

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391583 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.08.28

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

(22) Дата подачи заявки
2021.11.23

(54) АНТИТЕЛА К CD48, КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛА И ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА И
ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/117,817
(32) 2020.11.24
(33) US
(86) PCT/IB2021/060871
(87) WO 2022/112942 2022.06.02
(88) 2022.07.14
(71) Заявитель:
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
Д'Алесслио Джозеф Энтони (US),
Клинтер Клаудиа Юдит, Мундт
Корнелия Анне (CH), Ньюкомб
Ричард Воган (US), Швайгхоффер
Тамас, Винкельбах Катарина (CH)
(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном документе раскрыты антитела, их антигенсвязывающие фрагменты и конъюгаты антитела и лекарственного средства, которые связываются с CD48 человека. Также раскрыты фармацевтические композиции, содержащие антитела, их антигенсвязывающие фрагменты и конъюгаты антитела и лекарственного средства, и способы получения и применения таких фармацевтических композиций для лечения рака у нуждающегося в этом пациента.

A1

202391583

202391583

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578099EA/022

АНТИТЕЛА К CD48, КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛА И ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[0001] Настоящая заявка испрашивает преимущество по следующей предварительной заявке на патент США № 63/117817, поданной 24 ноября 2020 года, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Настоящее изобретение направлено на антитела к CD48 и их антигенсвязывающие фрагменты, конъюгаты антитела и лекарственного средства на их основе и варианты их применения для лечения рака у нуждающегося в этом пациента.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0003] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная копия в формате ASCII, созданная 18 ноября 2021 года, имеет название PAT058966_SL.txt, и при этом ее размер составляет 79220 байт.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] CD48 (также известный как BLAST-1 и SLAMF2) представляет собой молекулу адгезии и костимулирующую молекулу, вовлеченную в широкий спектр врожденных и адаптивных иммунных ответов, в диапазоне от активности гранулоцитов и аллергии до активации Т-клеток и аутоиммунитета (McArdel *et al.* (2016) Clin Immunol 164:10-20). В нормальных гематологических тканях CD48 помогает регулировать активацию и дифференцировку лимфоцитов, дендритных и эндотелиальных клеток. В онкологии хорошо известно, что CD48 значительно повышается как на уровне РНК, так и белка при ряде В-клеточных злокачественных новообразований, в том числе среди большого числа пациентов с множественной миеломой, подгруппы пациентов с диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомой, а также при более редких показаниях со значительной неудовлетворенной медицинской потребностью.

[0005] CD48 представляет собой привлекательную мишень для конъюгатов антитела и лекарственного средства вследствие его отсутствия в нормальных тканях, отличных от гемопоэтических, экспрессии, ограниченной зрелыми лимфоцитами и моноцитами, и значительным повышением уровня при ряде гематологических злокачественных новообразований. Антитела и конъюгаты антитела и лекарственного средства, нацеливающиеся на CD48, ранее продемонстрировали противоопухолевую активность в доклинических моделях гематологических видов рака. Предыдущие попытки терапевтического лечения показали, что CD48 имеет потенциал для быстрой интернализации при взаимодействии с антителом и перемещения в лизосому, а также для быстрого восстановления популяции на поверхности опухолевых клеток после интернализации. Сохраняется потребность в дополнительных терапевтических

соединениях, которые нацеливаются на CD48.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В данном документе раскрыты антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с CD48 человека. В одном варианте осуществления антитело к CD48 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи, выбранные из:

(i) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 2, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 3; CDR1 легкой цепи (LCDR1), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 16, CDR2 легкой цепи (LCDR2), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 17, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 18;

(ii) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 2, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 3; CDR1 легкой цепи (LCDR1), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 16, CDR2 легкой цепи (LCDR2), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 17, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 18;

(iii) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 5, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 6, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 3; CDR1 легкой цепи (LCDR1), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 19, CDR2 легкой цепи (LCDR2), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 20, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 21;

(iv) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 7, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 8, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 9; CDR1 легкой цепи (LCDR1), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 22, CDR2 легкой цепи (LCDR2), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 20, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 18;

