула антиген-специфического фага ROR1.

### **Скрининг моноклональных фаговых антител (скрининг одного клона)**

Следующий эксперимент проводят для выбора моноклонального антитела, которое

специфически связывается с ROR1, из фагового пула, полученного пэннингом.

Чтобы выделить моноклоны из концентрированного пула, фаговый пул высевает на агаризованную среду с LB-тетрациклином/карбенициллином и культивируют с получением одной колонии. Затем моноклоны инокулируют в 96-луночный глубокий планшет, содержащий 400 мкл  $2 \times$  YT-тетрациклиновую/карбенициллиновую среду на лунку и выращивают в течение ночи, затем 10 мкл культуры добавляют в новый 96-луночный глубокий планшет, содержащий 390 мкл  $2 \times$  YT-тетрациклина/карбенициллина и инкубируют при 37°C в течение 4 ч. К культуральному раствору добавляют 1 mM IPTG и инкубируют в течение ночи при 30°C. Культуральный раствор, культивированный в течение ночи, центрифугируют с получением супернатанта.

Затем, способ ELISA используют следующим образом для селекции клонов, экспрессирующих моноклональный растворимый scFv, связывающийся с антигеном ROR1-Fc (Steinberger Rader and Barbas III 2000 Phage display vectors In: Phage Display Laboratory Manual 1sted Cold Spring Harbor Laboratory Press NY USA pp119-1112). Более конкретно, 100 нг на лунку рекомбинантного ROR1-Fc человека, полученного в Варианте осуществления 1-1, или FBMA-Fc помещают в 96-луночный титровальный микропланшет (Nunc-Immuno Plate, NUNC, USA), который покрывали в течение ночи при 4°C. BCMA-Fc представляет собой белок, используемый в качестве отрицательного контроля, рекомбинантный белок, в котором внеклеточный домен белка BCMA человека связан с Fc человека. В каждую лунку помещают по 200 мкл Fc человека с 3% BSA и блокируют в течение 2 часов при 37°C.

Супернатант моноклонального фага готовят путем смешивания 1:1 с 3% BSA, и по 100 мкл каждой из этих смесей загружают в лунки и подвергают реакции в течение 2 часов при 37°C. После 5 промывок 300 мкл PBST добавляют анти-НА HRP связывающее антитело, подвергают реакции в течение 1 часа при 37°C, затем 5 раз промывают PBST. 100 мкл ТМВ (тетраметилбензидин, Sigma, T0440) добавляют для проявления цвета, и затем 50 мкл 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> добавляют для остановки реакции. Абсорбцию измеряют при 450 и 650 нм, и клоны, у которых абсорбция при 450 и 650 нм составляет 10 или выше при покрытии 1 мкм/мл ROR1, подвергают скринингу (фиг. 1).

Затем, проточную цитометрию используют для скрининга клонов, связывающихся с клеточными линиями, экспрессирующими ROR1. В частности, 100 мкл супернатанта моноклонального scFv подвергают реакции с клеточной линией (JeKo-1), суперэкспрессирующей ROR1, затем два раза промывают PBS. После реакции с анти-НА-FITC антителом (Sigma, H7411) при 4°C в течение 30 минут и дважды промывают PBS, затем суспендируют в 200 мкл PBS, проточный цитометр FACSCalibur (BD Bioscience) используют для скрининга клонов, связывающихся с клеточной линией JeKo-1 (фиг. 2).

В ходе этого процесса, 10 клонов антитела (AB4, A2F2, A2F3, BA6, CC9, C2E3, DG6, D2B12, A2F2 M1 и BA6 M1), связывающихся с рекомбинантным белком ROR1 человека, и клеточные линии, экспрессирующие ROR1, подвергают скринингу. Аминокислотная последовательность и CDR последовательность вариабельной области

тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи каждого из этих антител показана в следующих таблицах.

[Таблица 4а]

| Клон       | Последовательности CDR вариантальной области тяжелой цепи (VH) |                 |                        |                 |                         |                 | VH              |
|------------|----------------------------------------------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|-----------------|
|            | CDR1                                                           |                 | CDR2                   |                 | CDR3                    |                 |                 |
|            | Последова<br>тельность                                         | SEQ<br>ID<br>NO | Последова<br>тельность | SEQ<br>ID<br>NO | Последова<br>тельность  | SEQ<br>ID<br>NO | SEQ<br>ID<br>NO |
| AB4        | SYDMS                                                          | 1               | WISPDGSGSIYYADS<br>VKG | 6               | PTGRFDY                 | 14              | 43              |
| A2F2       | DYYMS                                                          | 2               | SISPDGSGNTYYADS<br>VKG | 7               | NLRAFDY                 | 15              | 44              |
| A2F3       | SYDMS                                                          | 1               | WISPGGGSKYYAD<br>SVKG  | 8               | VNGRFDY                 | 16              | 45              |
| BA6        | NYDMS                                                          | 3               | AIYHSGSSKYYAD<br>SVKG  | 9               | GGNGAWDTGFDY            | 17              | 46              |
| CC9        | SYDMS                                                          | 1               | GISHGSGNKYYAD<br>SVKG  | 10              | RLSLRRRPSYYSD<br>NAMDV  | 18              | 47              |
| C2E3       | NYAMS                                                          | 4               | SISHNSGSTYYADS<br>VKG  | 11              | FISARKSLGRSYSN<br>GMDV  | 19              | 48              |
| DG6        | DYDMS                                                          | 5               | VISPDGSGSIYYADS<br>VKG | 12              | DVVECNMNPSCSY<br>DNAMDV | 20              | 49              |
| D2B12      | NYDMS                                                          | 3               | SISPSSGSSIYYADS<br>VKG | 13              | APGWCQAPSCYY<br>DNAMDV  | 21              | 50              |
| A2F2<br>M1 | DYYMS                                                          | 2               | SISPDASNTYYADS<br>VKG  | 96              | NLRAFDY                 | 15              | 98              |
| BA6<br>M1  | NYDMS                                                          | 3               | AIYHSGSSKYYAD<br>SVKG  | 9               | GGNAAWDTGFDY            | 97              | 99              |

[Таблица 4b]

| Клон    | Последовательности CDR вариантальной области легкой цепи (LH) |                 |                        |                 |                        |                 | VL              |
|---------|---------------------------------------------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|------------------------|-----------------|-----------------|
|         | CDR1                                                          |                 | CDR2                   |                 | CDR3                   |                 |                 |
|         | Последова<br>тельность                                        | SEQ<br>ID<br>NO | Последова<br>тельность | SEQ<br>ID<br>NO | Последова<br>тельность | SEQ<br>ID<br>NO | SEQ<br>ID<br>NO |
| AB4     | SGSSSNIGNNNVN                                                 | 22              | YDNKRPS                | 30              | GTWDASLSGYV            | 38              | 51              |
| A2F2    | SGSSSNIGSNTVY                                                 | 23              | ANSQRPS                | 31              | GSWDYSLSGYV            | 39              | 52              |
| A2F3    | SGSSSNIGNNNVS                                                 | 24              | ADSHRPS                | 32              | ATWDYSLSGYV            | 40              | 53              |
| BA6     | SGSSSNIGSNDVS                                                 | 25              | YDNNRPS                | 33              | GAWDDSLSGYV            | 41              | 54              |
| CC9     | TGSSSNIGNNAVN                                                 | 26              | YDSNRPS                | 34              | GAWDDSLSGYV            | 41              | 55              |
| C2E3    | TGSSSNIGSNDVT                                                 | 27              | ADSKRPS                | 35              | GTWDYSLSGYV            | 42              | 56              |
| DG6     | SGSSSNIGSNIYVS                                                | 28              | DDSHRPS                | 36              | GAWDDSLSGYV            | 41              | 57              |
| D2B12   | SGSSSNIGNNDVS                                                 | 29              | DDSQRPS                | 37              | GAWDDSLSGYV            | 41              | 58              |
| A2F2 M1 | SGSSSNIGSNTVY                                                 | 23              | ANSQRPS                | 31              | GSWDYSLSGYV            | 39              | 52              |
| BA6 M1  | SGSSSNIGSNDVS                                                 | 25              | YDNNRPS                | 33              | GAWDDSLSGYV            | 41              | 54              |

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая последовательности вариабельной области и CDR, включена как часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей следующие полноразмерные тяжелые и легкие цепи в порядке AB4,

A2F2, A2F3, BA6, CC9, C2E3, DG6, D2B12, A2F2 M1 и BA6 M1: SEQ ID NO: 75 (тяжелая цепь) и 83 (легкая цепь); SEQ ID NO: 76 (тяжелая цепь) и 84 (легкая цепь); SEQ ID NO: 77 (тяжелая цепь) и 85 (легкая цепь); SEQ ID NO: 78 (тяжелая цепь) и 86 (легкая цепь); SEQ ID NO: 79 (тяжелая цепь) и 87 (легкая цепь); SEQ ID NO: 80 (тяжелая цепь) и 88 (легкая цепь); SEQ ID NO: 81 (тяжелая цепь) и 89 (легкая цепь); SEQ ID NO: 82 (тяжелая цепь) и 90 (легкая цепь); SEQ ID NO: 102 (тяжелая цепь) и 84 (легкая цепь); SEQ ID NO: 103 (тяжелая цепь) и 86 (легкая цепь). Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая константную область в последовательности нуклеиновой кислоты, представляет собой SEQ ID NO: 92 (тяжелая цепь) и SEQ ID NO: 94 (легкая цепь) или 95 (легкая цепь).

## **Вариант осуществления 2: Превращение анти-ROR1 scFV в полную форму IgG и ее получение**

### **Вариант осуществления 2-1: Клонирование анти-ROR1 scFV в полную форму IgG**

Для превращения последовательностей каждого из ROR1-специфических моноклональных фаговых антител, полученных в варианте осуществления 1, в полную форму IgG, синтезируют нуклеиновые кислоты, кодирующие переменные области тяжелой и легкой цепей соответствующих клонов, полученных в варианте осуществления 1 (Genotech, South Korea). После синтеза генов, кодирующих константные области тяжелой цепи и легкой цепи (SEQ ID No. 91 и 93, соответственно) подтипов IgG1 человека, гены соединяют с нуклеиновой кислотой, кодирующей соответствующие переменные области тяжелой и легкой цепи. Нуклеиновые кислоты, кодирующие легкие цепи и тяжелые цепи соответствующих антител, соответственно клонируют в векторы экспрессии на основе pcDNA3.1, получая векторы, кодирующие нуклеиновые кислоты антител в клеточных линиях CHO-S млекопитающих.

Что касается эталонной группы, используют химерное антитело, в котором IgG1 человека связан с переменной областью обычного анти-ROR1 антитела 2A2 (US 9,316,646).

Антитела по настоящему изобретению в форме IgG описаны со следующими полноразмерными последовательностями тяжелой и легкой цепей в порядке AB4, A2F2, A2F3, BA6, CC9, C2E3, DG6, D2B12 A2F2 M1 и BA6 M1: SEQ ID NO: 59 (тяжелая цепь) и 67 (легкая цепь); SEQ ID NO: 60 (тяжелая цепь) и 68 (легкая цепь); SEQ ID NO: 61 (тяжелая цепь) и 69 (легкая цепь); SEQ ID NO: 62 (тяжелая цепь) и 70 (легкая цепь); SEQ ID NO: 63 (тяжелая цепь) и 71 (легкая цепь); SEQ ID NO: 64 (тяжелая цепь) и 72 (легкая цепь); SEQ ID NO: 65 (тяжелая цепь) и 73 (легкая цепь); SEQ ID NO: 66 (тяжелая цепь) и 74 (легкая цепь); SEQ ID NO: 100 (тяжелая цепь) и 68 (легкая цепь); SEQ ID NO: 101 (тяжелая цепь) и 70 (легкая цепь).

### **Вариант осуществления 2-2: Экспрессия анти-ROR1 антител IgG**

Клетки CHO-S доводят до концентрации  $1,5 \times 10^6$  клеток/мл в среде CD-CHO (Gibco, 10743), затем культивируют в течение 1 дня при 37°C и 8% CO<sub>2</sub>. В день

трансфекции ДНК, клетки, которые выросли до  $2,5-3 \times 10^6$  клеток/мл, готовят в концентрации  $2,1 \times 10^6$  клеток/мл, используя среду CD-CHO, содержащую 1% ДМСО, и затем культивируют в течение 3 часов при 37°C и 8% CO<sub>2</sub>. После центрифугирования в течение 15 минут при 3000 об/мин, супернатант удаляют и повторно суспендируют в среде RPMI 1640, содержащей 25% FBS. После этого векторы, экспрессирующие тяжелую и легкую цепи Варианта осуществления 2-1, разводят в среде Opti-MEM в количестве 1 мкг на мл среды, и PEI (Polysciences, 23966, исходная концентрация: 1 мг/мл) разводят в количестве 8 мкл на мл культуральной среды.

Смесь вектора и PEI фиксируют при комнатной температуре в течение 10 минут, затем помещают в колбу, содержащую клетки, приготовленные, как описано выше. После культивирования в течение 4 часов при 5% CO<sub>2</sub>, 37°C и 100 об/мин, добавляют CD-CHO в том же объеме, что и культура, с последующим культивированием в течение 4 дней при 8% CO<sub>2</sub>, 37°C и 110 об/мин.

### **Вариант осуществления 2-3: Выделение и очистка анти-ROR1 антител IgG**

Равновесный буферный раствор (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl) доводят до равновесия путем пропускания через Mab selectsure (GE Healthcare, 5 мл), культуральный раствор Варианта осуществления 3-2 пропускают через колонку (Mab selectsure (GE Healthcare, 5 мл) так, чтобы экспрессированное антитело связывалось с колонкой. Позже, после элюирования 50 mM Na-цитратом (pH 3,4) и 100 mM раствором NaCl, 1M Tris-HCl (pH 9,0) используют для нейтрализации и достижения конечного pH 7,2. Буферный раствор заменяли PBS (физиологическим раствором с фосфатным буфером, pH 7,4).

### **Вариант осуществления 3: Анализ специфичности связывания анти-ROR1 антитела IgG с ROR1**

#### **Вариант осуществления 3-1: Анализ связывающей способности (ELISA) анти-ROR1 антитела IgG с антигеном ROR1 (внеклеточный домен)**

Специфическую связывающую способность антител IgG соответствующих клонов, полученных и подвергнутых скринингу в варианте осуществления 2, с антигеном анализируют следующим образом.

Аффинность связывания анти-ROR1 антитело - антиген оценивают с применением анализа связывания раствора на основе ELISA. В частности, 96-луночный титровальный микропланшет (Nunc-Immuno Plates, NUNC) покрывают на 16 часов при 4°C описанным ниже белком ROR1 в концентрации 1 мкг/мл в растворе PBS, и сайты неспецифического связывания блокируют в течение 2 часов с 3% BSA (бычьим сывороточным альбумином). В настоящем изобретении, используемый белок ROR1 представляет собой, в случае ROR1 человека, ROR1-Fc или рекомбинантный ROR1-His человека (Sino Biological, 13968-H08H) из Варианта осуществления 1. ROR1-His, используемый в ELISA, как указано в предложении выше, представляет собой белок от компании Sino Biological (13968-H08H), и используют ROR1-His из Варианта осуществления 1 или рекомбинантный белок ROR1 мыши (Acrobiosystems, RO1-M5221-100 мкг).

Затем анти-ROR1 антитела, полученные в варианте осуществления 3, добавляют в

концентрациях, указанных на фиг. 2, в 96-луночный титрационный микропланшет, и связывающую способность анализируют ELISA следующим образом. Более конкретно, после инкубации в течение 2 часов планшет промывают 5 раз PBS, содержащим 0,05% Tween 20, затем конъюгированные с HRP реагенты мультиклональных антител Fab (Perce, 31414) разводят до 1:10000 и помещают в промытый титровальный микропланшет. После реакции в течение 1 часа при 37°C, определяют антитела ROR1, связанные с планшетом. После реакции, проводят проявление цвета с использованием ТМБ (тетраметилбензидина, Sigma, T0440). Ферментативную реакцию останавливают с применением 0,5 моль/л серной кислоты, и измеряют абсорбцию при 450 нм и 650 нм (450 нм - 650 нм) с использованием микропланшетного ридера (Molecular Device)

Результаты представлены на фиг. 3а, фиг. 3b и фиг. 4, и подтверждается, что анти-ROR1 антитело по настоящему изобретению связывается с ROR1 человека и ROR1 мыши в зависимости от концентрации. Затем, при сравнении перекрестной специфичности с белком ROR1 мыши, обнаруживают, что антитело ROR1 по настоящему изобретению обладает превосходной связывающей способностью по сравнению с антителом 2A2, используемым в качестве эталонной группы.

### **Вариант осуществления 3-2: Измерение специфической связывающей способности анти-ROR1 антитела IgG с экспрессируемым на клеточной поверхности антигеном ROR1 (FACS)**

Для антитела к определенному антигену, используемого *in vivo* в качестве терапевтического антитела, критически важно, например, чтобы оно связывалось с антигенами, экспрессированными на клеточной поверхности. Некоторые антигены будут связываться с очищенным антигеном, но не будут связываться с антигеном, экспрессированным на клеточной поверхности. В таких случаях, даже когда антитело вводят *in vivo*, оно не может связываться с антигеном, что означает, что антитело не может связываться с клетками, экспрессирующими антиген, и что терапевтическое антитело и т. д. не может проявлять активность *in vivo*.

Соответственно, проводят FACS анализ для подтверждения того, что анти-ROR1 антитело по настоящему изобретению связывается с ROR1, экспрессируемым на клеточной поверхности.

Для этого эксперимента используют клеточные линии (фиг. 5 и фиг. 7 соответственно), временно (CHO-ROR1 человека, CHO-ROR2 человека, CHO-ROR1 мыши) или стабильно (MC38-ROR1 человека), трансфицированные геном ROR1, для достижения искусственной суперэкспрессии белка ROR1, клеточную линию, экспрессирующую ROR1 (JeKo-1, Mino) (фиг. 6), клеточную линию, не экспрессирующую ROR1 (MCF7) (фиг. 6), и устройство FACSCalibur (BD Biosciences) используют для измерения степени связывания анти-ROR1 антитела и ROR1 следующим образом. MCF7 представляет собой отрицательный контроль, который не экспрессирует ROR1, и CHO-ROR2 человека представляет собой отрицательный контроль, экспрессирующий ROR2 человека. JeKo-1, Mino, CHO-ROR1 человека, CHO-ROR1 мыши и MC38-ROR1 человека

представляют собой клеточные линии, которые экспрессируют ROR1 человека или ROR1 мыши.

В частности, после диссоциации каждой клеточной линии и промывки в PBS, число клеток подсчитывают и доводят до  $2 \times 10^5$  клеток/200 мкл PBS. Затем соответствующие моноклональные антитела ROR1, полученные в Варианте осуществления 3, разводят 5-кратно из 10 мкл/мл или 10 мкг/мл, затем подвергают реакции в течение 1 часа при 4°C. После реакции, клетки промывают в PBS, затем FITC-маркированное антитело, специфичное к константной области (Fc) (конъюгат анти-человеческий IgG козы - FITC, Fc-специфический, Sigma, F9512, концентрация 20 мг/мл) суспендируют в 2 мкл/ $1 \times 10^5$  клеток/200 мкл PBS и подвергают реакции в течение 1 часа при 4°C. Для идентификации степени экспрессии временно суперэкспрессированного ROR1 человека, ROR2 человека и ROR1 мыши, используют коммерчески доступное антитело для анализа FACS (анти-ROR1: R&D Systems, FAB 2000G, анти-ROR2: R&D, FAB20641P). После реакции клетки промывают в PBS и анализируют с использованием устройства FACSCalibur. Отрицательный контроль (2 Ab) обрабатывают только FITC-маркированным антителом, специфичным к константной области (Fc). Смещенные показатели для соответствующих экспериментальных групп, обработанных моноклональным антителом ROR1, сравнивают со смещенными показателями для контрольной группы (соотношение MFI: MFI анти-ROR1/MFI 2 Ab).

Результаты представлены на фиг. 5, фиг. 6 и фиг. 7. В результате было обнаружено, что анти-ROR1 антитело по настоящему изобретению специфически и в зависимости от концентрации связывается с ROR1 человека (фиг. 6), который изначально экспрессируется в клетках, и внеклеточным доменом ROR1 человека (фиг. 5 и фиг. 7), искусственно суперэкспрессированным в клетках.

Кроме того, было подтверждено, что он не связывается с белком семейства ROR2 человека и что он обладает межвидовой перекрестной специфичностью с ROR1 мыши (фиг. 5). При сравнении перекрестной специфичности с ROR1 мыши, экспрессируемым на клеточной поверхности, подтверждают, что антитело ROR1 по настоящему изобретению имеет более высокую степень связывания, чем антитело 2A2, используемое в качестве эталонной группы (фиг. 5).

### **Вариант осуществления 3-3: Измерение связывающей способности анти-ROR1 антитела IgG с экспрессируемым на клеточной поверхности антигеном ROR1 при различных видах рака (FACS)**

Затем проводят FACS анализ для подтверждения того, что анти-ROR1 антитело по настоящему изобретению связывается с ROR1, экспрессируемым на клеточной поверхности, в различных типах линий клеток рака. ROR1 экспрессируется в различных раковых клетках, включая не только раки крови, такие как В-клеточный лейкоз, лимфома, острый миелоидный лейкоз (AML), лимфома Беркитта, мантийноклеточная лимфома (MCL), острый лимфобластный лейкоз (ALL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), диффузная В-крупноклеточная лимфома (DLBCL), фолликулярная лимфома (FL) и

лимфома маргинальной зоны (MZL) и т. д., но также солидные виды рака, включая рак молочной железы, рак почки, рак яичников, рак желудка, рак печени, рак легких, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак мочевого пузыря, рак яичек, рак матки, рак предстательной железы, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), нейробластома, рак головного мозга, рак толстой кишки, плоскоклеточную карциному, меланому, миелому, рак шейки матки, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак надпочечников и т. д.

Для этого эксперимента используют следующие различные линии раковых клеток: AGS (ATCC CRL-1739<sup>TM</sup>, аденокарцинома желудка человека), NCI-N87 (ATCC CRL-5822<sup>TM</sup>, карцинома желудка человека), MKN-28 (KCLB 80102, аденокарцинома желудка человека), SNU-1750 (KCLB 01750, аденокарцинома желудка человека), SNU-16 (ATCC CRL5974<sup>TM</sup>, карцинома желудка человека), HCC1187 (ATCC CRL-2322<sup>TM</sup>, рак молочной железы человека по TNM, стадия IIA, степень 3), MDA-MB-231 (ATCC HTB-26<sup>TM</sup>, рак молочной железы человека), MDA-MB-468 (ATCC HTB-132<sup>TM</sup>, рак молочной железы человека), HCC70 (ATCC CRL2315<sup>TM</sup>, рак молочной железы человека по TNM, стадия IIIA, степень 3), HCC1143 (ATCC CRL-2321<sup>TM</sup>, стадия IIA, степень 3 по TNM, первичная протоковая карцинома), BT20 (ATCC HTB-19<sup>TM</sup> рак молочной железы человека), HCC1806 (ATCC CRL-2335<sup>TM</sup>, рак молочной железы человека по TNM, стадия IIB, степень 2), HCC1937 (ATCC CRL2336<sup>TM</sup>, стадия IIB, степень 3 по TNM, первичная протоковая карцинома), BT474 (ATCC HTB-20<sup>TM</sup>, протоковая карцинома), MCF7 (ATCC HTB-22<sup>TM</sup>, сайт метастазирования рака молочной железы), H460 (ATCC HTB-177<sup>TM</sup>, крупноклеточный рак легкого), A549 (ATCC CCL-185<sup>TM</sup>, карцинома легкого), NCI-H1975 (ATCC CRL-5908<sup>TM</sup>, немелкоклеточный рак легкого), H1437 (ATCC CRL5872<sup>TM</sup>, стадия 1, немелкоклеточная аденокарцинома легкого), Calu-6 (ATCC HTB-56<sup>TM</sup>, анапластическая карцинома легкого), HCT116 (ATCC CCL-247<sup>TM</sup>, колоректальная карцинома), DLD-1 (ATCC CCL-221<sup>TM</sup>, тип C по Dukes, колоректальная аденокарцинома), HT29 (ATCC HTB-38<sup>TM</sup>, колоректальная аденокарцинома), 697 (DSMZACC 42, острый миелобластный лейкоз), Kasumi-2 (ATCC CRL-2724<sup>TM</sup>, острый миелобластный лейкоз), Mino (ATCC CRL3000<sup>TM</sup>, мантийноклеточная лимфома), JeKo-1 (ATCC CRL3006<sup>TM</sup>, мантийноклеточная лимфома), Jurkat (ATCC TIB-152<sup>TM</sup>, острый Т-клеточный лейкоз). Анализ FACS (FACSCalibur, BD Biosciences) используют для анализа связывания анти-ROR1 антитела по настоящему изобретению с ROR1 в вышеуказанных клеточных линиях.

В частности, соответствующие клеточные линии диссоциируют и промывают в PBS, затем количество клеток подсчитывают и доводят до  $2 \times 10^5$  клеток/200 мкл PBS. Затем их обрабатывают 10 мкг/мл антителом с названием клона C2E3 из моноклональных антител ROR1, приготовленных в Варианте осуществления 3, и подвергают реакции в течение 1 часа при 4°C. После реакции, клетки промывают в PBS, затем FITC-маркированное антитело, специфичное к константной области (Fc) (конъюгат анти-человеческий IgG козы - FITC, Fc-специфический, Sigma, F9512, концентрация 20 мг/мл) суспендируют в 2 мкл/ $1 \times 10^5$  клеток/200 мкл PBS и подвергают реакции в течение 1 часа

при 4°C. После реакции, клетки промывают PBS и анализируют с помощью оборудования FACSCalibur. Отрицательный контроль обрабатывают только FITC-маркированным антителом, специфичным к константной области (Fc). Чтобы сравнить степень экспрессии ROR1 среди соответствующих линий раковых клеток, указывают частное от деления смещенных показателей для экспериментальной группы, обработанной моноклональным антителом ROR1 (C2E3) под настоящему изобретению на смещенные показатели для контрольной группы (соотношение MFI: MFI анти-ROR1/MFI или 2 Ab).

Результаты показаны на фиг. 8. Подтверждено, что анти-ROR1 антитело по настоящему изобретению связывается с ROR1, экспрессируемым в различных линиях раковых клеток, полученных из рака желудка, рака молочной железы, рака легких, рака толстой кишки, острого лимфоцитарного лейкоза (ALL) и мантийноклеточной лимфомы (MCL).

#### **Вариант осуществления 4. Измерение аффинности анти-ROR1 антитела IgG к ROR1.**

96-луночный черный микропланшет (Greiner bio one) помещают на лоток для биосенсоров и 200 мкл 10X KB или DW добавляют в каждую из 8 лунок. Затем биосенсоры Anti Penta His или 8 биосенсоров AR2G (ForteBio, USA) вставляют для гидратации на 10 минут. 600 мкл образцов для анализа разводят 2-кратно или 3-кратно до подходящих для анализа концентраций с применением 1X KB или 10X KB до 30-0,021 нМ. Для иммобилизации антигена, рекомбинантный ROR1-His человека (Sino Biological, 13968-H08H) разводят до 1 мкг/мл буфером 10X KB или ацетатом натрия pH5. Иммобилизацию фиксируют с порогом 0,3 нм на стадии загрузки. Анализ ассоциации проводят от 3 до 10 мин, и анализ диссоциации проводят в течение 20 мин. Согласно шаблону программы Octet, буфер помещают в новый 96-луночный черный микропланшет в соответствии с порядком. В качестве исходного уровня 1, помещают 200 мкл 10X KB или DW. Затем добавляют по 200 мкл каждого из 1 мкг/мл антигена, который должен быть загружен, белка ROR1-HIS. В качестве исходного уровня 2, помещают 200 мкл 10X KB или 1X KB. Затем в каждую лунку добавляют от 30 до 0,021 нМ разведенного антитела и 200 мкл каждого из буфера 10X KB или 1X KB, соответствующего эталонному бланку. Температуру тестовой пластины фиксируют на уровне 30°C. После введения всех образцов, оборудование запускают, и после завершения анализа, результаты загружают в программное обеспечение Octet Analysis 90 со значениями KD, проанализированными при обработке 1:1. Результаты показаны в таблице 6 ниже. Путем получения значений KD с помощью способа анализа Octet подтверждают, что анти-ROR1 антитело имеет сильный потенциал связывания с антигеном ROR1.

[Таблица 6] Измерение аффинности анти-ROR1 антитела IgG к ROR1

| NO | Клон  | KD (M)   | kon(1/Мсек) | koff(1/сек) | Chi   | R <sup>2</sup> |
|----|-------|----------|-------------|-------------|-------|----------------|
| 1  | AB4   | 6.39E-11 | 1.81E+06    | 1.16E-04    | 0.016 | 0.996          |
| 2  | A2F2  | 7.73E-11 | 1.53E+06    | 1.19E-04    | 0.106 | 0.997          |
| 3  | A2F3  | 2.40E-11 | 1.38E+06    | 3.31E-05    | 0.131 | 0.992          |
| 4  | BA6   | 9.37E-11 | 2.47E+06    | 2.31E-04    | 0.138 | 0.993          |
| 5  | C2E3  | 4.24E-10 | 5.46E+06    | 2.31E-03    | 0.176 | 0.966          |
| 6  | CC9   | 7.54E-10 | 7.31E+05    | 5.51E-04    | 0.200 | 0.992          |
| 7  | DG6   | 1.52E-10 | 2.23E+06    | 3.38E-04    | 0.506 | 0.964          |
| 8  | D2B12 | 8.03E-10 | 4.50E+05    | 3.61E-04    | 0.341 | 0.952          |

#### **Вариант осуществления 5: Анализ эффективности подавления роста рака анти-ROR1 антителом IgG в модели ксенотрансплантата опухоли у мышей**

Мышей с ксенотрансплантатом рака человека получают путем трансплантации  $1 \times 10^7$  клеток/голову ROR1-экспрессирующей линии клеток мантийноклеточной лимфомы человека JeKo-1 мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID). После ксенотрансплантации, когда размер опухоли достигает в среднем  $170 \text{ мм}^3$  (день 1), мышей делят на группы, и 5 типов анти-ROR-1 антител вводят мышам перитонеально с помощью 1 мл шприца два раза в неделю в дозе 10 мг/кг, всего 5 введений (дни 1, 4, 7, 10 и 14). Группе отрицательного контроля вводят перитонеально по 10 мг/кг каждого IgG1 человека (InVivoPlus изотипический контроль IgG1 человека, BioXCell, BP0297), имеющего структуру, аналогичную структуре антитела ROR-1, два раза в неделю, всего 5 введений. Размер опухолей, трансплантированных мышам, и вес мышей измеряют непосредственно перед первым введением (день 1), непосредственно перед введением в каждый последующий день введения и через два дня после последнего введения (день 16).

Результаты представлены на фиг. 9a и фиг. 9b. Анти-ROR-1 антитела по настоящему изобретению подавляют рост рака, и % ингибирования роста опухоли (%TGI) [антитела по] настоящему изобретению для сравнения с отрицательным контролем антитела IgG1 человека (HuIgG1) на 16-й день, когда эксперимент закончился, составляет C2E3 360%, A2F2 289%, AB4 361%, BA6 317% и CC9 294%. Анти-ROR-1 антитела по настоящему изобретению имеют статистически значимое различие по сравнению с группой, которой вводят HuIgG (односторонний ANOVA, P значение  $< 0,05$ ) (фиг. 9a). Результаты измерения массы тела (фиг. 9b) не выявили существенной разницы между группами введения. Как указано в Вариантах осуществления 3-1 и 3-2, анти-ROR1 антитела по настоящему изобретению обладают перекрестной специфичностью с антигеном ROR1 мыши. Соответственно, вводимые анти-ROR1 антитела по настоящему изобретению могут связываться с ROR1 человека, экспрессированным ксенотрансплантированной линией клеток мантийноклеточной лимфомы человека JeKo-1, а также с ROR1 мыши, экспрессированному самой мышью. Измерение массы тела показало сходные тенденции увеличения массы тела между группой отрицательного контроля (HuIgG1) и анти-ROR1 антителами по настоящему изобретению, и можно сказать, что это указывает на то, что введение анти-ROR1 антител по настоящему изобретению не вызывает токсичности. Эти результаты указывают на то, что антитела по

настоящему изобретению могут быть полезны в качестве противораковых терапевтических агентов.

