

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202293342 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.01.11

(22) Дата подачи заявки
2021.05.12

(51) Int. Cl. A61K 47/68 (2017.01)
A61K 31/4745 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 202010410633.5

(32) 2020.05.15

(33) CN

(86) PCT/CN2021/093348

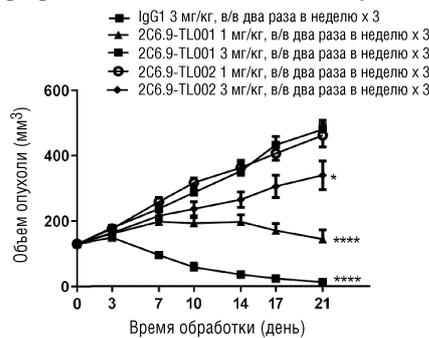
(87) WO 2021/228141 2021.11.18

(71) Заявитель:
СЫЧУАНЬ КЭЛУНЬ-БАЙОТЕК
БАЙОФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД.
(CN)

(72) Изобретатель:
Сяо Лян, Сюэ Тунтун, Ван Цзини,
Ван Чэн, Лю Дэнянь, Тянь Цян, Сун
Шуай (CN)

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

(57) Представлен анти-CLDN 18.2 конъюгат антитело-лекарственное средство, способ его получения и применение. Конъюгат антитело-лекарственное средство и его композиция способны эффективно связывать CLDN 18.2 и ингибировать рост Клаудин 18.2-положительных опухолей. Также представлена фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антитело-лекарственное средство или композицию, и применение фармацевтической композиции для получения лекарственного средства для профилактики и/или лечения опухолей.



A1

202293342

202293342

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576398EA/032

КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

Настоящая заявка основана на заявке CN № 202010410633.5 с датой подачи 15 мая 2020 года и по этой заявке испрашивается приоритет; раскрытие указанной заявки включено в настоящую заявку во всей полноте.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к области биомедицины, в частности относится к конъюгату, содержащему антитело против Клаудина 18.2 и лекарственное средство (ADC), и к композиции, содержащей ADC, и их применению.

Предпосылки создания изобретения

Лечение рака желудка преимущественно включает хирургическое иссечение. При неоперабельном или рецидивирующем раке желудка химиотерапия является основным методом лечения, но согласно современному уровню техники она может только облегчить симптомы и продлить выживаемость. В настоящее время не существует общепризнанной стандартной схемы химиотерапии рака желудка поздней стадии. Что касается биомакромолекулярных препаратов, за исключением трастузумаба, рамуцирумаба, пембролизумаба и др., которые были одобрены, большинство других таргетных препаратов для лечения рака желудка неудовлетворительны по эффективности или все еще находятся на ранних стадиях клинических исследований. Основным недостатком существующих лекарственных средств являются неудовлетворенные клинические потребности в нехирургическом лечении, очень ограниченные возможности лечения распространенного или рецидивирующего рака желудка, чрезвычайно плохой прогноз и высокая смертность. В связи с высокой заболеваемостью раком желудка в настоящее время потребности в лекарственном средстве от рака желудка велики.

Клаудин 18.2 (CLDN 18.2) является членом семейства белков Клаудинов. Белки семейства Клаудинов представляют собой тип белков, обеспечивающих плотные контакты между клетками. Различные подтипы Клаудинов экспрессируются в разных тканях и связаны с разными типами рака. Экспрессия Клаудина 18.2 в нормальных тканях ограничена клетками слизистой оболочки желудка. Клаудин 18.2 высоко экспрессируется в 70% случаев первичной аденокарциномы желудка и ее метастазов; он также экспрессируется при других видах рака, таких как рак поджелудочной железы, рак пищевода и немелкоклеточный рак легкого (NSCLC). Высокоспецифическая экспрессия Клаудина 18.2 в опухолевых тканях делает Клаудин 18.2 очень хорошей мишенью для иммунотерапии опухолей.

Сущность изобретения

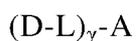
Автор настоящей заявки описал антитело с высокой специфичностью и высокой аффинностью к Клаудину 18.2 в заявке PCT/CN2019/126495, полное содержание которой

включено в настоящую заявку посредством ссылки и становится частью настоящей заявки. Как результат масштабной и креативной работы автором настоящей заявки затем был изобретен конъюгат, содержащий антитело против Клаудина 18.2 и лекарственное средство (ADC), который обеспечивает безопасный и эффективный вариант лекарственного средства для лечения опухолей.

В частности, авторы настоящего изобретения конъюгировали антитело с высокой аффинностью, которое специфически связывается с Клаудином 18.2, с биоактивной молекулой через линкер, для получения класса Клаудин 18.2-нацеленных ADC и композиции, содержащей ADC. ADC или композиция имеет высокую киллерную активность против некоторых опухолевых клеток, экспрессирующих Клаудин 18.2. В экспериментах на животных (in vivo) ADC может эффективно ингибировать рост Клаудин 18.2-положительных опухолей, особенно рак желудка или аденокарциному желудка, и является высокобезопасным при применении.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC)

В первом аспекте изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство (ADC), который специфически связывается с CLDN 18.2 человека, структура которого показана в формуле (I):



Формула (I)

где D представляет собой фрагмент биоактивной молекулы; L представляет собой линкер;

γ равно целому числу от 1 до 10; предпочтительно γ равно целому числу от 1 до 8 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8);

A представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с CLDN 18.2 человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с CLDN 18.2 человека, включает:

(1) следующие три CDR тяжелой цепи: CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, содержащиеся в VH (вариабельной области тяжелой цепи) с SEQ ID NO: 13, 14 или 23; и/или

следующие три CDR легкой цепи: CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащиеся в VL (вариабельной области легкой цепи) с SEQ ID NO: 15 или 24;

или

(2) следующие три CDR тяжелой цепи: CDR-H1, описанную в (1), или ее вариант, содержащий аминокислотную мутацию, и CDR-H2, описанную в (1), или ее вариант, содержащий аминокислотную мутацию, и CDR-H3, описанную в (1), или ее вариант, содержащий аминокислотную мутацию; и/или

следующие три CDR легкой цепи: CDR-L1, описанную в (1), или ее вариант, содержащий аминокислотную мутацию, CDR-L2, описанную в (1), или ее вариант,

содержащий аминокислотную мутацию, и CDR-L3, описанную в (1), или ее вариант, содержащий аминокислотную мутацию;

где по меньшей мере одна из трех CDR тяжелой цепи и/или трех CDR легкой цепи, описанных в (2), содержит аминокислотную мутацию по сравнению с соответствующей CDR в (1), и аминокислотная мутация представляет собой замену, делецию или добавление одной или более аминокислот (например, замену, делеция или добавление 1, 2 или 3 аминокислот); антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие мутацию, тем не менее способны к специфическому связыванию с CLDN 18.2, предпочтительно с CLDN 18.2 человека; предпочтительно замена представляет собой консервативную замену.

В некоторых вариантах осуществления CDR определены в соответствии с системой нумерации IMGT или AbM.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также включает каркасные области (FR) из иммуноглобулинов человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает:

(1-1) следующие три CDR тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации IMGT: CDR-H1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1, CDR-H2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 2 или 21, и CDR-H3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 3; и/или

следующие три CDR легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации IMGT: CDR-L1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 4, CDR-L2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR-L3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 6;

или

(1-2) следующие три CDR тяжелой цепи: CDR-H1, описанную в (1-1), или ее вариант, содержащий аминокислотную мутацию, и CDR-H2, описанную в (1-1), или ее вариант, содержащий аминокислотную мутацию, и CDR-H3, описанную в (1-1), или ее вариант, содержащий аминокислотную мутацию; и/или

следующие три CDR легкой цепи: CDR-L1, описанную в (1-1), или ее вариант, содержащий аминокислотную мутацию, и CDR-L2, описанную в (1-1), или ее вариант, содержащий аминокислотную мутацию, и CDR-L3, описанную в (1-1), или ее вариант, содержащий аминокислотную мутацию;

где по меньшей мере одна из трех CDR тяжелой цепи и/или трех CDR легкой цепи содержит аминокислотную мутацию по сравнению с соответствующей CDR в (1-1), и аминокислотная мутация представляет собой замену, делецию или добавление одной или более аминокислот (например, замену, делецию или добавление 1, 2 или 3 аминокислот); антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие мутацию, тем не менее способны к специфическому связыванию с CLDN 18.2 человека; предпочтительно замена представляет собой

консервативную замену;

или

(2-1) следующие три CDR тяжелой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации AbM: CDR-H1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 7, CDR-H2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 8 или 22, и CDR-H3, имеющую последовательность SEQ ID No 9; и/или

следующие три CDR легкой цепи, определенные в соответствии с системой нумерации AbM: CDR-L1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 10, CDR-L2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 11, и CDR-L3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 12;

или

(2-2) следующие три CDR тяжелой цепи: CDR-H1, описанную в (2-1), или ее вариант, содержащий аминокислотную мутацию, и CDR-H2, описанную в (2-1), или ее вариант, содержащий аминокислотную мутацию, и CDR-H3, описанную в (2-1), или ее вариант, содержащий аминокислотную мутацию; и/или

следующие три CDR легкой цепи: CDR-L1, описанную в (2-1), или ее вариант, содержащий аминокислотную мутацию, и CDR-L2, описанную в (2-1), или ее вариант, содержащий аминокислотную мутацию, и CDR-L3, описанную в (2-1), или ее вариант, содержащий аминокислотную мутацию;

где по меньшей мере одна из трех CDR тяжелой цепи и/или трех CDR легкой цепи содержит аминокислотную мутацию по сравнению с соответствующей CDR в (2-1), и аминокислотная мутация представляет собой замену, делецию или добавление одной или более аминокислот (например, замену, делецию или добавление 1, 2 или 3 аминокислот); антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие мутацию, тем не менее способны к специфическому связыванию с CLDN 18.2 человека; предпочтительно замена представляет собой консервативную замену.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также включает каркасные области (FR) из иммуноглобулинов человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает:

(1) следующую VH и/или VL, где CDR определены в соответствии с системой нумерации IMGT:

(1-1): VH, содержащую следующие 3 CDR: CDR-H1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 1, CDR-H2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 2 или 21, и CDR-H3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 3; и/или

VL, содержащую следующие 3 CDR: CDR-L1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 4, CDR-L2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR-L3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 6;

или

(1-2): по сравнению с VH или VL, описанной в (1-1), по меньшей мере одна CDR содержит мутацию, которая представляет собой замену, делецию или добавление одной или более аминокислот, или любую их комбинацию (например, замену, делецию или добавление 1, 2 или 3 аминокислот, или любую их комбинацию); предпочтительно замена представляет собой консервативную замену; антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие мутацию, тем не менее способны к специфическому связыванию с CLDN 18.2; предпочтительно с CLDN 18.2 человека;

или

(2) следующую VH и/или VL, где CDR определены в соответствии с системой нумерации AbM:

(2-1): VH, содержащую следующие 3 CDR: CDR-H1, имеющую последовательность SEQ ID NO: 7, CDR-H2, имеющую последовательность SEQ ID NO: 8 или 22, и CDR-H3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 9; и/или

VL, содержащую следующие 3 CDR: CDR-L1, имеющую последовательность SEQ ID NO:10, CDR-L2, имеющую последовательность SEQ ID NO:11, и CDR-L3, имеющую последовательность SEQ ID NO: 12;

или

(2-2): по сравнению с VH или VL, описанной в (2-1), по меньшей мере одна CDR содержит мутацию, которая представляет собой замену, делецию или добавление одной или более аминокислот, или любую их комбинацию (например, замену, делецию или добавление 1, 2 или 3 аминокислот, или любую их комбинацию); предпочтительно замена представляет собой консервативную замену; антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие мутацию, тем не менее способны к специфическому связыванию с CLDN 18.2; предпочтительно с CLDN 18.2 человека.

В некоторых вариантах осуществления VH и/или VL антитела или его антигенсвязывающего фрагмента включает каркасные области (FR) из иммуноглобулинов человека или мыши.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает:

(1) VH, представленную в SEQ ID NO: 13 или 14; и/или VL, представленную в SEQ ID NO: 15;

или

(2) по сравнению с VH, описанной в (1), VH, содержащаяся в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность; и/или по сравнению с VL, описанной в (1), VL,

содержащаяся в антители или его антигенсвязывающем фрагменте, имеет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность; антители или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющие идентичность с VL или VH, описанной в (1), тем не менее способны к специфическому связыванию с CLDN 18.2, предпочтительно с CLDN 18.2 человека;

или

(3) по сравнению с VH, описанной в (1), VH, содержащаяся в антители или его антигенсвязывающем фрагменте, имеет замену, делецию или добавление одной или более аминокислот, или любую их комбинацию (например, замену, делецию или добавление 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот, или любую их комбинацию); и/или по сравнению с VL, описанной в (1), VL, содержащаяся в антители или его антигенсвязывающем фрагменте, имеет замену, делецию или добавление одной или более аминокислот, или любую их комбинацию (например, замену, делецию или добавление 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот, или любую их комбинацию); предпочтительно замена представляет собой консервативную замену. Антители или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие мутацию, тем не менее способны к специфическому связыванию с CLDN 18.2; предпочтительно с CLDN 18.2 человека.

В любом из описанных выше аспектов антители или его антигенсвязывающий фрагмент может также включать константную область, полученную из иммуноглобулина млекопитающего (например, мыши или человека), или ее вариант.

В некоторых вариантах осуществления антители может включать:

(1) CH (константную область тяжелой цепи) иммуноглобулина человека или ее вариант, где вариант включает замену, делецию или добавление одной или более аминокислот по сравнению с последовательностью дикого типа, из которой он получен (например, замену, делецию или добавление до 20, до 15, до 10 или до 5 аминокислот; например, замену, делецию или добавление 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот); и/или

(2) CL (константную область легкой цепи) иммуноглобулина человека или ее вариант, где вариант включает замену, делецию или добавление одной или более аминокислот по сравнению с последовательностью дикого типа, из которой он получен (например, замену, делецию или добавление до 20, до 15, до 10 или до 5 аминокислот; например, замену, делецию или добавление 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот).

В некоторых вариантах осуществления константная область изменена, например мутирована, для модификации свойств анти-CLDN18.2 антитела (например, для изменения одного или более из следующих свойств: связывание Fc рецептора, гликозилирование антитела, количество цистеиновых остатков, функции в

отношении эффекторных клеток или факторов комплемента). По меньшей мере один аминокислотный остаток в константной области антитела может быть заменен другими для изменения функции. Например, эффекторную функцию можно изменить (например, усилить) путем изменения аффинности антитела к эффекторному лиганду (такому как FcR или C1q комплемента). В некоторых вариантах осуществления константная область изменена (например, усилена) для модификации антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) и/или антитело-зависимого клеточного фагоцитоза (ADCP).

В некоторых вариантах осуществления СН представляет собой константную область тяжелой цепи IgG, такую как константная область тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает константную область тяжелой цепи IgG1 человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает СН, представленную в SEQ ID NO: 16, или ее вариант, который имеет консервативную замену до 20 аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 16 (например, консервативную замену до 15, 10 или 5 аминокислот; например, консервативную замену 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот). СН, содержащая мутацию, сохраняет по существу такую же функцию, как SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах осуществления CL выбрана из константной области легкой цепи κ или λ .

В некоторых вариантах осуществления CL представляет собой константную область легкой цепи κ (например, человеческой легкой цепи κ).

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает CL, представленную в SEQ ID NO: 17, или ее вариант, который имеет консервативную замену до 20 аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 17 (например, консервативную замену до 15, 10 или 5 аминокислот; например, консервативную замену 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот). CL, содержащая мутацию, сохраняет по существу такую же функцию, как SEQ ID NO: 17.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает СН, представленную в SEQ ID NO: 16, и/или CL, представленную в SEQ ID NO: 17.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, содержащую VH последовательности с SEQ ID NO: 13, и СН, представленную в SEQ ID NO: 16; и

легкую цепь, содержащую VL последовательности с SEQ ID NO: 15, и CL, представленную в SEQ ID NO: 17.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, содержащую VH последовательности с SEQ ID NO: 14, и СН, представленную в SEQ

ID NO: 16; и

легкую цепь, содержащую VL последовательности с SEQ ID NO: 15, и CL, представленную в SEQ ID NO: 17.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает:

(1) тяжелую цепь, которая включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

(1-1) последовательности с SEQ ID NO: 18;

(1-2) последовательности, имеющей замену, делецию или добавление одной или нескольких аминокислот (например, замену, делецию или добавление 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) по сравнению с последовательностью с SEQ ID NO: 18; или

(1-3) последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность с последовательностью с SEQ ID NO: 18;

и

(2) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

(2-1) последовательности с SEQ ID NO: 20;

(2-2) последовательности, имеющей замену, делецию или добавление одной или нескольких аминокислот (например, замену, делецию или добавление 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) по сравнению с последовательностью с SEQ ID NO: 20; или

(2-3) последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность с последовательностью с SEQ ID NO: 20.

В некоторых вариантах осуществления замены, описанные в (1-2) и (2-2) выше, представляют собой консервативные замены. СН, содержащая мутацию, сохраняет по существу такую же функцию, как SEQ ID NO: 16.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает:

(1) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

(1-1) последовательности с SEQ ID NO: 19;

(1-2) последовательности, имеющей замену, делецию или добавление одной или нескольких аминокислот (например, замену, делецию или добавление 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) по сравнению с последовательностью с SEQ ID NO: 19; или

(1-3) последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере

85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность с последовательностью с SEQ ID NO:19;

и

(2) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

(2-1) последовательности с SEQ ID NO:20;

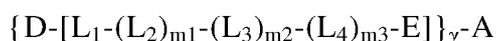
(2-2) последовательности, имеющей замену, делецию или добавление одной или нескольких аминокислот (например, замену, делецию или добавление 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) по сравнению с последовательностью с SEQ ID NO: 20; или

(2-3) последовательности, имеющей по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичность с последовательностью с SEQ ID NO:20.

В некоторых вариантах осуществления замены, описанные в (1-2) и (2-2), представляют собой консервативные замены. Предпочтительно антитело, содержащее мутации или идентичные последовательности, или его антигенсвязывающий фрагмент, тем не менее способны к специфическому связыванию с CLDN 18.2 человека.

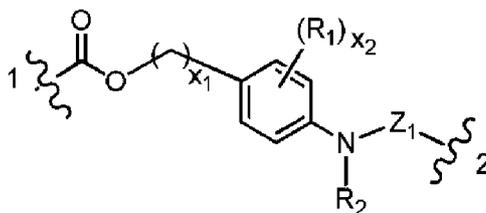
В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбраны из scFv, Fab, Fab', (Fab')₂, Fv фрагмента, связанного дисульфидной связью Fv (dsFv), диатела, биспецифического антитела и мультиспецифического антитела.

В некоторых вариантах осуществления структура (D-L)_γ-A показана в формуле (II):



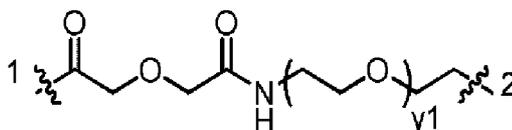
Формула (II)

где



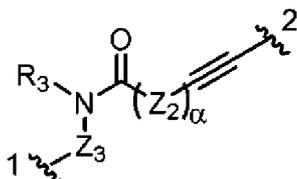
L_1 представляет собой _____, где R_1 и R_2 , каждый независимо, представляют собой водород (такой как протий или дейтерий), галоген, группу карбоновой кислоты, группу сульфоновой кислоты, циано, C_{1-6} алкил, галогенированный C_{1-6} алкил, циано-замещенный C_{1-6} алкил (например, $-CH_2CN$), C_{1-6}

алкокси, C_{2-10} алкенил или C_{2-10} алкинил; Z_1 представляет собой аминокислоту или пептид, состоящий из 2-10 аминокислот; x_1 и x_2 , каждый независимо, имеют значение 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6; L_1 связан с D в положении 1 и связан с L_2 в положении 2;

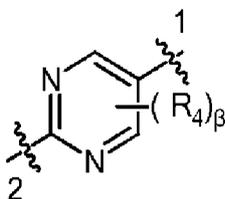


L_2 представляет собой _____, где y_1 имеет значение 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10; L_2 связан с L_1 в положении 1 и связан с L_3 в положении 2;

L_3 выбран из 5-12-членного ароматического гетероцикла;



L_4 представляет собой _____, где Z_2 выбран из C_{1-6} алкилена, C_{2-10} алкенилена, C_{2-10} алкинилена и C_{3-8} циклоалкилена; R_3 выбран из водорода (такого как протий или дейтерий) и C_{1-6} алкила; Z_3 отсутствует или выбран из C_{1-6} алкилена; альтернативно, R_3 и Z_3 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 4-8-членный гетероцикл; α имеет значение 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6, и L_4 связан с E в положении 2 и связан с L_3 в положении 1;

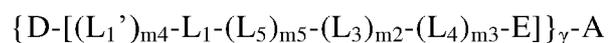


E представляет собой _____, где каждый R_4 независимо представляет собой водород (например, протий или дейтерий), β имеет значение 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6, и E связан с A в положении 2 и связан с L_4 в положении 1;

m_1 , m_2 и m_3 , каждый независимо, имеют значение 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

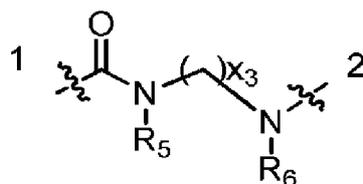
A, D и γ имеют значение, определенное выше.

В некоторых вариантах осуществления структура $(D-L)_\gamma-A$ является такой, как показано в формуле (III):

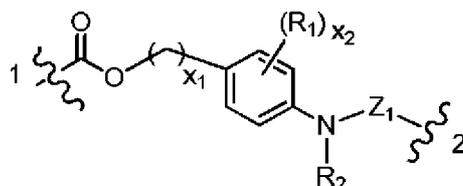


Формула (III)

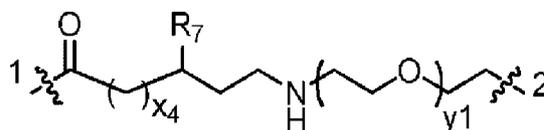
где



L_1' представляет собой $\text{---} \text{C}(=\text{O})\text{---N}(\text{R}_5)\text{---}(\text{---})_{x_3}\text{---N}(\text{R}_6)\text{---}$, где R_5 и R_6 , каждый независимо, представляют собой водород (такой как протий или дейтерий) или C_{1-6} алкил; x_3 имеет значение 1, 2, 3, 4, 5 или 6; и, если L_1' присутствует, он связывается с D в положении 1 и связывается с L_1 в положении 2;

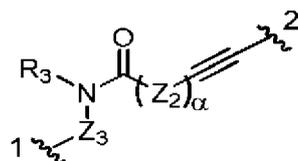


L_1 представляет собой $\text{---} \text{C}(=\text{O})\text{---O---}(\text{---})_{x_1}\text{---C}_6\text{H}_4\text{---N}(\text{R}_2)\text{---Z}_1\text{---}$, где R_1 и R_2 , каждый независимо, представляют собой водород (такой как протий или дейтерий), галоген, группу карбоновой кислоты, группу сульфоновой кислоты, циано, C_{1-6} алкил, галогенированный C_{1-6} алкил, циано-замещенный C_{1-6} алкил (например, $-\text{CH}_2\text{CN}$), C_{1-6} алкокси, C_{2-10} алкенил или C_{2-10} алкинил; Z_1 представляет собой аминокислоту или пептид, состоящий из 2-10 аминокислот; x_1 и x_2 , каждый независимо, имеют значение 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6; L_1 связан с L_1' (когда L_1' присутствует) в положении 1 или с D (когда L_1' отсутствует) в положении 1; L_1 связан с L_5 в положении 2;



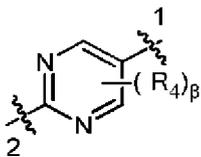
L_5 представляет собой $\text{---} \text{C}(=\text{O})\text{---}(\text{---})_{x_4}\text{---CH}(\text{R}_7)\text{---CH}_2\text{---NH---}(\text{---O---})_{y_1}\text{---}$, где R_7 представляет собой водород или C_{1-6} алкил, или R_7 связан с атомом N по его γ -C с образованием 5-6-членного гетероцикла; x_4 имеет значение 1, 2, 3, 4, 5 или 6; y_1 имеет значение 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10; и L_5 связан с L_1 в положении 1 и связан с L_3 в положении 2;

L_3 выбран из 5-12-членного ароматического гетероцикла;



L_4 представляет собой $\text{---} \text{N}(\text{R}_3)\text{---Z}_3\text{---C}(=\text{O})\text{---}(\text{---})_{\alpha}\text{---}$, где Z_2 выбран из C_{1-6} алкилена, C_{2-10} алкенилена, C_{2-10} алкинилена и C_{3-8} циклоалкилена; R_3 выбран из водорода (такого как протий и дейтерий) и C_{1-6} алкила; Z_3 отсутствует или выбран из C_{1-6} алкилена; или R_3 и Z_3 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 4-8-членный гетероциклический радикал; α имеет значение 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6, и L_4 связан с E в

положении 2 и связан с L_3 в положении 1;

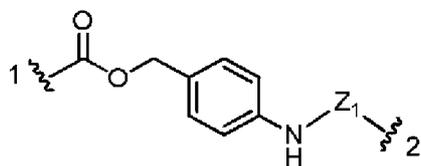


E представляет собой $(R_4)_\beta$, где каждый R_4 независимо представляет собой водород (такой как протий или дейтерий), β имеет значение 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6, и E связан с A в положении 2 и связан с L_4 в положении 1;

m_1 , m_2 , m_3 и m_4 , каждый независимо, имеют значение 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

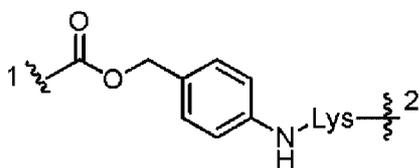
A , D и γ имеют значение, определенное выше.

В некоторых вариантах осуществления L_1 в ADC, представленном формулой (II) или формулой (III), представляет собой

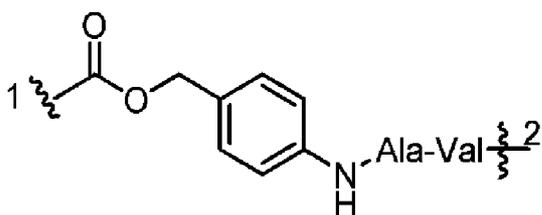


, где Z_1 представляет собой аминокислоту или пептид, состоящий из 2-5 аминокислот, где аминокислота выбрана из Lys, Cit, Val, D-Val, Phe, Leu, Gly, Ala и Asn; предпочтительно Z_1 выбран из Cit, Lys, Cit-Val и Ala-Val.

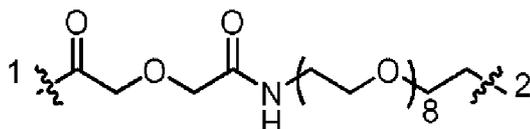
В некоторых вариантах осуществления L_1 представляет собой



В некоторых вариантах осуществления L_1 представляет собой



В некоторых вариантах осуществления L_2 в ADC, представленном формулой (II),



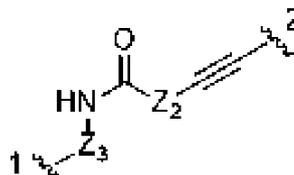
представляет собой $(CH_2)_8$, и m_1 имеет значение 1.

В некоторых вариантах осуществления L_3 в ADC, представленном формулой (II) или формулой (III), представляет собой 5-6-членный ароматический гетероцикл и m_2

имеет значение 1.

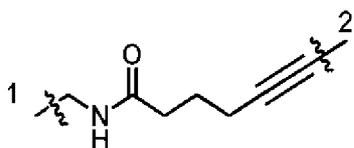
В некоторых вариантах осуществления L_3 представляет собой триазол и m_2 имеет значение 1.

В некоторых вариантах осуществления L_4 в ADC, представленном формулой (II)



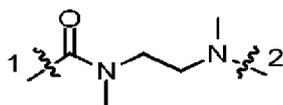
или формулой (III), представляет собой Z_2 , где Z_2 представляет собой C_{1-6} алкилен, Z_3 представляет собой C_{1-6} алкилен; и m_3 имеет значение 1.

В некоторых вариантах осуществления L_4 представляет собой



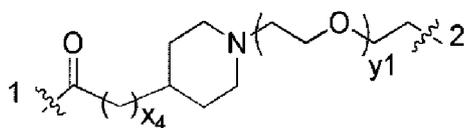
и m_3 имеет значение 1.

В некоторых вариантах осуществления L_1 в ADC, представленном формулой (III),



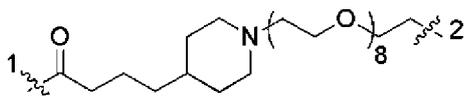
представляет собой

В некоторых вариантах осуществления L_5 в ADC, представленном формулой (III),



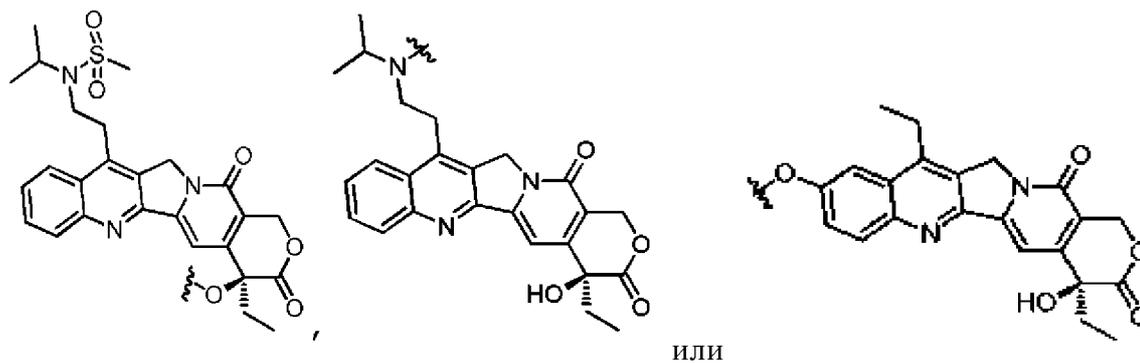
представляет собой x_4 , где x_4 имеет значение 1, 2, 3, 4, 5 или 6; y_1 имеет значение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

В некоторых вариантах осуществления L_5 в ADC, представленном формулой (III),

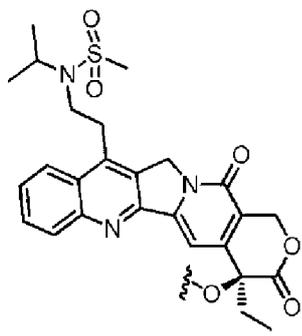


представляет собой

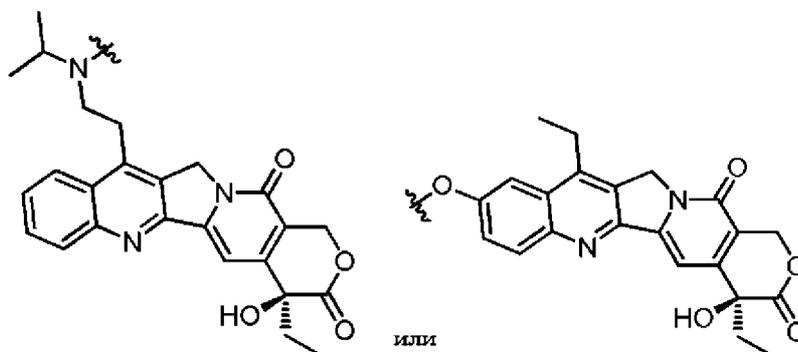
В некоторых вариантах осуществления D в конъюгате антитело-лекарственное средство, представленном формулой (I), представляет собой



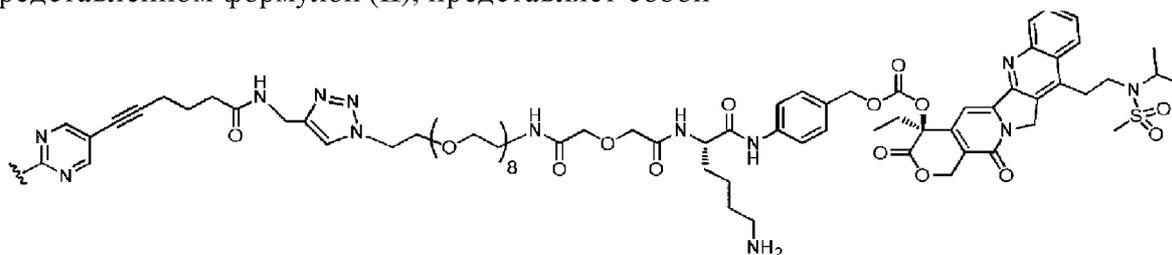
В некоторых вариантах осуществления D в конъюгате антитело-лекарственное средство, представленном формулой (II), представляет собой



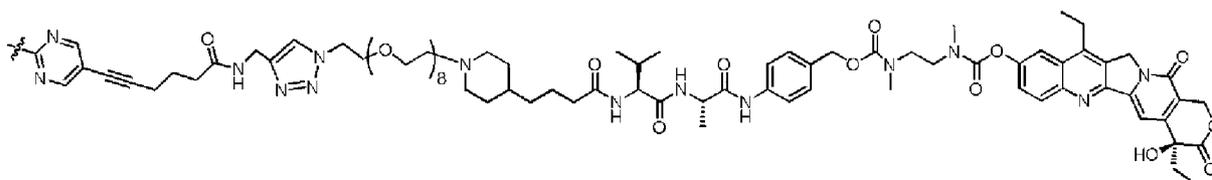
В некоторых вариантах осуществления D в ADC, представленном формулой (III), представляет собой



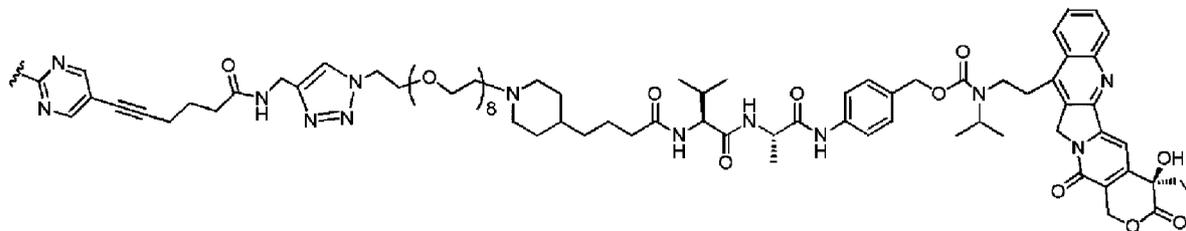
В некоторых вариантах осуществления D-[L₁-(L₂)_{m1}-(L₃)_{m2}-(L₄)_{m3}-E]- в ADC, представленном формулой (II), представляет собой



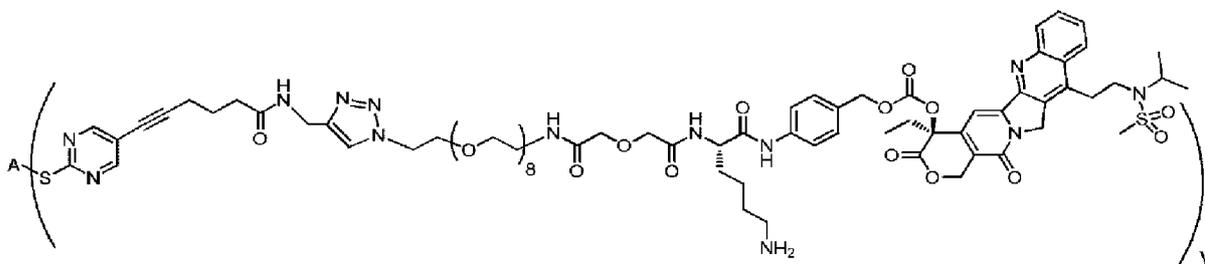
В некоторых вариантах осуществления D-[(L₁')_{m4}-L₁-(L₅)_{m5}-(L₃)_{m2}-(L₄)_{m3}-E]- в ADC, представленном формулой (III), представляет собой



или

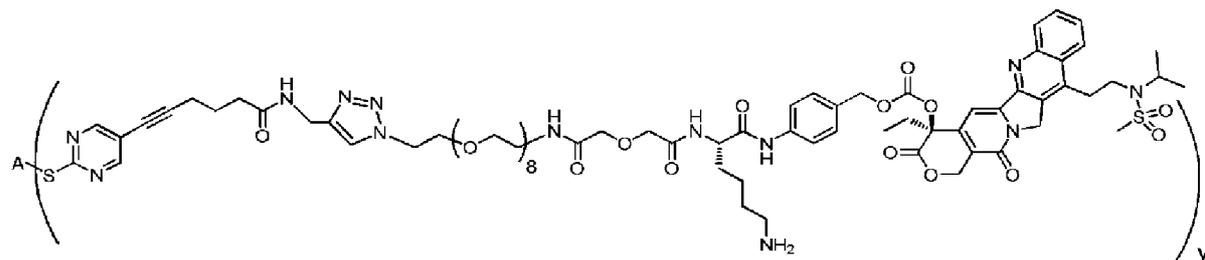


В некоторых вариантах осуществления структура ADC, представленного формулой (II), представляет собой:



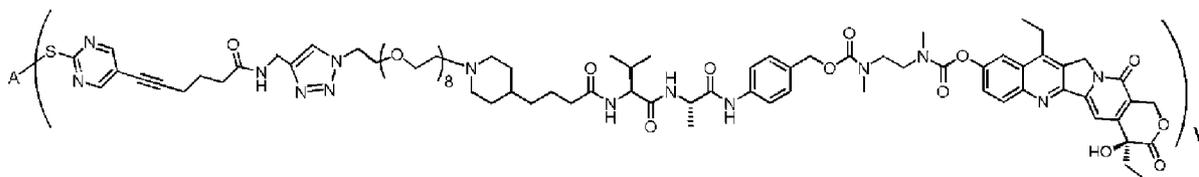
где γ выбран из целого числа от 1 до 10, например, γ имеет значение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и А представляет собой указанное выше антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с CLDN 18.2 человека.

В некоторых вариантах осуществления ADC, представленный формулой (II), показан в следующей формуле:



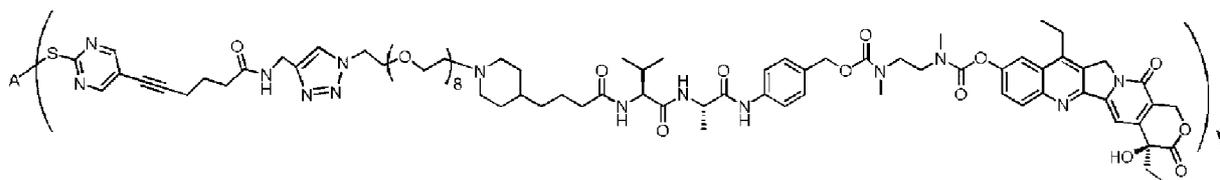
где γ равно целому числу от 1 до 10, например, γ имеет значение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и А представляет собой 2С6.9-hz21.

