(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202291359 (13) A2

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.10.31

(22) Дата подачи заявки
2018.02.08

(51) Int. Cl. ***A61K 47/68*** (2017.01)

(54) КОНЪЮГАТЫ ПИРРОЛОБЕНЗОДИАЗЕПИН-АНТИТЕЛО

(31) **1702031.4; 1719391.3; 1719398.8; 1719393.9**
(32) **2017.02.08; 2017.11.22; 2017.11.22; 2017.11.22**
(33) **GB**
(62) **202091705; 2018.02.08**
(71) Заявитель:
АДС ТЕРАПЬЮТИКС СА (CH); МЕДИМЬЮН ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Ван Беркель Патрисиус Хендрикус Корнелис (CH)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к пирролобензодиазепинам (ПБД), имеющим лабильную защитную группу в форме линкера к антителу.

202291359 A2

202291359 A2

КОНЪЮГАТЫ ПИРРОЛОБЕНЗОДИАЗЕПИН-АНТИТЕЛО

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно GB1702031.4, поданному 8 февраля 2017 г., GB1719391.3, поданной 22 ноября 2017 г., GB1719398.8, поданной 22 ноября 2017 г., и GB1719393.9, поданной 22 ноября 2017 г.

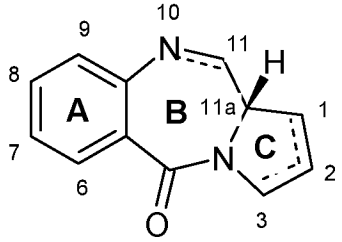
Область техники

Настоящее изобретение относится к пирролобензодиазепинам (PBD), содержащим лабильную защитную группу в форме линкера к антителу.

Уровень техники

Пирролобензодиазепины

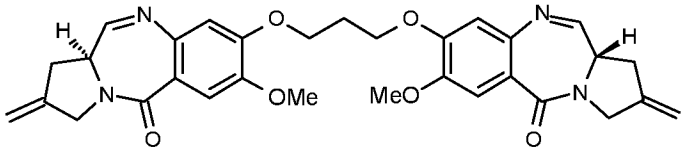
Некоторые пирролобензодиазепины (ПБД) обладают способностью распознавать и связываться с конкретными последовательностями ДНК; предпочтительная последовательность представляет собой PuGPu. Первый противоопухолевый антибиотик на основе ПБД, антрамицин, был открыт в 1965 г. (Leimgruber, et al., J. Am. Chem. Soc., 87, 5793-5795 (1965); Leimgruber, et al., J. Am. Chem. Soc., 87, 5791-5793 (1965)). Затем сообщалось о ряде природных ПБД и было разработано более 10 путей синтеза различных аналогов (Thurston, et al., Chem. Rev. 1994, 433-465 (1994); Antonow, D. and Thurston, D.E., Chem. Rev. 2011 111 (4), 2815-2864). Члены семейства включают аббеймицин (Hochlowski, et al., J. Antibiotics, 40, 145-148 (1987)), чикамицин (Konishi, et al., J. Antibiotics, 37, 200-206 (1984)), DC-81 (патент Японии 58-180 487; Thurston, et al., Chem. Brit., 26, 767-772 (1990); Bose, et al., Tetrahedron, 48, 751-758 (1992)), мазетрамицин (Kuminoto, et al., J. Antibiotics, 33, 665-667 (1980)), неотрамицины A и B (Takeuchi, et al., J. Antibiotics, 29, 93-96 (1976)), поротрамицин (Tsunakawa, et al., J. Antibiotics, 41, 1366-1373 (1988)), протракарцин (Shimizu, et al, J. Antibiotics, 29, 2492-2503 (1982); Langley and Thurston, J. Org. Chem., 52, 91-97 (1987)), сибаномицин (DC-102) (Hara, et al., J. Antibiotics, 41, 702-704 (1988); Itoh, et al., J. Antibiotics, 41, 1281-1284 (1988)), сибиромицин (Leber, et al., J. Am. Chem. Soc., 110, 2992-2993 (1988)) и томамицин (Arima, et al., J. Antibiotics, 25, 437-444 (1972)). ПБД имеют общую структуру:



Они различаются по числу, типу и положению заместителей в обоих своих ароматических кольцах A и пирролокольцах C, а также по степени насыщения кольца C. B

кольце B присутствует либо имин (N=C), либо карбиноламин (NH-CH(OH)), либо простой метиловый эфир карбиноламина (NH-CH(OMe)) в положении N10-C11, которое является электрофильным центром, ответственным за алкилирование ДНК. Все из известных природных продуктов имеют (S)-конфигурацию в хиральном положении C11a, что обуславливает правостороннюю «твист»-конформацию при рассмотрении от кольца C к кольцу A. Это придает им подходящую трехмерную форму для изоспиральности с малой бороздкой B-формы ДНК, что приводит к плотному прилеганию в сайте связывания (Kohn, в Antibiotics III. Springer-Verlag, New York, pp. 3-11 (1975); Hurley and Needham-VanDevanter, Acc. Chem. Res., 19, 230-237 (1986)). Их способность образовывать аддукт в малой бороздке позволяет им препятствовать процессингу ДНК, поэтому их применяют в качестве противоопухолевых агентов.

Одно соединение пирролобензодиазепина описано в работе Gregson et al. (Chem. Commun. 1999, 797-798) как соединение 1 и Gregson et al. (J. Med. Chem. 2001, 44, 1161-1174) как соединение 4a. Это соединение, также известное как SG2000, показано ниже:



SG2000

В WO 2007/085930 описано получение димерных соединений ПБД, содержащих линкерные группы для соединения с агентом, связывающим клетки, таким как антитело. Линкер присутствует в мостике, соединяющем мономерные блоки ПБД димера.

Димерные соединения ПБД, содержащие линкерные группы для соединения с агентом, связывающим клетки, таким как антитело, были описаны в WO 2011/130613 и WO 2011/130616. Линкер в этих соединениях присоединен к центральной части ПБД в положении C2 и обычно расщепляется при действии фермента на линкерную группу. В WO 2011/130598 линкер в этих соединениях присоединен к одному из доступных положений N10 на центральной части ПБД и обычно расщепляется при действии фермента на линкерную группу.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство

Терапия антителами была разработана для нацеленного (таргетного) лечения пациентов с раком, иммунологическими и ангиогенными нарушениями (Carter, P. (2006) Nature Reviews Immunology 6:343-357). Применение конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC), т. е. иммуноконъюгатов, для локальной доставки цитотоксических или цитостатических агентов, т. е. лекарственных средств для уничтожения или ингибирования опухолевых клеток в лечении рака, нацеливает доставку фрагмента

лекарственного средства к опухолям и внутриклеточное накопление в них, в то время как системное введение этих лекарственных средств неконъюгированной формеможет привести к неприемлемым уровням токсичности для нормальных клеток (Xie et al (2006) Expert. Opin. Biol. Ther. 6(3):281-291; Kovtun et al (2006) Cancer Res. 66(6):3214-3121; Law et al (2006) Cancer Res. 66(4):2328-2337; Wu et al (2005) Nature Biotech. 23(9):1137-1145; Lambert J. (2005) Current Opin. in Pharmacol. 5:543-549; Hamann P. (2005) Expert Opin. Ther. Patents 15(9):1087-1103; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Trail et al (2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337; Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614).

Таким образом, требуется максимальная эффективность при минимальной токсичности. Усилия по разработке и улучшению ADC были сосредоточены на селективности моноклональных антител (MAT), а также на механизме действия лекарственного средства, присоединении лекарственного средства, соотношении лекарственное средство/антитело (нагрузка) и свойствах высвобождения лекарственного средства (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornan et al (2009) Blood 114(13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; WO2009/052249; McDonagh (2006) Protein Eng. Design & Sel. 19(7): 299-307; Doronina et al (2006) Bioconj. Chem. 17:114-124; Erickson et al (2006) Cancer Res. 66(8):1-8; Sanderson et al (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852; Jeffrey et al (2005) J. Med. Chem. 48:1344-1358; Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070). Фрагменты лекарственного средства могут оказывать свои цитотоксические и цитостатические эффекты посредством механизмов, включающих связывание тубулина, связывание ДНК, ингибирование протеасомы и/или топоизомеразы. Некоторые цитотоксические лекарственные средства, как правило, неактивны или менее активны, когда они конъюгированы с крупными антителами или белковыми лигандами рецепторов.

Авторы настоящего изобретения разработали конкретные конъюгаты димерного ПБД и антитела.

Сущность изобретения

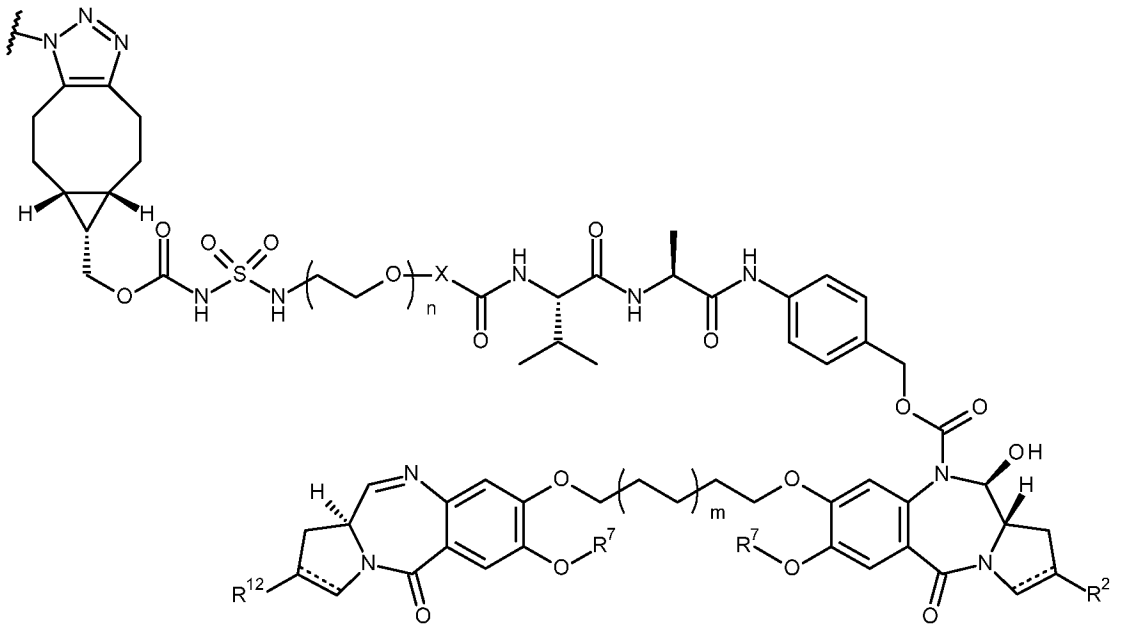
Согласно первому аспекту настоящего изобретения предложен конъюгат формулы (I):

$$Ab-(DL)_p \quad (I)$$

в которой:

Ab представляет собой антитело, которое связывается с DLK1;

DL представляет собой



где:

X выбран из группы, включающей одинарную связь, $-CH_2-$ и $-C_2H_4-$;

n составляет от 1 до 8;

m равно 0 или 1;

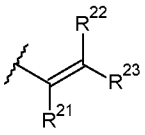
R^7 представляет собой метил или фенил;

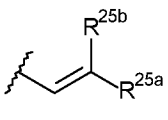
если между C2 и C3 присутствует двойная связь, R^2 выбран группы, состоящей из:

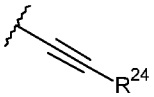
(ia) C_{5-10} арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, включающей: галоген, нитро, циано, простой эфир, карбокси, сложный эфир, C_{1-7} алкил, C_{3-7} гетероциклил и бис-окси-C_{1-3} алкилен;

(ib) C_{1-5} насыщенного алифатического алкила;

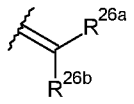
(ic) C_{3-6} насыщенного циклоалкила;

(id)  , где каждый из R^{21}, R^{22} и R^{23} независимо выбран из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, при этом общее число атомов углерода в группе R^{12} составляет не более 5;

(ie)  , где один из R^{25a} и R^{25b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем указанный фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; и

(if) 

, где R^{24} выбран из: H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, причем указанный фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила;

если между C2 и C3 присутствует одинарная связь, R^2 представляет собой 

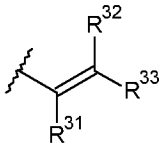
, где R^{26a} и R^{26b} независимо выбраны из H, F, C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, при этом алкильная и алкенильная группы необязательно замещены группой, выбранной из C_{1-4} алкиламидо и C_{1-4} алкилового сложного эфира; или, если один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, другой выбран из нитрила и C_{1-4} алкилового сложного эфира;

если между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, R^{12} выбран из группы, состоящей из:

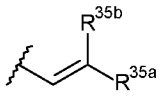
(ia) C_{5-10} арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, включающей: галоген, нитро, циано, простой эфир, карбокси, сложный эфир, C_{1-7} алкил, C_{3-7} гетероциклил и бис-окси-C_{1-3} алкилен;

(ib) C_{1-5} насыщенного алифатического алкила;

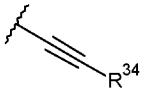
(ic) C_{3-6} насыщенного циклоалкила;

(id) 

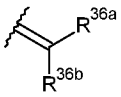
, где каждый из R^{31}, R^{32} и R^{33} независимо выбран из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, при этом общее число атомов углерода в группе R^{12} составляет не более 5;

(ie) 

, где один из R^{35a} и R^{35b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем указанный фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; и

(if) 

, где R^{24} выбран из: H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, причем указанный фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила;

если между C2′ и C3′ присутствует одинарная связь, R^{12} представляет собой  , где R^{36a} и R^{36b} независимо выбраны из H, F, C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, причем алкильная и алкенильная группы необязательно замещены группой, выбранной из C_{1-4} алкиламидо и C_{1-4} алкилового сложного эфира; или, если один из R^{36a} и R^{36b} представляет собой H, другой выбран из нитрила и сложного C_{1-4} алкилового эфира;

и p составляет от 1 до 8.

Согласно второму аспекту настоящего изобретения предложен конъюгат формулы (I):

$$Ab\text{-}(DL)_p \quad (I)$$

в которой:

Ab представляет собой антитело, которое связывается с KAAG1; и

DL определен для первого аспекта выше.

Согласно третьему аспекту настоящего изобретения предложен конъюгат формулы (I):

$$Ab\text{-}(DL)_p \quad (I)$$

в которой:

Ab представляет собой антитело, которое связывается с мезотелином; и

DL определен для первого аспекта выше.

Было установлено, что эти конъюгаты проявляют хорошую активность и неожиданную переносимость по сравнению с аналогичными конъюгатами, не содержащими сульфонамидную группу.

Краткое описание чертежей

На Фигуре 1 показана цитотоксичность конъюгата в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения *in vitro*.

На Фигуре 2 показана эффективность конъюгата в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения *in vivo*.

На Фигуре 3 показана цитотоксичность конъюгата в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения в клетках A204 и Hep3B в двухмерной и трехмерной клеточных культурах *in vitro*.

На Фигуре 4 показана цитотоксичность конъюгата в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения *in vitro*.

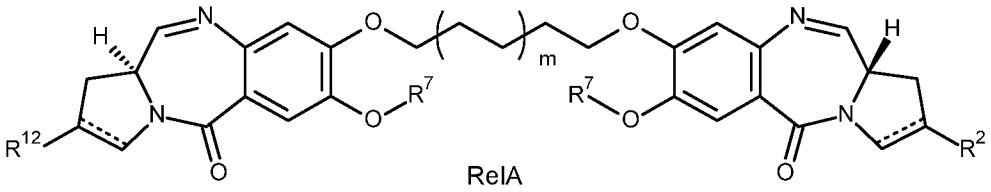
На Фигуре 5 показана эффективность конъюгата в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения *in vivo*.

На Фигуре 6 показана противоопухолевая активность конъюгата в соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения в ксенотрансплантатной модели SN12C *in vivo*.

Подробное описание изобретения

Согласно настоящему изобретению предложен димер ПБД с линкером, присоединенным по положению N10 на одном из фрагментов ПБД, конъюгированных с антителом, как определено ниже.

Настоящее изобретение подходит для применения при обеспечении соединения ПБД в предпочтительный сайт в организме субъекта. Конъюгат позволяет высвобождать активное соединение ПБД, которое не сохраняет никакой части линкера. Отсутствует выступ, который может повлиять на реакционную способность соединения ПБД. Таким образом, конъюгат формулы (I) будет высвобождать соединение RelA:



RelA

Указанная связь между димером ПБД и антителом в настоящем изобретении предпочтительно является стабильным вне клеток. Перед транспортировкой или доставкой в клетку конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) предпочтительно является стабильным и остается интактным, т. е. антитело остается присоединенным к фрагменту лекарственного средства. Линкеры стабильны вне клетки-мишени и могут расщепляться с некоторой степенью эффективности внутри клетки. Эффективный линкер будет: (i) поддерживать свойства специфичного связывания антитела; (ii) обеспечивать внутриклеточную доставку конъюгата или фрагмента лекарственного средства; (iii) оставаться стабильными и интактным, т.е. нерасщепленным, до тех пор, пока конъюгат не будет доставлен или транспортирован в свой целевой сайт; и (iv) поддерживать цитотоксический, цитолитический эффект или цитостатический эффект фрагмента лекарственного средства ПБД. Стабильность ADC может быть измерена с помощью стандартных аналитических методик, таких как масс-спектроскопия, ВЭЖХ и методика разделения/анализа ЖХ/МС.

Доставка соединений формул RelA достигается в целевом сайте активации конъюгата формулы (I) в результате воздействия фермента, такого как катепсин, на соединяющую группу и, в частности, на дипептидный фрагмент валин-аланин.

Определение

Заместители

В настоящей заявке выражение «необязательно замещенный» относится к исходной группе, которая может быть незамещенной или которая может быть замещенной.

Если не указано иное, в настоящей заявке термин «замещенный» относится к исходной группе, которая несет один или более заместителей. Термин «заместитель» используется в настоящей заявке в общепринятом смысле и относится к химическому фрагменту, который ковалентно присоединен или, если необходимо, конденсирован с исходной группой. Широкий круг заместителей хорошо известен, и способы их образования и введения в различные исходные группы также хорошо известны.

Примеры заместителей более подробно описаны ниже.

C_{1-12} алкил: в настоящей заявке термин «C_{1-12} алкил» относится к одновалентному фрагменту, полученному удалением атома водорода от атома углерода углеводородного соединения, содержащего от 1 до 12 атомов углерода, которое может быть алифатическим или алициклическим и которое может быть насыщенным или ненасыщенным (например, частично ненасыщенным, полностью ненасыщенным). В настоящей заявке термин «C_{1-4} алкил» относится к одновалентному фрагменту, полученному удалением атома водорода от атома углерода углеводородного соединения, содержащего от 1 до 4 атомов углерода, которое может быть алифатическим или алициклическим и которое может быть насыщенным или ненасыщенным (например, частично ненасыщенным, полностью ненасыщенным). Таким образом, термин «алкил» включает подклассы алкенил, алкинил, циклоалкил и т.д., обсуждаемые ниже.

Примеры насыщенных алкильных групп включают, но не ограничиваются ими, метил (C_1), этил (C_2), пропил (C_3), бутил (C_4), пентил (C_5), гексил (C_6) и гептил (C_7).

Примеры насыщенных линейных алкильных групп включают, но не ограничиваются ими, метил (C_1), этил (C_2), н-пропил (C_3), н-бутил (C_4), н-пентил (амил) (C_5), н-гексил (C_6) и н-гептил (C_7).

Примеры насыщенных разветвленных алкильных групп включают изопропил (C_3), изобутил (C_4), втор-бутил (C_4), трет-бутил (C_4), изопентил (C_5) и неопентил (C_5).

C_{2-12} алкенил: в настоящей заявке термин «C_{2-12} алкенил» относится к алкильной группе, содержащей одну или более двойных связей углерод-углерод.

Примеры ненасыщенных алкенильных групп включают, но не ограничиваются ими, этенил (винил, $-CH=CH_2$), 1-пропенил ($-CH=CH-CH_3$), 2-пропенил (аллил, $-CH-CH=CH_2$), изопропенил (1-метилвинил, $-C(CH_3)=CH_2$), бутенил (C_4), пентенил (C_5) и гексенил (C_6).

C_{2-12} алкинил: в настоящей заявке термин «C_{2-12} алкинил» относится к алкильной группе, содержащей одну или более тройных связей углерод-углерод.

Примеры ненасыщенных алкинильных групп включают, но не ограничиваются ими, этинил (-C≡CH) и 2-пропинил (пропаргил, -CH_2-C≡CH).

C_{3-12} циклоалкил: в настоящей заявке термин «C_{3-12} циклоалкил» относится к алкильной группе, которая также представляет собой циклильную группу; т. е. одновалентный фрагмент, полученный удалением атома водорода от атома алициклического кольца циклического углеводородного (карбоциклического) соединения, причем фрагмент содержит от 3 до 7 атомов углерода, включая от 3 до 7 кольцевых атомов.

Примеры циклоалкильных групп включают, но не ограничиваются ими, группы, происходящие из:

насыщенных моноциклических углеводородных соединений:

циклопропана (C_3), циклобутана (C_4), циклопентана (C_5), циклогексана (C_6), циклогептана (C_7), метилциклопропана (C_4), диметилциклопропана (C_5), метилциклобутана (C_5), диметилциклобутана (C_6), метилциклопентана (C_6), диметилциклопентана (C_7) и метилциклогексана (C_7);

ненасыщенных моноциклических углеводородных соединений:

циклопропена (C_3), циклобутена (C_4), циклопентена (C_5), циклогексена (C_6), метилциклопропена (C_4), диметилциклопропена (C_5), метилциклобутена (C_5), диметилциклобутена (C_6), метилциклопентена (C_6), диметилциклопентена (C_7) и диметилциклогексена (C_7); и

насыщенных полициклических углеводородных соединений:

норкарана (C_7), норпинана (C_7), норборнана (C_7).

C_{3-20} гетероциклил: в настоящей заявке термин «C_{3-20} гетероциклил» относится к одновалентному фрагменту, полученному удалением атома водорода от кольцевого атома гетероциклического соединения, причем фрагмент содержит от 3 до 20 кольцевых атомов, из которых от 1 до 10 представляют собой кольцевые гетероатомы. Предпочтительно каждое кольцо содержит от 3 до 7 кольцевых атомов, из которых от 1 до 4 представляют собой кольцевые гетероатомы.

В этом случае префиксы (например, C_{3-20}, C_{3-7}, C_{5-6} и т. д.) обозначают количество кольцевых атомов или диапазон количества кольцевых атомов, будь то атомы углерода или гетероатомы. Например, в настоящей заявке термин «C_{5-6} гетероциклил» относится к гетероциклильной группе, содержащей 5 или 6 кольцевых атомов.

Примеры моноциклических гетероциклильных групп включают, но не ограничиваются ими, группы, происходящие из:

N_1: азиридина (C_3), азетидина (C_4), пирролидина (тетрагидропиррола) (C_5), пирролина (например, 3-пирролина, 2,5-дигидропиррола) (C_5), 2H-пиррола или 3H-пиррола (изопиррола, изоазола) (C_5), пиперидина (C_6), дигидропиридина (C_6), тетрагидропиридина (C_6), азепина (C_7);

O_1: оксирана (C_3), оксетана (C_4), оксолана (тетрагидрофурана) (C_5), оксола (дигидрофурана) (C_5), оксана (тетрагидропирана) (C_6), дигидропирана (C_6), пирана (C_6), оксепина (C_7);

S_1: тиирана (C3), тиетана (C_4), тиолана (тетрагидротиофена) (C_5), тиана (тетрагидротиопирана) (C_6), тиепана (C_7);

O_2: диоксолана (C_5), диоксана (C_6) и диоксепана (C_7);

O_3: триоксана (C_6);

N_2: имидазолидина (C_5), пиразолидина (диазолидина) (C_5), имидазолина (C_5), пиразолина (дигидропиразола) (C_5), пиперазина (C_6);

N_1O_1: тетрагидрооксазола (C_5), дигидрооксазола (C_5), тетрагидроизоксазола (C_5), дигидроизоксазола (C_5), морфолина (C_6), тетрагидрооксазина (C_6), дигидрооксазина (C_6), оксазина (C_6);

N_1S_1: тиазолина (C_5), тиазолидина (C_5), тиоморфолина (C_6);

N_2O_1: оксадиазина (C_6);

O_1S_1: оксатиола (C_5) и оксатиана (тиоксана) (C_6); и,

$N_1O_1S_1$: оксатиазина (C_6).

Примеры замещенных моноциклических гетероциклильных групп включают группы, происходящие из сахаридов, в циклической форме, например, фураноз (C_5), такие как арабинофураноза, ликсофураноза, рибофураноза и ксилофураноза, и пираноз (C_6), такие как аллопираноза, альтропираноза, глюкопираноза, маннопираноза, гулопираноза, идопираноза, галактопираноза и талопираноза.

C_{5-20} арил: в настоящей заявке термин «C_{5-20} арил» относится к одновалентному фрагменту, полученному путем удаления атома водорода от атома ароматического кольца ароматического соединения, причем указанный фрагмент содержит от 3 до 20 кольцевых атомов. В настоящей заявке термин «C_{5-7} арил» относится к одновалентному фрагменту, полученному удалением атома водорода от атома ароматического кольца ароматического соединения, причем указанный фрагмент содержит от 5 до 7 кольцевых атомов, и в настоящей заявке термин «C_{5-10} арил» относится к одновалентному фрагменту, полученному удалением атома водорода от атома ароматического кольца ароматического соединения, причем указанный фрагмент содержит от 5 до 10 кольцевых атомов. Предпочтительно каждое кольцо содержит от 5 до 7 кольцевых атомов.

В этом случае префиксы (например, C_{3-20}, C_{5-7}, C_{5-6}, C_{5-10} и т. д.) обозначают количество кольцевых атомов или диапазон количества кольцевых атомов, будь то атомы углерода или гетероатомы. Например, в настоящей заявке термин «C_{5-6} арил» относится к арильной группе, содержащей 5 или 6 кольцевых атомов.

Все кольцевые атомы могут представлять собой атомы углерода, как в «карбоарильных группах».

Примеры карбоарильных групп включают, но не ограничиваются ими, группы, происходящие из бензола (т. е. фенила) (C_6), нафталина (C_{10}), азулена (C_{10}), антрацена (C_{14}), фенантрена (C_{14}), нафтацена (C_{18}) и пирена (C_{16}).

Примеры арильных групп, которые содержат конденсированные кольца, по меньшей мере одно из которых представляет собой ароматическое кольцо, включают, но не ограничиваются ими, группы, происходящие из индана (например, 2,3-дигидро-1H-индена) (C_9), индена (C_9), изоиндена (C_9), тетралина (1,2,3,4-тетрагидронафталина (C_{10}), аценафтена (C_{12}), флуорена (C_{13}), феналена (C_{13}), ацефенантрена (C_{15}) и ацеантрена (C_{16}).

Согласно другому варианту кольцевые атомы могут включать один или более гетероатомов, как в «гетероарильных группах». Примеры моноциклических гетероарильных групп включают, но не ограничиваются ими, группы, происходящие из:

N_1: пиррола (азола) (C_5), пиридина (азина) (C_6);

O_1: фурана (оксола) (C_5);

S_1: тиофена (тиола) (C_5);

N_1O_1: оксазола (C_5), изоксазола (C_5), изоксазина (C_6);

N_2O_1: оксадиазола (фуразана) (C_5);

N_3O_1: оксатриазола (C_5);

N_1S_1: тиазола (C_5), изотиазола (C_5);

N_2: имидазола (1,3-диазола) (C_5), пиразола (1,2-диазола) (C_5), пиридазина (1,2-диазина) (C_6), пиримидина (1,3-диазина) (C_6) (например, цитозина, тимина, урацила), пиразина (1,4-диазина) (C_6);

N_3: триазола (C_5), триазина (C_6); и,

N_4: тетразола (C_5).

Примеры гетероарила, который содержит конденсированные кольца, включают, но не ограничиваются ими:

C_9 (с 2 конденсированными кольцами), происходящий из бензофурана (O_1), изобензофурана (O_1), индола (N_1), изоиндола (N_1), индолизина (N_1), индолина (N_1), изоиндолина (N_1), пурина (N_4) (например, аденина, гуанина), бензимидазола (N_2), индазола (N_2), бензоксазола (N_1O_1), бензизоксазола (N_1O_1), бензодиоксола (O_2),

бензофуразана (N_2O_1), бензотриазола (N_3), бензотиофурана (S_1), бензотиазола (N_1S_1), бензотиадиазола (N_2S);

C_{10} (с 2 конденсированными кольцами), происходящий из хромена (O_1), изохромена (O_1), хромана (O_1), изохромана (O_1), бензодиоксана (O2), хинолина (N_1), изохинолина (N_1), хинолизина (N_1), бензоксазина (N_1O_1), бензодиазина (N_2), пиридопиридина (N_2), хиноксалина (N_2), хиназолина (N_2), циннолина (N_2), фталазина (N_2), нафтиридина (N_2), птеридина (N_4);

C_{11} (с 2 конденсированными кольцами), происходящий из бензодиазепина (N_2);

C_{13} (с 3 конденсированными кольцами), происходящий из карбазола (N_1), дибензофурана (O_1), дибензотиофена (S_1), карболина (N_2), перимидина (N_2), пиридоиндола (N_2); и,

C_{14} (с 3 конденсированными кольцами), происходящий из акридина (N_1), ксантена (O_1), тиоксантена (S_1), оксантрена (O_2), феноксатиина (O_1S_1), феназина (N_2), феноксазина (N_1O_1), фенотиазина (N_1S_1), тиантрена (S_2), фенантридина (N_1), фенантролина (N_2), феназина (N_2).

Вышеуказанные группы, независимо от того, являются ли они отдельными или частью другого заместителя, сами по себе необязательно могут быть замещены одной или более группами, выбранными из них самих и дополнительных заместителей, перечисленных ниже.

Галоген: -F, -Cl, -Br и -I.

Гидрокси: -OH.

Простой эфир: -OR, где R представляет собой простой эфирный заместитель, например, C_{1-7} алкильную группу (также называемую C_{1-7} алкоксигруппой, которая обсуждается ниже), C_{3-20} гетероциклильную группу (также называемую C_{3-20} гетероциклилоксигруппой) или C_{5-20} арильную группу (также называемую C_{5-20} арилоксигруппой), предпочтительно C_{1-7} алкильную группу.

Алкокси: -OR, где R представляет собой алкильную группу, например, C_{1-7} алкильную группу. Примеры C_{1-7} алкоксигрупп включают, но не ограничиваются ими, -OMe (метокси), -OEt (этокси), -O(nPr) (н-пропокси), -O(iPr) (изопропокси), -O(nBu) (н-бутокси), -O(sBu) (втор-бутокси), -O(iBu) (изобутокси) и -O(tBu) (трет-бутокси).

Карбокси (карбоновая кислота): -C(=O)OH.

Сложный эфир (карбоксилат, сложный эфир карбоновой кислоты, оксикарбонил): -C(=O)OR, где R представляет собой сложноэфирный заместитель, например, C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклильную группу или C_{5-20} арильную группу,

предпочтительно C_{1-7} алкильную группу. Примеры сложноэфирных групп включают, но не ограничиваются ими, -C(=O)OCH_3, -C(=O)OCH_2CH_3, -C(=O)$OC(CH_3)_3$ и -C(=O)OPh.

Амино: -NR^1R^2, где R^1 и R^2 независимо представляют собой амино заместители, например, водород, C_{1-7} алкильную группу (также называемую C_{1-7} алкиламино или ди-C_{1-7} алкиламино), C_{3-20} гетероциклильную группу или C_{5-20} арильную группу, предпочтительно H или C_{1-7} алкильную группу, или, в случае «циклической» аминогруппы, R^1 и R^2, вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют гетероциклическое кольцо, содержащее от 4 до 8 кольцевых атомов. Аминогруппы могут быть первичными (-NH_2), вторичными (-NHR^1) или третичными (-NHR^1R^2), а в катионной форме могут быть четвертичными (-+$NR^1R^2R^3$). Примеры аминогрупп включают, но не ограничиваются ими, -NH_2, -$NHCH_3$, -$NHC(CH_3)_2$, -$N(CH_3)_2$, -$N(CH_2CH_3)_2$ и -NHPh. Примеры циклических аминогрупп включают, но не ограничиваются ими, азиридино, азетидино, пирролидино, пиперидино, пиперазино, морфолино и тиоморфолино.

Амидо (карбамоил, карбамил, аминокарбонил, карбоксамид): -C(=O)NR^1R^2, где R^1 и R^2 независимо представляют собой амино заместители, определенные для аминогрупп. Примеры амидогрупп включают, но не ограничиваются ими, -C(=O)NH_2, -C(=O)$NHCH_3$, -C(=O)$N(CH_3)_2$, -C(=O)$NHCH_2CH_3$ и -C(=O)$N(CH_2CH_3)_2$, а также амидогруппы, в которых R^1 и R^2, вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют гетероциклическую структуру, например, как в пиперидинокарбониле, морфолинокарбониле, тиоморфолинокарбониле и пиперазинокарбониле.

Нитро: -NO_2.

Азидо: -N_3.

Циано (нитрил, карбонитрил): -CN.

Антитело

Антитело к DLK1

Согласно одному аспекту антитело представляет собой антитело, которое связывается с DLK1.

Гомологичный лиганду дельта белок 1 (DLK-1) представляет собой EGF-подобный мембраносвязанный белок, состоящий из шести тандемных EGF-подобных повторов, околомембранной области с сайтом расщепления, опосредуемого TACE (ADAM17), трансмембранного домена и короткого внутриклеточного хвоста. DLK-1 активно экспрессируется во время развития плода, но его экспрессия снижена и сильно ограничена у взрослых. Напротив, DLK-1 повторно экспрессируется в нескольких опухолях, таких как нейробластома, гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК), рабдомиосаркома, мелкоклеточный рак легких, миелодиспластический синдром и острый миелолейкоз. Интересно отметить,

что при ГЦК DLK-1, как было показано, является маркером стволовых раковых клеток, субпопуляции клеток, ответственных за инициацию, рост, метастазирование и рецидивирование опухоли.

В целом, DLK-1 представляет собой перспективную мишень для подхода на основе конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), вследствие его селективной экспрессии в широком диапазоне злокачественных новообразований и ограниченной экспрессии в здоровых органах, а также его экспрессии на стволовых раковых клетках ГЦК.

HuBa-1-3d

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 7. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения домен VH дополнительно содержит CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 6 и/или CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 5. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VH, содержащий CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 5, CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 6 и CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 7. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VH, содержащий последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 1.

Антитело может также содержать домен VL. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 10. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения домен VL дополнительно содержит CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 9 и/или CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 8. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 8, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 9 и CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 10. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VL, содержащий последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 2.

Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VH и домен VL. Предпочтительно VH содержит

последовательность SEQ ID NO. 1 и домен VL содержит последовательность SEQ ID NO. 2.

Домен (ы) VH и VL может (могут) спариваться с образованием антигенсвязывающего сайта антитела, который связывает DLK1.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой интактное антитело, содержащее домен VH, спаренный с доменом VL, при этом домены VH и VL содержат последовательности SEQ ID NO. 1, спаренную с SEQ ID NO. 2.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 3, спаренную с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO. 4. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой интактное антитело, содержащее две тяжелые цепи, содержащие последовательность SEQ ID NO. 3, каждая из которых спарена с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO. 4.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 11, спаренную с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO. 4. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой интактное антитело, содержащее две тяжелые цепи, содержащие последовательность SEQ ID NO. 11, каждая из которых спарена с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO. 4.

Согласно одному аспекту антитело представляет собой антитело, описанное в настоящей заявке, которое было модифицировано (или дополнительно модифицировано), как описано ниже. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой гуманизированный вариант, деиммунизированный вариант или вариант с измененной поверхностью антитела, раскрытого в настоящей заявке.