В модели ксенотрансплантата опухоли мыши обнаружено, что все 5 антител ROR1 по настоящему изобретению подавляют рост рака. Обнаружено, что из них, некоторые антитела (C2E3 и AB4), как показано в Варианте осуществления 6 и на фиг. 10 ниже, способны индуцировать гибель аутоактивных клеток линий раковых клеток с суперэкспрессией ROR1 при мультимеризации анти-человеческим Fc антителом. Однако возможны различные механизмы ингибирования рака, такие как индукция гибели аутоактивных клеток, ингибирование деления и роста раковых клеток, подавление ангиогенеза опухоли и активация иммунных клеток. Таким образом, результаты на фиг.10 ниже показывают, что каждое из анти-ROR1 антител по настоящему изобретению способно подавлять рост рака *in vivo* посредством различных механизмов действия.

**Вариант осуществления 6: Анализ способности анти-ROR1 антител IgG индуцировать гибель аутоактивных клеток**

Для анализа возможных механизмов антител по настоящему изобретению, демонстрирующих способность подавлять опухоль, как показано в варианте осуществления 5, анализируют их способность индуцировать гибель клеток.

С этой целью, клеточную линию JeKo-1 с суперэкспрессией ROR1 центрифугируют для удаления среды, содержащей сыворотку. После однократной промывки PBS, в каждую лунку 6-луночного планшета высевают  $5 \times 10^6$  клеток с использованием бессывороточной среды RPMI1640. 100 мкг/мл анти-ROR1 антитела по настоящему изобретению и 300 мкг/мл анти-человеческого Fc антитела (Thermo Fisher, 31125) помещают в соотношении 1:1 в эквивалентную пробирку, подвергают реакции в течение 10 минут при комнатной температуре, так что анти-ROR1 антитело перекрестно связывается с анти-человеческим Fc антителом. 150 мкл каждой смеси помещают в лунки, содержащие 15 мл среды, так что конечное количество обработанного антитела составляет 10 мкл/мл для антитела ROR1 и 30 мкл/мл для анти-человеческого Fc антитела, затем подвергают реакции путем культивирования в течение 24 часов при 5% CO<sub>2</sub> и 37°C.

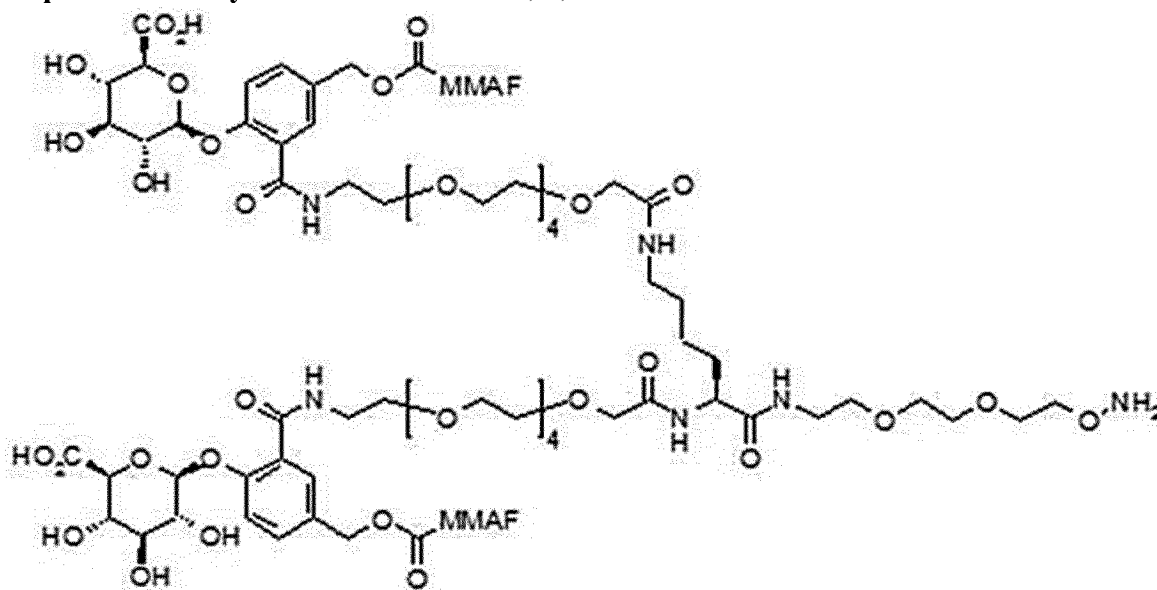
Затем, чтобы подтвердить, обладают ли отдельные антитело ROR1 и перекрестно-сшитое анти-ROR1 антитело способностью вызывать гибель аутоактивных клеток, клетки из каждой лунки собирают и один раз промывают PBS. Затем, каждую группу подвергают реакции с маркером гибели аутоактивных клеток аннексином V и маркером гибели клеток PI, и степень окрашивания групп наблюдают с помощью анализа FACS.

Результаты показаны на фиг. 10. По результатам эксперимента не наблюдают гибель аутоактивных клеток в группе, получавшей только анти-ROR1 антитело, но в случае некоторых клонов анти-ROR1 антител (C2E3 и AB4), поперечно-сшитые анти-человеческим Fc, степень окрашивания аннексином V и PI была выше, чем в контрольной группе. В частности, в отношении окрашивания маркером гибели аутоактивных клеток аннексином V, наблюдают увеличение на 23% для клона C2E3 и увеличение на 10% для клона AB4 по сравнению с контролем. Чтобы увидеть, является ли такая способность

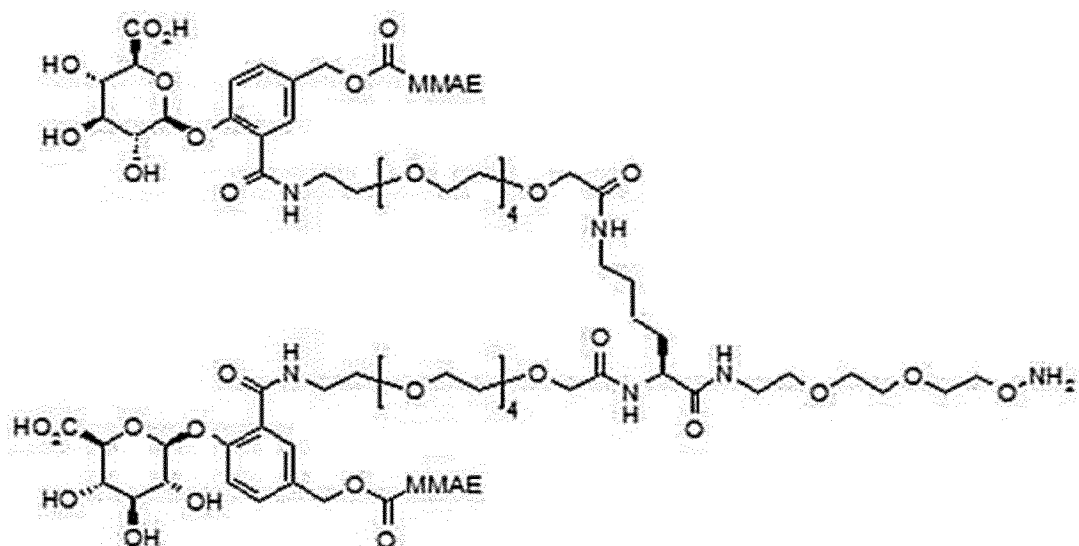
вызывать гибель аутоактивных клеток реакцией, специфичной для ROR1, тот же способ применяют к клеточной линии, не экспрессирующей ROR1, U266, с использованием клона C2E3 для изучения степени окрашивания аннексином V и PI. Подтверждают, что не экспрессирующая ROR1 клеточная линия U266 не способна индуцировать гибель аутоактивных клеток, доказывая, что способность одного перекрестно-сшитого анти-ROR1 антитела вызывать гибель аутоактивных клеток представляет собой ROR1-специфическую реакцию. Антитела способны образовывать мультимеры *in vivo* путем связывания с гамма-рецепторами Fc через свои Fc области, и поэтому можно сказать, что образование мультимера анти-ROR1 антитела с использованием анти-человеческого Fc антитела представляет собой условия, сходные с явлениями *in vivo*. Указанные выше результаты относятся к одному механизму, означающему, что анти-ROR1 антитело по настоящему изобретению может индуцировать гибель аутоактивных клеток в линиях раковых клеток с суперэкспрессией ROR1.

Следует отметить, что индукция гибели аутоактивных клеток клеточных линий рака посредством мультимеризации антитела ROR1 не является явлением, наблюдаемым во всех типах антител ROR1. Например, в случае клона BA6 среди антител ROR1 настоящего изобретения и антитела 2A2, используемого в качестве эталонной группы, они не индуцируют гибель аутоактивных клеток клеточных линий рака с суперэкспрессией ROR1 даже при мультимеризации анти-человеческим Fc антителом. Это означает, что антитела ROR1 по настоящему изобретению обладают способностью подавлять раковые клетки за счет различных механизмов действия. Эта разница может быть связана с различиями в эпитопах, с которыми связываются соответствующие антитела ROR1, но эта теория не является единственным объяснением этого.

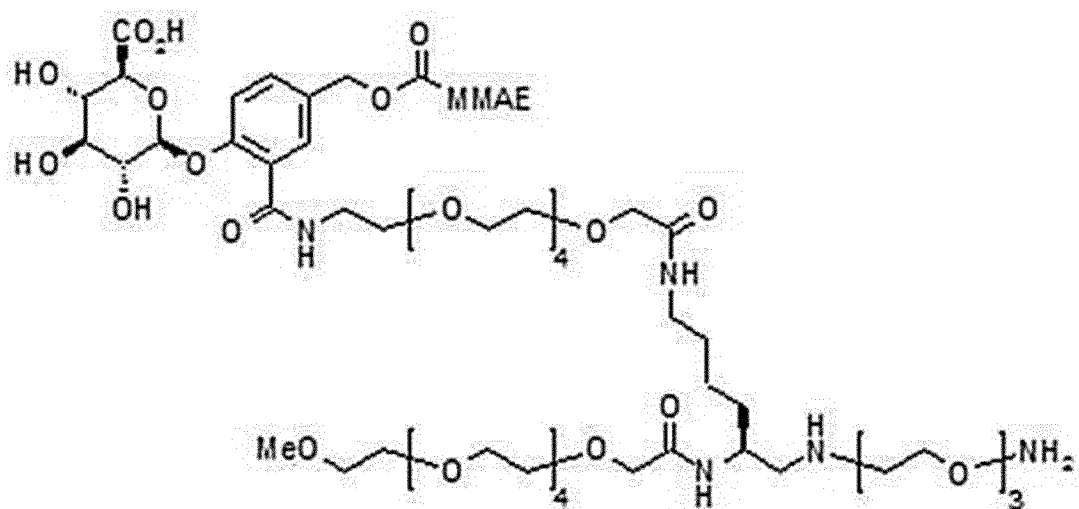
#### Вариант 7: Получение соединений 1, 2, 3 и 4.



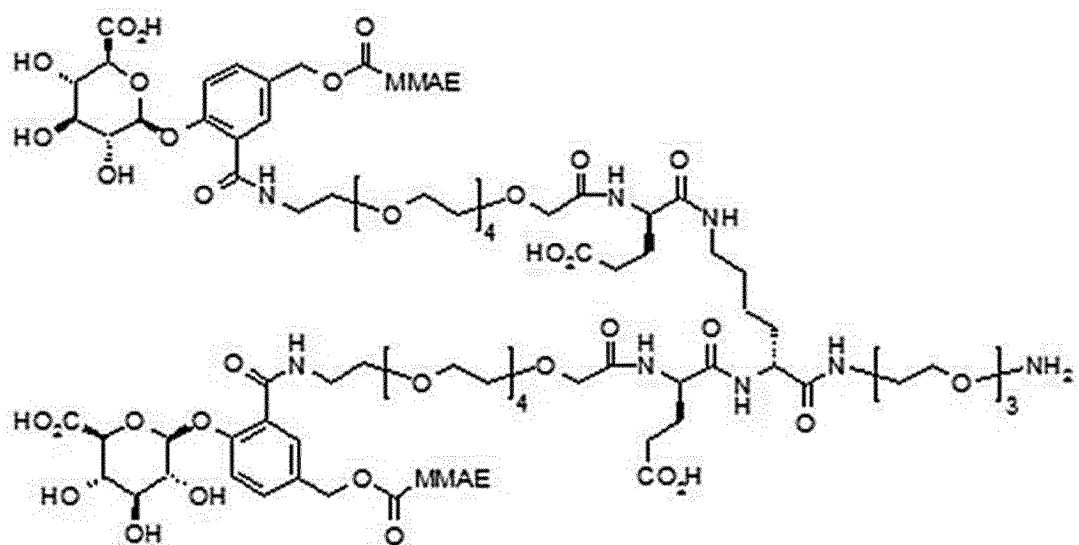
1



2



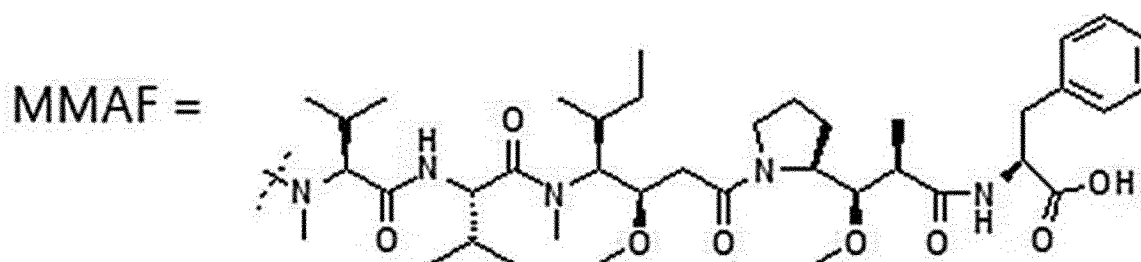
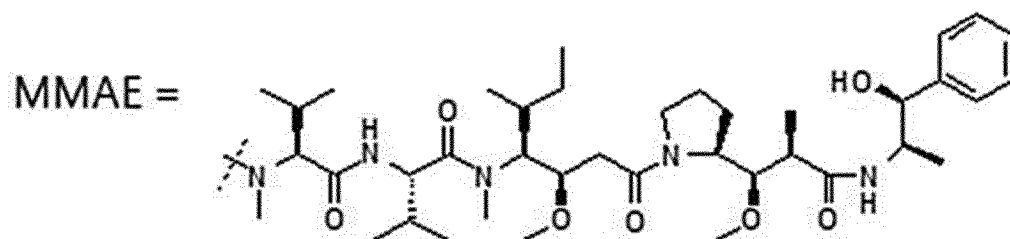
3



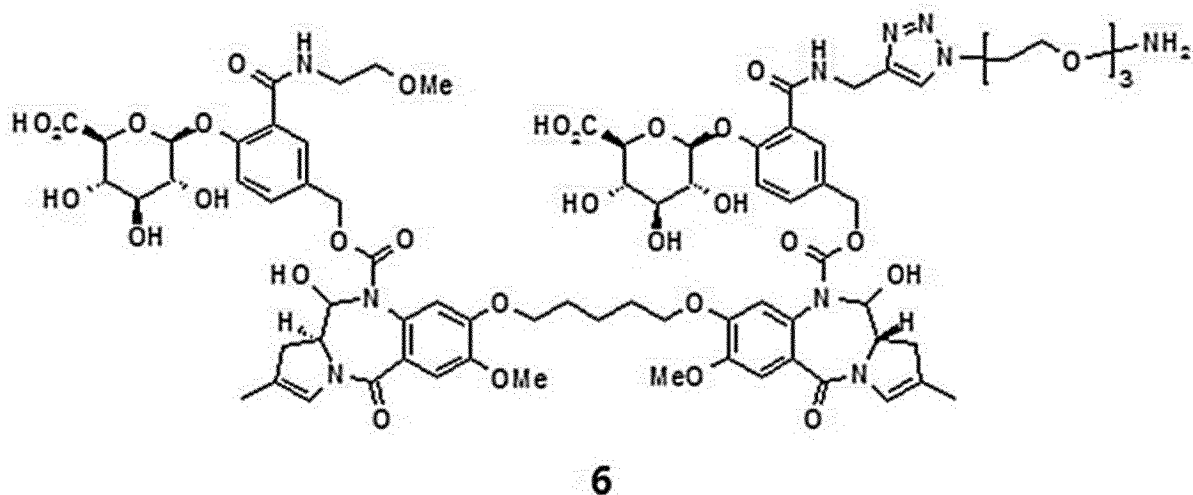
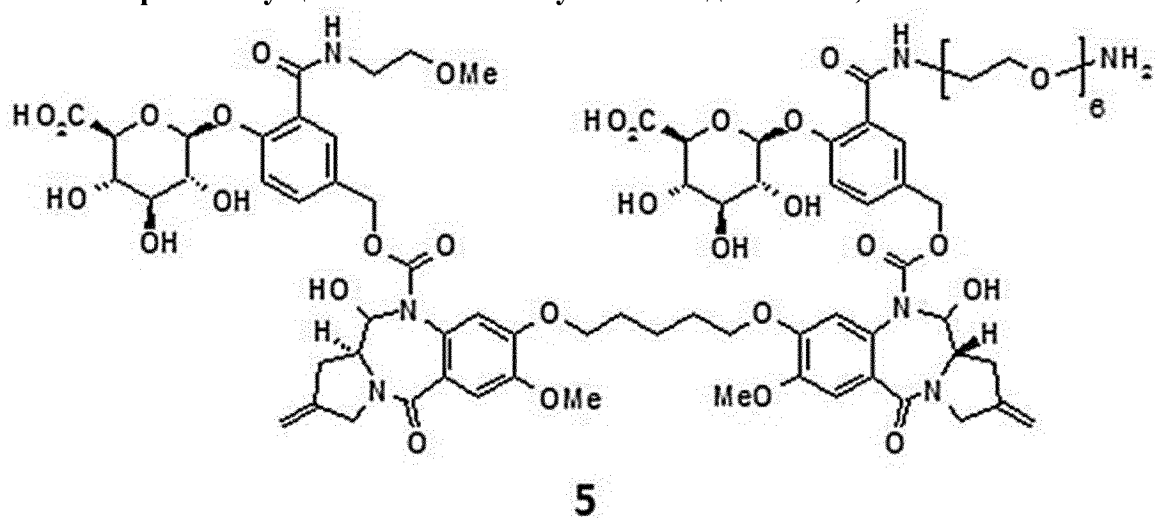
4

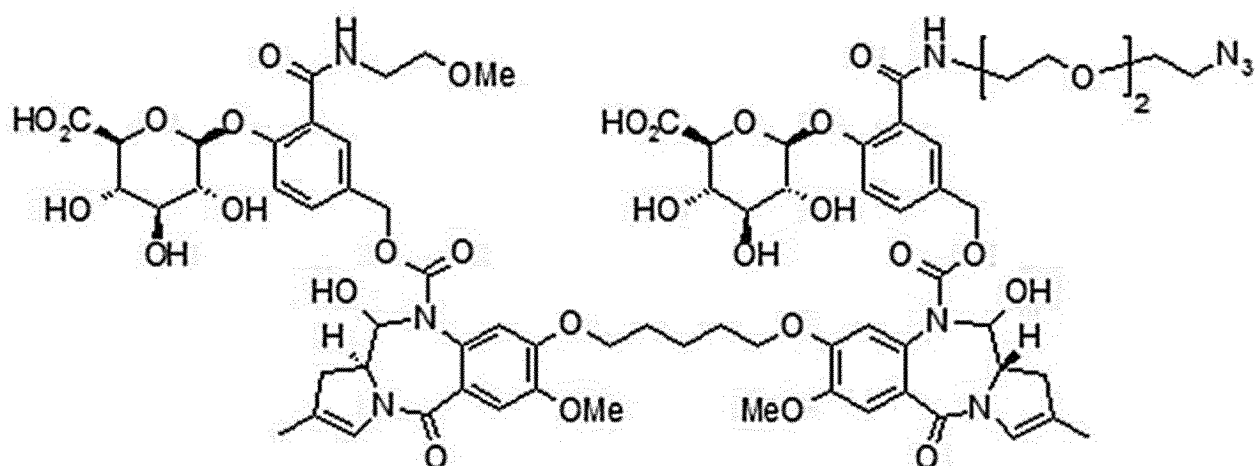
Соединения 1, 2 3 и 4 выше получают с применением способа, указанного в патенте WO 2017-089895.

В соединениях 1, 2, 3 и 4 выше, структуры MMAE или MMAF представляют собой следующие:



#### Вариант осуществления 8: Получение соединений 5, 6 и 7





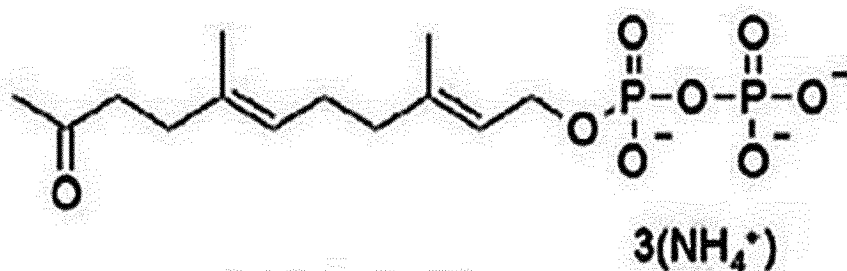
7

Соединения 5, 6 и 7 выше получают с применением способа, указанного в заявке на патент Кореи № 10-2018-0036895.

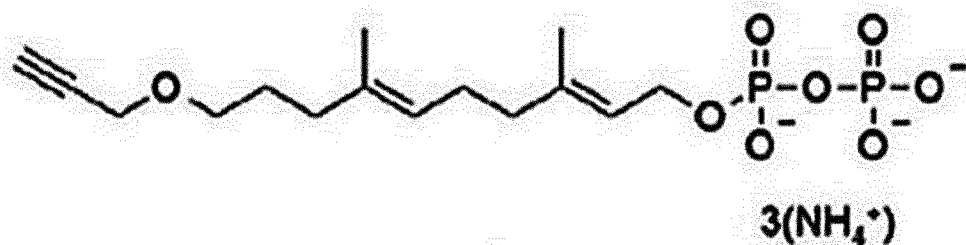
#### Вариант осуществления 9: Получение ADC

ADC получают с следующие две стадии, и LCB14-0511 и LCB14-0606, широко применяемые, получают с применением способа, указанного в выложенном патенте Кореи № 10-2014-0035393.

Структурные формулы LCB14-0511 и LCB14-0606 представляют собой следующие:



**LCB14-0606**



**LCB14-0511**

#### Стадия 1: Получение пренилированного антитела

Готовят реакцию смесь для пренилирования моноклонального антитела ROR1 (C2E3) по настоящему изобретению и проводят реакцию в течение 16 часов при 30°C. Реакционная смесь состоит из 24 мкМ антитела, 200 нМ FTase (Calbiochem # 344145) и

буферного раствора (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 мкМ ZnCl<sub>2</sub>, 0,144 mM DTT), содержащих 0,144 mM LCB14-0511 или LCB14-0606. После завершения реакции, пренилированное антитело обессоливают с помощью колонки G25 Sepharose (очиститель АКТА, GE Healthcare), уравновешенной буферным раствором PBS.

В качестве эталонного антитела используют химерное антитело (2A2), в котором IgG1 человека связан с вариабельной областью существующего анти-ROR1 антитела 2A2 (US 9,316,646).

## **Стадия 2: Способ конъюгации лекарственного средства**

### **<Конъюгация путем образования оксимной связи>**

Смесь для реакции образования оксимной связи между пренилированным антителом и линкером-лекарственным средством готовят путем смешивания 100 mM Na-ацетатного буферного раствора pH 5,2, 10% ДМСО, 20 мкМ антитела и 200 мкМ линкера-лекарственного средства (на месте, соединения 1, 2, 3, 4, 5 и 7 из Вариантов осуществления 7 и 8) и слегка перемешивают при 30°C. После реакции в течение 6 или 24 часов проводят процесс FPLC (очиститель АКТА, GE Healthcare) для удаления излишков используемых малых соединений. Белковую фракцию собирают и концентрируют.

### **<Сопряжение клик-реакцией>**

Смесь для реакции образования оксимной связи между пренилированным антителом и линкером-лекарственным средством готовят путем смешивания 10% ДМСО, 20 мкМ антитела и 200 мкМ линкера-лекарственного средства (на месте, соединение 6 из варианта 8), 1 mM пентагидрата сульфата меди (II), 2 mM (BimC4A)<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich 696854), 10 mM аскорбата натрия и 10 mM гидрохлорида аминогуанидина, подвергают реакции в течение 3 часов при 25°C, затем обрабатывают 20 mM ЭДТК и подвергают реакции в течение 30 минут. После реакции, проводят процесс FPLC (очиститель АКТА, GE Healthcare) для удаления излишков используемых малых соединений. Белковую фракцию собирают и концентрируют.

[Таблица 7]

Список полученных ADC

| ADC  | Антитело | Группа пренилирования | Токсин       |
|------|----------|-----------------------|--------------|
| ADC1 | C2E3     | LCB14-0000            | Соединение 1 |
| ADC2 |          |                       | Соединение 2 |
| ADC3 |          |                       | Соединение 3 |
| ADC4 |          |                       | Соединение 4 |
| ADC5 |          |                       | Соединение 5 |
| ADC6 |          |                       | Соединение 6 |
| ADC7 | 2A2      | LCB14-0511            | Соединение 7 |
| ADC8 |          | LCB14-0606            | Соединение 1 |

|       |  |  |              |
|-------|--|--|--------------|
| ADC9  |  |  | Соединение 2 |
| ADC10 |  |  | Соединение 3 |

#### Вариант осуществления 10: оценка свойств ADC

С использованием ADC, полученных в Варианте осуществления 9, анализируют свойства ADC по настоящему изобретению.

С этой целью проводят анализ хроматографией с гидрофобным взаимодействием - высокоэффективной жидкостной хроматографией (HIC-HPLC). ADC подвергают хроматографии с гидрофобным взаимодействием - высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием колонки фенил-5PW (7,5×75 мм, 10 мкм, Tosoh Bioscience, USA). 50 mM буферный раствор фосфата калия (pH 7,0), содержащий 1,5 M сульфата аммония, используют в качестве буферного раствора А, и буферный раствор 50 mM фосфата калия (pH 7,0), содержащий 30% ацетонитрила, используют в качестве буферного раствора В, и в качестве исходных условий стабилизируют 70% А и 30% В. Используя линейный градиент 70% А/30% В к 10% А/90% В, элюирование проводят в течение следующих 25 минут с дополнительным элюированием в течение 5 минут при 10% А/90% В. Скорость потока и температуру устанавливают 1,0 мл/мин и 25°C, соответственно. Затем проводят обнаружение при 254 и 280 нм. Используют антитело ROR1, и пренилированное антитело ROR1 используют в качестве эталонной группы.

Кроме того, проводят анализ эксклюзионной хроматографией-высокоэффективной жидкостной хроматографией (SEC-HPLC). Эксклюзионную хроматографию-высокоэффективную жидкостную хроматографию проводят для ADC с использованием защитной колонки SWXL (6,0 × 40 мм, Tosoh Bioscience, USA) и колонки G3000SWxl (7,8 × 300 мм, 5 мкм, Tosoh Bioscience, USA). Используя 200 mM буферный раствор фосфата калия (pH 7,0), содержащий 250 mM хлорида фосфата и 15% изопропилового спирта в качестве подвижной фазы, анализ проводят в течение 30 минут в условиях скорости потока 0,5 мл/мин и 25°C. Затем проводят обнаружение как при 254, так и при 280 нм. Используют антитело ROR1, и пренилированное антитело ROR1 используют в качестве контрольной группы.

Результаты анализа свойств ADC2 и ADC5 среди ADC, полученных в варианте 9, представлены на фиг. 11a и фиг. 11b.

#### Вариант 11: Оценка цитотоксичности *in vitro*

Измеряют активность ингибирования пролиферации клеток линии раковых клеток ADC, полученными в Варианте осуществления 9.

Для этого используют коммерчески доступные линии раковых клеток (клеточные линии Mino, Jeko-1, REC-1, H2228, NCIN87, HCC1806, MDA-MB-231, MCF-7 и Дауди). В 96-луночной планшете в каждую лунку высевает 4000-5000 соответствующих линий раковых клеток. После культивирования в течение 24 часов, их обрабатывают ADC, указанными в таблице 8, в концентрации 0,0015-10,0 нМ (серийно разведенной втрое). Через 72 часа количество живых клеток измеряют с использованием красителя WST-8 (Dojindo Molecular Technology Inc.).

Результаты представлены ниже в Таблице 8. Подтверждено, что в линиях раковых клеток, суперэкспрессирующих ROR1, моноклональные анти-ROR1 антитела по настоящему изобретению обладают гораздо более высокой цитотоксичностью, чем ADC (ADC 8, 9 и 10), конъюгированные с обычным анти-ROR1 антителом. Кроме того, подтверждено, что ADC на основе пирролобензодиазепина проявляют сильную цитотоксичность по сравнению с ADC на основе ауристатина.

[Таблица 8]

Сравнение цитотоксичности образцов ADC

|                               | Jeko-1                | MDA-MB-231 | H2228  | HCC1806 | MCF-7  |
|-------------------------------|-----------------------|------------|--------|---------|--------|
| Уровень Ag<br>(кратность MIF) | 13                    | 11.2       | 9.4    | 2.7     | 1      |
| Тестируемый образец           | IC <sub>50</sub> [nM] |            |        |         |        |
| ADC1                          | 2,067                 | н.о.       | н.о.   | н.о.    | -      |
| ADC8                          | н.о.                  | н.о.       | н.о.   | -       | -      |
| ADC2                          | 2,909                 | 10,276     | 11,587 | 15,526  | 12,567 |
| ADC9                          | 7,259                 | 17,806     | 19,500 | 23,583  | 32,049 |
| ADC5                          | 247                   | 243        | н.о.   | 5,092   | -      |
| ADC10                         | 481                   | ~1,000     | н.о.   | 23,430  | -      |

\*н.о.: Цитотоксичность наблюдают по мере увеличения концентрации, но клетки не погибают полностью при максимальной концентрации, и значение IC<sub>50</sub> определить не удастся.

\*-: демонстрирует слабую или отсутствующую цитотоксичность при максимальной концентрации.

\*Н/Д: нет данных

#### Вариант 12: Анализ эффективности подавления роста рака *in vivo*

**Вариант осуществления 12-1: Анализ эффективности подавления роста рака с помощью ADC в мышинной модели, привитой с клеточной линией рака молочной железы, экспрессирующей ROR1.**

$1 \times 10^7$  клеток/голову линии клеток рака молочной железы MDA-MB-468, экспрессирующей ROR-1 человека, прививают самкам голых мышей Balb/C для получения мышей с привитым раком человека. После прививки, мышей объединяют в группы, когда размер опухоли достигает  $166 \text{ мм}^3$  в среднем (день 1), и мышам внутривенно вводят 1 мг/кг ADC5, полученного в варианте осуществления 9. В контрольной группе мышам внутривенно вводят 10 мл/кг PBS.

Размер опухолей, привитых мышам, и массу тела мышей измеряют непосредственно перед первым введением (день 1) и через равные промежутки времени в течение 56 дней после этого.

Кроме того,  $1 \times 10^7$  клеток/голову линии клеток рака молочной железы MDA-MB-231, экспрессирующей ROR-1 человека, прививают мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID) для получения мышей с привитым раком человека. После прививки, объединяют в группы, когда размер опухоли достигает  $110 \text{ мм}^3$  в среднем (день

1), и 0,5, 1,0 или 2,0 мг/кг ADC5, полученного в Варианте осуществления 9, вводят мышам внутривенно один раз, или 0,33 мг/кг ADC5 вводят внутривенно два раза в неделю, всего три раза (дни 1, 7 и 14). В контрольной группе, мышам внутривенно вводят 10 мл/кг PBS. Размер опухолей, трансплантированных мышам, и массу тела мышей измеряют непосредственно перед первым введением (день 1), и через равные промежутки времени в течение 22 дней после этого.

Кроме того,  $1 \times 10^7$  клеток/голову линии клеток рака молочной железы HCC1187, экспрессирующей ROR-1 человека, прививают мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID) для получения мышей с привитым раком человека. После прививки, объединяют в группы, когда размер опухоли достигает  $110 \text{ мм}^3$  в среднем (день 1), и 1,25 или 0,31 мг/кг ADC5, полученного в Варианте осуществления 9, вводят мышам внутривенно один раз, или 3,75 мг/кг ADC2 вводят внутривенно один раз. В контрольной группе, мышам внутривенно вводят 10 мл/кг PBS. Размер опухолей, трансплантированных мышам, и массу тела мышей измеряют непосредственно перед первым введением (день 1), и через равные промежутки времени в течение 41 дня после этого.