В некоторых вариантах осуществления структура ADC, представленного формулой (III), представляет собой:



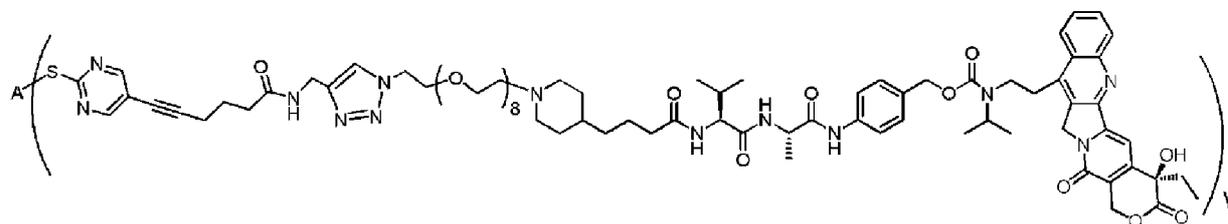
где γ выбран из целого числа от 1 до 10, например, γ имеет значение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и А представляет собой указанное выше антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с CLDN 18.2 человека.

В некоторых вариантах осуществления ADC, представленный формулой (III), показан в следующей формуле:



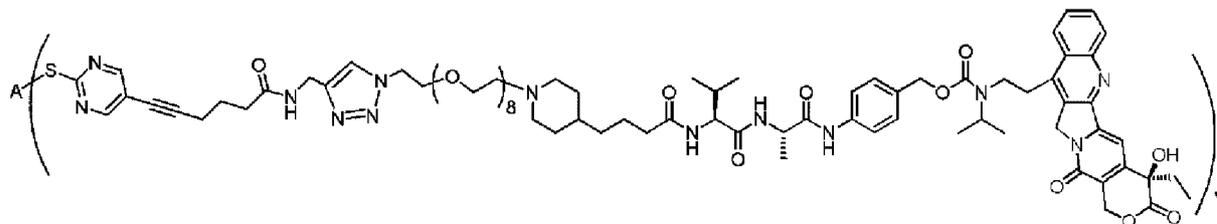
где γ равно целому числу от 1 до 10, например, γ имеет значение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и А представляет собой 2С6.9-hz21.

В некоторых вариантах осуществления структура ADC, представленного формулой (III), представляет собой:



где γ равно целому числу от 1 до 10, например, γ имеет значение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и А представляет собой указанное выше антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с CLDN 18.2 человека.

В некоторых вариантах осуществления ADC, представленный формулой (III), представлен следующей формулой:



где γ равно целому числу от 1 до 10, например, γ имеет значение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10, и А представляет собой 2С6.9-hz21.

Настоящее изобретение также обеспечивает композицию, содержащую один или более указанных выше конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC), молярное

отношение (значение DAR) фрагмента биоактивной молекулы (т.е. D в формуле (I)) к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с CLDN18.2 (т.е. A в формуле (I)) в композиции представляет собой десятичное или целое число от 1 до 10 (например, десятичное или целое число от 1 до 8, такое как 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,79, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 6,95, 7,0, 7,03, 7,1, 7,12, 7,2, 7,3, 7,40, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 или 8,0).

Значение DAR также известно как отношение лекарственное средство-антитело, которое относится к среднему количеству (D-L) фрагментов, присоединенных к каждому антителу, и может быть определено и рассчитано способами, известными в данной области. Например, на основании молекулярной массы конъюгированного антитела и (D-L), определенной методом ЖХ-МС, гидрофобной интерактивной хроматографии (HIC) и т.д., рассчитывали отношение легких цепей и тяжелых цепей, конъюгированных с различными количествами (D-L), и значение DAR рассчитывали из формулы $DAR = \frac{DAR_1 * n_1 + \dots + \text{легкая цепь } DAR_{n_1} * n_1}{DAR_1 * n_1 + \dots + \text{тяжелая цепь } DAR_1 * n_1 + \dots + DAR_{n_2} * n_2} * 2$. В этой формуле DAR_{n_1} означает долю легких цепей, конъюгированных с n_1 (D-L), приходящихся на легкую цепь, и DAR_{n_2} означает долю тяжелых цепей, конъюгированных с n_2 (D-L), приходящихся на тяжелую цепь.

В некоторых вариантах осуществления композиция также включает указанное выше антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления композиция включает 2C6.9-TL001. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой 2C6.9-TL001.

В некоторых вариантах осуществления композиция включает 2C6.9-TL002. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой 2C6.9-TL002.

В некоторых вариантах осуществления композиция включает 2C6.9-TL003. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой 2C6.9-TL003.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению могут быть дериватизированы, например, связаны с другой молекулой (например, другим полипептидом или белком). Как правило, дериватизация (например, мечение) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента не оказывает отрицательного влияния на его связывание с CLDN 18.2 (в частности, с CLDN 18.2 человека). Таким образом, также предполагается, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению включает такие дериватизированные формы.

Один тип дериватизированного антитела (например, биспецифическое антитело) получают путем перекрестного связывания двух или более антител (одного и того же типа или разных типов). Способы для получения биспецифических антител хорошо известны в данной области, и их примеры включают, но не ограничиваются этим, химическое перекрестное связывание, клеточную инженерию (межвидовую гибридому) или генную инженерию.

Другим типом дериватизированного антитела является меченое антитело.

Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению лигируют с детектируемой меткой. Детектируемая метка по настоящему изобретению может представлять собой любое вещество, определяемое при помощи флуоресценции, спектроскопическими, фотохимическими, биохимическими, иммунологическими, электрическими, оптическими или химическими методами. Такие метки хорошо известны в данной области, примеры которых включают, но не ограничиваются этим, ферменты (например, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, бета-галактозидазу, уреазу, глюкооксидазу и т.д.), радионуклиды (например, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C или ^{32}P), флуоресцентные красители (например, флуоресцеинизотиоцианат (FITC), флуоресцеин, тетраметилродамин изотиоцианат (TRITC), фикоэритрин (PE), тexasский красный, родамин, квантовые точки или производные цианинового красителя (например, Cy7, Alexa 750), сложные эфиры акридиния, магнитные шарики (например, Dynabeads®), калориметрические метки, такие как коллоиды, золотые или тонированные стеклянные или пластиковые (например, полистирольные, полипропиленовые, латексные и т.д.) шарики, и биотин для связывания с описанной выше меткой модифицированным авидином (например, стрептавидином). Патенты, в которых описано использование таких маркеров, включают, но не ограничиваются этим, патенты США №№ 3817837; 3850752; 3939350; 3996345; 4277437; 4275149, и 4366241 (каждый включен в настоящую заявку посредством ссылки). Детектируемая метка, как описано выше, может быть обнаружена способами, известными в данной области. Например, радиоактивную метку можно обнаружить с использованием фотопленки или сцинтилляционного счетчика, а флуоресцентную метку можно обнаружить при помощи фотодетектора для детекции испускаемого света. Ферментные метки обычно обнаруживаются путем обеспечения субстрата для фермента и детекции продукта реакции, образующегося при действии фермента на субстрат, а термометка обнаруживается путем простой визуализации окрашенной метки. В некоторых вариантах осуществления такие маркеры могут быть адаптированы для использования в иммунологических анализах (например, иммуноферментных анализах, радиоиммуноанализах, флуоресцентных иммуноанализах, хемилюминесцентных иммуноанализах и т.д.). В некоторых вариантах осуществления детектируемая метка, как описано выше, может быть связана с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению посредством линкера различной длины для снижения потенциальных стерических затруднений.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащиеся в конъюгате антитело-лекарственное средство (ADC) по настоящему изобретению, представляют собой одно или более из указанных выше дериватизированных антител или их антигенсвязывающих фрагментов.

Способы лечения и фармацевтические композиции

В другом аспекте настоящее изобретение также обеспечивает фармацевтическую композицию.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает

один или более из указанных выше конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) или композиций.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления фармацевтическая композиция также включает фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно включает другие ингредиенты с противоопухолевой активностью. В некоторых вариантах осуществления ADC или композиция и другие ингредиенты с противоопухолевой активностью находятся в одной и той же стандартной лекарственной форме или в разных стандартных лекарственных формах. Поэтому ADC или композицию по настоящему изобретению и другие ингредиенты с противоопухолевой активностью можно вводить одновременно, отдельно или последовательно.

В некоторых вариантах осуществления другие ингредиенты с противоопухолевой активностью представляют собой биоактивные полипептиды или их активные фрагменты, или химиотерапевтические средства. В некоторых вариантах осуществления биоактивный полипептид выбран из ингибиторов иммунных контрольных точек (антитело к PD-1, антитело к PD-L1, антитело к CTLA-4, антитело к LAG-3 и т.д.) или цитокинов (интерферон, IL-2, IL-15, GM-CSF, IL-7, IL-12, IL-18, IL-21 и т.д.). В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой одно или более средств, выбранных из эпирубина, оксалиплатина, капецитабина, 5-фторурацила, фолиновой кислоты, паклитаксела и альбумин-связанного паклитаксела. В некоторых вариантах осуществления другие ингредиенты с противоопухолевой активностью представляют собой комбинацию эпирубина, оксалиплатина и 5-фторурацила или комбинацию оксалиплатина, лейковорина и 5-фторурацила.

В другом аспекте, когда их вводят субъекту, ADC или композиция в фармацевтической композиции по настоящему изобретению являются достаточными для:

- (a) индукции апоптоза опухолевых клеток (особенно клеток рака желудка, таких как клетки аденокарциномы желудка);
- (b) ингибирования пролиферации опухолевых клеток (особенно клеток рака желудка, таких как клетки аденокарциномы желудка);
- (c) индукции и/или повышения комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC);
- (d) индукции и/или повышения антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC);
- (e) ингибирования экспрессии и активации CLDN18.2;
- (f) ингибирования CLDN18.2-опосредованного клеточного сигнального пути; или
- (g) любой комбинации (a) - (f).

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает применение конъюгата антитело-лекарственное средство, композиции или фармацевтической композиции для получения лекарственного средства для профилактики и/или лечения и/или адъювантной терапии опухолей.

В некоторых вариантах осуществления опухоль выбрана из солидных опухолей,

гематологических злокачественных заболеваний, и метастатических, рефрактерных или рецидивирующих раковых поражений.

В некоторых вариантах осуществления опухоль или рак выбраны из группы, состоящей из рака пищевода, рака желудочно-кишечного тракта, аденокарциномы желудка, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, колоректального рака, рака почки, рака легкого (например, немелкоклеточного рака легкого, NSCLC), рака печени, рака желудка, аденокарциномы пищеводно-желудочного перехода (GEJ), рака головы и шеи, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака матки, рака шейки матки, рака яичника, рака предстательной железы, тестикулярного рака, герминогенной опухоли, рака кости, рака кожи, рака тимуса, холангиокарциномы, рака желчного пузыря, меланомы, мезотелиомы, лимфомы, миеломы (например, множественной миеломы), саркомы, глиобластомы и лейкоза.

В некоторых вариантах осуществления опухоль выбрана из рака желудка, аденокарциномы желудка, аденокарциномы пищеводно-желудочного перехода (GEJ), рака пищевода, рака желудочно-кишечного тракта, рака поджелудочной железы и рака легкого (например, NSCLC).

В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой рак желудка, аденокарциному желудка или аденокарциному пищеводно-желудочного перехода (GEJ), такую как местнораспространенная неоперабельная или метастатическая опухоль, представляющая собой рак желудка, аденокарциному желудка или аденокарциному пищеводно-желудочного перехода (GEJ).

В некоторых вариантах осуществления опухоль является CLDN18.2-положительной и, кроме того, опухоль является HER2-отрицательной.

В некоторых вариантах осуществления опухоль является HER2-отрицательной.

В другом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ профилактики и/или лечения опухоли у субъекта. Еще в одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ задержки прогрессирования опухоли у субъекта. Еще в одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ уменьшения или ингибирования рецидива опухоли у субъекта. Способ включает стадию введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества конъюгата антитело-лекарственное средство, композиции или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления способ, описанный выше, дополнительно включает стадию применения второй терапии для субъекта, где вторая терапия выбрана из группы, состоящей из хирургической операции, химиотерапии, лучевой терапии, иммунотерапии, генной терапии, ДНК терапии, РНК терапии, нанотерапии, вирусной терапии, адъювантной терапии и любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления вторую терапию можно применять отдельно или в комбинации со способом, описанным выше; или вторую терапию можно применять отдельно, в комбинации, одновременно или последовательно со способом, описанным выше.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия представляет собой химиотерапию. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство выбрано из одного или более из эпирубина, оксалиплатина, капецитабина, 5-фторурацила, фолиновой кислоты, паклитаксела и альбумин-связанного паклитаксела. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой комбинацию эпирубина, оксалиплатина и 5-фторурацила или комбинацию оксалиплатина, лейковорина и 5-фторурацила. В некоторых вариантах осуществления комбинированная схема введения оксалиплатина, лейковорина и 5-фторурацила выбрана из FOLFOX4, FOLFOX6 или mFOLFOX6.

В некоторых вариантах осуществления вторая терапия представляет собой иммунотерапию. В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство для иммунотерапии выбрано из ингибиторов иммунных контрольных точек (например, антитело к PD-1, антитело к PD-L1, антитело к CTLA-4 и антитело к LAG-3) или цитокинов (например, interference Vegetarian, IL-2, IL-15, GM-CSF, IL-7, IL-12, IL-18 и IL-21).

В некоторых вариантах осуществления опухоль выбрана из солидных опухолей, гематологических злокачественных заболеваний и метастатических, рефрактерных или рецидивирующих раковых поражений.

В некоторых вариантах осуществления опухоль или рак выбраны из группы, состоящей из рака пищевода, рака желудочно-кишечного тракта, аденокарциномы желудка, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, колоректального рака, рака почки, рака легкого (например, NSCLC), рака печени, рака желудка, аденокарциномы пищеводно-желудочного перехода (GEJ), рака головы и шеи, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака матки, рака шейки матки, рака яичника, рака предстательной железы, тестикулярного рака, герминогенной опухоли, рака кости, рака кожи, рака тимуса, холангиокарциномы, рака желчного пузыря, меланомы, мезотелиомы, лимфомы, миеломы (например, множественной миеломы), саркомы, глиобластомы и лейкоза.

В некоторых вариантах осуществления опухоль выбрана из рака желудка, аденокарциномы желудка, аденокарциномы пищеводно-желудочного перехода (GEJ), рака пищевода, рака желудочно-кишечного тракта, рака поджелудочной железы и рака легкого (например, NSCLC).

В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой рак желудка, аденокарциному желудка или аденокарциному пищеводно-желудочного перехода (GEJ), такую как местнораспространенную неоперабельную или метастатическую опухоль, представляющую собой рак желудка, аденокарциному желудка или аденокарциному пищеводно-желудочного перехода (GEJ).

В некоторых вариантах осуществления опухоль является CLDN18.2-положительной и, кроме того, опухоль является HER2-отрицательной.

В некоторых вариантах осуществления опухоль является HER2-отрицательной.

ADC, композицию или фармацевтическую композицию по настоящему

изобретению можно сформулировать в виде любых лекарственных форм, известных в области медицины, таких как таблетки, пилюли, суспензии, эмульсии, растворы, гели, капсулы, порошки, гранулы, эликсиры, леденцы, суппозитории, инъекции (включая инъекции, стерильный порошок для инъекций и концентрированный раствор для инъекций), формы для ингаляции, спреи и т.п. Предпочтительная лекарственная форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Фармацевтическая композиция по изобретению должна быть стерильной и стабильной в условиях производства и хранения. Предпочтительной фармацевтической формой является инъекция. Инъекция может представлять собой стерильный инъекционный раствор. Например, для получения стерильного раствора для инъекций можно использовать следующие способы: необходимую дозу ADC или композиции диспергируют в подходящем носителе, необязательно с другими желаемыми ингредиентами (включая, но не ограничиваясь этим, агент, регулирующий pH, поверхностно-активное вещество, адъювант, агент для усиления ионной силы, изотонический агент, консервант, разбавитель или любую их комбинацию) с последующей стерилизацией фильтрованием. Кроме того, стерильный раствор для инъекций можно использовать для получения стерильного лиофилизированного порошка (например, путем вакуумной сушки или лиофилизации) для облегчения хранения и применения. Стерильный лиофилизированный порошок перед использованием можно диспергировать в подходящем носителе, таком как стерильная апирогенная вода.

Кроме того, ADC по настоящему изобретению может присутствовать в фармацевтической композиции в виде стандартной дозы для облегчения введения.

ADC, композицию или фармацевтическую композицию по изобретению можно вводить любым подходящим способом, известным в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, пероральный, буккальный, сублингвальный, внутриглазной, местный, парентеральный, ректальный, интратекальный, интрацистернальный, введение в паховую область, интравезикальный, местное нанесение (например, порошок, мазь или капли) или назальный путь. Однако для многих терапевтических применений предпочтительным путем/способом введения является парентеральный (такой как внутривенный, подкожный, интраперитонеальный, внутримышечный). Специалистам в данной области техники будет понятно, что путь и/или способ введения будут варьироваться в зависимости от намеченной цели. В предпочтительном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, фармацевтическую композицию по изобретению вводят путем внутривенной инфузии или инъекции.

Фармацевтические композиции по изобретению могут включать «терапевтически эффективную дозу» или «профилактически эффективную дозу» ADC или композиции по изобретению. «Профилактически эффективная доза» означает количество, достаточное для предотвращения, ингибирования или задержки начала заболевания. «Терапевтически эффективное количество» означает количество, достаточное для излечения или, по меньшей мере, частичного ингибирования заболевания и его осложнений у пациента, уже

страдающего заболеванием. Терапевтически эффективная доза ADC или композиции по настоящему изобретению может варьироваться в зависимости от таких факторов, как тяжесть заболевания, которое необходимо лечить, общее состояние собственной иммунной системы пациента, общее состояние пациента, такое как возраст, масса тела и пол, и введение лекарственного средства, а также других лечений для одновременного введения и т.п.

В настоящем изобретении дозовый режим может быть скорректирован для достижения оптимального предполагаемого ответа (такого как терапевтический или профилактический ответ). Например, введение может быть однократным, можно осуществлять введение несколько раз в течение определенного периода времени или можно осуществлять введение в пропорционально уменьшенной или увеличенной дозе по мере необходимости при лечении.

Типичный неограничивающий диапазон терапевтически или профилактически эффективных доз ADC или композиции по изобретению составляет от 0,02 до 100 мг/кг, например от 0,1 до 100 мг/кг, от 0,1 до 50 мг/кг или от 1 до 50 мг/кг. Следует отметить, что дозировка может варьироваться в зависимости от типа и тяжести состояния, подлежащего лечению. Кроме того, специалистам в данной области техники будет понятно, что для любого конкретного пациента конкретный дозовый режим должен корректироваться с течением времени в соответствии с потребностями пациента и профессиональной оценкой врача; приведенные диапазоны доз предназначены только для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения применения или диапазона фармацевтических композиций по изобретению.

В настоящем изобретении субъектом может быть млекопитающее, например человек.

Аббревиатура

CDR	Определяющая комплементарность область иммуноглобулинов
FR	Каркасная область антитела: содержащая аминокислотные остатки в вариабельной области антитела, кроме CDR
VH	Вариабельной области тяжелой цепи антитела
VL	Вариабельной области легкой цепи антитела
IgG	Иммуноглобулин G
AbM	Определение AbM CDR основано на исследовательской работе Martin (Martin ACR, Cheetham JC, Rees AR (1989) Modelling antibody hypervariable loops: A combined algorithm. Proc Natl Acad Sci USA 86:9268-9272), этот способ определения объединяет частичные определения по Kabat и Chothia.
Kabat	Система сравнения и нумерации иммуноглобулинов, предложенная Elvin A. Kabat (см., например, Kabat et al., Sequences of Proteins of

Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991)

Chothia	Система нумерации иммуноглобулинов, предложенная Chothia et al., которая представляет собой классическое правило для идентификации границ CDR областей на основании локализации структурной петлевой области. (см., например, Chothia & Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al. (1989) Nature 342:878-883)
IMGT	Система нумерации, основанная на международной информационной системе ImMunoGeneTics® (IMGT), предложенной Lefranc et al., см., Lefranc et al., Dev. Comparat. Immunol. 27:55-77, 2003
mAb	Моноклональное антитело
EC50	Концентрация, при которой достигается 50% эффективности или связывания
HRP	Пероксидаза хрена
CDR-H1	Определяющая комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи
CDR-H2	Определяющая комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи
CDR-H3	Определяющая комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи
CDR-L1	Определяющая комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи
CDR-L2	Определяющая комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи
CDR-L3	Определяющая комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи

В настоящем изобретении, если не указано иное, используемые научные и технические термины имеют значения, обычно понимаемые специалистами в данной области. Кроме того, лабораторные процедуры, связанные с культивированием клеток, биохимией, химией нуклеиновых кислот, иммунологией, используемые в настоящем изобретении, все являются рутинными стадиями, широко используемыми в соответствующих областях. В то же время, для лучшего понимания настоящего изобретения определения и объяснения соответствующих терминов представлены ниже.

В контексте настоящей заявки термины "ADC (конъюгат антитело-лекарственное средство)" или "конъюгат" являются взаимозаменяемыми и относятся к веществу, полученному путем конъюгации биоактивной молекулы с антителом через линкер.

Линкер может быть связан с антителом через различные химические связи. Например, в некоторых вариантах осуществления линкер присоединяется путем образования тиоэфирной связи с сульфгидрильной группой антитела. В структурных формулах некоторых конкретных молекул ADC (таких как молекулы ADC 2C6.9-TL001, 2C6.9-TL002 или 2C6.9-TL003) -S- просто представляет собой тиоэфирную связь, образованную линкером и сульфгидрильной группой антитела, и это не значит, что -S- является частью линкера.

Структурная формула ADC в настоящей заявке может быть представлена как $(D-L)_\gamma-A$, где D представляет собой биоактивный молекулярный фрагмент; L представляет собой линкер; A представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с CLDN 18.2 человека; γ , который относится к количеству (D-L), присоединенных к каждой молекуле антитела, выбран из целого числа от 1 до 10, такого как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Однако в процессе получения ADC каждая молекула антитела может связываться с различными количествами (D-L). Поэтому продукт ADC, как правило, представляет собой композицию антител, связанных с различными количествами (D-L). На практике, DAR часто используется для представления среднего количества (D-L), связанных с антителом.

В контексте настоящей заявки термин "антитело" относится к молекуле иммуноглобулина, обычно состоящей из двух пар полипептидных цепей (каждая пара имеет легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC)). Легкие цепи антител могут быть классифицированы как κ (каппа) и λ (лямбда) легкие цепи. Тяжелые цепи могут быть классифицированы как μ , δ , γ , α или ϵ тяжелые цепи, и изоотипы антитела поэтому определены как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. В легких и тяжелых цепях переменные и константные области соединены "J" областью из около 12 или более аминокислот, и тяжелая цепь также включает "D" область из около 3 или более аминокислот. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (CH). Константная область тяжелой цепи состоит из 3 доменов (CH1, CH2 и CH3). Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Константная область легкой цепи состоит из одного домена CL. Константные домены не вовлечены непосредственно в связывание антител и антигенов, но проявляют различные эффекторные функции, такие как опосредование связывания иммуноглобулинов с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки (например, эффекторные клетки) иммунной системы и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. VH и VL области также можно подразделить на гиперпеременные области (называемые определяющими комплементарность областями (CDR)), перемежающиеся с более консервативными областями (называемыми каркасными областями (FR)). Каждая VH и VL состоит из 3 CDR и 4 FR, расположенными в следующем порядке от амино-конца к карбокси-концу: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области (VH и VL) каждой пары тяжелой цепи/легкой цепи образуют антигенсвязывающие сайты, соответственно.

Назначение аминокислот в каждой области или домене может быть в соответствии с определением Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), или Chothia & Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia et al. (1989) *Nature* 342:878-883, или AbM, на основании соответствующего исследования Martin (Martin ACR, Cheetham JC, Rees AR (1989) *Modelling antibody hypervariable loops: A combined algorithm. Proc Natl Acad Sci USA* 86:9268-9272).

В этом контексте, если из контекста явно не следует иное, термин "антитело" включает не только интактное антитело, но также и антигенсвязывающие фрагменты антитела.

В контексте настоящей заявки термин "определяющая комплементарность область", или "CDR", относится к аминокислотным остаткам в вариабельной области антитела, которые ответственны за связывание антигена. Точные границы этих аминокислотных остатков могут быть определены в соответствии с различными системами нумерации, известными в данной области, например, в соответствии с системой нумерации Kabat (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991), системой нумерации Chothia (Chothia & Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia et al. (1989) *Nature* 342:878-883), системой нумерации IMGT (Lefranc et al., *Dev. Comparat. Immunol.* 27:55-77, 2003) или определением на основании соответствующего исследования Martin (Martin ACR, Cheetham JC, Rees AR (1989) *Modelling antibody hypervariable loops: A combined algorithm. Proc Natl Acad Sci USA* 86:9268-9272), где объединены части определений Kabat и Chothia, и такой способ был впервые использован в Оксфордской программе молекулярного моделирования антител (Martin AC R. *Protein sequence and structure analysis of antibody variable domains [M] //Antibody engineering. Springer, Berlin, Heidelberg, 2010: 33-51.*). Для данного антитела специалисты в данной области легко смогут идентифицировать CDR, определенные в соответствии с каждой системой нумерации. Кроме того, соответствие между разными системами нумерации хорошо известно специалистам в данной области (например, см. Lefranc et al., *Dev. Comparat. Immunol.* 27:55-77, 2003).

CDR, содержащиеся в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте по настоящему изобретению, можно определить в соответствии с различными системами нумерации, известными в данной области. В некоторых вариантах осуществления CDR, содержащиеся в антителе или его антигенсвязывающем фрагменте по настоящему изобретению, предпочтительно определяют в соответствии с системой нумерации Kabat, Chothia, IMGT или AbM.

В контексте настоящей заявки термин остатки "каркасной области" или "FR" относится к аминокислотным остаткам в вариабельной области антитела, отличным от остатков CDR, определенных выше.

В контексте настоящей заявки термин "антигенсвязывающий фрагмент" антитела относится к полипептиду фрагмента антитела, такому как полипептид фрагмента

полноразмерного антитела, который сохраняет способность к специфическому связыванию с тем же самым антигеном, с которым связывается полноразмерное антитело, и/или конкурирует с полноразмерным антителом за специфическое связывание с антигеном, который также называется "антигенсвязывающей частью". См., в общем, *Fundamental Immunology*, Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd edition, Raven Press, NY (1989)), который включен в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте для всех целей. Для получения антигенсвязывающего фрагмента антитела можно использовать технологию рекомбинантной ДНК или ферментативное, или химическое расщепление интактного антитела. Неограничивающие примеры антигенсвязывающего фрагмента включают фрагмент Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, dAb и определяющую комплементарность область (CDR), одноцепочечное антитело (например, scFv), химерное антитело, диатело, линейное антитело, наноантитело (технология от Domantis), доменное антитело (технология от Ablynx) и такие полипептиды, которые содержат по меньшей мере часть антитела, которая является достаточной для придания полипептиду специфической антигенсвязывающей способности. Обзор сконструированных вариантов антител см. в Holliger et al., 2005; *Nat Biotechnol*, 23:1126-1136.

В контексте настоящей заявки термин "полноразмерное антитело" относится к антителу, состоящему из двух "полноразмерных тяжелых цепей" или "тяжелых цепей" и двух "полноразмерных легких цепей" или "легких цепей", где "полноразмерная тяжелая цепь" или "тяжелая цепь" относится к полипептидной цепи, которая состоит из варибельной области тяжелой цепи (VH), домена CH1 константной области тяжелой цепи, шарнирной области (HR), домена CH2 константной области тяжелой цепи и домена CH3 константной области тяжелой цепи, в направлении от N-конца к C-концу; и, когда полноразмерное антитело имеет IgE изотип, оно необязательно также включает домен CH4 константной области тяжелой цепи. Предпочтительно "полноразмерная тяжелая цепь" представляет собой полипептидную цепь, состоящую из, в направлении от N-конца к C-концу, VH, CH1, HR, CH2 и CH3. "Полноразмерная легкая цепь" или "легкая цепь" представляет собой полипептидную цепь, состоящую из, в направлении от N-конца к C-концу, варибельной области легкой цепи (VL) и константной области легкой цепи (CL). Указанные две пары цепей полноразмерного антитела соединены дисульфидной связью между CL и CH1, и дисульфидной связью между HR двух полноразмерных тяжелых цепей. Полноразмерное антитело по настоящему изобретению может происходить от одного вида, такого как человек; оно также может представлять собой химерное антитело или гуманизированное антитело. Полноразмерное антитело по настоящему изобретению включает два антигенсвязывающих сайта, образованных парой VH и VL соответственно, и эти два антигенсвязывающих сайта специфически распознают/связывают один и тот же антиген.

В контексте настоящей заявки термин "Fd фрагмент" относится к фрагменту антитела, состоящему из VH и CH1 доменов; термин "dAb фрагмент" относится к фрагменту антитела, состоящему из VH доменов (Ward et al., *Nature* 341:544 546 (1989));

термин "Fab фрагмент" относится к фрагменту антитела, состоящему из VL, VH, CL и CH1 доменов; термин "F(ab')₂ фрагмент" относится к фрагменту антитела, содержащему два Fab фрагмента, связанных дисульфидным мостиком шарнирной области; термин "Fab' фрагмент" относится к фрагменту, полученному восстановлением дисульфидной связи, соединяющей два фрагмента тяжелой цепи в F(ab')₂ фрагменте, который состоит из интактной легкой цепи и Fd фрагмента тяжелой цепи (состоящего из VH и CH1 доменов).

В контексте настоящей заявки термин "Fv фрагмент" относится к фрагменту антитела, состоящему из VL и VH доменов одного плеча антитела. Fv фрагмент, как правило, считается наименьшим фрагментом антитела, который может образовывать полный антигенсвязывающий сайт. Как правило, считается, что шесть CDR могут придавать антителу антигенсвязывающую специфичность. Однако даже вариабельная область (например, Fd фрагмент, который содержит только три антиген-специфических CDR) может распознавать и связывать антиген, хотя ее аффинность может быть ниже, чем у полного сайта связывания.

В контексте настоящей заявки термин "Fc фрагмент" относится к фрагменту антитела, образованному с второй и третьей константными областями первой тяжелой цепи и второй и третьей константными областями второй тяжелой цепи антитела, которые связаны дисульфидной связью. Fc фрагмент антитела имеет множество различных функций, но не участвует в связывании антигена.

В контексте настоящей заявки термин "scFv" относится к одной полипептидной цепи, содержащей VL и VH домены, где VL и VH соединены линкером (см., например, Bird et al., *Science* 242:423-426 (1988); Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988); и Pluckthun, *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Volume 113*, edited by Roseburg and Moore, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)). Такая scFv молекула может иметь общую структуру: NH₂-VL-линкер-VH-COOH или NH₂-VH-линкер-VL-COOH. Подходящий линкер предшествующего уровня техники состоит из повторяющейся GGGGS аминокислотной последовательности или ее вариантов. Например, можно использовать линкер, имеющий аминокислотную последовательность (GGGGS)₄, но также можно использовать ее варианты (Holliger et al. (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448). Другие линкеры, которые можно использовать в настоящем изобретении, описаны в Alfthan et al. (1995), *Protein Eng.* 8:725-731, Choi et al. (2001), *Eur. J. Immunol.* 31: 94-106, Hu et al. (1996), *Cancer Res.* 56:3055-3061, Kipriyanov et al. (1999), *J. Mol. Biol.* 293:41-56, и Roovers et al. (2001), *Cancer Immunol.* В некоторых случаях также может присутствовать дисульфидная связь между VH и VL в scFv. В контексте настоящей заявки термин "ди-scFv" относится к фрагменту антитела, образованному связыванием двух scFv.

В контексте настоящей заявки термин "диатело" означает, что его VH и VL домены экспрессированы на одной полипептидной цепи, но используемый линкер слишком короткий, чтобы можно было обеспечить возможность спаривания между двумя доменами одной и той же цепи, таким образом, домены вынуждены спариваться с

комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих сайта (см., например, Holliger P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993), и Poljak RJ et al., Structure 2:1121-1123 (1994)).

Каждый из указанных выше фрагментов антител сохраняет способность к специфическому связыванию с тем же антигеном, с которым связывается полноразмерное антитело, и/или к конкурированию с полноразмерным антителом за специфическое связывание с антигеном.

В контексте настоящей заявки "биспецифическое антитело" относится к конъюгату, образованному первым антителом (фрагментом) и вторым антителом (фрагментом) или миметиками антител через связывающее плечо. Способ связывания включает, но не ограничивается этим, химическую реакцию, слияние генов, слияние белков, слияние полипептидов и ферментативную реакцию. «Мультиспецифическое антитело» включает, например, триспецифическое антитело и тетраспецифическое антитело, где первое представляет собой антитело с тремя различными антигенсвязывающими специфичностями, а второе представляет собой антитело с четырьмя различными антигенсвязывающими специфичностями.

В контексте настоящей заявки термин «миметики антител» относится к веществам, которые специфически связываются с антигеном, как это делает антитело, но не имеют структуры антитела. Обычно это искусственные пептиды или белки с молекулярной массой примерно от 3 до 20 кДа, такие как белок с анкириновым повтором (DARPin) и финомер. Сконструированный белок с анкириновым повтором (DARPin) связан с антителом IgG, фрагментом антитела scFv-Fc или их комбинацией, как в CN104341529A. Анти-IL-17a финомер связывается с анти-IL-6R антителом, как в WO 2015141862A1.

В этом контексте антигенсвязывающий фрагмент (например, указанный выше фрагмент антитела) антитела можно получить из данного антитела (например, антитела по настоящему изобретению) с использованием общепринятого метода, известного специалистам в данной области (например, технологии рекомбинантной ДНК или методов ферментативной, или химической фрагментации), и можно осуществить скрининг на его специфичность таким же образом, как осуществляют скрининг интактных антител.

В контексте настоящей заявки термины «моноклональное антитело» и «mAb» имеют одинаковое значение и используются взаимозаменяемо и относятся к антителу или фрагменту антитела, полученному из группы высоко гомологичных молекул антител, то есть группы идентичных молекул антител, за исключением естественных мутаций, которые могут возникать спонтанно. Моноклональное антитело обладает высокой специфичностью в отношении одного эпитопа на антигене. Поликлональные антитела указаны относительно моноклонального антитела, и они обычно содержат по меньшей мере два или более разных антител, и эти разные антитела обычно распознают разные эпитопы на антигене. Кроме того, определение «моноклональный» просто указывает на характер антитела как полученного из высокоомогенной популяции антител, и это не должно быть истолковано как требующее получения антитела каким-либо конкретным

способом.

Моноклональное антитело по настоящему изобретению может быть получено различными методами, такими как гибридная технология (см., например, Kohler et al. *Nature*, 256:495, 1975), технология рекомбинантной ДНК (см., например, патент США заявка 4816567) или технология фаговых библиотек антител (см., например, Clackson et al. *Nature* 352:624-628, 1991, или Marks et al. *J. Mol. Biol.* 222:581-597, 1991).

Например, моноклональные антитела можно получить следующим образом. Мышей или других подходящих животных-хозяев сначала иммунизируют иммуногеном (при необходимости с добавлением адьюванта). Способ введения иммуногена или адьюванта обычно представляет собой многоточечную подкожную инъекцию или интраперитонеальную инъекцию. Иммуноген может быть предварительно связан с некоторыми известными белками, такими как сывороточный альбумин или соевые ингибиторы трипсина, для повышения иммуногенности антигена у хозяина. Адьювант может представлять собой адьювант Фрейнда или MPL-TDM или т.п. После иммунизации животного организм будет продуцировать лимфоциты, которые секретируют антитела, специфически связывающиеся с иммуногеном. Кроме того, лимфоциты также могут быть получены путем иммунизации *in vitro*. Представляющие интерес лимфоциты собирают и сливают с клетками миеломы с использованием подходящего агента слияния, такого как ПЭГ, для получения гибридных клеток (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103, Academic Press, 1996). Гибридные клетки, полученные как описано выше, могут быть инокулированы в подходящую культуральную среду, которая предпочтительно содержит одно или несколько веществ, способных ингибировать рост неслитых родительских клеток миеломы. Например, для родительских клеток миеломы, в которых отсутствует гипоксантингуанинфосфотрансфераза (HGPRT или HPRT), добавление гипоксантина, аминоптерина и тимина (среда HAT) к культуральной среде будет ингибировать рост HGPRT-дефектных клеток. Предпочтительные клетки миеломы должны иметь высокую скорость слияния, способность к стабильной секреции антител и чувствительность к культуральной среде HAT. Среди них мышьяная миелома является предпочтительной для миеломных клеток, например, происходящие из опухоли мыши штаммы MOP-21 или MC-11 (THE Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA) и SP-2/0 или X63-Ag8-653 клеточная линия (American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA). Кроме того, в исследованиях также сообщалось об использовании человеческих миеломных и человеческих-мышьяных гетерологичных миеломных клеточных линий для получения человеческих моноклональных антител (Kozbor, J. *Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987). Культуральную среду для выращивания гибридных клеток используют для детекции продукции моноклональных антител против специфических антигенов. Способы определения специфичности связывания моноклональных антител, продуцируемых гибридными клетками, включают, например, иммунопреципитацию или анализы связывания *in vitro*, такие как

радиоиммуноанализ (RIA), твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Например, аффинность моноклонального антитела можно определить с использованием анализа Скэтчарда, описанного в Munson et al., *Anal. Biochem.* 107: 220 (1980). После определения специфичности, аффинности и реактивности антитела, продуцируемого гибридомой, представляющий интерес клеточный штамм может быть субклонирован стандартным методом предельного разведения, описанным в Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103, Academic Press, 1996. Подходящей культуральной средой может быть DMEM или RPMI-1640 или подобная. Кроме того, гибридомные клетки можно также выращивать в организме животных в виде асцитных опухолей. Используя традиционные методы очистки иммуноглобулина, такие как агарозный гель с белком А, хроматография на гидроксипатите, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография, моноклональные антитела, секретируемые субклонированными клетками, могут быть выделены из культуральной среды, асцита или сыворотки.

Моноклональные антитела также могут быть получены рекомбинантными методами генной инженерии. Молекула ДНК, кодирующая гены тяжелой цепи и легкой цепи моноклонального антитела, может быть выделена из гибридомной клетки методом ПЦР-амплификации с использованием нуклеиновокислотного праймера, который специфически связывается с генами тяжелой и легкой цепи моноклонального антитела. Полученную молекулу ДНК встраивают в вектор экспрессии, а затем трансфицируют в клетку-хозяина (такую как клетки *E. coli*, клетки COS, клетки CHO или другие миеломные клетки, которые не продуцируют иммуноглобулин) и культивируют в соответствующих условиях с получением таким образом желаемого рекомбинантного антитела.

Антитело может быть очищено хорошо известными способами, например, аффинной хроматографией с использованием белка А или белка G. Впоследствии, или альтернативно, специфический антиген (молекула-мишень, распознаваемая антителом) или его антигенный эпитоп может быть иммобилизован на колонке, а иммуноспецифическое антитело может быть очищено иммуноаффинной хроматографией. Очистка иммуноглобулинов описана, например, в Wilkinson (*The Scientist*, опубликовано *The Scientist, Inc., Philadelphia Pa., Vol. 14, No. 8 (Apr. 17, 2000)*, pp. 25-28).