Антитело к KAAG1

Согласно одному аспекту антитело представляет собой антитело, которое связывается с KAAG1.

Антитело 3A4

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 107. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения домен VH дополнительно содержит CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID

NO. 106 и/или CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 105. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VH, содержащий CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 105, CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 106 и CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 107. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VH, содержащий последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 101.

Антитело может также содержать домен VL. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 110. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения домен VL дополнительно содержит CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 109 и/или CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 108. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 108, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 109 и CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 110. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VL, содержащий последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 102, SEQ ID NO. 113 или SEQ ID NO. 115.

Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VH и домен VL. Предпочтительно VH содержит последовательность SEQ ID NO. 101 и домен VL содержит последовательность SEQ ID NO. 102, SEQ ID NO. 113 или SEQ ID NO. 115.

Домен (ы) VH и VL может (могут) спариваться с образованием антигенсвязывающего сайта антитела, который связывает KAAG1.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой интактное антитело, содержащее домен VH, спаренный с доменом VL, при этом домены VH и VL содержат последовательности SEQ ID NO. 101, спаренную с SEQ ID NO. 102, SEQ ID NO. 113 или SEQ ID NO. 115.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 103, спаренную с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO. 104, SEQ ID NO. 114 или SEQ ID NO. 116. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой интактное антитело, содержащее две тяжелые цепи, содержащие

последовательность SEQ ID NO. 103, каждая из которых спарена с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO. 104, SEQ ID NO. 114 или SEQ ID NO. 116.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 111, спаренную с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO. 104, SEQ ID NO. 114 или SEQ ID NO. 116. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой интактное антитело, содержащее две тяжелые цепи, содержащие последовательность SEQ ID NO. 111, каждая из которых спарена с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO. 104, SEQ ID NO. 114 или SEQ ID NO. 116.

Согласно одному аспекту антитело представляет собой антитело, описанное в настоящей заявке, которое было модифицировано (или дополнительно модифицировано), как описано ниже. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой гуманизированный вариант, деиммунизированный вариант или вариант с измененной поверхностью антитела, раскрытого в настоящей заявке.

Антитело к мезотелину

Согласно одному аспекту антитело представляет собой антитело, которое связывается с мезотелином.

ADCT-XA4

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 207. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения домен VH дополнительно содержит CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 206 и/или CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 205. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VH, содержащий CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 205, CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 206 и CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 207. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VH, содержащий последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 201.

Антитело может также содержать домен VL. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 210. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения домен VL дополнительно содержит CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 209 и/или CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 208. Согласно некоторым вариантам реализации

настоящего изобретения антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 208, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 209 и CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 210. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VL, содержащий последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 202.

Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VH и домен VL. Предпочтительно VH содержит последовательность SEQ ID NO. 201 и домен VL содержит последовательность SEQ ID NO. 202.

Домен (ы) VH и VL может (могут) спариваться с образованием антигенсвязывающего сайта антитела, который связывает мезотелин.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой интактное антитело, содержащее домен VH, спаренный с доменом VL, при этом домены VH и VL содержат последовательности SEQ ID NO. 201, спаренную с SEQ ID NO. 202.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 203, спаренную с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO. 204. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой интактное антитело, содержащее две тяжелые цепи, содержащие последовательность SEQ ID NO. 203, каждая из которых спарена с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO. 204.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 211, спаренную с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO. 204. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой интактное антитело, содержащее две тяжелые цепи, содержащие последовательность SEQ ID NO. 211, каждая из которых спарена с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO. 204.

ADCT-XFT

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 218. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения домен VH дополнительно содержит CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID

NO. 217 и/или CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 216. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VH, содержащий CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 216, CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 217 и CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 218. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VH, содержащий последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 212.

Антитело может также содержать домен VL. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 221. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения домен VL дополнительно содержит CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 220 и/или CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 219. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 219, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 220 и CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 221. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VL, содержащий последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 213.

Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VH и домен VL. Предпочтительно VH содержит последовательность SEQ ID NO. 212 и домен VL содержит последовательность SEQ ID NO. 213.

Домен (ы) VH и VL может (могут) спариваться с образованием антигенсвязывающего сайта антитела, который связывает мезотелин.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой интактное антитело, содержащее домен VH, спаренный с доменом VL, при этом домены VH и VL содержат последовательности SEQ ID NO. 212, спаренную с SEQ ID NO. 213.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 214, спаренную с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO. 215. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой интактное антитело, содержащее две тяжелые цепи, содержащие последовательность SEQ ID NO.

214, каждая из которых спарена с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO. 215.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 222, спаренную с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO. 215. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой интактное антитело, содержащее две тяжелые цепи, содержащие последовательность SEQ ID NO. 222, каждая из которых спарена с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO. 215.

ADCT-X09

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 229. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения домен VH дополнительно содержит CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 228 и/или CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 227. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VH, содержащий CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 227, CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 228 и CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 229. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VH, содержащий последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 223.

Антитело может также содержать домен VL. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 232. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения домен VL дополнительно содержит CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 231 и/или CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 230. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 230, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 231 и CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 232. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VL, содержащий последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 224.

Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VH и домен VL. Предпочтительно VH содержит

последовательность SEQ ID NO. 223 и домен VL содержит последовательность SEQ ID NO. 224.

Домен (ы) VH и VL может (могут) спариваться с образованием антигенсвязывающего сайта антитела, который связывает мезителин.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой интактное антитело, содержащее домен VH, спаренный с доменом VL, при этом домены VH и VL содержат последовательности SEQ ID NO. 223, спаренную с SEQ ID NO. 224.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 225, спаренную с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO. 226. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой интактное антитело, содержащее две тяжелые цепи, содержащие последовательность SEQ ID NO. 225, каждая из которых спарена с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO. 226.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 233, спаренную с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO. 226. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой интактное антитело, содержащее две тяжелые цепи, содержащие последовательность SEQ ID NO. 233, каждая из которых спарена с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO. 226.

ADCT-X09.2

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 240. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения домен VH дополнительно содержит CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 239 и/или CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 238. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VH, содержащий CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 238, CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 239 и CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 240. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VH, содержащий последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 234.

Антитело может также содержать домен VL. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 243. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения домен VL дополнительно содержит CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 242 и/или CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 241. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VL, содержащий CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 241, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 242 и CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 243. Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VL, содержащий последовательность в соответствии с SEQ ID NO. 235.

Согласно предпочтительным вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит домен VH и домен VL. Предпочтительно VH содержит последовательность SEQ ID NO. 234 и домен VL содержит последовательность SEQ ID NO. 235.

Домен (ы) VH и VL может (могут) спариваться с образованием антигенсвязывающего сайта антитела, который связывает мезотелин.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой интактное антитело, содержащее домен VH, спаренный с доменом VL, при этом домены VH и VL содержат последовательности SEQ ID NO. 234, спаренную с SEQ ID NO. 235.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 236, спаренную с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO. 237. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой интактное антитело, содержащее две тяжелые цепи, содержащие последовательность SEQ ID NO. 236, каждая из которых спарена с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO. 237.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 244, спаренную с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO. 237. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело представляет собой интактное антитело, содержащее две тяжелые цепи, содержащие последовательность SEQ ID NO.

244, каждая из которых спарена с легкой цепью, содержащей последовательность SEQ ID NO. 237.

Терминология

В настоящей заявке термин «антитело» используется в самом широком смысле и включает, в частности, моноклональные антитела, поликлональные антитела, димеры, мультимеры, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), интактные антитела и фрагменты антител, при условии, что они проявляют целевую биологическую активность, например, способность связывать DLK1, KAAG1 или мезотелин. Антитела могут быть мышиными, человеческими, гуманизированными, химерными или происходящими из других видов. Антитело представляет собой белок, вырабатываемый иммунной системой, который способен распознавать и связываться с конкретным антигеном. (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immuno Biology, 5 изд., Garland Publishing, New York). Антиген-мишень обычно имеет множество сайтов связывания, также называемых эпитопами, распознаваемых CDR на множестве антител. Каждое антитело, которое специфично связывается с отличающимся эпитопом, имеет отличающуюся структуру. Таким образом, один антиген может иметь более одного соответствующего антитела. Антитело включает полноразмерную молекулу иммуноглобулина или иммунологически активную часть полноразмерной молекулы иммуноглобулина, т. е. молекулу, которая содержит антигенсвязывающий сайт, который иммуноспецифически связывает антиген мишени, представляющей интерес, или его часть, причем такие мишени включают, но не ограничиваются ими, раковую клетку или клетки, которые вырабатывают аутоиммунные антитела, ассоциированные с аутоиммунным заболеванием. Иммуноглобулин может быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса или аллотипа (например, G1m1, G1m2, G1m3, не-G1m1 человека [т.е. любой аллотип, кроме G1m1], G1m17, G2m23, G3m21, G3m28, G3m11, G3m5, G3m13, G3m14, G3m10, G3m15, G3m16, G3m6, G3m24, G3m26, G3m27, A2m1, A2m2, Km1, Km2 и Km3) молекулы иммуноглобулина. Иммуноглобулины могут происходить из любых видов, включая человека, мышь или кролика.

В настоящей заявке термин «связывает DLK1» означает, что антитело связывает DLK1 с более высокой аффинностью, чем неспецифический партнер, такой как бычий сывороточный альбумин (БСА, номер доступа в Genbank CAA76847, вариант № CAA76847.1 GI:3336842, дата обновления записи: 7 января 2011, 14 ч 30 мин). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело связывает DLK1 с константой ассоциации (K_a), которая по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500,

1000, 2000, 5000, 10^4, 10^5 или 10^6 раз выше, чем константа ассоциации антитела для БСА, при измерении в физиологических условиях. Антитела согласно настоящему изобретению могут связывать DLK1 с высокой аффинностью. Например, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело может связывать DLK1 с K_D, которая равна или меньше примерно 10^{-6} М, такой как 1×10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}, 10^{-12}, 10^{-13} или 10^{-14}.

DLK1 является членом EGF-подобного семейства гомеозисных белков. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид DLK1 соответствует номеру доступа в Genbank CAA78163, вариант № CAA78163.1, дата обновления записи: 2 февраля 2011 г., 10 ч 34 мин (SEQ ID NO. 12). Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид DLK1, соответствует номеру доступа в Genbank Z12172, вариант № Z12172.1, дата обновления записи: 2 февраля 2011 г., 10 ч 34 мин. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения DLK1 содержит последовательность SEQ ID NO. 13.

В настоящей заявке термин «связывает KAAG1» означает, что антитело связывает KAAG1 с более высокой аффинностью, чем неспецифический партнер, такой как бычий сывороточный альбумин (БСА, номер доступа в Genbank CAA76847, вариант № CAA76847.1 GI:3336842, дата обновления записи: 7 января 2011 г., 14 ч 30 мин). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело связывает KAAG1 с константой ассоциации (K_a), которая по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000, 10^4, 10^5 или 10^6 раз выше, чем константа ассоциации антитела для БСА, при измерении в физиологических условиях. Антитела согласно настоящему изобретению могут связывать KAAG1 с высокой аффинностью. Например, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело может связывать KAAG1 с K_D, которая равна или меньше примерно 10^{-6} М, такой как 1×10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}, 10^{-12}, 10^{-13} или 10^{-14}.

KAAG1 (ассоциированный с почками антиген 1) экспрессируется в яичках и почках и, на более низких уровнях, в мочевом пузыре и печени. Он экспрессируется большим количеством опухолей различного гистологического происхождения, включая меланомы, саркомы и колоректальные карциномы. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид KAAG1 соответствует номеру доступа в Genbank AAF23613, вариант № AAF23613.1. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид KAAG1, соответствует номеру доступа в Genbank AF181722, вариант № AF181722.1. Согласно некоторым

вариантам реализации настоящего изобретения полипептид KAAG1 содержит последовательность SEQ ID NO. 112.

В настоящей заявке термин «связывает мезотелин» означает, что антитело связывает мезотелин с более высокой аффинностью, чем неспецифический партнер, такой как бычий сывороточный альбумин (БСА, номер доступа в Genbank CAA76847, вариант № CAA76847.1 GI:3336842, дата обновления записи: 7 января 2011 г., 14 ч 30 мин). Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело связывает мезотелин с константой ассоциации (K_a), которая по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000, 10^4, 10^5 или 10^6 раз выше, чем константа ассоциации антитела для БСА, при измерении в физиологических условиях. Антитела согласно настоящему изобретению могут связывать мезотелин с высокой аффинностью. Например, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитело может связывать мезотелин с K_D, которая равна или меньше примерно 10^{-6} М, такой как 1×10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}, 10^{-12}, 10^{-13} или 10^{-14}.

Мезотелин представляет собой белок массой 40 кДа, присутствующий на нормальных мезотелиальных клетках. Ген мезотелина кодирует белок-предшественник, который подвергается процессингу с образованием мезотелина, который присоединен к клеточной мембране с помощью гликофосфатидилинозитольной связи, а также отщепленного фрагмента массой 31 кДа, называемого фактором, стимулирующим мегакариоциты (MPF). Было высказано предположение, что мезотелин может участвовать в адгезии клеток. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид мезотелина соответствует номеру доступа в Genbank AAC50348, вариант № AAC50348.1, дата обновления записи: 23 июня 2010 г., 9 ч 12 мин. Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид мезотелина, соответствует номеру доступа в Genbank U40434, вариант № U40434.1, дата обновления записи: 23 июня 2010 г., 9 ч 12 мин. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид мезотелина содержит последовательность SEQ ID NO. 245. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения полипептид мезотелина содержит последовательность SEQ ID NO. 246

«Фрагменты антитела» содержат часть полноразмерного антитела, обычно его антигенсвязывающую или вариабельную область. Примеры фрагментов антитела включают фрагменты Fab, Fab′, $F(ab')_2$ и scFv; диатела; линейные антитела; фрагменты, вырабатываемые библиотекой экспрессии Fab, антиидиотипические (анти-Id) антитела, CDR (область, определяющая комплементарность) и эпитопсвязывающие фрагменты

любого из вышеуказанных, которые иммуноспецифически связываются с антигенами раковых клеток, вирусными антигенами или микробными антигенами, одноцепочечные молекулы антител; и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

В настоящей заявке термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т. е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными и направлены против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые включают разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. В дополнение к их специфичности преимущество моноклональных антител заключается в том, что их можно синтезировать без загрязнения другими антителами. Обстоятельство «моноклональный» указывает на характеристику антитела, как полученного из по существу гомогенной популяции антител, и оно не должно быть истолковано как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела для применения в соответствии с настоящим изобретением могут быть получены методом гибридомы, впервые описанным Kohler et al (1975) Nature 256:495, или могут быть получены методами рекомбинантной ДНК (см. US 4816567). Моноклональные антитела также могут быть выделены из фаговых библиотек антител с применением методик, описанных в Clackson et al. (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al. (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597, или из трансгенных мышей, несущих полностью человеческую иммуноглобулиновую систему (Lonberg (2008) Curr. Opinion 20(4):450-459).

Моноклональные антитела в настоящей заявке, в частности, включают «химерные» антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепей идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих из конкретного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, тогда как остальная часть цепи (ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих из другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагментам таких антител, при условии, что они проявляют целевую биологическую активность (US 4816567; и Morrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855). Химерные антитела включают «приматизированные» антитела, содержащие антигенсвязывающие последовательности вариабельного домена,

происходящие из примата, отличного от человека (например, обезьяны Старого света или человекообразной обезьяны), и последовательности константных областей человека.

В настоящей заявке «интактное антитело» представляет собой антитело, содержащее домены VL и VH, а также константный домен легкой цепи (CL) и константные домены тяжелой цепи, CH1, CH2 и CH3. Константные домены могут представлять собой константные домены с нативной последовательностью (например, константные домены человека с нативной последовательностью) или с вариантом их аминокислотной последовательности. Интактное антитело может иметь одну или более «эффекторных функций», которые относятся к тем видам биологической активности, которые связаны с областью Fc (областью Fc с нативной последовательностью или областью Fc с вариантом аминокислотной последовательности) антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают связывание C1q; комплементзависимую цитотоксичность; связывание с рецептором Fc; антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ); фагоцитоз; и подавление рецепторов клеточной поверхности, таких как B-клеточный рецептор и BCR.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей интактные антитела можно отнести к различным «классам». Существует пять основных классов интактных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть далее разделены на «подклассы» (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам антител, называются α, δ, ε, γ и μ, соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

Модификация антител

Антитела, раскрытые в настоящей заявке, могут быть модифицированы. Например, для того чтобы сделать их менее иммуногенными для субъекта-человека. Это можно осуществить с применением любой из ряда методик, известных специалисту в данной области техники. Некоторые из этих методик более подробно описаны ниже.

Гуманизация

Методики снижения иммуногенности не относящегося к человеку антитела или фрагмента антитела *in vivo* включают методики, названные «гуманизация».

«Гуманизированное антитело» относится к полипептиду, содержащему по меньшей мере часть модифицированной вариабельной области антитела человека, причем часть вариабельной области, предпочтительно часть по существу меньшая, чем интактный вариабельный домен человека, была заменена соответствующей последовательностью из вида, отличного от человека, и при этом модифицированная вариабельная область соединена с по меньшей мере другой частью другого белка, предпочтительно с

константной областью антитела человека. Выражение «гуманизированные антитела» включает антитела человека, в которых один или более остатков аминокислот области, определяющей комплементарность («CDR»), и/или один или более остатков аминокислот каркасного участка («FW» или «FR») заменены остатками аминокислот из аналогичных сайтов в антителах грызунов или других видов, отличных от человека. Выражение «гуманизированное антитело» также включает вариант аминокислотной последовательности иммуноглобулина или ее фрагмент, который содержит FR, содержащий по существу аминокислотную последовательность иммуноглобулина человека, и CDR, содержащий по существу аминокислотную последовательность иммуноглобулина, не относящегося к человеку.

«Гуманизированные» формы антител, не относящихся к человеку (например, мышиных), представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, происходящую из иммуноглобулина, не относящегося к человеку. Или, с другой стороны, гуманизированное антитело представляет собой антитело человека, которое также содержит выборочные последовательности антител, не относящихся к человеку (например, мышиных), вместо последовательностей человека. Гуманизированное антитело может включать консервативные замены аминокислот или неприродные остатки из одного и того же или разных видов, которые существенно не изменяют его связывающую и/или биологическую активность. Такие антитела представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, происходящую из иммуноглобулинов, не относящихся к человеку.

Существует ряд методик гуманизации, включая «прививку CDR», «направляемый отбор», «деиммунизацию», «изменение поверхности» (также известное как «рекомбинация поверхностных остатков»), «составные антитела», «оптимизацию содержания участков последовательности человека» и перестановку каркасных участков.

Прививка CDR

В этой методике гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентное антитело), в которых остатки из области, определяющей комплементарность (CDR), реципиентного антитела заменены остатками CDR из вида, отличного от человека (донорное антитело), такого как мышь, крыса, верблюд, крупный рогатый скот, коза или кролик, обладающего целевыми свойствами (по сути CDR, не относящиеся к человеку, «прививают» на каркас человека). В некоторых случаях остатки каркасного участка (FR) иммуноглобулина человека заменяют соответствующими остатками, не относящимися к человеку (это может происходить, например, если конкретный остаток FR оказывает значительное влияние на связывание антигена).

Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не обнаружены ни в реципиентном антителе, ни в импортированных CDR или каркасных последовательностях. Эти модификации вносят для дальнейшего улучшения и максимального повышения эффективности антител. Таким образом, в целом гуманизированное антитело будет содержать все из по меньшей мере одного и в одном аспекте двух вариабельных доменов, в которых все или все из гипервариабельных петель соответствуют таковым в иммуноглобулине, не относящемся к человеку, и все или по существу все из участков FR представляют собой последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело необязательно также будет содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc) или таковую из иммуноглобулина человека.

Направляемый отбор

Способ заключается в комбинировании домена V_H или V_L конкретного антитела, не относящегося к человеку, специфичного для конкретного эпитопа, с библиотекой V_H или V_L человека, и конкретные V-домены человека отбирают против антигена, представляющего интерес. Отобранный VH человека затем комбинируют с библиотекой VL для создания полностью человеческой комбинации VH×VL. Способ описан в Nature Biotechnology (N.Y.) 12, (1994) 899-903.

Составные антитела

В этом способе два или более сегментов аминокислотной последовательности из антитела человека комбинируют внутри готовой молекулы антитела. Их конструируют путем комбинирования нескольких сегментов последовательностей VH и VL человека в комбинациях, которые ограничивают или позволяют избежать Т-клеточных эпитопов человека в V-областях готового составного антитела. При необходимости Т-клеточные эпитопы ограничивают или их устраняют путем замены сегментов V-области, вносящих вклад или кодирующих Т-клеточный эпитоп, альтернативными сегментами, которые позволяют избежать Т-клеточных эпитопов. Этот способ описан в US 2008/0206239 A1.

Деиммунизация

Этот способ включает удаление Т-клеточных эпитопов человека (или другого второго вида) из V-областей терапевтического антитела (или другой молекулы). Последовательность V-области терапевтических антител анализируют на присутствие мотивов, связывающих ГКГС класса II, например, путем сравнения с базами данных мотивов, связывающих ГКГС (такими как база данных «мотивов», размещенная на сайте www.wehi.edu.au). Согласно другому варианту мотивы, связывающие ГКГС класса II, могут быть идентифицированы с применением вычислительных способов

«протягивания», таких как способы, разработанные Altuvia et al. (J. Mol. Biol. 249 244-250 (1995)); в этих способах последовательные перекрывающиеся пептиды из последовательностей V-области тестируют для определения их энергии связывания с белками ГКГС класса II. Эти данные затем могут быть объединены с информацией о других признаках последовательности, которые относятся к успешно презентированным пептидам, таких как амфипатичность, мотивы Ротбарда и сайты расщепления для катепсина B и других ферментов процессинга.

После выявления потенциальных Т-клеточных эпитопов второго вида (например, человека) их устраняют путем изменения одной или более аминокислот. Модифицированные аминокислоты обычно находятся внутри самого Т-клеточного эпитопа, но также могут быть смежными с эпитопом с точки зрения первичной или вторичной структуры белка (и, следовательно, могут не быть смежными в первичной структуре). Чаще всего изменение происходит путем замены, но в некоторых случаях более подходящим будет добавление или удаление аминокислоты.

Все изменения можно осуществлять с помощью технологии рекомбинантных ДНК так, что готовая молекула может быть получена путем экспрессии в рекомбинантном хозяине с применением хорошо известных способов, таких как сайт-направленный мутагенез. Однако также возможно применение белковой химии или любых других средств молекулярного изменения.

Изменение поверхности

Этот способ включает:

(a) определение конформационной структуры вариабельной области антитела (или его фрагмента), не относящегося к человеку (например, грызуна), путем построения трехмерной модели вариабельной области антитела, не относящегося к человеку;

(b) получение выравниваний последовательностей с применением распределений относительной доступности из рентгеновских кристаллографических структур достаточного количества вариабельных областей тяжелой и легкой цепей антитела, не относящегося к человеку, и антитела человека, чтобы получить группу положений каркаса тяжелой и легкой цепей, где положения выравнивания идентичны в 98% от достаточного количества тяжелых и легких цепей антитела, не относящегося к человеку;

(c) определение для антитела, не относящегося к человеку, подлежащего гуманизации, группы аминокислотных остатков, экспонированных на поверхности тяжелой и легкой цепей, с применением группы положений каркаса, полученной на этапе (b);

(d) выявление в аминокислотных последовательностях антитела человека группы аминокислотных остатков, экспонированных на поверхности тяжелой и легкой цепей, которая наиболее идентична группе аминокислотных остатков, экспонированных на поверхности, определенной на этапе (c), при этом тяжелая и легкая цепи из антитела человека спарены или не спарены естественным образом;

(e) замену группы аминокислотных остатков, экспонированных на поверхности тяжелой и легкой цепей, определенной на этапе (c), в аминокислотной последовательности антитела, не относящегося к человеку, подлежащего гуманизации, группой аминокислотных остатков, экспонированных на поверхности тяжелой и легкой цепей, выявленной на этапе (d);

(f) построение трехмерной модели вариабельной области антитела, не относящегося к человеку, полученной в результате замены, указанной на этапе (e);

(g) выявление путем сравнения трехмерных моделей, построенных на этапах (a) и (f), любых аминокислотных остатков из групп, выявленных на этапах (c) или (d), которые находятся в пределах 5 Ангстрем от любого атома любого остатка из областей, определяющих комплементарность, антитела, не относящегося к человеку, которое должно быть гуманизировано; и

(h) замену любых остатков человека, выявленных на этапе (g), исходным аминокислотным остатком, не относящимся к человеку, чтобы определить гуманизирующую группу аминокислотных остатков, экспонированных на поверхности, антитела, не относящегося к человеку; при условии, что этап (a) не обязательно должен проводиться первым, а должен быть проведен перед этапом (g).

Супергуманизация

Способ позволяет сравнивать последовательность, не относящуюся к человеку, с функциональным репертуаром генов зародышевой линии человека. Отбирают гены человека, кодирующие канонические структуры, идентичные или тесно связанные с последовательностями, не относящимися к человеку. Отобранные гены человека с самой высокой гомологией в пределах CDR выбирают в качестве доноров FR. Наконец, CDR, не относящиеся к человеку, прививают на эти FR человека. Этот способ описан в патенте WO 2005/079479 A2.

Оптимизация состава участков последовательности человека

Этот способ позволяет сравнить последовательность, не являющуюся человеческой (например, мышиную), с репертуаром генов зародышевых линий человека, и различия оценивают как содержание участков последовательности человека (HSC), которое количественно определяет последовательность на уровне потенциальных ГКГС/Т-

клеточных эпитопов. Последовательность-мишень затем гуманизируют путем максимального увеличения ее HSC вместо применения меры общей идентичности для получения множества разнообразных гуманизированных вариантов (описано в Molecular Immunology, 44, (2007) 1986–1998).

Перестановка каркасных участков

CDR антитела, не относящегося к человеку, гибридизуют в пределах рамки считывания с пулами кДНК, охватывающими все известные гены каркасных участков тяжелой и легкой цепей зародышевой линии человека. Затем гуманизированные антитела отбирают, например, путем пэннинга библиотеки фагового дисплея антител. Это описано в Methods 36, 43-60 (2005).

Модификация антитела с применением азида

Антитело может быть получено для конъюгации с линкером лекарственного средства с помощью трехэтапного способа:

(1) Экспрессия антитела (Ab), несущего центральный N-гликан, в подходящей системе экспрессии (например, клеточной линии CHO). Центральный N-гликан, как правило, конъюгирован с Asn297 тяжелой цепи в соответствии с системой нумерации Kabat;

(2) Обрезка всех гликановых изоформ (сложного, гибридного, с высоким содержанием маннозы) эндогликозидазой для высвобождения центрального GlcNAc; и

(3) Ферментативный перенос к центральному GlcNAc остатка N-ацетилгалактозы, несущего азидную группу, для конъюгации с линкером лекарственного средства.

Обзор вышеупомянутого способа изложен в van Geel, R., et al., Bioconjugate Chemistry, 2015, 26, 2233−2242; DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00224. В качестве альтернативы можно использовать однореакторный способ - см. примеры.

Варианты реализации

X

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения X представляет собой одинарную связь.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения X представляет собой $-CH_2-$.

Согласно дополнительным вариантам реализации настоящего изобретения X представляет собой $-C_2H_4-$.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения n составляет от 1 до 4.

Согласно некоторым из этих вариантов реализации настоящего изобретения n равно 1.

Согласно другим из этих вариантов реализации настоящего изобретения n равно 2.

Согласно другим из этих вариантов реализации настоящего изобретения n равно 4.

R^7

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения R^7 представляет собой метил.

Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения R^7 представляет собой фенил.

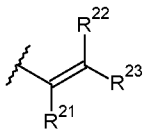
R^2

Если между C2 и C3 присутствует двойная связь, R^2 выбран из:

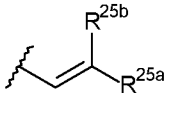
(a) C_{5-10} арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, включающей: галоген, нитро, циано, простой эфир, C_{1-7} алкил, C_{3-7} гетероциклил и бис-окси-C_{1-3} алкилен;

(b) C_{1-5} насыщенного алифатического алкила;

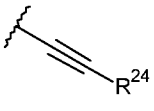
(c) C_{3-6} насыщенного циклоалкила;

(d) 

, где каждый из R^{21}, R^{22} и R^{23} независимо выбран из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, причем общее число атомов углерода в группе R^2 составляет не более 5;

(e) 

, где один из R^{25a} и R^{25b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; и

(f) 

, где R^{24} выбран из: H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила.

Если R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, она может представлять собой C_{5-7} арильную группу. C_{5-7} арильная группа может представлять собой фенильную группу или C_{5-7} гетероарильную группу, например, фуранил, тиофенил и пиридил. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения R^2 предпочтительно представляет собой фенил. Согласно другим вариантам реализации настоящего

изобретения R^{12} предпочтительно представляет собой тиофенил, например, тиофен-2-ил и тиофен-3-ил.

Если R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, она может представлять собой C_{8-10} арил, например, хинолинильную или изохинолинильную группу. Хинолинильная или изохинолинильная группа может быть связана с центральной частью ПБД за счет любого доступного положения кольца. Например, хинолинил может представлять собой хинолин-2-ил, хинолин-3-ил, хинолин-4-ил, хинолин-5-ил, хинолин-6-ил, хинолин-7-ил и хинолин-8-ил. Из них предпочтительными могут быть хинолин-3-ил и хинолин-6-ил. Изохинолинил может представлять собой изохинолин-1-ил, изохинолин-3-ил, изохинолин-4-ил, изохинолин-5-ил, изохинолин-6-ил, изохинолин-7-ил и изохинолин-8-ил. Из них предпочтительными могут быть изохинолин-3-ил и изохинолин-6-ил.

Если R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, она может нести любое количество групп-заместителей. Она предпочтительно несет от 1 до 3 групп-заместителей, причем 1 и 2 являются более предпочтительными, а наиболее предпочтительными являются однократно замещенные группы. Заместители могут находиться в любом положении.

Если R^2 представляет собой C_{5-7} арильную группу, одиночный заместитель предпочтительно находится на кольцевом атоме, который не является смежным со связью с остальной частью соединения, т.е. предпочтительно это β или γ по отношению к остальной части соединения. Следовательно, если C_{5-7} арильная группа представляет собой фенил, заместитель предпочтительно находится в мета- или пара-положениях и более предпочтительно находится в пара-положении.

Если R^2 представляет собой C_{8-10} арильную группу, например, хинолинил или изохинолинил, она может нести любое количество заместителей в любом положении хинолинового или изохинолинового колец. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения она несет один, два или три заместителя, и они могут находиться либо на проксимальном и дистальном кольцах, либо на обоих (если присутствует более одного заместителя).

Заместители R^2, если R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу

Если заместитель на R^2, когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой галоген, это предпочтительно F или Cl, более предпочтительно Cl.

Если заместитель на R^2, когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой простой эфир, он может, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, представлять собой алкоксигруппу, например, C_{1-7} алкоксигруппу (например, метокси, этокси), или он может, согласно некоторым вариантам

реализации настоящего изобретения, представлять собой C_{5-7} арилоксигруппу (например, фенокси, пиридилокси, фуранилокси). Сама алкоксигруппа может быть дополнительно замещена, например, аминогруппой (например, диметиламино).

Если заместитель на R^2, когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой C_{1-7} алкил, он предпочтительно может представлять собой C_{1-4} алкильную группу (например, метил, этил, пропил, бутил).

Если заместитель на R^2, когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой C_{3-7} гетероциклил, он может, согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения, представлять собой C_6 азотсодержащую гетероциклильную группу, например, морфолино, тиоморфолино, пиперидинил, пиперазинил. Эти группы могут быть связаны с остальной частью фрагмента ПБД за счет атома азота. Эти группы могут быть дополнительно замещены, например, C_{1-4} алкильными группами. Если C_6 азотсодержащая гетероциклильная группа представляет собой пиперазинил, указанный дополнительный заместитель может находиться на втором кольцевом атоме азота.

Если заместитель на R^2, когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой бис-окси-C_{1-3} алкилен, это предпочтительно бис-оксиметилен или бис-оксиэтилен.

Если заместитель на R^2, когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, представляет собой сложный эфир, это предпочтительно сложный метиловый эфир или сложный этиловый эфир.

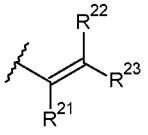
Особенно предпочтительные заместители, когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, включают метокси, этокси, фтор, хлор, циано, бис-оксиметилен, метилпиперазинил, морфолино и метилтиофенил. Другими особенно предпочтительными заместителями для R^2 являются диметиламинопропилокси и карбокси.

Особенно предпочтительные замещенные группы R^2, когда R^2 представляет собой C_{5-10} арильную группу, включают, но не ограничиваются ими, 4-метоксифенил, 3-метоксифенил, 4-этоксифенил, 3-этоксифенил, 4-фторфенил, 4-хлорфенил, 3,4-бисоксиметиленфенил, 4-метилтиофенил, 4-цианофенил, 4-феноксифенил, хинолин-3-ил и хинолин-6-ил, изохинолин-3-ил и изохинолин-6-ил, 2-тиенил, 2-фуранил, метоксинафтил и нафтил. Другой возможной замещенной группой R^2 является 4-нитрофенил. Группы R^2, представляющие особый интерес, включают 4-(4-метилпиперазин-1-ил)фенил и 3,4-бисоксиметиленфенил.

Если R^2 представляет собой C_{1-5} насыщенный алифатический алкил, он может представлять собой метил, этил, пропил, бутил или пентил. Согласно некоторым

вариантам реализации настоящего изобретения он может представлять собой метил, этил или пропил (н-пентил или изопропил). Согласно некоторым из этих вариантов реализации он может представлять собой метил. Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения он может представлять собой бутил или пентил, который может быть линейным или разветвленным.

Если R^2 представляет собой C_{3-6} насыщенный циклоалкил, он может представлять собой циклопропил, циклобутил, циклопентил или циклогексил. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения он может представлять собой циклопропил.

Если R^2 представляет собой 

, каждый из R^{21}, R^{22} и R^{23} независимо выбран из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, причем общее число атомов углерода в группе R^2 составляет не более 5. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения общее число атомов углерода в группе R^2 составляет не более 4 или не более 3.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения один из R^{21}, R^{22} и R^{23} представляет собой H, при этом две другие группы выбраны из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения два из R^{21}, R^{22} и R^{23} представляют собой H, при этом другая группа выбрана из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения группы, которые не являются H, выбраны из метила и этила. В некоторых из этих вариантов реализации группы, которые не являются H, представляют собой метил.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения R^{21} представляет собой H.

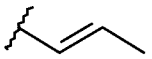
Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения R^{22} представляет собой H.

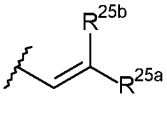
Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения R^{23} представляет собой H.

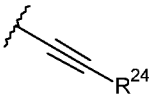
Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения R^{21} и R^{22} представляют собой H.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения R^{21} и R^{23} представляют собой H.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения R^{22} и R^{23} представляют собой H.

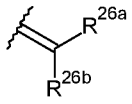
Группа R^2, представляющая особый интерес, представляет собой:  .

Если R^2 представляет собой  , один из R^{25a} и R^{25b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения группа, которая не является H, представляет собой необязательно замещенный фенил. Если необязательный заместитель фенила представляет собой галоген, он предпочтительно представляет собой фтор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фенильная группа является незамещенной.

Если R^2 представляет собой  , R^{24} выбран из: H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила. Если необязательный заместитель фенила представляет собой галоген, он предпочтительно представляет собой фтор. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения фенильная группа является незамещенной.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения R^{24} выбран из H, метила, этила, этенила и этинила. Согласно некоторым из этих вариантов реализации R^{24} выбран из H и метила.