Результаты представлены на фиг. 12, фиг. 13 и фиг. 14. Подтверждено, что ADC по настоящему изобретению подавляют рост рака в мышинных моделях с привитой клеточной линией рака молочной железы, экспрессирующей ROR1.

**Вариант осуществления 12-2: Анализ эффективности подавления роста рака ADC в модели мышей, привитых клеточной линией рака молочной железы, экспрессирующей ROR1.**

$1 \times 10^7$  клеток/голову линии клеток рака легкого Calu-3, экспрессирующей ROR-1 человека, прививают самкам голых мышей Balb/C для получения мышей с привитым раком человека. После прививки, мышей объединяют в группы, когда размер опухоли достигает  $184 \text{ мм}^3$  в среднем (день 1), и 3 мг/кг ADC2, полученного в Варианте осуществления 9, вводят мышам внутривенно один раз, или 0,25 или 1,0 мг/кг ADC5, полученного в Варианте осуществления 9, вводят внутривенно один раз. В контрольной группе, мышам внутривенно вводят 10 мл/кг PBS. Размер опухолей, трансплантированных мышам, и массу тела мышей измеряют непосредственно перед первым введением (день 1), и через равные промежутки времени в течение 35 дней после этого.

Результаты представлены на фиг. 15. Подтверждено, что ADC по настоящему изобретению подавляют рост рака в мышинных моделях с привитой линией клеток рака легкого, экспрессирующих ROR1.

**Вариант осуществления 12-3: Анализ эффективности подавления роста рака с помощью ADC в модели мышей, привитых клеточной линией мантийноклеточной лимфомы, экспрессирующей ROR1.**

$1 \times 10^7$  клеток/голову линии клеток мантийноклеточной лимфомы Jeko-1, экспрессирующей ROR-1 человека, прививают мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID) для получения мышей с привитым раком человека. После прививки, мышей объединяют в группы, когда размер опухоли достигает  $110 \text{ мм}^3$  в

среднем (день 1), и 3 мг/кг ADC2, полученного в Варианте осуществления 9, вводят мышам внутривенно один раз, или 0,25 или 1,0 мг/кг ADC5, полученного в Варианте осуществления 9, вводят внутривенно один раз. В контрольной группе, мышам внутривенно вводят 10 мл/кг PBS. Размер опухолей, трансплантированных мышам, и массу тела мышей измеряют непосредственно перед первым введением (день 1), и через равные промежутки времени в течение 33 дней после этого.

Результаты представлены на фиг. 16. Подтверждено, что ADC по настоящему изобретению подавляют рост рака в моделях мышей с привитой линией клеток мантийноклеточной лимфомы, экспрессирующих ROR1.

**Вариант осуществления 12-4: Сравнение эффективности подавления роста рака среди ADC в модели мышей, привитых клеточной линией мантийноклеточной лимфомы, экспрессирующей ROR1.**

Сравнивают эффективность подавления роста рака в зависимости от антител и лекарственных средств, содержащих ADC.

$1 \times 10^7$  клеток/голову линии клеток мантийноклеточной лимфомы Calu-3, экспрессирующей ROR-1 человека, прививают мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID) для получения мышей с привитым раком человека. После прививки, мышей объединяют в группы, когда размер опухоли достигает  $110 \text{ мм}^3$  в среднем (день 1), мышам однократно внутривенно вводят 1 мг/кг или 4 мг/кг ADC2 (C2 MMAE)) или ADC9 (2A2 MMAE), полученных в Варианте осуществления 9, или 0,25 или 1,0 мг/кг ADC5 (dPBD-ADC) или ADC10 (2A2 dPBD), полученных в Варианте осуществления 9. В контрольной группе, мышам внутривенно вводят 10 мл/кг PBS. Размер опухолей, трансплантированных мышам, и массу тела мышей измеряют непосредственно перед первым введением (день 1), и через равные промежутки времени в течение 37 дней после этого.

Результаты представлены на фиг.17. Подтверждено, что ADC, конъюгированные с анти-ROR1 моноклональными антителами по настоящему изобретению, обладают более высокой эффективностью подавления роста рака, чем ADC (ADC 9 и 10), конъюгированные с обычным анти-ROR1 антителом. Кроме того, подтверждено, что ADC на основе пирролобензодиазепина проявляют более сильное подавление роста рака, чем ADC на основе ауристатина.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат антитела общей формулы I или его фармацевтически приемлемая соль:

[Общая формула I]

$Ab - (X)_y$

где:

Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфически связывающееся с внеклеточным доменом ROR1, антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи,

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

переменную область тяжелой цепи, содержащую CDRH1, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-5; CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 6-13 и 96; и CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 14-21 и 97; и

переменную область легкой цепи, содержащую CDRL1, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 22-29; CDRL2, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 30-37; и CDRL3, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 38-42;

X представляет собой химический остаток, который независимо включает по меньшей мере один активный агент и линкер;

где линкер связывает Ab и по меньшей мере один активный агент; и

y представляет собой целое число от 1 до 20.

2. Конъюгат антитела по п.1, в котором антитело содержит ряд CDR: CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, и CDRL3, в которых:

(a) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 6 и 14, соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22, 30 и 38, соответственно;

(b) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 7 и 15, соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, 31 и 39, соответственно;

(c) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 8 и 16, соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24, 32 и 40, соответственно;

(d) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 9 и 17, соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, 33 и 41, соответственно;

(e) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, 10 и 18, соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26, 34 и 41, соответственно;

(f) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотную последовательность SEQ

ID NO: 4, 11 и 19, соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, 35 и 42, соответственно;

(g) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, 12 и 20, соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, 36 и 41, соответственно;

(h) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 13 и 21, соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, 37 и 41, соответственно;

(i) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 96 и 15, соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23, 31 и 39, соответственно; или

(j) CDRH1, CDRH2 и CDRH3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 9 и 97, соответственно, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25, 33 и 41, соответственно.

3. Конъюгат антитела по п.1 или 2, в котором антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую:

аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 43-50, 98 и 99;

по меньшей мере 90% идентичность последовательности к аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 43-50, 98 и 99, или;

по меньшей мере 95% идентичность последовательности к аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 43-50, 98 и 99,

или его фармацевтически приемлемая соль или сольват.

4. Конъюгат антитела по любому из пп. 1-3, в котором антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую:

аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 51-58;

по меньшей мере 90% идентичность последовательности к аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 51-58; или

по меньшей мере 95% идентичность последовательности к аминокислотной последовательности любой из SEQ ID NO: 51-58,

или его фармацевтически приемлемая соль.

5. Конъюгат антитела по любому из пп. 1-4, в котором антитело содержит комбинацию переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность: SEQ ID NO: 43 и 51, соответственно; SEQ ID NO: 44 и 52, соответственно; SEQ ID NO: 45 и 53, соответственно; SEQ ID NO: 46 и 54, соответственно; SEQ ID NO: 47 и 55, соответственно; SEQ ID NO: 48 и 56, соответственно; SEQ ID NO: 49 и 57, соответственно; SEQ ID NO: 50 и 58, соответственно; SEQ ID NO: 98 и 52, соответственно или SEQ ID NO: 99 и 54, соответственно.

6. Конъюгат антитела по любому из пп. 1-5, в котором антитело содержит комбинацию переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи, содержащую

аминокислотную последовательность: SEQ ID NO: 59 и 67, соответственно; SEQ ID NO 60 и 68, соответственно; SEQ ID NO 61 и 69, соответственно; SEQ ID NO 62 и 70, соответственно; SEQ ID NO 63 и 71, соответственно; SEQ ID NO 64 и 72, соответственно; SEQ ID NO 65 и 73, соответственно; или SEQ ID NO 66 и 74, соответственно.

7. Конъюгат антитела по п.1 или 2, в котором антитело представляет собой моноклональное антитело, доменное антитело (dAb), одноцепочечное антитело (scab), Fab фрагмент, Fab' фрагмент, F(ab')<sub>2</sub> фрагмент, scFab фрагмент, Fv фрагмент, dsFv фрагмент, одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), ScFv-Fc фрагмент, однодоменное антитело тяжелой цепи, однодоменное антитело легкой цепи, вариант антитела, мультимерное антитело, миниантитело, диатело, биспецифическое антитело или мультиспецифическое антитело.

8. Конъюгат антитела по п.1 или 2, в котором антитело представляет собой антитело кролика, мыши, химерное, гуманизированное и полностью человеческое моноклональное антитело.

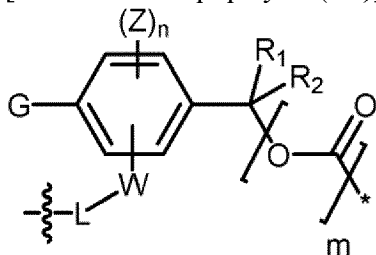
9. Конъюгат антитела по любому из пп. 1-8, в котором антитело представляет собой одно из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 типа.

10. Конъюгат антитела по любому из пп. 1-9, в котором ROR1 представляет собой ROR1 человека или ROR1 мыши.

11. Конъюгат антитела по любому из пп. 1-10, в котором линкер между антителом и активным агентом содержит расщепляемую связь (например, связь, расщепляемую ферментом).

12. Конъюгат антитела по любому из пп. 1-11, в котором конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру, представленную общей формулой IIa:

[Химическая формула (IIa)]



или ее фармацевтически приемлемую соль, где

G представляет собой сахар, сахарную кислоту или производное сахара;

W представляет собой -C(O)-, -C(O)NR', -C(O)O-, SO<sub>2</sub>NR', -P(O)R''NR', -SONR' или -PO<sub>2</sub>NR'; где C, S или P непосредственно связаны с фенильным кольцом;

каждый Z независимо представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил, галоген, циано или нитро;

n представляет собой целое число от 0 до 3; и

m представляет собой 0 или 1;

L отсутствует, представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>50</sub> алкилен или 1-50-атомный гетероалкилен или L содержит по меньшей мере одну единицу разветвления (BR) и по меньшей мере одну единицу соединения;

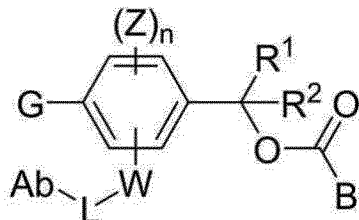
$R^1$  и  $R^2$  независимо представляют собой водород,  $C_1$ - $C_8$  алкил или  $C_3$ - $C_8$  циклоалкил; или  $R_1$  и  $R_2$ , объединены с получением ( $C_3$ - $C_8$ ) циклоалкильного кольца;

\* представляет точку присоединения к активному агенту; и

~ представляет точку присоединения к антителу.

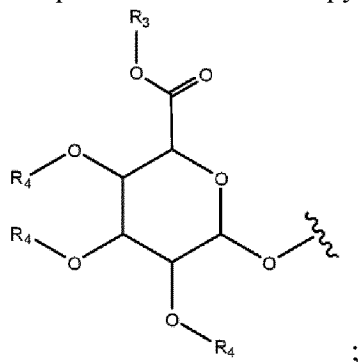
13. Конъюгат антитела по любому из пп. 1-12, в котором конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру, представленную общей формулой II:

[Общая формула II]



или ее фармацевтически приемлемую соль, где

G представляет собой группу глюкуроновой кислоты или



$R^3$  представляет собой водород или карбоксильную защитную группу;

каждый из  $R_4$  независимо представляет собой водородную или гидроксильную защитную группу;

B представляет собой активный агент;

$R^1$  и  $R^2$  представляют собой соответственно и независимо водород,  $C_1$ - $C_8$  алкил или  $C_3$ - $C_8$  циклоалкил;

W представляет собой  $-C(O)-$ ,  $-C(O)NR'-$ ,  $-C(O)O-$ ,  $SO_2NR'-$ ,  $-P(O)R''NR'-$ ,  $-SONR'-$  или  $-PO_2NR'-$ ; где C, S или P напрямую связаны с фенильным кольцом;

$R'$  и  $R''$  каждый независимо представляет собой водород,  $C_1$ - $C_8$  алкил,  $C_3$ - $C_8$  циклоалкил,  $C_1$ - $C_8$  алкокси,  $C_1$ - $C_8$  алкилтио, моно- или ди-  $C_1$ - $C_8$  алкиламино,  $C_3$ - $C_{20}$  гетероарил или  $C_6$ - $C_{20}$  арил;

каждый Z независимо представляет собой  $C_1$ - $C_8$  алкил, галоген, циано или нитро;

n представляет собой целое число 0-3; и

L содержит:

A)  $C_1$ - $C_{50}$  алкилен или 1-50-атомный гетероалкилен, удовлетворяющий по меньшей мере одному из следующих:

(i) L содержит по меньшей мере одну ненасыщенную связь;

(ii) L замещен двухвалентным заместителем, где 2 атома в L являются

одинаковыми, как в заместителе, таким образом образуя гетероарилен;

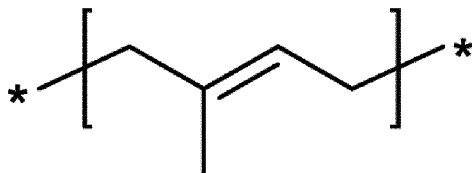
(iii) L представляет собой 1-50-атомный гетероалкилен;

(iv) L замещен по меньшей мере одним  $C_{1-20}$  алкилом; или

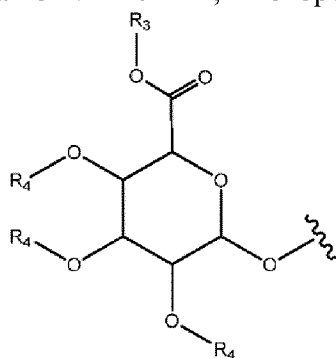
(v) L прерывается двухвалентной гетероариленовой группой; или

В) по меньшей мере одна единица производного изопренила общей формулы III ниже, которая может быть распознана изопреноидтрансферазой:

[Общая формула III]



14. Конъюгат антитела по п.12 или 13, в котором



G представляет собой

$R^3$  представляет собой водород или карбоксильную защитную группу; и

каждый  $R^4$  представляет собой, соответственно и независимо, водород или гидроксильную защитную группу.

15. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-14, в котором  $R^3$  представляет собой водород, и каждый  $R^4$  представляет собой водород.

16. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-15, в котором  $R^1$  и  $R^2$  представляют собой водород.

17. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-16, в котором Z независимо представляет собой  $C_1$ - $C_8$  алкил, галоген, циано или нитро.

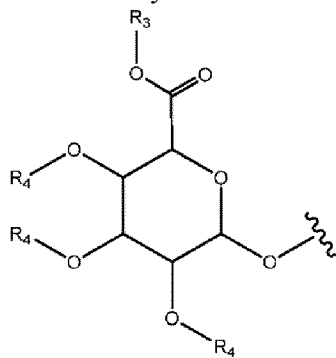
18. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-17, в котором n равно 0.

19. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-18, в котором W представляет собой -C(O)-, -C(O)NR'-, -C(O)O-,  $SO_2NR'$ -, -P(O)R''NR'-, -SONR'- или -PO<sub>2</sub>NR'-; C, S или P непосредственно связаны с фенильным кольцом; R' и R'', соответственно и независимо, представляют собой соединения, которые представляют собой водород,  $C_1$ - $C_8$  алкил,  $C_3$ - $C_8$  циклоалкил,  $C_1$ - $C_8$  алкокси,  $C_1$ - $C_8$  алкилтио, моно-или ди- $C_1$ - $C_8$  алкиламино,  $C_3$ - $C_{20}$  гетероарил или  $C_6$ - $C_{20}$  арил.

20. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-19, в котором W представляет собой -C(O)-, -C(O)NR'- или -C(O)O-.

21. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-20, в котором W представляет собой -C(O)NR'-; и C(O) связан с фенильным кольцом, и NR' связан с L.

22. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-21, в котором



G представляет собой

;

W представляет собой  $-C(O)NR'$ -, C(O) связан с фенильным кольцом,  $NR'$  связан с L; и

$R_3$  и  $R_4$  представляют собой водород.

23. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-22, в котором L представляет собой  $C_1$ - $C_{50}$  алкилен или 1-50-атомный гетероалкилен содержащий, по меньшей мере одно из:

- (i) L содержит по меньшей мере одну ненасыщенную связь;
- (ii) L замещен двухвалентным заместителем, где 2 атома в L являются одинаковыми, как в заместителе, таким образом образуя гетероарилен;
- (iii) L представляет собой 1-50-атомный гетероалкилен;
- (iv) L замещен по меньшей мере одним  $C_{1-20}$  алкилом; или
- (v) L прерывается гетероариленом.

24. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-23, в котором L представляет собой  $C_1$ - $C_{50}$  алкилен или 1-50-атомный гетероалкилен содержащий по меньшей мере одно из:

- (i) ненасыщенной связи;
- (ii) гетероарилена;
- (iii) 1-50-атомного гетероалкилена; или
- (iv) по меньшей мере один  $C_{1-20}$  алкильный заместитель.

25. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-23, в котором L является азотсодержащим 1-50-атомным гетероалкиленом, линкер содержит по меньшей мере 2 атома гидрофильной аминокислоты; и азот образует пептидную связь с карбонилем гидрофильной аминокислоты.

26. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-25, в котором W представляет собой  $-C(O)NR'$ -, и азот W представляет собой атом азота гидрофильной аминокислоты.

27. Конъюгат антитела по п.25 или 26, в котором гидрофильная аминокислота выбрана из группы, включающей аргинин, аспартат, аспарагин, глутамат, глутамин, гистидин, лизин, орнитин, пролин, серин и треонин.

28. Конъюгат антитела по любому из пп. 25-27, в котором аминокислота ковалентно связывает оксим линкера с полиэтиленгликолевой единицей линкера.

29. Конъюгат антитела по любому из пп. 25-28, в котором аминокислота выбрана из аргинина, аспартата, аспарагина, глутамата, глутамина, гистидина, лизина, орнитина, пролина, серина и треонина.

30. Конъюгат антитела по любому из пп. 25-29, в котором гидрофильная аминокислота содержит боковую цепь, имеющую группу, которая имеет электрический заряд в водном растворе при нейтральном pH.

31. Конъюгат антитела по любому из пп. 25-30, в котором гидрофильная аминокислота представляет собой аспартат или глутамат.

32. Конъюгат антитела по любому из пп. 25-30, в котором гидрофильная аминокислота представляет собой орнитин или лизин.

33. Конъюгат антитела по любому из пп. 25-30, в котором гидрофильная аминокислота представляет собой аргинин.

34. Конъюгат антитела по любому из пп. 25-33, в котором L дополнительно содержит пептид, и пептид содержит по меньшей мере одну гидрофильную аминокислоту и содержит боковую цепь, имеющую группу, которая имеет электрический заряд в водном растворе при нейтральном pH.

35. Конъюгат антитела по п.34, в котором каждая аминокислота пептида независимо выбрана из аланина, аспартата, аспарагина, глутамата, глутамина, глицина, лизина, орнитина, пролина, серина и треонина.

36. Конъюгат антитела по п.34 или 35, в котором пептид содержит по меньшей мере один аспартат или глутамат.

37. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-36, в котором W представляет собой -C(O)NR'-, и где азот W представляет собой атом азота N-концевой аминокислоты пептида.

38. Конъюгат антитела по п.37, в котором пептид ковалентно связывает оксим линкера с полиэтиленгликолевой единицей линкера.

39. Конъюгат антитела по любому из пп. 34-38, в котором пептид содержит 2-20 аминокислот.

40. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-39, в котором L ковалентно связан с антителом тиоэфирной связью, и тиоэфирная связь включает атом серы цистеина антитела.

41. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-40, в котором антитело содержит аминокислотный мотив, который может распознаваться изопреноидтрансферазой, на С-конце антитела, и тиоэфирная связь содержит атом серы цистеина антитела.

42. Конъюгат антитела по п.41, в котором аминокислотный мотив представляет собой последовательность CYYX, C представляет собой цистеин, Y представляет собой алифатическую аминокислоту, X представляет собой любую аминокислоту, выбранную из глутамина, глутамата, серина, цистеина, метионина, аланина и лейцина; и тиоэфирная связь содержит атом серы цистеина антитела.

43. Конъюгат антитела по п.42 или 43, в котором аминокислотный мотив представляет собой последовательность CYYX, и Y представляет собой любой мотив, выбранный из аланина, изолейцина, лейцина, метионина и валина.

44. Конъюгат антитела по любому из пп. 41-43, в котором аминокислотный мотив представляет собой последовательность CVIM или CVLL.

45. Конъюгат антитела по любому из пп. 41-44, в котором по меньшей мере одна из 1-20 аминокислот, предшествующих аминокислотному мотиву, представляет собой глицин.

46. Конъюгат антитела по любому из пп. 41-45, в котором по меньшей мере три из 1-20 аминокислот, предшествующих аминокислотному мотиву, представляют собой глицин или пролин.

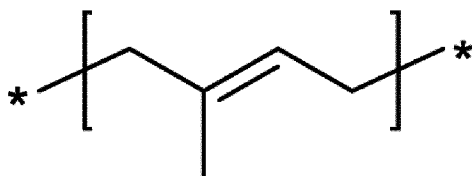
47. Конъюгат антитела по любому из пп. 41-46, в котором по меньшей мере одна из 1-20 аминокислот, предшествующих аминокислотному мотиву, представляет собой любую аминокислоту, выбранную из глицина, аспарагиновой кислоты, аргинина и серина.

48. Конъюгат антитела по любому из пп. 41-47, в котором, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот, предшествующих аминокислотному мотиву, представляют собой, соответственно, глицин.

49. Конъюгат антитела по любому из пп. 41-48, в котором L дополнительно содержит аминокислотную последовательность GGGGGGCVIM на С-конце.

50. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-49, в котором L дополнительно содержит по меньшей мере одну единицу производного изопренила общей формулы III:

[Общая формула III]

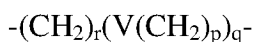


51. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-50, в котором L представляет собой 3-50 гетероалкилен, содержащий оксим, и атом кислорода оксима находится на стороне L, связанной с W, и атом углерода оксима находится на стороне L, связанной с Ab, или атом углерода оксима находится на стороне L, связанной с W, и атом кислорода оксима находится на стороне L, связанной с Ab.

52. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-51, в котором L дополнительно содержит оксим, и по меньшей мере одна единица изопренила ковалентно связывает оксим с Ab.

53. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-52, в котором L дополнительно содержит единицы соединения, представленные общей формулой VIII или общей формулой IX:

[Общая формула VIII]



[Общая формула IX]



где

V представляет собой одинарную связь, -O-, -S-, -NR<sup>21</sup>-, -C(O)NR<sup>22</sup>-, NR<sup>23</sup>C(O)-, NR<sup>24</sup>SO<sub>2</sub>- или -SO<sub>2</sub>NR<sup>25</sup>-;

X представляет собой -O-, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкилен или -NR<sup>21</sup>-;



69. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-68, в котором L содержит 6-12 -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- единиц.

70. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-67, в котором L дополнительно содержит 3 -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- единицы.

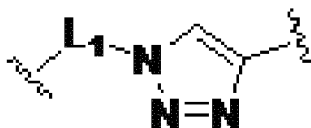
71. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-68, в котором L дополнительно содержит оксим и по меньшей мере одну единицу полиэтиленгликоля, ковалентно связывающую оксим с активным агентом.

72. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-71, в котором L дополнительно содержит единицу, сформированную 1,3-диполярными реакциями циклоприсоединения, реакциями гетеро-диенов, реакциями нуклеофильного замещения, реакциями карбонила нонадиольного типа, добавлениями к множественным связям углерод-углерод, реакциями окисления или клик-реакциями.

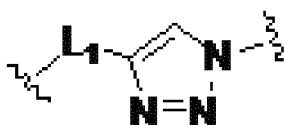
73. Конъюгат антитела по п.72, в котором единицы связывания образованы посредством реакции ацетилена и азиды или посредством реакции альдегидной или кетонной группы с гидразином или гидроксиламином.

74. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-73, в котором L дополнительно содержит единицу связывания, представленную общими формулами IV, V, VI или VII ниже:

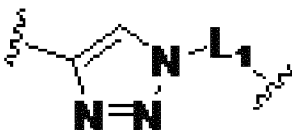
[Общая формула IV]



[Общая формула V]



[Общая формула VI]



[Общая формула VII]



где

L<sup>1</sup> представляет собой одинарную связь или алкилен C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>; и

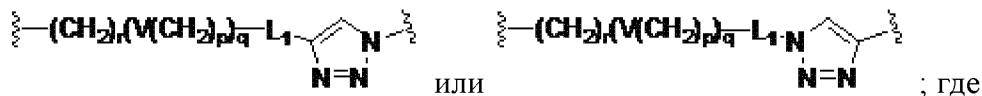
R<sup>11</sup> представляет собой водород или алкил C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>.

75. Конъюгат антитела по п.74, в котором L<sup>1</sup> представляет собой одинарную связь.

76. Конъюгат антитела по п.74, в котором  $L^1$  представляет собой  $C_{11}$ -алкилен.

77. Конъюгат антитела по п.74, в котором  $L^1$  представляет собой  $C_{12}$ -алкилен.

78. Конъюгат антитела по п.74, в котором L дополнительно содержит



V представляет собой одинарную связь, -O-, -S-, -NR<sup>21</sup>-, -C(O)NR<sup>22</sup>-, NR<sup>23</sup>C(O)-, NR<sup>24</sup>SO<sub>2</sub>- или -SO<sub>2</sub>NR<sup>25</sup>-;

R<sup>21</sup> - R<sup>25</sup>, независимо и соответственно представляют собой водород, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> арил или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил C<sub>3</sub>-C<sub>20</sub> гетероарил;

r представляет собой целое число 1-10;

p представляет собой целое число 0-10;

q представляет собой целое число 1-20; и

$L^1$  представляет собой одинарную связь.

79. Конъюгат антитела по п.78, в котором r представляет собой целое число 2 или 3.

80. Конъюгат антитела по п.78 или 79, в котором p представляет собой целое число 1 или 2.

81. Конъюгат антитела по любому из пп. 78-80, в котором q представляет собой целое число 1-6.

82. Конъюгат антитела по п.78, в котором r представляет собой целое число 2 или 3; p представляет собой целое число 1 или 2; и q представляет собой целое число 1-6.

83. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-83, в котором изопреноидтрансфераза представляет собой фарнезилпротеинтрансферазу (FTase) или геранилгеранилтрансферазу (GGTase).

84. Конъюгат антитела по любому из пп. 12-83, в котором L дополнительно содержит один или более разветвленных линкеров, ковалентно связанных с Ab, где

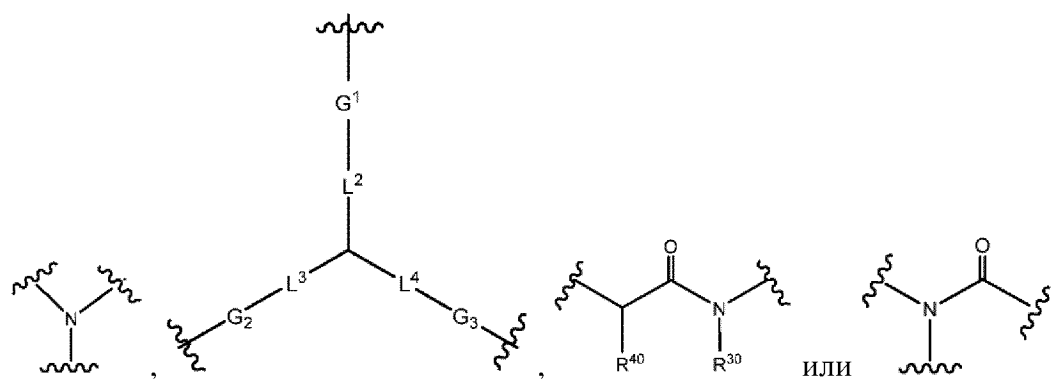
i) каждый разветвленный линкер содержит единицу разветвления (BR), ковалентно связанную с Ab первичным линкером (PL);

ii) каждый разветвленный линкер содержит первую ветвь (B1), в которой первый активный агент ковалентно связан с единицей разветвления вторичным линкером (SL) и группой расщепления (CG); и

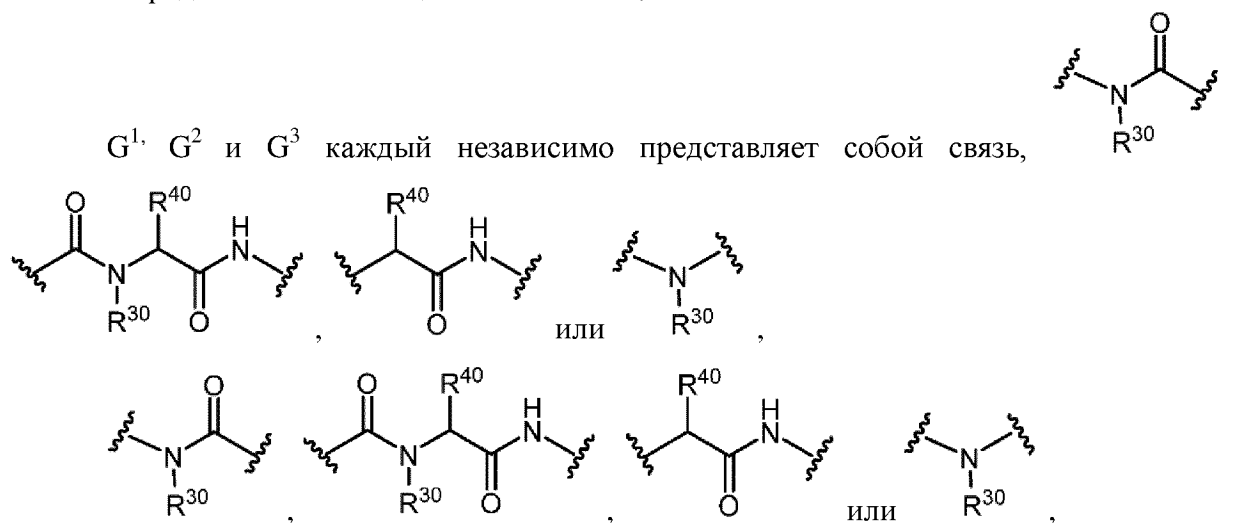
iii) каждый разветвленный линкер дополнительно содержит вторую ветвь (B2), в которой либо а) второй активный агент ковалентно связан с единицей разветвления вторичным линкером (SL) и группой расщепления (CG), либо б) полиэтиленгликолевая группа ковалентно связана с единицей разветвления,

где каждая группа расщепления может быть гидролизована для высвобождения активного агента из конъюгата антитело-лекарственное средство.

85. Конъюгат антитела по п.84, в котором единица разветвления представлена:



$L^2$ ,  $L^3$  и  $L^4$  каждый независимо представляет собой связь или  $-C_nH_{2n}-$ ;  
 $n$  представляет собой целое число 1-30;



$R^{30}$  представляет собой водород или  $C_{1-30}$  алкил;

$L^5$  представляет собой прямую связь или  $C_{1-10}$  алкилен; и

$R^{50}$  представляет собой водород  $C_{1-30}$  алкил.

86. Конъюгат антитела по п.84 или 85, в котором конъюгат антитела содержит по меньшей мере один разветвленный линкер, ковалентно связанный с Ab; и по меньшей мере два активных агента, ковалентно связанных с разветвленным линкером.

87. Конъюгат антитела по любому из пп. 84-86, в котором конъюгат антитела содержит два или более разветвленных линкеров, ковалентно связанных с Ab; и разветвленные линкеры связываются по меньшей мере с двумя активными агентами.

88. Конъюгат антитела по п.86 или 87, в котором конъюгат антитела содержит 3 разветвленных линкера.

89. Конъюгат антитела по п.86 или 87, в котором конъюгат антитела содержит 4 разветвленных линкера.

90. Конъюгат антитела по п.86 или 87, в котором конъюгат антитела содержит 1 разветвленный линкер.

91. Конъюгат антитела по п.86 или 87, в котором каждый из соответствующих разветвленных линкеров связывается с двумя активными агентами.

92. Конъюгат антитела по п.86 или 87, в котором конъюгат содержит по меньшей мере два различных активных агента.

93. Конъюгат антитела по любому из пп. 86-92, в котором разветвленный линкер связан по меньшей мере с двумя активными агентами.

94. Конъюгат антитела по любому из пп. 84-93, в котором активный агент связан с разветвленным линкером расщепляемой связью.