В контексте настоящей заявки термин «мышинное антитело» относится к антителу, которое получают путем слияния В-клеток иммунизированных мышей с клетками миеломы, отбора мышинных гибридных слитых клеток, которые могут неограниченно размножаться и секретировать антитело, с последующим скринингом, получением антитела и очисткой антитела; или к антителу, секретируемому плазматическими клетками, которое образуется в результате дифференцировки и пролиферации В-клеток после проникновения антигена в тело мыши. Для антител, продуцируемых при стимуляции специфическим антигеном, продукция антител обусловлена взаимодействием различных иммунных клеток, вызванным вторжением антигена в организм человека, что приводит к дифференцировке и пролиферации В-клеток в плазматические клетки, которые могут продуцировать и секретировать антитело.

В контексте настоящей заявки термин «химерное антитело» относится к антителу, в котором часть его легкой и/или тяжелой цепи происходит из одного антитела (которое может происходить от определенного вида или принадлежать к определенному классу или подклассу антител), а другая часть легкой цепи и/или тяжелой цепи происходит из другого антитела (которое может быть получено от того же или другого вида или принадлежать к тому же или другому классу или подклассу антител), которое, тем не менее, все еще сохраняет активность связывания с представляющим интерес антигеном (USP 4816567, Cabilly et al.; Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Например, термин «химерное антитело» может включать антитело (например, человеческое-мышинное химерное антитело), в котором переменные области тяжелой и легкой цепи антитела происходят из первого антитела (например, мышинного антитела), в то время как переменные области тяжелой цепи и легкой цепи антитела происходят из второго антитела (например, человеческого антитела).

В контексте настоящей заявки термин «гуманизированное антитело» относится к генетически сконструированному нечеловеческому антителу, аминокислотная последовательность которого была модифицирована для повышения гомологии с последовательностью человеческого антитела. Как правило, все или часть CDR областей гуманизированного антитела происходят из нечеловеческого антитела (донорное антитело), а все или часть не-CDR-областей (например, FR-области переменной области и/или константная область) происходят из человеческого иммуноглобулина (рецепторное антитело). Гуманизированные антитела обычно сохраняют желаемые свойства донорного антитела, включая, но не ограничиваясь этим, антигенную специфичность, аффинность, реактивность, способность повышать активность иммунных клеток, способность усиливать иммунный ответ и т.п. Донорное антитело может представлять собой антитело, происходящее от мыши, крысы, кролика или примата, отличного от человека (например, яванского макака), обладающее желаемыми свойствами (например, антиген-специфичностью, аффинностью, реактивностью, способностью повышать активность иммунных клеток и/или усиливать иммунный ответ).

Гуманизированное антитело может не только сохранять ожидаемые свойства нечеловеческого донорного антитела (например, мышинного антитела), но также эффективно снижать иммуногенность нечеловеческого донорного антитела (например, мышинного антитела) у человека и, таким образом, является особенно выгодным. Однако из-за проблемы соответствия между CDR донорного антитела и FR рецепторного антитела ожидаемые свойства гуманизированного антитела (например, антигенная специфичность, аффинность, реактивность, способность улучшать активность иммунных клеток и/или способность усиливать иммунный ответ) обычно ниже, чем у нечеловеческого донорного антитела (например, мышинного антитела).

Поэтому, хотя исследователями в данной области было осуществлено углубленное исследование гуманизации антител, и был достигнут определенный прогресс (см., например, Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Reichmann et al., Nature, 332: 323-329

(1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992), и Clark, *Immunol. Today* 21: 397-402 (2000)), предшествующий уровень техники не предоставляет подробные указания как полностью гуманизировать донорное антитело, чтобы полученное гуманизированное антитело не только имело наивысшую степень гуманизации, но и максимально сохраняло ожидаемые свойства донорного антитела. Специалисты должны направить усилия на изучение, исследование и модификацию специфического донорского антитела, а также проделать большую творческую работу, чтобы получить гуманизированное антитело, которое не только обладает высокой степенью гуманизации (например, степенью гуманизации по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%), но также сохраняет ожидаемые свойства специфического донорного антитела.

В настоящем изобретении для того, чтобы гуманизированное антитело по возможности максимально сохраняло свойства (включая, например, антигенную специфичность, аффинность, реактивность, способность повышать активность иммунных клеток и/или способность усиливать иммунный ответ) донорного антитела, каркасная область (FR) гуманизированного антитела по настоящему изобретению может включать как аминокислотные остатки человеческого рецепторного антитела, так и аминокислотные остатки соответствующего нечеловеческого донорного антитела.

Гуманизированное антитело по настоящему изобретению можно получить на основе последовательности мышинового моноклонального антитела, полученного как описано выше. ДНК, кодирующая тяжелую и легкую цепи, может быть получена из целевой мышины гибридомы и сконструирована с использованием стандартных методов молекулярной биологии, чтобы она содержала немышиные (например, человеческие) последовательности иммуноглобулина.

Для получения химерного антитела переменную область мышинового иммуноглобулина можно связать с константной областью человеческого иммуноглобулина с использованием способа, известного в данной области (см., например, патент США № 4816567, Cabilly et al.). Например, ДНК, кодирующую VH, функционально связывают с другой молекулой ДНК, кодирующей константную область тяжелой цепи, с получением гена полноразмерной тяжелой цепи. Последовательность гена константной области тяжелой цепи человека известна в данной области (см., например, Kabat, EA et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), ДНК фрагмент, содержащий эти области, можно получить стандартным методом ПЦР амплификации. Константная область тяжелой цепи может представлять собой константную область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD, но, как правило, предпочтительно представляет собой константную область IgG1 или IgG4. Например, ДНК, кодирующую VL, функционально связывают с другой молекулой ДНК,

кодирующей константную область легкой цепи CL, с получением гена полноразмерной легкой цепи (а также гена легкой цепи Fab). Последовательность гена константной области легкой цепи человека известна в данной области (см., например, Kabat, EA et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), ДНК фрагмент, содержащий эти области, можно получить стандартным методом ПЦР амплификации. Константная область легкой цепи может представлять собой константную область κ или λ , но, как правило, предпочтительно представляет собой константную область κ .

Для получения гуманизованного антитела мышинные CDR области можно привить на человеческую каркасную последовательность с использованием любых способов, известных в данной области (см. патент США № 5225539, Winter; патенты США №№ 5530101, 5585089, 5693762 и 6180370, Queen et al.; и Lo, Benny, КС, редактор, в Antibody Engineering: Methods and Protocols, volume 248, Humana Press, New Jersey, 2004). Альтернативно, также можно использовать трансгенное животное, которое способно продуцировать полную библиотеку человеческих антител без продукции эндогенного иммуноглобулина после иммунизации. Например, сообщалось, что гомозиготная делеция гена области соединения тяжелой цепи антитела (JH) у химерных и имеющих мутацию зародышевой линии мышей приводит к полному ингибированию продукции эндогенных антител, и перенос набора генов иммуноглобулинов зародышевой линии человека таким мышам с мутацией зародышевой линии будет приводить к продукции человеческих антител при антигенной стимуляции (см., например, Jakobovits et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551; Jakobovits et al., 1993, Nature 362 : 255-258; Bruggermann et al., 1993, Year in Immunology 7: 33; and Duchosal et al., 1992, Nature 355: 258). Неограничивающие примеры вышеуказанного трансгенного животного включают мышей HuMAb (Medarex, Inc.), которые содержат минилокусы гена иммуноглобулина человека, кодирующие нереаранжированные последовательности тяжелых цепей (μ и γ) и легкой цепи κ иммуноглобулина человека, и целевую мутацию, которая инактивирует эндогенные локусы цепи μ и κ (см., например, Lonberg et al. (1994) Nature 368 (6474): 856-859); или "KM mouseTM", которая несет трансген тяжелой цепи человека и трансхромосому легкой цепи человека (см. патентную заявку WO 02/43478). Другие способы гуманизации антител включают технологию фагового дисплея (Hoogenboom et al., 1991, J. Mol. Biol. 227: 381; Marks et al., J. Mol. Biol. 1991, 222: 581-597; Vaughan et al., 1996, Nature Biotech 14: 309).

В контексте настоящей заявки термин «степень гуманизации» относится к показателю, используемому для оценки количества нечеловеческих аминокислотных остатков в гуманизованном антителе. Степень гуманизации гуманизованного антитела можно оценить, например, путем предсказания гомологии последовательности варибельной области с V-доменом человека с использованием DomainGapAlign веб-сайта IMGT.

В контексте настоящей заявки термин «гомологичное антитело» относится к

варианту антитела, в котором аминокислотные последовательности содержащихся в нем переменных областей тяжелой и легкой цепей гомологичны аминокислотной последовательности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, представленного в настоящей заявке, и вариант сохраняет желаемые функциональные свойства анти-CLDN18.2 антитела по настоящему изобретению.

Способы выравнивания последовательностей для сравнения хорошо известны в данной области. Различные процедуры и алгоритмы выравнивания описаны в: Smith TF and Waterman MS, *Adv. Appl. Math.*, 2:482, 1981; Higgins DG and Sharp PM, *CABIOS* 5:151, 1989. Altschul SF et al., *Nature Genet.*, 6:119, 1994 раскрывает подробные идеи для выравнивания последовательностей и вычислений гомологии.

В контексте настоящей заявки термин «специфическое связывание» относится к реакции неслучайного связывания между двумя молекулами, такой как реакция между антителом и антигеном, на который оно направлено. Сила или аффинность специфического связывающего взаимодействия может быть выражена как равновесная константа диссоциации (K_D) или полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}) взаимодействия.

Специфическое связывание между двумя молекулами можно определить с использованием методов, известных в данной области. Один метод включает измерение скорости образования и диссоциации комплекса антигенсвязывающий сайт/антиген. Как «константа скорости связывания» (k_a или k_{on}), так и «константа скорости диссоциации» (k_{dis} или k_{off}) могут быть рассчитаны по концентрации и фактической скорости ассоциации и диссоциации (см. Malmqvist M, *Nature*, 1993, 361: 186-187). Отношение k_{dis}/k_{on} равно константе диссоциации K_D (см. Davies et al., *Annual Rev Biochem*, 1990; 59: 439-473). Значения K_D , k_{on} и k_{dis} можно измерить любым эффективным способом. В некоторых вариантах осуществления константу диссоциации можно измерить методом биолюминесцентной интерферометрии (например, метод ForteBio Octet). Кроме того, константу диссоциации можно измерить методами поверхностного плазмонного резонанса (например, Biacore) или Kinexa.

В контексте настоящей заявки термин «идентичность» относится к степени соответствия между двумя полипептидами или между двумя нуклеиновыми кислотами. Когда две сравниваемые последовательности имеют одинаковую мономерную субъединицу основания или аминокислоты в определенном положении (например, каждая из двух молекул ДНК имеет аденин в определенном положении или два полипептида содержат лизин в определенном положении), две молекулы идентичны в этом положении. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для двух последовательностей, по отношению к общему количеству положений для сравнения $\times 100$. Например, если 6 из 10 положений двух последовательностей совпадают, эти две последовательности имеют идентичность 60%. Например, последовательности ДНК: CTGACT и CAGGTT имеют идентичность 50% (совпадают 3 из 6 положений). Как правило, сравнение двух последовательностей

осуществляют таким образом, чтобы получить максимальную идентичность. Такое выравнивание можно осуществить с использованием компьютерной программы, такой как программа Align (DNASTar, Inc.), которая основана на методе Needleman, et al. (J. Mol. Biol. 48:443-453, 1970). Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями также можно определить с использованием алгоритма E. Meyers и W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)), который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), используя таблицу весов замен остатков PAM120, штраф за длину гэпа=12 и штраф за гэн=4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определить с использованием алгоритма Needleman и Wunsch (J. Mol. Biol., 48:444-453 (1970)), который был включен в программу GAP в программном пакете GCG (доступном на <http://www.gcg.com>), с использованием либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250, штрафа за гэн 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штрафа за длину гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В контексте настоящей заявки термин "консервативная замена" означает аминокислотную замену, которая не оказывает отрицательного влияния или не изменяет ожидаемые свойства белка/полипептида, содержащего аминокислотную последовательность, и вариант антитела, полученный путем консервативной замены, сохраняет биологическую активность своей исходной последовательности, такую как специфическое связывание с CLDN 18.2. Например, консервативные замены могут быть введены стандартными методами, известными в данной области, такими как сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез. Консервативные аминокислотные замены включают замены, при которых аминокислотный остаток заменяется другим аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь, например, остаток, аналогичный физически или функционально (например, имеющий сходный размер, форму, заряд, химические свойства, включая способность к образованию ковалентной связи или водородной связи и т.д.) соответствующему аминокислотному остатку. В данной области определены семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи. Эти семейства включают аминокислоты, имеющие основные боковые цепи (например, лизин, аргинин и гистидин), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, валин, фенилаланин, метионин), бета-ветви боковых цепей (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Следовательно, предпочтительна замена соответствующего аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей. Способы идентификации консервативных замен аминокислот хорошо известны в данной области (см., например, Brummell et al., Biochem. 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi et al., Protein Eng. 12(10): 879-879, 884 (1999) и Burks et al. Proc. Natl Acad. Set USA 94: 412-417 (1997), которые включены в настоящую заявку посредством ссылки).

Двадцать стандартных аминокислот, используемых в настоящем изобретении, экспрессируют обычным образом. См., например, *Immunology-A Synthesis* (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)), который включен в настоящую заявку посредством ссылки. В настоящем раскрытии термины «полипептид» и «белок» имеют одинаковое значение и используются взаимозаменяемо. Также в настоящем изобретении аминокислоты обычно представлены однобуквенными и трехбуквенными аббревиатурами, известными в данной области техники. Например, аланин может быть представлен как А или Ala.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент" в контексте настоящей заявки относится к носителю и/или эксципиенту, который фармакологически и/или физиологически совместим с субъектом и активным ингредиентом, который хорошо известен в данной области (см., например, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, под редакцией Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995) и включает, но не ограничивается этим, агенты, регулирующие рН, поверхностно-активные вещества, адъюванты, усилители ионной силы, разбавители, агенты, поддерживающие осмотическое давление, вещества, замедляющие абсорбцию, консерванты. Например, агенты, регулирующие рН, включают, но не ограничиваются этим, фосфатные буферы. Поверхностно-активные вещества включают, но не ограничиваются этим, катионные, анионные или неионные поверхностно-активные вещества, такие как Tween-80. Усилители ионной силы включают, но не ограничиваются этим, хлорид натрия. Консерванты включают, но не ограничиваются этим, различные антибактериальные и противогрибковые агенты, такие как парабены, хлорбутанол, фенол, сорбиновая кислота и т.п. Агенты, поддерживающие осмотическое давление, включают, но не ограничиваются этим, сахара, NaCl и т.п. Агенты, замедляющие абсорбцию, включают, но не ограничиваются этим, моностеарат и желатин. Разбавители включают, но не ограничиваются этим, воду, водные буферы (такие как забуференный физиологический раствор), спирты и полиолы (такие как глицерин) и т.п. Консерванты включают, но не ограничиваются этим, различные антибактериальные и противогрибковые агенты, такие как тимеросал, 2-феноксизтанол, парабены, хлорбутанол, фенол, сорбиновая кислота и т.п. Стабилизаторы имеют значение, обычно понятное специалистам в данной области, которые могут стабилизировать желаемую активность активного ингредиента в лекарственном средстве, включая, но не ограничиваясь этим, глутамат натрия, желатин, SPGA, сахара (например, сорбит, маннит, крахмал, сахарозу, лактозу, декстран или глюкозу), аминокислоты (такие как глутаминовая кислота, глицин), белки (такие как сухая сыворотка, альбумин или казеин) или продукты их разложения (такие как гидролизат лактальбумина).

В контексте настоящей заявки термин "профилактика" относится к способу, осуществляемому для предотвращения или задержки возникновения заболевания, расстройства или симптома (например, опухоли, инфекции или аутоиммунного заболевания) у субъекта. В контексте настоящей заявки термин «лечение» относится к

способу, осуществляемому для получения благоприятного или желаемого клинического результата. Для целей настоящего изобретения благоприятный или желаемый клинический результат включает, но не ограничивается этим, облегчение симптомов, уменьшение распространенности заболевания, стабилизацию (т.е. отсутствие обострения) состояния заболевания, отсрочку или замедление развития болезни, улучшение или облегчение выраженности заболевания и облегчение симптома (частично или полностью), либо определяемого, либо неопределяемого. Кроме того, термин «лечение» может также относиться к увеличению периода выживания по сравнению с ожидаемым периодом выживания (без приема лечения).

В контексте настоящей заявки термин «субъект» относится к млекопитающим, таким как млекопитающие-приматы, такие как человек. В некоторых вариантах осуществления субъект (например, человек) имеет опухоль, инфекцию или аутоиммунное заболевание, или имеет риск развития вышеуказанных заболеваний.

В контексте настоящей заявки термин «эффективное количество» относится к количеству, достаточному для достижения или, по меньшей мере, частичного достижения желаемого эффекта. Например, эффективное количество для предотвращения заболевания (например, опухоли, инфекции или аутоиммунного заболевания) относится к количеству, достаточному для предотвращения, остановки или задержки возникновения заболевания (например, опухоли, инфекции или аутоиммунного заболевания); эффективное количество для лечения заболевания относится к количеству, достаточному для излечения или, по меньшей мере, частичного предотвращения заболевания и его осложнений у пациента, у которого уже имеется заболевание. Специалисты в данной области вполне могут определить такое эффективное количество. Например, эффективное количество для терапевтического применения будет зависеть от тяжести заболевания, подлежащего лечению, общего состояния собственной иммунной системы пациента, общего состояния пациента, такого как возраст, масса тела и пол, способа, которым осуществляют введение лекарственного средства, и одновременно вводимых других терапий и т.д.

В контексте настоящей заявки термин «иммунная клетка» включает клетки, которые имеют гемопоэтическое происхождение и играют роль в иммунном ответе, например, лимфоциты, такие как В-клетки и Т-клетки; природные киллерные клетки; миелоидные клетки, такие как моноциты, макрофаги, эозинофилы, тучные клетки, базофилы и гранулоциты.

В контексте настоящей заявки термин «иммунный ответ» относится к эффекту иммунных клеток (например, лимфоцитов, антигенпрезентирующих клеток, фагоцитов или гранулоцитов) и растворимых макромолекул (включая антитела, цитокины и комплементы), продуцируемых иммунными клетками или печенью, что приводит к селективному повреждению или разрушению инвазивных патогенов, клеток или тканей, инфицированных патогенами, раковых клеток или нормальных клеток или тканей человека на фоне аутоиммунного или патологического воспаления, или удалению их из организма. В настоящем изобретении термин «антиген-специфический Т-клеточный

ответ» относится к иммунному ответу, продуцируемому Т-клеткой, который возникает, когда Т-клетка стимулируется Т-клеточно-специфическим антигеном. Неограничивающие примеры ответа, продуцируемого Т-клетками при антиген-специфической стимуляции, включают пролиферацию Т-клеток и продукцию цитокина, такого как ИЛ-2.

В контексте настоящей заявки термин «эффекторная функция» относится к биологической активности, обусловленной Fc-областью антитела (Fc-областью природной последовательности или варианта аминокислотной последовательности), которая варьируется в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антител включают, но не ограничиваются этим, аффинность связывания с Fc-рецептором, антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC), комплементзависимую цитотоксичность (CDC), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP), отрицательную регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточных рецепторов), активацию В-клеток, секрецию цитокинов, время полужизни/клиренс антител и комплексов антиген-антитело и т.п. Способы изменения эффекторной функции антитела известны в данной области, например, путем введения мутации в Fc-область.

Термины «рак» и «опухоль» используются взаимозаменяемо и относятся к большой группе заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Нерегулируемое деление клеток может привести к образованию злокачественных опухолей или клеток, которые проникают в соседние ткани и могут метастазировать в отдаленные части тела через лимфатическую систему или кровотоки. Рак включает доброкачественные и злокачественные опухоли, а также спящие опухоли или микрометастазы. Рак также включает рак крови, особенно гематологические злокачественные новообразования.

Термин «гематологическое злокачественное новообразование» или «гематологическая опухоль» включает лимфому, лейкоз, миелому или лимфоидные злокачественные новообразования, а также рак селезенки и опухоли лимфатических узлов. Примеры лимфом включают В-клеточную лимфому и Т-клеточную лимфому. В-клеточная лимфома включает, например, лимфому Ходжкина. Т-клеточная лимфома включает, например, кожную Т-клеточную лимфому. Гематологические злокачественные новообразования также включают лейкоз, такой как вторичный лейкоз или острый лимфоцитарный лейкоз. Гематологические злокачественные новообразования также включают миелому (например, множественную миелому) и другие гематологические и/или связанные с В-клетками или Т-клетками виды рака.

В контексте настоящей заявки термин «фармацевтически приемлемый» означает, что когда саму молекулу, молекулярный фрагмент или композицию соответствующим образом вводят животному или человеку, они не вызывают неблагоприятных, аллергических или других нежелательных реакций. Конкретные примеры некоторых веществ, которые можно использовать в качестве фармацевтически приемлемого носителя или его компонента, включают сахара, такие как лактоза, крахмал, целлюлоза и их

производные, растительные масла, желатин, полиолы, такие как пропиленгликоль, альгиновую кислоту и т.п.

В этом контексте комбинированная терапия включает применение комбинаций ADC, или композиции, или фармацевтической композиции, охватываемой настоящим изобретением, с одним или несколькими терапевтическими средствами (например, химиотерапевтическими средствами) второй терапии или другими профилактическими или терапевтическими методами (например, лучевой терапией).

Примеры терапевтических средств для второй терапии могут включать химиотерапевтические средства (например, ингибиторы митоза), алкилирующие агенты (например, азотистый иприт), антиметаболиты (например, аналоги фолиевой кислоты), натуральные продукты (например, алкалоид барвинка), различные реагенты (например, платиновые координационные комплексы), гормоны и антагонисты (например, кортикостероиды надпочечников), иммуномодуляторы (например, бропиримин, Urjohn) и т.д. Другие противораковые лечения включают другие антитела, которые специфически нацелены на раковые клетки.

В этом типе комбинированной терапии различные терапевтические средства часто имеют различные взаимодополняющие механизмы действия, и комбинированная терапия может привести к синергетическому эффекту. Комбинированная терапия включает терапевтические средства, влияющие на иммунный ответ (например, усиливающие или активирующие ответ), и терапевтические средства, влияющие на (например, ингибирующие или уничтожающие) опухолевые/раковые клетки. Комбинированная терапия может снизить вероятность возникновения лекарственно-резистентных раковых клеток. Комбинированная терапия может позволить уменьшить дозу одного или более чем одного из средств, чтобы уменьшить или устранить неблагоприятный эффект, связанный с одним или более чем одним из средств. Такая комбинированная терапия может иметь синергетический терапевтический или профилактический эффект на потенциальное заболевание, расстройство или состояние.

В этом контексте «комбинация» включает терапевтические средства, которые можно вводить по отдельности, такие как отдельные композиции для отдельного введения (например, могут быть представлены в наборе), и терапевтические средства, которые можно вводить вместе в виде одной композиции (т.е. "комбинированной лекарственной формы"). В некоторых вариантах осуществления ADC, композицию или фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно вводить последовательно. В других вариантах осуществления их можно вводить одновременно. ADC по настоящему изобретению можно использовать в любой комбинации по меньшей мере с одним другим (активным) средством.

“HER2-отрицательный” означает отсутствие какого-либо существенного количества белков HER2 на клеточной поверхности, включая ИНС 1+ или ИНС 2+/FISH отрицательные, а также диапазон ИНС от 0 до 1+ и ИНС от 1+ до 2+.

В контексте настоящей заявки термин "галоген" включает фтор, хлор, бром и иод.

В контексте настоящей заявки термин "C₁₋₆ алкил" относится к линейному или разветвленному алкилу (группе), содержащему 1-6 атомов углерода, включая, например, "C₁₋₄ алкил" и "C₁₋₃ алкил". Конкретные примеры включают, но не ограничиваются этим: метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, н-пентил, изопентил, 2-метилбутил, неопентил, 1-этилпропил, н-гексил, изогексил, 3-метилпентил, 2-метилпентил, 1-метилпентил, 3,3-диметилбутил, 2,2-диметилбутил, 1,1-диметилбутил, 1,2-диметилбутил, 1,3-диметилбутил, 2,3-диметилбутил, 2-этилбутил и 1,2-диметилпропил.

В контексте настоящей заявки термин "C₁₋₆ алкилен" относится к двухвалентной группе, полученной путем удаления двух атомов водорода из линейного или разветвленного алкана, содержащей 1-6 атомов углерода, включая, например, "C₁₋₄ алкилен" и "C₁₋₃ алкилен". Конкретные примеры включают, но не ограничиваются этим: метилен, этилен, проп-1,3-илен, бут-1,4-илен, пент-1,5-илен и гекс-1,6-илен.

В контексте настоящей заявки термин "C₂₋₁₀ алкенил" относится к линейному или разветвленному алкенилу, имеющему по меньшей мере одну двойную связь и количество атомов углерода от 2 до 10, включая, например, "C₂₋₆ алкенил" и "C₂₋₄ алкенил". Примеры включают, но не ограничиваются этим: винил, 1-пропенил, 2-пропенил, 1-бутенил, 2-бутенил, 1,3-бутадиенил, 1-пентенил, 2-пентенил, 3-пентенил, 1,3-пентадиенил, 1,4-пентадиенил, 1-гексенил, 2-гексенил, 3-гексенил, 1,4-гексадиенил, циклопентенил, 1,3-циклопентадиенил, циклогексенил и 1,4-циклогексадиенил.

В контексте настоящей заявки термин "C₂₋₁₀ алкенилен" относится к двухвалентной группе, полученной путем удаления двух атомов водорода из олефина, содержащей 2-10 атомов углерода, включая, например, "C₂₋₈ алкенилен" и "C₄₋₆ алкенилен". Примеры включают, но не ограничиваются этим: пентен-1,5-илен, 2-пентен-1,5-илен и гексен-1,6-илен.

В контексте настоящей заявки термин "C₂₋₁₀ алкинил" относится к линейному или разветвленному алкинилу, имеющему по меньшей мере одну тройную связь и количество атомов углерода от 2 до 10, включая, например, "C₂₋₆ алкинил" и "C₂₋₄ алкинил". Примеры включают, но не ограничиваются этим: этинил, пропирил, 2-бутирил, 2-пентинил, 3-пентинил, 4-метил-2-пентинил, 2-гексинил, 3-гексинил и 5-метил-2-гексинил.

В контексте настоящей заявки термин "C₂₋₁₀ алкинилен" относится к двухвалентной группе, полученной путем удаления двух атомов водорода из алкина, содержащей 2-10 атомов углерода, включая, например, "C₂₋₈ алкинилен" и "C₄₋₆ алкинилен". Примеры включают, но не ограничиваются этим: пентин-1,5-илен, 2-пентин-1,5-илен и гексин-1,6-илен.

В контексте настоящей заявки термин "C₁₋₆ алкокси" относится к группе, имеющей структуру C₁₋₆ алкил-O-, где C₁₋₆ алкил имеет значение, определенное выше. Конкретные примеры включают, но не ограничиваются этим, метокси, этокси, пропокси, изопропокси, н-пропокси, изопропокси, н-бутокси, изобутокси, трет-бутокси, пентокси и гексокси.

В контексте настоящей заявки термин "5-12-членный гетероарил" относится к

ароматической циклической группе, содержащей 5-12 кольцевых членов, один из которых представляет собой по меньшей мере гетероатом, выбранный из N, O и S. Конкретные примеры включают, но не ограничиваются этим: 5-10-членный гетероарил, 5-10-членный азот-содержащий гетероарил и 5-6-членный кислород-содержащий гетероарил, такие как фурил, тиенил, пирролил, тиазолил, изотиазол, тиадиазолил, оксазолил, изоксазолил, оксадиазолил, имидазолил, пиразолил, 1,2,3-триазолил, 1,2,4-триазолил, 1,2,3-оксадиазолил, 1,2,4-оксадиазолил, 1,2,5-оксадиазолил, 1,3,4-оксадиазолил, пиридил, пиримидинил, пиридазинил, пиразинил, 1,2,3-триазинил, 1,3,5-триазинил и 1,2,4,5-тетразинил.

Настоящее изобретение не ограничивается конкретными методологиями, протоколами, клеточными линиями, векторами/носителями или реагентами, описанными в настоящей заявке, поскольку они могут варьироваться. Кроме того, термины, используемые в настоящей заявке, используются только с целью описания конкретных вариантов осуществления, а не для ограничения объема настоящего изобретения.

В этом контексте (описания и формулы изобретения) формы единственного числа «a», «an», «the» и «указанный», если в контексте явно не указано иное, включают их формы множественного числа. Например, «клетка-хозяин» включает множество таких клеток-хозяев. Кроме того, в китайском языке нет соответствующих имеющихся в английском языке грамматических правил для указания единственного и множественного числа, где формы единственного и множественного числа существительного должны оцениваться в соответствии с контекстом или реальной ситуацией. Поэтому в английском переводе, вероятно, правильно, когда перед существительным есть слова «один или несколько».

Краткое описание чертежей

Фиг. 1А показывает обнаружение моноклональной стабильной клеточной линии НЕК293Т-Клаудин18.2 методом проточной цитометрии.

Фиг. 1В показывает обнаружение моноклональной стабильной клеточной линии L929-Клаудин18.2 методом проточной цитометрии.

Фиг. 1С показывает обнаружение моноклональной стабильной клеточной линии КАТОШ-Клаудин18.2 методом проточной цитометрии.

Фиг. 1D показывает обнаружение моноклональной стабильной клеточной линии NCI-N87-Клаудин18.2 методом проточной цитометрии.

Фиг. 1Е показывает обнаружение моноклональной стабильной клеточной линии НЕК293Т-Клаудин18.1 методом вестерн-блоттинга.

Фиг. 2 показывает определение аффинности 2С6.9-hz21 и IМАВ362 методом проточной цитометрии.

Фиг. 3 показывает определение аффинности связывания 2С6.9-hz21 и IМАВ362 с клетками L929-Клаудин 18.2.

Фиг. 4 показывает определение специфичности 2С6.9-hz21 методом проточной цитометрии.

Фиг. 5 показывает определение CDC киллинг-активности 2С6.9-hz21 и IMAВ362 против клеток НЕК293Т-Клаудин18.2.

Фиг. 6 показывает определение ADCC активности 2С6.9-hz21 и IMAВ362 против клеток НЕК293Т-Клаудин18.2.

Фиг. 7 показывает спектр эксклюзивной ВЭЖХ для 2С6.9-TL001 (DAR: 3,79).

Фиг. 8 показывает спектр эксклюзивной ВЭЖХ для 2С6.9-TL001 (DAR: 7,12).

Фиг. 9 показывает результаты испытаний аффинности 2С6.9-TL001 (DAR: 7,12) к Клаудину 18.2 на поверхности клеточной мембраны.

Фиг. 10А показывает результаты испытаний цитотоксического эффекта 2С6.9-TL001 (DAR: 7,12) на НЕК293Т-Клаудин 18.2.

Фиг. 10В показывает результаты испытаний цитотоксического эффекта 2С6.9-TL001 (DAR: 3,79) на НЕК293Т-Клаудин 18.2.

Фиг. 10С показывает результаты испытаний цитотоксического эффекта 2С6.9-TL001 (DAR: 7,12) на НЕК293Т-Клаудин 18.1.

Фиг. 10D показывает результаты испытаний цитотоксического эффекта 2С6.9-TL002 и 2С6.9-TL003 на НЕК293Т-Клаудин 18.2.

Фиг. 10Е показывает результаты испытаний цитотоксического эффекта 2С6.9-TL002 и 2С6.9-TL003 на НЕК293Т-Клаудин 18.1.

Фиг. 11А показывает результаты испытаний цитотоксического эффекта 2С6.9-TL001 (DAR: 7,12) на клетки NUGC-4.

Фиг. 11В показывает результаты испытаний цитотоксического эффекта 2С6.9-TL001 (DAR: 3,79) на клетки NUGC-4.

Фиг. 11С показывает результаты испытаний цитотоксического эффекта 2С6.9-TL002 и 2С6.9-TL003 на клетки NUGC-4.

Фиг. 12А показывает изменения объема опухоли у мышей в каждой группе в модели опухоли с подкожно трансплантированными NCI-N87-Клаудин18.2 клетками у бестимусных мышей Balb/c (*: $P < 0,05$; ****: $P < 0,0001$).

Фиг. 12В показывает изменения массы тела у мышей в каждой группе в модели опухоли с подкожно трансплантированными NCI-N87-Клаудин18.2 клетками у бестимусных мышей Balb/c.

Фиг. 12С показывает сравнение 11-дневной оценки эффективности *in vivo* 2С6.9-TL001 и 2С6,9 mAb+химиотерапия в CDX-модели (****: $P < 0,0001$).

Фиг. 12D показывает сравнение 21-дневной оценки эффективности *in vivo* 2С6.9-TL001 и моноклонального антитела 2С6.9+химиотерапия в CDX-модели (****: $P < 0,0001$).

Фиг. 12Е показывает изменения объема опухоли в течение 21 дня у мышей в каждой группе, обработанной 2С6.9-TL001 с разными значениями DAR, в CDX (NUGC-4) модели (****: $P < 0,001$).

Фиг. 12F показывает изменения массы тела в течение 21 дня у мышей в каждой группе, обработанной 2С6.9-TL001 с разными значениями DAR, в CDX-модели (NUGC-

4).

Фиг. 12G показывает изменения объема опухоли в течение 17 дней у мышей в каждой группе в PDX-модели подкожной трансплантации GA0006 рака желудка NuPrime® у бестимусных мышей Balb/c (****: $P < 0,0001$).

Фиг. 12H показывает изменения массы тела в течение 17 дней у мышей в каждой группе в PDX-модели подкожной трансплантации GA0006 рака желудка NuPrime® у бестимусных мышей Balb/c.

Фиг. 12I показывает изменения объема опухоли в течение 24 дней у мышей в каждой группе в PDX-модели подкожной трансплантации GA0006 рака желудка NuPrime® у бестимусных мышей Balb/c (****: $P < 0,0001$).

Фиг. 12J показывает изменения массы тела в течение 24 дней у мышей в каждой группе в PDX-модели подкожной трансплантации GA0006 рака желудка NuPrime® у бестимусных мышей Balb/c.

Фиг. 12K показывает изменения объема опухоли у мышей в каждой группе в модели опухоли с подкожной трансплантацией NCI-N87-Клаудин18.2 клеток у бестимусных мышей Balb/c (**: $P < 0,001$; ****: $P < 0,0001$).

Фиг. 12L показывает изменения массы тела у мышей в каждой группе в модели опухоли с подкожной трансплантацией NCI-N87-Клаудин18.2 клеток у бестимусных мышей Balb/c.

Фиг. 12M показывает изменения объема опухоли у мышей в каждой группе в модели опухоли с подкожной трансплантацией HEK293T-Клаудин18.2 клеток у бестимусных мышей Balb/c (**: $P < 0,01$; ****: $P < 0,0001$).

Фиг. 12N показывает изменения массы тела у мышей в каждой группе в модели опухоли с подкожной трансплантацией HEK293T-Клаудин18.2 клеток у бестимусных мышей Balb/c.

Фиг. 12O показывает изменения объема у мышей в каждой группе в модели опухоли с подкожной трансплантацией NUGC-4 клеток у бестимусных мышей Balb/c (****: $P < 0,0001$).

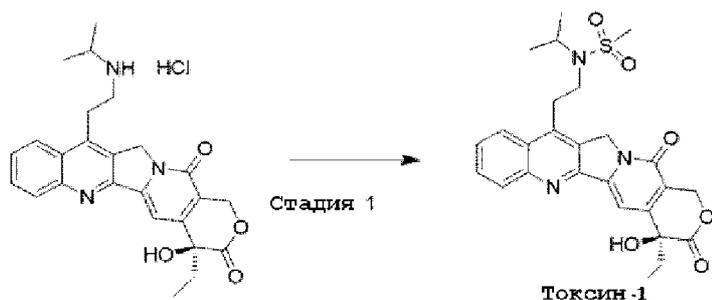
Фиг. 12P показывает изменения массы тела у мышей в каждой группе в модели опухоли с подкожной трансплантацией NUGC-4 клеток у бестимусных мышей Balb/c.

Фиг. 13 показывает спектр эксклюзионной ВЭЖХ для 2С6.9-TL001 (DAR:7,40).

Конкретный способ осуществления изобретения

Варианты осуществления настоящего изобретения будут подробно описаны ниже со ссылкой на примеры, но специалисты в данной области поймут, что следующие примеры используются только для иллюстрации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения. Конкретные условия, не указанные в примерах, относятся к обычным условиям или условиям, предложенным изготовителями. Все реагенты или инструменты, используемые без указания изготовителя, являются обычными коммерчески доступными продуктами.

Пример 1. Синтез биоактивной молекулы (ТОКСИН-1)



Метансульфонилхлорид (462 мг, 12,77 ммоль, чистота около 70%) добавляли по каплям к раствору в дихлорметане (40 мл) Белотекана гидрохлорида (3 г, 6,38 ммоль) и триэтиламина (2,58 г, 25,54 ммоль), полученной смеси давали прореагировать в течение 2ч при комнатной температуре. После фильтрования с отсасыванием фильтровальную лепешку промывали три раза дихлорметаном (3 мл) с получением 2,2 г (S)-N-(2-(4-этил-4-гидрокси-3,14-дион-3,4,12,14-тетрагидро-1H-пирано[3',4':6,7] индозино[1,2-b]хинолин-11-ил)этил)-N-изопропилметансульфонамида (ТОКСИН-1).

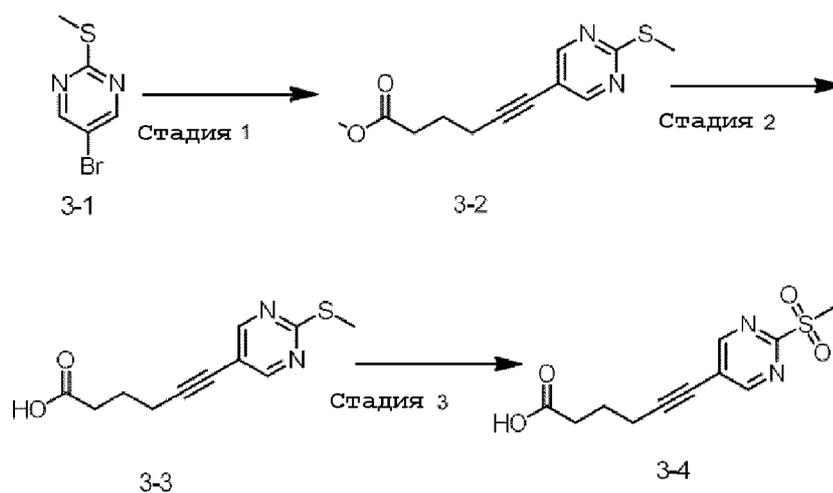
Структура характеризуется следующими данными:

^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 8,32 (д, $J=8,4$ Гц, 1H), 8,20 (дд, $J=8,4$, 1,2 Гц, 1H), 7,93-7,84 (м, 1H), 7,79 (т, $J=7,6$ Гц, 1H), 7,35 (с, 1H), 6,56 (с, 1H), 5,44 (д, $J=9,2$ Гц, 4H), 3,98 (п, $J=6,7$ Гц, 1H), 3,50 (т, $J=8,0$ Гц, 2H), 3,42-3,35 (м, 2H), 3,00 (с, 3H), 1,93-1,82 (м, 2H), 1,15 (д, $J=6,7$ Гц, 6H), 0,88 (т, $J=7,3$ Гц, 3H).