Если между C2 и C3 присутствует одинарная связь,

R^2 представляет собой  , где R^{26a} и R^{26b} независимо выбраны из H, F, C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, причем алкильная и алкенильная группы необязательно замещены группой, выбранной из C_{1-4} алкиламидо и C_{1-4} алкилового сложного эфира; или, если один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, другой выбран из нитрила и C_{1-4} алкилового сложного эфира.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предпочтительно R^{26a} и R^{26b} оба представляют собой H.

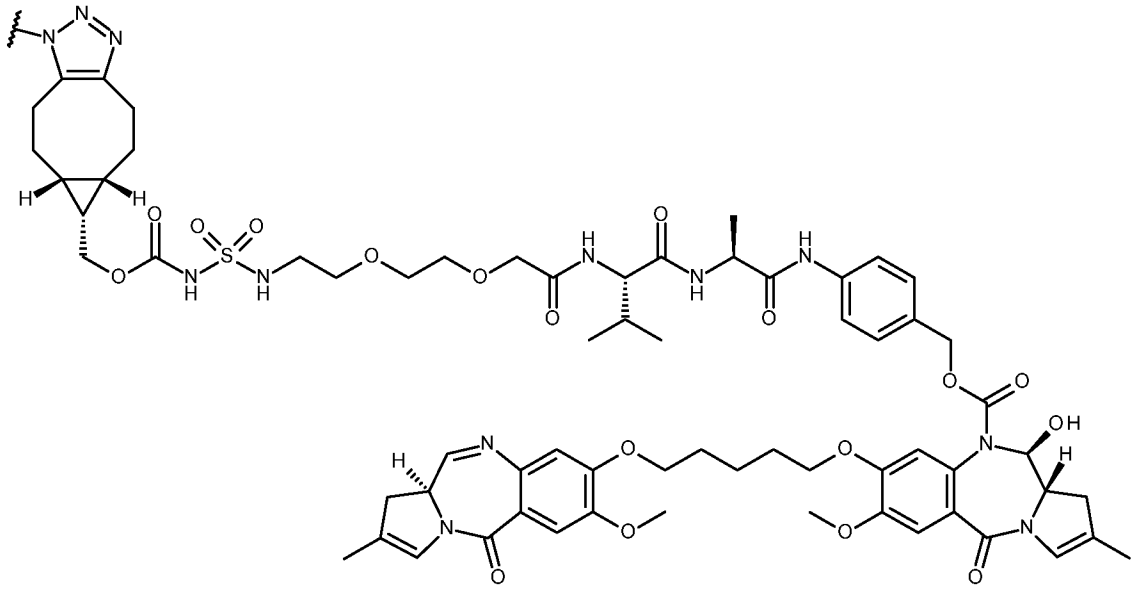
Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения предпочтительно R^{26a} и R^{26b} оба представляют собой метил.

Согласно другим вариантам реализации настоящего изобретения предпочтительно один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, а другой выбран из C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, причем алкильная и алкенильная группы необязательно замещены. В этих дополнительных вариантах реализации еще более предпочтительно группа, которая не является H, выбрана из метила и этила.

R^{12}

Вышеуказанные предпочтения для R^2 в равной степени применимы к R^{12}.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения DL представляет собой



Нагрузка лекарственным средством

Нагрузка лекарственным средством представляет собой среднее количество лекарственных средств ПБД на антитело, например, антитело.

Среднее количество лекарственных средств на антитело в препаратах ADC из реакций конъюгации может быть охарактеризовано обычными средствами, такими как УФ, ВЭЖХ с обращенной фазой, HIC, масс-спектроскопия, ИФА и электрофорез. Также может быть определено количественное распределение ADC в отношении p. С помощью ИФА можно определить усредненное значение p в конкретном препарате ADC (Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson et al (2005) Clin. Cancer Res. 11:843-852). Однако распределение значений p (лекарственное средство) не различимо на основании связывания антитело-антиген и из-за ограничения обнаружения ИФА. Кроме того, анализ методом ИФА для обнаружения конъюгатов антитело-лекарственное средство не позволяет определить, где фрагменты лекарственного средства присоединены к антителу, например, фрагменты тяжелой цепи или легкой цепи, или конкретные аминокислотные остатки. В некоторых случаях разделение, очистку и характеристику

гомогенного ADC, где p представляет собой некоторое значение из ADC с другими показателями нагрузки лекарственным средством, можно осуществлять с помощью таких средств, как ВЭЖХ с обращенной фазой или электрофорез. Такие методики также применимы к другим типам конъюгатов.

Для конъюгатов антитело-лекарственное средство согласно настоящему изобретению p ограничено количеством сайтов присоединения на антителе, т. е. количеством азидных групп. Например, антитело может иметь только одну или две азидные группы, к которым может быть присоединен линкер лекарственного средства.

Как правило, во время реакции конъюгации с антителом конъюгируется меньшее, чем теоретический максимум, количество фрагментов лекарственного средства. Нагрузку (соотношение лекарственное средство/антитело) ADC можно контролировать несколькими различными способами, включая: (i) ограничение молярного избытка интермедиата лекарственное средство-линкер (D-L) или линкерного реагента по отношению к антителу, и (ii) ограничение времени реакции конъюгации или температуры.

Если интермедиатом лекарственное средство-линкер или линкерным реагентом, а затем фрагментом лекарственного средства, реагирует более чем одна нуклеофильная или электрофильная группа антитела, то полученный продукт представляет собой смесь конъюгатов антитело-лекарственное срелство с распределением фрагментов лекарственного средства, присоединенных к антителу, например, 1, 2, 3 и т. д. Методы жидкостной хроматографии, такие как полимерная обращенная фаза (PLRP) и гидрофобное взаимодействие (HIC), могут позволить разделить соединения в смеси по величине нагрузки лекарственным средством. Могут быть выделены препараты ADC с одним значением нагрузки лекарственным средством (p), однако эти ADC с одним значением нагрузки все еще могут представлять собой гетерогенные смеси, поскольку фрагменты лекарственного средства могут быть присоединены за счет линкера в разных местах антитела.

Таким образом, композиции конъюгата антитело-лекарственное средство согласно настоящему изобретению включают смеси конъюгатов антитело-лекарственное средство, в которых антитело содержит один или более фрагментов лекарственного средства ПБД и в которых фрагменты лекарственного средства могут быть присоединены к антителу у различных аминокислотных остатков.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения среднее количество димерных пирролобензодиазепиновых групп на антитело находится в диапазоне от 1 до 8. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения диапазон выбран из 1-4, 1-4, 2-4 и 1-3.

Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения на антитело приходится одна или две димерные пирролобензодиазепиновые группы.

Включение других форм

Если не указано иное, в вышеупомянутое включены хорошо известные ионные, солевые, сольватные и защищенные формы этих заместителей. Например, ссылка на карбоновую кислоту (COOH) также включает анионную (карбоксилатную) форму (-COO-), ее соль или сольват, а также стандартные защищенные формы. Аналогичным образом, ссылка на аминогруппу включает протонированную форму ($-N^+HR^1R^2$), соль или сольват аминогруппы, например, гидрохлоридную соль, а также обычные защищенные формы аминогруппы. Аналогичным образом, ссылка на гидроксильную группу также включает анионную форму (-O-), ее соль или сольват, а также обычные защищенные формы.

Соли

Удобным или желательным может быть получение, очистка и/или обработка соответствующей соли активного соединения, например, фармацевтически приемлемой соли. Примеры фармацевтически приемлемых солей обсуждаются в Berge, et al., J. Pharm. Sci., 66, 1-19 (1977).

Например, если соединение является анионным или содержит функциональную группу, которая может быть анионной (например, -COOH может представлять собой -COO-), тогда соль может быть образована с подходящим катионом. Примеры подходящих неорганических катионов включают, но не ограничиваются ими, ионы щелочных металлов, такие как Na^+ и K^+, катионы щелочноземельных металлов, такие как Ca^{2+} и Mg^{2+}, и другие катионы, такие как Al^{3+}. Примеры подходящих органических катионов включают, но не ограничиваются ими, ион аммония (т.е. NH_4^+) и замещенные ионы аммония (например, NH_3R^+, $NH_2R_2^+$, NHR_3^+, NR_4^+). Примеры некоторых подходящих замещенных ионов аммония включают те, которые получены из: этиламина, диэтиламина, дициклогексиламина, триэтиламина, бутиламина, этилендиамина, этаноламина, диэтаноламина, пиперазина, бензиламина, фенилбензиламина, холина, меглумина и трометамина, а также аминокислот, таких как лизин и аргинин. Пример обычного иона четвертичного аммония представляет собой $N(CH_3)_4^+$.

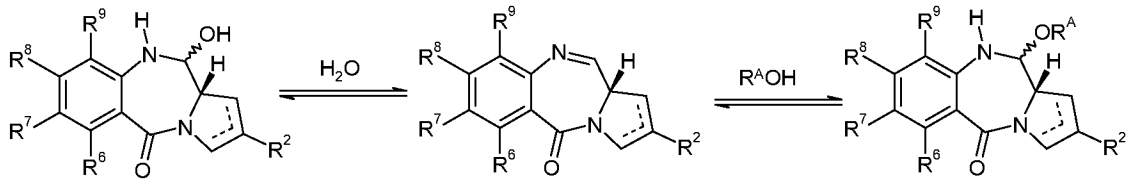
Если соединение является катионным или содержит функциональную группу, которая может быть катионной (например, $-NH_2$ может представлять собой $-NH_3^+$), тогда соль может быть образована с подходящим анионом. Примеры подходящих неорганических анионов включают, но не ограничиваются ими, те, которые получены из следующих неорганических кислот: хлористоводородной, бромистоводородной, йодистоводородной, серной, сернистой, азотной, азотистой, фосфорной и фосфористой.

Примеры подходящих органических анионов включают, но не ограничиваются ими, те, которые получены из следующих органических кислот: 2-ацетоксибензойной, уксусной, аскорбиновой, аспарагиновой, бензойной, камфорсульфоновой, коричной, лимонной, эдетической, этандисульфоновой, этансульфоновой, фумаровой, глюкогептоновой, глюконовой, глутаминовой, гликолевой, гидроксималеиновой, гидроксинафталинкарбоновой, изетионовой, молочной, лактобионовой, лауриновой, малеиновой, яблочной, метансульфоновой, муциновой, олеиновой, щавелевой, пальмитиновой, памоевой, пантотеновой, фенилуксусной, фенилсульфоновой, пропионовой, пировиноградной, салициловой, стеариновой, янтарной, сульфаниловой, винной, толуолсульфоновой, трифторуксусной кислоты и валериановой кислоты. Примеры подходящих полимерных органических анионов включают, но не ограничиваются ими, те, которые получены из следующих полимерных кислот: дубильной кислоты, карбоксиметилцеллюлозы.

Сольваты

Удобным или желательным может быть получение, очистка и/или обработка соответствующего сольвата активного соединения. В настоящей заявке термин «сольват» используется в общепринятом смысле для обозначения комплекса растворенного вещества (например, активного соединения, соли активного соединения) и растворителя. Если растворитель представляет собой воду, сольват удобно называть гидратом, например, моногидратом, дигидратом, тригидратом и т.д.

Настоящее изобретение включает соединения, в которых растворитель присоединен за счет иминной связи фрагмента ПБД, как проиллюстрировано ниже, где растворитель представляет собой воду или спирт (R^AOH, где R^A представляет собой C_{1-4} алкил):



Эти формы могут называться карбиноламинной формой и формой простого карбиноламинного эфира ПБД (как описано в разделе, касающемся R^{10} выше). Баланс этих равновесий зависит от условий, в которых находятся соединения, а также от структуры самого фрагмента.

Эти конкретные соединения могут быть выделены в твердой форме, например, с помощью лиофилизации.

Изомеры

Некоторые соединения согласно настоящему изобретению могут существовать в одной или более конкретных геометрических, оптических, энантиомерных, диастериомерных, эпимерных, атропических, стереоизомерных, таутомерных, конформационных или аномерных формах, включая, но не ограничиваясь ими, цис- и транс-формы; E- и Z-формы; c-, t- и r- формы; эндо- и экзоформы; R-, S- и мезоформы; D- и L-формы; d- и l-формы; (+) и (-) формы; кето, енол- и енолят-формы; син- и анти-формы; синклинальные и антиклинальные формы; α- и β-формы; аксиальные и экваториальные формы; формы «ванны», «кресла», «твист», «конверта» и «полу-кресла»; и их комбинации, далее в совокупности называемые «изомерами» (или «изомерными формами»).

Термин «хиральный» относится к молекулам, зеркальные отражения которых не способны накладываться друг на друга, в то время как термин «ахиральный» относится к молекулам, зеркальные отражения которых накладываются друг на друга.

Термин «стереоизомеры» относится к соединениям, которые имеют идентичное химическое строение, но различаются в отношении расположения атомов или групп в пространстве.

«Диастереомер» относится к стереоизомеру с двумя или более центрами хиральности, молекулы которого не являются зеркальным отражением друг друга. Диастереомеры имеют различные физические свойства, например, точки плавления, точки кипения, спектральные свойства и реакционную способность. Смеси диастереомеров могут разделяться при аналитических процедурах высокого разрешения, таких как электрофорез и хроматография.

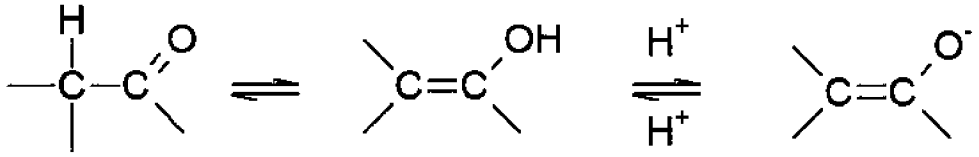
«Энантиомеры» относятся к двум стереоизомерам соединения, которые не являются наложенными друг на друга зеркальными отражениями.

В настоящей заявке стереохимические определения и правила, как правило, соответствуют S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; и Eliel, E. and Wilen, S., “Stereochemistry of Organic Compounds”, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994. Соединения согласно настоящему изобретению могут содержать асимметричные или хиральные центры и, следовательно, существовать в различных стереоизомерных формах. Предусмотрено, что все стереоизомерные формы соединений согласно настоящему изобретению, включая, но не ограничиваясь ими, диастереомеры, энантиомеры и атропоизомеры, а также их смеси, такие как рацемические смеси, составляют часть настоящего изобретения. Многие органические соединения существуют в оптически активных формах, т. е. они обладают способностью вращать плоскость плоскополяризованного света. При описании оптически

активного соединения префиксы D и L или R и S используются для обозначения абсолютной конфигурации молекулы относительно ее хирального (ых) центра (ов). Префиксы d и l или (+) и (-) используются для обозначения знака вращения соединением плоскополяризованного света, при этом (-) или l означают, что соединение является левовращающим. Соединение с префиксом (+) или d является правовращающим. Для конкретной химической структуры эти стереоизомеры идентичны, за исключением того, что они являются зеркальным отражением друг друга. Конкретный стереоизомер также может называться энантиомером, и смесь таких изомеров часто называют энантиомерной смесью. Смесь энантиомеров в соотношении 50:50 называется рацемической смесью или рацематом, что может иметь место в тех случаях, когда в химической реакции или процессе отсутствовал стереоотбор или стереоспецифичность. Термины «рацемическая смесь» и «рацемат» относятся к эквимолярной смеси двух энантиомерных молекул, лишенной оптической активности.

Следует отметить, что за исключением того, что обсуждается ниже для таутомерных форм, намеренно исключенных из термина «изомеры», используемого в настоящей заявке, это структурные (или относящиеся к строению) изомеры (т. е. изомеры, которые различаются по связям между атомами, а не просто по положению атомов в пространстве). Например, ссылка на метоксигруппу, $-OCH_3$, не должна рассматриваться как ссылка на ее структурный изомер, гидроксиметильную группу, $-CH_2OH$. Аналогичным образом, ссылка на орто-хлорфенил не должна рассматриваться как ссылка на его структурный изомер, мета-хлорфенил. Однако ссылка на класс структур вполне может включать структурно изомерные формы, попадающие в этот класс (например, C_{1-7} алкил включает н-пропил и изопропил; бутил включает н-, изо-, втор- и трет-бутил; метоксифенил включает орто -, мета- и пара-метоксифенил).

Вышеупомянутое исключение не относится к таутомерным формам, например, кето-, енол- и енолят-формам, например, как в следующих таутомерных парах: кето/енол (проиллюстрирована ниже), имин/енамин, амид/иминоспирт, амидин/амидин, нитрозо/оксим, тиокетон/енетиол, N-нитрозо/гидроксиазо и нитро/аци-нитро.



кето енол енолат

Термин «таутомер» или «таутомерная форма» относится к структурным изомерам с различными энергиями, которые способны к взаимопревращениям через

низкоэнергетический барьер. Например, протонные таутомеры (также известные как прототропные таутомеры) включают взаимопревращения за счет миграции протона, такие как изомеризация кето-енол и имин-енамин. Валентные таутомеры включают взаимопревращения путем перегруппировки некоторых связывающих электронов.

Следует отметить, что в термин «изомер» включены конкретно соединения с одним или более изотопными замещениями. Например, H может быть в любой изотопной форме, включая H^1, H^2 (D) и H^3 (T); C может быть в любой изотопной форме, включая C^{12}, C^{13} и C^{14}; O может быть в любой изотопной форме, включая O^{16} и O^{18}; и тому подобное.

Примеры изотопов, которые могут быть встроены в соединения согласно настоящему изобретению, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, фтора и хлора, такие как, но не ограничиваясь ими, H^2 (дейтерий, D), H^3 (тритий), C^{11}, C^{13}, C^{14}, N^{15}, F^{18}, P^{31}, P^{32}, S^{35}, Cl^{36} и I^{125}. Включены различные меченые изотопами соединения согласно настоящему изобретению, например, те, в которые встроены радиоактивные изотопы, такие как H^3, C^{13} и C^{14}. Такие меченые изотопами соединения можно применять в метаболических исследованиях, исследованиях кинетики реакций, методиках обнаружения или визуализации, таких как позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) или однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ), включая анализы распределения лекарственного средства или субстрата в ткани, или при радиоактивном лечении пациентов. Меченые или замещенные дейтерием терапевтические соединения согласно настоящему изобретению могут иметь улучшенные свойства DMPK (метаболизм и фармакокинетика лекарственного средства), связанные с распределением, метаболизмом и выделением (ADME). Замещение более тяжелыми изотопами, такими как дейтерий, может обеспечить определенные терапевтические преимущества, обусловленные большей метаболической стабильностью, например, увеличением периода полувыведения *in vivo* или снижением потребностей в дозировке. F^{18}-меченое соединение можно применять для исследований ПЭТ или ОФЭКТ. Меченые изотопами соединения согласно настоящему изобретению и их пролекарства обычно можно получить путем выполнения процедур, раскрытых в схемах или в примерах и препаратах, описанных ниже, заменив немеченый изотопом реагент легкодоступным меченым изотопом реагентом. Кроме того, замещение более тяжелыми изотопами, в частности, дейтерием (т. е. H^2 или D), может обеспечить определенные терапевтические преимущества, обусловленные большей метаболической стабильностью, например, увеличенным периодом полувыведения *in vivo* или сниженными потребностями в дозировке или улучшением терапевтического индекса. Следует понимать, что в данном случае дейтерий рассматривается как заместитель. Концентрация такого более тяжелого изотопа, в

частности, дейтерия, может определяться коэффициентом изотопного обогащения. В соединениях согласно настоящему изобретению любой атом, намерено не обозначенный как конкретный изотоп, предназначен для представления любого стабильного изотопа этого атома.

Если не указано иное, ссылка на конкретное соединение включает все такие изомерные формы, включая (полностью или частично) рацемические и другие их смеси. Способы получения (например, асимметричного синтеза) и разделения (например, фракционной кристаллизации и хроматографические средства) таких изомерных форм либо известны в данной области техники, либо могут быть легко получены известным образом путем адаптации способов, изложенных в настоящей заявке, или известных способов.

Биологическая активность

Анализы пролиферации клеток *in vitro*

Обычно цитотоксическую или цитостатическую активность конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) измеряют путем: воздействия на клетки млекопитающих, имеющие рецепторные белки, антитела из ADC в среде для культивирования клеток; культивирования клеток в течение периода от примерно 6 часов до примерно 5 дней; и измерения жизнеспособности клеток. Клеточные анализы *in vitro* применяют для измерения жизнеспособности (пролиферации), цитотоксичности и индукции апоптоза (активации каспазы) ADC согласно настоящему изобретению.

Эффективность конъюгатов антитело-лекарственное средство *in vitro* можно измерить с помощью анализа пролиферации клеток. Люминесцентный анализ жизнеспособности клеток CellTiter-Glo® представляет собой коммерчески доступный (Promega Corp., Мэдисон, Висконсин, США) способ гомогенного анализа, основанный на рекомбинантной экспрессии люциферазы Coleoptera (патенты США № 5583024; 5674713 и 5700670). Этот анализ пролиферации клеток позволяет определить количество жизнеспособных клеток в культуре на основании количественного определения присутствующего АТФ, индикатора метаболически активных клеток (Crouch et al (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88; US 6602677). Анализ CellTiter-Glo® проводят в 96-луночном формате, что делает его пригодным для автоматического высокопроизводительного скрининга (HTS) (Cree et al (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404). Процедура гомогенного анализа включает добавление одного реагента (реагент CellTiter-Glo®) непосредственно к клеткам, культивируемым в среде, дополненной сывороткой. Промывка клеток, удаление среды и несколько этапов пипетирования не требуются. Система позволяет обнаруживать только 15 клеток на лунку в 384-луночном формате через 10 минут после добавления

реагента и перемешивания. Клетки можно обрабатывать непрерывно с применением ADC, или их можно обрабатывать и отделять от ADC. Обычно клетки, обработанные кратковременно, т. е. 3 часа, проявляли эффективность, аналогичную таковой клеток, которые обрабатывали непрерывно.

Гомогенный формат «добавить-смешать-измерить» приводит к лизису клеток и возникновению люминесцентного сигнала, пропорционального количеству присутствующего АТФ. Количество АТФ прямо пропорционально количеству клеток, присутствующих в культуре. В анализе CellTiter-Glo® генерируется люминесцентный сигнал «типа свечения», возникающий в результате реакции люциферазы, период полужизни которого обычно превышает пять часов, в зависимости от типа клеток и используемой среды. Жизнеспособные клетки отражают в относительных единицах свечения (RLU). Субстрат, люциферин жука, окислительно декарбоксилируется рекомбинантной люциферазой светлячка с сопутствующим превращением АТФ в АМФ и испусканием фотонов.

Эффективность конъюгатов антитело-лекарственное средство *in vitro* также может быть измерена с помощью анализа цитотоксичности. Культивируемые прикрепленные клетки промывают ФСБ, отделяют с применением трипсина, разбавляют в полной среде, содержащей 10% ФСТ, центрифугируют, повторно суспендируют в свежей среде и подсчитывают с помощью гемоцитометра. Суспензионные культуры подсчитывают непосредственно. Подходящие для подсчета монодисперсные клеточные суспензии могут потребовать перемешивания суспензии путем повторной аспирации для разрушения скоплений клеток.

Суспензию клеток разбавляют до целевой плотности посева и распределяют (по 100 мкл на лунку) в черные 96-луночные планшеты. Планшеты с прикрепленными клеточными линиями инкубируют в течение ночи, чтобы обеспечить прикрепление. Суспензию клеточных культур можно использовать в день посева.

Исходный раствор (1 мл) ADC (20 мкг/мл) получают в соответствующей среде для культивирования клеток. Последовательные 10-кратные разведения маточного ADC получают в центрифужных пробирках объемом 15 мл путем последовательного переноса 100 мкл в 900 мкл среды для культивирования клеток.

Лунки с четырьмя повторами каждого разведения ADC (100 мкл) распределяют в 96-луночных черных планшетах, в которые предварительно высеяна суспензия клеток (100 мкл) с получением конечного объема 200 мкл. В контрольные лунки вносят среду для культивирования клеток (100 мкл).

Если время удвоения клеточной линии превышает 30 часов, инкубация ADC длится 5 дней, в ином случае проводят четырехдневную инкубацию.

В конце инкубационного периода жизнеспособность клеток оценивают с помощью анализа Alamar blue. AlamarBlue (Invitrogen) распределяют по всему планшету (по 20 мкл на лунку) и инкубируют в течение 4 часов. Флуоресценцию Alamar blue измеряют при возбуждении 570 нм и испускании 585 нм на считывающем устройстве для планшетов Varioskan Flash. Процент выживания клеток рассчитывают на основании средней интенсивности флуоресценции в обработанных ADC лунках по сравнению со средней интенсивностью флуоресценции в контрольных лунках.

Применение

Конъюгаты согласно настоящему изобретению можно применять, чтобы обеспечить соединение ПБД в целевом местоположении.

Целевое местоположение предпочтительно представляет собой популяцию пролиферативных клеток. Антитело представляет собой антитело к антигену, присутствующему в популяции пролиферативных клеток.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения антиген отсутствует или присутствует на сниженном уровне в популяции непролиферативных клеток по сравнению с количеством антигена, присутствующего в популяции пролиферативных клеток, например, популяции опухолевых клеток.

В целевом местоположении линкер может быть расщеплен для высвобождения соединения RelA. Таким образом, конъюгат можно применять для селективного обеспечения соединения RelA в целевом местоположении.

Линкер может быть расщеплен ферментом, присутствующим в целевом местоположении.

Целевое местоположение может быть *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

Соединения конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) согласно настоящему изобретению включают соединения, которые можно применять для противораковой активности. В частности, соединения (конъюгаты) включают антитело, конъюгированное, т. е. ковалентно присоединенное с помощью линкера, с фрагментом лекарственного средства ПБД, т. е. токсином. Если лекарственное средство не конъюгировано с антителом, лекарственное средство ПБД оказывает цитотоксическое действие. Таким образом, биологическую активность фрагмента лекарственного средства ПБД модулируют путем конъюгации с антителом. Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) согласно настоящему изобретению селективно доставляют эффективную

дозу цитотоксического агента в опухолевую ткань, в результате чего может быть достигнута более высокая селективность, т. е. более низкая эффективная доза.

Таким образом, в одном аспекте, согласно настоящему изобретению предложено соединение-конъюгат, описанное в настоящей заявке, для применения в терапии.

В дополнительном аспекте также предложено соединение-конъюгат, описанное в настоящей заявке, для применения в лечении пролиферативного заболевания. Согласно второму аспекту настоящего изобретения предложено применение соединения конъюгата при изготовлении лекарственного средства для лечения пролиферативного заболевания.

Специалист в данной области техники может легко определить, обладает ли конъюгат-кандидат лечебным действием в отношении пролиферативного состояния для любого конкретного типа клеток. Например, анализы, которые можно удобно применять для оценки активности, обеспеченной конкретным соединением, описаны в примерах ниже.

Термин «пролиферативное заболевание» относится к неблагоприятной или неконтролируемой клеточной пролиферации избыточных или патологических клеток, которая является нежелательной, такой как неопластическое или гиперпластическое размножение, будь то *in vitro* или *in vivo*.

Конъюгаты, направленные против DLK-1

Примеры пролиферативных состояний включают, но не ограничиваются ими, доброкачественную, предзлокачественную и злокачественную клеточную пролиферацию, включая, но не ограничиваясь ими, новообразования и опухоли (например, гистиоцитому, глиому, астроцитому, остеому), разные виды рака (например, рак легких, мелкоклеточный рак легких, рак желудочно-кишечного тракта, рак кишечника, рак толстой кишки, карциному молочной железы, карциному яичников, рак простаты, рак яичка, рак печени, рак почек, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак мозга, саркому, остеосаркому, саркому Капоши, меланому), лимфомы, лейкозы, псориаз, заболевания костей, фибропролиферативные нарушения (например, соединительных тканей) и атеросклероз. Разные виды рака, представляющие особый интерес, включают, но не ограничиваются ими, лейкозы и разные виды рака яичников.

Лечить можно любой тип клеток, включая, но не ограничиваясь ими, легких, желудочно-кишечного тракта (включая, например, кишечник, толстую кишку), груди (молочной железы), яичника, простаты, печени (печеночный), почки (почечный), мочевого пузыря, поджелудочной железы, мозга и кожи.

Нарушения, представляющие особый интерес, включают, но не ограничиваются ими, разные виды рака, включая разные виды метастатического рака и метастатические

раковые клетки, такие как циркулирующие опухолевые клетки, которые могут обнаруживаться циркулирующими в жидкостях организма, таких как кровь или лимфа. Разные виды рака, представляющие особый интерес, включают: гепатоцеллюлярную карциному, гепатобластому, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, рак толстой кишки, рак молочной железы, рак желудка, рак поджелудочной железы, нейробластому, рак надпочечников, феохромоцитому, параганглиому, медуллярную карциному щитовидной железы, рак скелетных мышц, липосаркому, глиому, опухоль Вильмса, нейроэндокринные опухоли, острый миелолейкоз и миелодиспластический синдром.

Другие нарушения, представляющие интерес, включают любое состояние, при котором DLK1 сверхэкспрессируется или при котором антагонизм DLK1 обеспечит клиническую пользу. Они включают иммунные нарушения, сердечно-сосудистые нарушения, тромбоз, диабет, нарушения контрольной точки иммунного ответа, фиброзные нарушения (фиброз) или пролиферативные заболевания, такие как рак, в частности, метастатический рак.

Конъюгаты, направленные против KAAG1

Примеры пролиферативных состояний включают, но не ограничиваются ими, доброкачественную, предзлокачественную и злокачественную клеточную пролиферацию, включая, но не ограничиваясь ими, новообразования и опухоли (например, гистиоцитому, глиому, астроцитому, остеому), разные виды рака (например, рак легких, мелкоклеточный рак легких, рак желудочно-кишечного тракта, рак кишечника, рак толстой кишки, карциному молочной железы, карциному яичников, рак простаты, рак яичка, рак печени, рак почек, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак мозга, саркому, остеосаркому, саркому Капоши, меланому), лимфомы, лейкозы, псориаз, заболевания костей, фибропролиферативные нарушения (например, соединительных тканей) и атеросклероз.

Лечить можно любой тип клеток, включая, но не ограничиваясь ими, легких, желудочно-кишечного тракта (включая, например, кишечник, толстую кишку), груди (молочной железы), яичника, простаты, печени (печеночный), почек (почечный), мочевого пузыря, поджелудочной железы, мозга и кожи.

Нарушения, представляющие особый интерес, включают, но не ограничиваются ими, разные виды рака, включая разные виды метастатического рака и метастатические раковые клетки, такие как циркулирующие опухолевые клетки, которые могут обнаруживаться циркулирующими в жидкостях организма, таких как кровь или лимфа.

Разные виды рака, представляющие особый интерес, включают рак яичников, рак молочной железы, рак простаты и рак почек.

Другие нарушения, представляющие интерес, включают любое состояние, при котором KAAG1 сверхэкспрессируется или при котором антагонизм KAAG1 обеспечит клиническую пользу. Они включают иммунные нарушения, сердечно-сосудистые нарушения, тромбоз, диабет, нарушения контрольной точки иммунного ответа, фиброзные нарушения (фиброз) или пролиферативные заболевания, такие как рак, в частности, метастатический рак.

Конъюгаты, направленные против мезотелина

Примеры пролиферативных состояний включают, но не ограничиваются ими, доброкачественную, предзлокачественную и злокачественную клеточную пролиферацию, включая, но не ограничиваясь ими, новообразования и опухоли (например, гистиоцитому, глиому, астроцитому, остеому), разные виды рака (например, рак легких, мелкоклеточный рак легких, рак желудочно-кишечного тракта, рак кишечника, рак толстой кишки, карциному молочной железы, карциному яичников, рак простаты, рак яичка, рак печени, рак почек, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак мозга, саркому, остеосаркому, саркому Капоши, меланому), лимфомы, лейкозы, псориаз, заболевания костей, фибропролиферативные нарушения (например, соединительных тканей) и атеросклероз.

Лечить можно любой тип клеток, включая, но не ограничиваясь ими, легких, желудочно-кишечного тракта (включая, например, кишечник, толстую кишку), груди (молочной железы), яичника, простаты, печени (печеночный), почек (почечный), мочевого пузыря, поджелудочной железы, мозга и кожи.

Нарушения, представляющие особый интерес, включают, но не ограничиваются ими, разные виды рака, включая разные виды метастатического рака и метастатические раковые клетки, такие как циркулирующие опухолевые клетки, которые могут обнаруживаться циркулирующими в жидкостях организма, таких как кровь или лимфа. Разные виды рака, представляющие особый интерес, включают мезотелиому, рак легких, рак яичников и рак поджелудочной железы.

Другие нарушения, представляющие интерес, включают любое состояние, при котором мезотелин сверхэкспрессируется или при котором антагонизм мезотелина обеспечит клиническую пользу. Они включают иммунные нарушения, сердечно-сосудистые нарушения, тромбоз, диабет, нарушения контрольной точки иммунного ответа, фиброзные нарушения (фиброз) или пролиферативные заболевания, такие как рак, в частности, метастатический рак.

Предусмотрено, что конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) согласно настоящему изобретению можно применять для лечения различных заболеваний или нарушений, например, характеризующихся сверхэкспрессией опухолевого антигена. Примерные состояния или гиперпролиферативные нарушения включают доброкачественные или злокачественные опухоли; лейкоз, гематологические и лимфоидные злокачественные новообразования. Другие примеры включают нейрональные, глиальные, астроцитарные, гипоталамические, железистые, макрофагальные, эпителиальные, стромальные, бластоцельные, воспалительные, ангиогенные и иммунологические, включая аутоиммунные, нарушения.

Обычно заболевание или нарушение, подлежащее лечению, представляет собой гиперпролиферативное заболевание, такое как рак. Примеры рака, подлежащего лечению, включают, но не ограничиваются ими, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз или лимфоидные злокачественные новообразования. Более конкретные примеры таких видов рака включают плоскоклеточный рак (например, эпителиальный плоскоклеточный рак), рак легких, включая мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, аденокарциному легких и плоскоклеточную карциному легких, рак брюшины, гепатоцеллюлярный рак, рак ЖКТ или рак желудка, включая рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак прямой кишки, колоректальный рак, карциному эндометрия или карциному матки, карциному слюнных желез, рак почек или почечный рак, рак простаты, рак влагалища, рак щитовидной железы, карциному печени, карциному анального канала, карциному полового члена, а также рак головы и шеи.

Аутоиммунные заболевания, для лечения которых можно применять соединения ADC, включают ревматологические нарушения (такие как, например, ревматоидный артрит, синдром Шегрена, склеродермию, волчанку, такую как СКВ и волчаночный нефрит, полимиозит/дерматомиозит, криоглобулинемию, синдром антител к фосфолипидам и псориатический артрит), остеоартрит, аутоиммунные нарушения желудочно-кишечного тракта и печени (такие как, например, воспалительные заболевания кишечника (например, язвенный колит и болезнь Крона), аутоиммунный гастрит и пернициозная анемия, аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз печени, первичный склерозирующий холангит и целиакия), васкулит (такой как, например, ANCA-ассоциированный васкулит, включая васкулит Чарга-Стросса, гранулематоз Вегенера и полиартериит), аутоиммунные неврологические нарушения (такие как, например, рассеянный склероз, опсо-миоклональный синдром, миастения гравис,

нейромиелит зрительного нерва, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и аутоиммунные полинейропатии), почечные нарушения (такие как, например, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера и болезнь Бергера), аутоиммунные дерматологические нарушения (такие как, например, псориаз, крапивница, аллергическая сыпь, обыкновенная пузырчатка, буллезный пемфигоид и кожная красная волчанка), гематологические нарушения (такие как, например, тромбоцитопеническая пурпура, тромботическая тромбоцитопеническая пурпура, посттрансфузионная пурпура и аутоиммунная гемолитическая анемия), атеросклероз, увеит, аутоиммунные заболевания слуха (такие как, например, болезнь внутреннего уха и потеря слуха), болезнь Бехчета, синдром Рейно, трансплантацию органа и аутоиммунные эндокринные нарушения (такие как, например, связанные с диабетом аутоиммунные заболевания, такие как инсулинозависимый сахарный диабет (IDDM), болезнь Аддисона и аутоиммунное заболевание щитовидной железы (например, болезнь Грейвса и тиреоидит). Более предпочтительно такие заболевания включают, например, ревматоидный артрит, язвенный колит, ANCA-ассоциированный васкулит, волчанку, рассеянный склероз, синдром Шегрена, болезнь Грейвса, IDDM, пернициозную анемию, тиреоидит и гломерулонефрит.