(v) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 27, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 28, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 29; CDR1 легкой цепи (LCDR1), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 42, CDR2 легкой цепи (LCDR2), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 43, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 44;

(vi) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 30, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 28, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 29; CDR1 легкой цепи (LCDR1), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 42, CDR2

легкой цепи (LCDR2), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 43, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 44;

(vii) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 31, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 32, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 29; CDR1 легкой цепи (LCDR1), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 45, CDR2 легкой цепи (LCDR2), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 46, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 47, или

[0007] (viii) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 33, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 34, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 35; CDR1 легкой цепи (LCDR1), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 48, CDR2 легкой цепи (LCDR2), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 46, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), состоящей из последовательности под SEQ ID NO: 44. В другом варианте осуществления антитело к CD48 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, или

(ii) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 36, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 49.

[0008] В другом варианте осуществления антитело к CD48 содержит:

(a) аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 12 и аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 25;

(b) аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 14 и аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 25;

(c) аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 63 и аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 25;

(e) аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 38 и аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 51;

(f) аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 40 и аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 51 или

(g) аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 65 и аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 51.

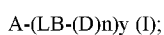
[0009] В еще одном варианте осуществления антитело к CD48 или его антигенсвязывающий фрагмент предусматривает Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab')₂ -фрагмент, одноцепочечный Fv (scFv), Fv, стабилизированный дисульфидными связями (sdFv), Fd-фрагмент, Fv-фрагмент, dAb-фрагмент, однодоменное антитело, макситело, минитело, нанотело, интратело, диатело, полуантитело, антитело с одним плечом,

моноклональное антитело, биспецифическое антитело, антитело, представляющее собой биспецифический активатор, привлекающий Т-клетки, полиспецифическое антитело, Т-клетку с химерным антигенным рецептором или радиоиммуноконъюгат.

[0010] Также раскрыты нуклеиновые кислоты, которые кодируют антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в данном документе. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую переменную тяжелую цепь (VH) или переменную легкую цепь (VL) антител, выбранную из последовательностей под SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 50. В других вариантах осуществления раскрытые в данном документе нуклеиновые кислоты кодируют последовательности тяжелой цепи и легкой цепи антител и содержат последовательности, выбранные из последовательностей под SEQ ID NO: 13, 15, 39, 41, 75, 77, 26 или 52.

[0011] Также раскрыты векторы, содержащие любую из предусмотренных в данном документе нуклеиновых кислот, линии клеток, содержащие любой из предусмотренных в данном документе векторов, и способы получения антител или их антигенсвязывающих фрагментов, предусмотренные в данном документе, с применением нуклеиновых кислот, векторов и линий клеток. В одном варианте осуществления способ получения антитела к CD48 или его антигенсвязывающего фрагмента включает культивирование любой из линий клеток, предусмотренных в данном документе, в подходящих условиях для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, затем очистку и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

[0012] В другом варианте осуществления в настоящей заявке также раскрыты конъюгаты антитела и лекарственного средства формулы (I):



где

A представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с CD48 человека, раскрытым в данном документе;

L_B представляет собой линкер;

D представляет собой цитотоксическое средство;

n представляет собой целое число от 1 до 10, и

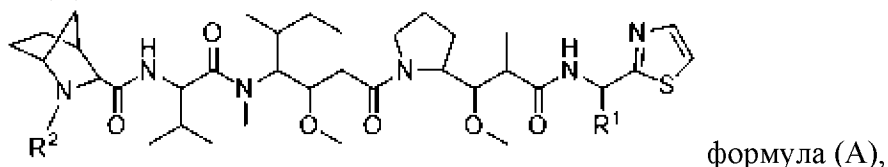
y представляет собой целое число от 1 до 10,

при этом фрагмент, представляющий собой линкер-лекарственное средство (L_B-(D)_n), ковалентно присоединен к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (A). В некоторых вариантах осуществления n равняется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления y равняется 1, 2, 3 или 4. В одном варианте осуществления L_B независимо выбран из расщепляемого линкера или нерасщепляемого линкера. В некоторых вариантах осуществления каждый L_B представляет собой расщепляемый линкер. В других вариантах осуществления каждый L_B представляет собой нерасщепляемый линкер.