ESI-MS (m/z): 512,2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +28,19^\circ$ ($c=0,101$ г/100 мл, CH_3CN).

Пример 2. Синтез 6-(2-(метилсульфонил)пиримидин-5-ил)-5-гексиновой кислоты (соединение 3-4)



Стадия 1: Синтез метилового эфира 6-(2-(метилтио)пиримидин-5-ил)-5-гексиновой кислоты (соединение 3-2)

При комнатной температуре метил 5-гексиноат (500 мг, 3,97 ммоль) и 5-бром-2-метилтиопиримидин растворяли в N, N-диметилформамиде (3 мл), последовательно добавляли триэтиламин (3 мл), иодид меди (75 мг, 0,4 ммоль) и

бис(трифенилфосфин)дихлорид палладия (II) (279 мг, 0,4 ммоль). Затем смесь нагревали до 95°C под защитным слоем азота и давали прореагировать при перемешивании в течение 6ч. Реакцию гасили водой. Смесь экстрагировали этилацетатом (20 мл × 3). Органические фазы объединяли, промывали насыщенным солевым раствором (20 мл × 2), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали для удаления осушающего агента, концентрировали в вакууме и очищали препаративной жидкостной хроматографией с получением 300 мг указанного в заголовке соединения. ESI-MS (m/z): 251,3 [M+H]⁺.

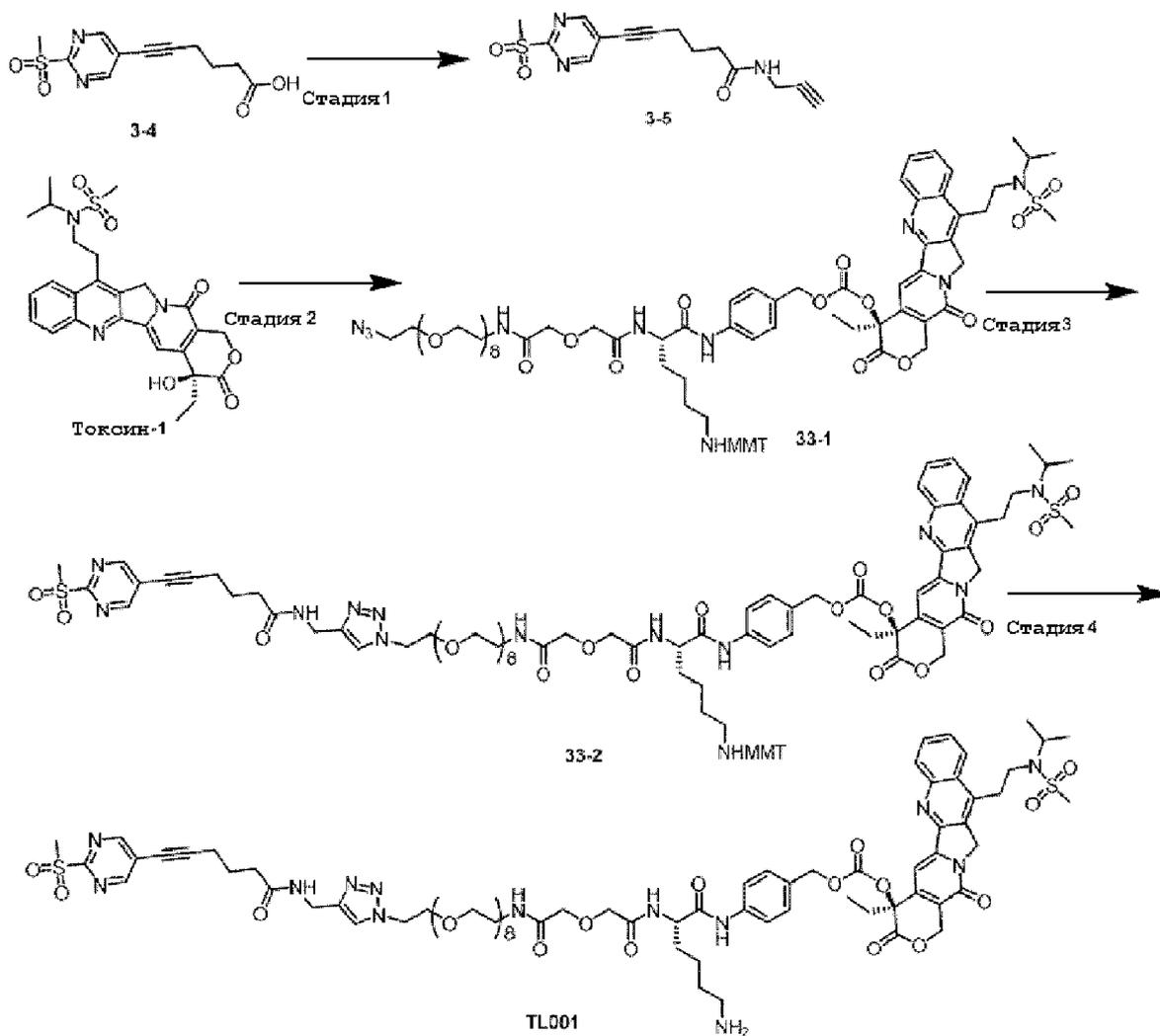
Стадия 2: Синтез 6-(2-(метилтио)пиримидин-5-ил)-5-гексиновой кислоты (соединение 3-3)

При комнатной температуре соединение 3-2 (200 мг, 0,8 ммоль) растворяли в смешанном растворе тетрагидрофурана и воды (4 мл/4 мл), добавляли гидроксид лития моногидрат (235 мг, 5,6 ммоль), полученной смеси давали прореагировать при перемешивании в течение 4ч при комнатной температуре с последующим разбавлением водой и экстрагированием этилацетатом (20 мл × 2); водную фазу доводили 1N раствором хлористоводородной кислоты до pH=3, экстрагировали этилацетатом (20 мл × 3); органические фазы объединяли, промывали насыщенным солевым раствором (20 мл × 2), сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали для удаления осушающего агента и концентрировали в вакууме с получением 120 мг указанного в заголовке соединения.

Стадия 3: Синтез 6-(2-(метилсульфонил)пиримидин-5-ил)-5-гексиновой кислоты (соединение 3-4)

При комнатной температуре соединение 3-3 (20 мг, 0,085 ммоль) растворяли в дихлорметане (4 мл), добавляли м-хлорпероксибензойную кислоту (22 мг, 0,127 ммоль), полученной смеси давали прореагировать при перемешивании при комнатной температуре в течение ночи и очищали препаративной жидкостной хроматографией с получением 20 мг указанного в заголовке соединения. ESI-MS (m/z): 269,1 [M+H]⁺.

Пример 3. (4-((S)-2-(4-аминобутил)-35-(4-((6-(2-(метилсульфонил)пиримидин-5-ил)гекс-5-инамидо)метил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)-4,8-диоксо-6,12,15,18,21,24,27,30,33-нонаокса-3,9-диазапентаэриаконтанамидо)бензил)((S)-4-этил-11-(2-(N-изопропилметилсульфонамидо)этил)-3,14-диоксо-3,4,12,14-тетрагидро-1H-пирано[3',4':6,7]индозино[1,2-b]хинолин-4-ил)карбонат (соединение TL001)



Стадия 1: Синтез 6-(2-(метилсульфонил)пиримидин-5-ил)-N-пропаргил-гекс-5-инамида (соединение 3-5)

Пропиниламин (189 мг, 3,4 ммоль) и соединение 3-4 (800 мг, 2,83 ммоль) растворяли в дихлорметане (10 мл) при 25°C, затем последовательно добавляли N, N-диизопропилэтиламин (738 мг, 5,67 ммоль) и гексафторфосфат O-(7-аза-бензотриазол-1-ил)-N, N, N',N'-тетраметилмочевины (1,63 г, 4,25 ммоль). Полученной смеси давали прореагировать при перемешивании в течение 2ч. Реакционный раствор концентрировали в вакууме, остаток очищали колоночной флэш-хроматографией на силикагеле (этилацетат/петролейный эфир=3/1) с получением 700 мг указанного в заголовке соединения. ESI-MS (m/z): 306,1 [M+H]⁺.

Стадия 2: Синтез (4-(((S)-35-азидо-2-(4-(((4-метоксифенил)дифенилметил)амино)бутил)-4,8-диоксо-6,12,15,18,21,24,27,30,33-нонаокса-3,9-диазапента триаконтанамидо)бензил)((S)-4-этил-11-(2-(N-изопропилметилсульфонамидо)этил)-3,14-диоксо-3,4,12,14-тетрагидро-1H-пирано[3',4':6,7]индозино[1,2-b]хинолин-4-ил)карбоната (соединение 33-1).

ТОКСИН-1 (250 мг, 0,49 ммоль) растворяли в дихлорметане (10 мл) под защитным слоем азота при 25°C, охлаждали до 0°C, добавляли дихлорметановый (3 мл) раствор 4-

диметиламинопиридина (478 мг, 3,91 ммоль) с последующим медленным добавлением по каплям дихлорметанового (10 мл) раствора трифосгена (72 мг, 0,24 ммоль). После добавления полученной смеси давали прореагировать при перемешивании в течение 20 мин при 0°C и смесь продували азотом в течение 20 мин. Затем добавляли дихлорметановый (7 мл) раствор (S)-2-(32-азидо-5-оксо-3,9,12,15,18,21,24,27,30-нонаокса-6-аза-дотриаконтанамидо)-N-(4-(гидроксиметил)фенил)-6-(((4-метоксифенил)дифенилметил)амино)гексанамид (518 мг, 0,49 ммоль) и перемешивали при 0°C в течение 1ч. Реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении, остаток очищали препаративной жидкостной хроматографией с получением 500 мг указанного в заголовке соединения. ESI-MS (m/z): 1597,5 [M+H]⁺.

Стадия 3: Синтез ((S)-4-этил-11-(2-(N-изопропилметилсульфонамидо)этил)-3,14-диоксо-3,4,12,14-тетрагидро-1H-пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)(4-((S)-2-(4-(((4-метоксифенил)дифенилметил)амино)бутил)-35-(4-((6-(2-(метилсульфонил)пиримидин-5-ил)гекс-5-инамидо)метил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)-4,8-диоксо-6,12,15,18,21,24,27,30,33-нонокси-3,9-диазапентатриаконтанамидо)бензил)карбоната (соединение 33-2)

При комнатной температуре соединение 33-1 (80 мг, 0,05 ммоль) и фрагмент 3-5 (23 мг, 0,075 ммоль) растворяли в растворе диметилсульфоксида и воды (2,0 мл:0,5 мл), затем добавляли бромид меди (11 мг, 0,08 ммоль). Полученную смесь перемешивали в течение 1ч и очищали препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографией с получением 30 мг указанного в заголовке соединения. ESI-MS (m/z): 815,9 [(M-273)/2+H]⁺.

Стадия 4: Синтез 4-((S)-2-(4-аминобутил)-35-(4-((6-(2-(метилсульфонил)пиримидин-5-ил)гекс-5-инамидо)метил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)-4,8-диоксо-6,12,15,18,21,24,27,30,33-нонаокса-3,9-диазапентатриаконтанамидо)бензил)((S)-4-этил-11-(2-(N-изопропилметилсульфонамидо)этил)-3,14-диоксо-3,4,12,14-тетрагидро-1H-пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-4-ил)карбоната (соединение TL001).

Соединение 33-2 (30 мг, 0,02 ммоль) растворяли в дихлорметане (1,0 мл) с последующим добавлением трифторуксусной кислоты (0,2 мл). Полученной смеси давали прореагировать в течение 30 мин при комнатной температуре, очищали препаративной ВЭЖХ с получением 20,0 мг трифторацетатной соли указанного в заголовке соединения. Структура характеризуется следующими данными:

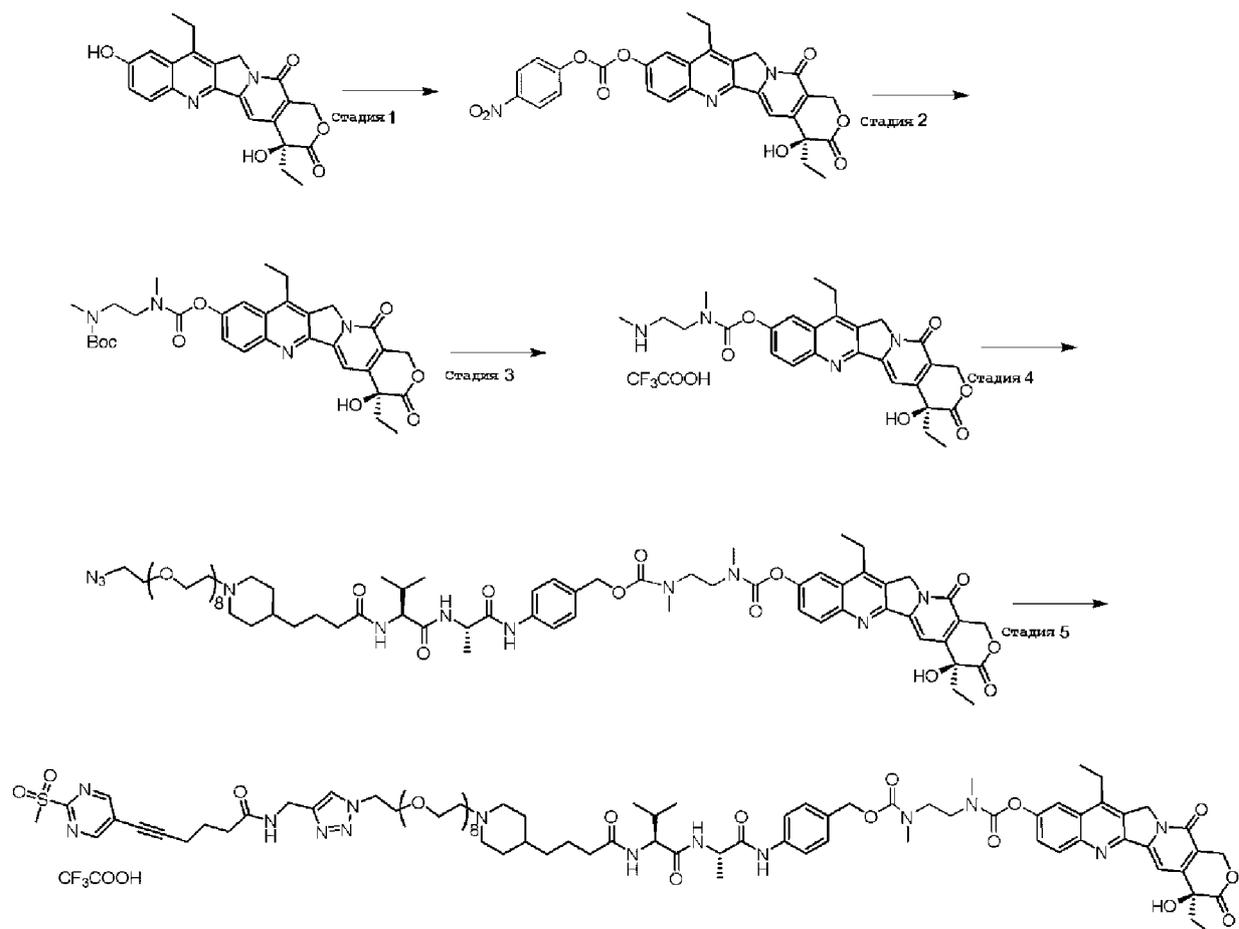
¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 10,18 (с, 1H), 9,10 (с, 2H), 8,38 (т, J=5,56 Гц, 1H), 8,32 (д, J=8,40 Гц, 1H), 8,22-8,20 (м, 2H), 8,09 (т, J=5,68 Гц, 1H), 7,91-7,87 (м, 2H), 7,82-7,78 (м, 1H), 7,69 (шир.с, 3H), 7,61 (д, J=8,56 Гц, 2H), 7,32 (д, J=8,56 Гц, 2H), 7,06 (с, 1H), 5,56 (д, J=16,96 Гц, 1H), 5,51 (д, J=16,96 Гц, 1H), 5,47 (д, J=19,28 Гц, 1H), 5,42 (д, J=19,28 Гц, 1H), 5,14 (д, J=12,20 Гц, 1H), 5,07 (д, J=12,16 Гц, 1H), 4,48 (т, J=5,24 Гц, 2H), 4,46-4,43 (м, 1H), 4,29 (д, J=5,60 Гц, 2H), 4,08-3,95 (м, 5H), 3,79 (т, J=5,28 Гц, 2H), 3,51-3,43 (м, 32H), 3,40 (с, 3H), 3,39-3,35 (м, 2H), 3,30-3,26 (м, 2H), 3,00 (с, 3H), 2,82-2,74 (м, 2H), 2,56 (т, J=7,08 Гц, 2H), 2,29 (т, J=7,36 Гц, 2H), 2,23-2,13 (м, 2H), 1,82 (п, J=7,24 Гц, 2H), 1,78-1,63

(м, 2H), 1,61-1,49 (м, 2H), 1,42-1,27 (м, 2H), 1,15 (д, J=6,80 Гц, 3H), 1,13 (д, J=6,76 Гц, 3H), 0,90 (т, J=7,32 Гц, 3H).

ESI-MS (m/z): 816,0[M/2+H]⁺.

$[\alpha]_D^{20} = -19,55^\circ$ (c = 1,000 г/100 мл, CH₃CN).

Пример 4. Синтез ((S)-4,11-диэтил-4-гидрокси-3,14-диоксо-3,4,12,14-тетрагидро-1H-пирано[3',4':6,7]индозино[1,2-b]хинолин-9-ил)(4-((S)-2-((S)-3-метил-2-(4-(1-(26-(4-((6-(2-(метилсульфонил)пиримидин-5-ил)гекс-5-инамидо)метил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозанил)пиперидин-4-ил)бутирамидо)бутирамидо)пропионамидо)бензил)этан-1,2-диилбис(метилкарбамат)трифторацетата (TL002)



Стадия 1: Синтез (S)-4,11-диэтил-4-гидрокси-3,14-диоксо-3,4,12,14-тетрагидро-1H-пирано[3',4':6,7]индозино[1,2-b]хинолин-9-ил(4-нитрофенил)карбоната

(S)-4,11-диэтил-4,9-дигидрокси-1H-пирано[3',4':6,7]индозино[1,2-b]хинолин-3,14(4H,12H)-дион (150 мг, 0,37 ммоль) растворяли в дихлорметане (15 мл), добавляли диизопропилэтиламин (96,81 мг, 0,74 ммоль) с последующим добавлением раствора бис(4-нитрофенил)карбоната (127,92 мг, 0,41 ммоль) в дихлорметане (15 мл), полученной смеси давали прореагировать при 25°C в течение 3ч. Реакционный раствор концентрировали с получением 207 мг указанного в заголовке соединения, которое использовали непосредственно для следующей реакции.

ESI-MS (m/z):558,1[M+H]⁺.

Стадия 2: Синтез (S)-трет-бутил(4,11-диэтил-4-гидрокси-3,14-диоксо-3,4,12,14-тетрагидро-1H-пирано[3',4':6,7]индозино[1,2-b]хинолин-9-ил)этан-1,2-диилбис(метилкарбамата)

(S)-(4,11-диэтил-4-гидрокси-3,14-диоксо-3,4,12,14-тетрагидро-1H-пирано[3',4':6,7]индозино[1,2-b]хинолин-9-ил)(4-нитрофенил)карбонат (207 мг, 0,33 ммоль) растворяли в дихлорметане (10 мл), добавляли диизопропилэтиламин (130,87 мг, 1,00 ммоль) и трет-бутил N-метил-N-[2-(метиламино)этил]карбамат (71,34 мг, 0,37 ммоль), полученную смесь перемешивали при 25°C в течение 12ч. Реакционный раствор концентрировали, остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: дихлорметан/метанол=9/1) с получением 207 мг указанного в заголовке соединения.

ESI-MS (m/z):607,3[M+H]⁺.

Стадия 3: Синтез (S)-N-метил-(4,11-диэтил-4-гидрокси-3,14-диоксо-3,4,12,14-тетрагидро-1H-пирано[3',4':6,7] индозино[1,2-b]хинолин-9-ил)(2-(метиламино)этил)карбамат трифторацетата

(S)-трет-бутил (4,11-диэтил-4-гидрокси-3,14-диоксо-3,4,12,14-тетрагидро-1H-пирано[3',4':6,7]индозино[1,2-b] хинолин-9-ил)этан-1,2-диилбис(метилкарбамат) (207 мг, 0,19 ммоль) растворяли в дихлорметане (8 мл), добавляли трифторуксусную кислоту (2 мл), полученной смеси давали прореагировать при 25°C в течение 2ч. Реакционный раствор концентрировали с получением 200 мг указанного в заголовке соединения, которое использовали непосредственно для следующей реакции.

ESI-MS (m/z):507,2[M+H]⁺.

Стадия 4: Синтез 4-((S)-2-((S)-2-(4-(1-(26-азидо-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозанил)пиперидин-4-ил)бутирамидо)-3-метилбутирамидо)пропионамидо)бензил)((S)-4,11-диэтил-4-гидрокси-3,14-диоксо-3,4,12,14-тетрагидро-1H-пирано[3',4':6,7]индозино[1,2-b]хинолин-9-ил)этан-1,2-диилбис(метилкарбамата)

(4-((S)-2-((S)-2-(4-(1-(26-азидо-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозанил)пиперидин-4-ил)бутирамидо)-3-метилбутирамидо)пропионамидо)бензил)(4-нитрофенил)карбонат (150 мг, 0,12 ммоль) растворяли в N, N-диметилформамиде (3 мл), добавляли 1-гидроксибензотриазол (34,03 мг, 0,25 ммоль) и диизопропилэтиламин (48,82 мг, 0,37 ммоль) с последующим добавлением (S)-N-метил-(4,11-диэтил-4-гидрокси-3,14-диоксо-3,4,12,14-тетрагидро-1H-пирано[3',4':6,7]индозино[1,2-b] хинолин-9-ил)(2-(метиламино)этил)карбамат трифторацетата (102,11 мг, 0,12 ммоль), полученной смеси давали прореагировать при 25°C в течение 16ч. Реакционный раствор очищали препаративной ВЭЖХ, собранные фракции подвергали лиофилизации с получением 44 мг указанного в заголовке соединения.

ESI-MS (m/z):1400,7[M+H]⁺.

Хроматографическая колонка: Waters XBridge Prep C18 OBD 19 мм × 150 мм × 5,0 мкм

Подвижная фаза А: ацетонитрил; Подвижная фаза В: вода (0,05% муравьиной кислоты)

Время [мин]	Подвижная фаза А [%]	Подвижная фаза В [%]	Скорость потока [мл/мин]
0,00	10	90	28
3,00	10	90	28
19,00	90	10	28

Стадия 5: Синтез ((S)-4,11-диэтил-4-гидрокси-3,14-диоксо-3,4,12,14-тетрагидро-1Н-пирано[3',4':6,7]индозино[1,2-b]хинолин-9-ил)(4-((S)-2-((S)-3-метил-2-(4-(1-(26-(4-((6-(2-(метилсульфонил)пиримидин-5-ил)гекс-5-инамидо)метил)-1Н-1,2,3-триазол-1-ил)-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозанил)пиперидин-4-ил)бутирамидо)бутирамидо)пропионамидо)бензил)этан-1,2-диилбис(метилкарбамат)трифторацетата

4-((S)-2-((S)-2-(4-(1-(26-азидо-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозанил)пиперидин-4-ил)бутирамидо)-3-метилбутирамидо)пропионамидо)бензил)((S)-4,11-диэтил-4-гидрокси-3,14-диоксо-3,4,12,14-тетрагидро-1Н-пирано[3',4':6,7]индозино[1,2-b]хинолин-9-ил)этан-1,2-диилбис(метилкарбамат) (44 мг, 0,30 ммоль) и 6-(2-(метилсульфонил)пиримидин-5-ил)-N-пропил)гексамид (14,09 мг, 0,045 ммоль) растворяли в растворе диметилсульфоксида (3 мл) и воды (0,75 мл), добавляли бромид меди (8,65 мг, 0,06 ммоль), полученной смеси давали прореагировать при 25°C в течение 1ч. Реакционный раствор очищали препаративной ВЭЖХ, собранные фракции подвергали лиофилизации, затем смесь растворяли в дихлорметане (2 мл), добавляли трифторуксусную кислоту (0,2 мл) и перемешивали при 25°C в течение 0,5ч, очищали препаративной ВЭЖХ и собранные фракции подвергали лиофилизации с получением 16 мг указанного в заголовке соединения.

ESI-MS (m/z): 853,6[M/2+H]⁺.

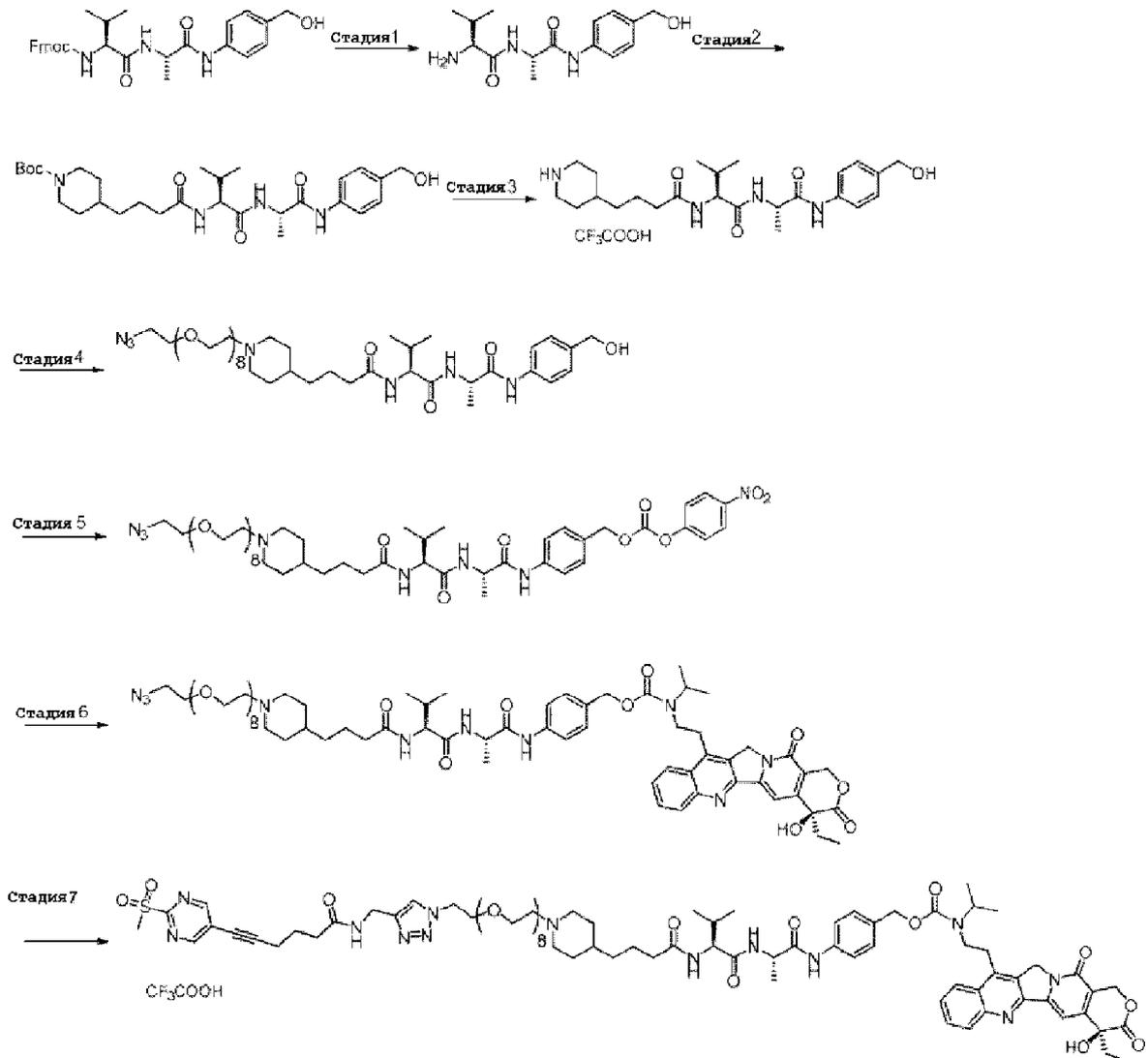
Хроматографическая колонка: Waters SunFire Prep C18 ODS 5 мкм 19×50 мм

Подвижная фаза А: ацетонитрил; Подвижная фаза В: вода (0,05% трифторуксусной кислоты)

Время [мин]	Подвижная фаза А [%]	Подвижная фаза В [%]	Скорость потока [мл/мин]
0,00	10	90	28
4,00	10	90	28
20,00	90	10	28

Пример 5. Синтез (4-((S)-2-((S)-3-метил-2-(4-(1-(26-(4-((6-(2-

(метилсульфонил)пиримидин-5-ил)гекс-5-инамидо)метил)-1Н-1,2,3-триазол-1-ил)-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозанил)пиперидин-4-ил)бутирамидо)бутирамидо)пропионамидо)бензил)(2-((S)-4-этил-4-гидрокси-3,14-диоксо-3,4,12,14-тетрагидро-1Н-пирано[3',4':6,7]индозино[1,2-b]хинолин-11-ил) N-этил-N-изопропилкарбамат трифторацетата (TL003)



Стадия 1: Синтез (S)-2-амино-N-((S)-1-((4-(гидроксиметил)фенил)амино)-1-оксопроп-2-ил)-3-метилбутирамида

При комнатной температуре ((9H-флуорен-9-ил) метил) (((S)-1-((S)-1-((4-(гидроксиметил)фенил)амино)-1-оксопроп-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобут-2-ил)карбамат (2,00 г, 3,88 ммоль) растворяли в N, N-диметилформамиде (12 мл), добавляли пиперидин (3 мл), полученной смеси давали прореагировать при 25°C в течение 2ч. Реакционный раствор затем выливали в воду для осаждения твердых частиц и твердые частицы фильтровали, очищали препаративной ВЭЖХ. Собранные фракции подвергали лиофилизации с получением 810 мг указанного в заголовке соединения.

ESI-MS (m/z): 294,0[M+H]⁺.

Хроматографическая колонка: Waters SunFire Prep C18 ODS 8 мкм 45×450 мм

Подвижная фаза А: ацетонитрил; Подвижная фаза В: вода

Время [мин]	Подвижная фаза А [%]	Подвижная фаза В [%]	Скорость потока [мл/мин]
0,00	7	93	60
7,00	7	93	60
50,00	50	50	60

Стадия 2: Синтез трет-бутил 4-(4-((S)-1-((S)-1-((4-(гидроксиметил)фенил)амино)-1-оксопроп-2-ил)амино-3-метил-1-оксобут-2-ил)амино-4-оксобутил)пиперидин-1-карбоксилата

При комнатной температуре (S)-2-амино-N-((S)-1-((4-(гидроксиметил)фенил)амино)-1-оксопроп-2-ил)-3-метилбутирамид (810 мг, 2,76 ммоль), 4-(1-(трет-бутоксикарбонил)пиперидин-4-ил)масляную кислоту и 2-этокси-1-этоксикарбо-1,2-дигидрохиолин растворяли в дихлорметане (8 мл) и метаноле (8 мл) и давали прореагировать при 45°C в течение 2ч. Реакционный раствор концентрировали в вакууме и остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: дихлорметан/метанол=15/1) с получением 1,31 г указанного в заголовке соединения.

ESI-MS (m/z): 546,8[M+H]⁺.

Стадия 3: Синтез (S)-N-((S)-1-((4-(гидроксиметил)фенил)амино)-1-оксопроп-2-ил)-3-метил-2-(4-(пиперидин-4-ил)бутирамида)бутирамид трифторацетата

При комнатной температуре трет-бутил 4-(4-((S)-1-((S)-1-((4-(гидроксиметил)фениламино)-1-оксопроп-2-ил)амино-3-метил-1-оксобут-2-ил)амино-4-оксобутил)пиперидин-1-формат (1,3 г, 2,14 ммоль) растворяли в дихлорметане (20 мл), добавляли трифторуксусную кислоту (5 мл) и давали прореагировать при 25°C в течение 2ч. Реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении и остаток растворяли в ацетонитриле (30 мл), добавляли карбонат калия (1,22 г, 8,85 ммоль) и давали прореагировать при 25°C в течение 2ч. Реакционную смесь фильтровали с отсасыванием, фильтровальную лепешку промывали ацетонитрилом, фильтрат собирали и концентрировали при пониженном давлении с получением 900 мг указанного в заголовке соединения.

ESI-MS (m/z): 446,9[M+H]⁺.

Стадия 4: Синтез (S)-2-(4-(1-(26-азидо-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозанил)пиперидин-4-ил)бутирамида)-N-((S)-1-((4-(гидроксиметил)фенил)амино)-1-оксопроп-2-ил)-3-метилбутирамида

При комнатной температуре (S)-N-((S)-1-((4-(гидроксиметил)фенил)амино)-1-оксопроп-2-ил)-3-метил-2-(4-(пиперидин-4-ил)бутирамида)бутирамид трифторацетат (487 мг, 0,78 ммоль) и 26-азидо-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозанил п-толуолсульфонат (619 мг, 0,94 ммоль) растворяли в

ацетонитриле (20 мл), добавляли карбонат калия (655 мг, 4,69 ммоль) и давали прореагировать при 16°C в течение 6ч. Реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении, остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (элюент: дихлорметан/метанол=8/1) с получением 586 мг указанного в заголовке соединения.

ESI-MS (m/z): 868,5[M+H]⁺.

Стадия 5: Синтез (4-((S)-2-((S)-2-(4-(1-(26-азидо-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозанил)пиперидин-4-ил)бутирамидо)-3-метилбутирамидо)пропионамидо)бензил)(4-нитрофенил)карбоната

При комнатной температуре (S)-2-(4-(1-(26-азидо-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозанил)пиперидин-4-ил)бутирамидо)-N-((S)-1-((4-(гидроксиметил)фенил)амино)-1-оксопроп-2-ил)-3-метилбутирамид (585 мг, 0,64 ммоль) растворяли в дихлорметане (30 мл), добавляли N, N-диизопропилэтиламин (334,31 мг, 2,56 ммоль) с последующим добавлением по каплям дихлорметанового (30 мл) раствора ди(п-нитробензол)карбоната (602,35 мг, 1,92 ммоль), полученной смеси давали прореагировать при 25°C в течение 6ч. Реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении, к остатку добавляли метил трет-бутиловый эфир, смесь подвергали фильтрованию с получением 760 мг указанного в заголовке соединения.

ESI-MS (m/z): 1033,4[M+H]⁺.

Стадия 6: Синтез (4-((S)-2-((S)-2-(4-(1-(26-азидо-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозанил)пиперидин-4-ил)бутирамидо)-3-метилбутирамидо)пропионамидо)бензил)(N-(2-((S)-4-этил-4-гидрокси-3,14-диоксо-3,4,12,14-тетрагидро-1H-пирано[3',4':6,7]индозино[1,2-b]хинолин-11-ил)этил)-N-изопропил)карбамата

При комнатной температуре (4-((S)-2-((S)-2-(4-(1-(26-азидо-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозанил)пиперидин-4-ил)бутирамидо)-3-метилбутирамидо)пропионамидо)бензил)(4-нитрофенил)карбонат (150 мг, 0,12 ммоль) растворяли в N, N-диметилформамиде (3 мл), добавляли 1-гидроксибензотриазол (34,03 мг, 0,25 ммоль) и N, N-диизопропилэтиламин (48,82 мг, 0,37 ммоль) с последующим добавлением (S)-4-этил-4-гидрокси-11-(2-(изопропиламино)этил)-1,12-дигидро-14H-пирано[3',4':6,7]индозино[1,2-b]хинолин-3,14(4H)-дион гидрохлорида (59,79 мг, 0,12 ммоль), реакционный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение ночи и затем очищали препаративной ВЭЖХ, собранные фракции подвергали лиофилизации с получением 64 мг указанного в заголовке соединения.

ESI-MS (m/z): 1327,6[M+H]⁺.

Стадия 7: Синтез (4-((S)-2-((S)-3-метил-2-(4-(1-(26-(4-((6-(2-(метилсульфонил)пиримидин-5-ил)гекс-5-инамидо)метил)-1H-1,2,3-триазол-1-ил)-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозанил)пиперидин-4-

ил)бутирамидо)бутирамидо)пропионамидо)бензил)(2-((S)-4-этил-4-гидрокси-3,14-диоксо-3,4,12,14-тетрагидро-1H-пирано[3',4':6,7]индозино[1,2-b]хинолин-11-ил)N-этил-N-изопропилкарбамат трифторацетата

При комнатной температуре (4-((S)-2-((S)-2-(4-(1-(26-азидо-3,6,9,12,15,18,21,24-октаоксагексакозанил)пиперидин-4-ил)бутирамидо)-3-метилбутирамидо)пропионамидо)бензил)(N-(2-((S)-4-этил-4-гидрокси-3,14-диоксо-3,4,12,14-тетрагидро-1H-пирано[3',4':6,7]индозино[1,2-b]хинолин-11-ил)этил)-N-изопропил)карбамат (64 мг, 0,046 ммоль) и 6-(2-(метилсульфонил)пиримидин-5-ил)-N-(проп-2-инил)гексамид (21,63 мг, 0,069 ммоль) растворяли в диметилсульфоксиде (4 мл) и воде (1 мл), добавляли бромид меди (13,27 мг, 0,092 ммоль), полученной смеси давали прореагировать при 25°C в течение 1ч. Реакционный раствор очищали препаративной ВЭЖХ, собранные фракции подвергали лиофилизации с получением 35 мг указанного в заголовке соединения. ESI-MS (m/z):1632,8[M+H]⁺.