Способы лечения

Конъюгаты согласно настоящему изобретению можно применять в способе терапии. Также предложен способ лечения, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества соединения-конъюгата согласно настоящему изобретению. Термин «терапевтически эффективное количество» представляет собой количество, достаточное для того чтобы продемонстрировать пользу для пациента. Такая польза может представлять собой по меньшей мере улучшение по меньшей мере одного симптома. Фактическое введенное количество, а также скорость и временная динамика введения будут зависеть от характера и степени тяжести того, что лечат. Назначение лечения, например, принятие решения о дозировке, находится в пределах ответственности врачей общей практики и других врачей.

Соединение согласно настоящему изобретению можно вводить по отдельности или в комбинации с другими способами лечения, либо одновременно, либо последовательно, в зависимости от состояния, подлежащего лечению. Примеры способов лечения и способов терапии включают, но не ограничиваются ими, химиотерапию (введение активных агентов, включая, например, лекарственные средства, такие как химиотерапевтические средства); хирургическое вмешательство; и лучевую терапию.

«Химиотерапевтический агент» представляет собой химическое соединение, которое можно применять для лечения рака, независимо от механизма действия. Классы химиотерапевтических агентов включают, но не ограничиваются ими: алкилирующие агенты, антиметаболиты, растительные алкалоиды, блокирующие митотическое веретено, цитотоксические/противоопухолевые антибиотики, ингибиторы топоизомеразы, антитела, фотосенсибилизаторы и ингибиторы киназы. Химиотерапевтические агенты включают соединения, используемые в «нацеленной терапии» и обычной химиотерапии.

Примеры химиотерапевтических агентов включают: эрлотиниб (тарцева®, Genentech/OSI Pharm.), доцетаксел (таксотер®, Sanofi-Aventis), 5-ФУ (фторурацил, 5-фторурацил, CAS № 51-21-8), гемцитабин (гемзар®, Lilly), PD-0325901 (CAS № 391210-10-9, Pfizer), цисплатин (цис-диамин, дихлорплатину(II), CAS № 15663-27-1), карбоплатин (CAS № 41575-94-4), паклитаксел (таксол®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, Нью-Джерси, США), трастузумаб (герцептин®, Genentech), темозоломид (4-метил-5-оксо-2,3,4,6,8-пентазабицикло-[4.3.0]-нона-2,7,9-триен-9-карбоксамид, CAS № 85622-93-1, темодар®, темодал®, Schering Plough), тамоксифен ((Z)-2-[4-(1,2-дифенилбут-1-енил)фенокси]-*N,N*-диметилэтанамин, нолвадекс®, истубал®, валодекс®) и доксорубицин (адриамицин®), Akti-1/2, HPPD и рапамицин.

Другие примеры химиотерапевтических агентов включают: оксалиплатин (элоксатин®, Sanofi), бортезомиб (велкейд®, Millennium Pharm.), сутент (сунитиниб®, SU11248, Pfizer), летрозол (фемара®, Novartis), иматиниб мезилат (гливек®, Novartis), XL-518 (ингибитор Mek, Exelixis, WO 2007/044515), ARRY-886 (ингибитор Mek, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (ингибитор PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (ингибитор PI3K, Novartis), XL-147 (ингибитор PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), фулвестрант (фазлодекс®, AstraZeneca), лейковорин (фолиновая кислота), рапамицин (сиролимус, рапамун®, Wyeth), лапатиниб (тайкерб® GSK572016, Glaxo Smith Kline), лонафарниб (сарасар™, SCH 66336, Schering Plough), сорафениб (нексавар®, BAY43-9006, Bayer Labs), гефитиниб (иресса®, AstraZeneca), иринотекан (камптосар®, CPT-11 Pfizer), типифарниб (зарнестра™, Johnson&Johnson), абраксан™ (без кремофора), составы альбумин-модифицированных наночастиц паклитаксела (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Il), вандетаниб (rINN, ZD6474, зактима®, AstraZeneca), хлоранмбуцил, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), темсиролимус (торизел®, Wyeth), пазопаниб (GlaxoSmithKline), канфосфамид (телцита®, Telik), тиотепа и циклосфосфамид (цитоксан®, неосар®); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин,

триэтиленфосфамид, триэтилентиофосфамид и триметиломеламин; ацетогенины (в частности, буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и CB1-TM1); элейтеробин; панкратистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотные иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид оксида мехлорэтамина, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимнустин; антибиотики, такие как энедииновые антибиотики (например, калихеамицин, калихеамицин гамма-1I, калихеамицин-омегаI1 (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); динемицин, динемицин A; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; а также хромофорную часть неокарциностатина и родственные хромофоры хромопротеиновых энедииновых антибиотиков), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эсорубицин, идарубицин, неморубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин C, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфиромицин, пуромицин, келамицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; средства, угнетающие функцию надпочечников, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; восполнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; гликозид альдофосфамида; аминолевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидайнин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраерин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лосоксантрон; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид;

прокарбазин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Юджин, Орегон, США); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2′,2″-трихлортриэтиламин; трихотецены (в частности, токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ара-С»); циклофосфамид; тиотепа; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин (навельбин®); новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; капецитабин (кселода®, Roche); ибандронат; CPT-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любого из вышеупомянутых.

В определение «химиотерапевтический агент» также включены: (i) противогормональные агенты, функция которых заключается в регуляции или ингибировании действия гормона на опухоли, такие как антиэстрогены и селективные модуляторы рецепторов эстрогена (SERM), включая, например, тамоксифен (включая нолвадекс®; цитрат тамоксифена), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и фарестон® (цитрат торемифина); (ii) ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, которая регулирует выработку эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоглутетимид, мегасе® (ацетат мегестрола), аромазин® (экземестан; Pfizer), форместание, фадрозол, ривисор® (ворозол), фемара® (летрозол; Novartis) и аримидекс® (анастрозол; AstraZeneca); (iii) антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; а также троксацитабин (1,3-диоксолан-нуклеозидный аналог цитозина); (iv) ингибиторы протеинкиназы, такие как ингибиторы MEK (WO 2007/044515); (v) ингибиторы липидкиназы; (vi) антисмысловые олигонуклеотиды, в частности, те, которые ингибируют экспрессию генов в сигнальных путях, участвующих в аберрантной пролиферации клеток, например, PKC-альфа, Raf и H-Ras, такие как облимерсен (генасенс®, Genta Inc.); (vii) рибозимы, такие как ингибиторы экспрессии VEGF (например, ангиозим®) и ингибиторы экспрессии HER2; (viii) вакцины, такие как вакцины для генной терапии, например, алловектин®, лейвектин® и ваксид®; пролейкин® rIL-2; ингибиторы топоизомеразы 1, такие как люртотекан®; абареликс® rmRH; (ix) антиангиогенные агенты, такие как бевацизумаб (авастин®, Genentech); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любого из вышеупомянутых.

В определение «химиотерапевтический агент» также включены терапевтические антитела, такие как алемтузумаб (кампат), бевацизумаб (авастин®, Genentech); цетуксимаб (эрбитукс®, Imclone); панитумумаб (вектибикс®, Amgen), ритуксимаб (ритуксан®, Genentech/Biogen Idec), офатумумаб (арзерра®, GSK), пертузумаб (перджета™, омнитарг™, 2C4, Genentech), трастузумаб (герцептин®, Genentech), тозитумомаб (бексар, Corixia) и конъюгат антитело-лекарственное средство, гемтузумаб озогамицин (милотарг®, Wyeth).

Гуманизированные моноклональные антитела с терапевтическим потенциалом в качестве химиотерапевтических агентов в комбинации с конъюгатами согласно настоящему изобретению включают: алемтузумаб, аполизумаб, азелизумаб, атлизумаб, бапинейзумаб, бевацизумаб, биватузумаб мертанзин, кантузумаб мертанзин, целизумаб, цертолизумаб пегол, цидфузитузумаб, цидтузумаб, даклизумаб, экулизумаб, эфализумаб, эпратузумаб, эрлизумаб, фелвизумаб, фонтолизумаб, гемтузумаб озогамицин, инотузумаб озогамицин, ипилимумаб, лабетузумаб, линтузумаб, матузумаб, меполизумаб, мотавизумаб, мотовизумаб, натализумаб, нимотузумаб, ноловизумаб, нумавизумаб, окрелизумаб, омализумаб, паливизумаб, пасколизумаб, пекфуситузумаб, пектузумаб, пертузумаб, пекселизумаб, раливизумаб, ранибизумаб, ресливизумаб, реслизумаб, ресивизумаб, ровелизумаб, руплизумаб, сибротузумаб, сиплизумаб, сонтузумаб, такатузумаб тетраксетан, тадоцизумаб, тализумаб, тефибазумаб, тоцилизумаб, торализумаб, трастузумаб, тукотузумаб целмолейкин, тукузитузумаб, умавизумаб, уртоксазумаб и визилизумаб.

Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением и для применения в соответствии с настоящим изобретением могут содержать, помимо активного ингредиента, т. е. соединения-конъюгата, фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель, буфер, стабилизатор или другие материалы, хорошо известные специалистам в данной области техники. Такие материалы должны быть нетоксичными и не должны создавать помехи для эффективности активного ингредиента. Точный характер носителя или другого материала будет зависеть от пути введения, который может быть пероральным или с помощью инъекции, например, кожной, подкожной или внутривенной.

Фармацевтические композиции для перорального введения могут быть в форме таблетки, капсулы, порошка или жидкости. Таблетка может содержать твердый носитель или адъювант. Жидкие фармацевтические композиции обычно содержат жидкий носитель, такой как вода, нефтяные, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Может быть включен физиологический солевой раствор,

раствор декстрозы или другого сахарида или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. Капсула может содержать твердый носитель, такой как желатин.

Для внутривенной, кожной или подкожной инъекции или инъекции в место поражения активный ингредиент будет в форме парентерально приемлемого водного раствора, который не содержит пирогены и имеет подходящий pH, изотоничность и стабильность. Специалисты с соответствующими навыками в данной области техники способны приготовить подходящие растворы, применяя, например, изотонические носители, такие как инъекция хлорида натрия, инъекция раствора Рингера, инъекция раствора Рингера с лактозой. При необходимости могут быть включены консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки.

Составы

Несмотря на то, что соединение-конъюгат можно применять (например, вводить) по отдельности, часто предпочтительно представить его в виде композиции или состава.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения композиция представляет собой фармацевтическую композицию (например, состав, препарат, лекарственное средство), содержащую соединение-конъюгат, описанное в настоящей заявке, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере одно соединение-конъюгат, описанное в настоящей заявке, вместе с одним или более другими фармацевтически приемлемыми ингредиентами, хорошо известными специалистам в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, фармацевтически приемлемые носители, разбавители, вспомогательные вещества, адъюванты, наполнители, буферы, консерванты, антиоксиданты, смазывающие агенты, стабилизаторы, солюбилизаторы, сурфактанты (например, смачивающие агенты), маскирующие агенты, окрашивающие агенты, ароматизирующие агенты и подслащающие агенты.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения композиция дополнительно содержит другие активные агенты, например, другие терапевтические или профилактические агенты.

Подходящие носители, разбавители, вспомогательные вещества и т. д. можно найти в стандартных фармацевтических руководствах. См., например, Handbook of Pharmaceutical Additives, 2 изд. (ред. M. Ash и I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources,

Inc., Endicott, New York, USA), Remington's Pharmaceutical Sciences, 20 изд., pub. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; и Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2 изд., 1994.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способам получения фармацевтической композиции, включающим смешивание по меньшей мере одного [C^{11}]-радиомеченого конъюгата или соединения, подобного конъюгату, определенных в настоящей заявке, с одним или более другими фармацевтически приемлемыми ингредиентами, хорошо известными специалистам в данной области техники, например, носителями, разбавителями, вспомогательными веществами и т. д. При изготовлении в виде дискретных единиц (например, таблеток и т. д.) каждая единица содержит заранее определенное количество (дозировку) активного соединения.

В настоящей заявке термин «фармацевтически приемлемый» относится к соединениям, ингредиентам, материалам, композициям, лекарственным формам и т. д., которые, в рамках здравого медицинского заключения, подходят для применения при контакте с тканями рассматриваемого субъекта (например, человека) без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергического ответа или другой проблемы или осложнения, соразмерно с разумным соотношением польза/риск. Каждый носитель, разбавитель, вспомогательное вещество и т. д. также должен быть «приемлемым» в отношении совместимости с другими ингредиентами состава.

Составы могут быть получены с помощью любых способов, хорошо известных в области фармацевтики. Такие способы включают этап объединения активного соединения с носителем, который составляет один или более дополнительных ингредиентов. Обычно составы получают путем равномерного и тесного объединения активного соединения с носителями (например, жидкими носителями, мелкодисперсным твердым носителем и т. д.), а затем формовки продукта, если необходимо.

Состав может быть получен для обеспечения быстрого или медленного высвобождения; немедленного, отсроченного, контролируемого по времени или пролонгированного высвобождения; или их комбинации.

Составы, подходящие для парентерального введения (например, путем инъекции), включают водные или неводные, изотонические, апирогенные, стерильные жидкости (например, растворы, суспензии), в которых активный ингредиент растворен, суспендирован или обеспечен иным образом (например, в липосоме или другой микрочастице). Такие жидкости могут дополнительно содержать другие фармацевтически приемлемые ингредиенты, такие как антиоксиданты, буферы, консерванты, стабилизаторы, бактериостатические агенты, суспендирующие агенты, загущающие агенты и растворенные вещества, которые делают состав изотоническим с кровью (или

другой соответствующей жидкостью организма) предполагаемого реципиента. Примеры вспомогательных веществ включают, например, воду, спирты, полиолы, глицерин, растительные масла и тому подобное. Примеры изотонических носителей, подходящих для применения в таких составах, включают инъекцию хлорида натрия, раствор Рингера или инъекцию раствора Рингера с лактатом. Как правило, концентрация активного ингредиента в жидкости составляет от примерно 1 нг/мл до примерно 10 мкг/мл, например, от примерно 10 нг/мл до примерно 1 мкг/мл. Составы могут быть представлены в герметичных контейнерах, содержащих одну дозу или несколько доз, например, в ампулах и флаконах, и могут храниться в сублимированном (лиофилизированном) состоянии, требующем только добавления стерильного жидкого носителя, например, воды для инъекций, непосредственно перед применением. Инъекционные растворы и суспензии для немедленного введения могут быть приготовлены из стерильных порошков, гранул и таблеток.

Дозировка

Специалист в данной области техники поймет, что подходящие дозировки соединения-конъюгата и композиций, содержащих соединение-конъюгат, могут варьироваться у разных пациентов. Определение оптимальной дозировки обычно будет включать компенсацию уровня терапевтической пользы с любым риском или вредными побочными эффектами. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества факторов, включая, но не ограничиваясь ими, активность конкретного соединения, путь введения, время введения, скорость выведения соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, применяемые в комбинации, степень тяжести состояния, а также вид, пол, возраст, массу, состояние, общее состояние здоровья и анамнез пациента. Количество соединения и путь его введения будут, в конечном счете, оставлены на усмотрение врача, ветеринара или клинициста, несмотря на то, что обычно дозировка будет выбрана для достижения локальных концентраций в месте действия, которые позволяют достичь целевого эффекта, не вызывая существенных опасных или вредных побочных эффектов.

Введение можно осуществлять в одной дозе, непрерывно или периодически (например, в виде разделенных доз с соответствующими интервалами) в течение курса лечения. Способы определения наиболее эффективных средств и дозировки для введения хорошо известны специалистам в данной области техники и будут варьироваться в зависимости от состава, применяемого для терапии, цели терапии, клетки (клеток)-мишени (ей), которую (ых) лечат, и субъекта, которого лечат. Однократное или

многократное введение может быть выполнено с применением уровня дозы и схемы, выбранной лечащим врачом, ветеринаром или клиницистом.

Обычно подходящая доза активного соединения находится в пределах диапазона от примерно 100 нг до примерно 25 мг (более типично от примерно 1 мкг до примерно 10 мг) на килограмм массы тела субъекта в сутки. Если активное соединение представляет собой соль, сложный эфир, амид, пролекарство или тому подобное, вводимое количество рассчитывают на основании исходного соединения, и, таким образом, фактическая масса, которая должна быть применена, пропорционально увеличивается.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения активное соединение вводят пациенту-человеку в соответствии со следующей схемой дозирования: примерно 100 мг, 3 раза в сутки.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения активное соединение вводят пациенту-человеку в соответствии со следующей схемой дозирования: примерно 150 мг, 2 раза в сутки.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения активное соединение вводят пациенту-человеку в соответствии со следующей схемой дозирования: примерно 200 мг, 2 раза в сутки.

Однако согласно одному варианту реализации настоящего изобретения соединение-конъюгат вводят пациенту-человеку в соответствии со следующей схемой дозирования: примерно 50 или примерно 75 мг, 3 или 4 раза в сутки.

Согласно одному варианту реализации настоящего изобретения соединение-конъюгат вводят пациенту-человеку в соответствии со следующей схемой дозирования: примерно 100 или примерно 125 мг, 2 раза в сутки.

Дозировки, описанные выше, можно применять к конъюгату (включая фрагмент ПБД и линкер к антителу) или к эффективному количеству обеспеченного соединения ПБД, например, количеству соединения, которое может быть высвобождено после расщепления линкера.

Для предотвращения или лечения заболевания соответствующая дозировка ADC согласно настоящему изобретению будет зависеть от типа заболевания, которое подлежит лечению, определенного выше, степени тяжести и течения заболевания, от того, вводится ли молекула в профилактических или терапевтических целях, предшествующей терапии, клинического анамнеза пациента и ответа на антитело, а также от усмотрения лечащего врача. Молекулу вводят подходящим способом пациенту за один раз или в течение нескольких обработок. В зависимости от типа и степени тяжести заболевания примерно от 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,1-20 мг/кг) молекулы составляют начальную

предполагаемую дозировку для введения пациенту, например, будь то с помощью одного или нескольких отдельных введений или путем непрерывной инфузии. Типичная суточная дозировка может варьироваться от примерно 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от факторов, упомянутых выше. Примерная дозировка ADC для введения пациенту находится в пределах диапазона от примерно 0,1 до примерно 10 мг/кг массы пациента. Для повторных введений в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение продолжают до тех пор, пока не произойдет целевое подавление симптомов заболевания. Примерная схема дозирования включает курс введения начальной нагрузочной дозы примерно 4 мг/кг с последующим введением дополнительных доз ADC каждую неделю, каждые две недели или каждые три недели. Можно применять другие схемы дозирования. Прогресс этой терапии легко контролировать с помощью обычных методик и анализов.

Лечение

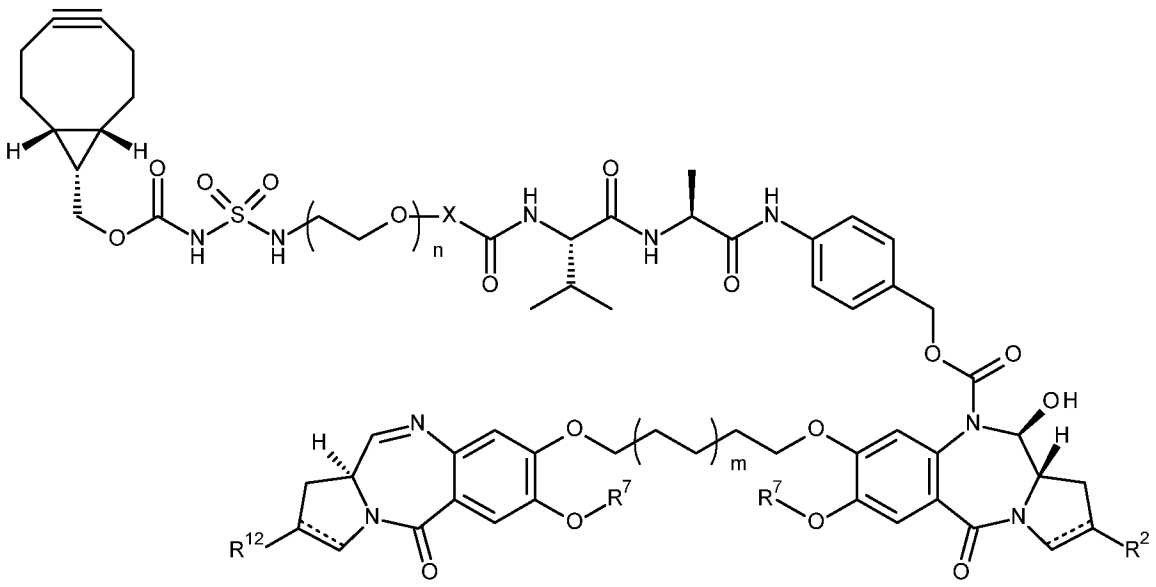
В настоящей заявке термин «лечение», применительно к лечению состояния, обычно относится к лечению и терапии, будь то человека или животного (например, в вариантах применения в ветеринарии), при которых достигается некоторый целевой терапевтический эффект, например, ингибирование прогрессирования состояния, и включает снижение скорости прогрессирования, задержку скорости прогрессирования, регресс состояния, улучшение состояния и излечение состояния. Также включено лечение как профилактическая мера (т. е. профилактика, предотвращение).

В настоящей заявке термин «терапевтически эффективное количество» относится к такому количеству активного соединения или материала, композиции или лекарственной формы, содержащей активное соединение, которое является эффективным для осуществления некоторого целевого терапевтического действия, соразмерно с разумным соотношением польза/риск, при введении в соответствии с целевой схемой лечения.

Аналогичным образом, в настоящей заявке термин «профилактически эффективное количество» относится к такому количеству активного соединения или материала, композиции или лекарственной формы, содержащей активное соединение, которое является эффективным для достижения некоторого желательного профилактического эффекта, соразмерно с разумным соотношением польза/риск, при введении в соответствии с целевой схемой лечения.

Получение конъюгатов лекарственного средства

Конъюгаты антитело-лекарственное средство согласно настоящему изобретению могут быть получены путем конъюгирования следующего линкера лекарственного средства:



с азидсодержащим антителом с помощью способов, описанных, например, в van Geel, R., et al., Bioconjugate Chemistry, 2015, 26, 2233−2242; DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.5b00224. Подходящие способы включают, но не ограничиваются этим, конъюгацию без меди, например, в водных условиях с необязательным сорастворителем, выбранным из ДМФА, ДМСО и ДМАА.

Линкер лекарственного средства может быть синтезирован в соответствии с примерами, с соответствующими модификациями, например, со ссылкой на WO 2016/053107 для синтеза линкера, и на следующие документы для димера ПБД, например: WO 2011/130598, WO2013/055987, WO2014/057074.

Субъект/пациент

Субъект/пациент может представлять собой животное, млекопитающее, плацентарное млекопитающее, сумчатого (например, кенгуру, вомбата), однопроходное животное (например, утконоса), грызуна (например, морскую свинку, хомяка, крысу, мышь), представителя мышиных (например, мышь), зайцеобразного (например, кролика), пернатого (например, птицу), представителя собачьих (например, собаку), представителя кошачьих (например, кошку), представителя лошадиных (например, лошадь), свинообразного (например, свинью), представителя овечьих (например, овцу), представителя бычьих (например, корову), примата, обезьянообразного (например, обезьяну или человекообразную обезьяну), обезьяну (например, мартышку, павиана), человекообразную обезьяну (например, гориллу, шимпанзе, орангутана, гиббона) или человека.

Кроме того, субъект/пациент может иметь любую из его форм развития, например, плод. Согласно одному предпочтительному варианту реализации настоящего изобретения субъект/пациент представляет собой человека.

Изложение сущности изобретения

Следующие пронумерованные утверждения описывают некоторые конкретно предусмотренные комбинации настоящего изобретения.

Конъюгаты, направленные против DLK1

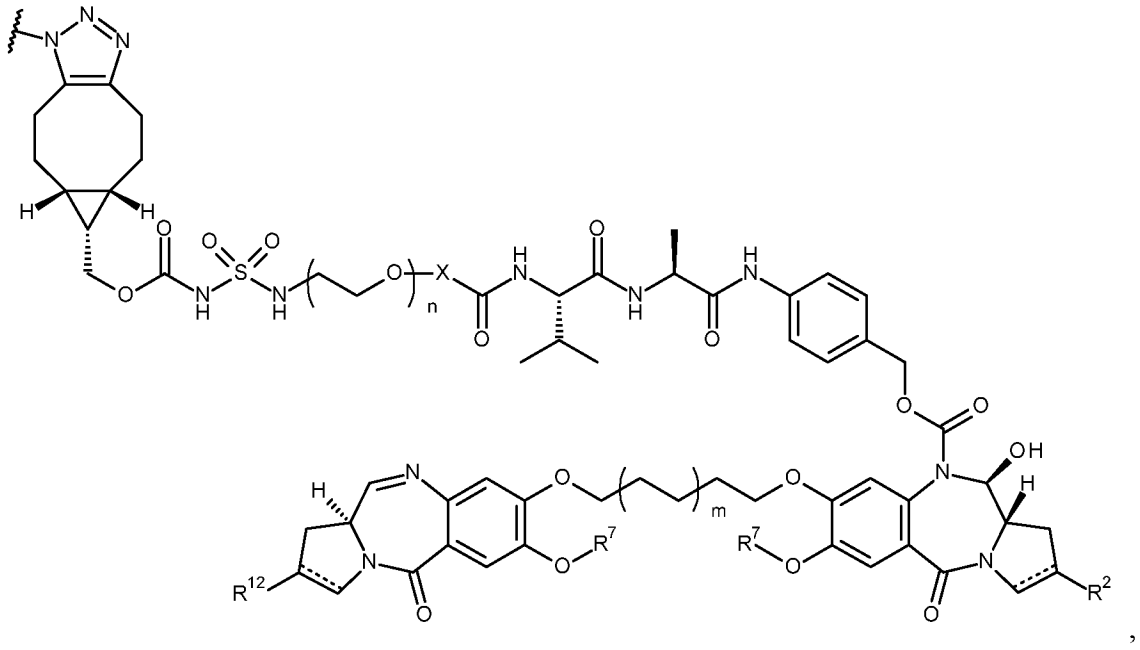
1. Конъюгат формулы (I):

$$Ab\text{-}(DL)_p \quad (I)$$

в которой:

Ab представляет собой антитело, которое связывается с DLK1;

DL представляет собой



,

где:

X выбран из группы, включающей: одинарную связь, $-CH_2-$ и $-C_2H_4-$;

n составляет от 1 до 8;

m равно 0 или 1;

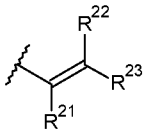
R^7 представляет собой метил или фенил;

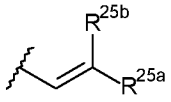
если между C2 и C3 присутствует двойная связь, R^2 выбран из группы, состоящей из:

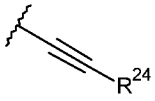
(ia) C_{5-10} арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, включающей: галоген, нитро, циано, простой эфир, карбокси, сложный эфир, C_{1-7} алкил, C_{3-7} гетероциклил и бис-окси-C_{1-3} алкилен;

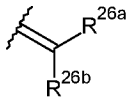
(ib) C_{1-5} насыщенного алифатического алкила;

(ic) C_{3-6} насыщенного циклоалкила;

(id)  , где каждый из R^{21}, R^{22} и R^{23} независимо выбран из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, причем указанное общее число атомов углерода в группе R^2 составляет не более 5;

(ie)  , где один из R^{25a} и R^{25b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; и

(if)  , где R^{24} выбран из: H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила;

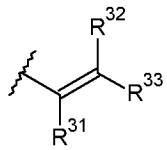
если между C2 и C3 присутствует одинарная связь, R^2 представляет собой  , где R^{26a} и R^{26b} независимо выбраны из H, F, C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, причем алкильная и алкенильная группы необязательно замещены группой, выбранной из C_{1-4} алкиламидо и C_{1-4} алкилового сложного эфира; или, если один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, другой выбран из нитрила и C_{1-4} алкилового сложного эфира;

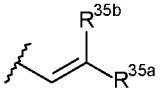
если между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, R^{12} выбран из группы, состоящей из:

(iia) C_{5-10} арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, включающей: галоген, нитро, циано, простой эфир, карбокси, сложный эфир, C_{1-7} алкил, C_{3-7} гетероциклил и бис-окси-C_{1-3} алкилен;

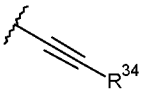
(iib) C_{1-5} насыщенного алифатического алкила;

(iic) C_{3-6} насыщенного циклоалкила;

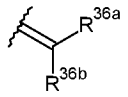
(iid)  , где каждый из R^{31}, R^{32} и R^{33} независимо выбран из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, причем указанное общее число атомов углерода в группе R^{12} составляет не более 5;

(iie) 

, где один из R^{35a} и R^{35b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; и

(iif) 

, где R^{24} выбран из: H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила;

если между C2′ и C3′ присутствует одинарная связь, R^{12} представляет собой 

, где R^{36a} и R^{36b} независимо выбраны из H, F, C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, причем алкильная и алкенильная группы необязательно замещены группой, выбранной из C_{1-4} алкиламидо и C_{1-4} алкилового сложного эфира; или, если один из R^{36a} и R^{36b} представляет собой H, другой выбран из нитрила и C_{1-4} алкилового сложного эфира;

и p составляет от 1 до 8.

2. Конъюгат по утверждению 1, в котором X представляет собой одинарную связь.

3. Конъюгат по утверждению 1, в котором X представляет собой $-CH_2-$.

4. Конъюгат по утверждению 1, в котором X представляет собой $-C_2H_4-$.

5. Конъюгат по любому из пп. 1-4, в котором n составляет 1-4.

6. Конъюгат по утверждению 5, в котором n равно 1.

7. Конъюгат по утверждению 5, в котором n равно 2.

8. Конъюгат по утверждению 5, в котором n равно 4.

9. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R^2 представляет собой C_{5-7} арильную группу.

10. Соединение по утверждению 9, в котором R^2 представляет собой фенил.

11. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R^2 представляет собой C_{8-10} арильную группу.

12. Соединение по любому из пп. 9-11, в котором R^2 несет от одной до трех групп-заместителей.

13. Соединение по любому из пп. 9-12, в котором указанные заместители выбраны из метокси, этокси, фтора, хлора, циано, бис-оксиметилена, метилпиперазинила, морфолино и метилтиофенила.

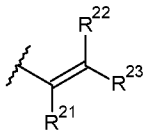
14. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R^2 представляет собой C_{1-5} насыщенную алифатическую алкильную группу.

15. Соединение по утверждению 14, в котором R^2 представляет собой метил, этил или пропил.

16. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R^2 представляет собой C_{3-6} насыщенную циклоалкильную группу.

17. Соединение по утверждению 16, в котором R^2 представляет собой циклопропил.

18. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R^2 представляет собой группу формулы:



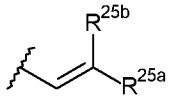
19. Соединение по утверждению 18, в котором указанное общее число атомов углерода в группе R^2 составляет не более 4.

20. Соединение по утверждению 19, в котором указанное общее число атомов углерода в группе R^2 составляет не более 3.

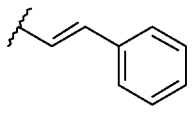
21. Соединение по любому из пп. 18-20, в котором один из R^{21}, R^{22} и R^{23} представляет собой H, при этом две другие группы выбраны из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила.

22. Соединение по любому из пп. 18-20, в котором два из R^{21}, R^{22} и R^{23} представляют собой H, при этом другая группа выбрана из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила.

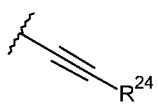
23. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R^2 представляет собой группу формулы:



24. Соединение по утверждению 23, в котором R^2 представляет собой группу:

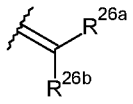


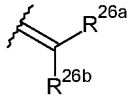
25. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R^2 представляет собой группу формулы:

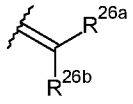


26. Соединение по утверждению 25, в котором R^{24} выбран из H, метила, этила, этенила и этинила.

27. Соединение по утверждению 26, в котором R^{24} выбран из H и метила.

28. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует одинарная связь, R^2 представляет собой  , а R^{26a} и R^{26b} оба представляют собой H.

29. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует одинарная связь, R^2 представляет собой  , а R^{26a} и R^{26b} оба представляют собой метил.

30. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует одинарная связь, R^2 представляет собой  , один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, а другой выбран из C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, причем алкильная и алкенильная группы необязательно замещены.

31. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, и R^{12} представляет собой C_{5-7} арильную группу.

32. Соединение по утверждению 31, в котором R^{12} представляет собой фенил.

33. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, и R^{12} представляет собой C_{8-10} арильную группу.

34. Соединение по любому из пп. 31-33, в котором R^{12} несет от одной до трех групп-заместителей.

35. Соединение по любому из пп. 31-34, в котором указанные заместители выбраны из метокси, этокси, фтора, хлора, циано, бис-оксиметилена, метилпиперазинила, морфолино и метилтиофенила.

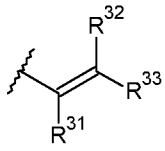
36. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, и R^{12} представляет собой C_{1-5} насыщенную алифатическую алкильную группу.

37. Соединение по утверждению 36, в котором R^{12} представляет собой метил, этил или пропил.

38. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, и R^{12} представляет собой C_{3-6} насыщенную циклоалкильную группу.

39. Соединение по утверждению 38, в котором R^{12} представляет собой циклопропил.

40. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, и R^{12} представляет собой группу формулы:



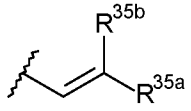
41. Соединение по утверждению 40, в котором указанное общее число атомов углерода в группе R^{12} составляет не более 4.

42. Соединение по утверждению 41, в котором указанное общее число атомов углерода в группе R^{12} составляет не более 3.

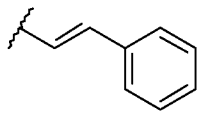
43. Соединение по любому из пп. 40-42, в котором один из R^{31}, R^{32} и R^{33} представляет собой H, при этом две другие группы выбраны из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила.

44. Соединение по любому из пп. 40-42, в котором два из R^{31}, R^{32} и R^{33} представляют собой H, при этом другая группа выбрана из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила.

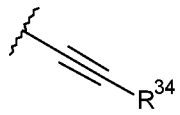
45. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, и R^{12} представляет собой группу формулы:



46. Соединение по утверждению 45, в котором R^{12} представляет собой группу:

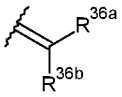


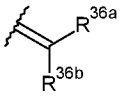
47. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, и R^{12} представляет собой группу формулы:

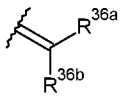


48. Соединение по утверждению 47, в котором R^{34} выбран из H, метила, этила, этенила и этинила.