[0013] В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой лекарственное средство, является ингибитором Eg5, ингибитором V-АТФазы, ингибитором

HSP90, ингибитором IAP, ингибитором mTog, стабилизатором микротрубочек, дестабилизатором микротрубочек, ауристатином, доластатином, майтанзиноидом, MetAP (метионинаминопептидазой), ингибитором ядерного экспорта белков CRM1, ингибитором DPPIV, ингибитором реакций переноса фосфорильной группы в митохондриях, ингибитором синтеза белков, ингибитором киназ, ингибитором CDK2, ингибитором CDK9, ингибитором протеасом, ингибитором кинезина, ингибитором HDAC, ДНК-повреждающим средством, ДНК-алкилирующим средством, ДНК-интеркалятором, средством, связывающим малую бороздку ДНК, ингибитором РНК-полимеразы, аманитином, ингибитором сплайсосом, ингибитором топоизомеразы и ингибитором DHFR или проапоптотическим средством, но исключая ингибиторы BCL-2, ингибиторы MCL-1 и ингибиторы BCL-XL. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой лекарственное средство, является ауристатином.

[0014] В одном варианте осуществления фрагмент D, представляющий собой лекарственное средство, является цитотоксическим средством, выбранным из соединения формулы (A):



где

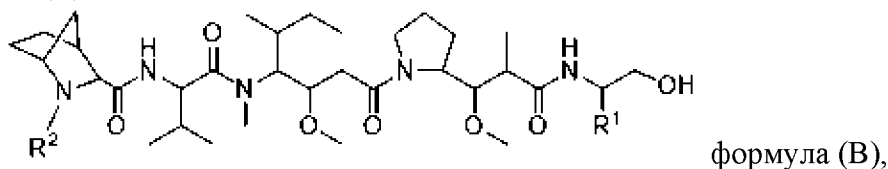


R^2 представляет собой H, C_1 - C_6 алкил, $-C(=O)R^3$, $-(CH_2)_mOH$, $-C(=O)(CH_2)_mOH$, $-C(=O)((CH_2)_mO)_nR^4$, $-((CH_2)_mO)_nR^4$ или C_1 - C_6 алкил, который необязательно замещен $-CN$, $-C(=O)NH_2$ или 1-5 гидроксилами;

каждый R^3 независимо выбран из C_1 - C_6 алкила и C_1 - C_6 алкила, который необязательно замещен 1-5 гидроксилами,

и каждый R^4 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила,

или D представляет собой цитотоксическое средство, выбранное из соединения формулы (B):



где



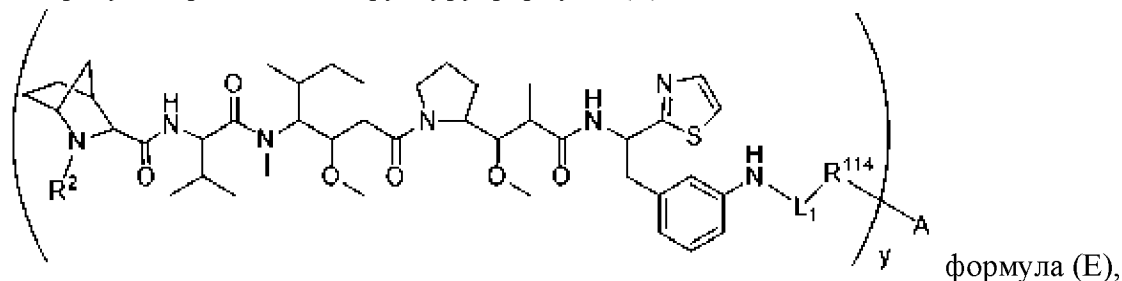
R^2 представляет собой H, C_1 - C_6 алкил, $-C(=O)R^3$, $-(CH_2)_mOH$, $-C(=O)(CH_2)_mOH$, $-C(=O)((CH_2)_mO)_nR^4$, $-((CH_2)_mO)_nR^4$ или C_1 - C_6 алкил, который необязательно замещен $-CN$, $-$

$C(=O)NH_2$ или 1-5 гидроксилами;

каждый R^3 независимо выбран из C_1 - C_6 алкила и C_1 - C_6 алкила, который необязательно замещен 1-5 гидроксилами;

и каждый R^4 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила.