Хроматографическая колонка: Waters SunFire Prep C18 OBD 5 мкм 19×150 мм

Подвижная фаза А: ацетонитрил;

Подвижная фаза В: вода (0,05% трифторуксусной кислоты)

Время [мин]	Подвижная фаза А [%]	Подвижная фаза В [%]	Скорость потока [мл/мин]
0,00	10	90	28
2,00	10	90	28
18,00	90	10	28

Пример 6. Получение моноклонального антитела, нацеленного на Клаудин 18.2 человека

Моноклональное антитело, нацеленное на Клаудин 18.2 человека, в настоящем изобретении представляет собой гуманизированное моноклональное антитело, включая 2С6.9-hz11 и 2С6.9-hz21, и его последовательности CDR, последовательность варибельной области и последовательность константной области показаны в Таблице 1:

Таблица 1

Информация о последовательностях

SEQ ID NO	Описание	SEQ ID NO	Описание
1	IMGT 2С6.9 CDR-H1	13	варибельная область тяжелой цепи гуманизированного антитела 2С6.9-hz11
2	IMGT 2С6.9 CDR-H2	14	варибельная область тяжелой цепи гуманизированного антитела 2С6.9-hz21
3	IMGT 2С6.9 CDR-H3	15	варибельная область легкой цепи гуманизированного антитела 2С6.9-

			hz11/2C6.9-hz21
4	IMGT 2C6.9 CDR-L1	16	константная область тяжелой цепи IgG1 человека
5	IMGT 2C6.9 CDR-L2	17	константная область легкой цепи к человека
6	IMGT 2C6.9 CDR-L3	18	Полноразмерная аминокислотная последовательность тяжелой цепи гуманизированного антитела 2C6.9-hz11
7	AbM 2C6.9 CDR-H1	19	Полноразмерная аминокислотная последовательность тяжелой цепи гуманизированного антитела 2C6.9-hz21
8	AbM 2C6.9 CDR-H2	20	Полноразмерная аминокислотная последовательность легкой цепи гуманизированного антитела 2C6.9-hz11/2C6.9-hz21
9	AbM 2C6.9 CDR-H3	21	IMGT 2C6.9 CDR-H2 (после модификации)
10	AbM 2C6.9 CDR-L1	22	AbM 2C6.9 CDR-H2 (после модификации)
11	AbM 2C6.9 CDR-L2	23	вариабельная область тяжелой цепи мышинового антитела 2C6.9M
12	AbM 2C6.9 CDR-L3	24	вариабельная область легкой цепи мышинового антитела 2C6.9M

6.1 Конструирование и идентификация клеточных линий, сверхэкспрессирующих человеческий Клаудин 18.2 и человеческий Клаудин 18.1

6.1.1 Конструирование клеточных линий, сверхэкспрессирующих человеческий Клаудин 18.2 и человеческий Клаудин 18.1

Для определения специфичности и функции антитела к человеческому Клаудину 18.2 полные кодирующие последовательности человеческого Клаудина 18.2 (Gene accession number: NM_001002026.2, синтезирована компанией Nanjing Genscript Biotech Corporation) и человеческого Клаудина 18.1 (Gene accession number: NM_016369.3, синтезирована компанией Nanjing Genscript Biotech Corporation) клонировали в лентивирусный вектор pLVX-IRES-puro, и вирусы были получены с использованием лентивирусной системы упаковки в соответствии с опубликованным способом (Mohammadi Z etl., Mol Biotechnol. 2015 Sep;57(9):793-800.). Полученные вирусы использовали для инфицирования клеток HEK293T, L929, КАТОIII и NCI-N87.

Моноклональные стабильные клеточные линии НЕК293Т-Клаудин 18.1, НЕК293Т-Клаудин 18.2, L929-Клаудин 18.2, КАТОШ-Клаудин 18.2 и NCI-N87-Клаудин 18.2 получали путем скрининга на основе пурамицина и отбора отдельных клонов. ВаF/3 клетки (DSMZ, Cat# ACC300) трансфицировали плазмидами, кодирующими человеческий Клаудин 18.2 или человеческий Клаудин 18.1, с использованием набора для трансфекции 4D-Nucleofector X (Lonza, Cat# V4XC-3012). Через 48ч после трансфекции клетки подвергали скринингу путем добавления 1,25 мг/мл гигромицина (Thermo Fisher Sci. Cat# 10687010). Отдельные клоны отбирали после 12 дней скрининга с получением, таким образом, моноклональных клеточных линий ВаF/3-Claud18.1 и ВаF/3-Claud18.2.

6.1.2 Детекция клеточных линий, сверхэкспрессирующих человеческий Клаудин 18.2 и человеческий Клаудин 18.1

Вестерн-блот использовали для детекции НЕК293Т-Клаудин 18.1 (Детекторное антитело: Proteintech, 66167-1-Ig) и FACS использовали для детекции других клеточных линий (Проточный цитометр: Beckman, CytoFlex; Детекторное антитело: IMAV362, последовательности которого описаны в патенте: CN 101312989 B). Как показано на Фиг. 1A-1D, результаты FACS продемонстрировали, что были получены моноклональные клеточные линии НЕК293Т-Клаудин 18.2, L929-Клаудин 18.2, КАТОШ-Клаудин 18.2 и NCI-N87-Клаудин 18.2, которые были в высокой степени положительными (близко к 100%) и с хорошей гомогенностью, и их использовали в последующих экспериментах. Результаты вестерн-блоттинга (Фиг. 1E) продемонстрировали, что все три стабильные клеточные линии НЕК293Т-Клаудин 18.1 сверхэкспрессировали человеческий Клаудин 18.1, при этом один клон НЕК293Т-Клаудин 18.1-1C2 показал более высокий уровень экспрессии по сравнению с остальными, и его использовали в последующих экспериментах.

6.2 Получение мышинных моноклональных антител к человеческому Клаудину 18.2

ДНК/клеточную иммунизацию осуществляли на мышах дикого типа для генерирования мышинных моноклональных антител к человеческому Клаудину 18.2. Каждой мышке Balb/c вводили путем инъекции через хвостовую вену 100 мкг плазмиды, содержащей полную кодирующую последовательность человеческого Клаудина 18.2. После четвертой и шестой иммунизации определяли сывороточные титры методом FACS. Мышей с высокими сывороточными титрами стимулировали клеточными линиями, сверхэкспрессирующими ВаF/3-Клаудин18.2, за 3-5 дней до слияния. ПЭГ-опосредованное слияние мышинных спленоцитов и мышинной миеломной клеточной линии Sp2/0 (ATCC, Cat# CRL-1581) осуществляли с использованием стандартного протокола слияния, с последующей селекцией в среде НАТ под давлением. FACS скрининг осуществляли через 10-14 дней после слияния.

Супернатанты примерно 6000 гибридом подвергали скринингу с использованием метода проточной цитометрии (доступный от Sartorius в виде Model iQue Screener Plus), и были получены и субклонированы 43 положительные гибридомы, связывающиеся с НЕК293Т-Клаудин 18.2 клеточной линией. 14 гибридом, которые специфически

связывались с человеческим Клаудином 18.2, но не с человеческим Клаудином 18.1, отбирали методом FACS с использованием клеточных линий НЕК293Т-Клаудин18.2 и НЕК293Т-Клаудин18.1. Отдельные клоны получали методом лимитирующих разведений и селекции субклонов.

Линия клеток рака желудка человека NUGC4 (приобретена в банке клеток JCRB в Японии, каталожный номер: JCRB0834) эндогенно экспрессирует Клаудин 18.2 и широко используется для оценки связывания между антителами и эндогенным Клаудином 18.2 и для разработки функциональных анализов. Клетки NUGC4 использовали для оценки клонов-кандидатов, и в результате отобрали 7 субклонов. После дальнейшего определения аффинности 2С6.9М был выбран для амплификации и гуманизации вариабельной области.

Для выявления подтипов антител из клонов гибридом-кандидатов использовали набор для быстрого изотипирования Pierce (Thermo Fisher SCI.Cat #26179) для идентификации 2С6.9М. Результаты идентификации показали, что тяжелая цепь относится к подтипу IgG1, а легкая цепь относится к подтипу каппа.

Клетки гибридомы размножали и около 8000 клеток собирали и лизировали. Первую цепь кДНК синтезировали с использованием набора для обратной транскрипции кДНК (Thermo Fisher Sci. Cat# 18080-200). Гены VH и VK (VL каппа) амплифицировали методом ПЦР из кДНК с использованием праймеров. Продукты ПЦР очищали с использованием набора для очистки ДНК (Qiagen, № по каталогу 28104) и лигировали с вектором ТОРО (Thermo Fisher Sci. № по каталогу K457540). Около 12 клонов отбирали из каждой реакции лигирования и секвенировали. Затем последовательности анализировали при помощи Vector NTI 11.5 (Thermo Fisher Sci.) и Sequencer 5.4.6 (Genecodes). Последовательность вариабельной области и последовательность CDR полученного мышинового антитела 2С6.9М представлены в Таблице 2.

Таблица 2

Аминокислотная последовательность вариабельной области и CDR 2С6.9 (SEQ ID NO:)

Клон №	VH	VL	Способ описания	CDR-Н1	CDR-Н2	CDR-Н3	CDR-L1	CDR-L2	CDR-L3
2С6.9М	23	24	IMGT	1	2	3	4	5	6
			Abm	7	8	9	10	11	12

6.3 Гуманизация мышинового антитела 2С6.9М

Метод CDR-прививки использовали для гуманизации мышинового антитела 2С6.9М. Вкратце, способ гуманизации включал следующие стадии: аминокислотные последовательности мышинных моноклональных антител выравняли с аминокислотными последовательностями человеческих антител зародышевой линии для идентификации человеческих каркасов зародышевой линии с высокой степенью гомологии и хорошими физико-химическими свойствами; определяли аффинность к HLA-DR и затем отбирали человеческие каркасы зародышевой линии с низкой аффинностью к

HLA-DR; затем шесть CDR областей мышинных антител прививали к выбранным каркасам тяжелой цепи и легкой цепи.

В частности, CDR тяжелой и легкой цепей мышинового антитела 2C6.9M прививали к каркасам (FR) соответствующих матриц для гуманизации. Матрицы для гуманизации тяжелой цепи и легкой цепи 2C6.9M представляют собой последовательность зародышевой линии человека IGHV4-59*01 (IMGT идентификационный номер AB019438) и IGKV4-1*01 (IMGT идентификационный номер Z00023), соответственно.

Кроме того, используя компьютерное моделирование осуществляли молекулярный докинг для анализа варибельной области и окружающих ее каркасных аминокислотных последовательностей, чтобы определить пространственный стереоскопический способ связывания антител. Путем расчета электростатических сил, Ван-дер-Ваальсовых сил, гидрофобных взаимодействий и энтропии были идентифицированы критические аминокислотные остатки, которые могут взаимодействовать с Клаудином 18.2 или сохранять пространственную структуру в аминокислотной последовательности мышинового антитела, и эти мышинные аминокислоты сохранялись после прививки. Другими словами, в остатках FR-области матрицы для гуманизации была произведена серия обратных мутаций, чтобы аффинности мышинных антител могли быть максимально сохранены в гуманизированных антителах.

Последовательности варибельной области мышинового антитела 2C6.9M показаны в SEQ ID NO: 23 и SEQ ID NO: 24, а его последовательности CDR показаны в SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 12. Чтобы избежать возникновения изомеризации, не влияя при этом на аффинность, аминокислотная последовательность 2C6.9 CDR-H2 была модифицирована в изобретении. Модифицированные последовательности показаны в SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 22. Наконец, были сконструированы 2 гуманизированных антитела, названные 2C6.9-hz11 и 2C6.9-hz21, соответственно. Константная область тяжелой цепи каждого антитела представляет собой константную область тяжелой цепи человеческого IgG1 дикого типа (SEQ ID NO:16), а константная область легкой цепи антитела представляет собой константную область легкой цепи к человеческого IgG1 дикого типа (SEQ ID NO:17).

Варибельная область, константная область и аминокислотная последовательность тяжелой/легкой цепи каждого антитела 2C6.9 показаны в Таблице 1.

Кодон-оптимизированные кДНК аминокислотных последовательностей тяжелой и легкой цепей гуманизированного антитела 2C6.9 синтезировали и лигировали в плазмиду pcDNA3.4 (по заказу Nanjing Genscript Biotech Corporation). pcDNA3.4, соответствующую тяжелой и легкой цепи, одновременно трансфицировали в клетки Expi293F (приобретенные у компании Thermo) и клеточный супернатант очищали на аффинной колонке с белком А (MabSelect SuRe, GE) с получением гуманизированного моноклонального антитела 2C6.9.

6.4 Детекция аффинности гуманизированного моноклонального антитела 2C6.9
Аффинность 2C6.9-hz21 к человеческому Клаудину 18.2 на клеточной мембране

определяли с использованием клеток НЕК293Т-Клаудин 18.2. Конкретные процедуры были следующими: клетки НЕК293Т-Клаудин 18.2 отделяли и центрифугировали, после чего дважды промывали PBS. Затем клетки ресуспендировали в PBS, содержащем 1% BSA, и высевали в 96-луночный планшет с коническим дном по 300000 клеток на лунку в объеме 50 мкл, всего 20 лунок. Затем в каждую лунку добавляли по отдельности 50 мкл 2С6.9-hz21 и IMAВ362 антитела с 11 концентрациями, начиная с 1000 нМ, с трехкратным разведением. Человеческий IgG служил в качестве отрицательного контроля. Реакционные смеси тщательно перемешивали и инкубировали в течение 1 часа при 4°С в темноте с последующей трехкратной промывкой с использованием PBS, добавляли FITC-меченое вторичное антитело против Fc человека (Biolegend, 409322) и инкубировали в течение 0,5 часа при 4°С в темноте. Детекцию осуществляли методом проточной цитометрии (Beckman, Cytotflex) после трехкратной промывки PBS.

Как показано на Фиг. 2 и в Таблице 3, EC50 значение аффинности связывания 2С6.9-hz21 с НЕК293Т-Клаудин 18.2 было ниже, чем у IMAВ362; и максимальное значение флуоресценции 2С6.9-hz21 было выше, чем у IMAВ362, что указывает на то, что аффинность 2С6.9-hz21 к Клаудину 18.2 на клеточной мембране была сильнее, чем у IMAВ362.

Таблица 3

Измерение аффинности гуманизированного антитела 2С6.9-hz21 к НЕК293Т-Клаудин 18.2 методом проточной цитометрии

Название антитела	EC50 (нМ)	Макс. MFI
2С6.9-hz21	5,767	165866,3
ИМАВ362	8,217	156715,7

6.5 Определение аффинности и специфичности гуманизированного антитела 2С6.9

Человеческий Клаудин 18.2 относится к семейству тетраспанинов и имеет сложную структуру. Клеточный анализ ELISA, таким образом, осуществляли для сохранения структуры Клаудина 18.2. Стабильные клеточные линии L929-Клаудин 18.2, сконструированные в 6.1, использовали для детекции. В частности, L929-Клаудин 18.2 адгезивные клетки отделяли обработкой с использованием 2мМ EDTA. Клетки ресуспендировали и доводили до 2×10^5 /мл и 100 мкл повторно полученной суспензии высевали в 96-луночный планшет и инкубировали в течение ночи при 37°С. На следующий день среду удаляли и планшет промывали PBS один раз. В планшет добавляли 4% формальдегид 100 мкл/лунка. После 30-мин инкубации при комнатной температуре формальдегид удаляли и затем промывали два раза при помощи PBS. Затем в планшет добавляли блокирующий буфер (PBS, содержащий 2% BSA) при 100 мкл/лунка и инкубировали при 37°С в течение 2ч. После удаления блокирующего буфера в соответствующие лунки добавляли 100 мкл/лунка серийно разведенного антитела (начиная с 1 мкМ, с 4-кратным разведением, в общей сложности 11 концентраций) и затем

инкубировали при 37°C в течение 2ч. Планшет промывали 250 мкл PBST 5 раз и каждый раз давали выстояться в течение 2 мин. В планшет добавляли 100 мкл/лунка меченное пероксидазой хрена вторичное анти-человеческое IgG антитело (HRP-anti-Human IgG, Jackson ImmunoResearch, 109-035-003), разведенное 1:10000 в PBS (содержащем 2% BSA). Планшет инкубировали при 37°C в течение 1ч и промывали 6 раз 250 мкл PBST, при этом каждый раз планшету давали выстояться в течение 2 мин. Добавляли раствор ТМВ (Thermo, 34029) 100 мкл/лунка. Реакционные смеси инкубировали при 37°C в течение 20 мин и реакции останавливали добавлением 50 мкл 2 моль/л H₂SO₄. Значения поглощения OD450 нм получали на планшет-ридере (MD, SpectraMax M2) и результаты использовали для подбора кривой с использованием программы Graphpad Prism.

Результаты показаны на Фиг. 3 и в Таблице 4, показывающих, что аффинность гуманизированного антитела 2С6.9-hz21 к человеческому Клаудину 18.2 значительно выше, чем у IMAВ362. В этом же эксперименте аффинность гуманизированного антитела 2С6.9-hz11 была близка к аффинности антитела 2С6.9-hz21 (результат не показан).

Таблица 4

Детекция аффинности связывания гуманизированного антитела 2С6.9-hz21 с L929-Клаудин 18.2 клетками с использованием клеточного анализа ELISA

Название антитела	EC50(нМ)	Макс. значение сигнала (OD450)
2С6.9-hz21	0,12	0,92
ИМАВ362	0,15	0,53

Специфичность антител-кандидатов определяли методом FACS. Конкретные процедуры были следующими: клетки НЕК293Т, НЕК293Т-человеческий Клаудин 18.1 и НЕК293Т-человеческий Клаудин 18.2 отделяли и затем центрифугировали. После промывки два раза раствором PBS клетки ресуспендировали с использованием PBS, содержащего 1% BSA. К 300000 клеткам для каждой клеточной линии добавляли антитела-кандидаты при конечной концентрации 1000 нМ, тщательно смешивали и инкубировали в течение 1ч при 4°C, защищая от света. Затем клетки промывали PBS три раза и добавляли FITC-меченное вторичное антитело против человеческого Fc (BioLegend, 409322) с последующей инкубацией в течение 0,5 часа при 4°C в темноте. Детекцию осуществляли методом проточной цитометрии (Beckman, Cytoflex) после промывки раствором PBS три раза.

Как показано на Фиг. 4, 2С6.9-hz21 может специфически связываться с человеческим Клаудином 18.2, но не с человеческим Клаудином 18.1.

6.6 Определение комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC) гуманизированного антитела 2С6.9

2С6.9 относится к IgG1 подтипу, который может эффективно активировать классический путь комплемента и индуцировать комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). В исследовании использовали сыворотку морских свинок (приобретенную у

Zhengzhou Baiji, номер по каталогу S0001), которая богата комплементами, для определения CDC активности 2С6.9. Конкретные процедуры являются следующими: НЕК293Т-Клаудин 18.2 клетки собирали и центрифугировали с последующим регулированием плотности клеток. Клетки в количестве 5×10^4 /лунка высевали в планшет и инкубировали в течение ночи. DMEM, содержащую 20% сыворотки морских свинок, подготавливали на следующий день и использовали для разбавления 2С6.9 и IMAВ362. Начиная с 20 мкг/мл получали 10 концентраций с двукратным разведением. Исходную клеточную культуральную среду для клеток НЕК293Т-Клаудин 18.2 удаляли и разведения антител добавляли в соответствующие лунки по 100 мкл/лунка. 10 мкл/лунка лизисного буфера использовали в качестве положительного контроля. Реакционные смеси оставляли выстаиваться в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ и инкубировали в течение 3ч. Затем добавляли CellTiter-Glo Luminescent (CTG, приобретенный у Promega, Item No.: G7573) при 50 мкл/лунка для окрашивания, с последующим 30-сек смешиванием, и оставляли выстаиваться в течение 1 мин при комнатной температуре. Значение сигнала флуоресценции затем определяли в считывающем устройстве для микропланшетов (MD, SpectraMax M2), результаты вводили в программу Graphpad Prism для подбора кривой.

Как показано на Фиг. 5 и в Таблице 6, CDC активность 2С6.9-hz21 была более сильной по сравнению с активностью контрольного антитела IMAВ362.

Таблица 6

Определение CDC активности анти-Клаудин 18.2 гуманизованного антитела 2С6.9-hz21

Название антитела	EC50 значение (нг/мл)
2С6.9-hz21	1363
IMAV362	3317

6.7 Определение антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) гуманизованного антитела 2С6.9

2С6.9 относится к IgG1 подтипу и обладает относительно сильной антитело-зависимой клеточно-опосредованной цитотоксичностью (ADCC). Анализ НК-клеточно-опосредованного киллинга использовали для определения ADCC активности 2С6.9. Конкретные процедуры были следующими: Клетки НЕК293Т-Клаудин 18.2 собирали и центрифугировали с последующим регулированием плотности клеток. Клетки в количестве 1×10^4 /лунка высевали в планшет и инкубировали в течение ночи. Среду удаляли на следующий день. NK92MI-CD16a клетки (Huabo Biopharm) центрифугировали, ресуспендировали в МЕМА среде и доводили до 1×10^6 /мл, затем клетки 50 мкл/лунка добавляли в соответствующие лунки. 2С6.9-hz21 и IMAВ362 антитела разводили в МЕМА среде. Для НЕК293Т-Клаудин18.2 клеток испытывали 10 концентраций антитела, начиная с 40 мкг/мл, с 5-кратным разведением. Для NUGC-4 клеток испытывали 11 концентраций антитела, начиная с 2 мг/мл, с 5-кратным разведением. Разведения антител по 50 мкл/лунка добавляли в соответствующие лунки и реакционные смеси оставляли

выстаиваться в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ и инкубировали в течение 5,5ч. Затем в лунку с положительным контролем добавляли лизисный буфер и инкубировали еще в течение 0,5ч. В лунки добавляли лактатдегидрогеназу (LDH) по 50 мкл/лунка в качестве детектирующего агента (DOJINDO LABORATORISE, CK12) и поглощение при 490нм регистрировали через каждые 10мин в считывающем устройстве для микропланшетов (MD, SpectraMax M2). Результаты вводили в программу Graphpad Prism для подбора кривой.

Как показано на Фиг. 6 и в Таблице 7, ADCC активность 2С6.9-hz21 в отношении НЕК293Т-Клаудин 18.2 сильнее, чем активность IMAВ362.

Таблица 7

Определение ADCC активности гуманизированного антитела 2С6.9-hz21 к человеческому Клаудину 18.2

Название антитела	EC50 значение (нг/мл)	Макс. цитотоксичность (%)
2С6.9-hz21	67,67	30
IMAB362	57,66	20

Пример 7. Получение ADC, нацеленного на Клаудин 18.2 (2С6.9-ADC)

2С6.9-TL001 получен путем конъюгации TL001, полученного в Примере 3, с гуманизированным моноклональным антителом 2С6.9. Способ получения является следующим:

(1) Конъюгация: к 30 мг 2С6.9-hz21 антитела добавляли раствор 20 мМ РВ+105 мМ NaCl+100 мМ динатрий эдетата (рН 7,7), рН доводили до 7,7 раствором 2М Tris, смесь разбавляли раствором 20 мМ РВ+105 мМ NaCl рН7,7 (конечная концентрация динатрий эдетата составляла 5 мМ, а конечная концентрация антитела составляла 15 мг/мл), равномерно смешивали, добавляли раствор ТСЕР 10 мМ и тщательно смешивали, полученной смеси давали выстояться при комнатной температуре в течение некоторого времени (30 или 90 минут); затем добавляли TL001, растворенный в диметилсульфоксиде (молярное отношение к антителу: 5:1 или 9:1), тщательно смешивали и оставляли выстаиваться при комнатной температуре в течение 2 часов с получением конъюгированного образца, получившего название 2С6.9-TL001.

(2) Замена буфера: 30 кДа 50-мл ультрафильтрационную пробирку (Millipore) использовали для замены буфера для 2С6.9-TL001, замещающий раствор представлял собой буфер 10 мМ гистидина-гидрохлорида гистидина+8% сахарозы (рН 6,0), с количеством замен=15; образец собирали и добавляли 10% Tween-20, при этом конечная концентрация Tween-20 в образце составляла 0,02% (масс./об.).

3) Испытание:

После замены 2С6.9-TL001 подвергали ЖХ-МС анализу молекулярной массы при следующих условиях:

Условия хроматографического определения:

Колонка для жидкостной хроматографии: Thermo MAbPac RP 3,0×100 мм;

Подвижная фаза А: 0,1%FA/98%Н₂O/2%ACN;

Подвижная фаза В: 0,1%FA/2%Н₂O/98%ACN;

Скорость потока: 0,25 мл/мин;

Температура камеры для образца: 8°C; температура колонки: 60°C; размер образца:

1 мкл;

Время (мин)	2	20	22	25	26	30
Подвижная фаза А (%)	75	60	5	5	75	75
Подвижная фаза В (%)	25	40	95	95	25	25

Переключающий клапан: 0-3 мин на сброс, 3-22 мин на МС, 22-30 мин на сброс

Условия масс-спектрометрии:

Масс-спектрометрическая система: AB Sciex Triple TOF 5600+;

Параметры: GS1 35; GS2 35; CUR 30; TEM 350; ISVF 5500; DP 200; CE 10; m/z 600-4000; Временные интервалы в сумме 40.

Теоретическая молекулярная масса и измеренная молекулярная масса легкой цепи и тяжелой цепи 2С6.9-TL001, полученного конъюгацией TL001 и 2С6.9-hz21 (тяжелая цепь рассчитана по основной гликоформе G0F), показаны в таблице ниже:

Пептидная цепь		mAb	DAR1	DAR2	DAR3	DAR4
LC	Теоретическое значение (Да)	24090,8	25641,6	27192,3	28743,1	30293,8
	Измеренное значение (Да)	24091,6	25642,1	Не определено	Не определено	Не определено
НС	Теоретическое значение (Да)	49955,2	51505,9	53056,7	54607,4	56158,2
	Измеренное значение (Да)	49957,5	51507,9	53058,5	54609,2	56157,9

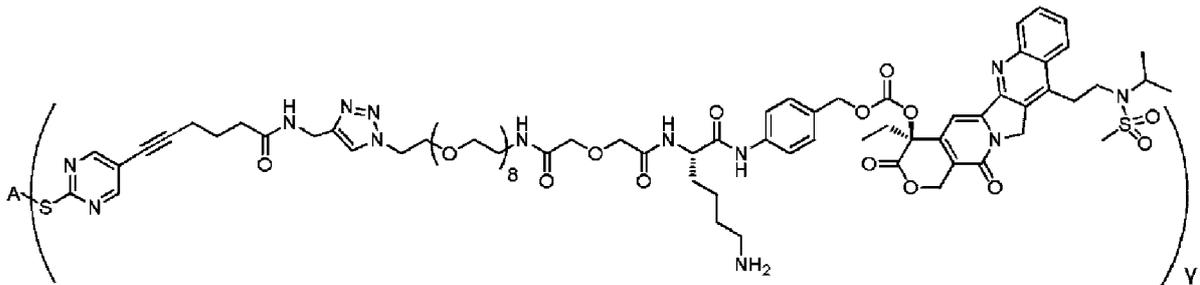
Когда исходное соотношение для конъюгации между TL001 и 2С6.9-hz21 составляет 5:1, легкая цепь (LC) антитела 2С6.9-TL001 конъюгируется с 0-1 токсином (доли LC и DAR1 составляют 57,8% и 42,2%, соответственно), а тяжелая цепь (НС) конъюгируется с 0-4 токсинами (доли НС, DAR1, DAR2, DAR3 и DAR4 составляют 22,5%, 30,3%, 25,0%, 21,9% и 0,3%, соответственно). Поэтому отношение токсина к антителу (DAR) составляет 3,79, и формула для расчета следующая: $DAR = \text{легкая цепь} \cdot DAR1 \cdot 2 + \text{тяжелая цепь} \cdot (DAR1 \cdot 1 + DAR2 \cdot 2 + DAR3 \cdot 3 + DAR4 \cdot 4) \cdot 2$.

Когда исходное соотношение для конъюгации между TL001 и 2С6.9-hz21 составляет 9:1, легкая цепь (LC) антитела 2С6.9-TL001 конъюгируется с 0-1 токсином (доли LC и DAR1 составляют 7,5% и 92,5%, соответственно), а тяжелая цепь (НС) конъюгируется с 0-4 токсинами (доли НС, DAR1, DAR2, DAR3 и DAR4 составляют 2,5%, 10,2%, 9,8%, 76,4% и 1,1%, соответственно). Поэтому отношение токсина к антителу

(DAR) составляет 7,12.

Когда исходное соотношение для конъюгации между TL001 и 2C6.9-hz21 составляет 9:1, после конъюгации и катионной хроматографии легкая цепь 2C6.9-TL001 конъюгирована с 0-1 токсином (LC и DAR1 составляют 1,5% и 24,0%, соответственно), а тяжелая цепь конъюгирована с 0-4 токсинами (НС, DAR1, DAR2, DAR3 и DAR4 составляют 0,7%, 2,1%, 14,3%, 54,5% и 2,8%, соответственно). Полученное отношение лекарственного средства к антителу (DAR) было рассчитано как составляющее 7,40.

Молекулярная структура ADC 2C6.9-TL001 представлена ниже:



где γ равно целому числу от 1 до 10, и А представляет собой 2C6.9-hz21.

Конъюгаты подвергали детекции методом размерно-эксклюзионной (SEC) ВЭЖХ.

Хроматографические условия:

Колонка для жидкостной хроматографии: TSKgel G3000SWx1, 300×7,8 мм, 5 мкм;

Подвижная фаза: 90 ммоль/л Na₂HPO₄, 30 ммоль/л NaH₂PO₄, 200 mM NaCl, 5% ацетонитрила;

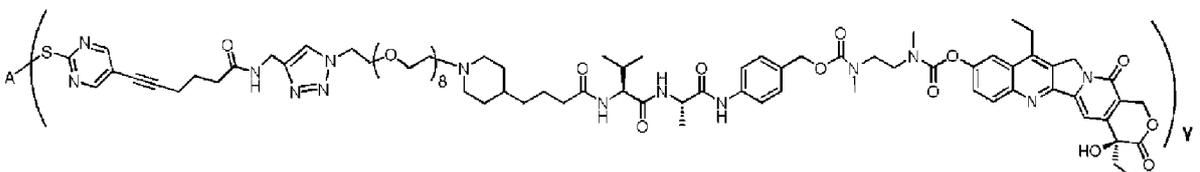
Скорость потока: 0,8 мл/мин; длина волны детекции: 280 нм; температура колонки: комнатная температура; температура камеры для образца: 8°C;

Размер образца: 40 мкл; изократический режим: 30 мин.

SEC хроматограммы 2C6.9-TL001 (DAR: 3,79) и 2C6.9-TL001 (DAR: 7,12) показаны на Фиг. 7-8, SEC хроматограмма 2C6.9-TL001 (DAR:7,40) показана на Фиг. 13. В соответствии с временем удерживания и отношением площадей пиков SEC, подтверждено, что молекулярная масса основных продуктов конъюгирования составляет около 150 кД, т.е. 2C6.9-TL001, полученный конъюгацией TL001 и 2C6.9-hz21, все еще сохраняет полную структуру антитела.

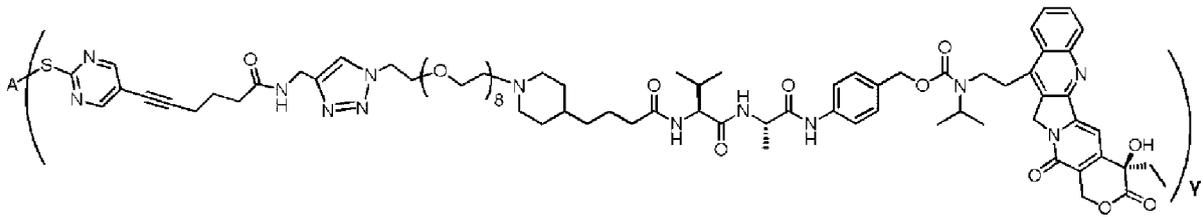
Такой же способ получения использовали для конъюгации TL002 и TL003, полученных в Примерах 4 и 5, с гуманизированным моноклональным антителом 2C6.9 для получения 2C6.9-TL002 и 2C6.9-TL003, получение и способ детекции описаны выше. Значения DAR полученных 2C6.9-TL002 и 2C6.9-TL003 составляют 6,95 и 7,03, соответственно.

Молекулярная структура ADC 2C6.9-TL002 представлена ниже:



где γ равно целому числу от 1 до 10, и А представляет собой 2С6.9-hz21.

Молекулярная структура 2С6.9-TL003 представлена ниже:



где γ равно целому числу от 1 до 10, и А представляет собой антитело 2С6.9.

Пример 8. Определение аффинности 2С6.9-TL001

Клеточный анализ ELISA осуществляли для определения аффинности 2С6.9-TL001 (DAR: 7,12) к Клаудину 18.2 на поверхности клеточной оболочки. Конкретные процедуры были следующими: L929-Клаудин 18.2 адгезивные клеточные линии отделяли при помощи 2 мМ EDTA, ресуспендировали до 2×10^5 клеток/мл и 100мкл повторно полученной суспензии добавляли в 96-луночный планшет и инкубировали при 37°C в течение ночи; на следующий день среду удаляли и планшет промывали PBS один раз. В планшет добавляли 100 мкл/лунка 4% раствор формальдегида при комнатной температуре на 30 мин; формальдегид затем удаляли, затем два раза осуществляли промывку раствором PBS и добавляли 100 мкл PBS (содержащего 2% BSA) и инкубировали в течение 2ч; блокирующий раствор удаляли, подлежащий испытанию 2С6.9-TL001 разбавляли PBS (содержащим 2% BSA), начиная с 9,375 мкг/мл, с 4-кратным разведением, в общей сложности 9 концентраций, и затем добавляли в планшет при 100 мкл/лунка и инкубировали при 37°C в течение 2ч; планшет промывали 250 мкл PBST 5 раз и каждый раз давали выстояться в течение 2 мин; PBS (2% BSA) использовали для разбавления меченого пероксидазой хрена (HRP) вторичного антитела против человеческого IgG (HRP-anti-Human IgG, Jackson immunoresearch) при соотношении 1:10000, разведения добавляли в планшет при 100 мкл/лунка и инкубировали при 37°C в течение 1ч; после промывки с использованием 250 мкл PBST 6 раз клеткам каждый раз давали выстояться в течение 2 мин; в соответствующую лунку добавляли 100 мкл хромогенного раствора ТМВ (Thermo) для проявления 20 мин при 37°C; добавляли 50 мкл 2 моль/л H₂SO₄ для остановки реакции, значения поглощения OD450 нм получали в считывающем устройстве для микропланшетов (MD) и значения вводили в программу Graphpad Prism для подбора кривой. Результаты эксперимента показаны на Фиг. 9, и EC₅₀ значение аффинности 2С6.9-TL001 (DAR: 7,12) к Клаудину 18.2 на поверхности клеточной мембраны составило 39,94 нг/мл. Антитело 2С6.9-hz21, после конъюгирования с TL001, все еще обладало отличной аффинностью к Клаудину 18.2.

Пример 9. Детекция киллерной активности 2С6.9-ADC на опухолевых клеточных линиях с высокой экспрессией Клаудина18.2

Киллерную активность 2С6.9-TL001 на клеточных линиях с высокой экспрессией Клаудина18.2 определяли с использованием клеток НЕК293Т-Клаудин 18.2 и НЕК293Т-Клаудин 18.1. Конкретные стадии эксперимента представляют собой следующие: за

день до эксперимента клетки разводили средой DMEM+10% FBS, суспензию загружали в планшет по 100 мкл/лунка и 1×10^4 клеток/лунка для выстаивания в течение ночи; на следующий день молекулы ADC 4-кратно разбавляли базовой средой DMEM, начиная с 150 мкг/мл (DAR:7,12) или 262,5 мкг/мл (DAR:3,79), в общей сложности 11 концентраций, разведения добавляли в соответствующие лунки, по 100 мкл на каждую лунку, до достижения конечной сывороточной концентрации 5%; клетки инкубировали при 37°C в 5% CO₂ инкубаторе в течение 48ч; затем добавляли (20 мкл/лунка) ССК8 (Rhinogen), клетки помещали в 5% CO₂ инкубатор на 0,5-2,5ч при 37°C, значения поглощения OD450 нм получали каждые полчаса в считывающем устройстве для микропланшетов (MD) и значения вводили в программу Graphpad Prism для подбора кривой.

Как показано на Фиг. 10А, 10В и 10С, 2С6.9-TL001 может эффективно убивать НЕК293Т-Клаудин 18.2 клетки. Когда значение DAR составляет 7,12, его EC₅₀ значение составляет 473 нг/мл; когда значение DAR составляет 3,79, его EC₅₀ значение составляет 794,1 нг/мл. В то же время, EC₅₀ 2С6.9-TL001 (DAR: 7,12) для киллинга НЕК293Т-Клаудин18 составляет 3900 нг/мл, и киллерная активность 2С6.9-TL001 (DAR: 7,12), направленная на Клаудин 18.2-клетки, значительно сильнее, чем в отношении Клаудин 18.1-клеток (разница примерно в 8 раз), показывая, что киллинг-эффект 2С6.9-TL001 является Клаудин 18.2-специфическим.

Киллерную активность 2С6.9-TL002 и 2С6.9-TL003 на клетках НЕК293Т-Клаудин 18.2 и НЕК293Т-Клаудин 18.1 определяли тем экспериментальным способом, который описан выше. Результаты эксперимента на Фиг. 10D и 10Е показывают, что 2С6.9-TL002 и 2С6.9-TL003 могут эффективно убивать НЕК293Т-Клаудин 18.2 клетки, и EC₅₀ значения составляли 628,9 нг/мл и 540,2 нг/мл, соответственно; EC₅₀ значения 2С6.9-TL002 и 2С6.9-TL003 для киллинга НЕК293Т-Клаудин18.1 составляли 30590 нг/мл и 8258 нг/мл, соответственно. Киллерная активность 2С6.9-TL002 и 2С6.9-TL003 в отношении НЕК293Т-Клаудин 18.2 клеток была значительно сильнее, чем в отношении Клаудина 18.1, показывая, что киллинг-эффект был Клаудин 18.2-специфическим.

Пример 10. Детекция киллерной активности 2С6.9-ADC на клеточных линиях с эндогенно экспрессированным Клаудином 18.2

Клеточная линия рака желудка NUGC-4 была выбрана для детекции киллерной активности 2С6.9-TL001 на клетках с эндогенно экспрессированным Клаудином 18.2. Конкретные стадии эксперимента представляют собой следующие: за день до эксперимента клетки разводили средой RPMI 1640+10% FBS, суспензию загружали в планшет по 100 мкл/лунка и 1×10^4 клеток/лунка для выстаивания в течение ночи; на следующий день 2С6.9-TL001 разводили 3-кратно средой RPMI 1640, начиная с 1000 мкг/мл (DAR 7,12) или 1750 мкг/мл (DAR: 3,79), в общей сложности 11 концентраций, разведения добавляли в соответствующие лунки по 100 мкл на лунку, и конечная сывороточная концентрация достигала 5%; клетки инкубировали при 37°C в 5% CO₂ инкубаторе в течение 72ч; затем добавляли ССК8 (Rhinogen), 20 мкл/лунка, клетки

инкубировали при 37°C в 5% CO₂ инкубаторе в течение 0,5-2,5ч, значения поглощения OD450 нм получали в считывающем устройстве для микропланшетов (MD) каждые полчаса, значения вводили в программу Graphpad Prism для подбора кривой. Результаты эксперимента показаны на Фиг. 11А и 11В, 2С6.9-TL001 может эффективно убивать NUGC-4 клетки: когда значение DAR составляет 7,12, его EC₅₀ значение составляет 2,383 мкг/мл; когда значение DAR составляет 3,79, его EC₅₀ значение составляет 10,01 мкг/мл.

Киллерную активность 2С6.9-TL002 и 2С6.9-TL003 в отношении NUGC-4 клеток определяли тем же экспериментальным способом, который описан выше. Исходная концентрация ADC составляла 500 мкг/мл, с 4-кратным разведением, в общей сложности 11 концентраций. Как показано на Фиг. 11С, 2С6.9-TL002 и 2С6.9-TL003 могут эффективно убивать NUGC-4 клетки, и EC₅₀ значения соответственно составляют 54,92 мкг/мл и 123,94 мкг/мл.