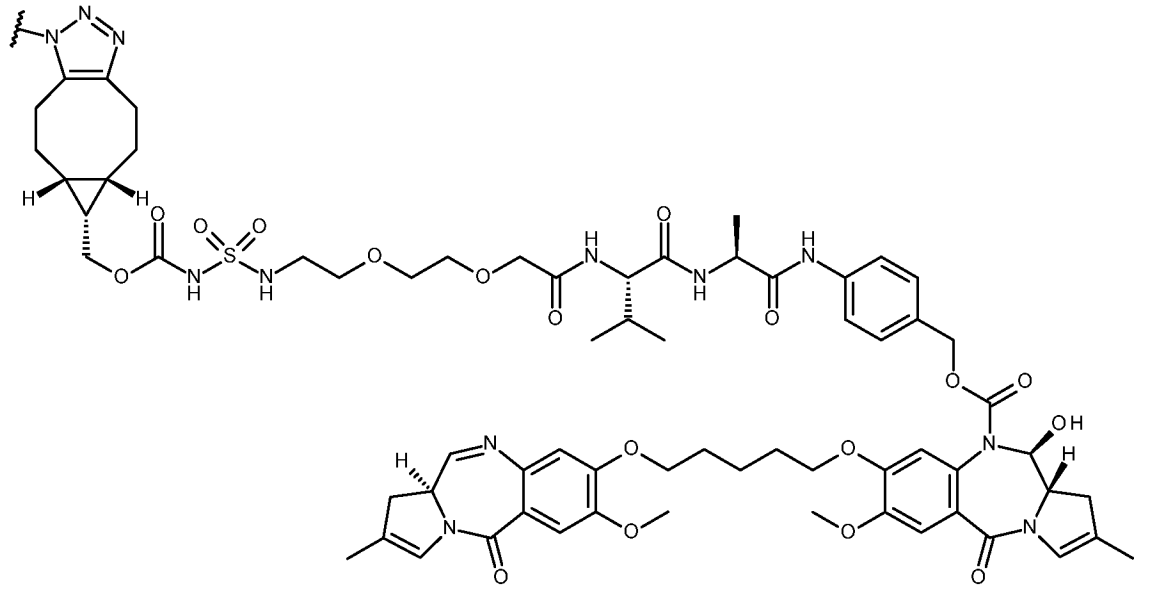
49. Соединение по утверждению 48, в котором R^{34} выбран из H и метила.

50. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует одинарная связь, R^{12} представляет собой  , а R^{36a} и R^{36b} оба представляют собой H.

51. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует одинарная связь, R^{12} представляет собой  , а R^{36a} и R^{36b} оба представляют собой метил.

52. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует одинарная связь, R^{12} представляет собой  , один из R^{36a} и R^{36b} представляет собой H, а другой выбран из C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, причем алкильная и алкенильная группы необязательно замещены.

53. Конъюгат по утверждению 1, в котором DL представляет собой:



54. Конъюгат по любому из пп. 1-53, в котором указанное антитело содержит домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 7.

55. Конъюгат по любому из пп. 1-54, в котором указанное антитело содержит домен VH, содержащий CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 6 и/или CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 5.

56. Конъюгат по любому из пп. 1-55, в котором указанное антитело содержит домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 7, CDR2

VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 6 и CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 5.

57. Конъюгат по любому из пп. 1-56, в котором указанное антитело содержит домен VH, содержащий последовательность SEQ ID NO. 1.

58. Конъюгат по любому из пп. 1-57, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 10.

59. Конъюгат по любому из пп. 1-58, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 9 и/или CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 8.

60. Конъюгат по любому из пп. 1-59, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 10, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 9 и CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 8.

61. Конъюгат по любому из пп. 1-60, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий последовательность SEQ ID NO. 2.

62. Конъюгат по любому из пп. 1-61, в котором указанное антитело представляет собой интактное антитело.

63. Конъюгат по любому из пп. 1-62, в котором указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 3, или тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 11.

64. Конъюгат по любому из пп. 1-63, в котором указанное антитело содержит легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 4.

65. Конъюгат по любому из пп. 1-64, в котором указанное антитело является гуманизированным, деиммунизированным или антителом с измененной поверхностью.

66. Конъюгат по любому из пп. 1-65, в котором на указанном антителе отсутствуют неконъюгированные азидные группы.

67. Конъюгат по любому из пп. 1-66, в котором p равно 1, 2, 3 или 4.

68. Композиция, содержащая смесь конъюгатов антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-67, причем указанная средняя нагрузка лекарственным средством на антитело в указанной смеси конъюгатов антитело-лекарственное средство составляет от примерно 1 до примерно 4.

69. Конъюгат по любому из пп. 1-67 для применения в терапии.

70. Конъюгат по любому из пп. 1-67 для применения в лечении пролиферативного заболевания у субъекта.

71. Конъюгат по утверждению 70, в котором указанное заболевание представляет собой рак.

72. Конъюгат по утверждению 71, в котором указанный рак представляет собой рак, выбранный из группы, включающей: гепатоцеллюлярную карциному, гепатобластому, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, рак толстой кишки, рак молочной железы, рак желудка, рак поджелудочной железы, нейробластому, рак надпочечников, феохромоцитому, параганглиому, медуллярную карциному щитовидной железы, рак скелетных мышц, липосаркому, глиому, опухоль Вильмса, нейроэндокринные опухоли, острый миелолейкоз и миелодиспластический синдром.

73. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому из пп. 1-67 и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

74. Фармацевтическая композиция по утверждению 73, дополнительно содержащая терапевтически эффективное количество химиотерапевтического агента.

75. Применение конъюгата по любому из пп. 1-67 в получении лекарственного средства для применения в лечении пролиферативного заболевания у субъекта.

76. Способ лечения рака, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по утверждению 74.

77. Способ по утверждению 76, в котором указанному пациенту вводят химиотерапевтический агент в комбинации с указанным конъюгатом.

Конъюгаты, направленные против KAAG1

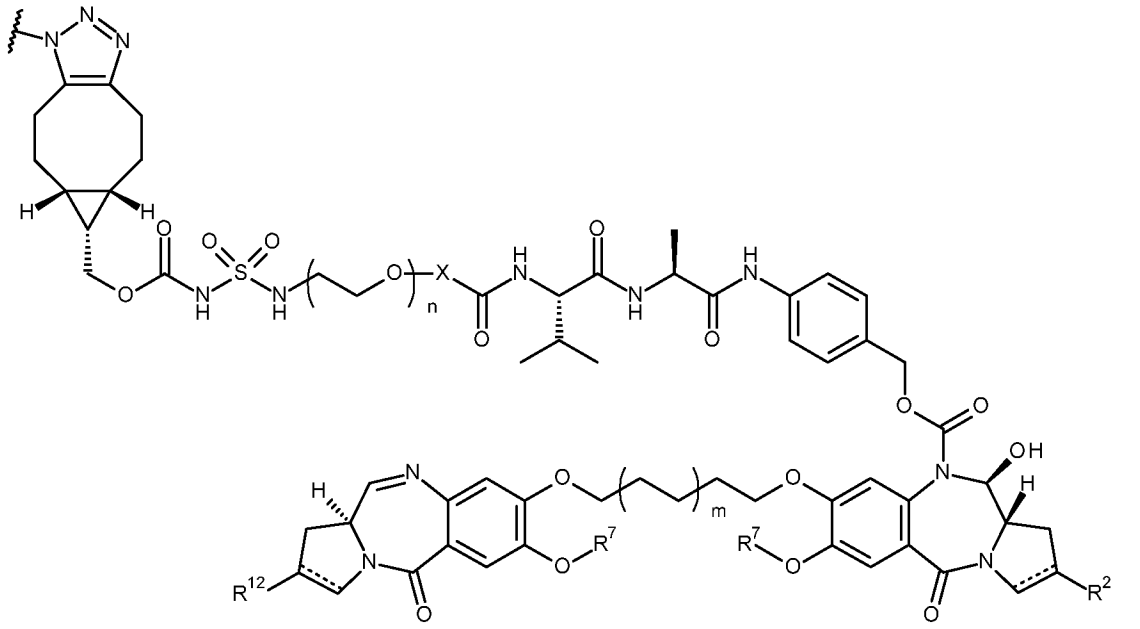
1. Конъюгат формулы (I):

$$Ab\text{-}(DL)_p \quad (I)$$

в которой:

Ab представляет собой антитело, которое связывается с KAAG1;

DL представляет собой



,

где:

X выбран из группы, включающей: одинарную связь, $-CH_2-$ и $-C_2H_4-$;

n составляет от 1 до 8;

m равно 0 или 1;

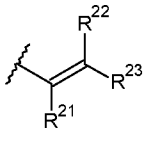
R^7 представляет собой метил или фенил;

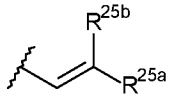
если между C2 и C3 присутствует двойная связь, R^2 выбран из группы, состоящей из:

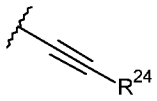
(ia) C_{5-10} арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, включающей: галоген, нитро, циано, простой эфир, карбокси, сложный эфир, C_{1-7} алкил, C_{3-7} гетероциклил и бис-окси-C_{1-3} алкилен;

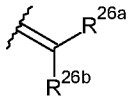
(ib) C_{1-5} насыщенного алифатического алкила;

(ic) C_{3-6} насыщенного циклоалкила;

(id)  , где каждый из R^{21}, R^{22} и R^{23} независимо выбран из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, причем указанное общее число атомов углерода в группе R^2 составляет не более 5;

(ie)  , где один из R^{25a} и R^{25b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; и

(if)  , где R^{24} выбран из: H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила;

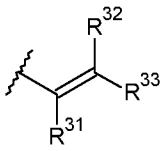
если между C2 и C3 присутствует одинарная связь, R^2 представляет собой  , где R^{26a} и R^{26b} независимо выбраны из H, F, C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, причем алкильная и алкенильная группы необязательно замещены группой, выбранной из C_{1-4} алкиламидо и C_{1-4} алкилового сложного эфира; или, если один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, другой выбран из нитрила и C_{1-4} алкилового сложного эфира;

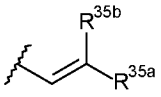
если между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, R^{12} выбран из группы, состоящей из:

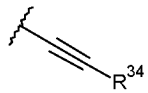
(iia) C_{5-10} арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, включающей: галоген, нитро, циано, простой эфир, карбокси, сложный эфир, C_{1-7} алкил, C_{3-7} гетероциклил и бис-окси-C_{1-3} алкилен;

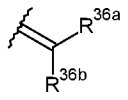
(iib) C_{1-5} насыщенного алифатического алкила;

(iic) C_{3-6} насыщенного циклоалкила;

(iid)  , где каждый из R^{31}, R^{32} и R^{33} независимо выбран из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, причем указанное общее число атомов углерода в группе R^{12} составляет не более 5;

(iie)  , где один из R^{35a} и R^{35b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; и

(iif)  , где R^{24} выбран из: H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила;

если между C2′ и C3′ присутствует одинарная связь, R^{12} представляет собой  ,
где R^{36a} и R^{36b} независимо выбраны из H, F, C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, причем алкильная и алкенильная группы необязательно замещены группой, выбранной из C_{1-4} алкиламидо и C_{1-4} алкилового сложного эфира; или, если один из R^{36a} и R^{36b} представляет собой H, другой выбран из нитрила и C_{1-4} алкилового сложного эфира;
и p составляет от 1 до 8.

2. Конъюгат по утверждению 1, в котором X представляет собой одинарную связь.

3. Конъюгат по утверждению 1, в котором X представляет собой $-CH_2-$.

4. Конъюгат по утверждению 1, в котором X представляет собой $-C_2H_4-$.

5. Конъюгат по любому из пп. 1-4, в котором n составляет 1-4.

6. Конъюгат по утверждению 5, в котором n равно 1.

7. Конъюгат по утверждению 5, в котором n равно 2.

8. Конъюгат по утверждению 5, в котором n равно 4.

9. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R^2 представляет собой C_{5-7} арильную группу.

10. Соединение по утверждению 9, в котором R^2 представляет собой фенил.

11. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R^2 представляет собой C_{8-10} арильную группу.

12. Соединение по любому из пп. 9-11, в котором R^2 несет от одной до трех групп-заместителей.

13. Соединение по любому из пп. 9-12, в котором указанные заместители выбраны из метокси, этокси, фтора, хлора, циано, бис-оксиметилена, метилпиперазинила, морфолино и метилтиофенила.

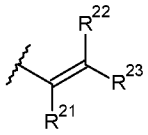
14. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R^2 представляет собой C_{1-5} насыщенную алифатическую алкильную группу.

15. Соединение по утверждению 14, в котором R^2 представляет собой метил, этил или пропил.

16. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R^2 представляет собой C_{3-6} насыщенную циклоалкильную группу.

17. Соединение по утверждению 16, в котором R^2 представляет собой циклопропил.

18. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R^2 представляет собой группу формулы:



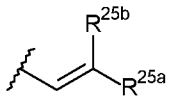
19. Соединение по утверждению 18, в котором указанное общее число атомов углерода в группе R^2 составляет не более 4.

20. Соединение по утверждению 19, в котором указанное общее число атомов углерода в группе R^2 составляет не более 3.

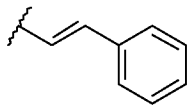
21. Соединение по любому из пп. 18-20, в котором один из R^{21}, R^{22} и R^{23} представляет собой H, при этом две другие группы выбраны из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила.

22. Соединение по любому из пп. 18-20, в котором два из R^{21}, R^{22} и R^{23} представляют собой H, при этом другая группа выбрана из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила.

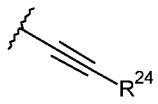
23. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R^2 представляет собой группу формулы:



24. Соединение по утверждению 23, в котором R^2 представляет собой группу:

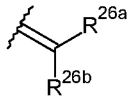


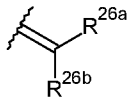
25. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R^2 представляет собой группу формулы:

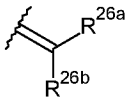


26. Соединение по утверждению 25, в котором R^{24} выбран из H, метила, этила, этенила и этинила.

27. Соединение по утверждению 26, в котором R^{24} выбран из H и метила.

28. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует одинарная связь, R^2 представляет собой  , а R^{26a} и R^{26b} оба представляют собой H.

29. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует одинарная связь, R^2 представляет собой  , а R^{26a} и R^{26b} оба представляют собой метил.

30. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует одинарная связь, R^2 представляет собой  , один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, а другой выбран из C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, причем алкильная и алкенильная группы необязательно замещены.

31. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, и R^{12} представляет собой C_{5-7} арильную группу.

32. Соединение по утверждению 31, в котором R^{12} представляет собой фенил.

33. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, и R^{12} представляет собой C_{8-10} арильную группу.

34. Соединение по любому из пп. 31-33, в котором R^{12} несет от одной до трех групп-заместителей.

35. Соединение по любому из пп. 31-34, в котором указанные заместители выбраны из метокси, этокси, фтора, хлора, циано, бис-оксиметилена, метилпиперазинила, морфолино и метилтиофенила.

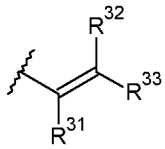
36. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, и R^{12} представляет собой C_{1-5} насыщенную алифатическую алкильную группу.

37. Соединение по утверждению 36, в котором R^{12} представляет собой метил, этил или пропил.

38. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, и R^{12} представляет собой C_{3-6} насыщенную циклоалкильную группу.

39. Соединение по утверждению 38, в котором R^{12} представляет собой циклопропил.

40. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, и R^{12} представляет собой группу формулы:



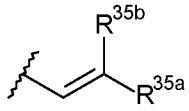
41. Соединение по утверждению 40, в котором указанное общее число атомов углерода в группе R^{12} составляет не более 4.

42. Соединение по утверждению 41, в котором указанное общее число атомов углерода в группе R^{12} составляет не более 3.

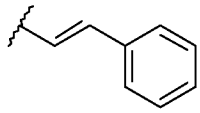
43. Соединение по любому из пп. 40-42, в котором один из R^{31}, R^{32} и R^{33} представляет собой H, при этом две другие группы выбраны из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила.

44. Соединение по любому из пп. 40-42, в котором два из R^{31}, R^{32} и R^{33} представляют собой H, при этом другая группа выбрана из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила.

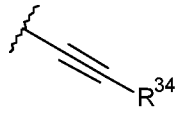
45. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, и R^{12} представляет собой группу формулы:



46. Соединение по утверждению 45, в котором R^{12} представляет собой группу:

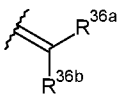


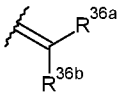
47. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, и R^{12} представляет собой группу формулы:

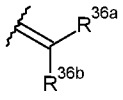


48. Соединение по утверждению 47, в котором R^{34} выбран из H, метила, этила, этенила и этинила.

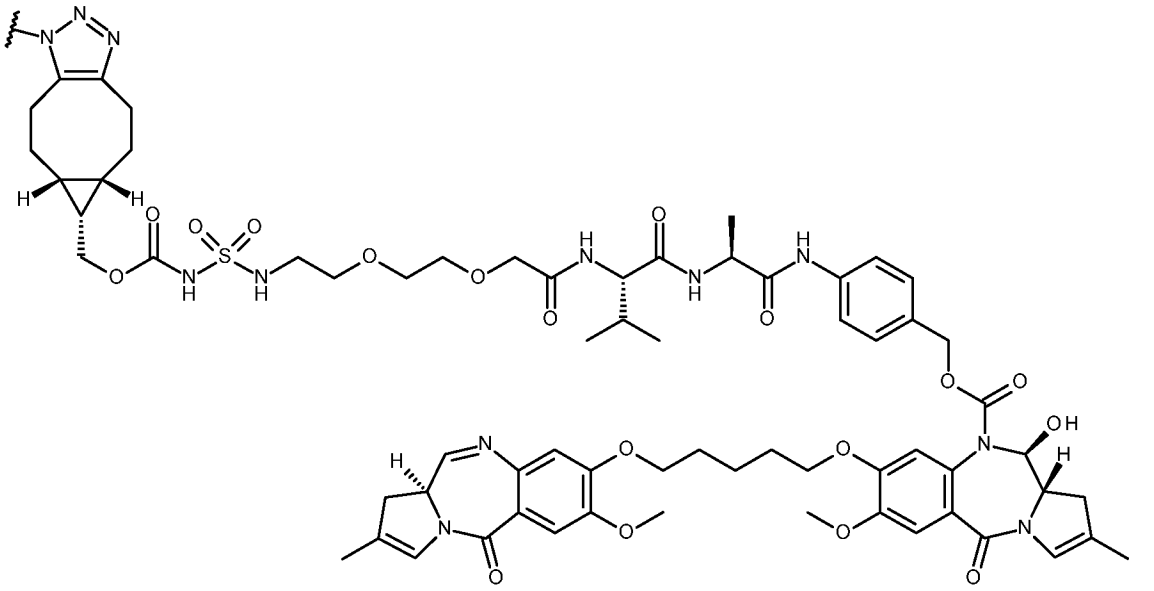
49. Соединение по утверждению 48, в котором R^{34} выбран из H и метила.

50. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует одинарная связь, R^{12} представляет собой  , а R^{36a} и R^{36b} оба представляют собой H.

51. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует одинарная связь, R^{12} представляет собой  , а R^{36a} и R^{36b} оба представляют собой метил.

52. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует одинарная связь, R^{12} представляет собой  , один из R^{36a} и R^{36b} представляет собой H, а другой выбран из C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, причем алкильная и алкенильная группы необязательно замещены.

53. Конъюгат по утверждению 1, в котором DL представляет собой:



54. Конъюгат по любому из пп. 1-53, в котором указанное антитело содержит домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 107.

55. Конъюгат по любому из пп. 1-54, в котором указанное антитело содержит домен VH, содержащий CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 106 и/или CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 105.

56. Конъюгат по любому из пп. 1-55, в котором указанное антитело содержит домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 107, CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 106 и CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 105.

57. Конъюгат по любому из пп. 1-56, в котором указанное антитело содержит домен VH, содержащий последовательность SEQ ID NO. 101.

58. Конъюгат по любому из пп. 1-57, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 110.

59. Конъюгат по любому из пп. 1-58, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 109 и/или CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 108.

60. Конъюгат по любому из пп. 1-59, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 110, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 109 и CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 108.

61. Конъюгат по любому из пп. 1-60, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий последовательность SEQ ID NO. 102.

62. Конъюгат по любому из пп. 1-60, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий последовательность SEQ ID NO. 113.

63. Конъюгат по любому из пп. 1-60, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий последовательность SEQ ID NO. 115.

64. Конъюгат по любому из пп. 1-63, в котором указанное антитело представляет собой интактное антитело.

65. Конъюгат по любому из пп. 1-64, в котором указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 103, или тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 111.

66. Конъюгат по любому из пп. 1-65, в котором указанное антитело содержит легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 104.

67. Конъюгат по любому из пп. 1-65, в котором указанное антитело содержит легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 114.

68. Конъюгат по любому из пп. 1-65, в котором указанное антитело содержит легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 116.

69. Конъюгат по любому из пп. 1-68, в котором указанное антитело является гуманизированным, деиммунизированным или антителом с измененной поверхностью.

70. Конъюгат по любому из пп. 1-69, в котором на указанном антителе отсутствуют неконъюгированные азидные группы.

71. Конъюгат по любому из пп. 1-70, в котором p равно 1, 2, 3 или 4.

72. Композиция, содержащая смесь конъюгатов антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-71, причем указанная средняя нагрузка лекарственным средством на антитело в указанной смеси конъюгатов антитело-лекарственное средство составляет от примерно 1 до примерно 4.

73. Конъюгат по любому из пп. 1-71 для применения в терапии.

74. Конъюгат по любому из пп. 1-71 для применения в лечении пролиферативного заболевания у субъекта.

75. Конъюгат по утверждению 74, в котором указанное заболевание представляет собой рак.

76. Конъюгат по утверждению 75, в котором указанный рак представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из: рака яичников, рака молочной железы, рака простаты и рака почек.

77. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому из пп. 1-71 и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

78. Фармацевтическая композиция по утверждению 77, дополнительно содержащая терапевтически эффективное количество химиотерапевтического агента.

79. Применение конъюгата по любому из пп. 1-71 в получении лекарственного средства для применения в лечении пролиферативного заболевания у субъекта.

80. Способ лечения рака, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по утверждению 78.

81. Способ по утверждению 80, в котором указанному пациенту вводят химиотерапевтический агент в комбинации с указанным конъюгатом.

Конъюгаты, направленные против мезотелина

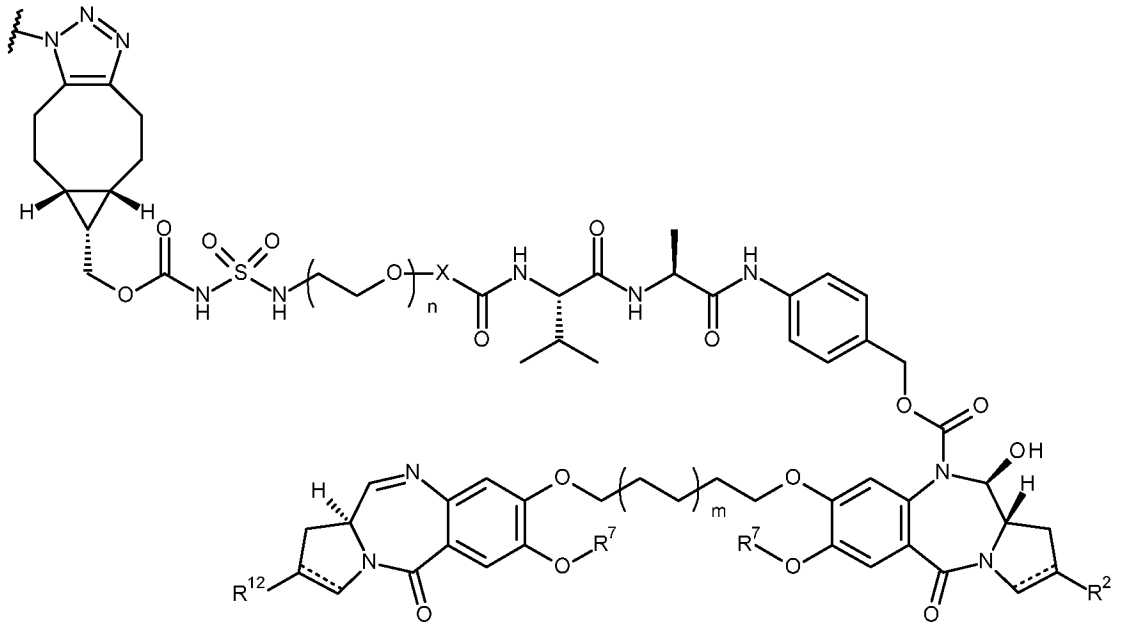
1. Конъюгат формулы (I):

$$Ab\text{-}(DL)_p \quad (I)$$

в которой:

Ab представляет собой антитело, которое связывается с мезотелином;

DL представляет собой



,

где:

X выбран из группы, включающей: одинарную связь, $-CH_2-$ и $-C_2H_4-$;

n составляет от 1 до 8;

m равно 0 или 1;

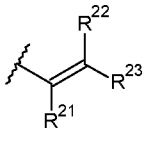
R^7 представляет собой метил или фенил;

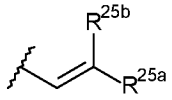
если между C2 и C3 присутствует двойная связь, R^2 выбран из группы, состоящей из:

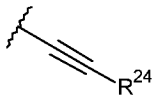
(ia) C_{5-10} арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, включающей: галоген, нитро, циано, простой эфир, карбокси, сложный эфир, C_{1-7} алкил, C_{3-7} гетероциклил и бис-окси-C_{1-3} алкилен;

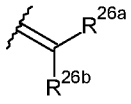
(ib) C_{1-5} насыщенного алифатического алкила;

(ic) C_{3-6} насыщенного циклоалкила;

(id)  , где каждый из R^{21}, R^{22} и R^{23} независимо выбран из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, причем указанное общее число атомов углерода в группе R^2 составляет не более 5;

(ie)  , где один из R^{25a} и R^{25b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; и

(if)  , где R^{24} выбран из: H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила;

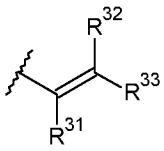
если между C2 и C3 присутствует одинарная связь, R^2 представляет собой  , где R^{26a} и R^{26b} независимо выбраны из H, F, C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, причем алкильная и алкенильная группы необязательно замещены группой, выбранной из C_{1-4} алкиламидо и C_{1-4} алкилового сложного эфира; или, если один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, другой выбран из нитрила и C_{1-4} алкилового сложного эфира;

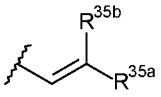
если между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, R^{12} выбран из группы, состоящей из:

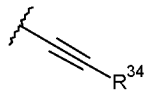
(iia) C_{5-10} арильной группы, необязательно замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, включающей: галоген, нитро, циано, простой эфир, карбокси, сложный эфир, C_{1-7} алкил, C_{3-7} гетероциклил и бис-окси-C_{1-3} алкилен;

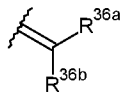
(iib) C_{1-5} насыщенного алифатического алкила;

(iic) C_{3-6} насыщенного циклоалкила;

(iid)  , где каждый из R^{31}, R^{32} и R^{33} независимо выбран из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, причем указанное общее число атомов углерода в группе R^{12} составляет не более 5;

(iie)  , где один из R^{35a} и R^{35b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; и

(iif)  , где R^{24} выбран из: H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, причем фенил необязательно замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила;

если между C2′ и C3′ присутствует одинарная связь, R^{12} представляет собой  ,
где R^{36a} и R^{36b} независимо выбраны из H, F, C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, причем алкильная и алкенильная группы необязательно замещены группой, выбранной из C_{1-4} алкиламидо и C_{1-4} алкилового сложного эфира; или, если один из R^{36a} и R^{36b} представляет собой H, другой выбран из нитрила и C_{1-4} алкилового сложного эфира;
и p составляет от 1 до 8.

2. Конъюгат по утверждению 1, в котором X представляет собой одинарную связь.

3. Конъюгат по утверждению 1, в котором X представляет собой $-CH_2-$.

4. Конъюгат по утверждению 1, в котором X представляет собой $-C_2H_4-$.

5. Конъюгат по любому из пп. 1-4, в котором n составляет 1-4.

6. Конъюгат по утверждению 5, в котором n равно 1.

7. Конъюгат по утверждению 5, в котором n равно 2.

8. Конъюгат по утверждению 5, в котором n равно 4.

9. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R^2 представляет собой C_{5-7} арильную группу.

10. Соединение по утверждению 9, в котором R^2 представляет собой фенил.

11. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R^2 представляет собой C_{8-10} арильную группу.

12. Соединение по любому из пп. 9-11, в котором R^2 несет от одной до трех групп-заместителей.

13. Соединение по любому из пп. 9-12, в котором указанные заместители выбраны из метокси, этокси, фтора, хлора, циано, бис-оксиметилена, метилпиперазинила, морфолино и метилтиофенила.

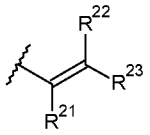
14. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R^2 представляет собой C_{1-5} насыщенную алифатическую алкильную группу.

15. Соединение по утверждению 14, в котором R^2 представляет собой метил, этил или пропил.

16. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R^2 представляет собой C_{3-6} насыщенную циклоалкильную группу.

17. Соединение по утверждению 16, в котором R^2 представляет собой циклопропил.

18. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R^2 представляет собой группу формулы:



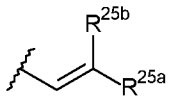
19. Соединение по утверждению 18, в котором указанное общее число атомов углерода в группе R^2 составляет не более 4.

20. Соединение по утверждению 19, в котором указанное общее число атомов углерода в группе R^2 составляет не более 3.

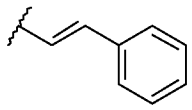
21. Соединение по любому из пп. 18-20, в котором один из R^{21}, R^{22} и R^{23} представляет собой H, при этом две другие группы выбраны из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила.

22. Соединение по любому из пп. 18-20, в котором два из R^{21}, R^{22} и R^{23} представляют собой H, при этом другая группа выбрана из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила.

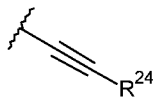
23. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R^2 представляет собой группу формулы:



24. Соединение по утверждению 23, в котором R^2 представляет собой группу:

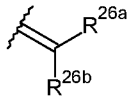


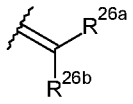
25. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R^2 представляет собой группу формулы:

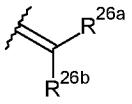


26. Соединение по утверждению 25, в котором R^{24} выбран из H, метила, этила, этенила и этинила.

27. Соединение по утверждению 26, в котором R^{24} выбран из H и метила.

28. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует одинарная связь, R^2 представляет собой  , а R^{26a} и R^{26b} оба представляют собой H.

29. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует одинарная связь, R^2 представляет собой  , а R^{26a} и R^{26b} оба представляют собой метил.

30. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором между C2 и C3 присутствует одинарная связь, R^2 представляет собой  , один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, а другой выбран из C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, причем алкильная и алкенильная группы необязательно замещены.

31. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, и R^{12} представляет собой C_{5-7} арильную группу.

32. Соединение по утверждению 31, в котором R^{12} представляет собой фенил.

33. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, и R^{12} представляет собой C_{8-10} арильную группу.

34. Соединение по любому из пп. 31-33, в котором R^{12} несет от одной до трех групп-заместителей.

35. Соединение по любому из пп. 31-34, в котором указанные заместители выбраны из метокси, этокси, фтора, хлора, циано, бис-оксиметилена, метилпиперазинила, морфолино и метилтиофенила.

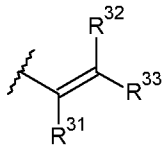
36. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, и R^{12} представляет собой C_{1-5} насыщенную алифатическую алкильную группу.

37. Соединение по утверждению 36, в котором R^{12} представляет собой метил, этил или пропил.

38. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, и R^{12} представляет собой C_{3-6} насыщенную циклоалкильную группу.

39. Соединение по утверждению 38, в котором R^{12} представляет собой циклопропил.

40. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, и R^{12} представляет собой группу формулы:



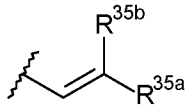
41. Соединение по утверждению 40, в котором указанное общее число атомов углерода в группе R^{12} составляет не более 4.

42. Соединение по утверждению 41, в котором указанное общее число атомов углерода в группе R^{12} составляет не более 3.

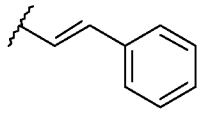
43. Соединение по любому из пп. 40-42, в котором один из R^{31}, R^{32} и R^{33} представляет собой H, при этом две другие группы выбраны из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила.

44. Соединение по любому из пп. 40-42, в котором два из R^{31}, R^{32} и R^{33} представляют собой H, при этом другая группа выбрана из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила.

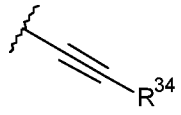
45. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, и R^{12} представляет собой группу формулы:



46. Соединение по утверждению 45, в котором R^{12} представляет собой группу:

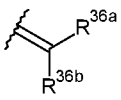


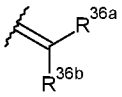
47. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, и R^{12} представляет собой группу формулы:

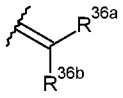


48. Соединение по утверждению 47, в котором R^{34} выбран из H, метила, этила, этенила и этинила.

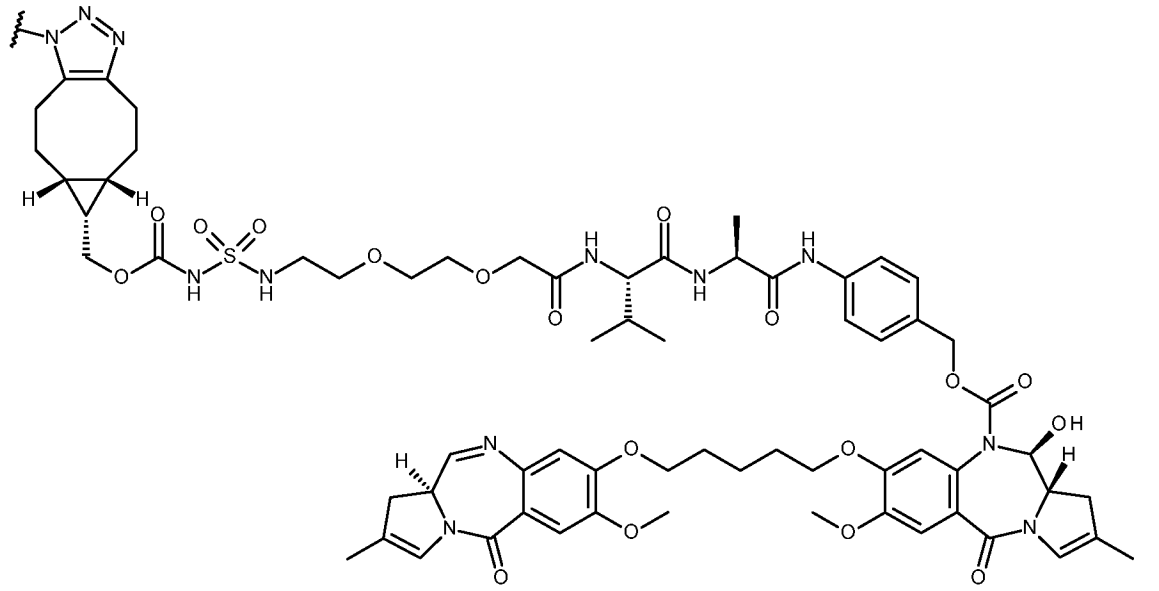
49. Соединение по утверждению 48, в котором R^{34} выбран из H и метила.

50. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует одинарная связь, R^{12} представляет собой  , а R^{36a} и R^{36b} оба представляют собой H.

51. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует одинарная связь, R^{12} представляет собой  , а R^{36a} и R^{36b} оба представляют собой метил.

52. Соединение по любому из пп. 1-30, в котором между C2′ и C3′ присутствует одинарная связь, R^{12} представляет собой  , один из R^{36a} и R^{36b} представляет собой H, а другой выбран из C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, причем алкильная и алкенильная группы необязательно замещены.

53. Конъюгат по утверждению 1, в котором DL представляет собой:



54. Конъюгат по любому из пп. 1-53, в котором указанное антитело содержит домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 207.