95. Конъюгат антитела по п.84 или 85, в котором активные агенты связываются с единицей разветвления через второй линкер; и единицы разветвления связаны с анти-ROR1 антителом первым линкером.

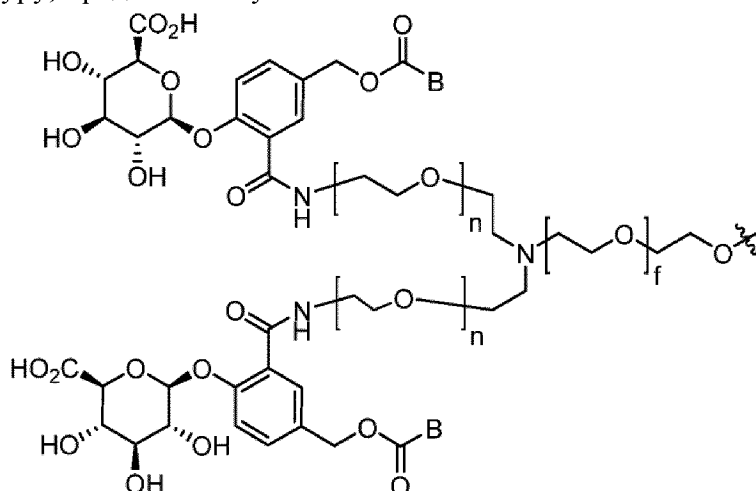
96. Конъюгат антитела по любому из пп. 84-95, в котором единица разветвления представляет собой атом азота.

97. Конъюгат антитела по любому из пп. 84-96, в котором единица разветвления представляет собой амид, и первый линкер содержит карбонил амида.

98. Конъюгат антитела по любому из пп. 84-96, в котором единица разветвления представляет собой амид, и второй линкер содержит карбонил амида.

99. Конъюгат антитела по любому из пп. 84-98, в котором единица разветвления представляет собой единицу лизина.

100. Конъюгат антитела по п.12-85, в котором конъюгат антитела содержит структуру, представленную:



где

каждый В представляет собой активный агент;

каждый n независимо представляет собой целое число от 0 до 30; и

каждый f независимо представляет собой целое число от 0 до 30.

101. Конъюгат антитела по п.100, в котором n представляет собой целое число 1-10.

102. Конъюгат антитела по п.100, в котором n представляет собой целое число 4-20.

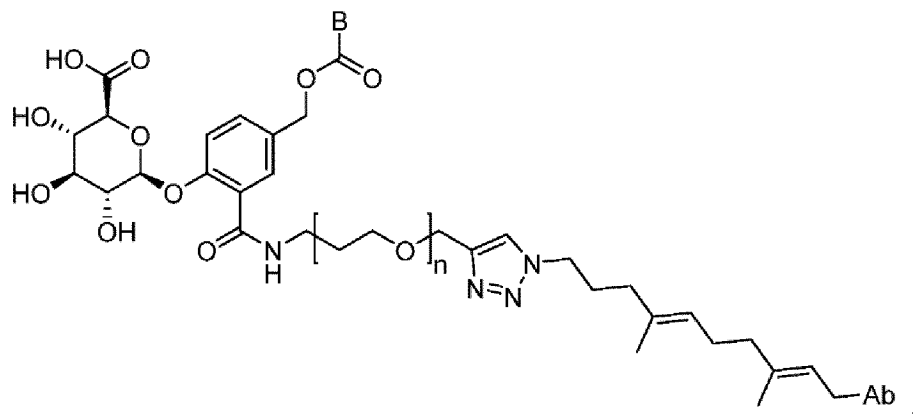
103. Конъюгат антитела по любому из пп. 100-102, в котором L содержит оксим, и по меньшей мере одна единица полиэтиленгликоля ковалентно связывает оксим с активным агентом.

104. Конъюгат антитела по любому из пп. 11-103, в котором расщепляемая связь расщепляется в клетке-мишени.

105. Конъюгат антитела по любому из пп. 11-103, в котором расщепляемая связь

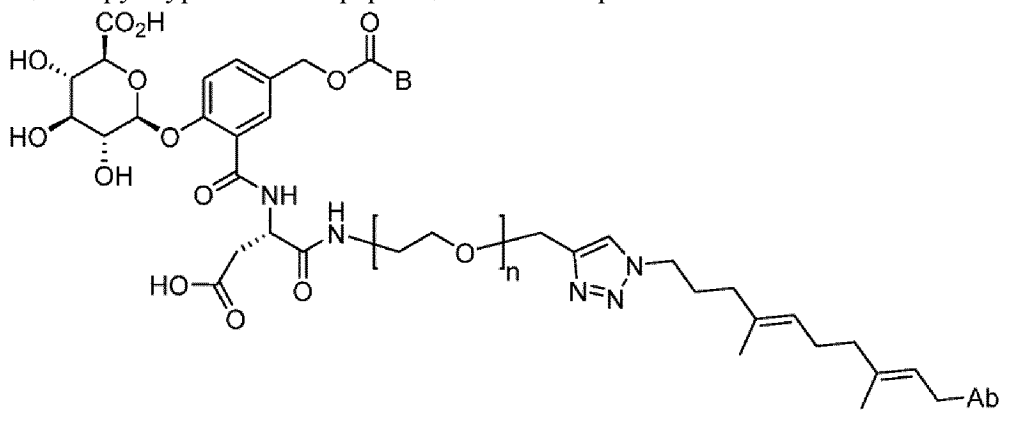
расщепляется активатором (например, радиацией, кислотой, основанием или ферментом).

106. Конъюгат антитела по любому из пп. 1-11, в котором конъюгат представлен следующей структурой или ее фармацевтически приемлемой солью:



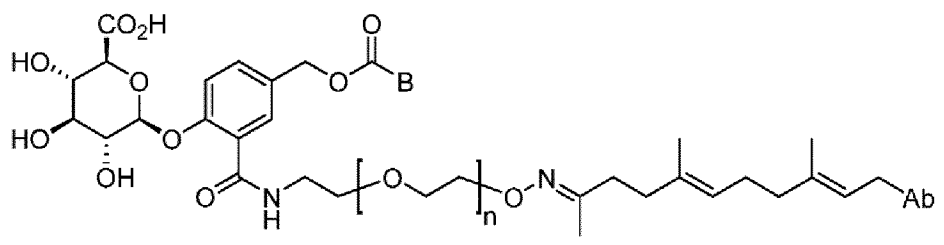
где Ab представляет собой анти-ROR1 антитело; B представляет собой активный агент и; n представляет собой целое число 1-20.

107. Конъюгат антитела по любому из пп. 1-11, в котором конъюгат представлен следующей структурой или ее фармацевтически приемлемой солью:



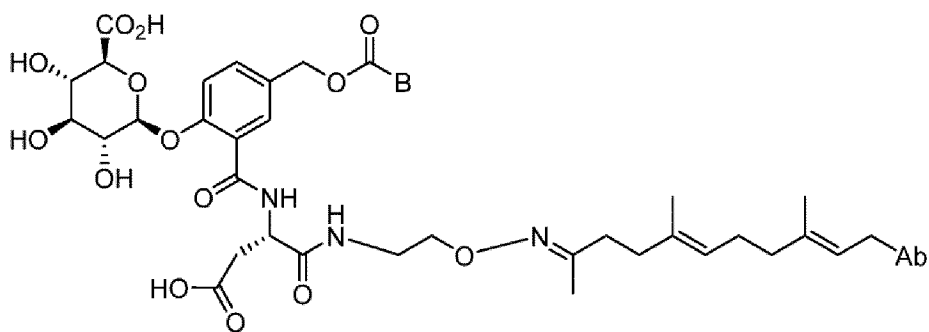
где Ab представляет собой анти-ROR1 антитело; B представляет собой активный агент и; n представляет собой целое число 1-20.

108. Конъюгат антитела по любому из пп. 1-11, в котором конъюгат представлен следующей структурой или ее фармацевтически приемлемой солью:



где Ab представляет собой анти-ROR1 антитело; B представляет собой активный агент и; n представляет собой целое число 1-20.

109. Конъюгат антитела по любому из пп. 1-11, в котором конъюгат представлен следующей структурой или ее фармацевтически приемлемой солью:



где Ab представляет собой анти-ROR1 антитело; В представляет собой активный агент и; n представляет собой целое число 1-20.

110. Конъюгат антитела по любому из пп. 1-109, в котором активный агент представляет собой химиотерапевтический агент или токсин.

111. Конъюгат антитела по любому из пп. 1-110, в котором активный агент представляет собой иммунорегуляторное соединение, противораковый агент, противовирусное, антибактериальное, противогрибковое, противопаразитарное средство или их комбинацию.

112. Конъюгат антитела по любому из пп. 1-111, в котором активный агент выбран из:

(а) эрлотиниба, бортезомиба, фулвестранта, сутента, летрозоло, мезилата иматиниба, РТК787/ZK 222584, оксалиплатина, 5-фторурацила, лейковорина, рапамицина, лапатиниба, лонафарниба, сорафениба, гефитиниба, AG1478, AG1571, тиотепа, циклофосфида, бусульфана, импросульфана, пипосульфана, бензодопа, карбоксона, метуредопа, уредопа, этиленимина, альтретамина, триэтиленмеламина, триэтиленфосфорида, триэтиленфосфорида, тейметилломеламина, буллатаина, буллатаинона, камптотецина, топотекана, бриостатина, каллистатина, СС-1065, адозелезина, карзелезина, бизелезина, криптофицина 1, криптофицина 8, доластатина, дуокармицина, KW-2189, СВ1-ТМ1, элеутеробина, панкреатистатина, саркодиктина, спонпистатина, хлорамбуцила, хлорнафазина, холофосфида, эстрамаустина, ифосфида, мехлоретамина, мельфалана, новемибихина, фенестерина, преднимустина, трофосфида, урамустина, кармустина, хлорозотоксина, фотемустина, ломустина, нимустина, ранимустина, калихеамицина, калихеамицина гамма 1, калихеамицина омега 1, динемидина, динемидина А, клодроната, эспеперамицина, неокарзиностатина хромофора, аклаиномицинов, актиномицина, антримицина, азазерина, блеомицинов, катциномицина, карабицина, карниномицина, карзинофилина, хромомицинов, дактиномицина, даунорубицина, деторубицина, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцина, доксорубицина, морфолино-доксорубицина, цианоморфолино-доксорубицина, 2-пирролино-доксорубицина, липосомального доксорубицина, дезоксидоксорубицина, эпирубицина, эзрубицина, марцелломицина, митомицина С, микофеноловой кислоты, ногаламицина, оливомицинов, пепломицина, потфиромицина, пуромицина, квеламицина, родорубицина, стрептомицина, стрептозоцина, тудерцидина, убенимекса, зиностатина,

зорубицина, 5-фторурацила, деноптерина, метотрексата, птеропретина, триметрексата, флударабина, 6-меркаптопурина, тиампирина, тигуанина, анцитабина, азацитидина, 6-азауридина, кармофура, цитарабина, дидезоксиуридина, доксифлуридина, эноцитабина, флоксуридина, калустерона, дромостанолон, пропионата, эпителиостанола, мепитиостана, тестолактона, аминоглутетимида, митотана, трилостана, фолиновой кислоты, ацеглатона, гликозида альдофосфамида, аминоклевулиновой кислоты, энилурацила, амсакрина, бестрабуцила, бисантрена, эдатрексата, дефофамина, демоколцина, диазиквона, элфорнитина, эллиптиниума ацетата, этоглуцида, нитрата галлия, гидроксимочевины, лентинана, лонидаинина, майтанзина, ансамитоцинов, митогуазона, митоксантрона, мопиданмола, натриэрина, пентостатина, фенамета, пирарубицина, лозоксантрона, 2-этилгидразида, прокарбазина, полисахарида-к, разоксана, сизофирана, спирогермания, теназоновой кислоты, триаквизона, 2,2',2''-трихлортриэтиламина, Т-2 токсина, верракурина А, роридина А, ангидина, уретана, виндезина, дакарбазина, манномустина, митобронитола, митолактола, пипобромана, гацитозина, арабинозида, циклофосфамида, тиотепа, паклитаксела, альбумин-сконструированного состава наночастиц паклитаксела, доцетаксела, хлорамбуцила, гемцитабина, 6-тиогуанина, меркаптопурина, цисплатина, карбоплатина, винбластина, платины, этопозид, ифосфамида, митоксантрона, винкристина, винорелбина, новантрона, тенипозид, эдатрексата, дауномицина, аминоклеветина, кселола, ибандроната, CPT-11, ингибитора топоизомеразы RFS 2000, дифторметилорнитина, ретиноевой кислоты, капецитабина или их фармацевтически приемлемых солей, сольватов или кислот;

(b) монокина, лимфокина, традиционного полипептидного гормона, паратиреоидного гормона, тироксина, релаксина, прорелаксина, гликопротеинового гормона, фолликулостимулирующего гормона, тиреотропного гормона, лютеинизирующего гормона, фактора роста печени, фактора роста фибробластов, пролактина, плацентарного лактогена, фактора некроза опухоли, фактора некроза опухоли- $\alpha$ , фактора некроза опухоли- $\beta$ , мюллеровского ингибирующего вещества, гонадотропин-ассоциированного пептида мыши, ингибина, активина, фактора роста эндотелия сосудов, тромбopoэтина, эритропоэтина, остеоиндуктивного фактора, интерферона, интерферона- $\alpha$ , интерферона- $\beta$ , интерферона- $\gamma$ , колониестимулирующего фактора (CSF), макрофагального CSF, гранулоцитарно-макрофагального CSF, гранулоцитарного CSF, интерлейкина (IL), IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, фактора некроза опухоли, полипептидного фактора, LIF, kit лиганда или их смеси;

(c) дифтерийного токсина, ботулинического токсина, столбнячного токсина, дизентерийного токсина, холерного токсина, аманитина,  $\alpha$ -аматинина, пирролобензодиазепина, производного пирролобензодиазепина, индолинобензодиазепина, пиридобензодиазепина, тетродотоксина, бреветоксина, цигуатоксина, рицина, АМ токсина, ауристатина, тубулизина, гелданамицина, майтансиноида, калихеамицина, дауномицина, доксорубицина, метотрексата, виндезина, SG2285, доластатина, аналога

доластатина, ауристатина, криптофицина, камптотецина, ризоксина, производных ризоксина, СС-1065, аналогов или производных СС-1065, дуокармицина, энедиинового антибиотика, эсперамицина, эпотилона, анатоксина или их смесей;

(d) аффинного лиганда, где аффинный лиганд представляет собой субстрат, ингибитор, активный агент, нейротрансмиттер, радиоактивный изотоп или их смесей;

(e) радиоактивной метки,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ , флуоресцентного красителя, электроноплотного реагента, фермента, биотина, стрептавидина, диоксигенина, гаптена, иммуногенного белка, молекулы нуклеиновой кислоты с последовательностью, комплементарной мишени или их смесей;

(f) иммуномодулирующего соединения, противоракового агента, противовирусного агента, антибактериального агента, противогрибкового агента, противопаразитарного агента или их смесей;

(g) тамоксифена, ралоксифена, дролоксифена, 4-гидрокситамоксифена, триоксифена, кеоксифена, LY117018, онапристона или торемифена;

(h) 4(5)-имидазола, аминоклутетимида, мегестрола ацетата, экземестана, летрозолола или анастрозолола;

(i) флутамида, нилутамида, бикалутамида, лейпролида, гозерелина или троксацитабина;

(j) ингибитора ароматазы;

(k) ингибитора протеинкиназы;

(l) ингибитора липидкиназы;

(m) антисмыслового олигонуклеотида;

(n) рибозима;

(o) вакцины; и

(p) антиангиогенного агента.

113. Конъюгат антитела по любому из пп. 1-110, в котором:

Ab представляет собой анти-ROR1 антитело;

активный агент представляет собой димер пирролобензодиазепина;

линкер связывает Ab с положением N10 или N'10 димера пирролобензодиазепина;

и

у представляет собой целое число от 1 до 20.

114. Конъюгат антитела по п.113, в котором:

активный агент представляет собой димер пирролобензодиазепина;

димер пирролобензодиазепина замещен X в положении N10 или X' в положении N'10, где X или X' связывает димер пирролобензодиазепина с линкером;

X и X', соответственно и независимо, представляют собой  $-\text{C}(\text{O})\text{O}^*$ ,  $-\text{S}(\text{O})\text{O}^*$ ,  $-\text{C}(\text{O})^*$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^{\text{X}}^*$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^{\text{X}}^*$ ,  $-\text{P}(\text{O})\text{R}'\text{NR}^{\text{X}}^*$ ,  $-\text{S}(\text{O})\text{NR}^{\text{X}}^*$  или  $-\text{PO}_2\text{NR}^{\text{X}}^*$ ;

$\text{R}^{\text{X}}$  представляет собой  $\text{C}_{1-8}$  алкил,  $\text{C}_{3-8}$  циклоалкил,  $\text{C}_{3-20}$  гетероарил или  $\text{C}_{5-20}$  арил;

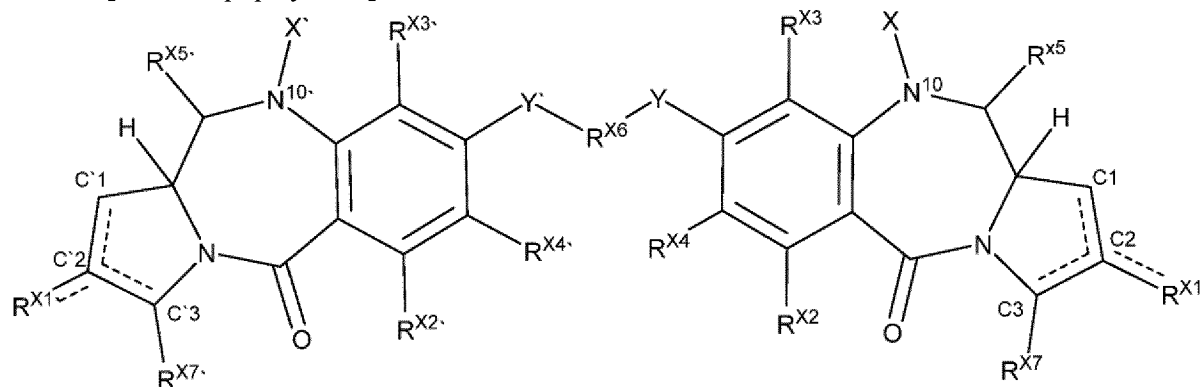
$\text{R}^{\text{X}}$  представляет собой OH,  $\text{N}_3$ , CN, SH,  $\text{C}_{1-8}$  алкил,  $\text{C}_{3-8}$  циклоалкил,  $\text{C}_{1-8}$  алкокси,  $\text{C}_{1-8}$  алкилтио,  $\text{C}_{3-20}$  гетероарил,  $\text{C}_{5-20}$  арил или amino; и

\* представляет собой сайт связывания между димером пирролобензодиазепина и линкером.

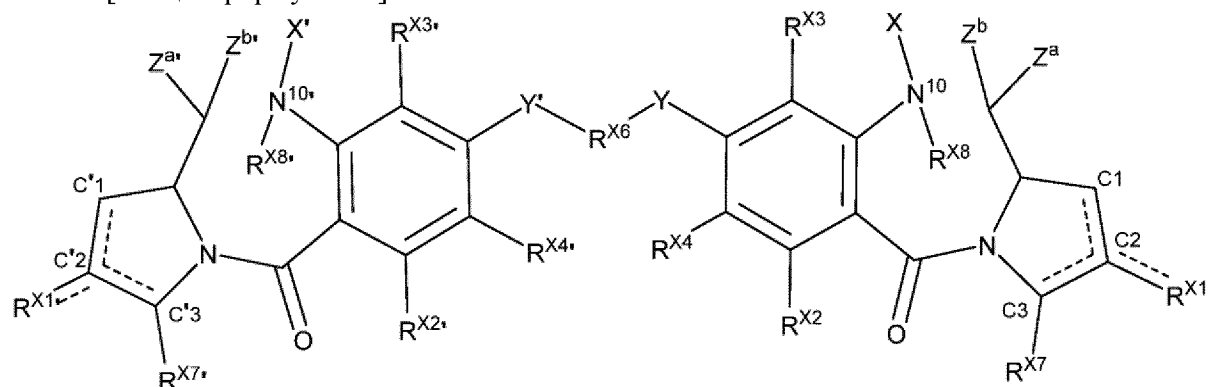
115. Конъюгат антитела по п.114, в котором X и X' каждый независимо представляет собой  $-C(O)O^*$ ,  $-C(O)-^*$  или  $-C(O)NR^X-^*$ .

116. Конъюгат антитела по п.114 или 115, в котором димер пирролобензодиазепина представлен общей формулой X или общей формулой XI ниже:

[Общая формула X]



[Общая формула XI]



где:

пунктирная линия представляет собой необязательную двойную связь, насколько это допустимо валентностью;

$R^{X1}$  и  $R^{X1'}$  независимо выбраны из H, OH, =O, =CH<sub>2</sub>, CN, R<sup>m</sup>, OR<sup>m</sup>, =CH-R<sup>m</sup>, =C(R<sup>m</sup>)<sub>2</sub>, OSO<sub>2</sub>-R<sup>m</sup>, CO<sub>2</sub>R<sup>m</sup>, COR<sup>m</sup>, галогена и дигалогена;

R<sup>m</sup> выбран из R<sup>m</sup>, CO<sub>2</sub>R<sup>m</sup>, COR<sup>m</sup>, CHO, CO<sub>2</sub>H и галогена;

каждый R<sup>m</sup> независимо выбран из C<sub>1-12</sub> алкила, C<sub>2-12</sub> алкенила, C<sub>2-12</sub> алкинила, C<sub>5-20</sub> арила, C<sub>5-20</sub> гетероарила, C<sub>3-6</sub> циклоалкила, 3-7-членного гетероцикла, 3-7-членного гетероциклоалкила и 5-7-гетероарила; или R<sup>m</sup> представляет собой X или X';

$R^{X2}$ ,  $R^{X2'}$ ,  $R^{X3}$ ,  $R^{X3'}$ ,  $R^{X5}$  и  $R^{X5'}$  независимо выбраны из H, R<sup>m</sup>, OH, OR<sup>m</sup>, SH, SR<sup>m</sup>, NH<sub>2</sub>, NHR<sup>m</sup>, NR<sup>m</sup><sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, Me<sub>3</sub>SN и галогена;

$R^{X4}$  и  $R^{X4'}$  независимо выбраны из H, R<sup>m</sup>, OH, OR<sup>m</sup>, SH, SR<sup>m</sup>, NH<sub>2</sub>, NHR<sup>m</sup>, NR<sup>m</sup><sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, Me<sub>3</sub>SN, галогена, C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> алкокси, C<sub>2-6</sub> алкенила, C<sub>2-6</sub> алкинила, C<sub>3-6</sub> циклоалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила, C<sub>5-12</sub> арила, 5-7-гетероарила, -CN, -NCO, -OR<sup>n</sup>, -OC(O)R<sup>n</sup>, -OC(O)NR<sup>n</sup>R<sup>n</sup>, -OS(O)R<sup>n</sup>, -OS(O)<sub>2</sub>R<sup>n</sup>, -SR<sup>n</sup>, -S(O)R<sup>n</sup>, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>n</sup>, -S(O)NR<sup>n</sup>R<sup>n</sup>, -

$S(O)_2NR^nR^m$ ,  $-OS(O)NR^nR^m$ ,  $-OS(O)_2NR^nR^m$ ,  $-NR^nR^m$ ,  $-NR^nC(O)R^o$ ,  $-NR^nC(O)OR^o$ ,  $-NR^nC(O)NR^oR^o$ ,  $-NR^nS(O)R^o$ ,  $-NR^nS(O)_2R^o$ ,  $-NR^nS(O)NR^oR^o$ ,  $-NR^nS(O)_2NR^oR^o$ ,  $-C(O)R^n$ ,  $-C(O)OR^n$  и  $-C(O)NR^nR^m$ ;

$R^X$  и  $R^{X'}$  каждый независимо выбран из H, OH,  $N_3$ , CN,  $NO_2$ , SH,  $NH_2$ ,  $ONH_2$ ,  $NHNH_2$ , галогена,  $C_{1-8}$  алкила,  $C_{3-8}$  циклоалкила,  $C_{1-8}$  алкокси,  $C_{1-8}$  алкилтио,  $C_{3-20}$  гетероарила,  $C_{5-20}$  арила или моно- или ди- $C_{1-8}$  алкиламино;

Y и Y' каждый независимо выбран из O, S и N(H);

каждый  $R^{X6}$  независимо выбран из  $C_{3-12}$  алкилена,  $C_{3-12}$  алкенилена или  $C_{3-12}$  гетероалкилена;

$R^{X7}$  и  $R^{X7'}$  независимо выбраны из H,  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{2-6}$  алкенила,  $C_{2-6}$  алкинила,  $C_{3-6}$  циклоалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила,  $C_{6-10}$  арила, 5-7-гетероарила,  $-OR^r$ ,  $-OC(O)R^r$ ,  $-OC(O)NR^rR^r$ ,  $-OS(O)R^r$ ,  $-OS(O)_2R^r$ ,  $-SR^r$ ,  $-S(O)R^r$ ,  $-S(O)_2R^r$ ,  $-S(O)NR^rR^r$ ,  $-S(O)_2NR^rR^r$ ,  $-OS(O)NR^rR^r$ ,  $-OS(O)_2NR^rR^r$ ,  $-NR^rR^r$ ,  $-NR^rC(O)R^s$ ,  $-NR^rC(O)OR^s$ ,  $-NR^rC(O)NR^sR^s$ ,  $-NR^rS(O)R^s$ ,  $-NR^rS(O)_2R^s$ ,  $-NR^rS(O)NR^sR^s$ ,  $-NR^rS(O)_2NR^sR^s$ ,  $-C(O)R^r$ ,  $-C(O)OR^s$  или  $-C(O)NR^rR^r$ ;

каждый  $R^r$ ,  $R^s$  и  $R^{s'}$  независимо выбран из H,  $C_{1-7}$  алкила,  $C_{2-7}$  алкенила,  $C_{2-7}$  алкинила,  $C_{3-13}$  циклоалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила,  $C_{5-10}$  арила и 5-7-гетероарила;

каждый  $R^{X8}$  и  $R^{X8'}$  независимо выбран из H,  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{2-6}$  алкенила,  $C_{2-6}$  алкинила,  $C_{3-6}$  гетероалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила,  $C_{5-10}$  арила, 5-7-гетероарила,  $-S(O)R^m$ ,  $-S(O)_2R^m$ ,  $-S(O)NR^mR^m$ ,  $-S(O)_2NR^mR^m$ ,  $-NR^mR^m$ ,  $-NR^mC(O)R^m$ ,  $NR^mC(O)OR^n$ ,  $-NR^mC(O)NR^nR^n$ ,  $-NR^mS(O)R^n$ ,  $-NR^mS(O)_2R^n$ ,  $-NR^mS(O)NR^nR^n$ ,  $-NR^mS(O)_2NR^nR^n$ ,  $-C(O)R^m$ ,  $-C(O)OR^m$  и  $-C(O)NR^mR^m$ ;

$Z^a$  выбран из  $OR^{X12a}$ ,  $NR^{X12a}R^{X12a}$  или  $SR^{X12a}$ ;

$Z^b$  выбран из  $OR^{X13a}$ ,  $NR^{X13a}R^{X13a}$  или  $SR^{X13a}$ ;

$Z^{a'}$  выбран из  $OR^{X12a'}$ ,  $NR^{X12a'}R^{X12a'}$  или  $SR^{X12a'}$ ;

$Z^{b'}$  выбран из  $OR^{X13a'}$ ,  $NR^{X13a'}R^{X13a'}$  или  $SR^{X13a'}$ ;

каждый  $R^{X12a}$ ,  $R^{X12a'}$ ,  $R^{X13a}$  и  $R^{X13a'}$  независимо выбран из H,  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{2-6}$  алкенила,  $C_{2-6}$  алкинила,  $C_{3-6}$  циклоалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила,  $C_{5-10}$  арила, 5-7-гетероарила,  $-C(O)R^{X15a}$ ,  $-C(O)OR^{X15a}$  и  $-C(O)NR^{X15a}R^{X15a'}$ ;

каждый  $R^{X15a}$  и  $R^{X15a'}$  независимо выбран из  $C_{1-12}$  алкила,  $C_{2-12}$  алкенила,  $C_{2-12}$  алкинила,  $C_{5-20}$  арил, а  $C_{5-20}$  гетероарила,  $C_{3-6}$  циклоалкила, 3-7-членного гетероциклила, 3-7-членного гетероциклоалкила и 5-7-гетероарила;

каждый  $R^{X13a}$  и  $R^{X14a}$  независимо представляет собой H или алкил; или  $R^{X13a}$  и  $R^{X14a}$ , вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют 3-7-членный гетероциклил, образуют 3-7-членный гетероциклоалкил или образуют 3-7-членный гетероарил, и  $R^{X13a'}$  и  $R^{X14a'}$  произвольно связаны с атомами, к которым они присоединены, с образованием 3-7-членного гетероциклила, 3-7-членного гетероциклоалкила или 3-7-членного гетероарила; и

каждый of  $R^n$ ,  $R^{n'}$ ,  $R^o$ ,  $R^{o'}$ ,  $R^p$  и  $R^{p'}$  независимо выбран из H,  $C_{1-7}$  алкила,  $C_{2-7}$

алкенила, C<sub>2-7</sub> алкинила, C<sub>3-13</sub> циклоалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила, C<sub>5-10</sub> арила и 5-7-гетероарила.

117. Конъюгат антитела по п.116, в котором:

R<sup>m</sup> независимо выбран из C<sub>1-12</sub> алкила, C<sub>2-12</sub> алкенила, C<sub>2-12</sub> алкинила, C<sub>5-20</sub> арила, C<sub>5-20</sub> гетероарила, C<sub>3-6</sub> циклоалкила, 3-7-членного гетероциклила, 3-7-членного гетероциклоалкила и 5-7-гетероарила; и

R<sup>m</sup> представляет собой замещенный C<sub>1-12</sub> алкил, C<sub>2-12</sub> алкенил, C<sub>2-12</sub> алкинил, C<sub>5-20</sub> арил, C<sub>5-20</sub> гетероарил, C<sub>3-6</sub> циклоалкил, 3-7-членный гетероциклил, 3-7-членный гетероциклоалкил или 5-7-гетероарил.

118. Конъюгат антитела по п.116 или 117, в котором:

R<sup>X4</sup> и R<sup>X4'</sup> независимо выбраны из H, R<sup>m</sup>, OH, OR<sup>m</sup>, SH, SR<sup>m</sup>, NH<sub>2</sub>, NHR<sup>m</sup>, NR<sup>m</sup>R<sup>m</sup>, NO<sub>2</sub>, Me<sub>3</sub>SN, галогена, C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> алкокси, C<sub>2-6</sub> алкенила, C<sub>2-6</sub> алкинила, C<sub>3-6</sub> циклоалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила, C<sub>5-12</sub> 5-7-гетероарила, -CN, -NCO, -OR<sup>n</sup>, -OC(O)R<sup>n</sup>, -OC(O)NR<sup>n</sup>R<sup>n</sup>, -OS(O)R<sup>n</sup>, -OS(O)<sub>2</sub>R<sup>n</sup>, -SR<sup>n</sup>, -S(O)R<sup>n</sup>, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>n</sup>, -S(O)NR<sup>n</sup>R<sup>n</sup>, -S(O)<sub>2</sub>NR<sup>n</sup>R<sup>n</sup>, -OS(O)NR<sup>n</sup>R<sup>n</sup>, -OS(O)<sub>2</sub>NR<sup>n</sup>R<sup>n</sup>, -NR<sup>n</sup>R<sup>n</sup>, -NR<sup>n</sup>C(O)R<sup>o</sup>, -NR<sup>n</sup>C(O)OR<sup>o</sup>, -NR<sup>n</sup>C(O)NR<sup>o</sup>R<sup>o</sup>, -NR<sup>n</sup>S(O)R<sup>o</sup>, -NR<sup>n</sup>S(O)<sub>2</sub>R<sup>o</sup>, -NR<sup>n</sup>S(O)NR<sup>o</sup>R<sup>o</sup>, -NR<sup>n</sup>S(O)<sub>2</sub>NR<sup>o</sup>R<sup>o</sup>, -C(O)R<sup>n</sup>, -C(O)OR<sup>n</sup> и -C(O)NR<sup>n</sup>R<sup>n</sup>; и

R<sup>X4</sup> или R<sup>X4'</sup> представляет собой C<sub>1-6</sub> алкил, C<sub>1-6</sub> алкокси, C<sub>2-6</sub> алкенил, C<sub>2-6</sub> алкинил, C<sub>3-6</sub> циклоалкил, 3-7-членный гетероциклоалкил, C<sub>5-12</sub> арил или 5-7-гетероарил, и дополнительно замещен, по меньшей мере одним C<sub>1-6</sub> алкилом, C<sub>1-6</sub> алкокси, C<sub>2-6</sub> алкенилом, C<sub>2-6</sub> алкинилом, C<sub>3-6</sub> циклоалкилом, 3-7-членным гетероциклоалкилом, C<sub>5-10</sub> арилом, 5-7-гетероарилом, -OR<sup>p</sup>, -OC(O)R<sup>p</sup>, -C(O)NR<sup>p</sup>R<sup>p</sup>, -OS(O)R<sup>p</sup>, -OS(O)<sub>2</sub>R<sup>p</sup>, -SR<sup>p</sup>, -S(O)R<sup>p</sup>, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>p</sup>, -S(O)NR<sup>p</sup>R<sup>p</sup>, -S(O)<sub>2</sub>NR<sup>p</sup>R<sup>p</sup>, -OS(O)NR<sup>p</sup>R<sup>p</sup>, -OS(O)<sub>2</sub>NR<sup>p</sup>R<sup>p</sup>, -NR<sup>p</sup>R<sup>p</sup>, -NR<sup>p</sup>C(O)R<sup>q</sup>, -NR<sup>p</sup>C(O)OR<sup>q</sup>, -NR<sup>p</sup>C(O)NR<sup>q</sup>R<sup>q</sup>, -NR<sup>p</sup>S(O)R<sup>q</sup>, -NR<sup>p</sup>S(O)<sub>2</sub>R<sup>q</sup>, -NR<sup>p</sup>S(O)NR<sup>q</sup>R<sup>q</sup>, -NR<sup>p</sup>S(O)<sub>2</sub>NR<sup>q</sup>R<sup>q</sup>, -C(O)R<sup>p</sup>, -C(O)OR<sup>p</sup> или -C(O)NR<sup>p</sup>R<sup>p</sup>.