Пример 11. Детекция интернализации 2С6.9-hz21 антитела

NUGC-4 были выбраны для определения способности к интернализации антитела 2С6.9. Конкретные стадии эксперимента были следующими: NUGC-4 клетки расщепляли трипсином и подсчитывали, ресуспендировали в PBS (содержащем 1% BSA), плотность клеток доводили до 3×10^6 /мл; 2С6.9-hz21 антитело при конечной концентрации 100 мкг/мл добавляли к 100 мкл ресуспендированных клеток, изотипический человеческий IgG использовали в качестве отрицательного контроля и инкубировали на льду в течение 1ч; после инкубации клетки промывали предварительно охлажденным PBS три раза, ресуспендировали с использованием NUGC-4 клеточной культуральной среды (1640+10% FBS) и разделяли на две части: одну часть инкубировали при 37°C в клеточном инкубаторе в течение 4ч (группа эндоцитоза), а другую часть инкубировали на льду в течение 4ч (группа аффинности); после инкубации клетки промывали предварительно охлажденным PBS три раза, ресуспендировали в 50 мкл PBS (содержащем 1% BSA), добавляли анти-человеческое флуоресцентное вторичное антитело (Biolegend) и инкубировали при 4°C в течение получаса; после инкубации клетки промывали предварительно охлажденным PBS три раза, детекцию осуществляли методом проточной цитометрии (Beckman), процент интернализации антитела рассчитывали в соответствии с формулой: $\text{эндоцитоз (\%)} = [1 - (\text{MFI}_{37^\circ} \text{ группа антитела} - \text{MFI}_{37^\circ} \text{ контрольная группа}) / (\text{MFI}_{\text{группа антитела на льду}} - \text{MFI}_{\text{контрольная группа на льду}})] \times 100\%$. Результаты эксперимента показали, что процент интернализации 2С6.9-hz21 на NUGC-4 клетках за 4 часа составил 37,79%, показывая, что конъюгаты 2С6.9-hz21 имеют потенциал для интернализации лекарственных средств в клетки и уничтожения опухолевых клеток.

Пример 12. Определение эффективности 2С6.9-ADC in vivo

Модель ксенотрансплантата, полученного из линии раковых клеток (CDX), и модель ксенотрансплантата, полученного от пациента (PDX), используют для оценки противоопухолевого эффекта молекул ADC.

12.1 CDX-модель NCI-N87-Клаудин18.2+ у бестимусных мышей Balb/c

Клетки NCI-N87-Клаудин18.2 культивировали в среде RPMI1640, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки, при 37°C и 5% CO₂. Клетки в фазе экспоненциального роста собирали и ресуспендировали в PBS, а затем подкожно инокулировали самкам голых мышей Balb/c (Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.) в количестве 5×10^6 клеток на мышью (суспендированных в 0,1 мл PBS) для установления подкожно трансплантированной опухолевой модели. Когда средний объем опухоли достигал от 70 до 100 мм³, мышью случайным образом разделяли на группы в соответствии с объемом опухоли, по 7 мышью в группе. День распределения по группам был установлен как день 0, и группы представляли собой группу изотипического контрольного человеческого IgG1 антитела (отрицательный контроль) (сокращенно IgG1), 2C6.9-TL001 (DAR: 7,12) 1 мг/кг группу и 3 мг/кг группу, а также 2C6.9-TL002 (DAR: 6,95) 1 мг/кг группу и 3 мг/кг группу. Все образцы вводили через хвостовую вену два раза в неделю, всего 6 раз.

После введения диаметр опухоли измеряли штангенциркулем два раза в неделю и рассчитывали объем опухоли по следующей формуле: $V=0,5 a \times b^2$, где *a* и *b* представляют собой длинный диаметр и короткий диаметр опухоли, соответственно. Случаи смерти животных наблюдали и регистрировали каждый день.

Процент ингибирования роста опухоли TGI (%) рассчитывали по следующей формуле для оценки противоопухолевого эффекта:

$$TGI (\%) = [1 - (V_{Tend} - V_{Tstart}) / (V_{Cend} - V_{Cstart})] \times 100\%$$

где

V_{Tend} : средний объем опухоли в конце эксперимента в группе лечения

V_{Tstart} : средний объем опухоли перед началом введения в группе лечения

V_{Cend} : средний объем опухоли в конце эксперимента в группе отрицательного контроля

V_{Cstart} : средний объем опухоли перед началом введения в группе отрицательного контроля

Относительный показатель пролиферации опухоли T/C (%) рассчитывали по следующей формуле для оценки противоопухолевого эффекта:

$$T/C (\%) (\text{объем опухоли}) = (T_t / T_0) / (C_t / C_0) \times 100\%$$

где

T_0 : средний объем опухоли в группе лечения в начале эксперимента (т.е. P0)

T_t : средний объем опухоли в группе лечения при каждом измерении

C_0 : средний объем опухоли в группе отрицательного контроля в начале эксперимента (т.е. P0)

C_t : средний объем опухоли в группе отрицательного контроля при каждом измерении.

Результаты эксперимента показаны в Таблице 8 и на Фиг. 12A и 12B, 2C6.9-TL001 (DAR: 7,12) показал значительный ингибирующий эффект на рост опухоли в модели опухоли с трансплантированным NCI-N87-Клаудин18.2 раком желудка дозозависимым

образом. По сравнению с группой отрицательного контроля, после 6 доз (день 21) степень ингибирования опухоли (TGI) в группе 2C6.9-TL001 1 мг/кг достигла 96,03%, а у 4 мышей наблюдалась частичная регрессия опухоли; в то время как в группе 3 мг/кг TGI достигала 133,50%, и у 3 мышей была частичная регрессия опухоли, а у 4 мышей была полная регрессия опухоли. Значение TGI в группе 2C6.9-TL002 3 мг/кг составило 40,11%, а группа 1 мг/кг не имела явного противоопухолевого эффекта. Во всех группах лечения в течение периода наблюдения не наблюдалось значительной потери массы тела, и животные имели хорошую переносимость.

Таблица 8

CDX-модель NCI-N87-Клаудин18.2+ у бестимусных мышей Balb/c

Группа	День 21					
	Доза (мг/кг)	Объем опухоли (мм ³) ($\bar{x} \pm SEM$)	TGI (%)	T/C (%)	Регрессия опухоли (PR/CR)	P значение
IgG1	3	479,07±28,15	--	--	0/0	--
2C6.9-TL001	1	143,91±28,23	96,03	29,96	4/0	<0,0001
2C6.9-TL001	3	12,96±4,62	133,50	2,70	3/4	<0,0001
2C6.9-TL002	1	461,02±36,32	5,28	95,94	0/0	ns
2C6.9-TL002	3	339,28±43,91	40,11	70,62	1/0	<0,0001

Примечание: TGI: степень ингибирования роста опухоли; T/C: относительный показатель пролиферации опухоли; PR: частичная регрессия опухолей; CR: полная регрессия опухолей; P значение представляет собой значимую разницу по сравнению с IgG1 группой; N/A: не определено; ns: $p > 0,05$, нет статистически значимой разницы

12.2 Сравнение эффективности *in vivo* 2C6.9-TL001 и 2C6.9 моноклональное антитело+химиотерапия в CDX-модели

Модели подкожно трансплантированных опухолей NCI-N87-Клаудин18.2 устанавливали в соответствии с Примером 12.1 и осуществляли деление на группы. День распределения по группам был установлен как день 0. Группы представляли собой соответственно группу введения человеческого IgG1 изотипического контрольного антитела (отрицательный контроль) (IgG1 для краткости), группу введения паклитаксела (альбумин-связывающегося типа), объединенную группу 2C6.9 mAb с группой паклитаксела и группу 2C6.9-TL001 (DAR: 7,12). Все образцы вводили путем инъекции через хвостовую вену два раза в неделю в общей сложности 3 недели. Доза показана в

Таблице 9.

Результаты эксперимента показаны в Таблице 9 и на Фиг. 12С. По сравнению с группой отрицательного контроля все из трех групп введения смогли показать существенное ингибирование роста опухоли после 11 дней введения лекарственного средства, особенно группа 2С6.9-TL001 (DAR: 7,12). Степень ингибирования опухоли (TGI) в группе 2С6.9-TL001 (DAR: 7,12) достигает 121,68%, и 6 из 7 мышей имеют частичную регрессию опухоли.

Таблица 9

Сравнение эффективности *in vivo* 2С6.9-TL001 и 2С6.9 моноклональное антитело+химиотерапия в CDX-модели

Группа	День 11				
	Доза (мг/кг)	Объем опухоли (мм ³) ($\bar{x} \pm SEM$)	TGI (%)	Регрессия опухоли (PR/CR)	Р значение
IgG1	3	314,03±34,45	N/A	0/0	N/A
Паклитаксел	12	226,21±28,26	42,40	0/0	ns
2С6.9+ паклитаксел	10+12	175,03±14,30	67,43	0/0	<0,0001
2С6.9-TL001	3	62,76±9,98	121,68	6/0	<0,0001

Примечание: TGI: степень ингибирования роста опухоли; T/C: относительный показатель пролиферации опухоли; PR: частичная регрессия опухоли; CR: полная регрессия опухоли. Р значение представляет собой значимую разницу по сравнению с группой IgG1; N/A: не определено; ns: $p > 0,05$, нет статистически значимой разницы.

После 21 дня введения, по сравнению с группой отрицательного контроля, все из трех групп введения смогли показать существенное ингибирование роста опухоли, и в группе 2С6.9-TL001 (DAR: 7,12) оно было наиболее существенным. Степень ингибирования опухоли (TGI) в группе 2С6.9-TL001 (DAR: 7,12) достигала 125,73%, и 5 из 7 мышей имели полную регрессию опухоли, и у 2 мышей была частичная регрессия опухоли. Результаты эксперимента показаны в Таблице 10 и на Фиг. 12D.

Таблица 10

Сравнение эффективности *in vivo* 2С6.9-TL001 и 2С6.9 моноклональное антитело+химиотерапия в CDX-модели

Группа	День 21				
	Доза (мг/кг)	Объем опухоли (мм ³)	TGI (%)	Регрессия опухоли (PR/CR)	Р значение

		$\bar{x} \pm \text{SEM}$			
IgG1	3	456,60±36,43	N/A	0/0	N/A
Паклитаксел	12	276,31±23,46	51,60	0/0	<0,0001
2C6.9+ паклитаксел	10+12	207,52±21,25	71,43	0/0	<0,0001
2C6.9-TL001	3	17,75±3,97	125,73	2/5	<0,0001

Примечание: TGI: степень ингибирования роста опухоли; T/C: относительный показатель пролиферации опухоли; PR: частичная регрессия опухоли; CR: полная регрессия опухоли. P значение представляет собой значимую разницу по сравнению с группой IgG1; N/A: не определено.

12.3 Сравнение эффективности *in vivo* 2C6.9-TL001, имеющего разные значения DAR, в CDX-модели

NUGC-4 клетки культивировали с использованием культуральной среды RPMI1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), при 37°C с 5% CO₂. Клетки в экспоненциальной фазе роста собирали, ресуспендировали в PBS и инокулировали подкожно самкам бестимусных мышей Balb/c (Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.) при объеме клеток 5×10⁶/мышь (суспендированных в 0,1 мл PBS) для установления подкожно трансплантированной модели опухоли. Когда средний объем опухоли достигал около 70-100 мм³, мышей случайным образом распределяли по группам в соответствии с объемом опухоли, по 7 мышей на группу. День распределения по группам был установлен как день 0, и группы представляли собой соответственно группу введения человеческого IgG1 изотипического контрольного антитела (отрицательный контроль) (IgG1 для краткости), группу введения 2C6.9-TL001 (DAR: 3,79) 5,25 мг/кг, группу введения 2C6.9-TL001 (DAR: 3,79) 17,5 мг/кг, группу введения 2C6.9-TL001 (DAR: 7,12) 3 мг/кг и группу введения 2C6.9-TL001 (DAR: 7,12) 10 мг/кг (препараты ADC с разными значениями DAR вводили при рассчитанной дозе с одинаковой нагрузкой токсином). Все образцы вводили путем инъекции через хвостовую вену два раза в неделю, в общей сложности 3 недели. Дозы показаны в Таблице 11.

Результаты эксперимента показаны в Таблице 11 и на Фиг. 12E и 12F. При одинаковой нагрузке токсином эффективность 2C6.9-TL001 с высоким значением DAR (7,12) по существу эквивалентна эффективности конъюгата с низким значением DAR (3,79) после 21 дня введения лекарственного средства. Никакой существенной потери массы тела не наблюдалось ни в какой из групп обработки за период наблюдения, и животные показали хорошую переносимость.

Таблица 11

Сравнение эффективности *in vivo* 2C6.9-TL001, имеющего разные значения DAR, в CDX-модели

Группа	День 21			
	Доза (мг/кг)	Объем опухоли (мм ³) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	TGI (%)	P значение
IgG1	17,5	1227,10±168,01	N/A	N/A
2C6.9-TL001(DAR:3,79)	5,25	736,12±92,59	43,76	<0,0001
2C6.9-TL001(DAR:3,79)	17,5	477,42±67,90	66,94	<0,0001
2C6.9-TL001(DAR:7,12)	3	670,96±113,92	49,60	<0,0001
2C6.9-TL001(DAR:7,12)	10	250,04±28,73	87,17	<0,0001

Примечание: TGI: степень ингибирования роста опухоли; T/C: относительный показатель пролиферации опухоли; PR: частичная регрессия опухоли; CR: полная регрессия опухоли. P значение представляет собой значимую разницу по сравнению с группой IgG1; N/A: не определено.

12.4 PDX-модель NuPrime® GA0006+ рака желудка у бестимусных мышей Balb/c

Опухолевую ткань собирали у имеющих опухоль мышей в модели ксенотрансплантата GA0006 рака желудка NuPrime® (Crown Bioscience (Taicang) Inc.; опухоль желудка с высокой экспрессией Клаудина 18.2 от 57-летней пациентки), ее разрезали на кусочки диаметром 3×3×3 мм и инокулировали подкожно в правую переднюю лопатку бестимусных мышей Balb/c. Когда средний объем опухоли составил около 150-250 мм³, мышей случайным образом делили на три группы в зависимости от размера опухоли, по 7 мышей на группу, день распределения по группам был установлен как день 0. Было три группы: группа введения человеческого IgG1 гомотипического контрольного антитела (отрицательный контроль) (IgG1 10 мг/кг), группа введения 3-мг/кг и группа введения 10-мг/кг 2C6.9-TL001-DAR7,12. Все образцы вводили путем инъекции в хвостовую вену два раза в неделю, в общей сложности 5 раз. После введения лекарственного средства объем опухоли и массу тела мышей наблюдали и регулярно измеряли, как описанно в Примере 12.1.

Результаты эксперимента в Таблице 12 и на Фиг. 12G и 12H показывают, что 2C6.9-TL001-DAR7,12 имеет значительный ингибирующий эффект на рост опухоли PDX-модели рака желудка GA0006 дозозависимым образом. По сравнению с группой отрицательного контроля степень ингибирования опухоли (TGI) в 3-мг/кг группе достигала 94,72% после 5 доз (День 17), а опухоли у 4 мышей частично исчезали; значение TGI в 10-мг/кг группе достигало 124,49%, и опухоли у 7 мышей полностью исчезли, показывая, что 2C6.9-TL001 может эффективно ингибировать рост опухоли. Никакой существенной потери массы тела не наблюдалось ни в какой из групп обработки

за период наблюдения, и животные показали хорошую переносимость.

Таблица 12

PDX-модель NuPrime® GA0006+ рака желудка у бестимусных мышей Balb/c

Группа	День 17					
	Доза (мг/кг)	Объем опухоли (мм ³) ($\bar{x} \pm SEM$)	TGI (%)	T/C (%)	Регрессия опухоли (PR/CR)	Р значен ие
IgG1	10	780,46±93,30	N/A	N/A	0/0	N/A
2C6.9- TL001	3	187,00±46,07	94,72	23,96	4/0	<0,0001
2C6.9- TL001	10	0,00±0,00	124,4 9	0,00	0/7	<0,0001

Примечание: TGI: степень ингибирования роста опухоли; T/C: относительный показатель пролиферации опухоли; PR: частичная регрессия опухоли; CR: полная регрессия опухоли. Р значение представляет собой значимую разницу по сравнению с группой IgG1; N/A: не определено.

Результаты эксперимента показаны в Таблице 13 и на Фиг. 12I и 12J. В день 24 после введения 2C6.9-TL001-DAR7,12 показал значительное и дозозависимое ингибирование роста опухоли в PDX-модели GA0006 рака желудка. По сравнению с группой отрицательного контроля степень ингибирования опухоли (TGI) в 3-мг/кг группе достигала 103,76%, и у 6 мышей была частичная регрессия опухолей; значение TGI в 10 мг/кг группе достигало 113,70%, и у 7 мышей была полная регрессия опухолей, это показывает, что 2C6.9-TL001 может эффективно ингибировать рост опухоли. Никакой существенной потери массы тела не наблюдалось ни в какой из групп обработки за период наблюдения, и животные показали хорошую переносимость.

Таблица 13

PDX-модель NuPrime® GA0006+ рака желудка у бестимусных мышей Balb/c

Группа	День 24					
	Доза (мг/кг)	Объем опухоли (мм ³) ($\bar{x} \pm SEM$)	TGI (%)	T/C (%)	Регрессия опухоли (PR/CR)	Р значени е
IgG1	10	1273,78±124,49	N/A	N/A	0/0	N/A
2C6.9-TL001	3	111,83±42,26	103,76	8,78	6/0	<0,0001
2C6.9-TL001	10	0,00±0,00	113,70	0,00	0/7	<0,0001

Примечание: TGI: степень ингибирования роста опухоли; T/C: относительный показатель пролиферации опухоли; PR: частичная регрессия опухоли; CR: полная регрессия опухоли. P значение представляет собой значимую разницу по сравнению с группой IgG1; N/A: не определено.

12.5 Оценка эффективности *in vivo* против NCI-N87-Клаудин18.2 в CDX-модели бестимусных мышей Balb/c

Модель опухоли с подкожной трансплантацией NCI-N87-Клаудин18.2 устанавливали в соответствии со способом Примера 12.1. Когда средний объем опухоли достигал около 140 мм³, мышей случайным образом распределяли по группам в соответствии с объемом опухоли, по 8 мышей на группу. День распределения по группам был установлен как день 0, и группы представляли собой, соответственно, группу введения человеческого IgG1 изотипического контрольного антитела (отрицательный контроль) (IgG1 для краткости), группу введения 0,3 мг/кг, группу введения 1 мг/кг и группу введения 3 мг/кг 2C6.9-TL001 (DAR: 7,40). Все образцы вводили путем инъекции в хвостовую вену два раза в неделю, всего 6 раз, дозы показаны в Таблице 14.

Результаты показаны в Таблице 14 и на Фиг. 12K и 12L. Когда период наблюдения продлевали до дня 31 после прекращения введения лекарственного средства, по сравнению с группой отрицательного контроля, степень ингибирования опухоли (TGI) в группе 2C6.9-TL001 0,3 мг/кг составила 34,04%, тогда как значение TGI в группах 1 мг/кг и 3 мг/кг достигало 122,57% (частичную регрессию опухолей наблюдали у всех мышей) и 184,22% (полную регрессию опухолей наблюдали у 4 мышей, а частичную регрессию опухолей наблюдали у 4 мышей), соответственно. Никакой существенной потери массы тела не наблюдалось ни в какой из групп обработки за период наблюдения, и животные показали хорошую переносимость.

Таблица 14

Оценка эффективности *in vivo* против NCI-N87-Клаудин18.2 в CDX-модели бестимусных мышей Balb/c

Группа	День 31					
	Доза (мг/кг)	Объем опухоли (мм ³) ($\bar{x} \pm \text{SEM}$)	TGI (%)	T/C (%)	Регрессия опухоли (PR/CR)	P значение
IgG1	3	592,50±24,38	N/A	N/A	0/0	N/A
2C6.9-TL001	0,3	437,74±16,68	34,04	74,04	0/0	<0,001
2C6.9-TL001	1	107,06±9,63	122,57	18,13	8/0	<0,0001
2C6.9-TL001	3	21,83±2,26	184,22	3,69	4/4	<0,0001

Примечание: TGI: степень ингибирования роста опухоли; T/C: относительный

показатель пролиферации опухоли; PR: частичная регрессия опухоли; CR: полная регрессия опухоли. P значение представляет собой значимую разницу по сравнению с группой IgG1; N/A: не определено.

12.6 Оценка эффективности *in vivo* против НЕК293Т-Клаудин18.2 в CDX-модели бестимусных мышей Balb/c

НЕК293Т-Клаудин18.2 клетки (клетки почки эмбриона человека) культивировали в среде DMEM, содержащей 3 мкг/мл пуромицина и 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), при 37°C с 5% CO₂. Клетки в экспоненциальной фазе роста собирали, ресуспендировали в PBS и инокулировали подкожно самкам бестимусных мышей Balb/c (Zhejiang Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.) при объеме клеток 1×10⁷/мышь (суспендированных в 0,1 мл PBS) для установления подкожно трансплантированной модели опухоли. Когда средний объем опухоли достигал около 120-140 мм³, мышей случайным образом распределяли по группам в соответствии с объемом опухоли, по 8 мышей на группу. День распределения по группам был установлен как день 0, и группы представляли собой, соответственно, группу введения человеческого IgG1 изотипического контрольного антитела (отрицательный контроль) (указана как IgG1), группу введения 0,3 мг/кг, группу введения 1 мг/кг и группу введения 3 мг/кг 2С6.9-TL001 (DAR: 7,40). Все образцы вводили путем инъекции в хвостовую вену два раза в неделю, всего 6 раз, дозы показаны в Таблице 15.

Результаты показаны в Таблице 15 и на Фиг. 12М и 12N. По сравнению с группой отрицательного контроля 2С6.9-TL001 (DAR: 7,40) показал значительное и дозозависимое ингибирование роста опухоли в модели опухоли с трансплантацией клеток почки эмбриона человека НЕК293Т-Клаудин18.2 после 6 доз (день 21 после первой дозы). Степень ингибирования опухоли (TGI) в группе 2С6.9-TL001 0,3 мг/кг составила 70,99% (полную регрессию опухоли наблюдали у 1 мыши), тогда как значение TGI в группах 1 мг/кг и 3 мг/кг составило 94,98% (частичную регрессию опухоли наблюдали у 2 мышей) и 182,81% (частичную регрессию опухоли наблюдали у 2 мышей, а полную регрессию опухоли наблюдали у 6 мышей), соответственно.

Таблица 15

Оценка эффективности *in vivo* против НЕК293Т-Клаудин18.2 в CDX-модели бестимусных мышей Balb/c

Группа	День 21					
	Доза (мг/кг)	Объем опухоли (мм ³) ($\bar{x} \pm SEM$)	TGI (%)	T/C (%)	Регрессия опухоли (PR/CR)	P значение
IgG1	3	1547,48±245,85	N/A	N/A	0/0	N/A
2С6.9-TL001	0,3	507,95±99,30	70,99	32,83	0/1	<0,01
2С6.9-TL001	1	156,48±23,87	94,98	10,13	2/0	<0,0001

2C6.9-TL001	3	14,36±3,63	182,81	0,92	2/6	<0,0001
-------------	---	------------	--------	------	-----	---------

Примечание: TGI: степень ингибирования роста опухоли; T/C: относительный показатель пролиферации опухоли; PR: частичная регрессия опухоли; CR: полная регрессия опухоли. P значение представляет собой значимую разницу по сравнению с группой IgG1; N/A: не определено.

12.7 Оценка эффективности *in vivo* против NUGC-4 в CDX-модели бестимусных мышей Balb/c

NUGC-4 клетки культивировали в RPMI1640 среде, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), при 37°C и 5% CO₂. Клетки в экспоненциальной фазе роста собирали, ресуспендировали в PBS и инокулировали подкожно самкам Balb/c бестимусных мышей (Zhejiang Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd.) при объеме клеток 5×10⁶/мышь (суспендированные в 0,1 мл PBS) для установления подкожно трансплантированной модели опухоли. Когда средний объем опухоли достигал около 80 мм³, мышей случайным образом распределяли по группам в соответствии с объемом опухоли, по 8 мышей на группу. День распределения по группам был установлен как день 0, и группы представляли собой, соответственно, группу введения человеческого IgG1 изотипического контрольного антитела (отрицательный контроль) (указана как IgG1), группу введения 3 мг/кг и группу введения 10 мг/кг 2C6.9-TL001 (DAR: 7,40). Все образцы вводили путем инъекции в хвостовую вену два раза в неделю, всего 6 раз, дозы показаны в Таблице 16.

Результаты показаны в Таблице 16 и на Фиг. 12O и 12P. По сравнению с группой отрицательного контроля 2C6.9-TL001 (DAR: 7,40) показал значительное и дозозависимое ингибирование роста опухоли в модели опухоли с трансплантацией рака желудка NUGC-4 после 6 доз (день 21 после первой дозы). Группа 2C6.9-TL001 3 мг/кг показала степень ингибирования опухоли (TGI) 56,62%, тогда как значение TGI в 10 мг/кг группе составило 90,28% (частичную регрессию опухоли наблюдали у 2 мышей).

Таблица 16

Оценка эффективности *in vivo* против NUGC-4 в CDX-модели бестимусных мышей Balb/c

Группа	День 21					
	Доза (мг/кг)	Объем опухоли (мм ³) ($\bar{x} \pm SEM$)	TGI (%)	T/C (%)	Регрессия опухоли (PR/CR)	P значение
IgG1	10	782,66±47,61	N/A	N/A	0/0	N/A
2C6.9-TL001	3	385,67±35,09	56,62	48,95	0/0	<0,0001
2C6.9-TL001	10	148,23±25,52	90,28	19,09	2/0	<0,0001

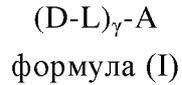
Примечание: TGI: степень ингибирования роста опухоли; T/C: относительный показатель пролиферации опухоли; PR: частичная регрессия опухоли; CR: полная регрессия опухоли. P значение представляет собой значимую разницу по сравнению с группой IgG1; N/A: не определено.

В заключение, 2C6.9-TL001 может эффективно ингибировать рост Клаудин18.2-положительной опухоли как в CDX-модели, так и в PDX-модели дозозависимым образом и является безопасным для применения.

Хотя варианты осуществления настоящего изобретения были подробно описаны, специалистам в данной области техники будет понятно: в соответствии с руководящими указаниями и идеям, содержащимися в полном раскрытии изобретения, возможны модификации и вариации деталей, и все эти изменения входят в объем настоящего изобретения. Объем настоящего изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения и любым ее эквивалентом.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), структура которого показана в формуле (I),



где D представляет собой фрагмент биоактивной молекулы; L представляет собой линкер;

γ равно целому числу от 1 до 10; предпочтительно, γ равно целому числу от 1 до 8 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8);

A представляет собой антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с CLDN 18.2 человека, и антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(1) следующие VH и/или VL, где CDR определены в соответствии с системой нумерации IMGT:

(1-1): VH, содержащую следующие 3 CDR:

CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 1,

CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 2 или 21, и

CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 3; и/или

VL, содержащую следующие 3 CDR:

CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 4,

CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 5, и

CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 6;

или

(1-2): по сравнению с VH или VL, описанной в (1-1), по меньшей мере одна CDR содержит мутацию, которая представляет собой замену, делецию или добавление одной или более аминокислот, или любую их комбинацию (например, замену, делецию или добавление 1, 2 или 3 аминокислот, или любую их комбинацию); антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее мутацию, при этом способно специфически связываться с CLDN 18.2 человека;

или

(2) следующие VH и/или VL, где CDR определены в соответствии с системой нумерации AbM:

(2-1): VH, содержащую следующие 3 CDR:

CDR-H1 с последовательностью SEQ ID NO: 7,

CDR-H2 с последовательностью SEQ ID NO: 8 или 22, и

CDR-H3 с последовательностью SEQ ID NO: 9; и/или

VL, содержащую следующие 3 CDR:

CDR-L1 с последовательностью SEQ ID NO: 10,

CDR-L2 с последовательностью SEQ ID NO: 11, и

CDR-L3 с последовательностью SEQ ID NO: 12;

или

(2-2): по сравнению с VH или VL, описанной в (2-1), по меньшей мере одна CDR содержит мутацию, которая представляет собой замену, делецию или добавление одной или более аминокислот, или любую их комбинацию (например, замену, делецию или добавление 1, 2 или 3 аминокислот, или любую их комбинацию); антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее мутацию, при этом способно специфически связываться с CLDN 18.2 человека;

предпочтительно, замена представляет собой консервативную замену;

предпочтительно, VH и/или VL антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, содержит каркасные области (FR) иммуноглобулина человека или мыши.

2. ADC по п. 1, где:

(1) антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит VH с SEQ ID NO: 13 или 14; и/или VL с SEQ ID NO: 15;

(2) по сравнению с VH, описанной в (1), VH, содержащаяся в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична; и/или по сравнению с VL, описанной в (1), VL, содержащаяся в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична;

или

(3) по сравнению с VH, описанной в (1), VH, содержащаяся в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте, имеет замену, делецию или добавление одной или более аминокислот, или любую их комбинацию (например, замену, делецию или добавление 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот, или любую их комбинацию); и/или по сравнению с VL, описанной в (1), VL, содержащаяся в антителе, или его антигенсвязывающем фрагменте, имеет замену, делецию или добавление одной или более аминокислот, или любую их комбинацию (например, замену, делецию или добавление 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот, или любую их комбинацию); предпочтительно, замена представляет собой консервативную замену.

3. ADC по п. 1 или 2, где антитело содержит:

(1) CH (константную область тяжелой цепи) иммуноглобулина человека или ее вариант, где вариант включает замену, делецию или добавление одной или более аминокислот по сравнению с последовательностью дикого типа, из которой он получен (например, замену, делецию или добавление до 20, до 15, до 10 или до 5

аминокислот; например, замену, делецию или добавление 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот); и/или

(2) CL (константную область легкой цепи) иммуноглобулина человека или ее вариант, где вариант включает замену, делецию или добавление одной или более аминокислот по сравнению с последовательностью дикого типа, из которой он получен (например, замену, делецию или добавление до 20, до 15, до 10 или до 5 аминокислот; например, замену, делецию или добавление 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот);

предпочтительно, CH представляет собой константную область тяжелой цепи IgG, такую как константная область тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4;

предпочтительно, антитело содержит константную область тяжелой цепи IgG1 человека;

предпочтительно, антитело содержит CH с SEQ ID NO: 16, или ее вариант, который имеет консервативную замену до 20 аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 16 (например, консервативную замену до 15, 10 или 5 аминокислот; например, консервативную замену 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот);

предпочтительно, CL представляет собой константную область легкой цепи к;

предпочтительно, антитело содержит CL с SEQ ID NO: 17, или ее вариант, который имеет консервативную замену до 20 аминокислот по сравнению с SEQ ID NO: 17 (например, консервативную замену до 15, 10 или 5 аминокислот; например, консервативную замену 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот);

более предпочтительно, антитело содержит CH с SEQ ID NO: 16, и/или CL с SEQ ID NO: 17.

4. ADC по любому из пп. 1-3, где антитело представляет собой:

(1) тяжелую цепь, содержащую

VH с последовательностью SEQ ID NO: 13, и

CH с последовательностью SEQ ID NO: 16, и

легкую цепь, содержащую

VL с последовательностью SEQ ID NO: 15, и

CL с последовательностью SEQ ID NO: 17;

или

(2) тяжелую цепь, содержащую

VH с последовательностью SEQ ID NO: 14, и

CH с последовательностью SEQ ID NO: 16, и

легкую цепь, содержащую

VL с последовательностью SEQ ID NO: 15, и

CL с последовательностью SEQ ID NO: 17.

5. ADC по любому из пп. 1-4, где антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит:

(1) тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность,

выбранную из группы, состоящей из:

(1-1) последовательности SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19;

(1-2) последовательности, имеющей замену, делецию или добавление одной или более аминокислот (например, замену, делецию или добавление 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19; или

(1-3) последовательности, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19;

и

(2) легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

(2-1) последовательности SEQ ID NO:20;

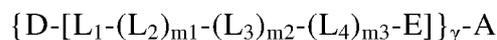
(2-2) последовательности, имеющей замену, делецию или добавление одной или более аминокислот (например, замену, делецию или добавление 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) по сравнению с последовательностью с SEQ ID NO: 20; или

(2-3) последовательности, которая по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 20;

предпочтительно, замены, описанные в (1-2) и (2-2), представляют собой консервативные замены.

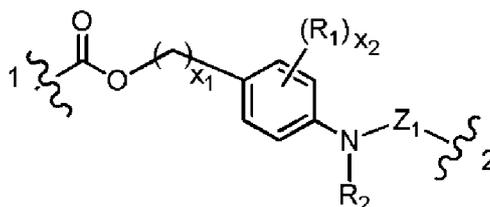
6. ADC по любому из пп. 1-5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбран из ScFv, Fab, Fab', (Fab')₂, Fv фрагмента, связанного дисульфидной связью Fv(dsFv), диатела, биспецифического антитела и мультиспецифического антитела.

7. ADC по любому из пп. 1-6, который имеет структуру, показанную в формуле (II),



Формула (II)

где



L₁ представляет собой

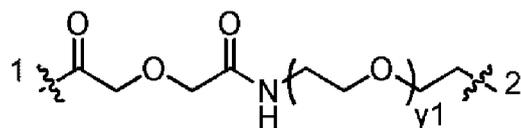
где R₁ и R₂, каждый независимо, представляют собой водород (такой как

протий или дейтерий), галоген, группу карбоновой кислоты, группу сульфоновой кислоты, циано, C₁₋₆ алкил, галогенированный C₁₋₆ алкил, циано-замещенный C₁₋₆ алкил (например, -CH₂CN), C₁₋₆ алкокси, C₂₋₁₀ алкенил или C₂₋₁₀ алкинил;

Z₁ представляет собой аминокислоту или пептид, состоящий из 2-10 аминокислот;

x₁ и x₂, каждый независимо, равен 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6;

L₁ связан с D в положении 1 и связан с L₂ в положении 2;

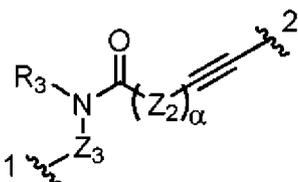


L₂ представляет собой

где y₁ имеет значение 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

L₂ связан с L₁ в положении 1 и связан с L₃ в положении 2;

L₃ выбран из 5-12-членного ароматического гетероцикла;



L₄ представляет собой

где Z₂ выбран из C₁₋₆ алкилена, C₂₋₁₀ алкенилена, C₂₋₁₀ алкинилена и C₃₋₈ циклоалкилена;

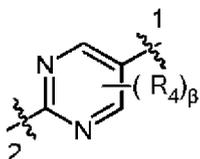
R₃ выбран из водорода (такого как протий или дейтерий) и C₁₋₆ алкила;

Z₃ отсутствует или выбран из C₁₋₆ алкилена;

альтернативно, R₃ и Z₃ вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 4-8-членный гетероцикл;

α имеет значение 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6, и

L₄ связан с E в положении 2 и связан с L₃ в положении 1;



E представляет собой

где каждый R₄ представляет собой водород (такой как протий или дейтерий),

β имеет значение 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6, и

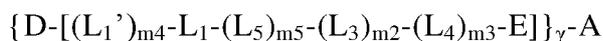
E связан с A в положении 2 и связан с L₄ в положении 1;

m₁, m₂ и m₃, каждый независимо, имеют значение 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

A имеет значение, определенное в любом из пп. 1-6;

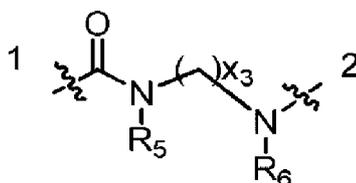
D и γ имеют значение, определенное в п. 1.

8. ADC по любому из пп. 1-6, который имеет структуру, показанную в формуле (III):



Формула (III)

где

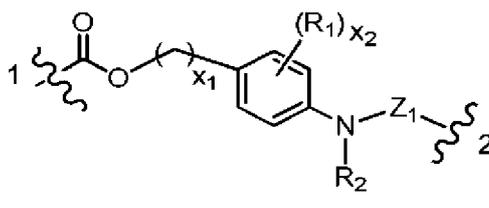


L_1' представляет собой

где R_5 и R_6 , каждый независимо, представляют собой водород (такой как протий или дейтерий) или C_{1-6} алкил;

x_3 имеет значение 1, 2, 3, 4, 5 или 6; и

если L_1' присутствует, он связывается с D в положении 1 и связывается с L_1 в положении 2;



L_1 представляет собой

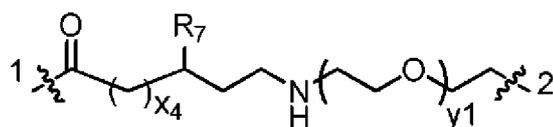
где R_1 и R_2 , каждый независимо, представляют собой водород (такой как протий или дейтерий), галоген, группу карбоновой кислоты, группу сульфоновой кислоты, циано, C_{1-6} алкил, галогенированный C_{1-6} алкил, циано-замещенный C_{1-6} алкил (например, $-CH_2CN$), C_{1-6} алкокси, C_{2-10} алкенил или C_{2-10} алкинил;

Z_1 представляет собой аминокислоту или пептид, состоящий из 2-10 аминокислот;

x_1 и x_2 , каждый независимо, имеют значение 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6; и,

в положении 1, L_1 связан с L_1' (когда L_1' присутствует) в положении 1 или с D (когда L_1' отсутствует) в положении 1;

L_1 связан с L_5 в положении 2;



L_5 представляет собой

где R_7 представляет собой водород или C_{1-6} алкил, или R_7 связан с N атомом по

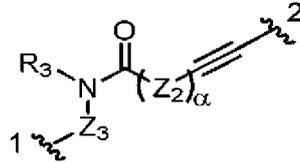
его γ -С с образованием 5-6-членного гетероциклила;

x_4 имеет значение 1, 2, 3, 4, 5 или 6;

u_1 имеет значение 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10; и

L_5 связан с L_1 в положении 1 и связан с L_3 в положении 2;

L_3 выбран из 5-12-членного ароматического гетероцикла;



L_4 представляет собой

где Z_2 выбран из C_{1-6} алкилена, C_{2-10} алкенилена, C_{2-10} алкинилена и C_{3-8} циклоалкилена;

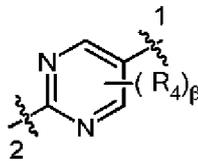
R_3 выбран из водорода (такого как протий и дейтерий) и C_{1-6} алкила;

Z_3 отсутствует или выбран из C_{1-6} алкилена; или

R_3 и Z_3 вместе с атомом азота, к которому они присоединены, образуют 4-8-членный гетероциклический радикал;

α имеет значение 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6; и

L_4 связан с E в положении 2 и связан с L_3 в положении 1;



E представляет собой

где каждый R_4 независимо представляет собой водород (такой как протий или дейтерий),

β имеет значение 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6, и

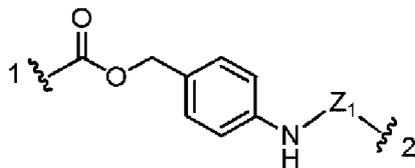
E связан с A в положении 2 и связан с L_4 в положении 1;

m_1 , m_2 , m_3 и m_4 , каждый независимо, имеют значение 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

A имеет значение, определенное в любом из пп. 1-6;

D и γ имеют значение, определенное в п. 1.