55. Конъюгат по любому из пп. 1-54, в котором указанное антитело содержит домен VH, содержащий CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 206 и/или CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 205.

56. Конъюгат по любому из пп. 1-55, в котором указанное антитело содержит домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 207, CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 206 и CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 205.

57. Конъюгат по любому из пп. 1-56, в котором указанное антитело содержит домен VH, содержащий последовательность SEQ ID NO. 201.

58. Конъюгат по любому из пп. 1-57, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 210.

59. Конъюгат по любому из пп. 1-58, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 209 и/или CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 208.

60. Конъюгат по любому из пп. 1-59, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 210, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 209 и CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 208.

61. Конъюгат по любому из пп. 1-60, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий последовательность SEQ ID NO. 202.

62. Конъюгат по любому из пп. 1-61, в котором указанное антитело представляет собой интактное антитело.

63. Конъюгат по любому из пп. 1-62, в котором указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 203, или тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 211.

64. Конъюгат по любому из пп. 1-63, в котором указанное антитело содержит легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 204.

65. Конъюгат по любому из пп. 1-53, в котором указанное антитело содержит домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 218.

66. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 65, в котором указанное антитело содержит домен VH, содержащий CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 217 и/или CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 216.

67. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 65-66, в котором указанное антитело содержит домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 218, CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 217 и CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 216.

68. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 65-67, в котором указанное антитело содержит домен VH, содержащий последовательность SEQ ID NO. 212.

69. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 65-68, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 221.

70. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 65-69, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 220 и/или CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 219.

71. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 65-70, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ

ID NO. 221, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 220 и CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 219.

72. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 65-71, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий последовательность SEQ ID NO. 213.

73. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 65-72, в котором указанное антитело представляет собой интактное антитело.

74. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 65-73, в котором указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 214, или тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 222.

75. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 65-74, в котором указанное антитело содержит легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 215.

76. Конъюгат по любому из пп. 1-53, в котором указанное антитело содержит домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 229.

77. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 76, в котором указанное антитело содержит домен VH, содержащий CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 228 и/или CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 227.

78. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 76-77, в котором указанное антитело содержит домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 228, CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 227 и CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 226.

79. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 76-78, в котором указанное антитело содержит домен VH, содержащий последовательность SEQ ID NO. 223.

80. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 76-79, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 232.

81. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 76-80, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 231 и/или CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 230.

82. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 76-81, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 232, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 231 и CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 230.

83. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 76-82, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий последовательность SEQ ID NO. 224.

84. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 76-83, в котором указанное антитело представляет собой интактное антитело.

85. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 76-84, в котором указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 225, или тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 233.

86. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 76-85, в котором указанное антитело содержит легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 226.

87. Конъюгат по любому из пп. 1-53, в котором указанное антитело содержит домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 240.

88. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 87, в котором указанное антитело содержит домен VH, содержащий CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 239 и/или CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 238.

89. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 87-88, в котором указанное антитело содержит домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 240, CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 239 и CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 238.

90. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 87-89, в котором указанное антитело содержит домен VH, содержащий последовательность SEQ ID NO. 234.

91. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 87-90, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 243.

92. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 87-91, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 242 и/или CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 241.

93. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 87-92, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 243, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 242 и CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 241.

94. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 87-93, в котором указанное антитело содержит домен VL, содержащий последовательность SEQ ID NO. 235.

95. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 87-94, в котором указанное антитело представляет собой интактное антитело.

96. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 87-95, в котором указанное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 236, или тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 244.

97. Конъюгат по любому из пп. 1-53 или 87-96, в котором указанное антитело содержит легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 237.

98. Конъюгат по любому из пп. 1-97, в котором указанное антитело является гуманизированным, деиммунизированным или антителом с измененной поверхностью.

99. Конъюгат по любому из пп. 1-98, в котором на указанном антителе отсутствуют неконъюгированные азидные группы.

100. Конъюгат по любому из пп. 1-99, в котором p равно 1, 2, 3 или 4.

101. Композиция, содержащая смесь конъюгатов антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-100, причем указанная средняя нагрузка лекарственным средством на антитело в указанной смеси конъюгатов антитело-лекарственное средство составляет от примерно 1 до примерно 4.

102. Конъюгат по любому из пп. 1-100 для применения в терапии.

103. Конъюгат по любому из пп. 1-100 для применения в лечении пролиферативного заболевания у субъекта.

104. Конъюгат по утверждению 103, в котором указанное заболевание представляет собой рак.

105. Конъюгат по утверждению 104, в котором указанный рак представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из: мезотелиомы, рака легких, рака яичников или рака поджелудочной железы.

106. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому из пп. 1-100 и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

107. Фармацевтическая композиция по утверждению 106, дополнительно содержащая терапевтически эффективное количество химиотерапевтического агента.

108. Применение конъюгата по любому из пп. 1-100 в получении лекарственного средства для применения в лечении пролиферативного заболевания у субъекта.

109. Способ лечения рака, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по утверждению 101.

110. Способ по утверждению 109, в котором указанному пациенту вводят химиотерапевтический агент в комбинации с указанным конъюгатом.

Примеры

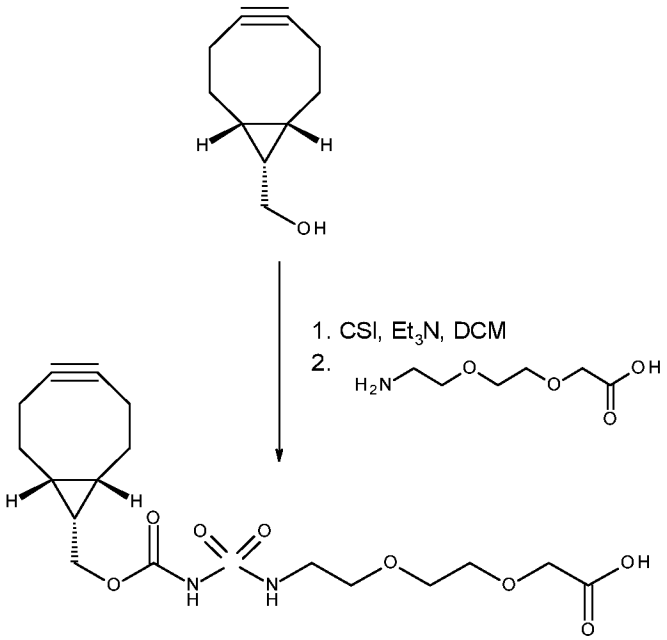
Обзор

ADC, раскрытые в настоящей заявке, синтезируют с помощью двухэтапного способа. Первый этап представляет собой ремоделирование гликана, на котором происходит обрезка нативного N-соединенного гликана до центрального GlcNAc, а затем добавление азидо-модифицированного GalNAc с образованием промежуточного соединения

антитело-GalNAc-N_3. Это соединение очищают с помощью хроматографии на белке A и затем конъюгируют с линкером лекарственного средства на втором этапе.

Эти этапы описаны ниже в следующем описании синтеза лекарственное средство-линкер.

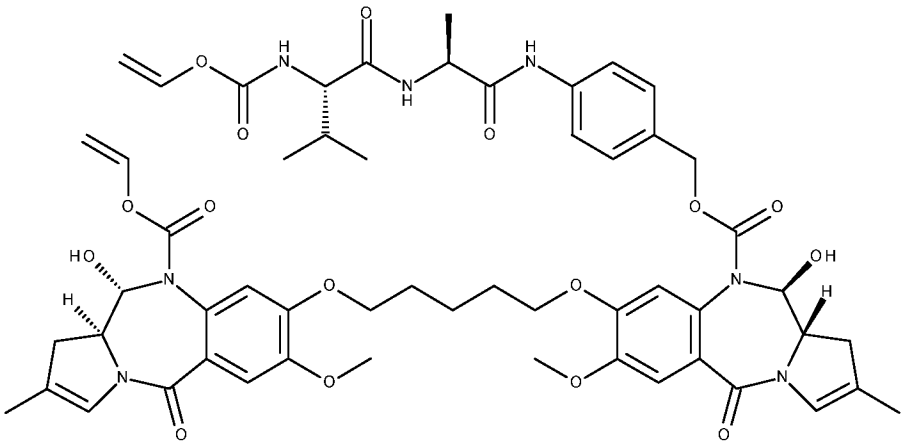
Синтез промежуточного соединения **3**



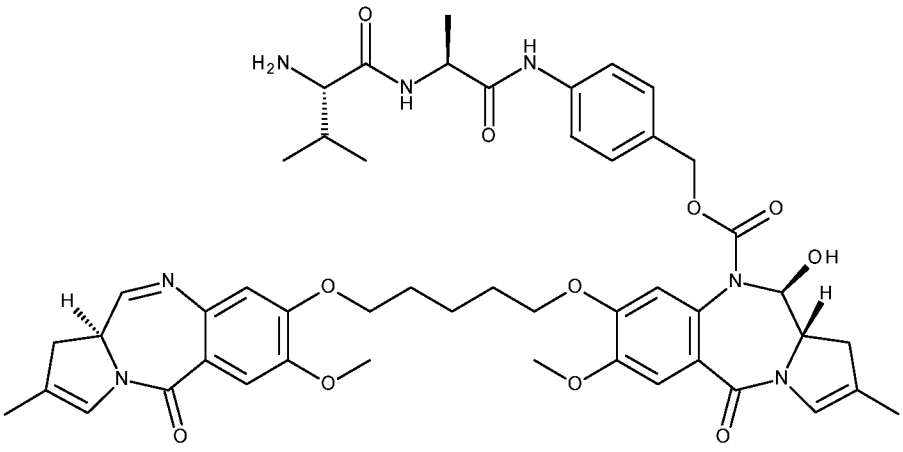
3

Раствор BCN-спирта (0,384 г, 2,55 ммоль) в MeCN (25 мл) в атмосфере N_2 охлаждали до 0°C и по каплям добавляли хлорсульфонилизоцианат (CSI) (0,255 мл, 415 мг, 2,93 ммоль, 1,15 экв.). После перемешивания в течение 15 минут по каплям добавляли Et_3N (1,42 мл, 1,03 г, 10,2 ммоль, 4 экв.) и перемешивание продолжали в течение еще 10 минут. Затем добавляли раствор 2-(2-(2-аминоэтокси)этокси)уксусной кислоты (1,0 г, 6,1 ммоль, 2,4 экв.) в H_2O (5 мл) и реакционную смесь перемешивали до комнатной температуры в течение 2 ч. По истечении этого времени добавляли $CHCl_3$ (50 мл) и H_2O (100 мл) и разделяли слои. К водному слою в делительной воронке добавляли CH_2Cl_2 (100 мл) и pH доводили до 4 с помощью 1 н HCl перед разделением слоев. Водный слой дважды экстрагировали с применением CH_2Cl_2 (2×100 мл), органические слои объединяли, высушивали (Na_2SO_4), фильтровали и концентрировали. Остаток очищали с помощью хроматографии в резервуарной колонке на силикагеле, элюировали с применением CH_2Cl_2 до 20% MeOH в CH_2Cl_2. Выход составил 0,42 г (1,0 ммоль, 39%) **3** в виде бесцветного липкого воска.

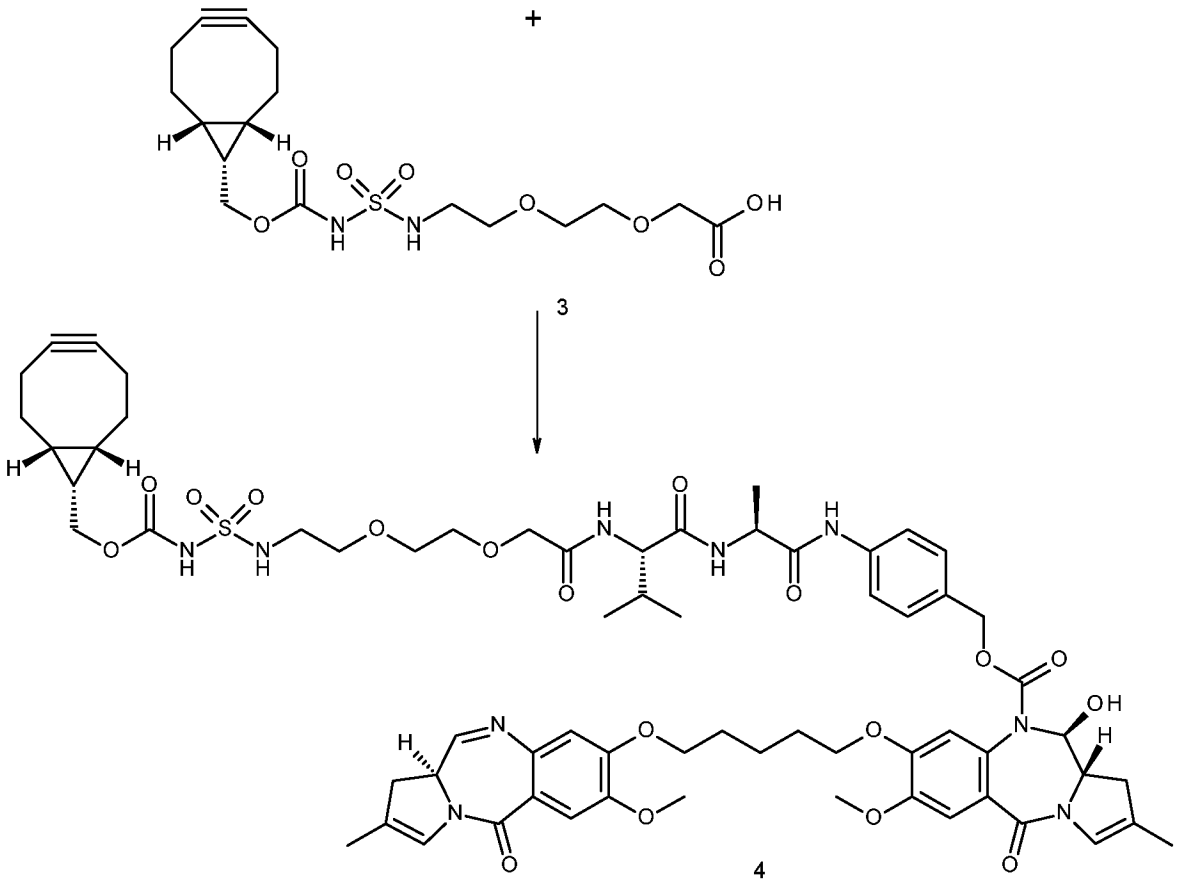
Синтез линкера лекарственного средства



1



2



Соединение 1 может быть синтезировано, как описано в WO2014/057074 - см. соединение 22.

(a) Тетракистрифенилфосфин палладия ($Pd(PPh_3)_4$, 4,8 мг, 4,15 мкмоль) взвешивают и помещают в инертную атмосферу. Раствор пирролидина (5,0 мкл, 4,3 мг, 60 мкмоль) в ДХМ (1 мл) дегазируют путем барботирования N_2 через раствор. Раствор **1** (27 мг, 24 мкмоль) в ДХМ (6 мл) дегазируют путем барботирования N_2 через раствор. Во время барботирования раствора с применением N_2 добавляют дегазированный раствор пирролидина. Взвешенный $Pd(PPh_3)_4$ растворяют в ДХМ (1 мл) и добавляют 0,9 мл этого раствора. Через 50 минут барботирования с применением N_2 добавляют ДХМ (25 мл) и смесь промывают водным насыщенным NH_4Cl (25 мл). После разделения водный слой экстрагируют с применением ДХМ (2×25 мл). Объединенные органические слои высушивают (Na_2SO_4) и концентрируют. Остаток очищают методом ОФ-ВЭЖХ (30–90% MeCN (0,1% муравьиной кислоты) в H_2O (0,1% муравьиной кислоты)). Объединенные фракции пропускают через колонки SPE (HCO_3^-) и концентрируют. После добавления MeCN (50 мл) смесь снова концентрируют. Полученный остаток **2** используют на следующем этапе.

Превращение реакции можно контролировать с помощью анализа методом ЖХ/МС. Колонка: колонка XBridge BEH C18 Intelligent Speed (IS), 130 Å, 3,5 мкм (4,6 мм×20 мм). Подвижная фаза A: вода (0,1% муравьиной кислоты), подвижная фаза B (0,1% муравьиной

кислоты). Обнаружение с применением PDA и ESI+. Образцы могут быть получены путем разбавления реакционной смеси MeCN.

(b) К раствору вышеуказанного остатка **2** в $CHCl_3$ (5 мл) добавляют раствор **3** (15 мг, 36 мкмоль, мол. масса 418 г/моль) в $CHCl_3$ (0,8 мл). Полученную смесь добавляют к твердому веществу EDC.HCl (4,7 мг, 25 мкмоль), добавляли $CHCl_3$ (5 мл) и смесь перемешивали в течение 30 минут. Добавляют ДХМ (30 мл) и полученную смесь промывают водой (30 мл). После разделения водную фазу экстрагируют с применением ДХМ (30 мл). Объединенные органические слои высушивают (Na_2SO_4) и концентрируют. Остаток очищают с помощью ОФ-ВЭЖХ (30–90% MeCN (без кислоты) в H_2O (0,01% муравьиной кислоты)). Перед сбором пробирки для элюции после ВЭЖХ заполняют 5% водным $(NH_4)HCO_3$. Объединенные фракции ВЭЖХ экстрагируют с применением ДХМ (3×20 мл). Объединенные органические слои высушивают (Na_2SO_4) и концентрируют. Продукт **4** получают в виде светло-желтого/белого масла (21 мг, 16 мкмоль, мол. масса 1323 г/моль, 67% после двух этапов).

Превращение реакции можно контролировать с помощью анализа методом ЖХ/МС. Колонка: колонка XBridge BEH C18 Intelligent Speed (IS), 130 Å, 3,5 мкм (4,6 мм×20 мм). Подвижная фаза A: вода (0,1% муравьиной кислоты), подвижная фаза B (0,1% муравьиной кислоты). Обнаружение с применением PDA и ESI+.

Ремоделирование гликана (ADC, направленный против DLK1, ConjA1)

Получение антитела

Буфер в приблизительно 60 мг антитела к DLK1 заменяли 25 мМ трис/Cl, 150 мМ NaCl, pH=8,0 с помощью колонки для обессоливания G25; 4×2,5 мл при 6 мг/мл, загруженных на 4× колонки для обессоливания PD10 (GE 17085101). Затем антитело с замененным буфером концентрировали до по меньшей мере 25 мг/мл с использованием центробежного концентратора Vivaspin 20 (Sigma Z614637). С помощью УФ-анализа при A280-320 нм, используя коэффициент экстинкции 1,5, было подтверждено, что концентрация белка составляет 28,4 мг/мл.

Реакция ремоделирования

Ремоделирование гликана выполняли в однореакторной реакции в течение ночи (16 часов) при комнатной температуре. Следующую реакционную смесь получали с добавлением растворов/реагентов в порядке, подробно представленном ниже:

Раствор	**Объем (мкл)**	**Конечная концентрация**
25мМ трис/Cl, 150 мМ NaCl, pH=8,0	663,8	Нет данных

Антитело к DLK1 в 25 мМ трис/Cl, 150 мМ NaCl, pH=8,0	2000	15 мг/мл
3,5 мг/мл EndoSH в 25 мМ трис/Cl, pH=8,0	165,7	1% масс./масс. относительно МАТ
4,82 мг/мл His-TnGalNAcT в 25 мМ трис/Cl, pH=8,0	902,5	7,5% масс./масс. относительно МАТ
1 М $MgCl_2$ в воде MQ	38,7	10 мМ
0,1 М 6-N_3GalNAc-UDP в воде MQ	96	25 экв. относительно МАТ

Процедура очистки на белке А

Связывание с белком А и элюирование выполняли на колонке HiTrap MabSelect Sure 5 мл (GE 11-0034-94). Все хроматографические этапы выполняли при скорости потока 240 см/ч, используя систему AKTA Prime plus. Колонку подготавливали и использовали следующим образом:

Раствор	CV	Примечания
0,1 М NaOH	3	Дезинфекция
25 мМ трис/Cl, 25 мМ NaCl, pH=8,0	10	Уравновешивание
Образец антитела к DLK1	По мере необходимости	Загрузка
0,4 М фосфат калия, 0,2% тритон 100, pH=7,0	20	Этап промывки/удаления эндотоксинов
25 мМ трис/Cl, 25 мМ NaCl, pH=8,0	20	Этап промывки/удаления тритона
0,15 М уксусной кислоты	По мере необходимости	Сбор пика от 0,1 до 0,1 опт. ед.

После аффинной очистки на белке А небольшой образец продукта может быть восстановлен с применением DTT и впоследствии подвергнут анализу методом МС. Типичный масс-спектр успешной реакции переноса показывает образование одного

основного продукта (90% от общей тяжелой цепи), возникающего в результате переноса модифицированной галактозы к антителу с замещенным центральным GlcNAc(Fuc), и минорного продукта (±10% от общей тяжелой цепи), полученного в результате переноса модифицированной галактозы к антителу с замещенным центральным GlcNAc (без фукозы).

Замена буфера после очистки на белке А

Далее, буфер в ремоделированном и очищенном GalNAc-N_3-антителе к DLK1 заменяли фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и концентрировали до приблизительно 16,6 мг/мл с использованием центробежного концентратора Vivaspin 20 (Sigma Z614637). Элюат после очистки на белке А разбавляли ФСБ в соотношении 1:1, затем повторно концентрировали до первоначального объема и повторяли это 6 раз. Наконец, объем уменьшали до целевого значения 16-17 мг/мл, и образец извлекали из устройства. С помощью УФ-анализа при А280-320 нм, используя коэффициент экстинкции 1,5, было подтверждено, что концентрация белка составляет 16,4 мг/мл, и всего было выделено 2,7 мл.

Конъюгация **4** с модифицированным антителом для получения ConjA1

Условия реакции

2,7 мл 16,4 мг/мл азидо-модифицированного антитела к DLK1 (в этом примере HuBa-1-3d, описанное в настоящей заявке)

0,3 мл 10 мМ **4** в диметилацетамиде

Реакционную смесь тщательно перемешивали и оставляли для протекания конъюгации в течение ночи (16 часов) при комнатной температуре. Конъюгационную смесь фильтровали через PVDF-фильтр с размером пор 0,2 мкм (Millipore SLGV033RS) перед окончательной очисткой и изготовлением состава.

Очистка ConjA1

Профильтрованную конъюгационную смесь очищали с использованием центробежного концентратора Vivaspin 20 (Sigma Z614637). Конъюгационную смесь разбавляли 30 мМ гистидина HCl, 200 мМ сорбита, pH=6,0 в соотношении 1:1 и повторно концентрировали до первоначального объема. Это повторяли 12 раз перед извлечением очищенной массы ADC из центрифужного устройства.

Концентрацию белка определяли с помощью количественного анализа методом гель-проникающей хроматографии (SEC), используя калибровочную кривую антитела и конъюгат, разбавленный до приблизительно 5 мг/мл дополнительными 30 мМ гистидина HCl, 200 мМ сорбита, pH=6,0. Твин 20 добавляли до 0,02% масс./об. из 1% маточного раствора в 30 мМ гистидина HCl, 200 мМ сорбита, pH=6,0, и концентрацию повторно

тестировали с помощью количественного анализа методом SEC. Отбирали образец для тестирования, а остаток разделяли на аликвоты по 1 мл и замораживали при -80°C.

Анализ продукта показал следующие свойства:

Прозрачный, бесцветный, без частиц

5,17 [белок] по данным SEC

Средний DAR 1,87 (по данным хроматографии с обращенной фазой)

0,09 ЕЭ/мг эндотоксина

≤4,5% свободного соединения лекарственное средство-линкер

pH=6,06

Ремоделирование гликана (ADC, направленный против KAAG1, ConjA2)

Получение антитела

Буфер в приблизительно 150 мг антитела к KAAG1 (приблизительно 25 мл при 6,13 мг/мл в ФСБ, pH=7,4) заменяли 25 мМ трис/Cl, 150 мМ NaCl, pH=8,0 и концентрировали до >25 мг/мл с использованием центробежных концентраторов Vivaspin 20 (Sigma Z614637). Сначала антитело концентрировали до 12 мл, после этого разбавляли 25 мМ трис/Cl, 150 мМ NaCl, pH=8,0 в соотношении 1:1, затем повторно концентрировали до 12 мл, и этот способ повторяли 6 раз. Наконец, маточный раствор с замененным буфером дополнительно концентрировали до 6 мл. Концентрацию белка определяли с помощью УФ-анализа при A280-320 нм, используя коэффициент экстинкции 1,5, а затем разбавляли до 25 мг/мл с применением 25 мМ трис/Cl, 150 мМ NaCl, pH=8,0.

Реакция ремоделирования

Ремоделирование гликана выполняли в однореакторной реакции в течение ночи (16 часов) при комнатной температуре. Следующую реакционную смесь получали, добавляя растворы/реагенты в порядке, подробно представленном ниже:

Раствор	Объем (мкл)	Конечная концентрация
25 мМ трис/Cl, 150 мМ NaCl, pH=8,0	893	Нет данных
MAT к KAAG1 в 25 мМ трис/Cl, 150 мМ NaCl, pH=8,0	6000	15 мг/мл
3,5 мг/мл EndoSH в 25 мМ трис/Cl, pH=8,0	428,4	1% масс./масс. относительно MAT
4,82 мг/мл His-TnGalNAcT в 25 мМ трис/Cl, pH=8,0	2330	7,5% масс./масс. относительно MAT
1 М $MgCl_2$ в воде MQ	100,2	10 мМ

0,1 М 6-N_3GalNAc-UDP в воде MQ	250	25 экв. относительно MAT

Процедура очистки на белке А

Связывание с белком А и элюирование выполняли на колонке HiScreen MabSelect Sure 4,7 мл (GE 28-9269-77). Все хроматографические этапы выполняли при скорости потока 240 см/ч, используя систему AKTA Prime plus. Колонку подготавливали и использовали следующим образом:

Раствор	CV	Примечания
0,1 М NaOH	3	Дезинфекция
25 мМ трис/Cl, 25 мМ NaCl, pH=8,0	10	Уравновешивание
Образец антитела	По мере необходимости	Загрузка
0,4 М фосфат калия, 0,2% тритон 100, pH=7,0	20	Этап промывки/удаления эндотоксинов
25 мМ трис/Cl, 25 мМ NaCl, pH=8,0	20	Этап промывки/удаления тритона
0,15 М уксусная кислота	По мере необходимости	Сбор пика от 0,1 до 0,1 опт. ед.

После аффинной очистки на белке А небольшой образец продукта может быть восстановлен с применением DTT и впоследствии подвергнут анализу методом МС. Типичный масс-спектр успешной реакции переноса показывает образование одного основного продукта (90% от общей тяжелой цепи), полученного в результате переноса модифицированной галактозы к антителу с замещенным центральным GlcNAc(Fuc), и минорного продукта (±10% от общей тяжелой цепи), полученного в результате переноса модифицированной галактозы к антителу с замещенным центральным GlcNAc (без фукозы).

Замена буфера после очистки на белке А

pH элюата с белка А, содержащего ремоделированное/очищенное Ab-GalNAc-N_3, корректировали путем добавления 1,5 М трис-основания при 3,2% об./об., затем буфер заменяли ФСБ и концентрировали до ≈17 мг/мл, используя центробежные концентраторы Vivaspin 20 (Sigma Z614637). Сначала объединенный продукт со скорректированным pH

разбавляли ФСБ в соотношении 1:1, затем повторно концентрировали до первоначального объема и этот способ повторяли 6 раз. Наконец, маточный раствор с замененным буфером дополнительно концентрировали до целевого значения ≈17 мг/мл. С помощью УФ-анализа при A280-320 нм, используя коэффициент экстинкции 1,5, было подтверждено, что концентрация белка составляет 16,5 мг/мл; всего было выделено 7,9 мл с выходом 88%.

Конъюгация **4** с модифицированным антителом с получением ConjA2

К 7,9 мл 16,5 мг/мл Ab-GalNAc-N_3 (Ab=3A4, описанное в настоящей заявке) добавляли 0,788 мл 10 мМ PL1601 в ДМФА (10% конечный об./об. ДМФА). Реакционную смесь тщательно перемешивали и оставляли для протекания конъюгации в течение ночи (16 часов) при комнатной температуре. Конъюгационную смесь фильтровали через PES-фильтр с размером пор 0,22 мкм (Millipore SLGV033RS) перед окончательной очисткой и изготовлением состава.

Очистка ConjA2

Профильтрованную конъюгационную смесь очищали путем диафильтрации в постоянном объеме с использованием мембраны Pellicon 3 30 кДа при площади мембраны ≈50 г/м^2, поперечном потоке 5,0 ± 0,25 л/мин/м^2, TMP 1,0 ± 0,2 бар и в общей сложности 12 диаобъемах обмена буфера на ФСБ с pH=7,4. Диафильтрованный объединенный продукт извлекали из UFDF и фильтровали через мембранный PES-фильтр с размером пор 0,22 мкм (Millipore SLGV033RS) в стерильные пробирки, производства Eppendorf. Концентрацию белка определяли с помощью УФ-анализа при A280-320 нм с использованием коэффициента экстинкции 1,5, она составила 4,9 мг/мл. Отбирали образец для тестирования, а остаток хранили при 4°C.

Анализ продукта показал следующие свойства:

Прозрачный, бесцветный, без частиц

4,9 мг/мл [белок] по данным спектроскопии при A280/330 нм

Средний DAR 1,9 (по данным хроматографии с обращенной фазой)

0,07 ЕЭ/мг эндотоксина

3% свободного соединения лекарственное средство-линкер

98,3% мономера по данным гель-проникающей хроматографии

Ремоделирование гликана (ADC, направленный против мезотелина, ConjA3)

Получение антитела

Буфер в приблизительно 60 мг антитела к мезотелину заменяют 25 мМ трис/Cl, 150 мМ NaCl, pH=8,0 с помощью колонки для обессоливания G25; 4×2,5 мл при 6 мг/мл, загруженных на 4× колонки для обессоливания PD10 (GE 17085101). Затем антитело с

замененным буфером концентрируют до по меньшей мере 25 мг/мл с использованием центробежного концентратора Vivaspin 20 (Sigma Z614637). Концентрацию белка подтверждают с помощью УФ-анализа при A280-320 нм с использованием коэффициента экстинкции 1,5.

Реакция ремоделирования

Ремоделирование гликана выполняют в однореакторной реакции в течение ночи (16 часов) при комнатной температуре. Следующую реакционную смесь получают, добавляя растворы/реагенты в порядке, подробно представленном ниже:

Раствор	**Объем (мкл)**	**Конечная концентрация**
25 мМ трис/Cl, 150 мМ NaCl, pH=8,0	663,8	Нет данных
Антитело к мезотелину в 25 мМ трис/Cl, 150 мМ NaCl, pH=8,0	2000	15 мг/мл
3,5 мг/мл EndoSH в 25 мМ трис/Cl, pH=8,0	165,7	1% масс./масс. относительно MAT
4,82 мг/мл His-TnGalNAcT в 25 мМ трис/Cl, pH=8,0	902,5	7,5% масс./масс. относительно MAT
1 М $MgCl_2$ в воде MQ	38,7	10 мМ
0,1 М 6-N_3GalNAc-UDP в воде MQ	96	25 экв. относительно MAT

Процедура очистки на белке A

Связывание с белком A и элюирование выполняют на колонке HiTrap MabSelect Sure объемом 5 мл (GE 11-0034-94). Все хроматографические этапы выполняют при скорости потока 240 см/ч с использованием системы AKTA Prime plus. Колонку подготавливают и используют следующим образом:

Раствор	**CV**	**Примечания**
0,1 М NaOH	3	Дезинфекция
25 мМ трис/Cl, 25 мМ NaCl, pH=8,0	10	Уравновешивание
Образец антитела к мезотелину	По мере необходимости	Загрузка

0,4 М фосфат калия, 0,2% тритон 100, pH=7,0	20	Этап промывки/удаления эндотоксинов
25 мМ трис/Cl, 25 мМ NaCl, pH=8,0	20	Этап промывки/удаления тритона
0,15 М уксусная кислота	По мере необходимости	Сбор пика от 0,1 до 0,1 опт. ед.

После аффинной очистки на белке А небольшой образец продукта может быть восстановлен с применением DTT и впоследствии подвергнут анализу методом МС. Типичный масс-спектр успешной реакции переноса показывает образование одного основного продукта (90% от общей тяжелой цепи), полученного в результате переноса модифицированной галактозы к антителу с замещенным центральным GlcNAc(Fuc), и минорного продукта (±10% от общей тяжелой цепи), полученного в результате переноса модифицированной галактозы к антителу с замещенным центральным GlcNAc (без фукозы).

Замена буфера после очистки на белке А

Далее, буфер в ремоделированном и очищенном GalNAc-N_3-антителе к мезотелину заменяют фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и концентрируют до приблизительно 16,6 мг/мл с использованием центробежного концентратора Vivaspin 20 (Sigma Z614637). Элюат с белка А разбавляют ФСБ в соотношении 1:1, затем повторно концентрируют до первоначального объема и это повторяют 6 раз. Наконец, объем уменьшают до целевого значения 16-17 мг/мл, и образец извлекают из устройства. Концентрацию белка подтверждают с помощью УФ-анализа при А280-320 нм с использованием коэффициента экстинкции 1,5.

Конъюгация **4** с модифицированным антителом для получения ConjA3

Условия реакции

2,7 мл ~15 мг/мл азидо-модифицированного антитела к мезотелину

0,3 мл 10 мМ **4** в диметилацетамиде

Реакционную смесь тщательно перемешивают и оставляют для протекания конъюгации в течение ночи (16 часов) при комнатной температуре. Конъюгационную смесь фильтруют через PVDF-фильтр с размером пор 0,2 мкм (Millipore SLGV033RS)

перед окончательной очисткой и изготовлением состава.

Очистка ConjA3

Профильтрованную конъюгационную смесь очищают с использованием центробежного концентратора Vivaspin 20 (Sigma Z614637). Конъюгационную смесь разбавляют 30 мМ гистидина HCl, 200 мМ сорбита, pH=6,0 в соотношении 1:1, а затем повторно концентрируют до первоначального объема. Это повторяют 12 раз перед извлечением очищенной массы ADC из центрифужного устройства.

Концентрацию белка определяют с помощью количественного анализа методом SEC с использованием калибровочной кривой антитела и конъюгата, разбавленного до приблизительно 5 мг/мл дополнительными 30 мМ гистидина HCl, 200 мМ сорбита, pH=6,0. Твин 20 добавляют до 0,02% масс./об. из 1% маточного раствора в 30 мМ гистидина HCl, 200 мМ сорбита, pH=6,0, и концентрацию повторно тестируют с помощью количественного анализа методом SEC. Отбирают образец для тестирования, а оставшуюся часть распределяют на аликвоты по 1 мл и замораживают при -80°C.

Цитотоксичность ConjA1 *in vitro*

Колбы с клетками Lu135 или клетками SK-N-FI обрабатывали трипсином, и высвобожденные клетки промывали и ресуспендировали в свежей среде. Плотность клеток определяли путем смешивания с трипановым синим (0,4% (масс./об.) Sigma TB154) в соотношении 1:1 и подсчета прозрачных/синих (живых/мертвых) клеток с помощью автоматического счетчика клеток Luna II (Logos Biosystems). Суспензию клеток разбавляли до требуемой плотности посева (20×104/мл), распределяли в белые 96-луночные микропланшеты с плоским дном (50 мкл/лунку) и инкубировали в течение ночи.

Маточный раствор (1 мл) ConjA1 (20 мкг/мл) получали путем разбавления ConjA1, стерилизованного путем фильтрации, в той же среде для культивирования клеток. Набор из 8×10-кратных разведений маточного раствора ConjA1 получали в стерильном 24-луночном планшете путем последовательного переноса 100 мкл в 900 мкл среды для культивирования клеток. Каждое разведение ConjA1 распределяли, 50 мкл/лунку, в лунки с 4 повторами 96-луночного планшета, содержащего суспензию клеток. В контрольные лунки вносили аналогичный объем только культуральной среды.