119. Конъюгат антитела по любому из пп. 116-118, в котором:

R<sup>X7</sup> и R<sup>X7'</sup> независимо выбраны из H, C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>2-6</sub> алкенила, C<sub>2-6</sub> алкинила, C<sub>3-6</sub> циклоалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила, C<sub>6-10</sub> арила, 5-7-гетероарила, -OR<sup>r</sup>, -OC(O)R<sup>r</sup>, -OC(O)NR<sup>r</sup>R<sup>r</sup>, -OS(O)R<sup>r</sup>, -OS(O)<sub>2</sub>R<sup>r</sup>, -SR<sup>r</sup>, -S(O)R<sup>r</sup>, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>r</sup>, -S(O)NR<sup>r</sup>R<sup>r</sup>, -S(O)<sub>2</sub>NR<sup>r</sup>R<sup>r</sup>, -OS(O)NR<sup>r</sup>R<sup>r</sup>, -OS(O)<sub>2</sub>NR<sup>r</sup>R<sup>r</sup>, -NR<sup>r</sup>R<sup>r</sup>, -NR<sup>r</sup>C(O)R<sup>s</sup>, -NR<sup>r</sup>C(O)OR<sup>s</sup>, -NR<sup>r</sup>C(O)NR<sup>s</sup>R<sup>s</sup>, -NR<sup>r</sup>S(O)R<sup>s</sup>, -NR<sup>r</sup>S(O)<sub>2</sub>R<sup>s</sup>, -NR<sup>r</sup>S(O)NR<sup>s</sup>R<sup>s</sup>, -NR<sup>r</sup>S(O)<sub>2</sub>NR<sup>s</sup>R<sup>s</sup>, -C(O)R<sup>r</sup>, -C(O)OR<sup>s</sup> или -C(O)NR<sup>r</sup>R<sup>r</sup>;

R<sup>X7</sup> и R<sup>X7'</sup> представляют собой C<sub>1-6</sub> алкил, C<sub>2-6</sub> алкенил, C<sub>2-6</sub> алкинил, C<sub>3-6</sub> циклоалкил, 3-7-членный гетероциклоалкил, C<sub>6-10</sub> арил или 5-7-гетероарил, и дополнительно, C<sub>1-6</sub> алкил, C<sub>2-6</sub> алкенил, C<sub>2-6</sub> алкинил, C<sub>3-6</sub> циклоалкил, 3-7-членный гетероциклоалкил, C<sub>6-10</sub> арил или 5-7-гетероарил, -OR<sup>t</sup>, -OC(O)R<sup>t</sup>, -OC(O)NR<sup>t</sup>R<sup>t</sup>, -OS(O)R<sup>t</sup>, -OS(O)<sub>2</sub>R<sup>t</sup>, -SR<sup>t</sup>, -S(O)R<sup>t</sup>, -S(O)<sub>2</sub>R<sup>t</sup>, -S(O)NR<sup>t</sup>R<sup>t</sup>, -S(O)<sub>2</sub>NR<sup>t</sup>R<sup>t</sup>, -OS(O)NR<sup>t</sup>R<sup>t</sup>, -OS(O)<sub>2</sub>NR<sup>t</sup>R<sup>t</sup>, -NR<sup>t</sup>R<sup>t</sup>, -NR<sup>t</sup>C(O)R<sup>u</sup>, -NR<sup>t</sup>C(O)OR<sup>u</sup>, -NR<sup>t</sup>C(O)NR<sup>u</sup>R<sup>u</sup>, -NR<sup>t</sup>S(O)R<sup>u</sup>, -NR<sup>t</sup>S(O)<sub>2</sub>R<sup>u</sup>, -NR<sup>t</sup>S(O)NR<sup>u</sup>R<sup>u</sup>, -NR<sup>t</sup>S(O)<sub>2</sub>NR<sup>u</sup>R<sup>u</sup>, -C(O)R<sup>t</sup>, -C(O)OR<sup>t</sup> или -C(O)NR<sup>t</sup>R<sup>t</sup>; и

R<sup>r</sup>, R<sup>r'</sup>, R<sup>s</sup>, R<sup>s'</sup>, R<sup>t</sup>, R<sup>t'</sup>, R<sup>u</sup> и R<sup>u'</sup> каждый независимо выбран из H, C<sub>1-7</sub> алкила, C<sub>2-7</sub>

алкенила,  $C_{2-7}$  алкинила,  $C_{3-13}$  циклоалкила, 3-7-членного гетероциклоалкила,  $C_{5-10}$  арила и 5-7-гетероарила.

120. Конъюгат антитела по любому из пп. 116-119, в котором  $R^{X1}$  и  $R^{X1'}$  оба представляют собой  $R^m$ , и  $R^m$  представляет собой  $C_{1-6}$  алкил,  $C_{2-6}$  алкенил,  $C_{5-7}$  арил или  $C_{3-6}$  гетероарил.

121. Конъюгат антитела по любому из пп. 116-120, в котором каждый из  $R^{X2}$ ,  $R^{X2'}$ ,  $R^{X3}$ ,  $R^{X3'}$ ,  $R^{X5}$  и  $R^{X5'}$ , независимо выбраны из Н или ОН.

122. Конъюгат антитела по любому из пп. 116-121, в котором  $R^{X4}$  и  $R^{X4'}$  оба представляют собой  $R^m$ , и  $R^m$  представляет собой  $C_{1-6}$  алкокси.

123. Конъюгат антитела по любому из пп. 116-122, в котором  $R^{X4}$  и  $R^{X4'}$  каждый независимо выбран из метокси, этокси и бутокси.

124. Конъюгат антитела по любому из пп. 116-123, в котором Y и Y' представляют собой О.

125. Конъюгат антитела по любому из пп. 116-124, в котором:

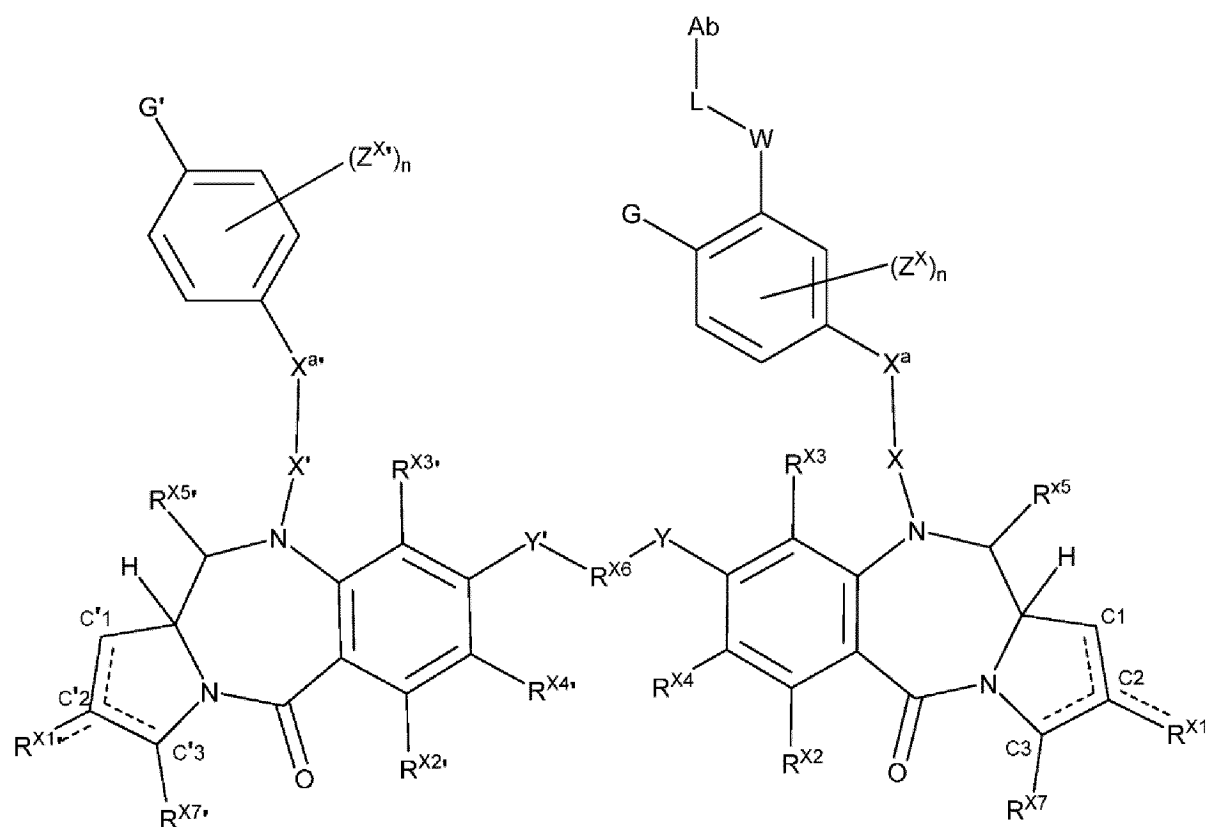
$R^{X6}$  представляет собой  $C_{3-12}$  алкилен,  $C_{3-12}$  алкенилен или  $C_{3-12}$  гетероалкилен, где  $R^{X6}$  замещен  $-NH_2$ ,  $-NHR^m$ ,  $-NHC(O)R^m$ ,  $-NHC(O)R^m$ ,  $-NHC(O)CH_2-[OCH_2CH_2]_n-R^{XX}$  или  $-[CH_2CH_2O]_n-R^{XX}$ ;

$R^{XX}$  представляет собой Н, ОН,  $N_3$ , CN,  $NO_2$ , SH,  $NH_2$ ,  $ONH_2$ ,  $NHNNH_2$ , галоген,  $C_{1-8}$  алкил,  $C_{3-8}$  циклоалкил,  $C_{1-8}$  алкокси,  $C_{1-8}$  алкилтио,  $C_{3-20}$  гетероарил,  $C_{5-20}$  арил или моно- или ди- $C_{1-8}$  алкил amino; и

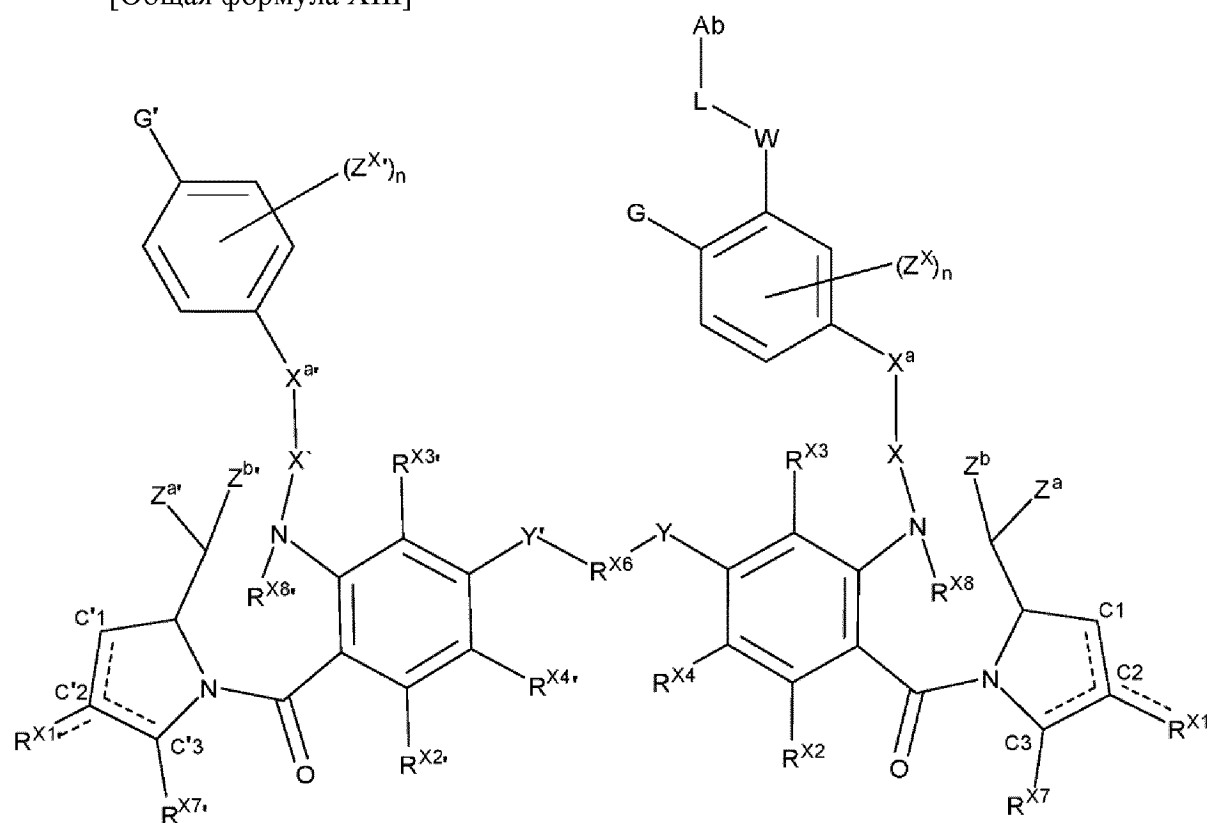
n представляет собой целое число 1-6.

126. Конъюгат антитела по любому из пп. 1-125, в котором активный агент имеет структуру, представленную общей формулой XII или общей формулой XIII;

[Общая формула XII]



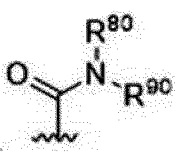
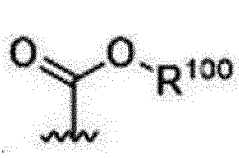
[Общая формула XIII]



где

$X^a$  и  $X^{a'}$  каждый независимо представляет собой связь или  $C_{1-6}$  алкилен;

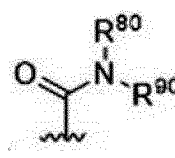
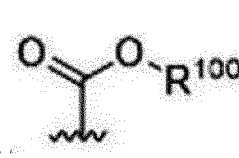
$Z^{X'}$  и  $Z^X$  каждый независимо выбран из водорода,  $C_{1-8}$  алкила, галогена, циано,

нитро, ,  и  $-(CH_2)_m-OCH_3$ ;

каждый  $R^{80}$ ,  $R^{90}$  и  $R^{100}$  независимо выбран из водорода,  $C_{1-8}$  алкила,  $C_{2-6}$  алкенила и  $C_{1-6}$  алкокси; и

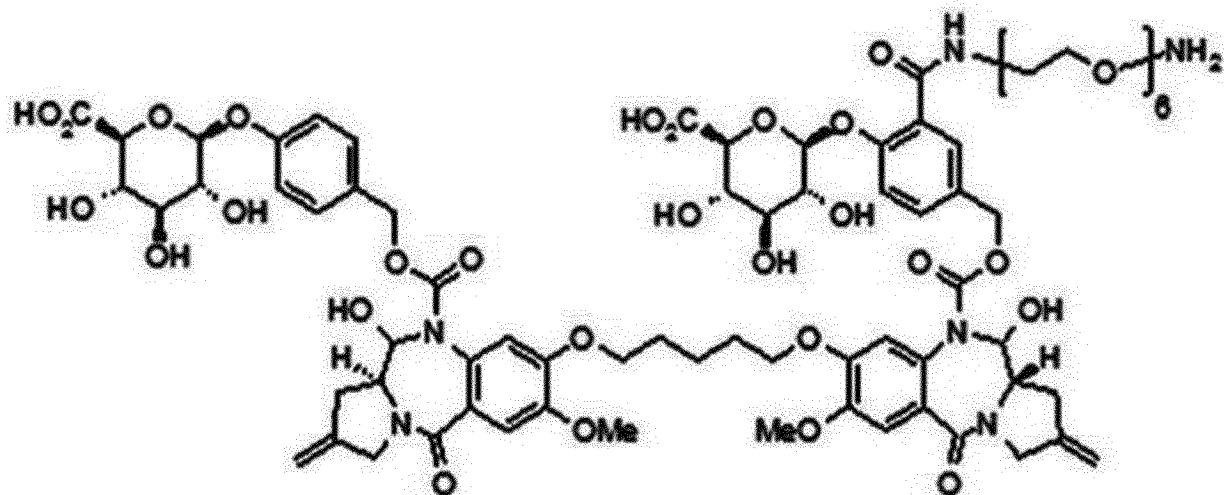
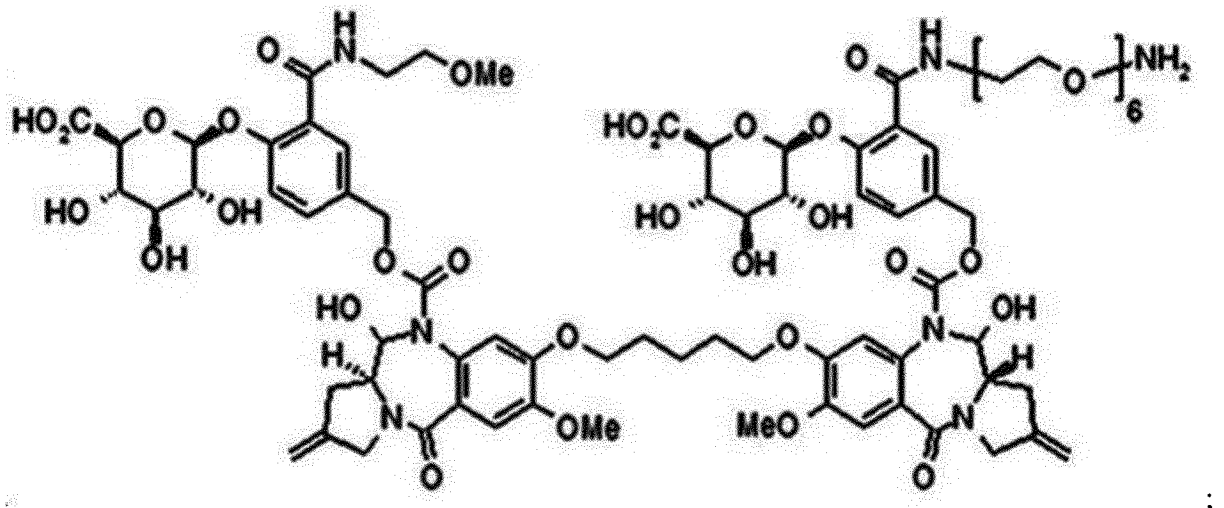
$m$  представляет собой целое число 0-12.

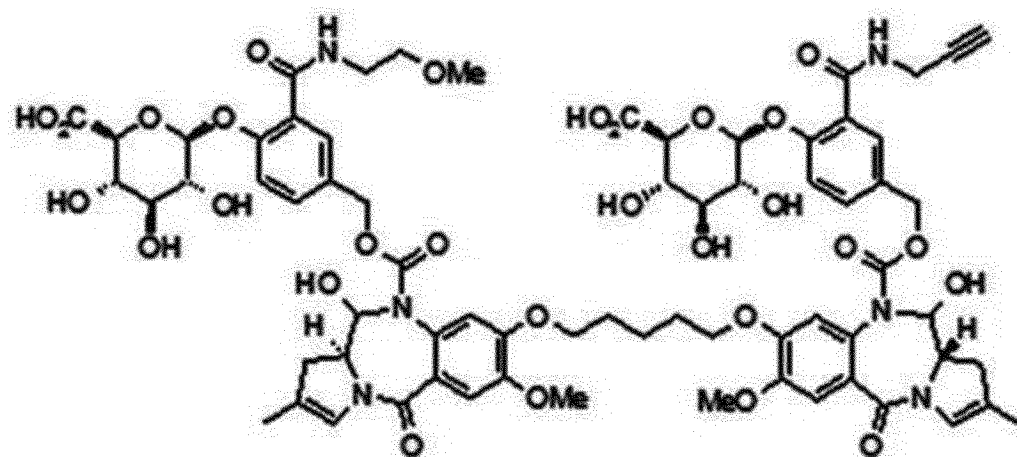
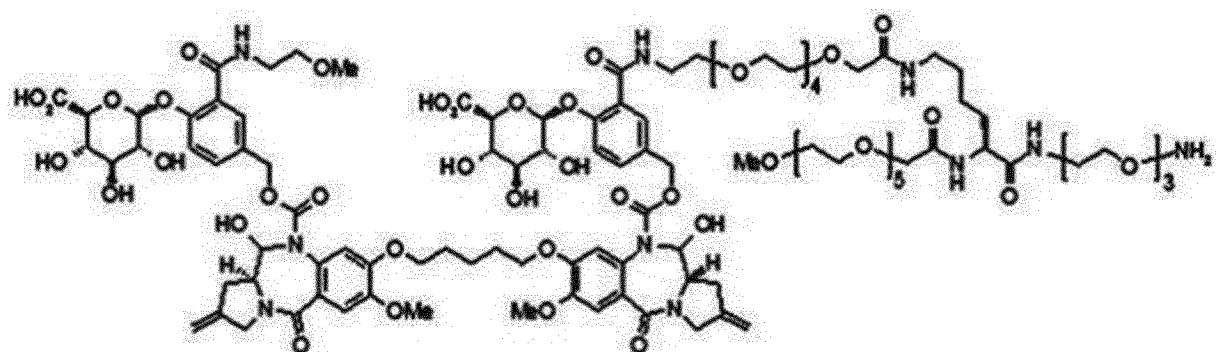
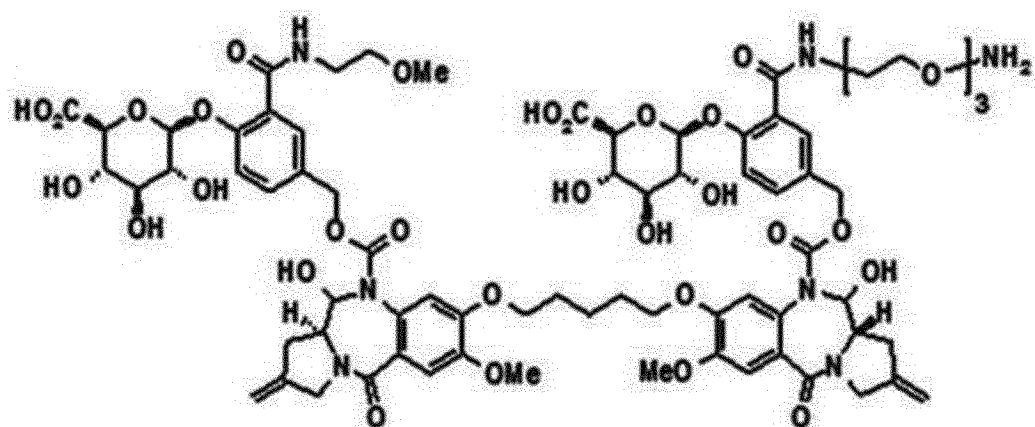
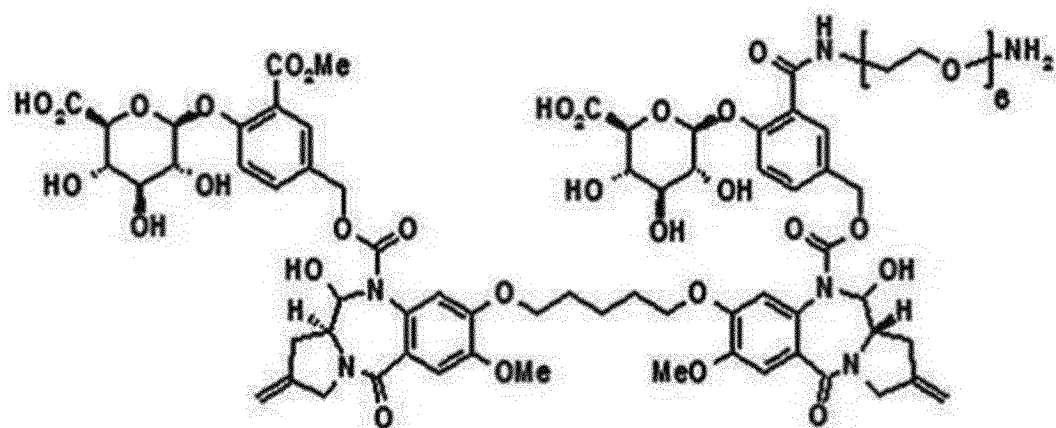
127. Конъюгат антитела по любому из пп. 116-126, в котором  $Z^{X'}$  и  $Z^X$  каждый

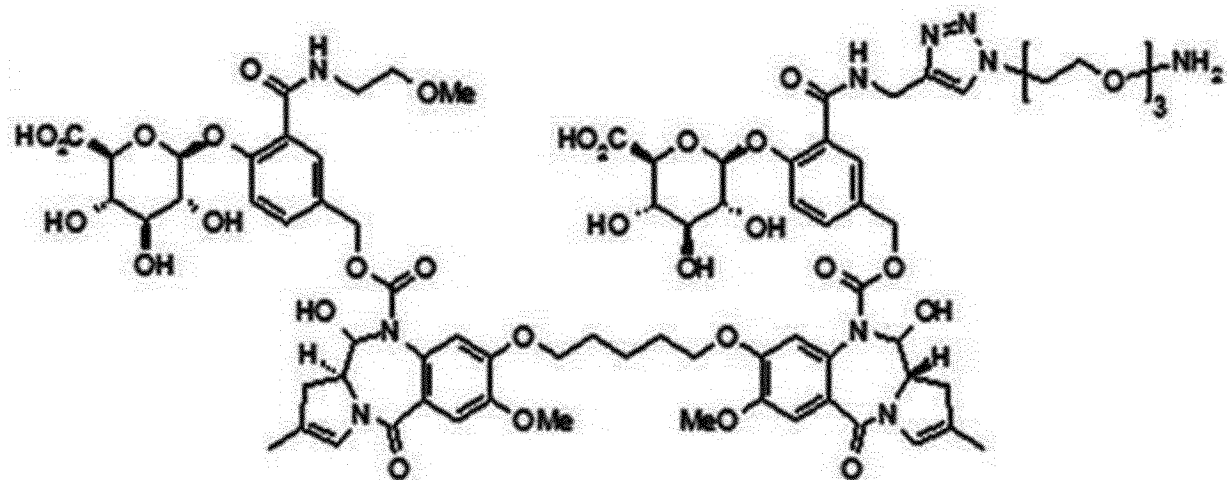
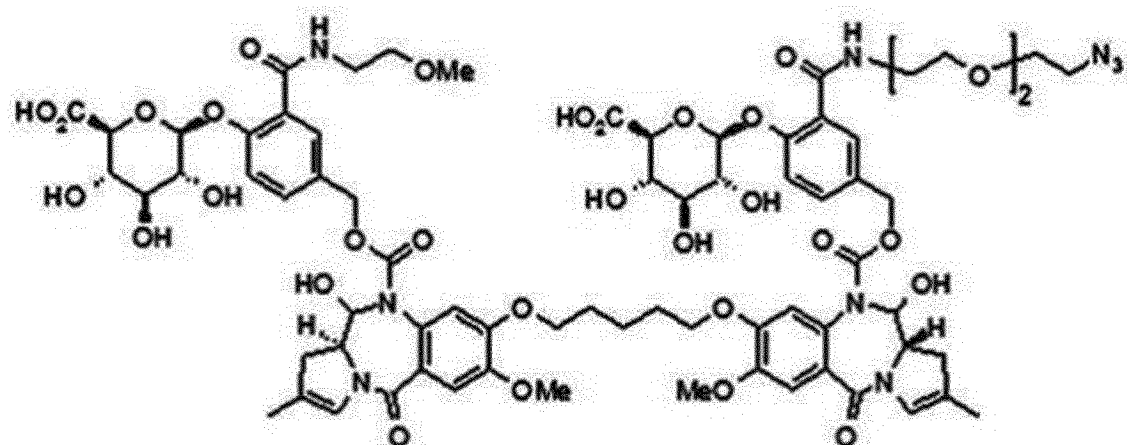
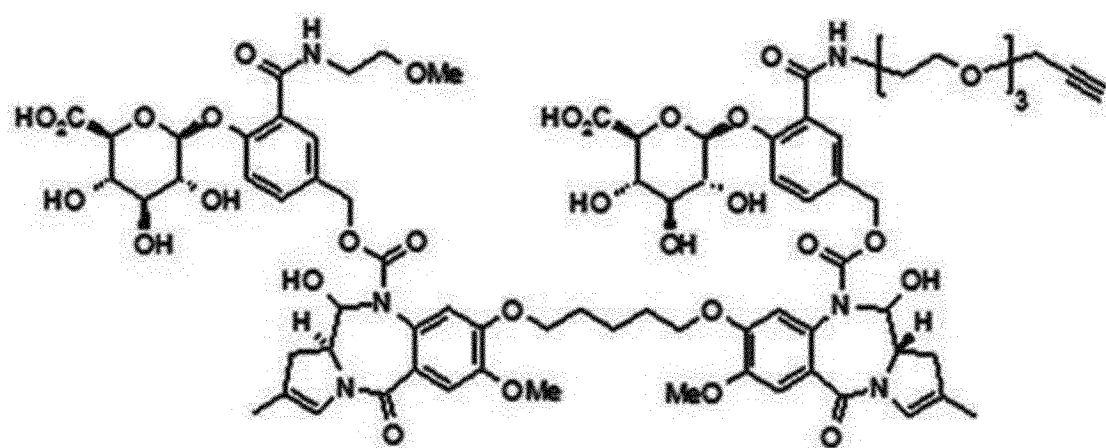
независимо выбран из водорода, ,  и  $-(CH_2)_m-OCH_3$ ;

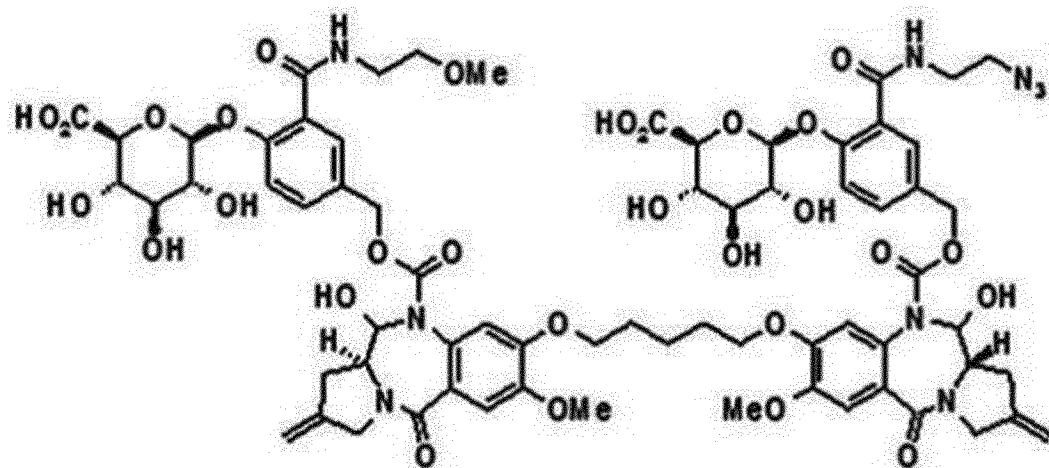
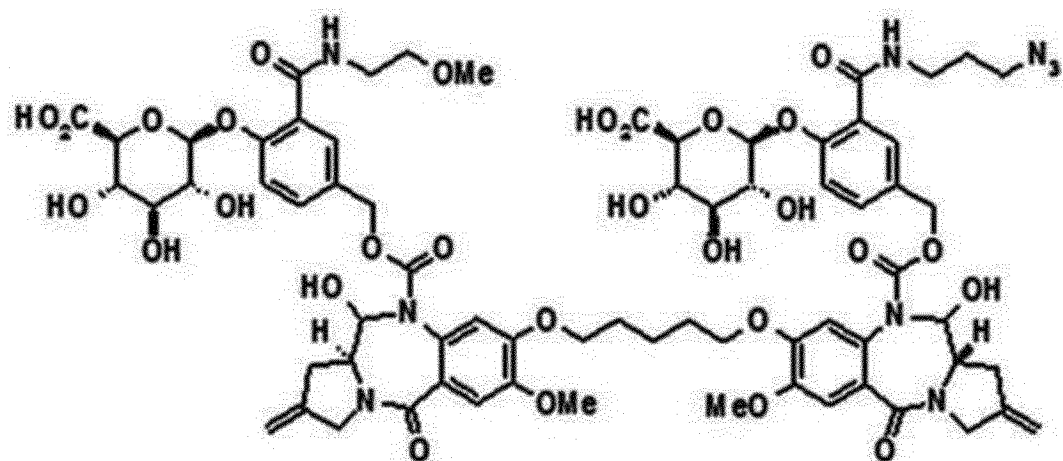
$R^{80}$ ,  $R^{90}$  и  $R^{100}$  каждый независимо выбран из водорода,  $C_{1-3}$  алкила и  $C_{1-3}$  алкокси; и  $m$  представляет собой целое число 1-6.