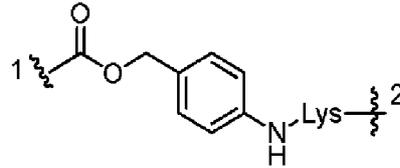
9. ADC по любому из пп. 7-8,



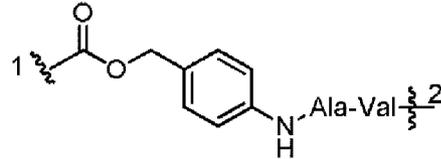
где L_1 представляет собой

где Z_1 представляет собой аминокислоту или пептид, состоящий из 2-5

аминокислот, где аминокислота выбрана из Lys, Cit, Val, D-Val, Phe, Leu, Gly, Ala и Asn;
предпочтительно Z_1 выбран из Cit, Lys, Cit-Val и Ala-Val;

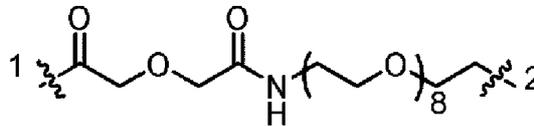


предпочтительно, L_1 представляет собой



предпочтительно, L_1 представляет собой

10. ADC по любому из пп. 7-9,



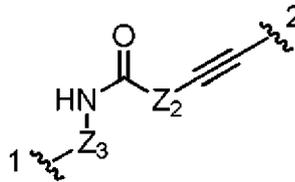
где L_2 представляет собой

m_1 имеет значение 1.

11. ADC по любому из пп. 7-10, где L_3 представляет собой 5-6-членный ароматический гетероцикл и m_2 имеет значение 1;

предпочтительно L_3 представляет собой триазол и m_2 имеет значение 1.

12. ADC по любому из пп. 7-11,

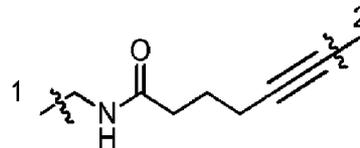


где L_4 представляет собой

Z_2 представляет собой C_{1-6} алкилен,

Z_3 представляет собой C_{1-6} алкилен; и

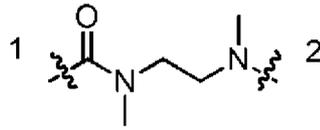
m_3 имеет значение 1;



предпочтительно, L_4 представляет собой

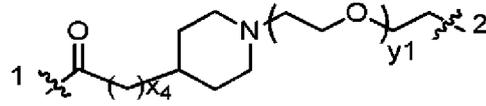
m_3 имеет значение 1.

13. ADC по любому из пп. 8-12,



где L_1' представляет собой

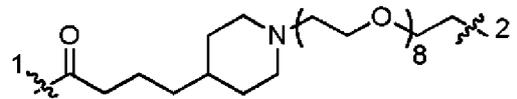
14. ADC по любому из пп. 8-13,



где L_5 представляет собой

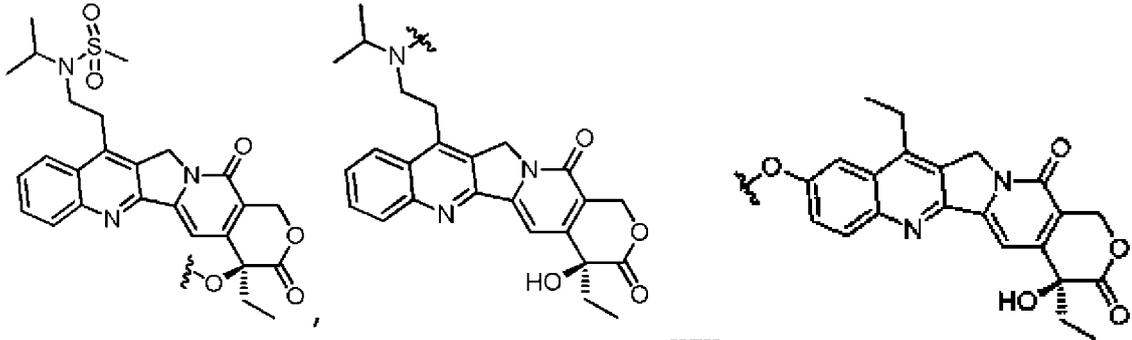
где x_4 имеет значение 1, 2, 3, 4, 5 или 6;

y_1 имеет значение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

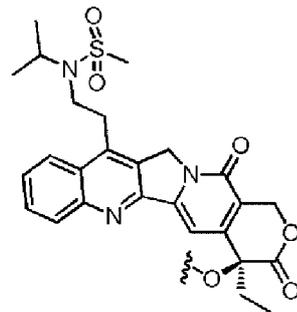


предпочтительно, L_5 представляет собой

15. ADC по любому из пп. 1-14, где D представляет собой

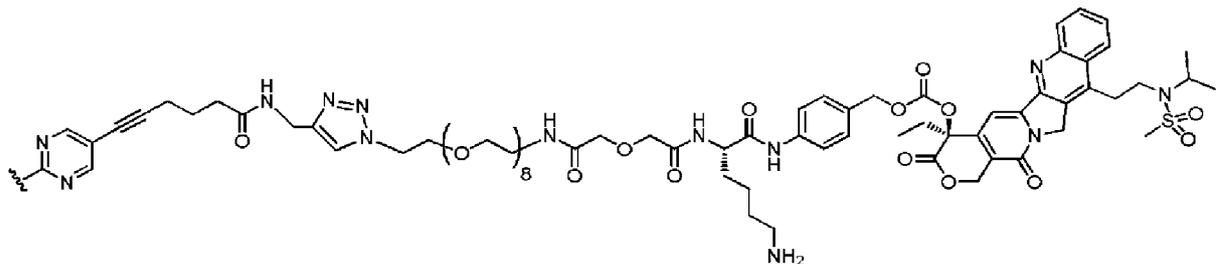


или



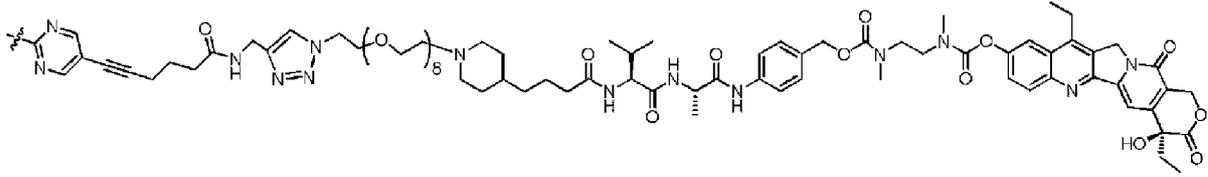
предпочтительно, D представляет собой

16. ADC по п. 7, где $D-[L_1-(L_2)_{m1}-(L_3)_{m2}-(L_4)_{m3}-E]$ - в формуле (II) представляет собой

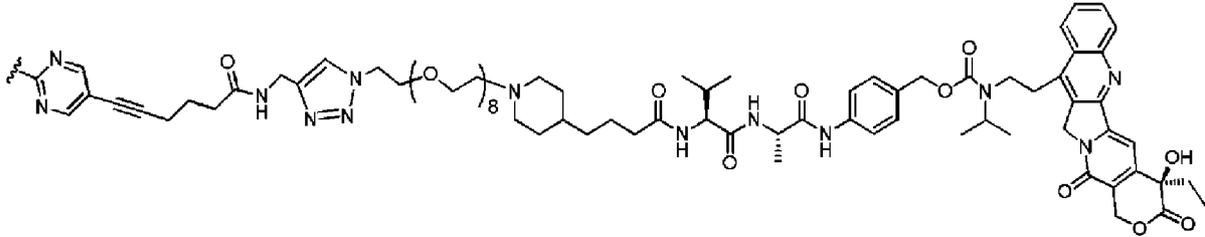


17. ADC по п. 8, где $D-[(L_1')_{m4}-L_1-(L_5)_{m5}-(L_3)_{m2}-(L_4)_{m3}-E]$ - в формуле (III)

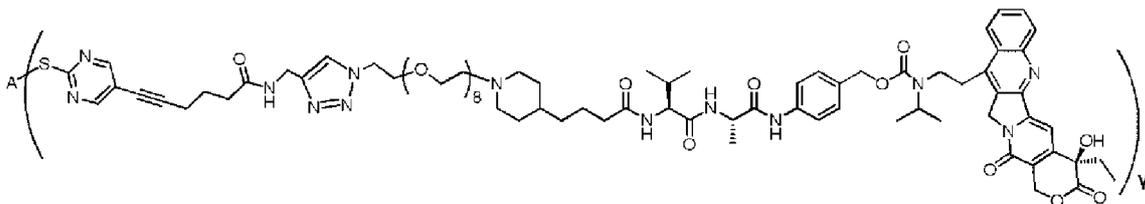
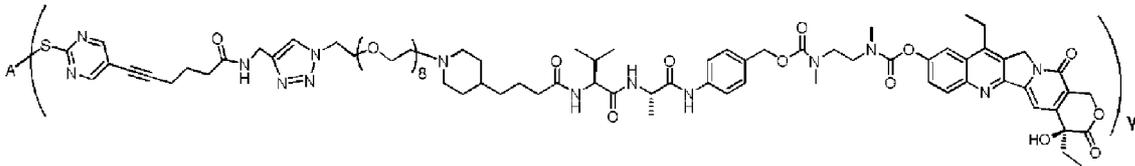
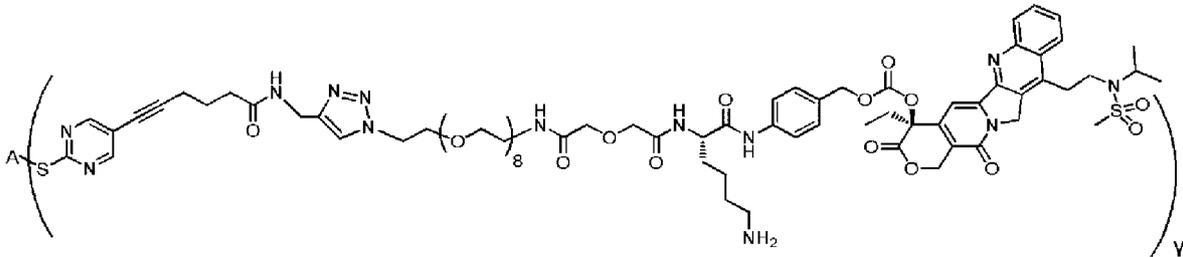
представляет собой



или



18. ADC по любому из пп. 1-17, который выбран из:



где γ равно целому числу от 1 до 10; например, γ имеет значение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

19. ADC по любому из пп. 1-18, где антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит метку; предпочтительно антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит детектируемую метку, такую как ферменты (т.е. пероксидаза хрена), радионуклиды, флуоресцентные красители, люминесцентные вещества (например, хемилюминесцентные вещества) или биотин.

20. Композиция, содержащая ADC по любому из пп. 1-19, и молярное отношение фрагмента биоактивной молекулы к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые специфически связываются с CLDN18.2 (значение DAR), представляет собой десятичное или целое число от 1 до 10 (например, десятичное или целое число от 3 до 8,

такое как 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,79, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 6,95, 7,0, 7,03, 7,1, 7,12, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 или 8,0).

21. Фармацевтическая композиция, содержащая ADC по любому из пп. 1-19 или композицию по п. 20 и фармацевтически приемлемый носитель и/или эксципиент.

22. Применение ADC по любому из пп. 1-19, композиции по п. 20 или фармацевтической композиции по п. 21 для получения лекарственного средства для профилактики и/или лечения и/или адъювантной терапии опухолей;

необязательно, лекарственное средство дополнительно включает дополнительный противоопухолевый активный ингредиент; предпочтительно ADC, композицию или фармацевтическую композицию вводят отдельно, одновременно или последовательно с дополнительным противоопухолевым активным ингредиентом; предпочтительно дополнительный противоопухолевый активный ингредиент представляет собой биоактивный полипептид или его активный фрагмент, или химиотерапевтическое средство; более предпочтительно биоактивный полипептид выбран из ингибиторов иммунных контрольных точек (например, антитела к PD-1, антитела к PD-L1, антитела к CTLA-4 и антитела к LAG-3) или цитокина (например, интерферона, IL-2, IL-15, GM-CSF, IL-7, IL-12, IL-18 и IL-21); предпочтительно химиотерапевтическое средство является одним или более, выбранным из эпирубина, оксалиплатина, капецитабина, 5-фторурацила, лейковорина, паклитаксела и альбумин-связанного паклитаксела.

23. Применение по п. 22, где опухоль выбрана из солидных опухолей, гематологических опухолей или метастатических, рефрактерных или рецидивирующих раковых поражений;

предпочтительно опухоль или рак выбраны из рака пищевода, рака желудочно-кишечного тракта, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, колоректального рака, рака почки, рака легкого (такого как немелкоклеточный рак легкого, NSCLC), рака печени, рака желудка, аденокарциномы желудка, аденокарциномы пищеводно-желудочного перехода (GEJ), рака головы и шеи, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака матки, рака шейки матки, рака яичника, рака предстательной железы, тестикулярного рака, герминогенной опухоли, рака кости, рака кожи, рака тимуса, холангиокарциномы, рака желчного пузыря, меланомы, мезотелиомы, лимфомы, миеломы (такой как множественная миелома), саркомы, глиобластомы и лейкоза;

предпочтительно опухоль выбрана из рака желудка, аденокарциномы желудка, аденокарциномы пищеводно-желудочного перехода (GEJ), раку пищевода, рака желудочно-кишечного тракта, рака поджелудочной железы и рака легкого (такого как NSCLC);

предпочтительно опухоль представляет собой рак желудка, аденокарциному желудка или аденокарциному пищеводно-желудочного перехода (GEJ), такую как местнораспространенная неоперабельная или метастатическая опухоль, представляющая

собой рак желудка, аденокарциному желудка или аденокарциному пищеводно-желудочного перехода (GEJ);

предпочтительно, опухоль является CLDN 18.2-положительной, и более предпочтительно опухоль является HER2-отрицательной.

24. Способ профилактики и/или лечения опухоли, и/или задержки прогрессирования опухоли, и/или уменьшения проявления или ингибирования рецидива опухоли у субъекта, где способ включает стадию введения субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) по любому из пп. 1-19, композиции по п. 20 или фармацевтической композиции по п. 21;

необязательно, способ дополнительно включает стадию применения второй терапии для субъекта, где вторая терапия выбрана из хирургической операции, химиотерапии, лучевой терапии, иммунотерапии, генной терапии, ДНК терапии, РНК терапии, нанотерапии, вирусной терапии, адъювантной терапии и любой их комбинации; способ и вторую терапию применяют отдельно, в комбинации, одновременно или последовательно;

предпочтительно иммунотерапия включает введение биоактивного полипептида, и более предпочтительно биоактивный полипептид выбран из ингибиторов иммунных контрольных точек (например, антитела к PD-1, антитела к PD-L1, антитела к CTLA-4 и антитела к LAG-3) или цитокина (например, интерферона, IL-2, IL-15, GM-CSF, IL-7, IL-12, IL-18 и IL-21);

предпочтительно химиотерапия является одной или более, выбранной из эпирубицина, оксалиплатина, капецитабина, 5-фторурацила, фолиновой кислоты, паклитаксела и альбумин-связанного паклитаксела;

предпочтительно опухоль выбрана из солидных опухолей, гематологических опухолей и метастатических, рефрактерных или рецидивирующих раковых поражений;

предпочтительно опухоль или рак выбраны из рака пищевода, рака желудочно-кишечного тракта, рака поджелудочной железы, рака щитовидной железы, колоректального рака, рака почки, рака легкого (такого как NSCLC), рака печени, рака желудка, аденокарциномы желудка, аденокарциномы пищеводно-желудочного перехода (GEJ), рака головы и шеи, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака матки, рака шейки матки, рака яичника, рака предстательной железы, тестикулярного рака, герминогенной опухоли, рака кости, рака кожи, рака тимуса, холангиокарциномы, рака желчного пузыря, меланомы, мезотелиомы, лимфомы, миеломы (такой как множественная миелома), саркомы, глиобластомы и лейкоза;

предпочтительно опухоль выбрана из рака желудка, аденокарциномы желудка, аденокарциномы пищеводно-желудочного перехода (GEJ), рака пищевода, рака желудочно-кишечного тракта, рака поджелудочной железы, рака легкого (такого как NSCLC);

предпочтительно опухоль представляет собой рак желудка, аденокарциному желудка или аденокарциному пищеводно-желудочного перехода (GEJ), такую как

местнораспространенная неоперабельная или метастатическая опухоль, представляющая собой рак желудка, аденокарциному желудка или аденокарциному пищеводно-желудочного перехода (GEJ);

предпочтительно опухоль является CLDN 18.2-положительной, и более предпочтительно опухоль является HER2-отрицательной.