[0015] Также в данном документе раскрыт конъюгат антитела и лекарственного средства, предусматривающий структуру формулы (E):



где

A представляет антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с CD48 человека, раскрытым в данном документе;

y представляет собой целое число от 1 до 10;

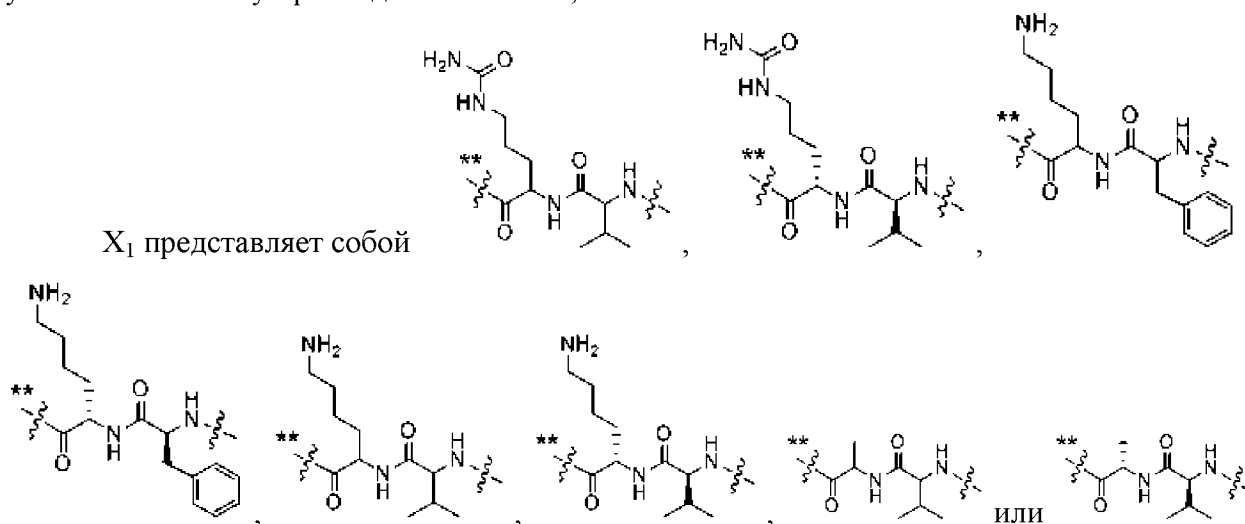
R^2 представляет собой H, C_1 - C_6 алкил, $-C(=O)R^3$, $-(CH_2)_mOH$, $-C(=O)(CH_2)_mOH$, $-C(=O)((CH_2)_mO)_nR^4$, $-((CH_2)_mO)_nR^4$ или C_1 - C_6 алкил, который необязательно замещен $-CN$, $-C(=O)NH_2$ или 1-5 гидроксид;

каждый R^3 независимо выбран из C_1 - C_6 алкила и C_1 - C_6 алкила, который необязательно замещен 1-5 гидроксилами;