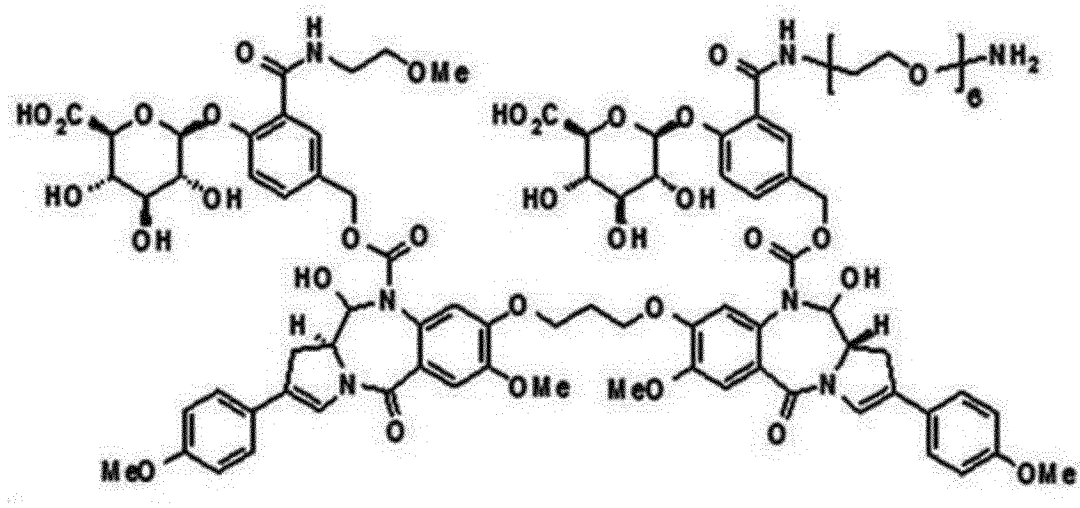
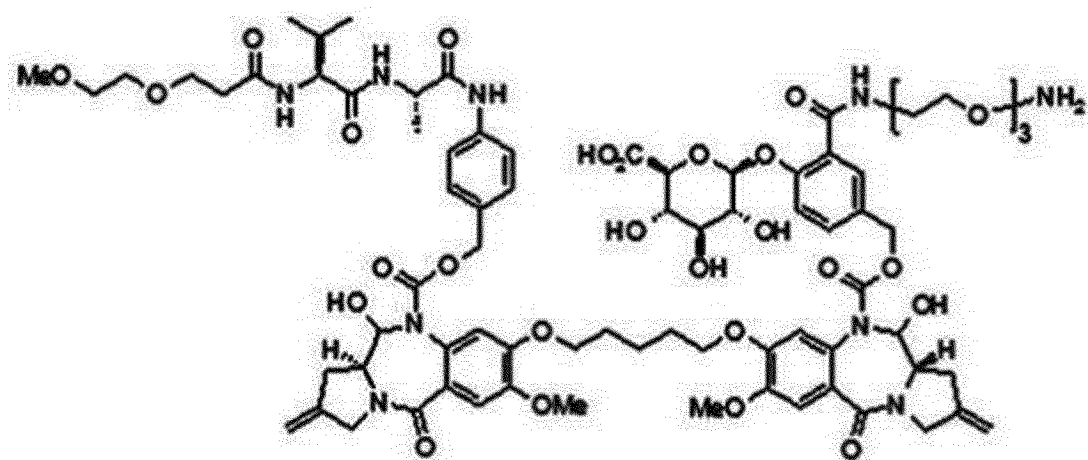
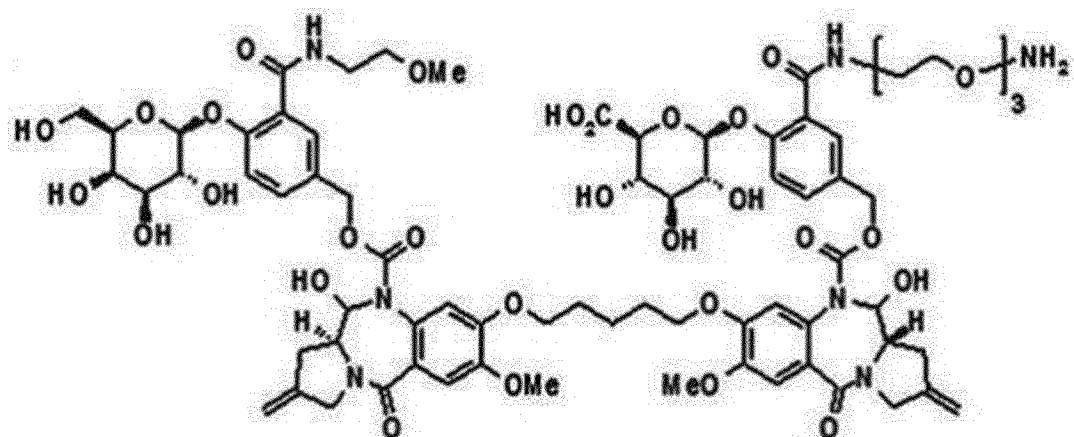
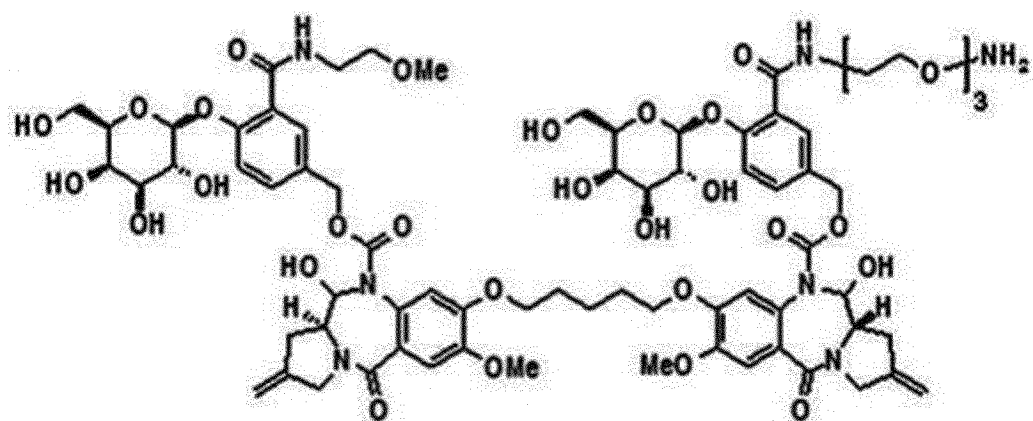
128. Конъюгат антитела по любому из пп. 1-127, в котором активный агент выбран из

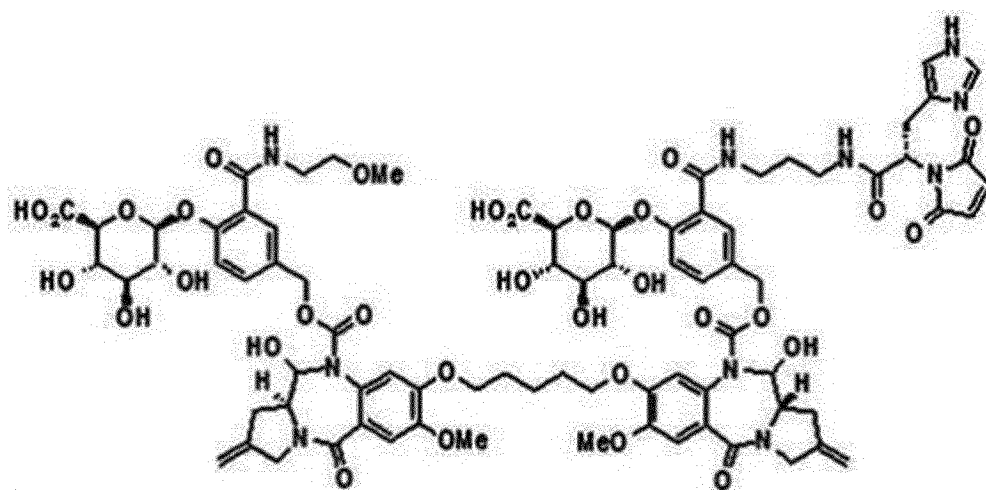
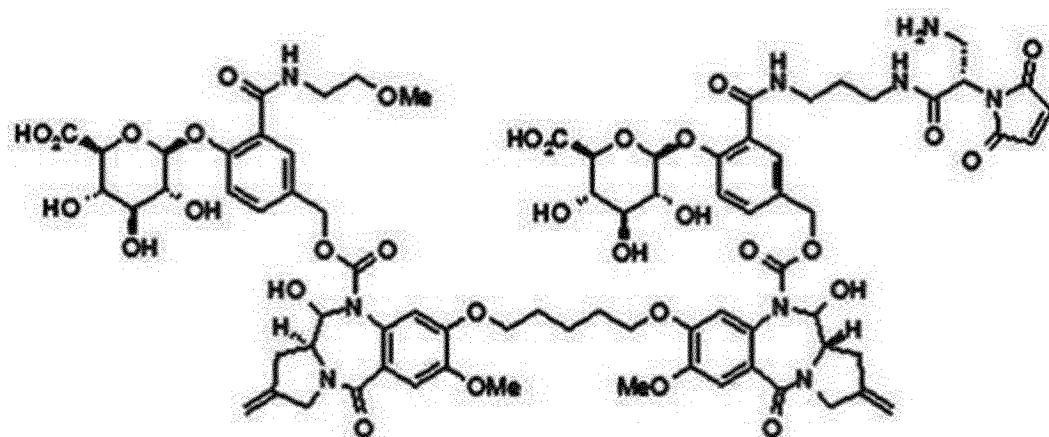
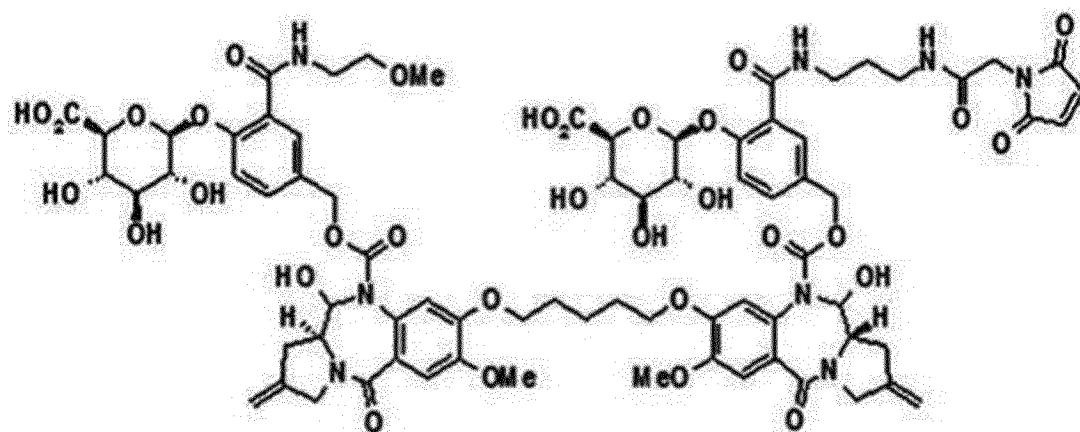


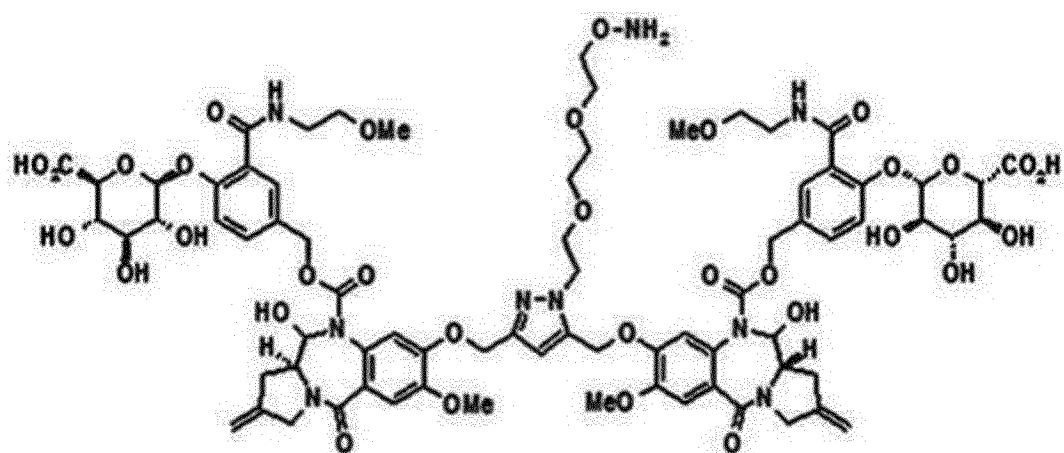
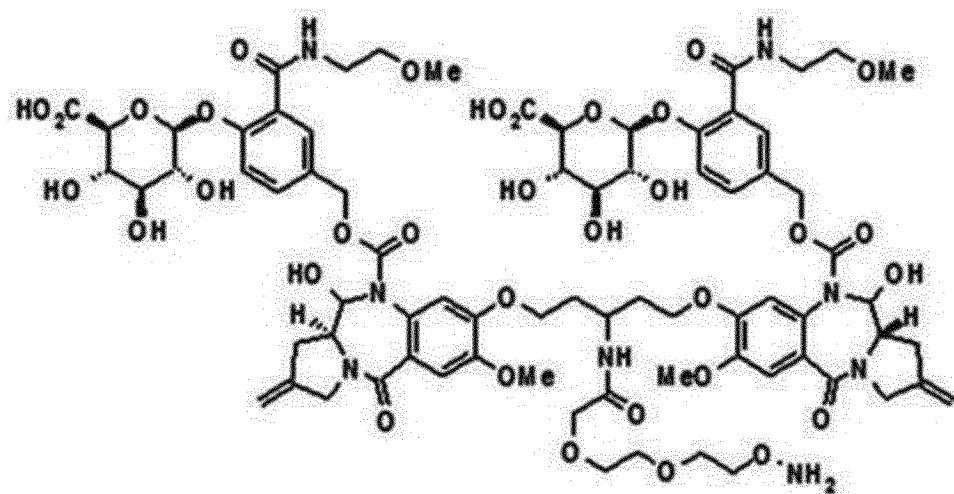
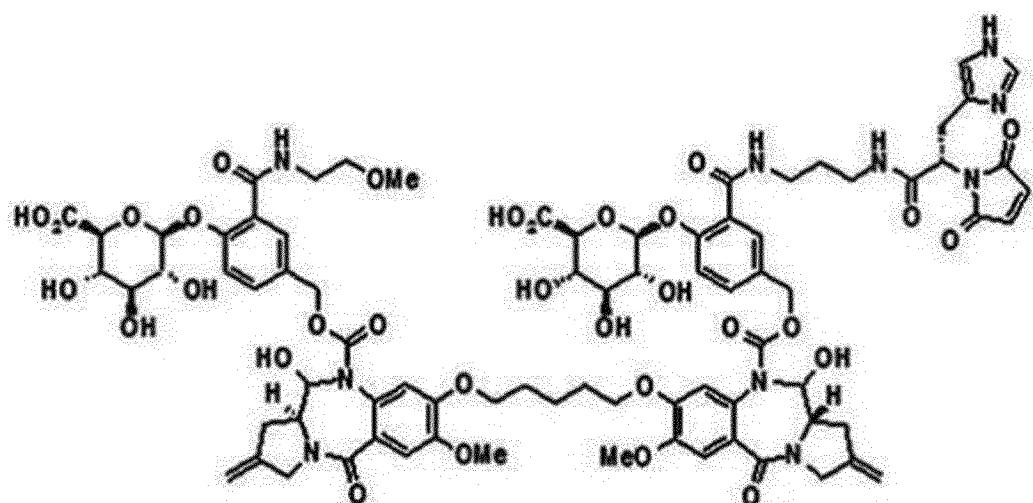


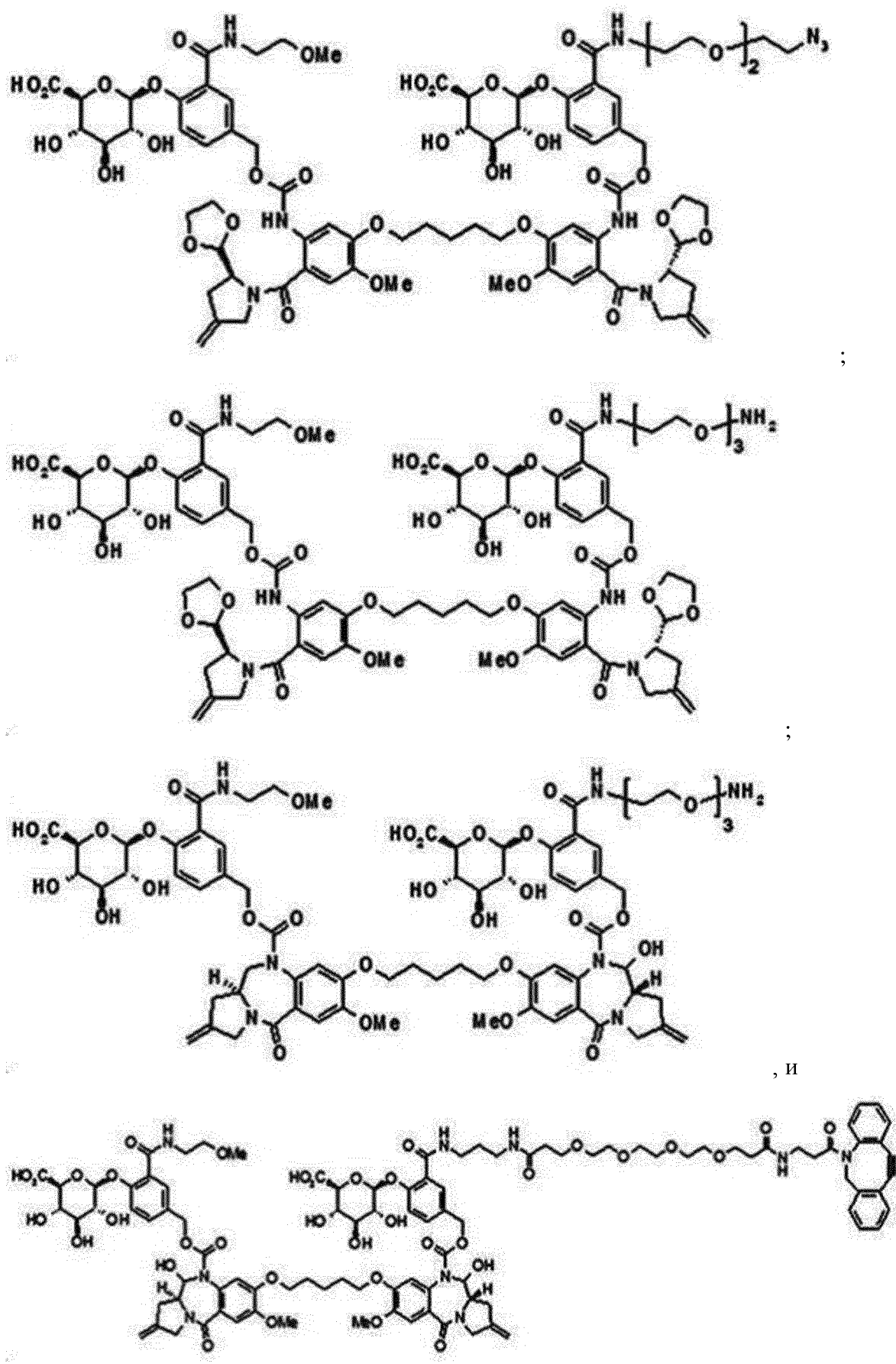








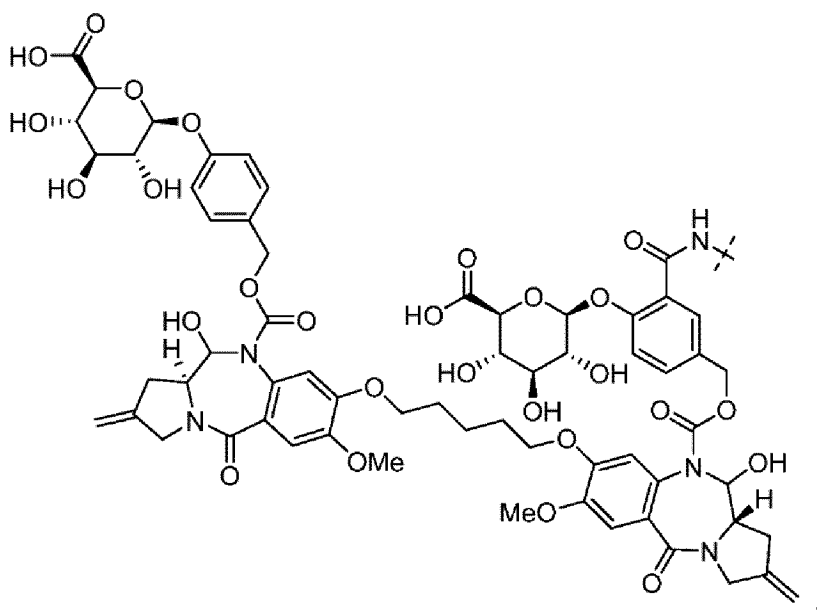
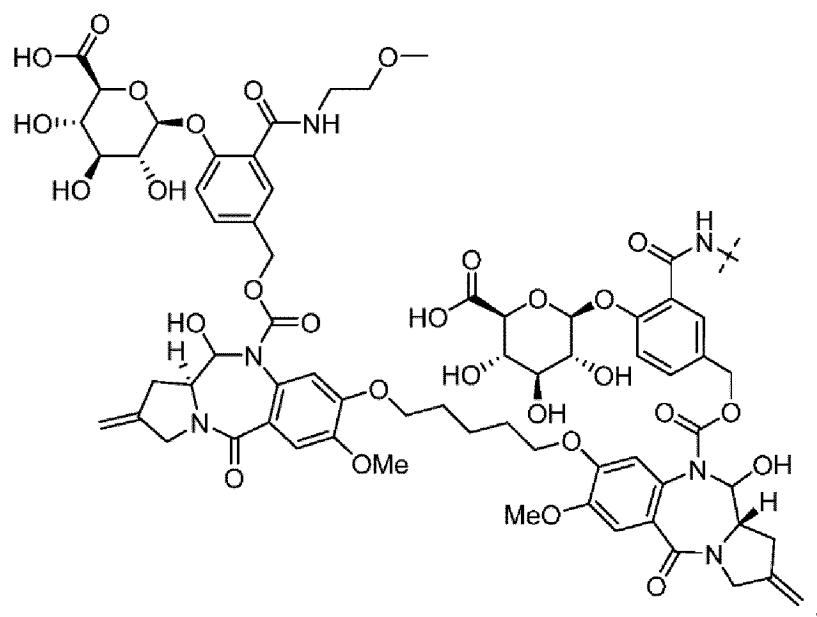


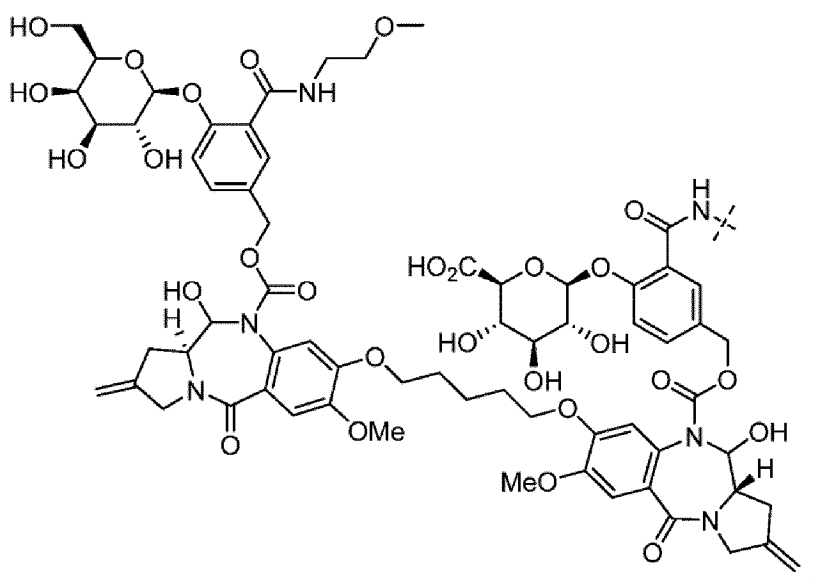
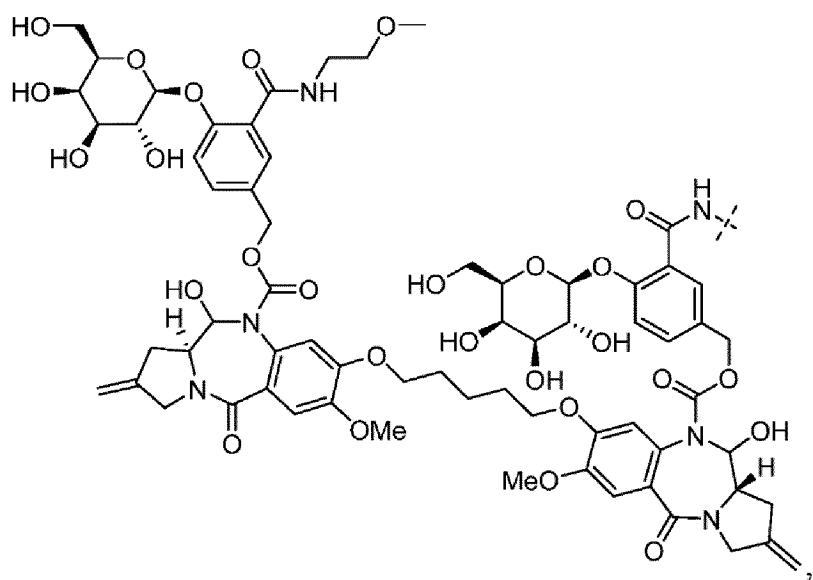
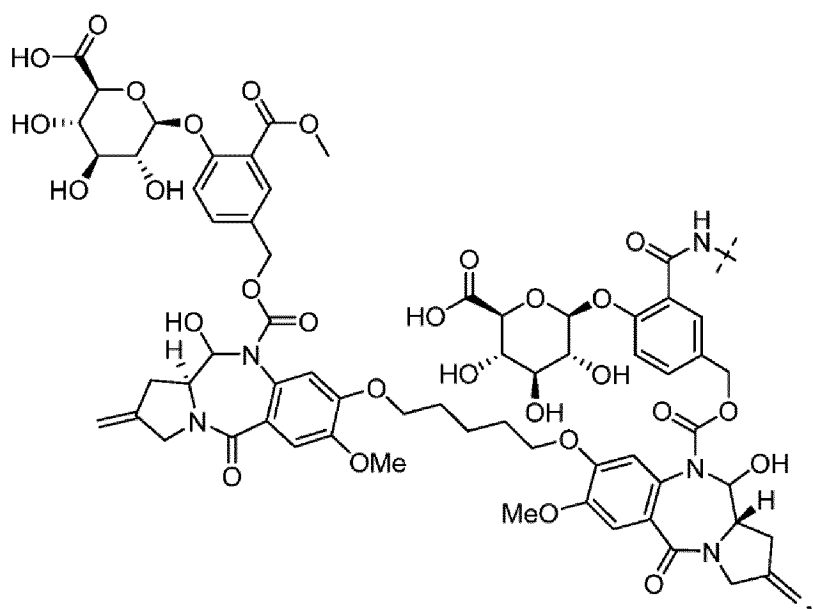


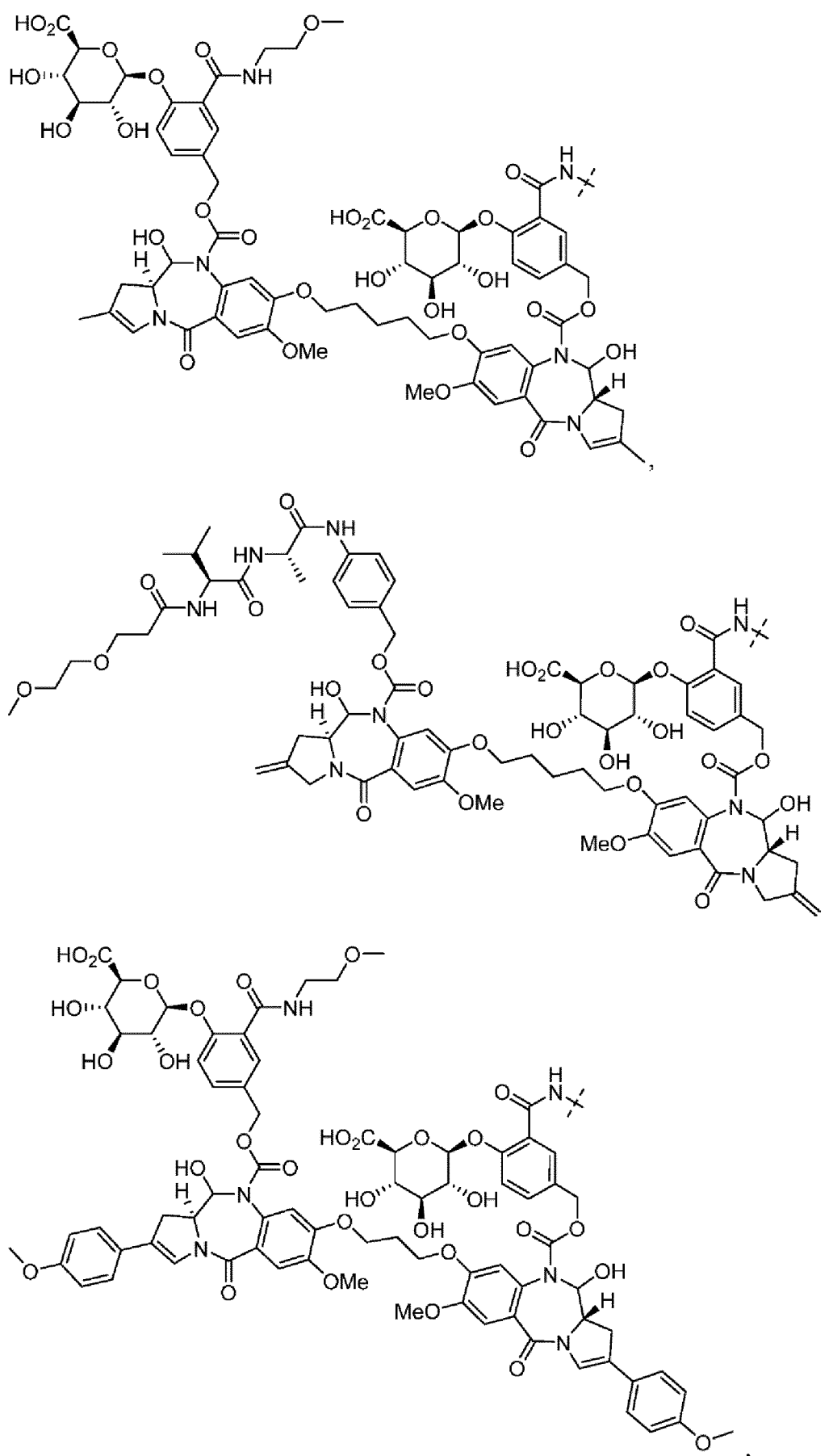
или его фармацевтически приемлемой соли.