После периода воздействия ConjA1 жизнеспособность клеток измеряли с помощью Promega CellTiter-Glo, добавляя 100 мкл/лунку, перемешивая в течение 2 минут и считывая сигнал на Envision с использованием протокола люминесценции. Данные анализировали с использованием программного обеспечения Graphpad Prism.

Было установлено, что $ЭК_{50}$ ConjA1 против клеток Lu-135 составляет 0,01765 мкг/мл. $ЭК_{50}$ контроля ADC составляла 0,5326 мкг/мл (см. Фигуру 1A*).

Было установлено, что $ЭК_{50}$ ConjA1 против клеток SK-N-FI составляет 0,1565 мкг/мл. $ЭК_{50}$ контроля ADC составляла 5×10^5 мкг/мл (см. Фигуру 1B*).

*На обеих фигурах 1A * 1B ▼ представляет собой ConjA1 и ● представляет собой контроль ADC, идентичный в других отношениях, содержащий антитело B12, неспецифичное в отношении DLK1.

Исследования эффективности *in vivo* с применением ConjA1

Противоопухолевая активность в ксенотрансплантатной модели LI1097, происходящей от пациента с раком печени (PDX), in vivo

Затравочные опухоли LI1097 приживляли подкожно у мышей NOD/SCID и поддерживали подкожно у голых мышей BALB/c перед имплантацией. Когда объемы опухолей достигали 700-1500 $мм^3$, опухоли собирали и разрезали на кусочки диаметром примерно 2-3 $мм^3$. Опухоли или кусочки опухоли промывали ледяными средами RPMI1640 (без сыворотки) и затем помещали в ледяные среды для использования.

Перед имплантацией опухоли кожу самок голых мышей BALB/c в возрасте от пяти до шести недель дезинфицировали йодофором на правом боку. Каждой мыши инокулировали без анестезии, подкожно, в верхнюю часть правого бока один фрагмент первичной опухоли печени человека LI1097 для развития опухоли.

После инокуляции опухоли ежедневно проверяли заболеваемость и смертность животных. Размер опухоли измеряли штангенциркулем два раза в неделю в двух измерениях. Объем опухоли выражали в $мм^3$ с использованием формулы: TV = 0,5a×b2, где a и b представляют собой длинный и короткий диаметры опухоли, соответственно.

На 12 день исследования мышей рандомизировали на 5 групп по 8 мышей в каждой; средний объем опухоли составлял ~170 $мм^3$ в когорте. Мышам вводили дозы тестируемых агентов на 13 день исследования (1 день, указанный вертикальной пунктирной линией на графике). Тестируемые мыши в этом исследовании получали в 1 день однократную дозу назначенного им тестируемого изделия и уровня дозы, после чего рост опухоли контролировали до 51 дня.

Результаты показаны на Фигуре 2A, на которой:

○ = носитель, qd×1

◊ = контроль ADC с использованием антитела B12, неспецифичного в отношении DLK1, 1 мг/кг, qd×1

□ = ConjA1, 0,1 мг/кг, qd×1

Δ = ConjA1, 0,3 мг/кг, qd×1

▼ = ConjA1, 1,0 мг/кг, qd×1

Как следует из Фигуры 2A, ConjA1 при 1,0 мг/кг привел к наибольшему замедлению роста опухоли, за ним следовал ConjA1 при 0,3 мг/кг. Кроме того, при самой высокой протестированной дозе ConjA1 привел к 3/8 частичным ответам (PR) и 2/8 полным ответам (CR), тогда как ни одна из мышей, получавших носитель или ADC для контроля изотипа (1 мг/кг, однократная доза), не имела PR, CR или не выжила без опухоли (TFS).

Противоопухолевая активность в ксенотрансплантатной модели нейробластомы SK-N-FI in vivo

Самки мышей NOD-SCID были в возрасте шести недель в день имплантации. Клетки SK-N-FI собирали во время логарифмической фазы размножения и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере с 50% матригеля. По 100 мкл (3×10^6 клеток) смеси клеточной суспензии вводили подкожно с помощью шприца калибром 26 G в правый бок каждой мыши. Животных обследовали два раза в неделю для оценки массы тела и размера опухоли. Размер опухоли измеряли с использованием цифровых штангенциркулей и рассчитывали в соответствии со следующим выражением:

Объем опухоли ($мм^3$) = (малая ось)2×(большая ось)× $\pi/6$

Через восемнадцать дней после трансплантации раковых клеток 50 мышей, у которых объем опухоли составил от 99,0 $мм^3$ до 155,2 $мм^3$ (в среднем 116,2 $мм^3$), распределяли на 5 групп (N = 10 в каждой группе). В день дозирования испытываемым субъектам осуществляли введение путем внутривенной инъекции в хвостовую вену. Конечная точка исследования была установлена как достижение каждой опухолью конечной точки объема 1000 $мм^3$ или конец исследования (через 60 дней после введения дозы), в зависимости от того, что наступило раньше.

Результаты показаны на Фигуре 2B, на которой:

◊ = носитель, qd×1

○ = контроль ADC с использованием антитела B12, неспецифичного в отношении DLK1, 0,5 мг/кг, qd×1

□ = контроль ADC с использованием антитела B12, неспецифичного в отношении DLK1, 1 мг/кг, qd×1

Δ = ConjA1, 0,5 мг/кг, qd×1

▼ = ConjA1, 1,0 мг/кг, qd×1

Как следует из Фигуры 2B, ConjA1 при 1,0 мг/кг привел к наибольшему замедлению роста опухоли, за ним следовал ConjA1 при 0,5 мг/кг.

В ксенотрансплантатной модели SK-N-FI, происходящей из нейробластомы человека, однократная доза ConjA1 при 0,5 или 1 мг/кг показала дозозависимую

противоопухолевую активность по сравнению с мышами, обработанными носителем и ADC для контроля изотипа.

В самой высокой протестированной дозе ConjA1 привел к 1/9 животному с частичным ответом (PR) и 4/9 животным с полным ответом (CR), одно из которых выжило без опухоли (TFS) в конце исследования на 60 день (одно животное из 10 первоначальных животных в этой группе было исключено из окончательных фигур по причинам, не связанным с лечением).

Токсикологическое исследование у крыс

Токсикологическое исследование у крыс (оценка нецелевой токсичности, протестированный ADC не связывает Dlk-1 крысы)

Метод

ConjA1 оценивали в исследовании переносимости однократной внутривенной дозы у крыс. Самцам крыс Sprague-Dawley (n = 3/группу) вводили дозу 5 мг/кг в 1 день и проводили вскрытие на 21 день после введения дозы. Массу тела и потребление пищи часто контролировали с помощью отбора образцов в течение жизни для определения клинической патологии (кровь на 8 и 21 дни) и повторного отбора образцов для определения фармакокинетики. При вскрытии проводили макроскопические наблюдения, при этом выборочные органы взвешивали и сохраняли для возможного гистопатологического исследования.

Результаты

ConjA1 клинически хорошо переносился при 5 мг/кг без каких-либо выраженных нежелательных клинических признаков. Прибавка массы тела была снижена, при этом животные были примерно на 15% легче, чем контрольная группа в конце исследования. Количество лейкоцитов снизилось на 8 день (количество нейтрофилов снизилось на примерно 95% по сравнению с одновременным контролем), при этом имелись признаки восстановления к 22 дню.

Общий вывод

ConjA1 обладал хорошей стабильностью, хорошо переносился и показал благоприятный фармакокинетический профиль у крыс с периодом полужизни 9 дней при 5 мг/кг. Это свидетельствует о том, что МПД у крыс составляет по меньшей мере 5 мг/кг или выше.

Цитотоксичность в клетках A204 и Hep3B в 2D- и 3D-культурах клеток *in vitro*

Материалы и методы

Клетки высевали в онко-среды (RPMI, 5% ФБС, 2 мМ L-аланил-L-глутамин, 1 мМ пирувата натрия и 1% пенициллина/стрептомицина) в 384-луночные планшеты Elplasia, предварительно покрытые pHEMA.

Соединения ADC, ConjA1, и B12-1601 добавляли через 24 часа после посева клеток, с начальной концентрацией 10 мг/мл, 10-кратное последовательное разведение для 9 концентраций с четырьмя повторами. Периоды инкубации с соединениями ADC составили 5 дней в 2D- и 7 дней в 3D-культурах, при этом среды заменяли каждые 3 дня в общей сложности в течение 14 дней.

В конце периода инкубации клетки лизировали и анализировали для определения жизнеспособности клеток. Конечную точку пролиферации клеток анализировали как процент от контроля (POC), используя следующую формулу:

POC=относительное количество клеток (лунки с соединением)/относительное количество клеток (контрольные лунки с носителем)×100%

Данные анализировали с использованием программного обеспечения Graphpad Prism.

Результаты

На Фигуре 3 представлены данные о цитотоксичности в клетках A204 и Hep3B в 3D-культуре клеток *in vitro*:

- На Фигуре 3A показаны данные для клеток A204 [$ИК_{50}$ 3D ADC = 0,001460 мкг/мл, $ИК_{50}$ 3D B12–PL1601 = 0,7662 мкг/мл, $ИК_{50}$ 2D ADC = 0,006399 мкг/мл, $ИК_{50}$ 3D B12–PL1601 = 0,4059 мкг/м];

- На Фигуре 3B показаны данные для клеток Hep3B [$ИК_{50}$ 3D ADC = 0,2271 мкг/мл, $ИК_{50}$ 3D B12–PL1601 = ~432,6 мкг/мл, $ИК_{50}$ 2D ADC = ~59,29 мкг/мл, $ИК_{50}$ 2D B12–PL1601 = ~3,957 мкг/мл].

Цитотоксичность ConjA2 *in vitro*

Колбы с клетками SN12C или клетками MDA-MB-231FI обрабатывали трипсином, и высвобожденные клетки промывали и ресуспендировали в свежей среде. Плотность клеток определяли путем смешивания с трипановым синим (0,4% (масс./об.) Sigma TB154) в соотношении 1:1 и подсчета прозрачных/синих (живых/мертвых) клеток с помощью автоматического счетчика клеток Luna II (Logos Biosystems). Суспензию клеток разбавляли до требуемой плотности посева (20×10^4/мл), распределяли в белые 96-луночные микропланшеты с плоским дном (50 мкл/лунку) и инкубировали в течение ночи.

Маточный раствор (1 мл) ConjA2 (20 мкг/мл) получали путем разведения ConjA2, стерилизованного путем фильтрации, в той же среде для культивирования клеток. Набор

из 8×10-кратных разведений маточного раствора ConjA2 получали в стерильном 24-луночном планшете путем последовательного переноса 100 мкл в 900 мкл среды для культивирования клеток. Каждое разведение ConjA2 распределяли, 50 мкл/лунку, в лунки с 4 повторами 96-луночного планшета, содержащего суспензию клеток. В контрольные лунки вносили аналогичный объем только культуральной среды.

После периода воздействия ConjA2 жизнеспособность клеток измеряли с помощью Promega CellTiter-Glo, добавляя 100 мкл/лунку, перемешивая в течение 2 минут и считывая сигнал на Envision с использованием протокола люминесценции. Данные анализировали с использованием программного обеспечения Graphpad Prism.

Было установлено, что $ЭК_{50}$ ConjA2 против клеток SN12C составляет 0,0663 мкг/мл. $ЭК_{50}$ контроля ADC не поддавалась обнаружению (см. Фигуру 4A*).

Было установлено, что $ЭК_{50}$ ConjA2 против клеток MDA-MB-231 составляет 0,226 мкг/мл. $ЭК_{50}$ контроля ADC не поддавалась обнаружению (см. Фигуру 4B*).

**На обеих фигурах 4A и 4B ♦ представляет собой ConjA2 и ● представляет собой контроль ADC, идентичный в других отношениях, содержащий антитело B12, неспецифичное в отношении KAAG1.*

Исследование эффективности ConjA2 *in vivo*

Самки голых бестимусных мышей (Crl:NU(Ncr)-Foxn1nu, Charles River) были в возрасте восьми недель с диапазоном массы тела (BW) от 20,7 до 31,2 г в 1 день исследования.

В день имплантации опухолевые клетки MDA-MB-231, используемые для имплантации, собирали в логарифмической фазе размножения и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) при 5×10^7 клеток/мл. Каждой мыши вводили путем подкожной (п/к) инъекции в правый бок 5×10^6 клеток (0,1 мл клеточной суспензии), и опухоли контролировали, когда их объемы приближались к целевому диапазону от 100 до 150 $мм^3$. Опухоли измеряли с помощью штангенциркулей в двух измерениях, и объем рассчитывали с использованием формулы:

Объем опухоли ($мм^3$) = $w^2\times l/2$

где w = ширина и l = длина в мм опухоли. Массу опухоли можно оценить с допущением, что 1 мг эквивалентен 1 $мм^3$ объема опухоли.

Через шестнадцать дней после имплантации опухоли, обозначено как 1 день исследования, животных сортировали по группам, каждая из которых состояла из 8 мышей с индивидуальными объемами опухолей от 108 до 144 $мм^3$ и групповыми средними объемами опухолей 112,5-123,8 $мм^3$. В 1 день исследования все средства лечения вводили внутривенно (в/в) в виде однократной инъекции (qd×1) путем инъекции в

хвостовую вену в объеме дозирования 0,2 мл на 20 г массы тела (10 мл/кг), пересчитанном в соответствии с массой тела каждого отдельного животного. Опухоли измеряли с помощью штангенциркулей два раза в неделю, и каждое животное подвергали эвтаназии, когда объем опухоли у него достигал конечной точки 1500 мм^3 или в конце исследования, в зависимости от того, что наступило раньше. Исследование закончилось на 59 день.

Результаты показаны на Фигуре 5, на которой:

○ = носитель, qd×1 (верхняя линия)

□ = контроль ADC с использованием антитела B12, неспецифичного в отношении KAAG1, 0,6 мг/кг, qd×1

○ = ConjA2, 0,6 мг/кг, qd×1 (нижняя линия)

Как следует из Фигуры 5, ConjA2 при 0,6 мг/кг привел к значительному замедлению роста опухоли.

Противоопухолевая активность ConjA2 в ксенотрансплантатной модели SN12C *in vivo*

Самки мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (Fox Chase SCID®, CB17/Icr-Prkdcscid/IcrIcoCrl, Charles River) были в возрасте девяти недель с диапазоном массы тела (BW) от 15,4 до 22,2 г в 1 день исследования.

В день имплантации опухоли каждая тестируемая мышь получала 5×106 клеток SN12C (0,1 мл суспензии клеток в 50% матриксе Матригель® (Corning®) в фосфатно-солевом буфере), имплантированных подкожно в правый бок. Рост опухоли контролировали, когда средний размер приближался к целевому диапазону от 100 до 150 мм^3.

Опухоли измеряли с помощью штангенциркулей в двух измерениях, и объем рассчитывали с использованием формулы:

Объем опухоли (мм^3) = $w^2 \times l/2$

где w = ширина и l = длина в мм опухоли. Массу опухоли можно оценить с допущением, что 1 мг эквивалентен 1 мм^3 объема опухоли.

Через двадцать три дня после имплантации опухоли, обозначено как 1 день исследования, животных сортировали по девяти группам (n=8) с индивидуальными объемами опухолей от 108 до 172 мм^3 и групповыми средними объемами опухолей 129 мм^3.

В 1 день исследования все средства лечения вводили внутривенно (в/в) в виде однократной инъекции (qd×1) путем инъекции в хвостовую вену в объеме дозирования 0,2 мл на 20 г массы тела (10 мл/кг), пересчитанном в соответствии с массой тела каждого отдельного животного. Опухоли измеряли с помощью штангенциркулей два раза в

неделю, и каждое животное подвергали эвтаназии, когда объем опухоли у него достигал конечной точки 1000 мм^3 или в конце исследования, в зависимости от того, что наступило раньше. Исследование закончилось на 60 день.

Данные показаны на Фигуре 6, на которой можно видеть, что введение ADC (ConjA2) уменьшало рост опухоли дозозависимым образом.

Цитотоксичность *in vitro*

Колбы с клетками OVCAR3, CAPAN-2 или HPAC обрабатывают трипсином, и высвобожденные клетки промывают и ресуспендируют в свежей среде. Плотность клеток определяют путем смешивания с трипановым синим (0,4% (масс./об.) Sigma TB154) в соотношении 1:1 и подсчета прозрачных/синих (живых/мертвых) клеток с помощью автоматического счетчика клеток Luna II (Logos Biosystems). Суспензию клеток разбавляют до требуемой плотности посева (20×104/мл), распределяют в белые 96-луночные микропланшеты с плоским дном (50 мкл/лунку) и инкубируют в течение ночи.

Маточный раствор (1 мл) ConjA3 (20 мкг/мл) получают путем разведения ConjA3, стерилизованного путем фильтрации, в той же среде для культивирования клеток. Набор из 8×10-кратных разведений маточного раствора ConjA3 получают в стерильном 24-луночном планшете путем последовательного переноса 100 мкл в 900 мкл среды для культивирования клеток. Каждое разведение ConjA3 распределяют, 50 мкл/лунку, в лунки с 4 повторами 96-луночного планшета, содержащего суспензию клеток. В контрольные лунки вносят аналогичный объем только культуральной среды.

После периода воздействия ConjA3 жизнеспособность клеток измеряют с помощью Promega CellTiter-Glo, добавляя 100 мкл/лунку, перемешивая в течение 2 минут и считывая сигнал на Envision с использованием протокола люминесценции. Данные анализируют с использованием программного обеспечения Graphpad Prism.

Исследование эффективности ConjA3 *in vivo*

Противоопухолевая активность в модели OVCAR3 in vivo

Затравочные опухоли приживляют подкожно у мышей NOD/SCID и поддерживают подкожно у голых мышей BALB/c перед имплантацией. Когда объемы опухолей достигли 700-1500 мм^3, опухоли собирают и разрезают на кусочки диаметром примерно 2-3 мм^3. Опухоли или кусочки опухоли промывают ледяными средами RPMI1640 (без сыворотки) и затем помещают в ледяные среды для использования.

Перед имплантацией опухоли кожу самок голых мышей BALB/c в возрасте от пяти до шести недель дезинфицируют йодофором на правом боку. Каждой мыши инокулируют без анестезии, подкожно, в верхнюю часть правого бока один фрагмент опухоли для развития опухоли.

После инокуляции опухоли ежедневно проверяют заболеваемость и смертность животных. Размер опухоли измеряют штангенциркулем два раза в неделю в двух измерениях. Объем опухоли выражают в мм^3 с использованием формулы: TV = 0,5a×b2, где a и b представляют собой длинный и короткий диаметры опухоли, соответственно.

На 12 день исследования мышей рандомизируют на 5 групп по 8 мышей в каждой; средний объем опухоли составляет ~170 мм^3 в когорте. Мышам вводят дозы тестируемых агентов на 13 день исследования. Тестируемые мыши в этом исследовании получают в 1 день однократную дозу назначенного им тестируемого изделия и уровня дозы, после чего рост опухоли контролируют до 51 дня.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID NO. 1 [VH HuBa-1-3d, CDR подчеркнут]

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSGYTFTDYAMHWVRQAPGQGLEWIGVISTYYGN
TNYNQKFKGKATMTVDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGLREYYYAMDYWGQ
GTMVTVSS

SEQ ID NO. 2 [VL HuBa-1-3d, CDR подчеркнут]

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLVYFAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSTPPTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO. 3 [тяжелая цепь HuBa-1-3d]

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSGYTFTDYAMHWVRQAPGQGLEWIGVISTYYGN
TNYNQKFKGKATMTVDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGLREYYYAMDYWGQ
GTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYN*STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

N* обозначает Asn297

SEQ ID NO. 4 [легкая цепь HuBa-1-3d]

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLVYFAST
RESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSTPPTFGQGTKLEIKRTVAAP
SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO. 5 [CDR1 VH HuBa-1-3d]

DYAMH

SEQ ID NO. 6 [CDR2 VH HuBa-1-3d]

VISTYYGNTNYNQKFKG

SEQ ID NO. 7 [CDR3 VH HuBa-1-3d]

GGLREYYYAMDY

SEQ ID NO. 8 [CDR1 VL HuBa-1-3d]

KSSQSLLNSSNQKNYLA

SEQ ID NO. 9 [CDR2 VL HuBa-1-3d]

FASTRES

SEQ ID NO. 10 [CDR3 VL HuBa-1-3d]

QQHYSTPPT

SEQ ID NO. 11 [тяжелая цепь HuBa-1-3d, концевой K]

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKGSGYTFTDYAMHWVRQAPGQGLEWIGVISTYYGN
TNYNQKFKGKATMTVDKSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGLREYYYAMDYWGQ
GTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYN*STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

N* обозначает Asn297

SEQ ID NO. 12 [DLK1 человека, вариант 1]

MTATEALLRVLLLLLAFGHSTYGAECFPACNPQNGFCEDDNVCRCHVGWQGPLCDQC
VTSPGCLHGLCGEPGQCICTDGWDGELCDRDVRACSSAPCANNGTCVSLDGGLYECSC
APGYSGKDCQKKDGPCVINGSPCQHGGTCVDDEGRASHASCLCPPGFSGNFCEIVANSC
TPNPCENDGVCTDIGGDFRCRCPAGFIDKTCSRPVTNCASSPCQNGGTCLQHTQVSYECL
CKPEFTGLTCVKKRALSPQQVTRLPSGYGLAYRLTPGVHELPVQQPEHRILKVSMKELN
KKTPLLTEGQAICFTILGVLTSLVVLGTVGIVFLNKCETWVSNLRYNHMLRKKKNLLLQ
YNSGEDLAVNIIFPEKIDMTTFSKEAGDEEI

SEQ ID NO. 13 [DLK1 человека, вариант 2]

MTATEALLRVLLLLLAFGHSTYGAECFPACNPQNGFCEDDNVCRCQPGWQGPLCDQCV
TSPGCLHGLCGEPGQCICTDGWDGELCDRDVRACSSAPCANNRTCVSLDDGLYECSCA
PGYSGKDCQKKDGPCVINGSPCQHGGTCVDDEGRASHASCLCPPGFSGNFCEIVANSCT
PNPCENDGVCTDIGGDFRCRCPAGFIDKTCSRPVTNCASSPCQNGGTCLQHTQVSYECL
CKPEFTGLTCVKKRALSPQQVTRLPSGYGLAYRLTPGVHELPVQQPEHRILKVSMKELN
KKTPLLTEGQAICFTILGVLTSLVVLGTVGIVFLNKCETWVSNLRYNHMLRKKKNLLLQ
YNSGEDLAVNIIFPEKIDMTTFSKEAGDEEI

SEQ ID NO. 101 [VH 3A4, CDR подчеркнут]

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGD
TNYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLVTV
SS

SEQ ID NO. 102 [VL 3A4, CDR подчеркнут]

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO. 103 [тяжелая цепь 3A4]

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGD
TNYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYN*STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

N* обозначает Asn297

SEQ ID NO. 104 [легкая цепь 3A4]

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFS
GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSL
SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO. 105 [CDR1 VH3A4]

GYTFTDDYMS

SEQ ID NO. 106 [CDR2 VH3A4]

DINPYNGDTN

SEQ ID NO. 107 [CDR3 VH3A4]

DPGAMDY

SEQ ID NO. 108 [CDR1 VL3A4]

RSSQSLLHSNGNTYLE

SEQ ID NO. 109 [CDR2 VL3A4]

TVSNRFS

SEQ ID NO. 110 [CDR3 VL3A4]

FQGSHVPLT

SEQ ID NO. 111 [тяжелая цепь 3A4, концевой K]

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGD
TNYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTLVTV
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYN*STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

N* обозначает Asn297

SEQ ID NO. 112 [KAAG1 человека]

MDDDAAPRVEGVPVAVHKHALHDGLRQVAGPGAAAAHLPRWPPPQLAASRREAPPLS
QRPHRTQGAGSPPETNEKLTNPQVKEK

SEQ ID NO. 113 [VL 3A4-L2, CDR подчеркнут]

DVVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRF
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO. 114 [легкая цепь 3A4-L2]

DVVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRF
SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO. 115 [VL 3A4-K4, CDR подчеркнут]

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSLLHSNGNTYLEWYQQKPGQPPKLLIYTVSNRF
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCFQGSHVPLTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO. 116 [легкая цепь 3A4-K4]

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSLLHSNGNTYLEWYQQKPGQPPKLLIYTVSNRF
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCFQGSHVPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO. 201 [VH XA4, CDR подчеркнут]

QVHLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGITFRIYGMHWVRQAPGKGLEWVAVLWYDGSH
EYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARDGDYYDSGSPLDYWGQG
TLVTVSS

SEQ ID NO. 202 [VL XA4, CDR подчеркнут]

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO. 203 [тяжелая цепь XA4]

QVHLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGITFRIYGMHWVRQAPGKGLEWVAVLWYDGSH
EYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARDGDYYDSGSPLDYWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYN*STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ

VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

N* обозначает Asn297

SEQ ID NO. 204 [легкая цепь XA4]

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPA
RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO. 205 [CDR1 VH XA4]

IYGMH

SEQ ID NO. 206 [CDR2 VH XA4]

VLWYDGSHEYYADSVKG

SEQ ID NO. 207 [CDR3 VH XA4]

DGDYYDSGSPLDY

SEQ ID NO. 208 [CDR1 VL XA4]

RASQSVSSYLA

SEQ ID NO. 209 [CDR2 VL XA4]

DASNRAT

SEQ ID NO. 210 [CDR3 VL XA4]

QQRSNWPLT

SEQ ID NO. 211 [тяжелая цепь XA4, концевой K]

QVHLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGITFRIYGMHWVRQAPGKGLEWVAVLWYDGSH
EYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARDGDYYDSGSPLDYWGQG
TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF
PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYN*STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

N* обозначает Asn297

SEQ ID NO. 212 [VH XFT, CDR подчеркнут]

QVELVQSGAVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQAPGKGLEWMGIIDPGDSRTRY
SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGQLYGGTYMDGWGQGTLVT
VSS

SEQ ID NO. 213 [VL XFT, CDR подчеркнут]

DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGGYNSVSWYQQHPGKAPKLMIYGVNNRPSGV
SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYDIESATPVFGGGTKLEIK

SEQ ID NO. 214 [тяжелая цепь XFT]

QVELVQSGAVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQAPGKGLEWMGIIDPGDSRTRY
SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGQLYGGTYMDGWGQGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYN*STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

N* обозначает Asn297

SEQ ID NO. 215 [легкая цепь XFT]

DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGGYNSVSWYQQHPGKAPKLMIYGVNNRPSGV
SNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYDIESATPVFGGGTKLEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO. 216 [XFT CDR1 VH]

GYSFTSYWIG

SEQ ID NO. 217 [CDR2 VH XFT]

WMGIIDPGDSRTRYSPSFQG

SEQ ID NO. 218 [CDR3 VH XFT]

GQLYGGTYMDG

SEQ ID NO. 219 [CDR1 VL XFT]

TGTSSDIGGYNSVS

SEQ ID NO. 220 [CDR2 VL XFT]

LMIYGVNNRPS

SEQ ID NO. 221 [CDR3 VL XFT]

SSYDIESATP

SEQ ID NO. 222 [тяжелая цепь XFT, концевой K]

QVELVQSGAVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQAPGKGLEWMGIIDPGDSRTRY
SPSFQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGQLYGGTYMDGWGQGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE

EQYN*STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

N* обозначает Asn297

SEQ ID NO. 223 [VH X09, CDR подчеркнут]

QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGASS
YNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGSGTPVT
VSS

SEQ ID NO. 224 [VL X09, CDR подчеркнут]

DIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPG
RFSGSGSGNSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSKHPLTFGSGTKVEIK

SEQ ID NO. 225 [тяжелая цепь X09]

QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGASS
YNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGSGTPVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYN*STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

N* обозначает Asn297

SEQ ID NO. 226 [легкая цепь X09]

DIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPG
RFSGSGSGNSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSKHPLTFGSGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO. 227 CDR1 VH[X09]

GYSFT

SEQ ID NO. 228 [CDR2 VH X09]

LITPYNGASSYNQKFRG

SEQ ID NO. 229 [CDR3 VH X09]

GGYDGRGFDY

SEQ ID NO. 230 [CDR1 VL X09]

SASSSVSYMH

SEQ ID NO. 231 [CDR2 VL X09]

DTSKLAS

SEQ ID NO. 232 [CDR3 VL X09]

QQWSKHPLT

SEQ ID NO. 233 [тяжелая цепь X09, концевой K]

QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGASS
YNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGSGTPVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYN*STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

N* обозначает Asn297

SEQ ID NO. 234 [VH X09.2, CDR подчеркнут]

QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGASS
YNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGQGTTVT
VSS

SEQ ID NO. 235 [VL X09.2, CDR подчеркнут]

DIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPG
RFSGSGSGNSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSGYPLTFGAGTKLEIK

SEQ ID NO. 236 [тяжелая цепь X09.2]

QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGASS
YNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGSGTPVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYN*STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

N* обозначает Asn297

SEQ ID NO. 237 [легкая цепь X09.2]

DIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPG
RFSGSGSGNSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSKHPLTFGSGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO. 238 [CDR1 VH X09.2]

GYTMN

SEQ ID NO. 239 [CDR2 VH X09.2]

LITPYNGASSYNQKFRG

SEQ ID NO. 240 [CDR3 VH X09.2]

GGYDGRGFDY

SEQ ID NO. 241 [CDR1 VL X09.2]

SASSSVSYMH

SEQ ID NO. 242 [CDR2 VL X09.2]

DTSKLAS

SEQ ID NO. 243 [CDR3 VL X09.2]

QQWSGYPLT

SEQ ID NO. 244 [тяжелая цепь X09.2, концевой K]

QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGASS
YNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGSGTPVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYN*STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

N* обозначает Asn297

SEQ ID NO. 245 [мезотелин человека, вариант 1]

MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGWVQPSRTLAGETGQEAAPLDGVLANPPNISS
LSPRQLLGFPCAEVSGLSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPL
DLLLFLNPDAFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLLPAALACWGVRGSLLSEA
DVRALGGLACDLPGRFVAESAEVLLPRLVSCPGPLDQDQQEAARAALQGGGPPYGPPST
WSVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIVAAWRQRSSRDPSWRQPERTILRPRFRREVEKT
ACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDEL
YPQGYPESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLETLKALLEVNKGHEMSPQAPRRPLPQ
VATLIDRFVKGRGQLDKDTLDTLTAFYPGYLCSLSPEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDP
RQLDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRT
DAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDTLGLGLQGGIPNGY
LVLDLSMQEALSGTPCLLGPGPVLTVLALLLASTLA

SEQ ID NO. 246 [мезотелин человека, вариант 2]

MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGWVQPSRTLAGETGQEAAPLDGVLANPPNISS
LSPRQLLGFPCAEVSGLSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPL
DLLLFLNPDAFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLLPAALACWGVRGSLLSEA
DVRALGGLACDLPGRFVAESAEVLLPRLVSCPGPLDQDQQEAARAALQGGGPPYGPPST
WSVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIVAAWRQRSSRDPSWRQPERTILRPRFRREVEKT
ACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDEL
YPQGYPESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLETLKALLEVNKGHEMSPQVATLIDRF
VKGRGQLDKDTLDTLTAFYPGYLCSLSPEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYP
KARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTV
AEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSMQ
EALSGTPCLLGPGPVLTVLALLLASTLA

Формула изобретения

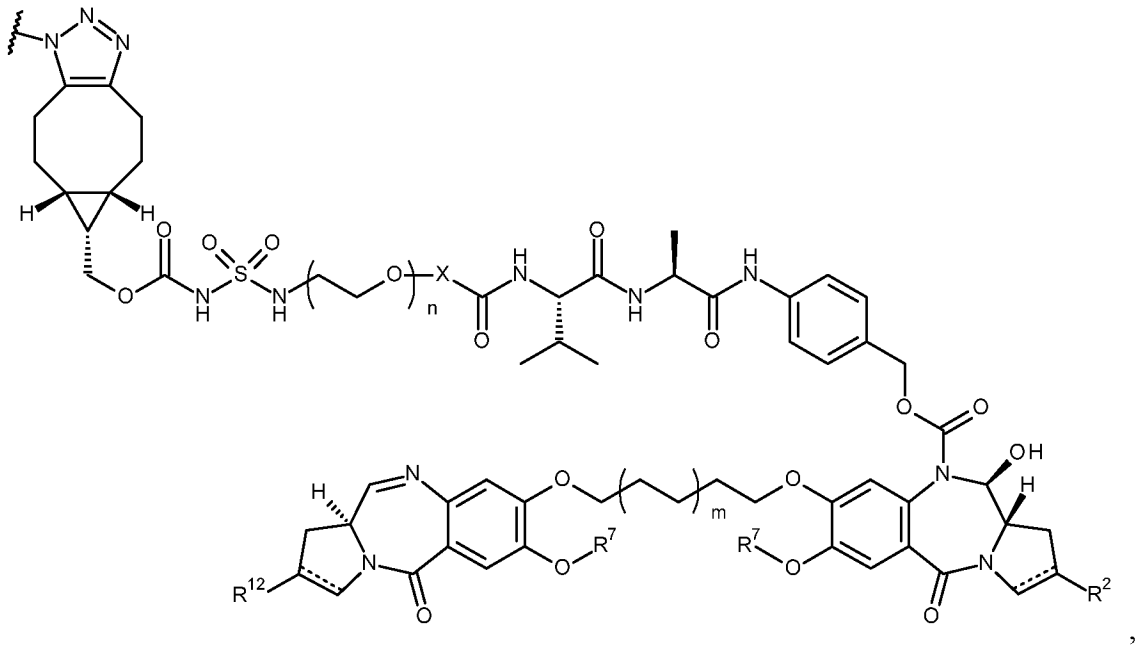
1. Конъюгат формулы (I):

$$Ab\text{-}(DL)_p \quad (I)$$

в которой:

Ab представляет собой антитело, которое связывается с KAAG1 или мезотелином;

DL представляет собой



,

где:

X выбран из группы, включающей: одинарную связь, $-CH_2-$ и $-C_2H_4-$;

n составляет от 1 до 8;

m равно 0 или 1;

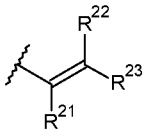
R^7 представляет собой метил или фенил;

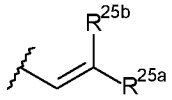
если между C2 и C3 присутствует двойная связь, R^2 выбран из группы, состоящей из:

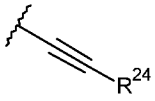
(ia) C_{5-10} арильной группы, незамещённой или замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, включающей: галоген, нитро, циано, C_{1-7} алкокси, карбокси, C_{1-7} алкил, C_{3-7} гетероциклил, бис-окси-C_{1-3} алкилен и -C(=O)OR, при этом R представляет собой C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклильную группу или C_{5-20} арильную группу;

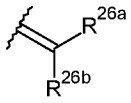
(ib) C_{1-5} насыщенного алифатического алкила;

(ic) C_{3-6} насыщенного циклоалкила;

(id)  , где каждый из R^{21}, R^{22} и R^{23} независимо выбран из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, причем указанное общее число атомов углерода в группе R^2 составляет не более 5;

(ie)  , где один из R^{25a} и R^{25b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем фенил не замещен или замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; и

(if)  , где R^{24} выбран из: H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, причем фенил не замещен или замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила;

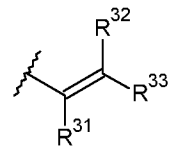
если между C2 и C3 присутствует одинарная связь, R^2 представляет собой  , где R^{26a} и R^{26b} независимо выбраны из H, F, C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, причем алкильная и алкенильная группы не замещены или замещены группой, выбранной из C_{1-4} алкиламидо и C_{1-4} алкилового сложного эфира; или, если один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, другой выбран из нитрила и C_{1-4} алкилового сложного эфира;

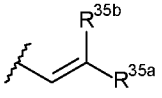
если между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, R^{12} выбран из группы, состоящей из:

(iia) C_{5-10} арильной группы, незамещённой или замещенной одним или более заместителями, выбранными из группы, включающей: галоген, нитро, циано, C_{1-7} алкокси, карбокси, C_{1-7} алкил, C_{3-7} гетероциклил, бис-окси-C_{1-3} алкилен и -C(=O)OR, при этом R представляет собой C_{1-7} алкильную группу, C_{3-20} гетероциклильную группу или C_{5-20} арильную группу;

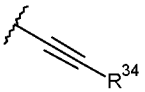
(iib) C_{1-5} насыщенного алифатического алкила;

(iic) C_{3-6} насыщенного циклоалкила;

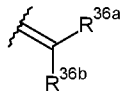
(iid)  , где каждый из R^{31}, R^{32} и R^{33} независимо выбран из H, C_{1-3} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, C_{2-3} алкинила и циклопропила, причем общее число атомов углерода в группе R^{12} составляет не более 5;

(iie) 

, где один из R^{35a} и R^{35b} представляет собой H, а другой выбран из: фенила, причем фенил не замещен или замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила; и

(iif) 

, где R^{34} выбран из: H; C_{1-3} насыщенного алкила; C_{2-3} алкенила; C_{2-3} алкинила; циклопропила; фенила, причем фенил не замещён или замещен группой, выбранной из галогена, метила, метокси; пиридила; и тиофенила;

если между C2′ и C3′ присутствует одинарная связь, R^{12} представляет собой 

, где R^{36a} и R^{36b} независимо выбраны из H, F, C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, причем алкильная и алкенильная группы не замещены или замещены группой, выбранной из C_{1-4} алкиламидо и C_{1-4} алкилового сложного эфира; или, если один из R^{36a} и R^{36b} представляет собой H, другой выбран из нитрила и C_{1-4} алкилового сложного эфира;

и p составляет от 1 до 8,

при этом C_{3-20} гетероциклильная группа содержит от 3 до 20 кольцевых атомов, из которых от 1 до 10 являются кольцевыми гетероатомами, выбранными из N, O, S; а C_{3-7} гетероциклильная группа содержит от 3 до 7 кольцевых атомов, из которых от 1 до 4 представляют собой кольцевые гетероатомы, выбранные из N, O, S.