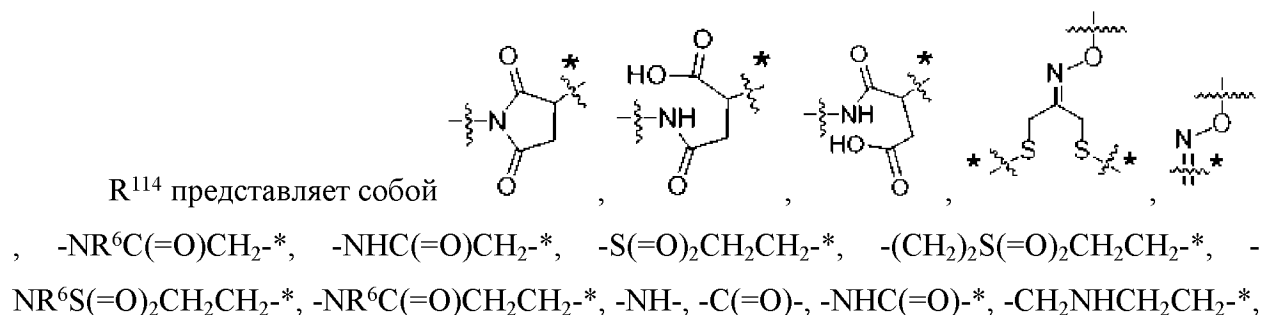
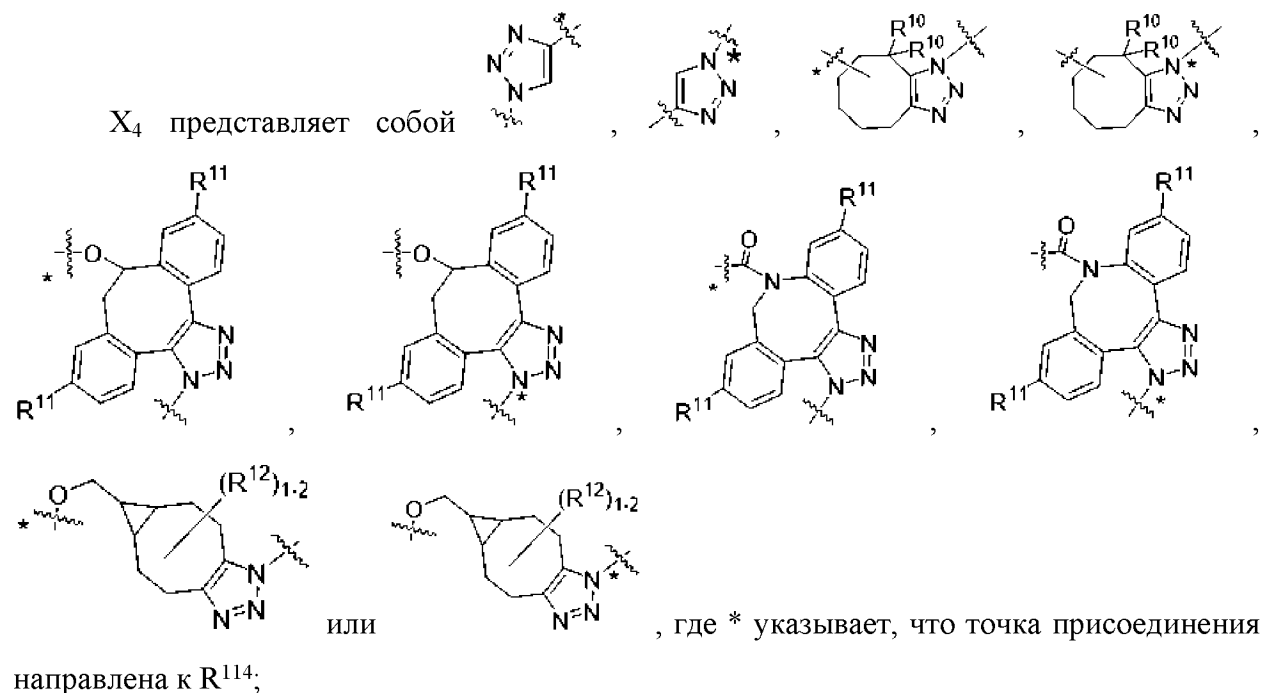
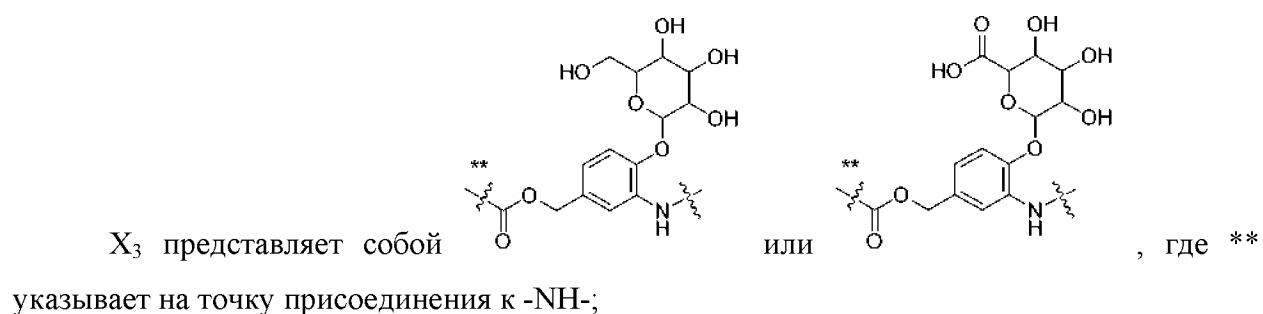