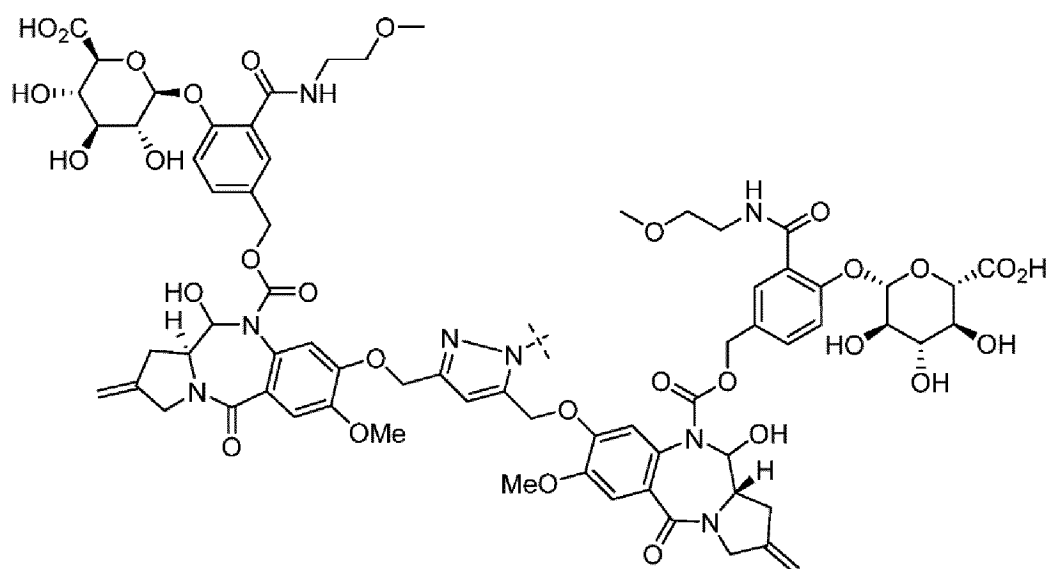
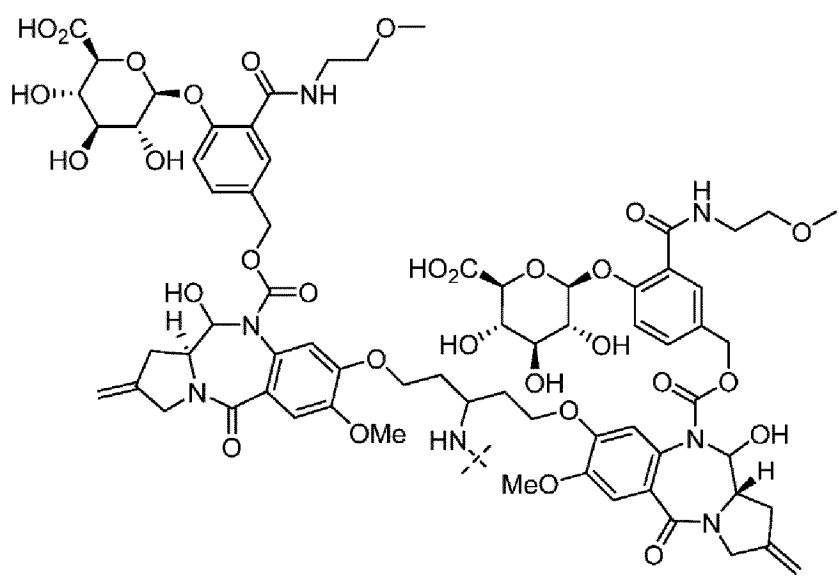
129. Конъюгат антитела по любому из пп. 1-127, в котором активный агент выбран

из:

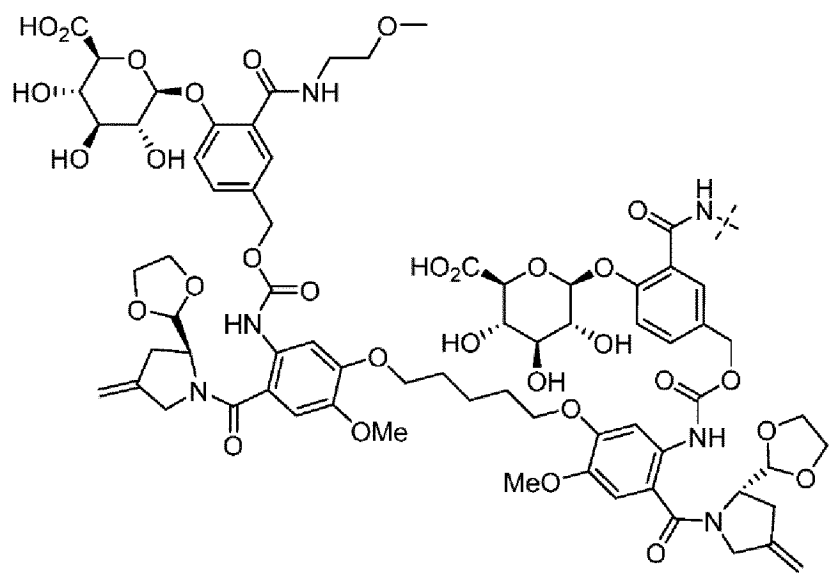








и



или их фармацевтически приемлемой соли; и

связь, наложенная с пунктирной линией, представляет собой точку соединения с L.

130. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антитело-

лекарственное средство по любому из пп. 1-129 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

131. Фармацевтическая композиция для профилактики, облегчения или лечения заболевания, связанного с суперэкспрессией ROR1, содержащая конъюгат антитела по любому из пп. 1-129 или его фармацевтически приемлемую соль или сольват.

132. Фармацевтическая композиция по п.131, где фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически эффективное количество химиотерапевтического агента.

133. Фармацевтическая композиция по п.131 или 132, где заболевание, связанное с суперэкспрессией ROR1, представляет собой рак.

134. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 131-133, где рак выбран из хронического лимфолейкоза (CLL), В-клеточного лейкоза, лимфомы, острого миелоидного лейкоза (AML), лимфомы Беркитта, мантийно-клеточной лимфомы (MCL), острого лимфобластного лейкоза (ALL), диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), фолликулярной лимфомы (FL) и лимфомы маргинальной зоны (MZL), рака молочной железы, рака почки, рака яичников, рака желудка, рака печени, рака легких, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака мочевого пузыря, рака яичек, рака матки, рака предстательной железы, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), нейробластомы, рака головного мозга, рака толстой кишки, плоскоклеточной карциномы, меланомы, миеломы, рака шейки матки, рака щитовидной железы, рака головы и шеи и рака надпочечников.

135. Способ лечения заболевания или нарушения, связанного с суперэкспрессией ROR1 у субъекта, включающий введение субъекту конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-129 или его фармацевтически приемлемой соли.

136. Способ по п.135, в котором заболевание или нарушение, связанное с суперэкспрессией ROR1, представляет собой рак.

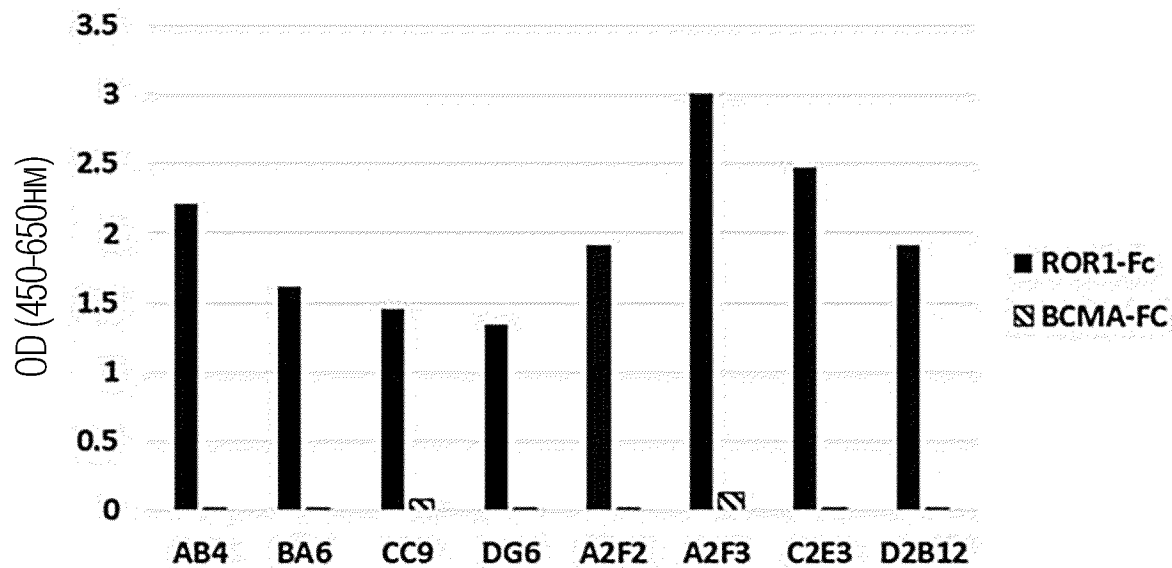
137. Способ по п.136, в котором рак выбран из хронического лимфолейкоза (CLL), В-клеточного лейкоза, лимфомы, острого миелоидного лейкоза (AML), лимфомы Беркитта, мантийно-клеточной лимфомы (MCL), острого лимфобластного лейкоза (ALL), диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), фолликулярной лимфомы (FL) и лимфомы маргинальной зоны (MZL), рака молочной железы, рака почки, рака яичников, рака желудка, рака печени, рака легких, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака мочевого пузыря, рака яичек, рака матки, рака предстательной железы, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), нейробластомы, рака головного мозга, рака толстой кишки, плоскоклеточной карциномы, меланомы, миеломы, рака шейки матки, рака щитовидной железы, рака головы и шеи и рака надпочечников.

138. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-129 или его фармацевтически приемлемой соли.

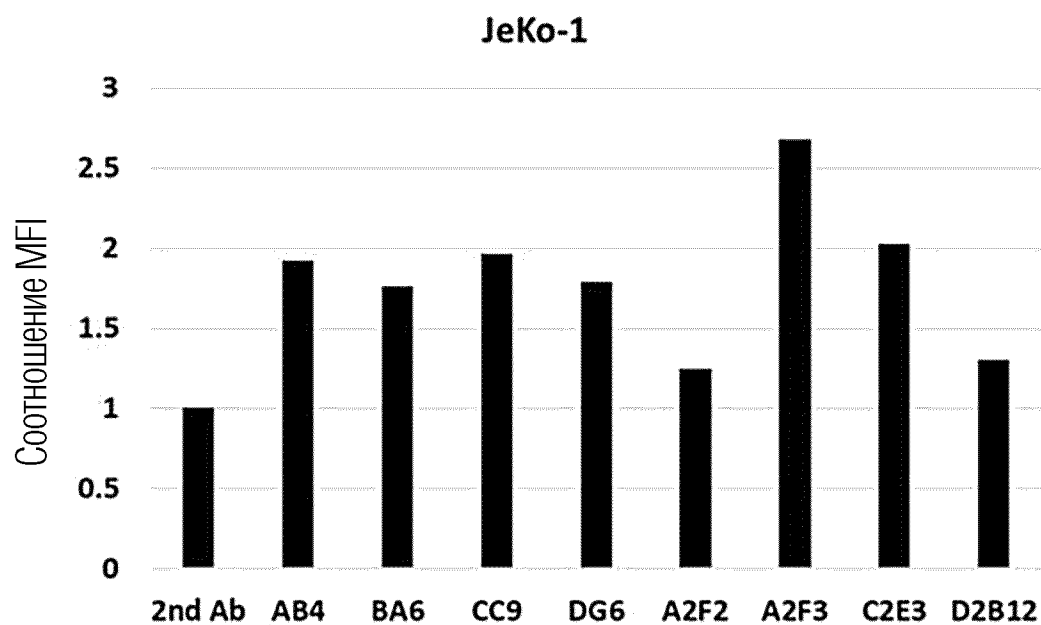
139. Способ по п.138, в котором рак выбран из хронического лимфолейкоза (CLL),

В-клеточного лейкоза, лимфомы, острого миелоидного лейкоза (AML), лимфомы Беркитта, мантийно-клеточной лимфомы (MCL), острого лимфобластного лейкоза (ALL), диффузной В-крупноклеточной лимфомы (DLBCL), фолликулярной лимфомы (FL) и лимфомы маргинальной зоны (MZL), рака молочной железы, рака почки, рака яичников, рака желудка, рака печени, рака легких, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака кожи, рака мочевого пузыря, рака яичек, рака матки, рака предстательной железы, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), нейробластомы, рака головного мозга, рака толстой кишки, плоскоклеточной карциномы, меланомы, миеломы, рака шейки матки, рака щитовидной железы, рака головы и шеи и рака надпочечников.

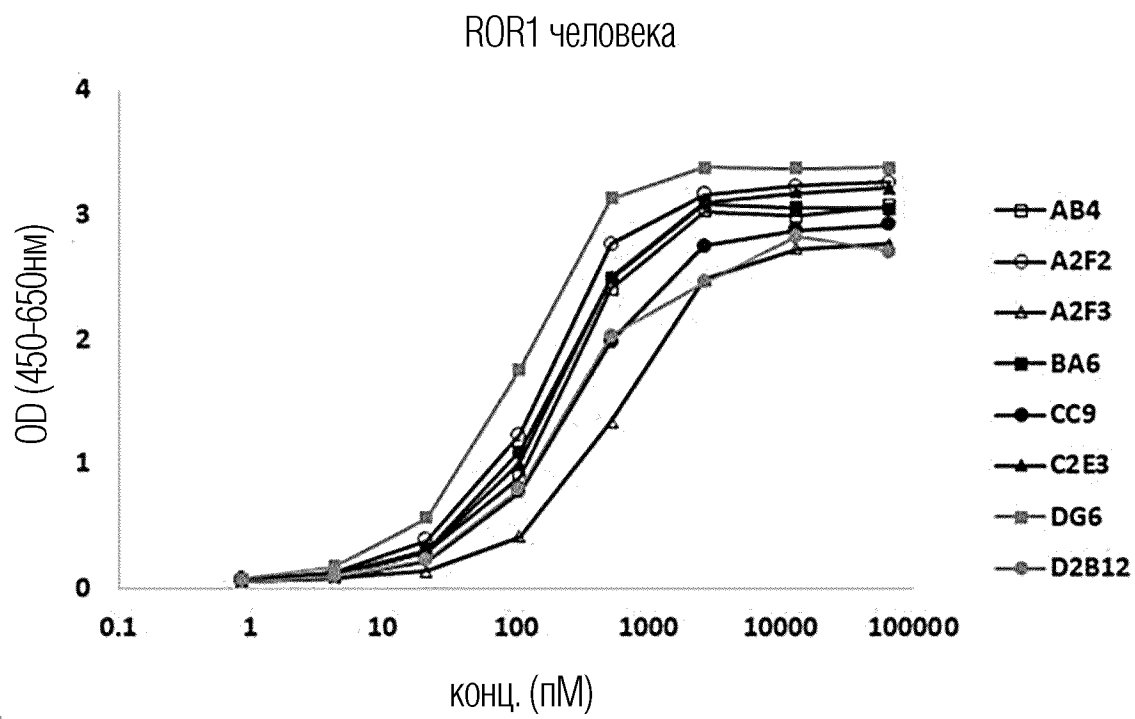
ФИГ. 1



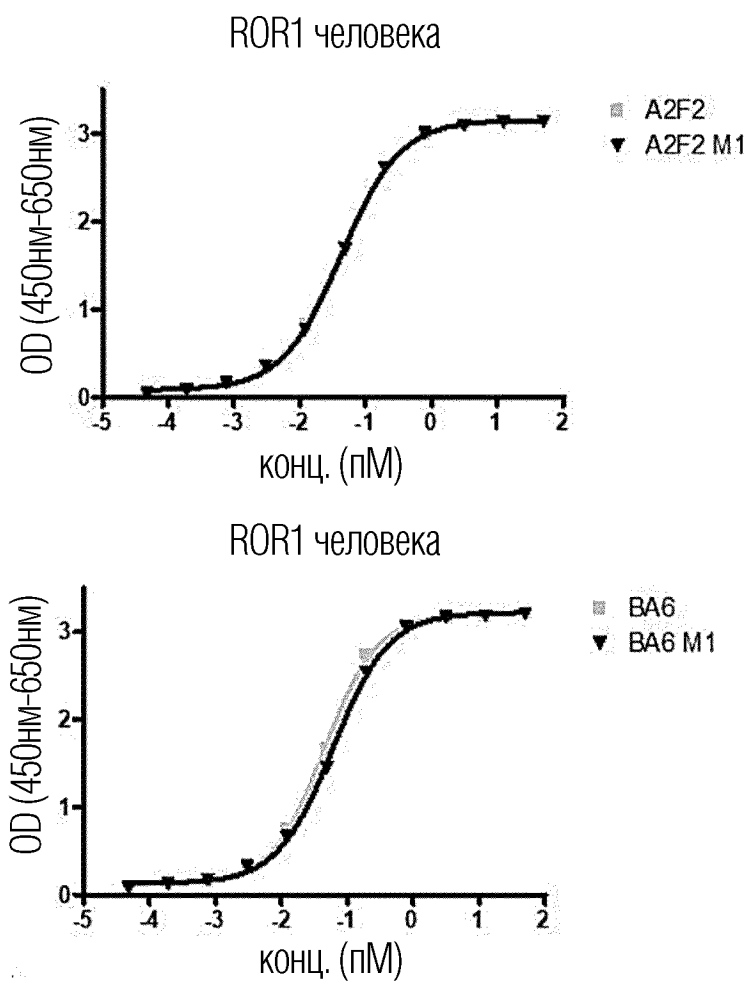
ФИГ. 2



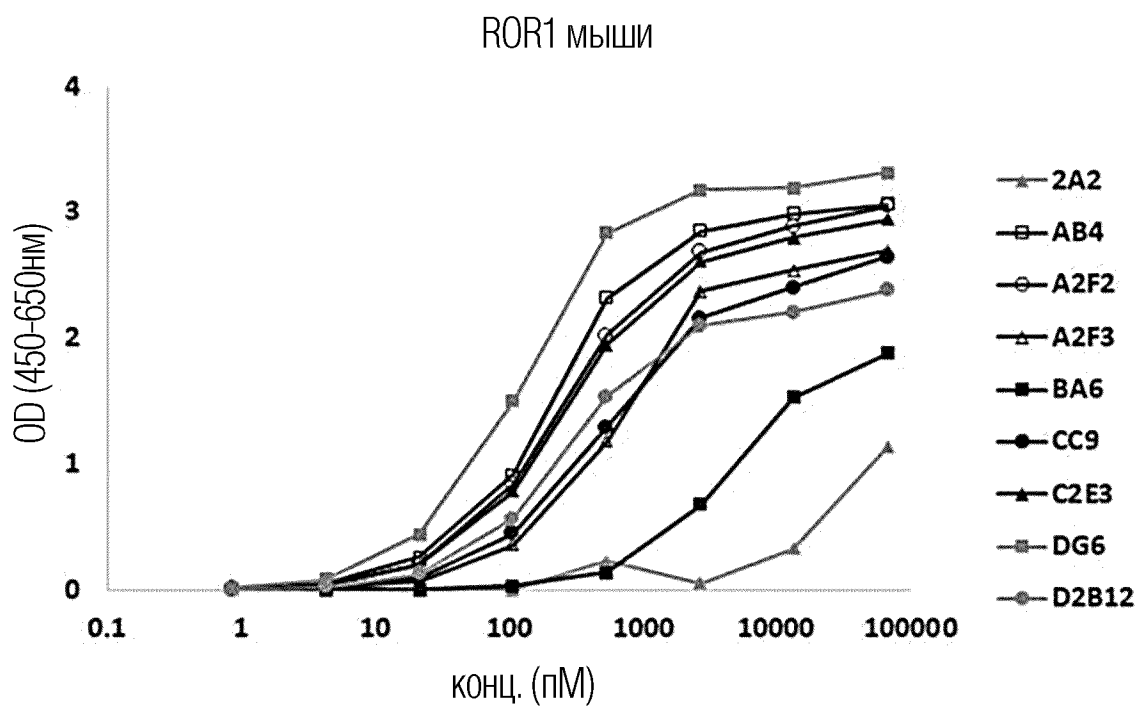
ФИГ. 3а



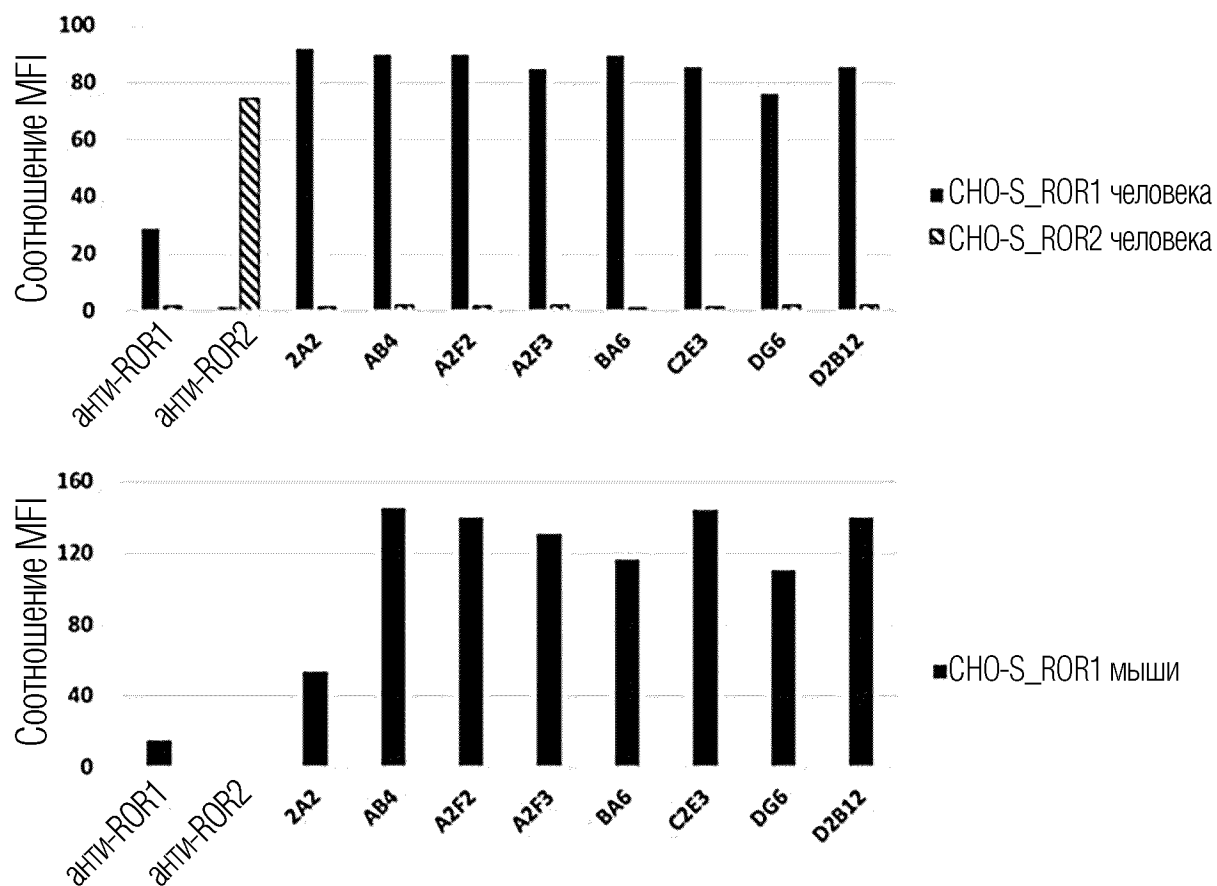
ФИГ. 3b

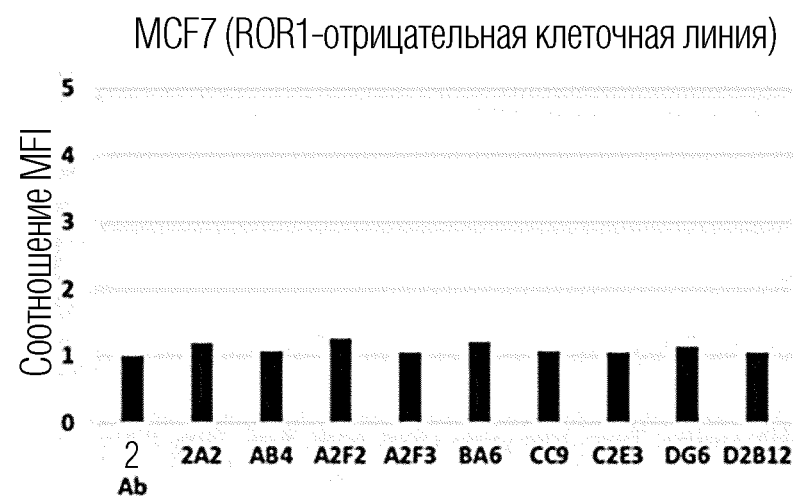
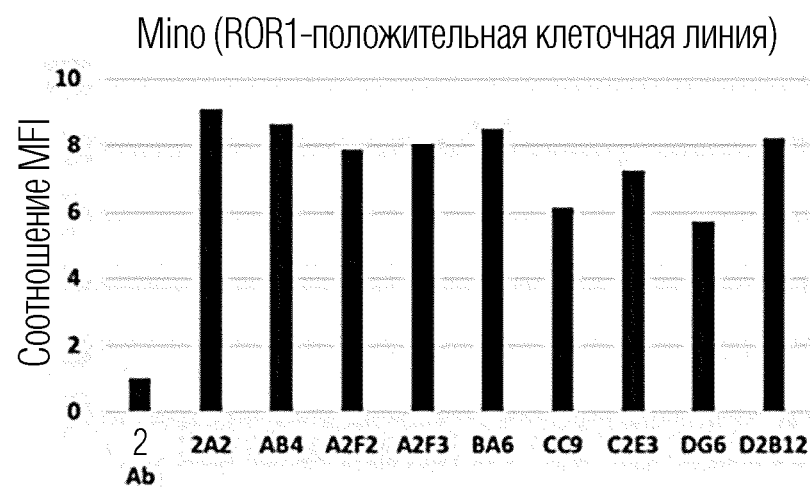


## ФИГ. 4



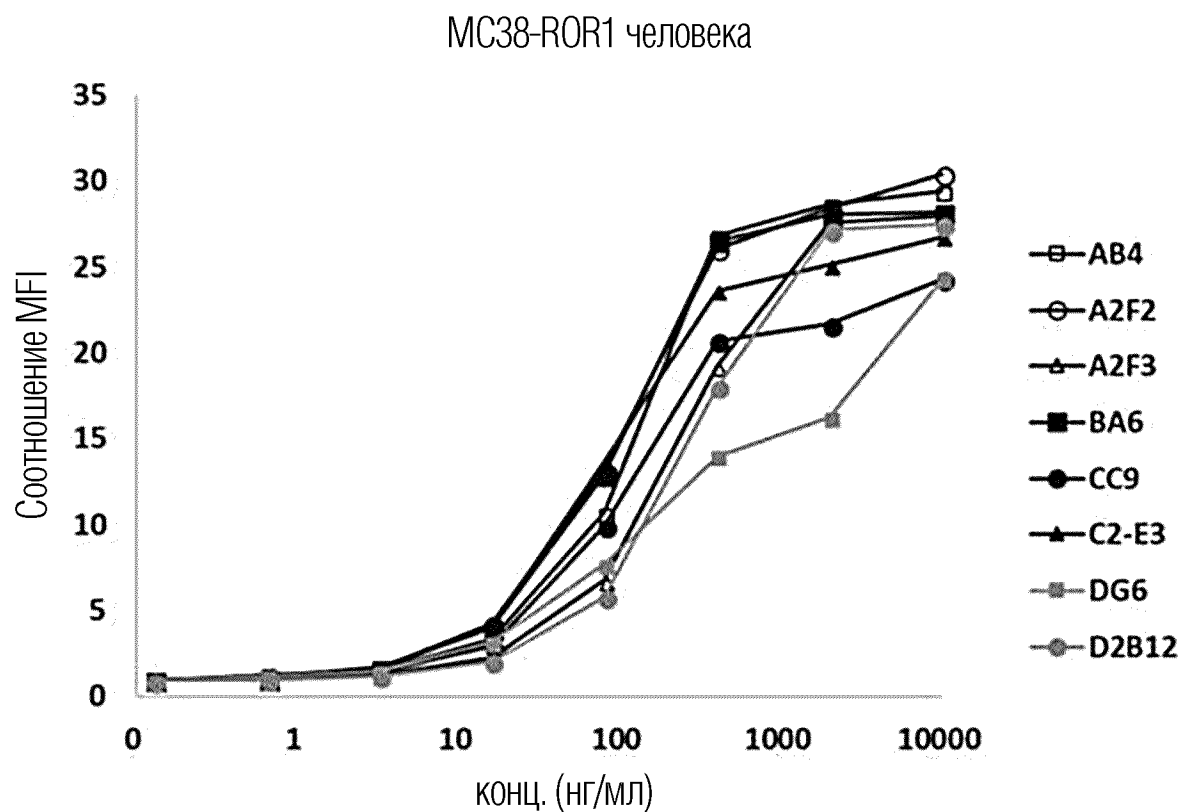
ФИГ. 5





ФИГ. 6

ФИГ. 7

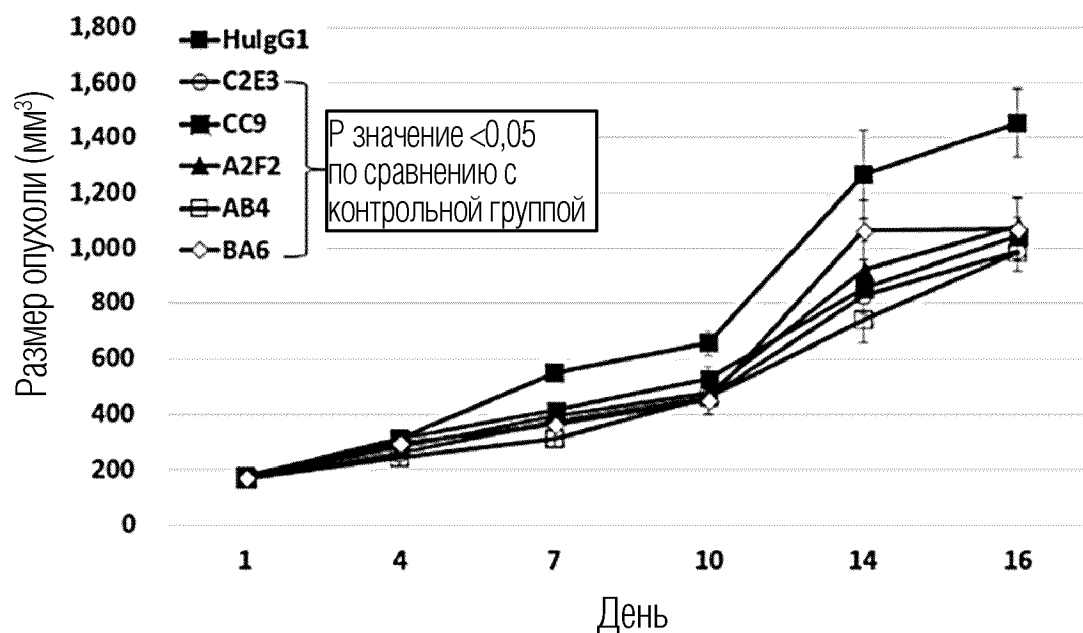


ФИГ. 8

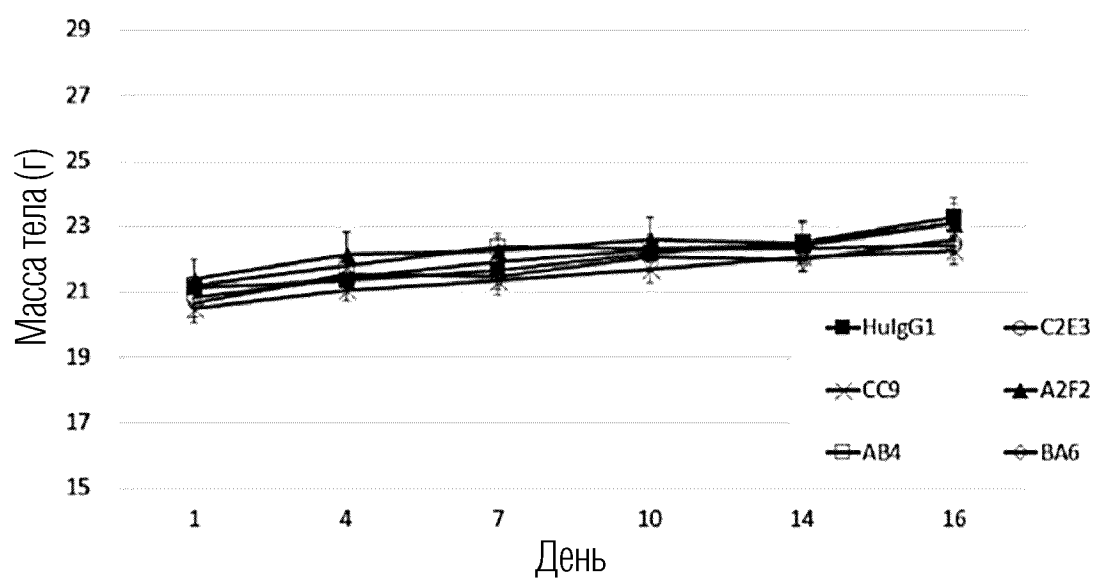
| Линия клеток рака   |            | Средний коэффициент кратности | Линия клеток рака  |           | Средний коэффициент кратности |
|---------------------|------------|-------------------------------|--------------------|-----------|-------------------------------|
| Рак желудка         | AGS        | 12.3                          | Рак легкого        | H460      | 10.9                          |
|                     | NCI-N87    | 11.8                          |                    | A549      | 6.0                           |
|                     | MKN-28     | 4.9                           |                    | NCI-H1975 | 4.2                           |
|                     | SNU-1750   | 3.9                           |                    | H1437     | 4.1                           |
|                     | SNU-16     | 2.4                           |                    | Calu-6    | 3.3                           |
| Рак молочной железы | HCC1187    | 9.3                           | Рак толстой кишки  | HCT116    | 18.0                          |
|                     | MDA-MB-231 | 8.8                           |                    | DLD-1     | 17.6                          |
|                     | MDA-MB-468 | 6.4                           |                    | HT29      | 3.9                           |
|                     | HCC70      | 3.8                           | ALL                | 697       | 12.0                          |
|                     | HCC1143    | 3.2                           |                    | Kasumi-2  | 11.5                          |
|                     | BT20       | 3.0                           | MCL                | Mino      | 7.2                           |
|                     | HCC1806    | 2.3                           |                    | JeKo-1    | 4.0                           |
|                     | HCC1937    | 2.7                           | Т-клеточный лейкоз | Jurkat    | 1.7                           |
|                     | BT474      | 1.7                           |                    |           |                               |
|                     | MCF7       | 1.1                           |                    |           |                               |