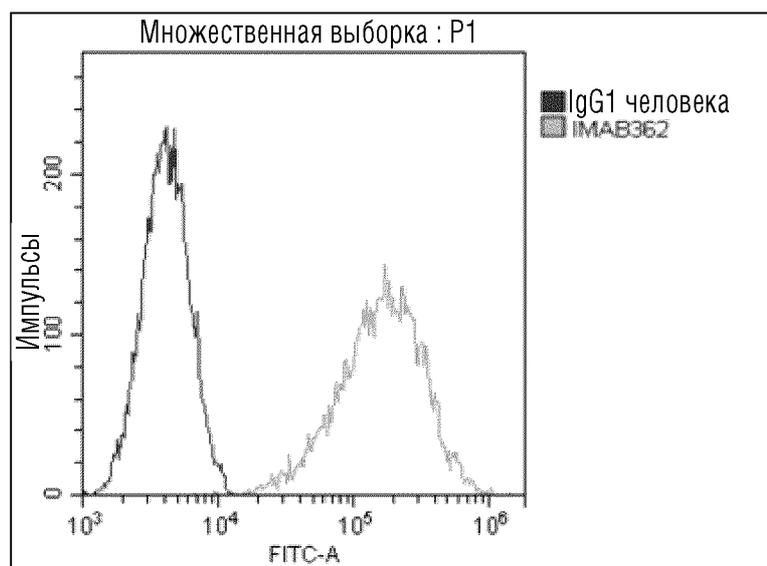
По доверенности

1/14

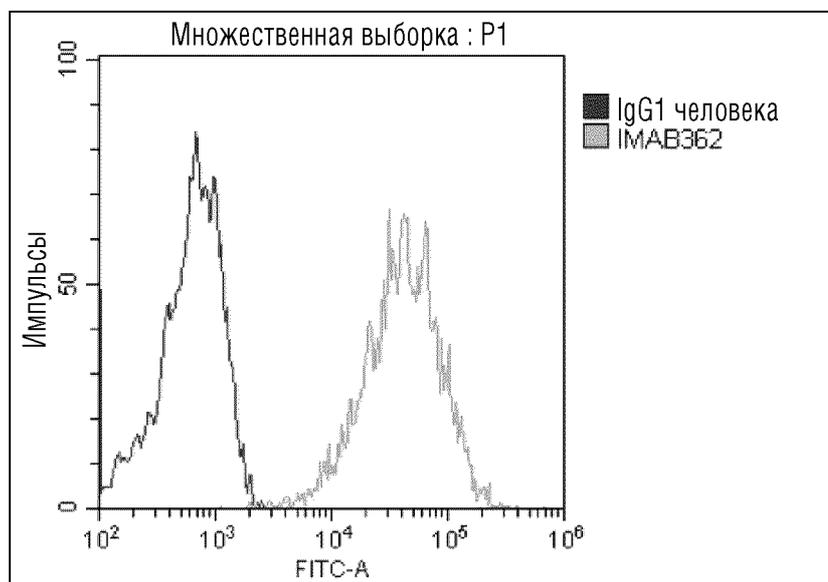
ФИГ.1А



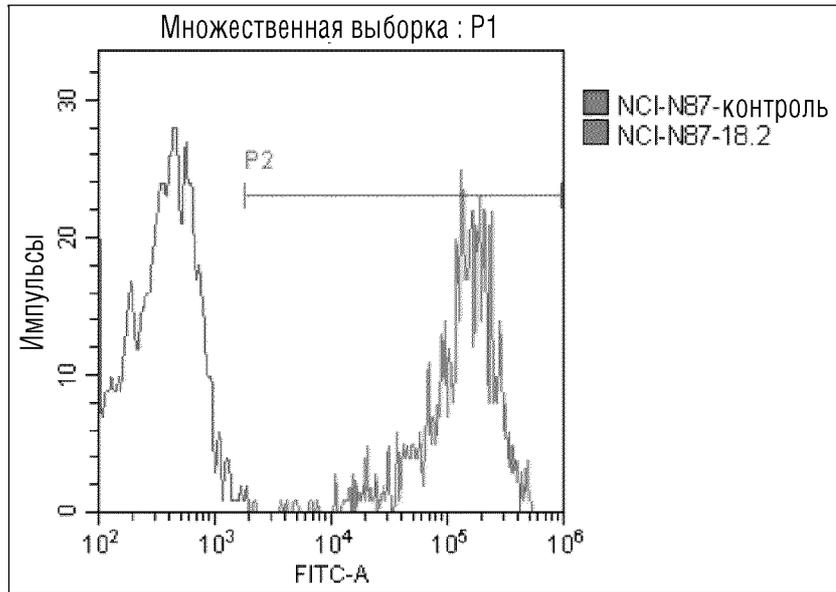
ФИГ.1В



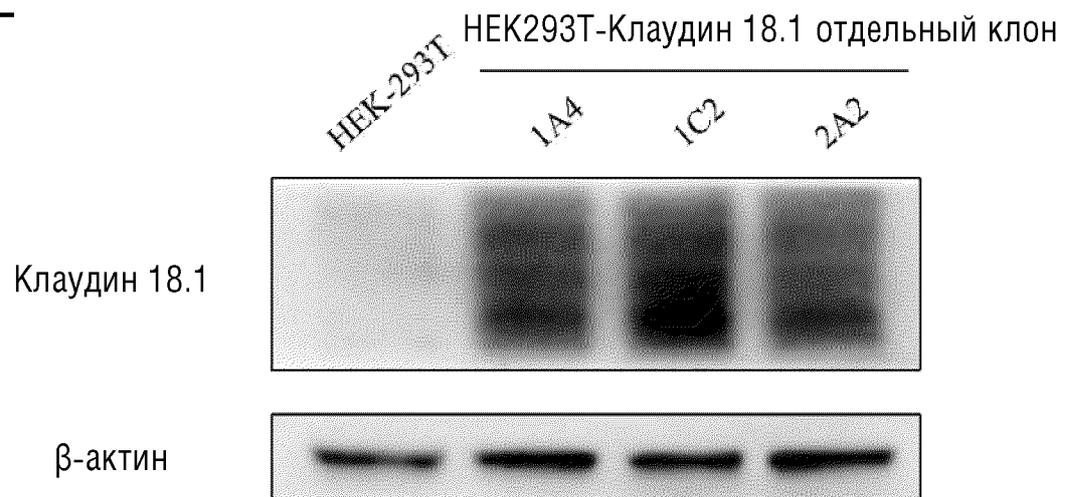
ФИГ.1С



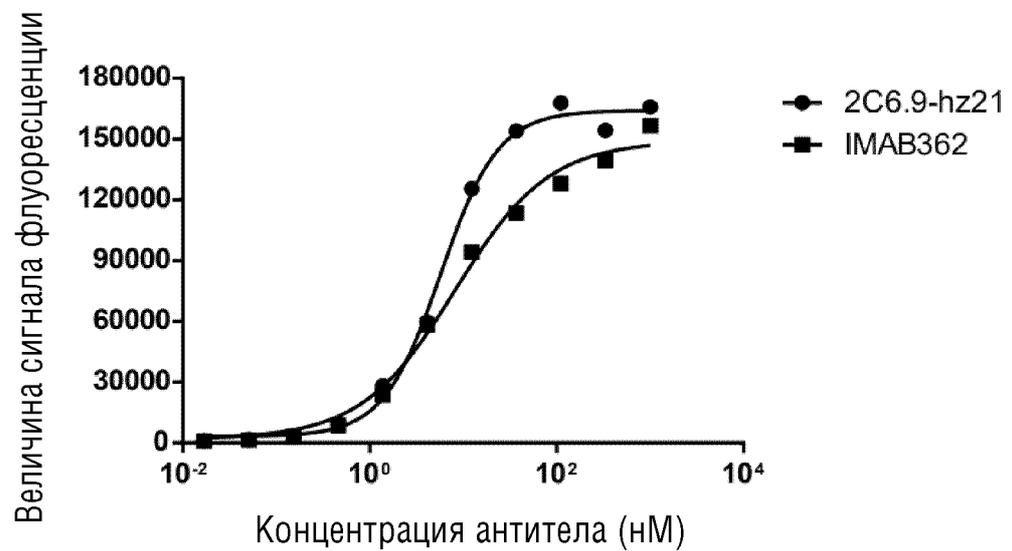
ФИГ.1D



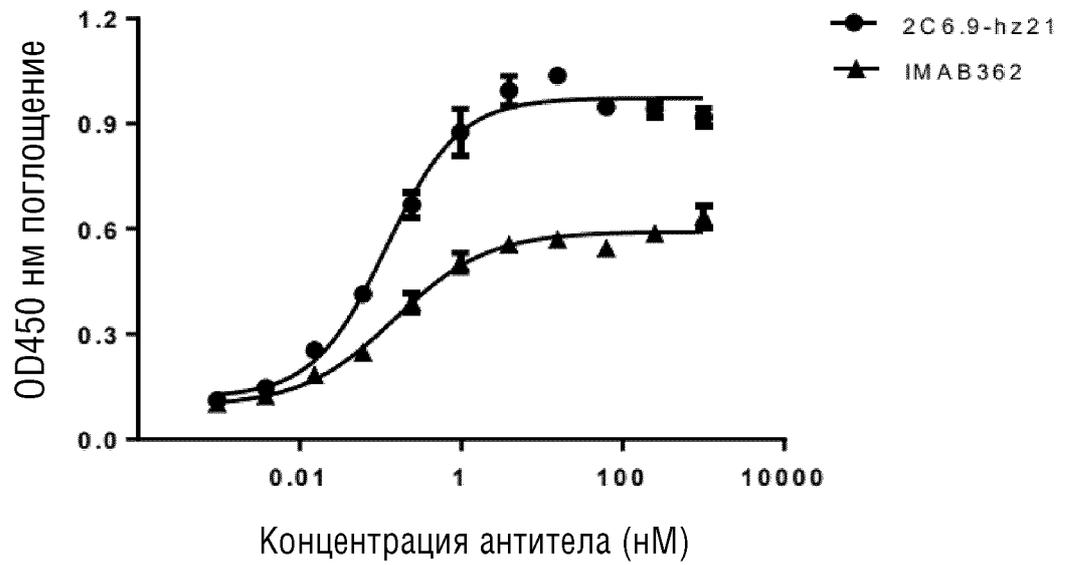
ФИГ.1E



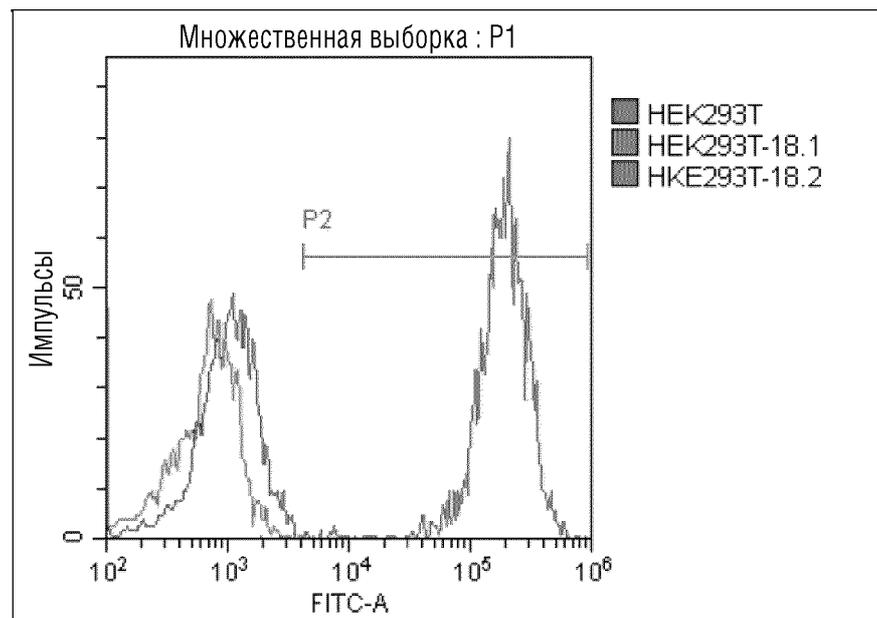
ФИГ.2



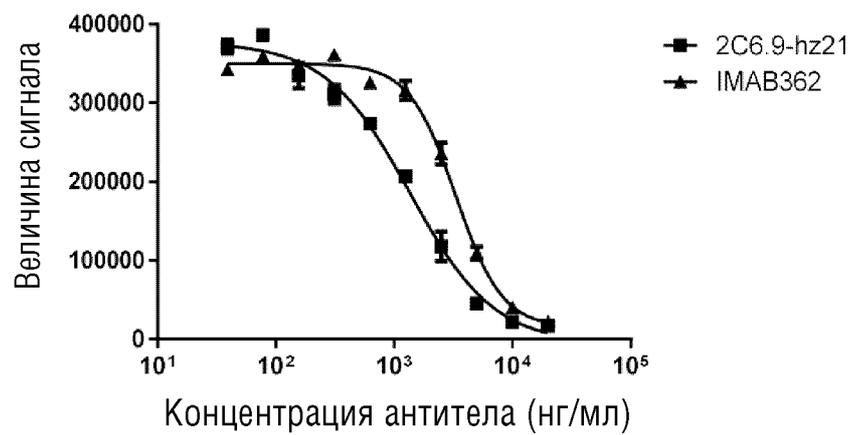
ФИГ.3



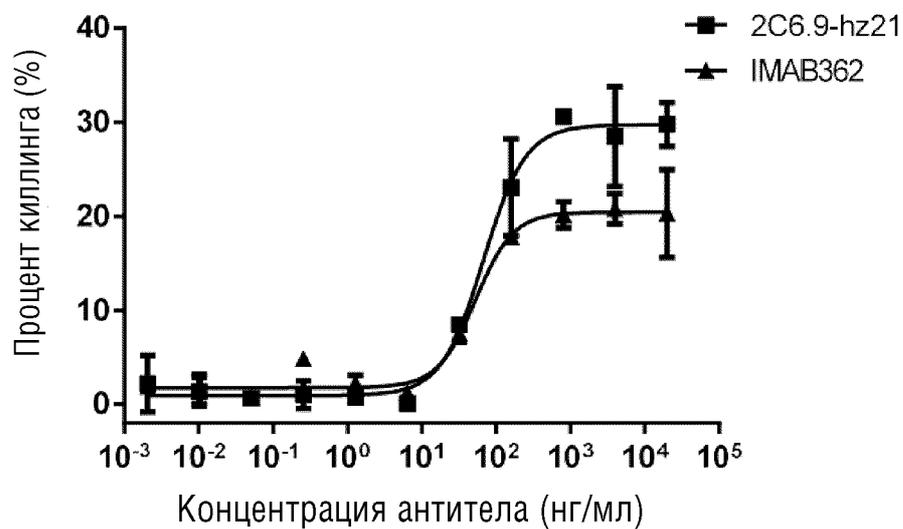
ФИГ.4



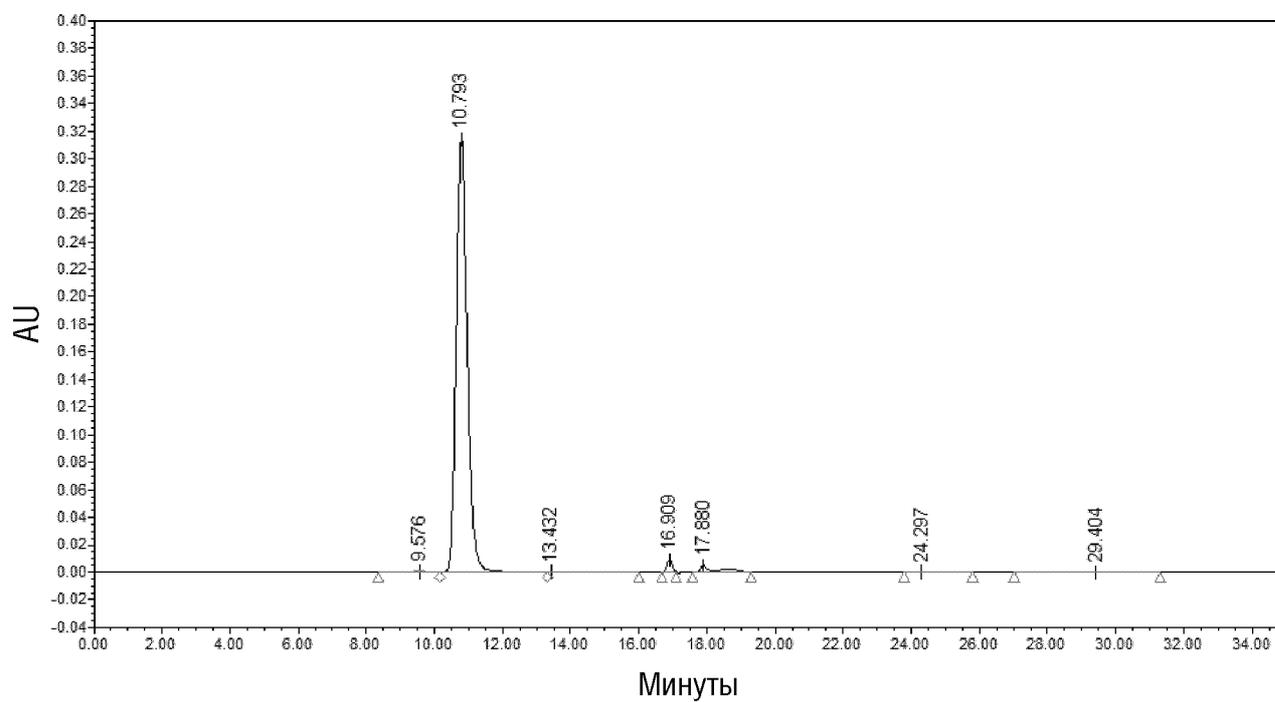
ФИГ.5



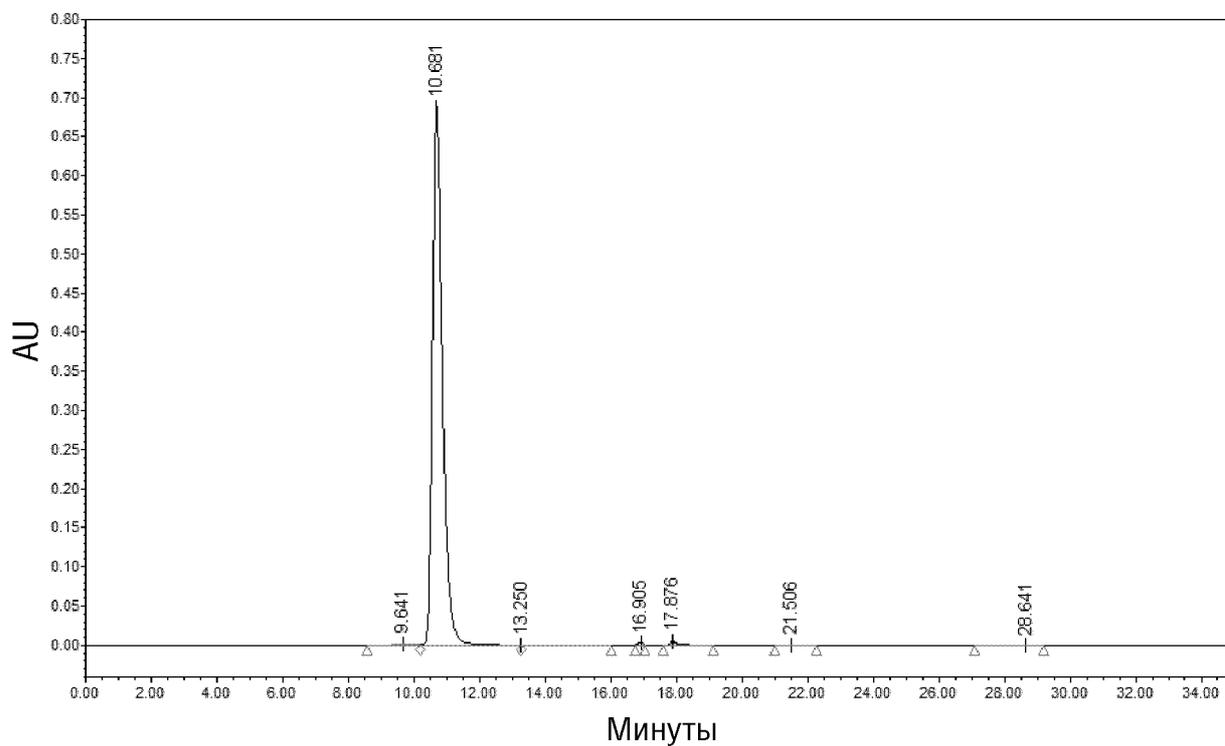
ФИГ.6



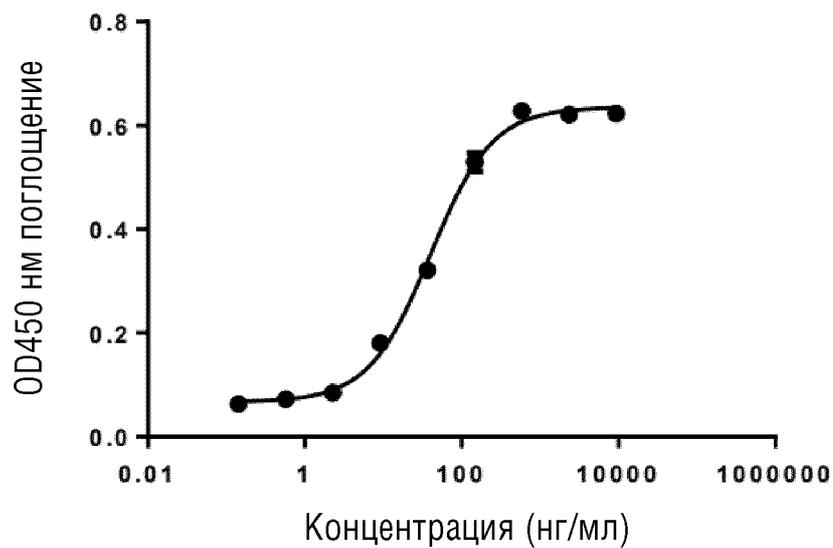
ФИГ.7



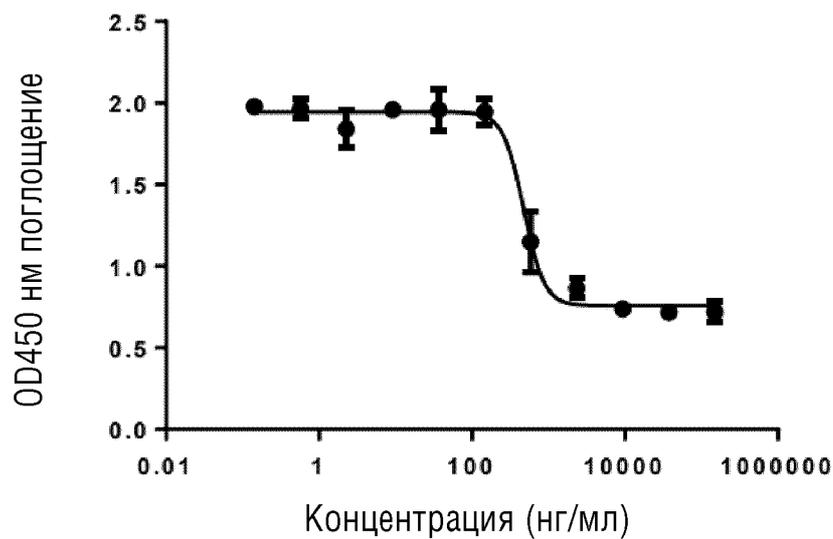
ФИГ.8



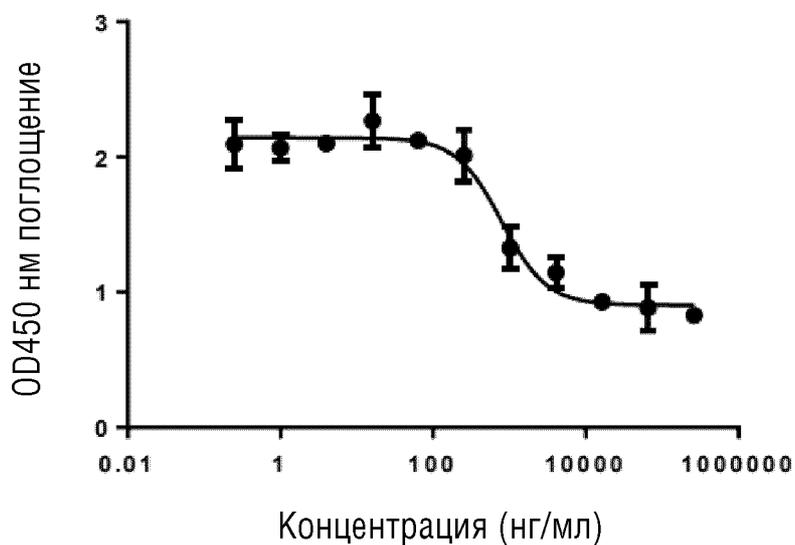
ФИГ.9



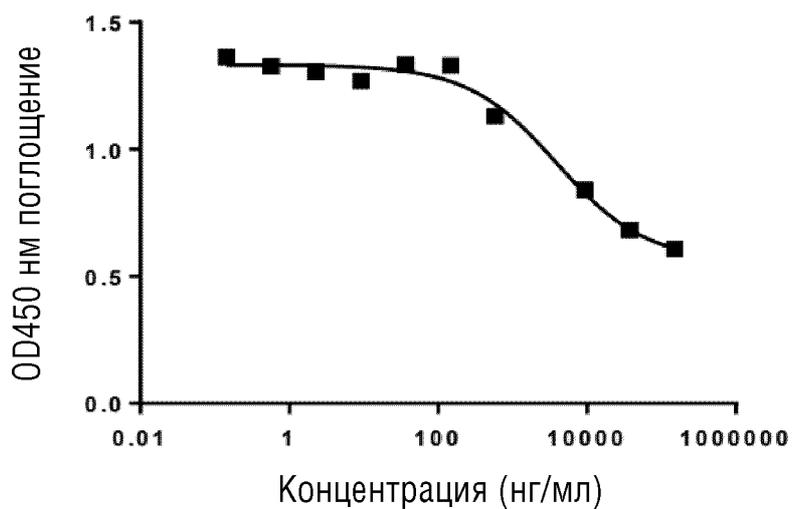
ФИГ.10А



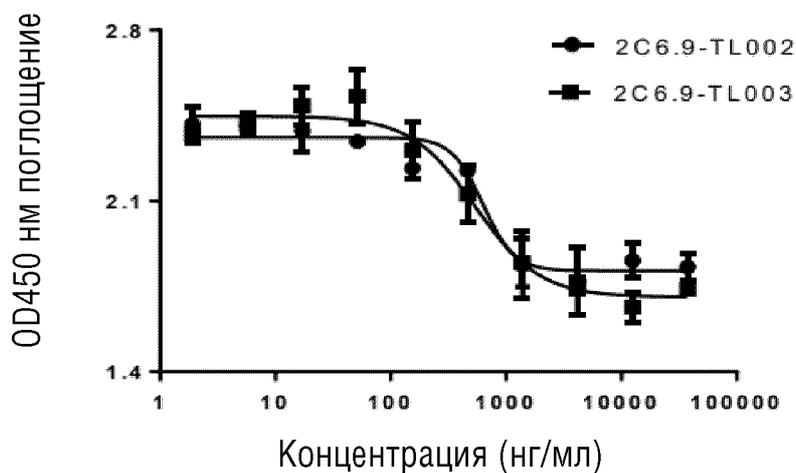
ФИГ.10В



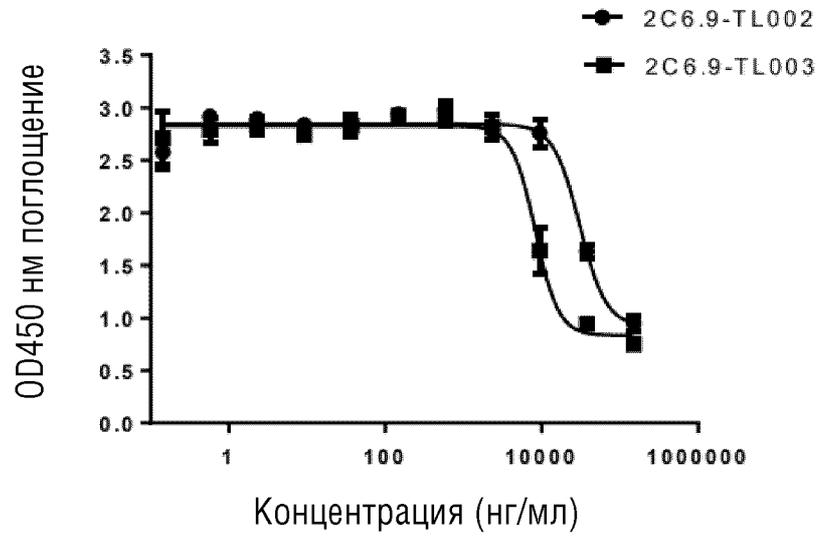
ФИГ.10С



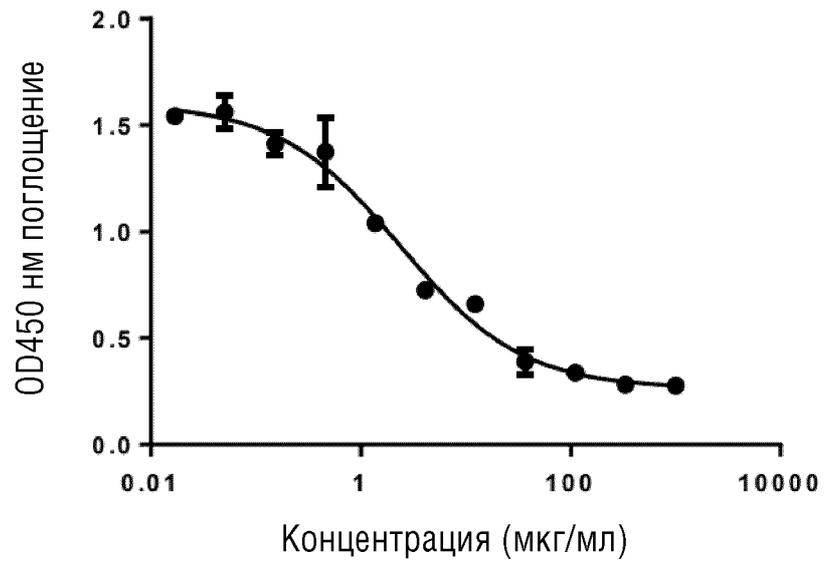
ФИГ.10D



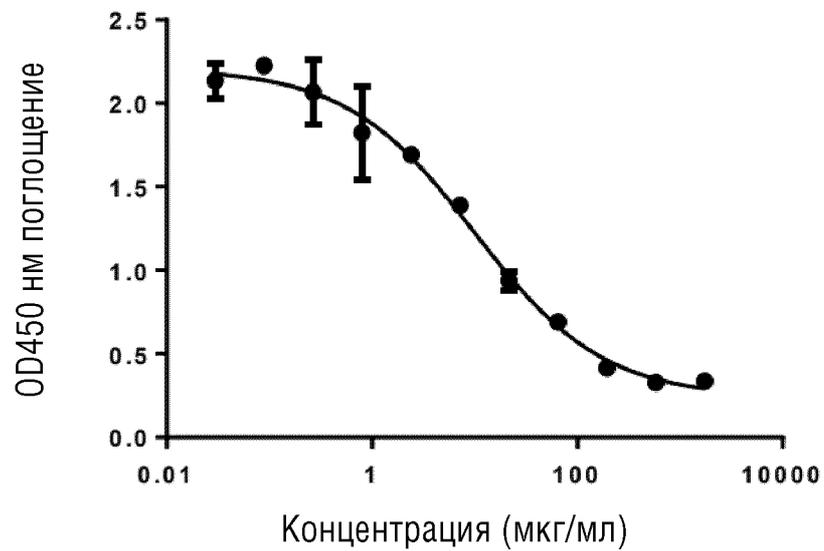
ФИГ.10Е



ФИГ.11А

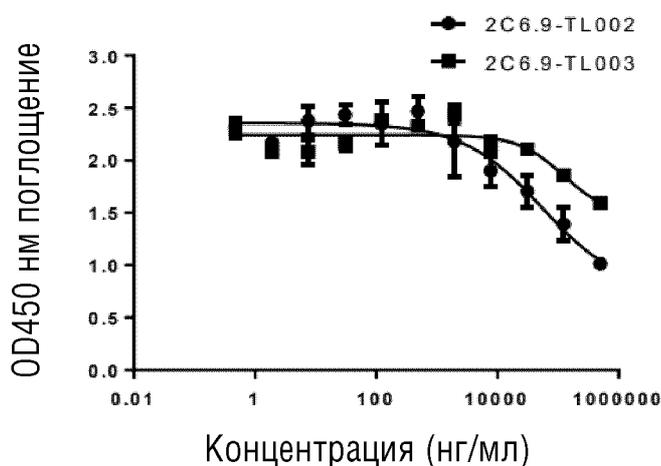


ФИГ.11В

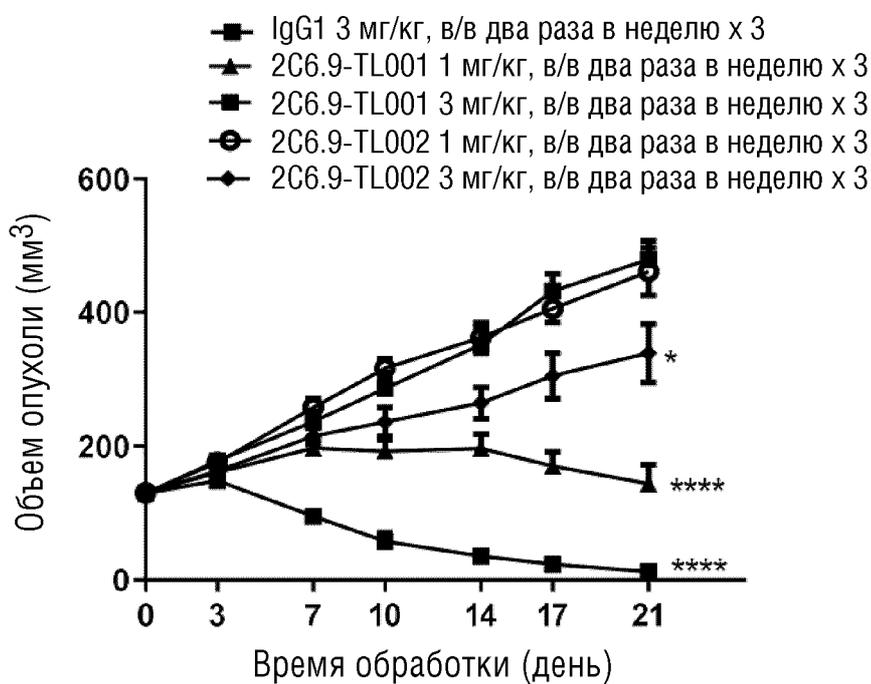


8/14

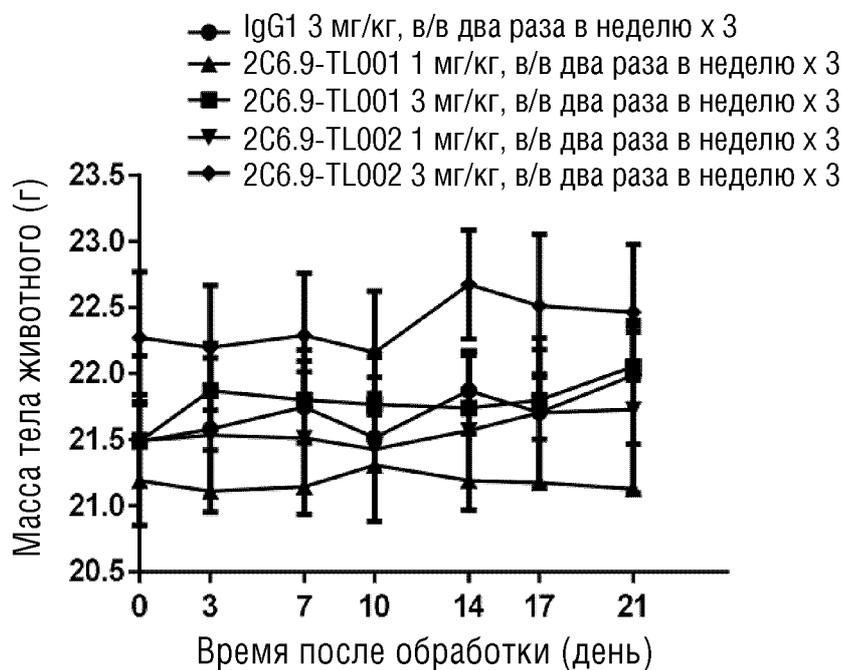
ФИГ.11С



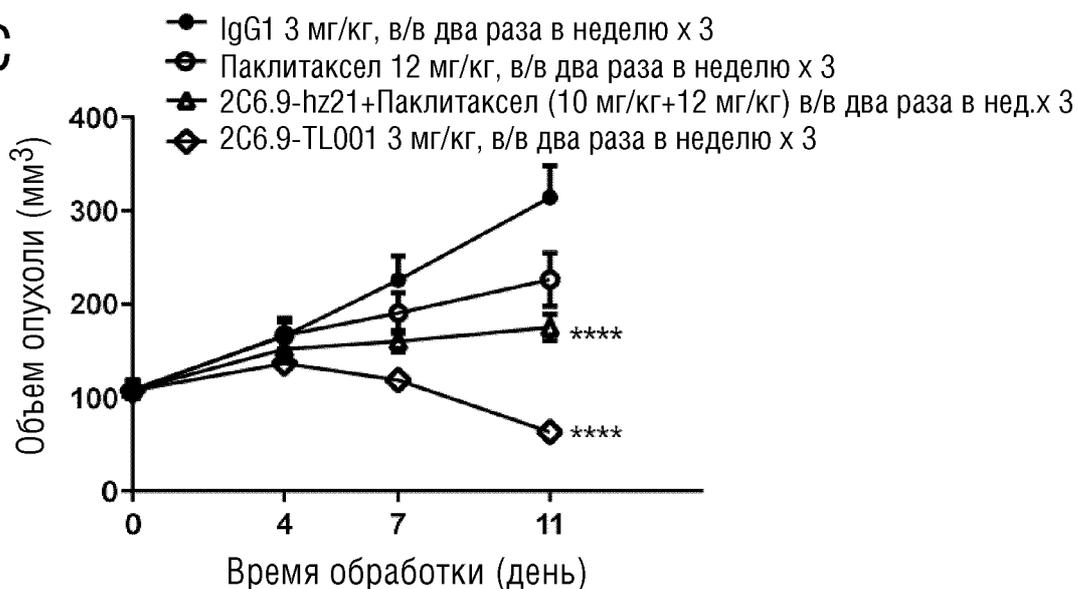
ФИГ.12А



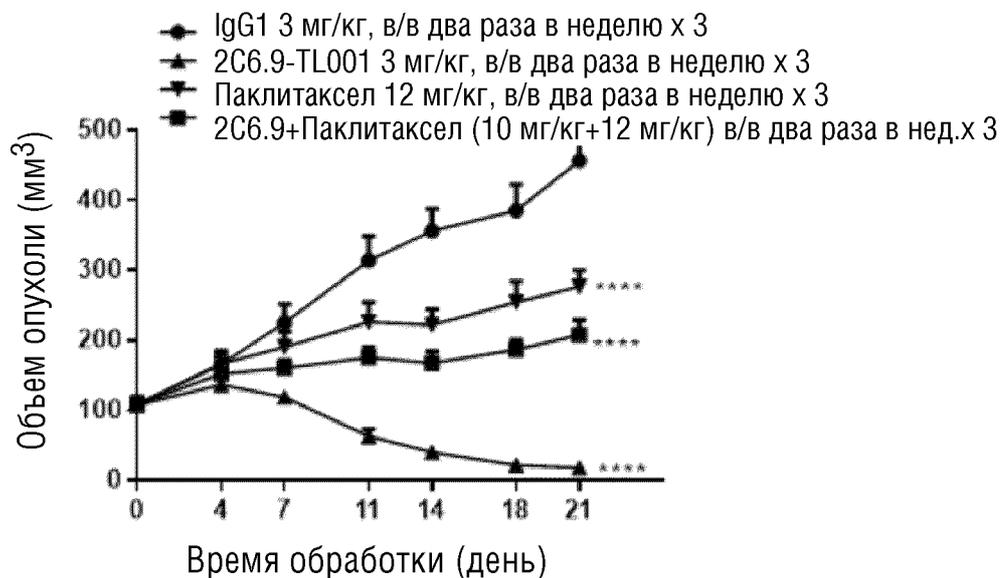
ФИГ.12В



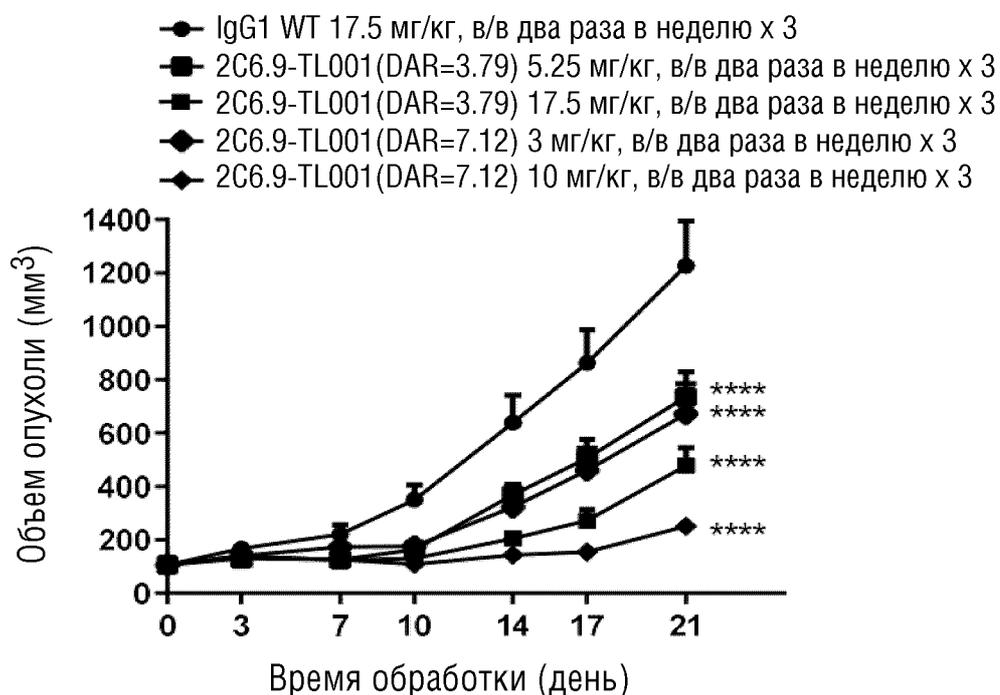
ФИГ.12С



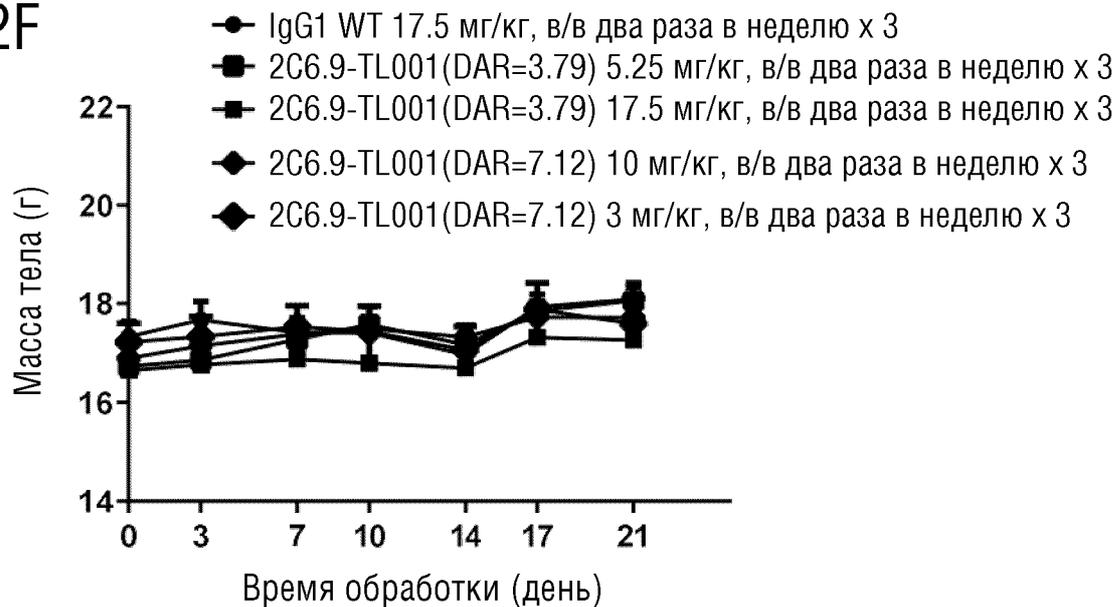
ФИГ.12D



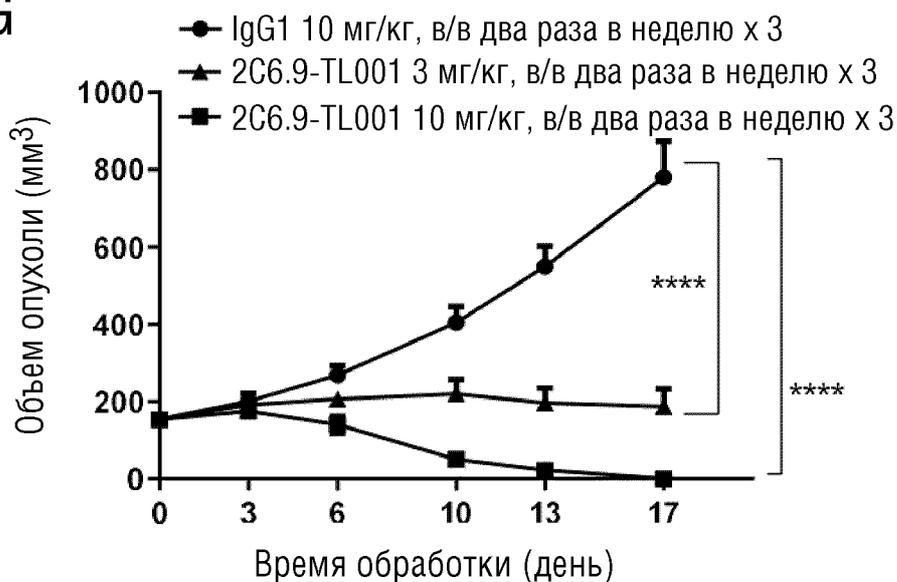
ФИГ.12Е



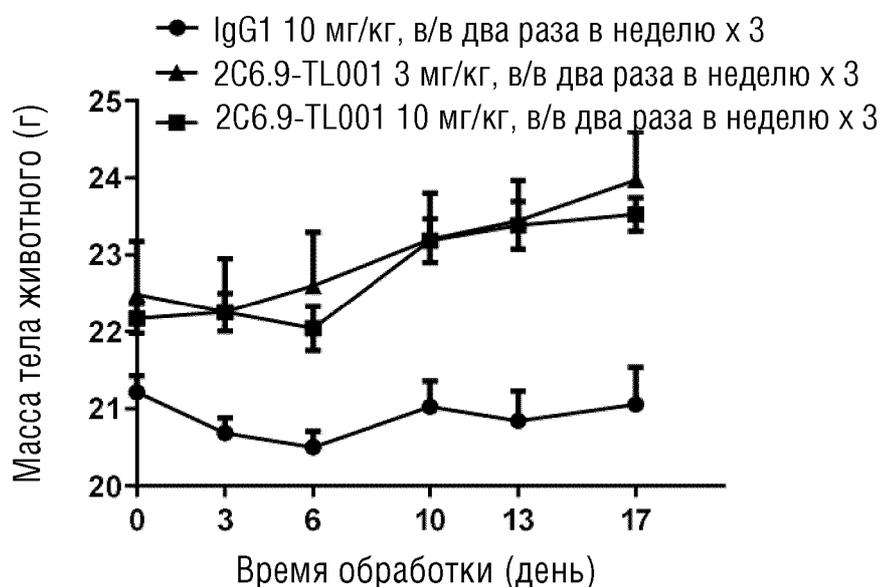
ФИГ.12F



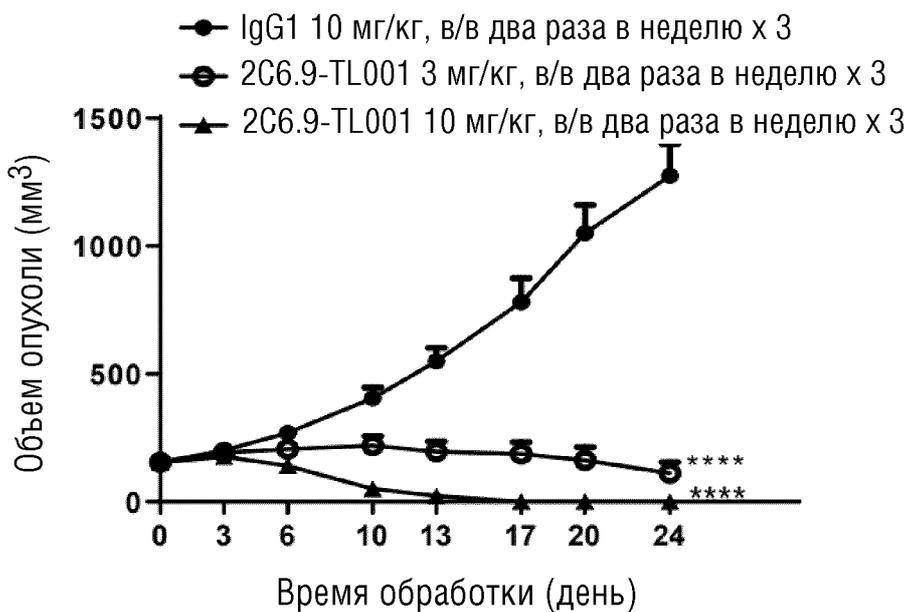
ФИГ.12G



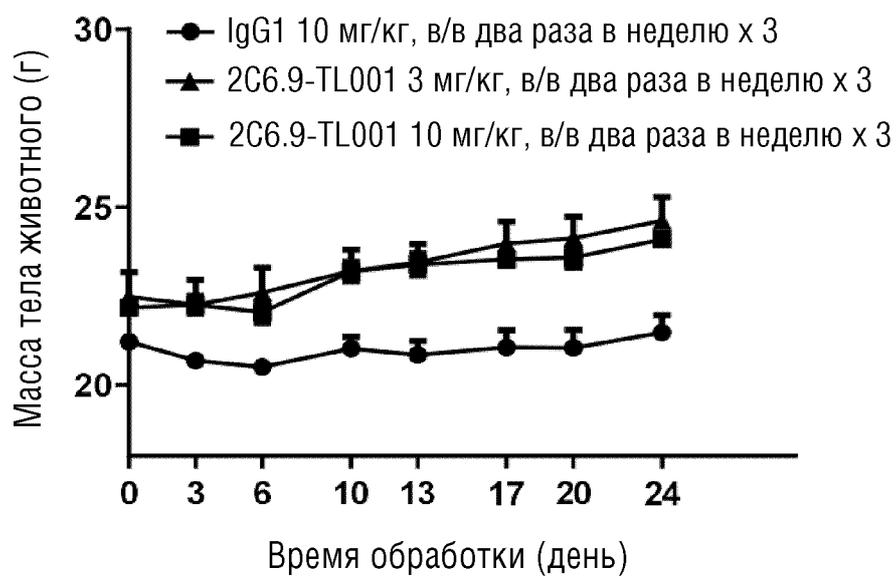
ФИГ.12H



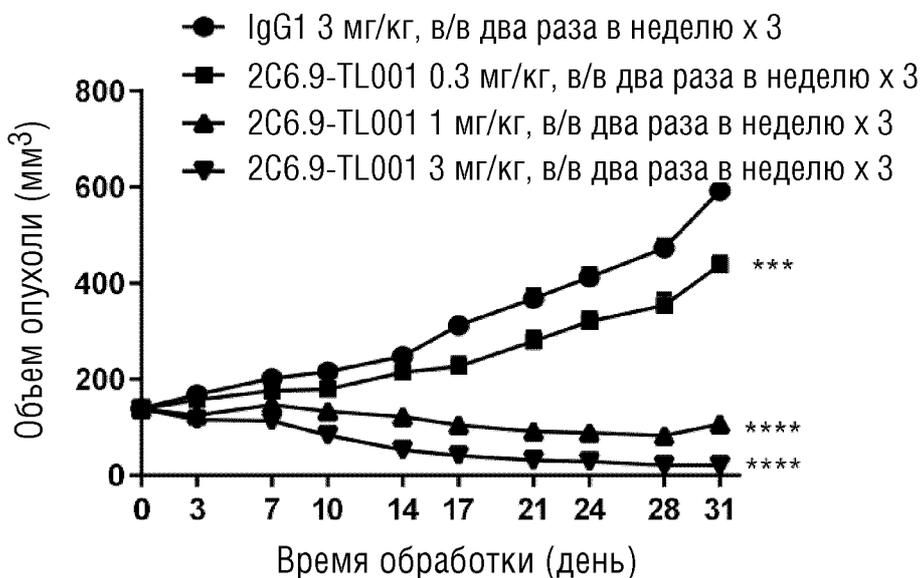
ФИГ.12I



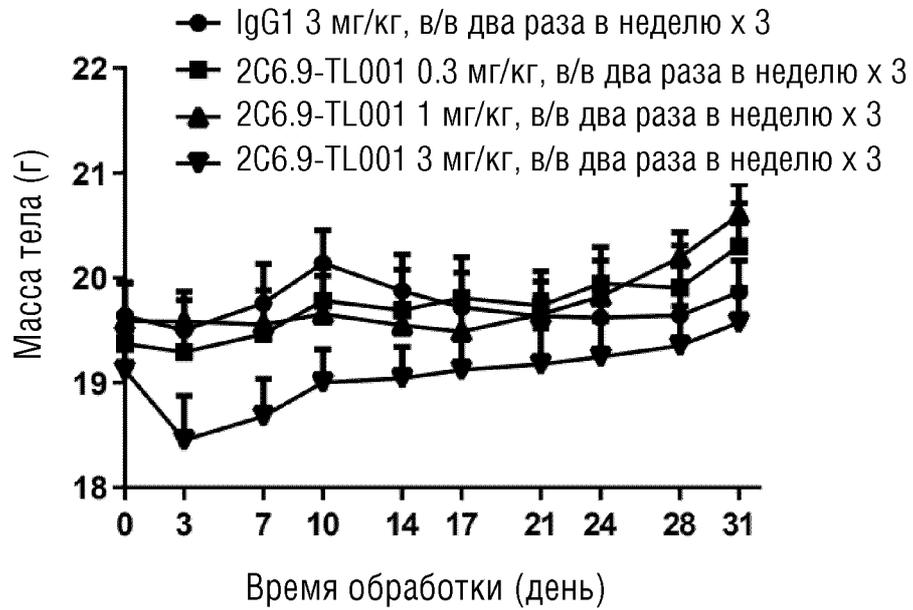
ФИГ.12J



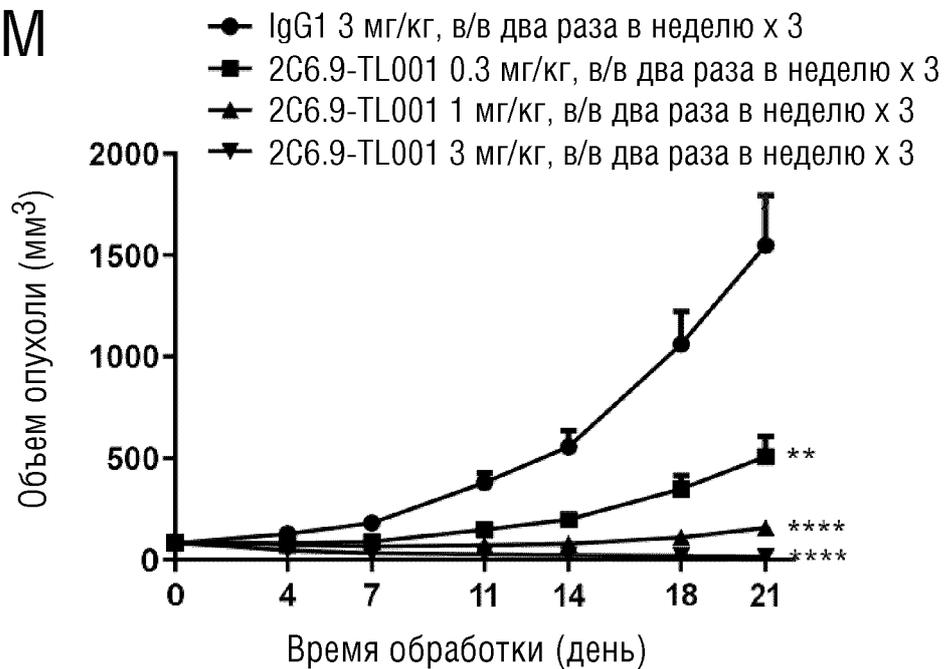
ФИГ.12K



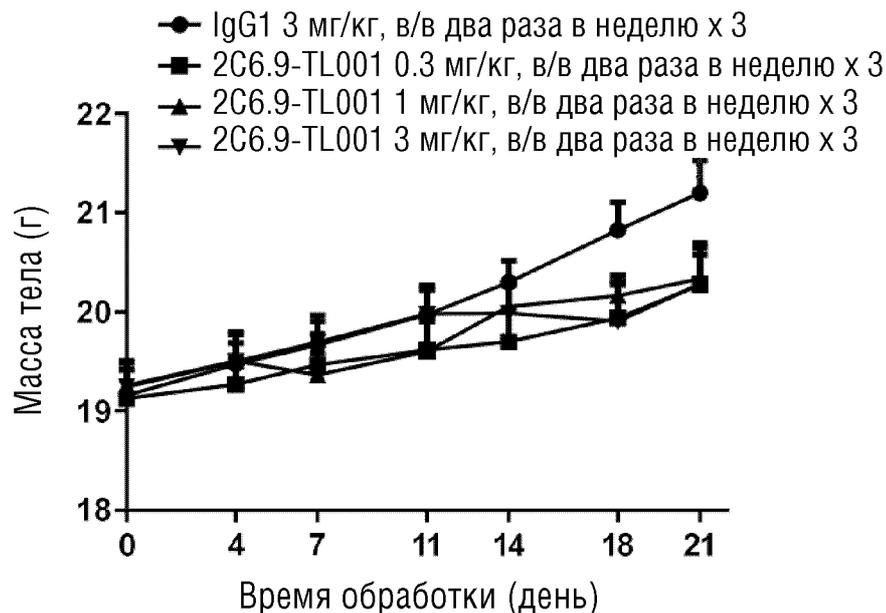
ФИГ.12L



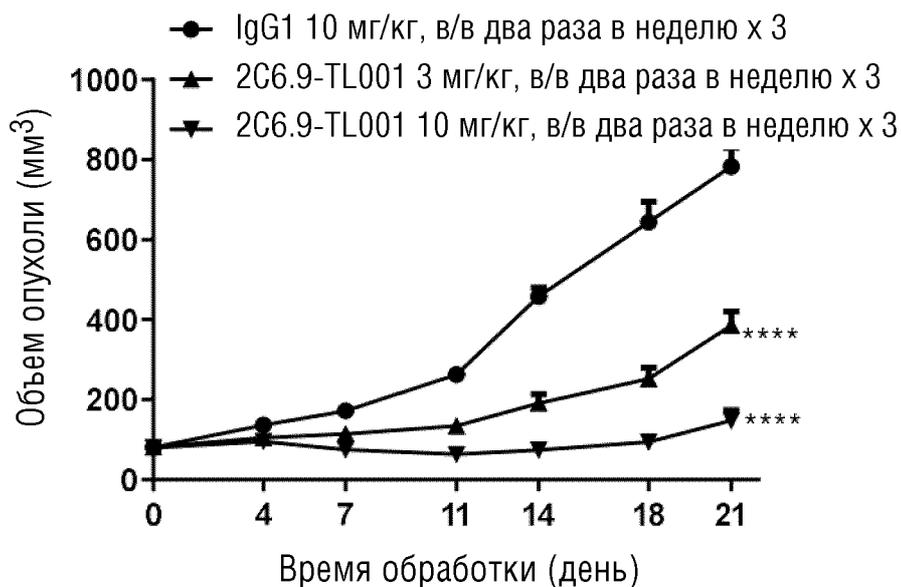
ФИГ.12M



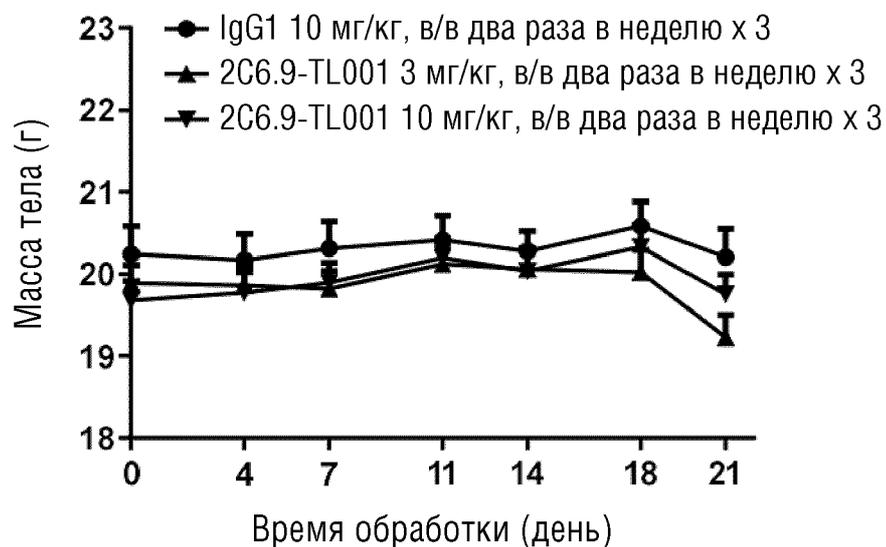
ФИГ.12N



ФИГ.12O



ФИГ.12P



ФИГ.13