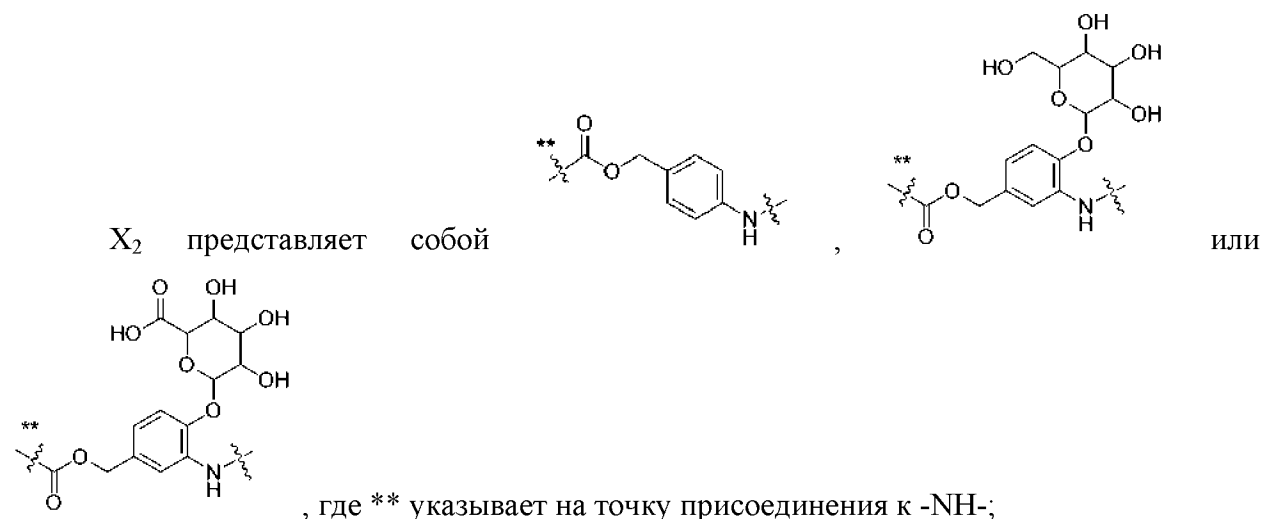
каждый R^4 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила;