2. Конъюгат по п. 1, характеризующийся тем, что X представляет собой $-CH_2-$.

3. Конъюгат по п. 1 или 2, характеризующийся тем, что n составляет 1-4.

4. Конъюгат по п. 3, характеризующийся тем, что n равно 2.

5. Конъюгат по любому из пп. 1-4, характеризующееся тем, что между C2 и C3 присутствует двойная связь, а R^2 представляет собой C_{1-5} насыщенную алифатическую алкильную группу.

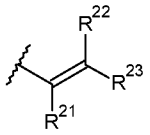
6. Конъюгат по п. 5, характеризующееся тем, что R^2 представляет собой метил, этил или пропил.

7. Конъюгат по любому из пп. 1-4, характеризующееся тем, что между C2 и C3 присутствует двойная связь, и R^2 представляет собой:

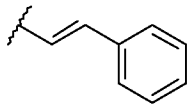
(a) фенил, который несет от одной до трех групп-заместителей; при этом указанные заместители выбраны из метокси, этокси, фтора, хлора, циано, бис-оксиметилена, метилпиперазинила, морфолино и метилтиофенила, или

(b) циклопропил; или

(c) группу формулы:

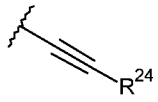


при этом общее число атомов углерода в группе R^2 составляет не более 3; или (e) группу:

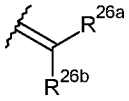


, или

(f) группу формулы:



, при этом R^{24} выбран из H и метила.

8. Конъюгат по любому из пп. 1-4, характеризующийся тем, что между C2 и C3 присутствует одинарная связь, R^2 представляет собой  , и

(a) R^{26a} и R^{26b} оба представляют собой H; или

(b) R^{26a} и R^{26b} оба представляют собой метил; или

(c) один из R^{26a} и R^{26b} представляет собой H, а другой выбран из C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, причем алкильная и алкенильная группы не замещены или замещены.

9. Конъюгат по любому из пп. 1-8, характеризующийся тем, что между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, и R^{12} представляет собой C_{1-5} насыщенную алифатическую алкильную группу.

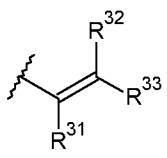
10. Конъюгат по п. 9, характеризующееся тем, что R^{12} представляет собой метил, этил или пропил.

11. Конъюгат по любому из пп. 1-8, характеризующийся тем, что между C2′ и C3′ присутствует двойная связь, и R^{12} представляет собой:

(a) фенил, который содержит от одной до трех групп-заместителей, где указанные заместители выбраны из метокси, этокси, фтора, хлора, циано, бис-оксиметилена, метилпиперазинила, морфолино и метилтиофенила; или

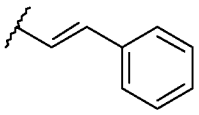
(b) циклопропил; или

(c) группу формулы:



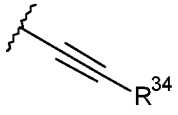
, при этом общее число атомов углерода в группе R^{12} составляет не более 3; или

(d) группу:

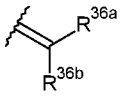


, или

(e) группу формулы:



, при этом R^{34} выбран из H и метила.

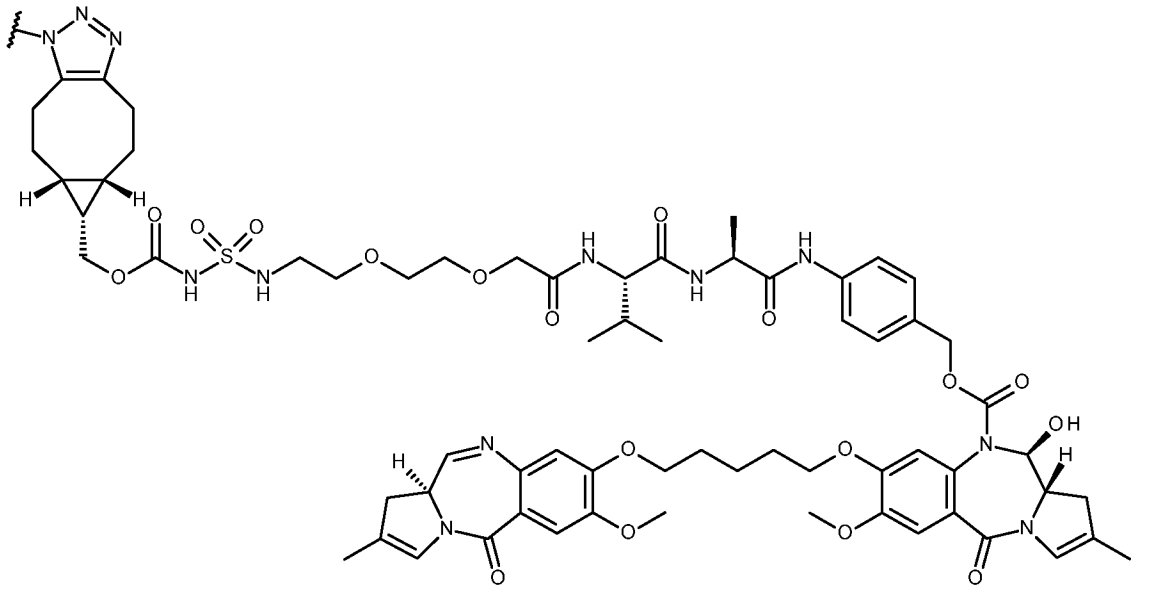
12. Конъюгат по любому из пп. 1-8, характеризующийся тем, что между C2′ и C3′ присутствует одинарная связь, R^{12} представляет собой  и:

(a) R^{36a} и R^{36b} оба представляют собой H, или

(b) R^{36a} и R^{36b} оба представляют собой метил; или

(c) один из R^{36a} и R^{36b} представляет собой H, а другой выбран из C_{1-4} насыщенного алкила, C_{2-3} алкенила, причем алкильная и алкенильная группы не замещены или замещены.

13. Конъюгат по п. 1, характеризующийся тем, что DL представляет собой:



14. Конъюгат по любому из пп. 1-13, характеризующийся тем, что, если указанное антитело связывается с KAAG1, указанное антитело содержит:

(a) домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 107;

(b) домен VH, содержащий CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 106 и/или CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 105;

(c) домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 107, CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 106 и CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 105;

(d) домен VH, содержащий последовательность SEQ ID NO. 101;

(e) домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 110;

(f) домен VL, содержащий CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 109 и/или CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 108;

(g) домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 110, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 109 и CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 108;

(3) домен VL, содержащий последовательность SEQ ID NO. 102;

(i) домен VL, содержащий последовательность SEQ ID NO. 113;

(j) домен VL, содержащий последовательность SEQ ID NO. 115;

(k) тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 103, или тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 111;

(l) легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 104;

(m) легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 114; и/или

(n) легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 116.

15. Конъюгат по любому из пп. 1-13, характеризующийся тем, что, если указанное антитело связывается с мезотелином, указанное антитело содержит:

(a) домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 207;

(b) домен VH, содержащий CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 206 и/или CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 205;

(c) домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 207, CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 206 и CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 205;

(d) домен VH, содержащий последовательность SEQ ID NO. 201;

(e) домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 210;

(f) домен VL, содержащий CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 209 и/или CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 208;

(g) домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 210, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 209 и CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 208;

(h) домен VL, содержащий последовательность SEQ ID NO. 202;

(i) тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 203, или тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 211;

(j) легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 204;

(k) домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 218;

(l) домен VH, содержащий CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 217 и/или CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 216;

(m) домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 218, CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 217 и CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 216;

(n) домен VH, содержащий последовательность SEQ ID NO. 212;

(o) домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 221;

(p) домен VL, содержащий CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 220 и/или CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 219;

(q) домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 221, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 220 и CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 219;

(r) домен VL, содержащий последовательность SEQ ID NO. 213;

(s) тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 214, или тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 222;

(t) легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 215;

(u) домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 229;

(v) домен VH, содержащий CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 228 и/или CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 227;

(w) домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 228, CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 227 и CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 226;

(x) домен VH, содержащий последовательность SEQ ID NO. 223;

(y) домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 232;

(z) домен VL, содержащий CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 231 и/или CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 230;

(aa) домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 232, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 231 и CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 230;

(ab) домен VL, содержащий последовательность SEQ ID NO. 224;

(ac) тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 225, или тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 233;

(ad) легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 226;

(ae) домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 240;

(af) домен VH, содержащий CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 239 и/или CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 238;

(ag) домен VH, содержащий CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 240, CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 239 и CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 238;

(ah) домен VH, содержащий последовательность SEQ ID NO. 234;

(ai) домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 243;

(aj) домен VL, содержащий CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 242 и/или CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 241;

(ak) домен VL, содержащий CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 243, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 242 и CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO. 241;

(al) домен VL, содержащий последовательность SEQ ID NO. 235;

(am) тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 236, или тяжелую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 244; и/или

(an) легкую цепь, содержащую последовательность SEQ ID NO. 237.

16. Композиция для лечения пролиферативного заболевания у субъекта, содержащая смесь конъюгатов по любому из пп. 1-15, причем указанная средняя нагрузка лекарственным средством на антитело в указанной смеси конъюгатов составляет от 1 до 4.

17. Применение конъюгата по любому из пп. 1-16 для лечения пролиферативного заболевания у субъекта.

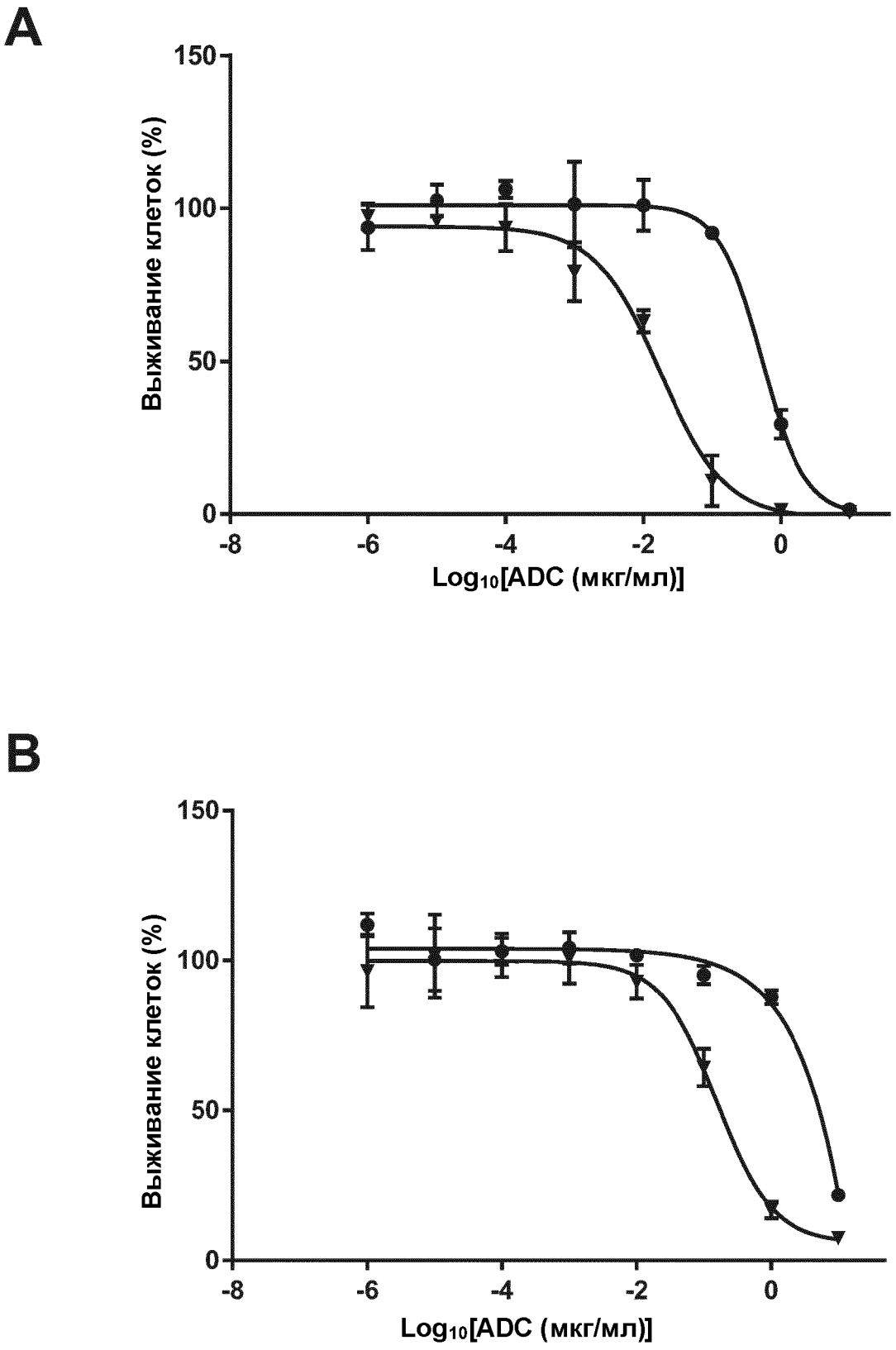
18. Применение по п. 17, характеризующийся тем, что указанное заболевание представляет собой рак.

19. Применение по п. 18, характеризующийся тем, что, если указанное антитело связывается с KAAG1, указанный рак представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из: рака яичников, рака молочной железы, рака простаты и рака почек.

20. Применение по п. 18, характеризующийся тем, что, если указанное антитело связывается с мезотелином, указанный рак представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из: мезотелиомы, рака легких, рака яичников и рака поджелудочной железы.

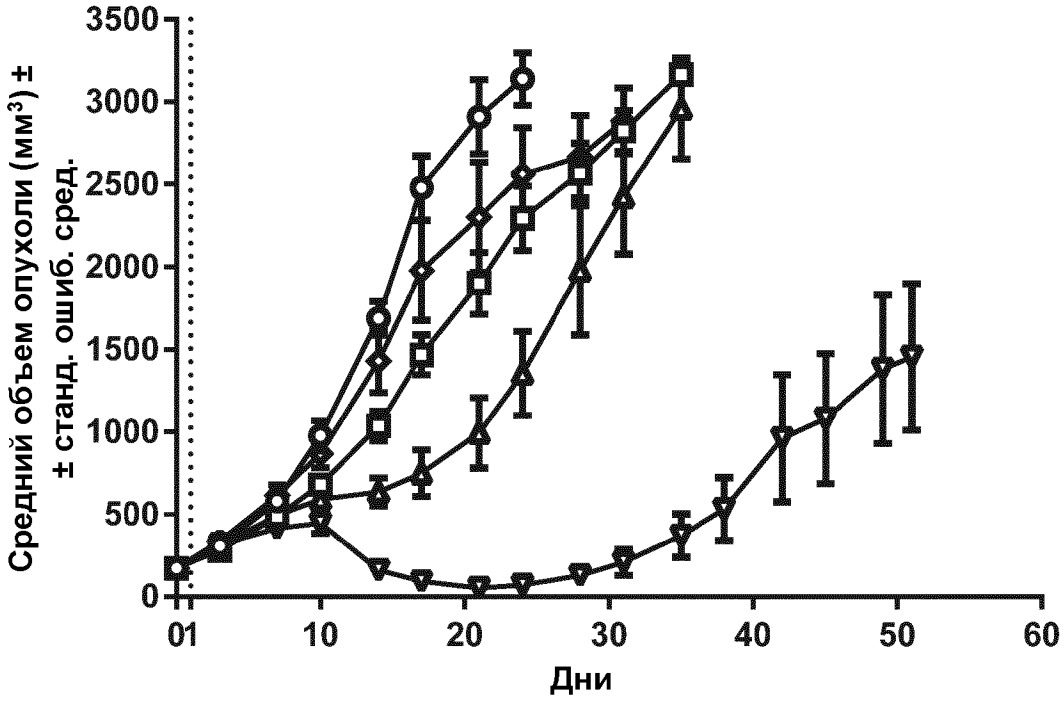
21. Фармацевтическая композиция для лечения пролиферативного заболевания у субъекта, содержащая конъюгат по любому из пп. 1-16 и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

22. Фармацевтическая композиция по п. 21, дополнительно содержащая терапевтически эффективное количество химиотерапевтического агента.

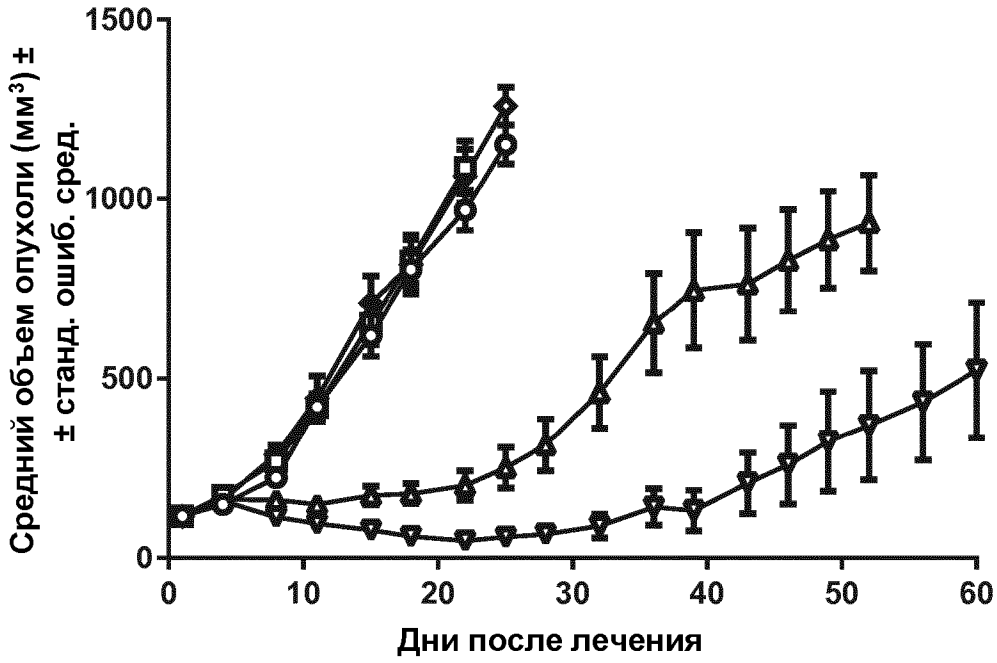

A
150
100
50
0
Выживание клеток (%)
-8
-6
-4
-2
0
Log10[ADC (мкг/мл)]
B
150
100
50
0
Выживание клеток (%)
-8
-6
-4
-2
0
Log10[ADC (мкг/мл)]

Фигура 1

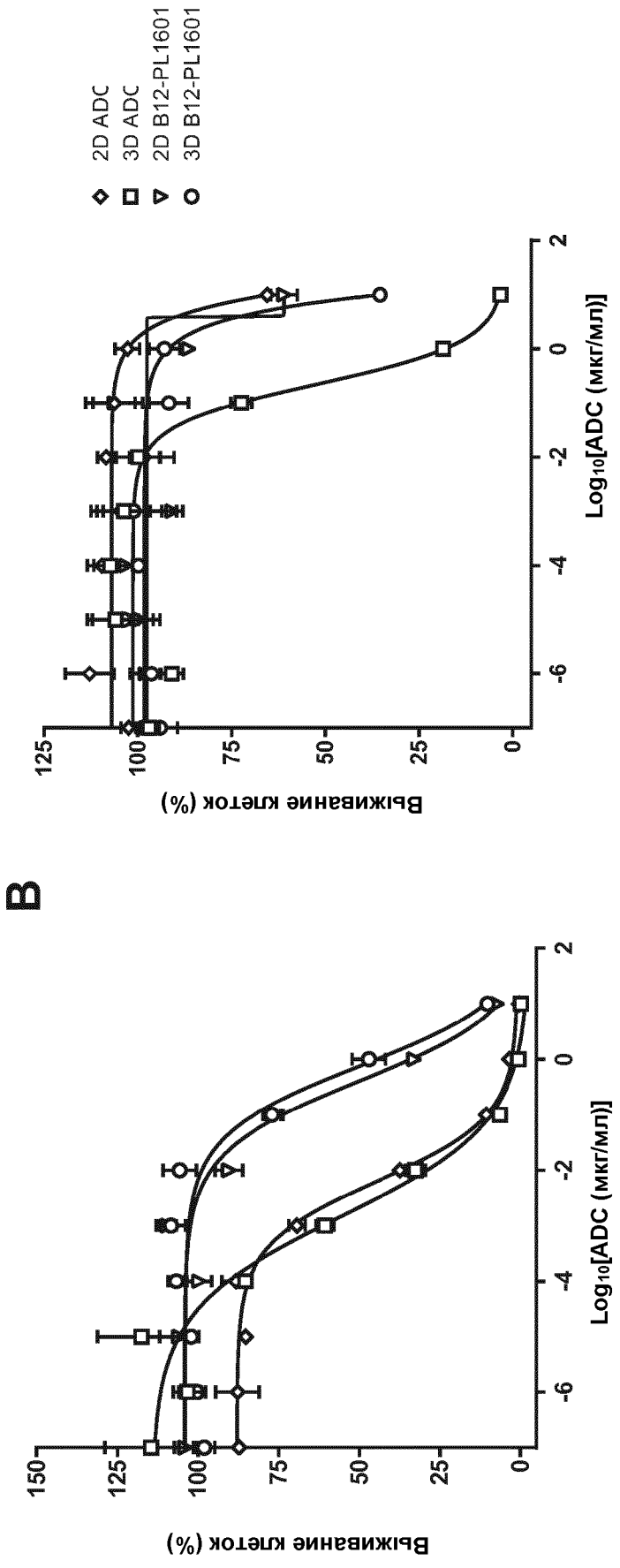
A


Средний объем опухоли (мм³) ±
± станд. ошиб. сред.
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
01
10
20
30
40
50
60
Дни

B

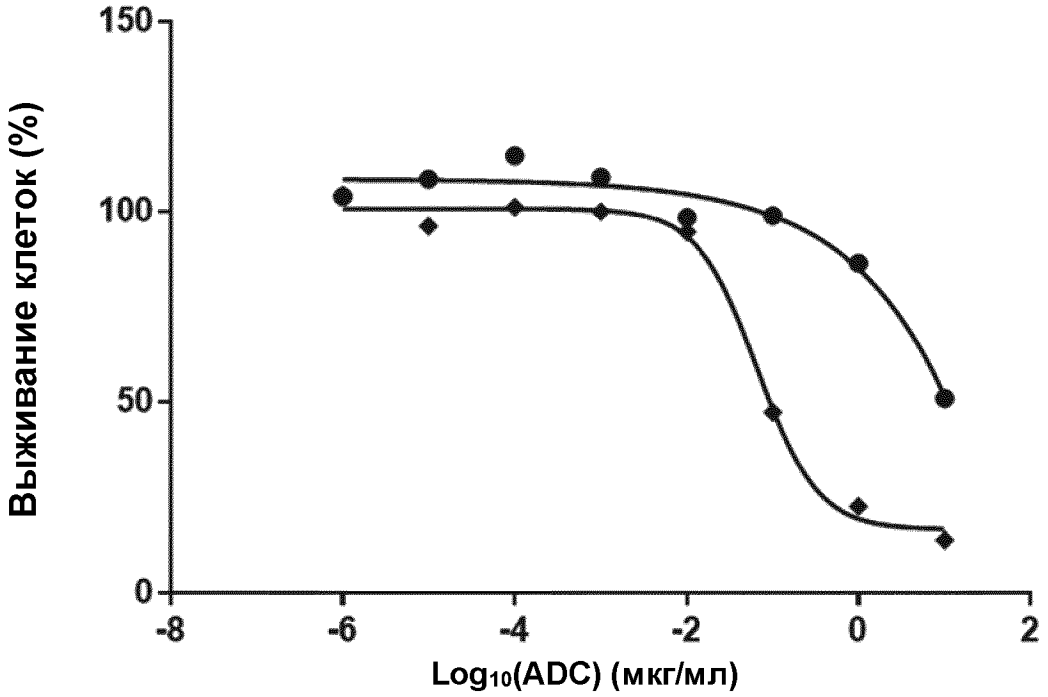

Средний объем опухоли (мм³) ±
± станд. ошиб. сред.
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
60
Дни после лечения

Фигура 2

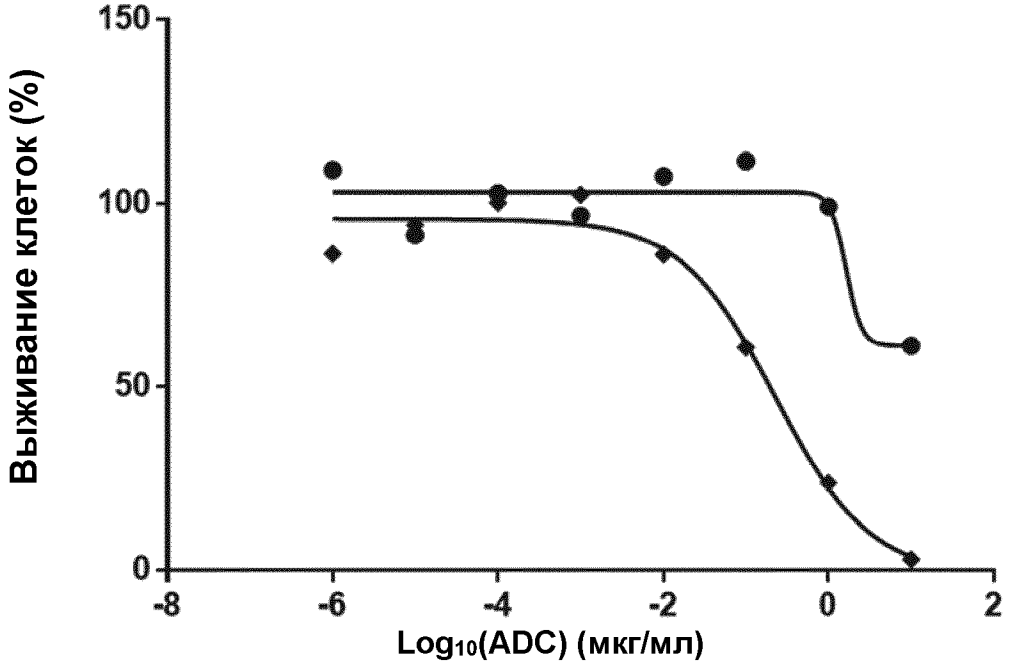

A
B
2D ADC
3D ADC
2D B12-PL1601
3D B12-PL1601
Выживание клеток (%)
Log10[ADC (мкг/мл)]
150
125
100
75
50
25
0
2
0
-2
-4
-6

Фигура 3

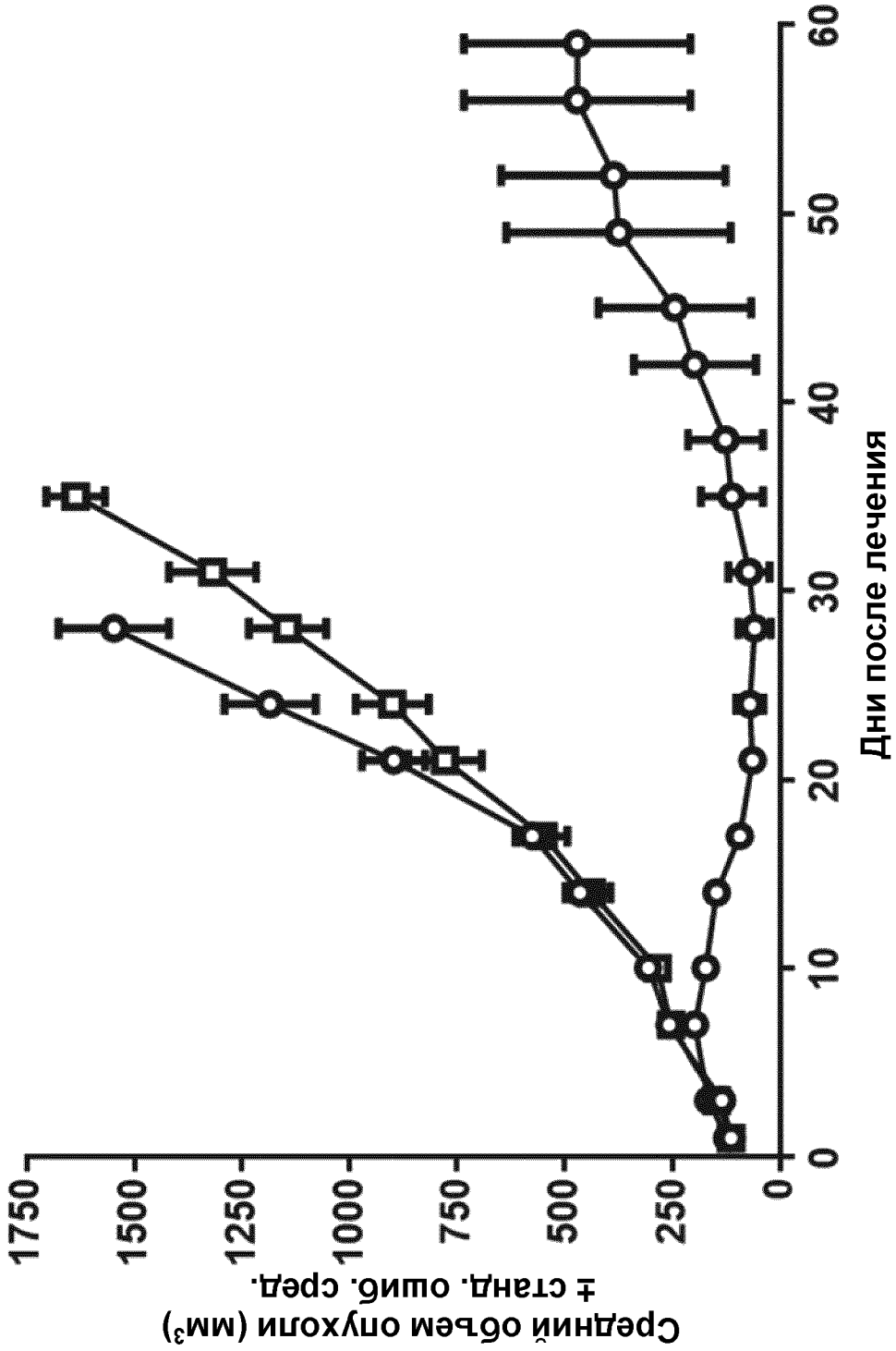
A


150
100
50
0
Выживание клеток (%)
-8
-6
-4
-2
0
2
Log10(ADC) (мкг/мл)

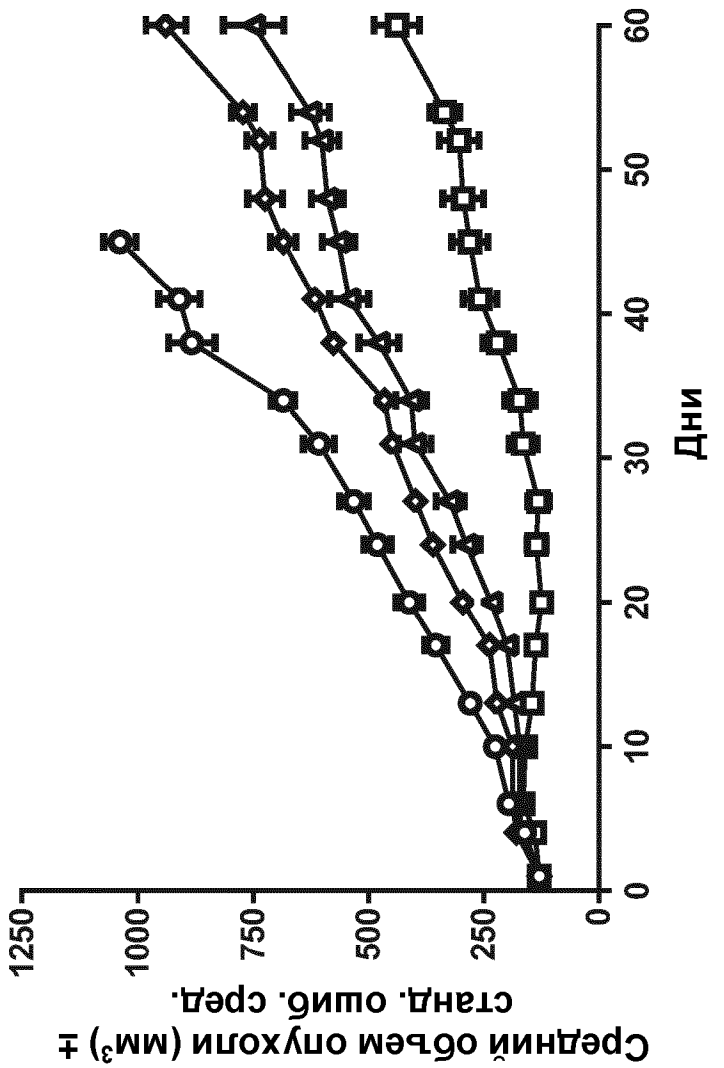
B


150
100
50
0
Выживание клеток (%)
-8
-6
-4
-2
0
2
Log10(ADC) (мкг/мл)

Фигура 4


Средний объем опухоли (мм³)
± станд. ошиб. средн.
1750
1500
1250
1000
750
500
250
0
0
10
20
30
40
50
60
Дни после лечения

Фигура 5


Средний объем опухоли (мм³) ± стандартная ошибка среднего
1250
1000
750
500
250
0
0
10
20
30
40
50
60
Дни
Носитель, qd1
ADC, 0,3 мг/мг, qd1
ADC, 0,6 мг/мг, qd1
ADC, 1 мг/мг, qd1

Фигура 6