• Средний коэффициент кратности:  
MFI анти-ROR1/MFI 2 Ab

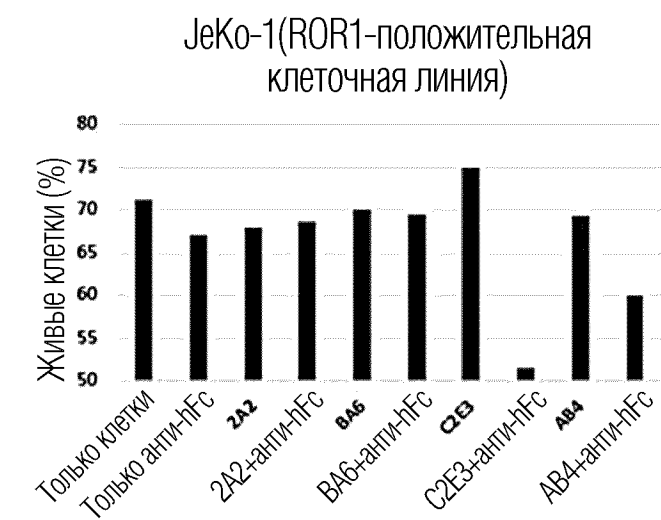
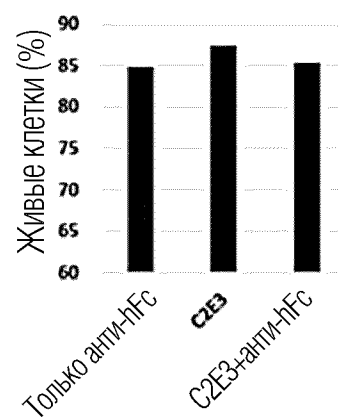
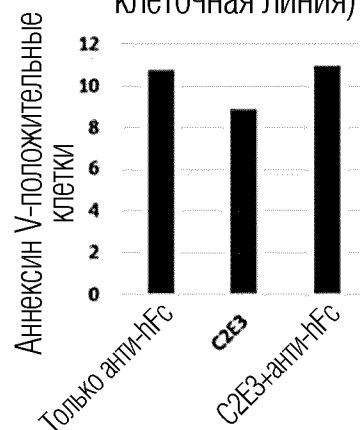
ФИГ. 9а



ФИГ. 9б

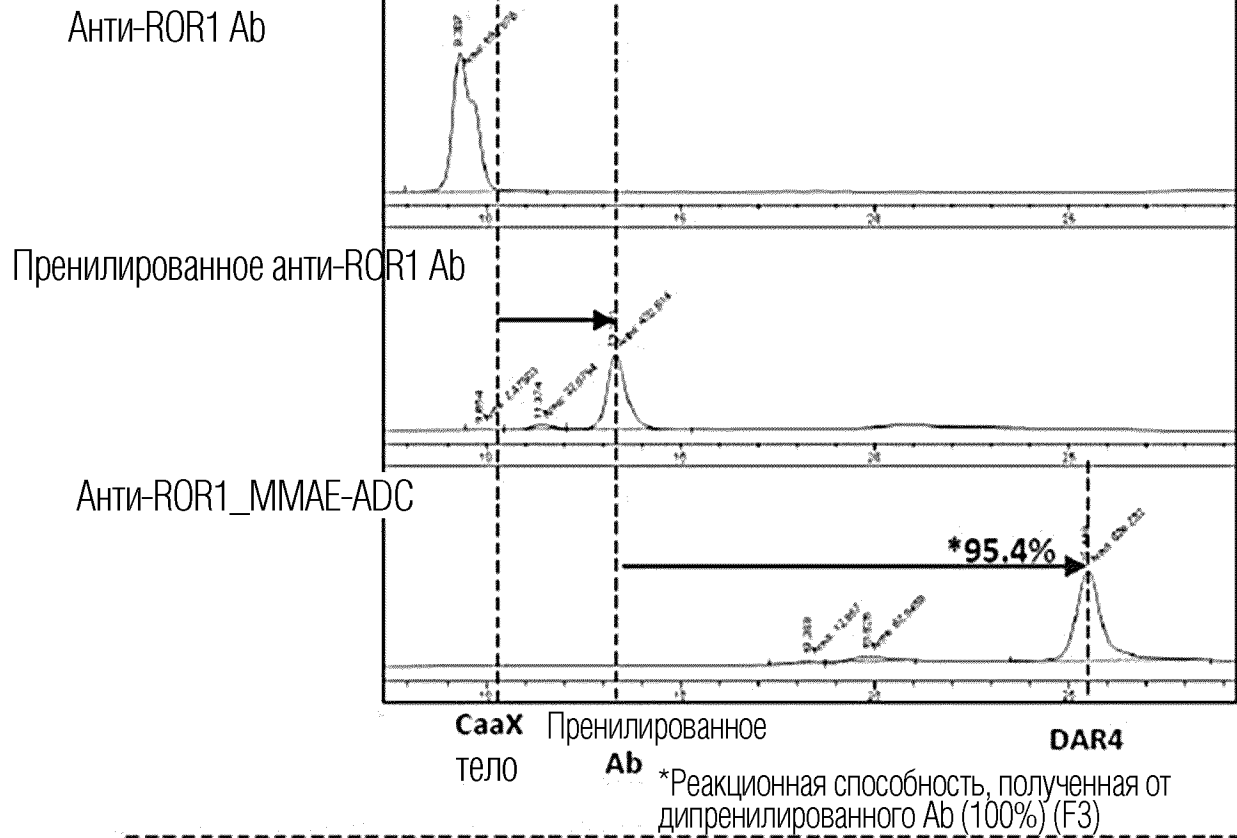


## ФИГ. 10

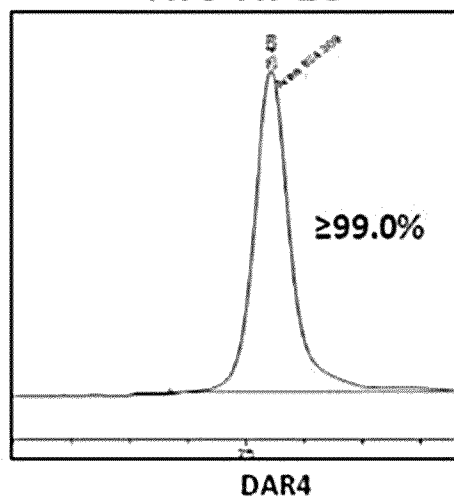
U266 (ROR1-отрицательная  
клеточная линия)U266 (ROR1-отрицательная  
клеточная линия)

## ФИГ. 11а

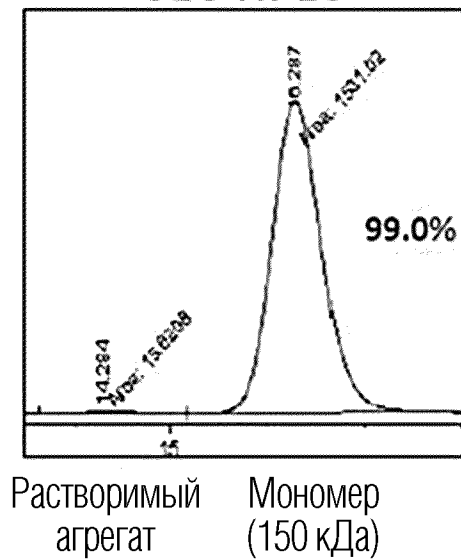
## Анти-ROR1\_MMAE конъюгат, DAR4



## &lt; HIC-HPLC &gt;

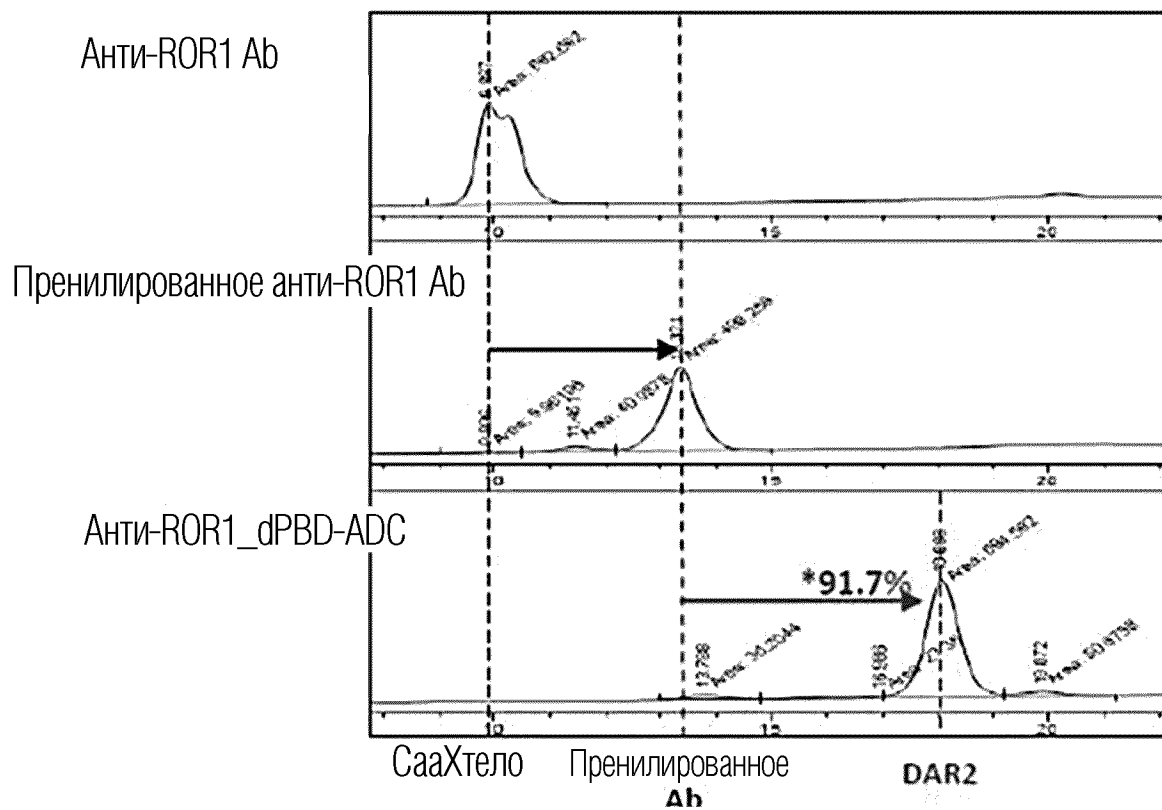


## &lt; SEC-HPLC &gt;



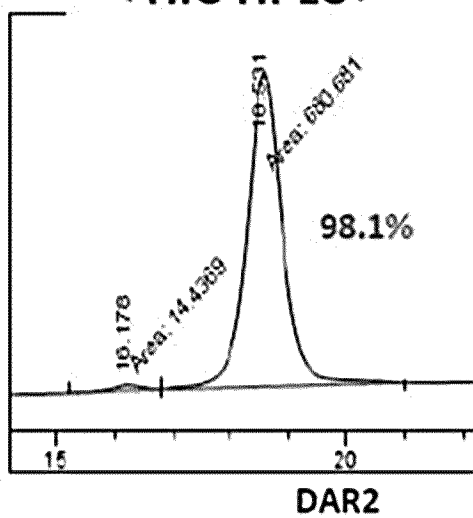
## ФИГ. 11b

Анти-ROR1\_dPBD конъюгат, DAR2

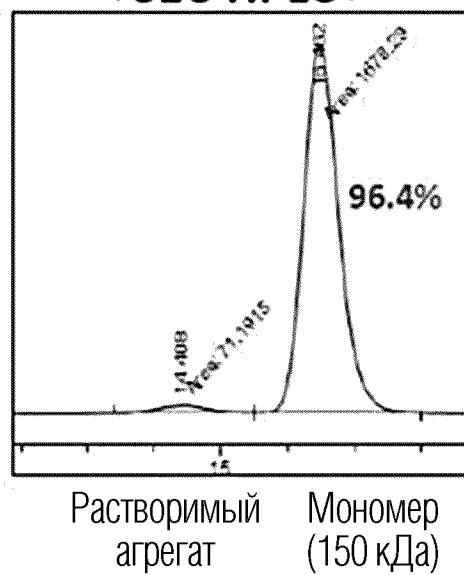


\*Реакционная способность, полученная от дипренилированного Ab (100%) (F3)

## &lt; HIC-HPLC &gt;

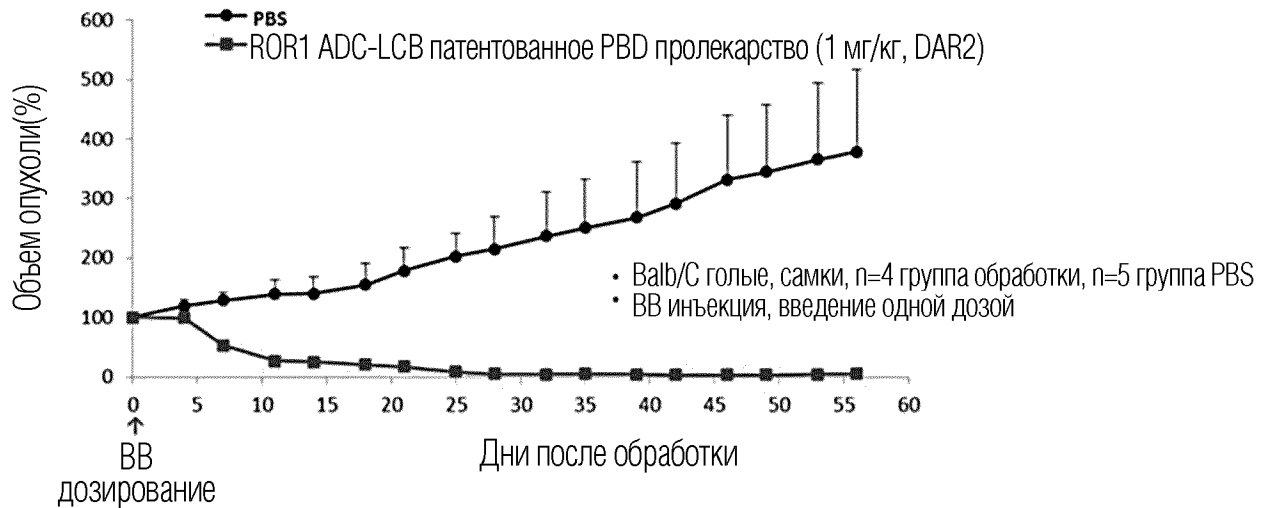


## &lt; SEC-HPLC &gt;



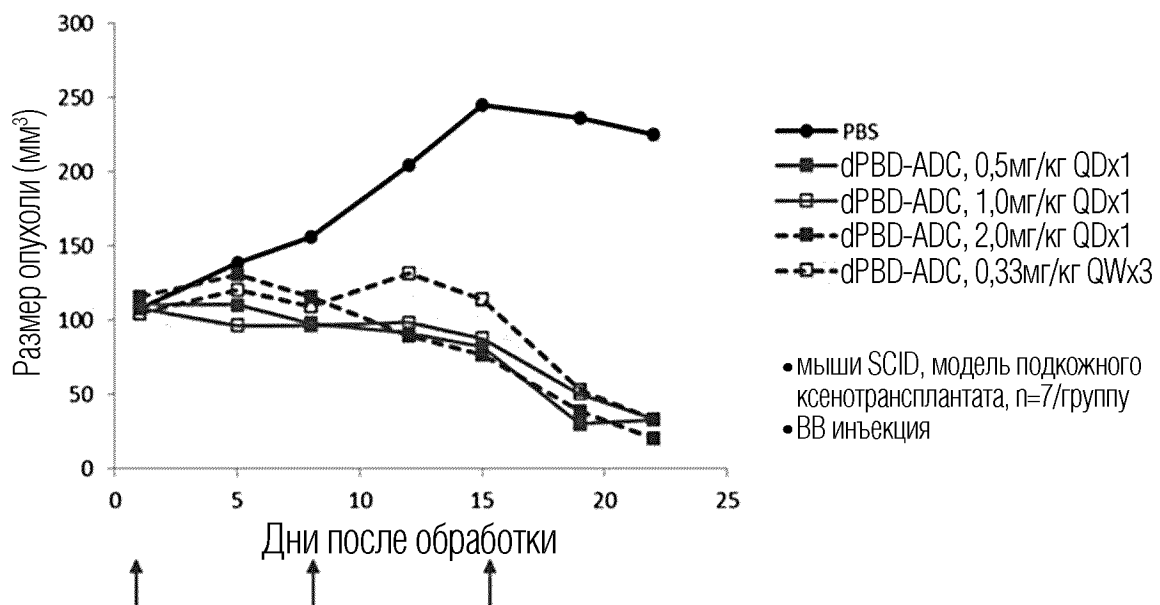
## ФИГ. 12

Модель ксенотрансплантата  
MDA-MB-468 in vivo (одно ВВ введение)



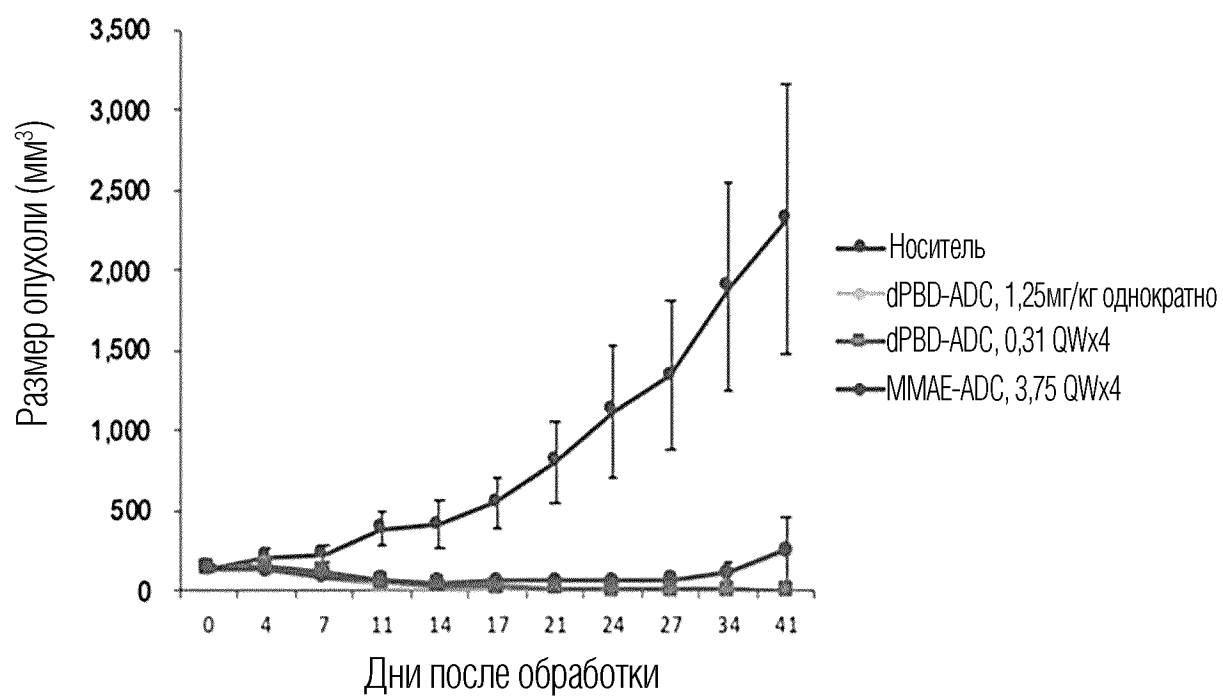
## ФИГ. 13

Модель ксенотрансплантата  
MDA-MB-231 in vivo (ВВ введение)

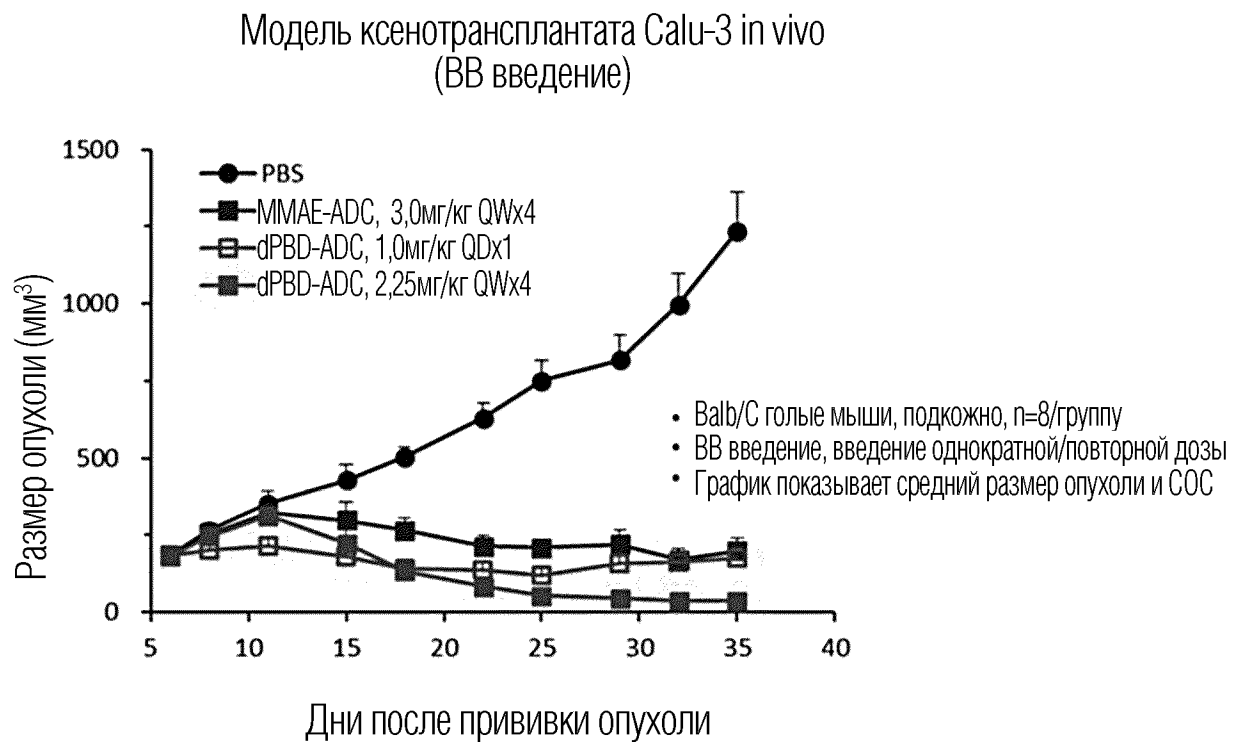


## ФИГ. 14

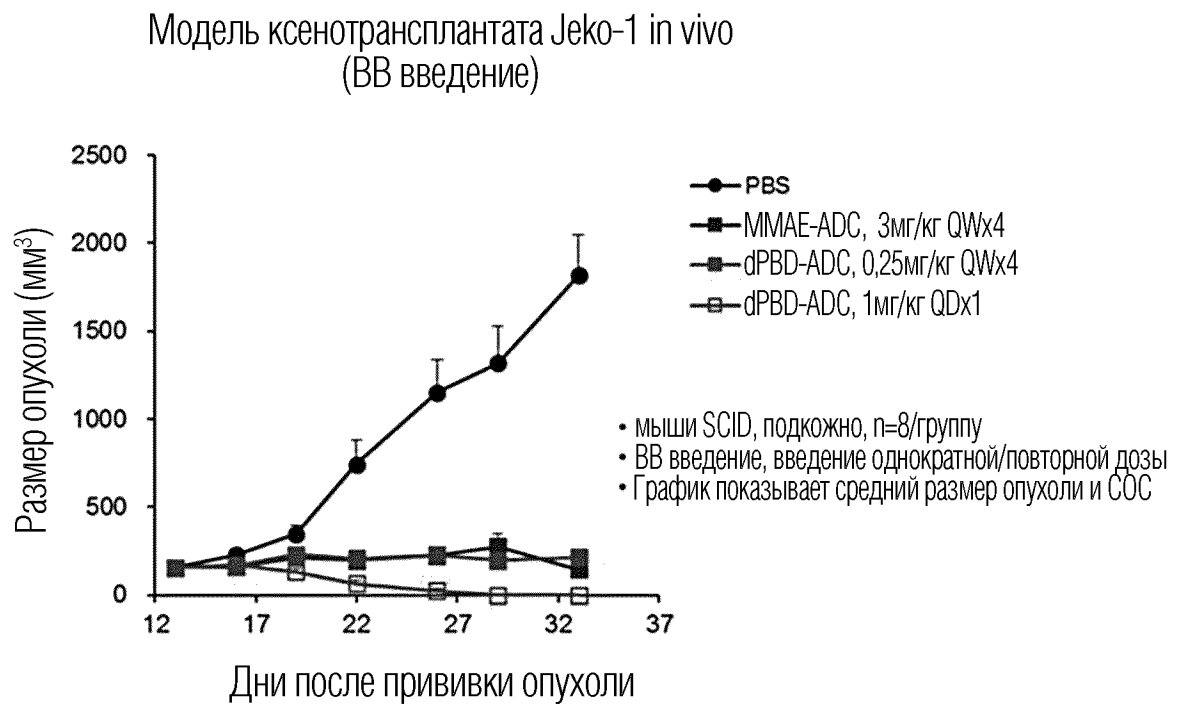
Модель ксенотрансплантата HCC1187

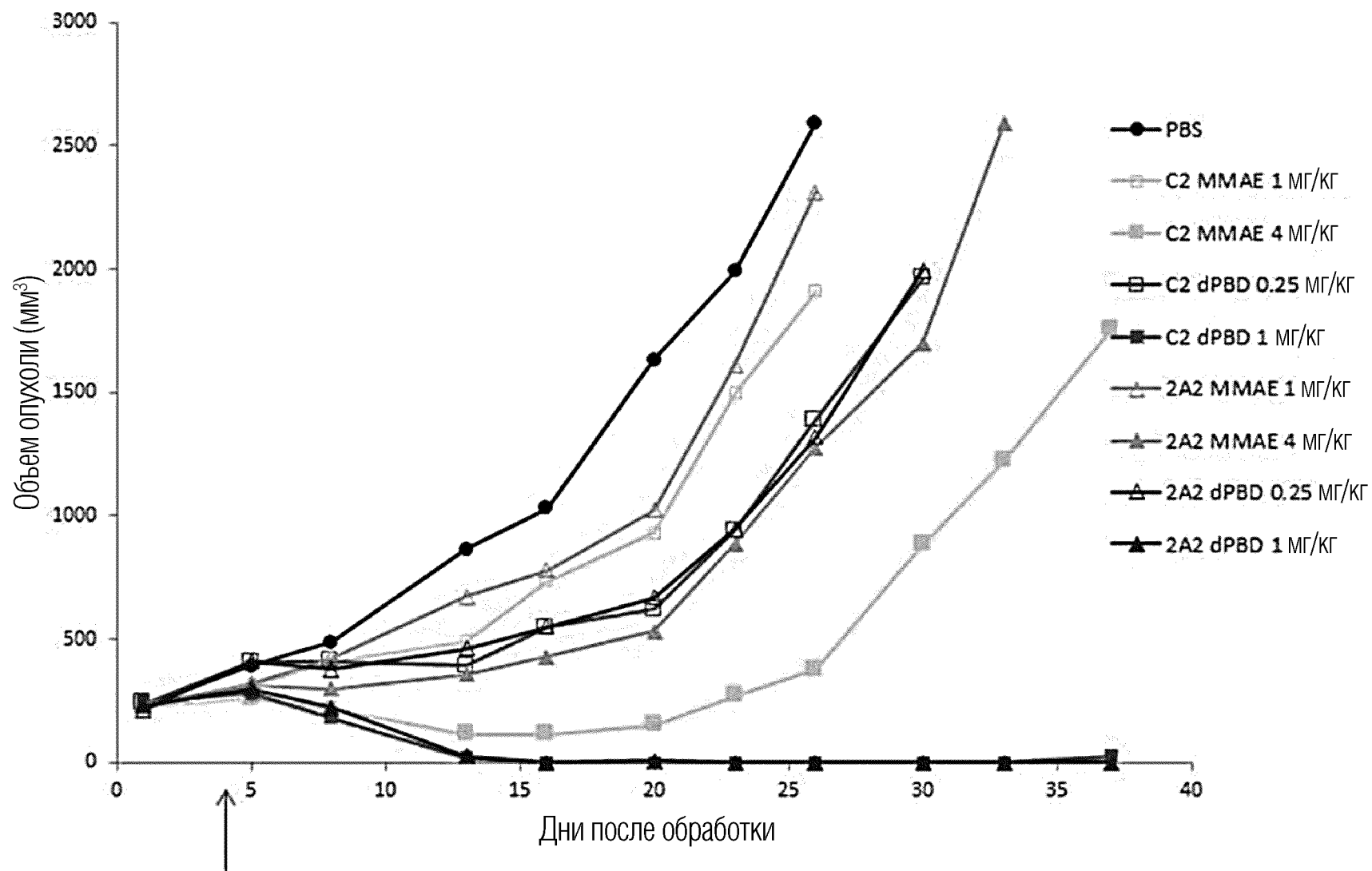


ФИГ. 15



ФИГ. 16





ФИГ. 17