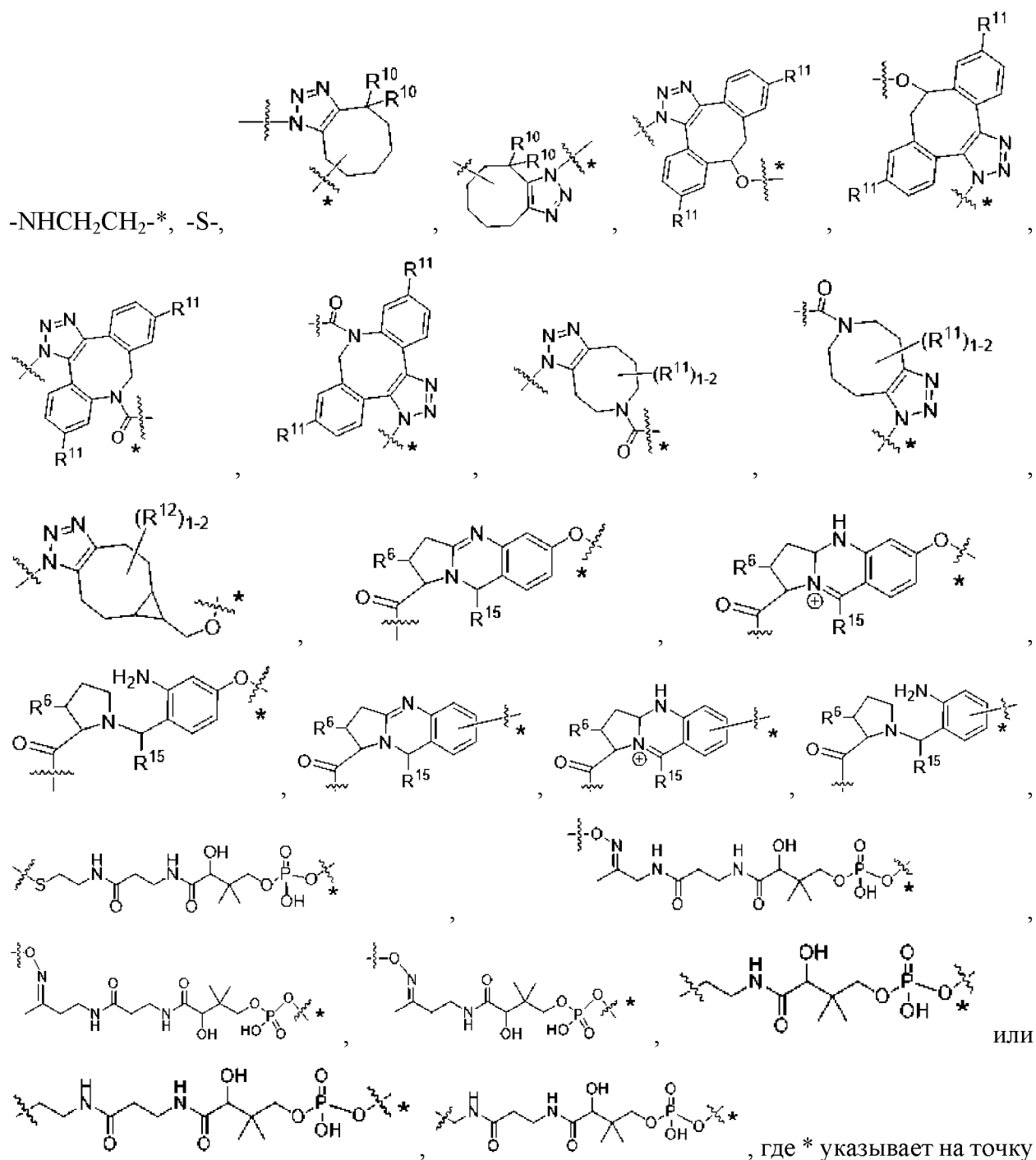
L_1 представляет собой $-X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_1C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_2X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_2X_1C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$, $-X_1C(=O)(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$, $X_2X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$ или $-X_2X_1C(=O)(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$, где ** указывает на точку присоединения к R^{114} ;

X_1 представляет собой



, где ** указывает на точку присоединения к -NH- или к X₂;





присоединения к A ;

каждый R⁶ независимо выбран из H и C₁-C₆алкила;

каждый R¹⁰ независимо выбран из H, C₁-C₆алкила, F, Cl и -OH;

каждый R¹¹ независимо выбран из H, C₁-C₆алкила, F, Cl, -NH₂, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -N(CH₃)₂, -CN, -NO₂ и -OH;

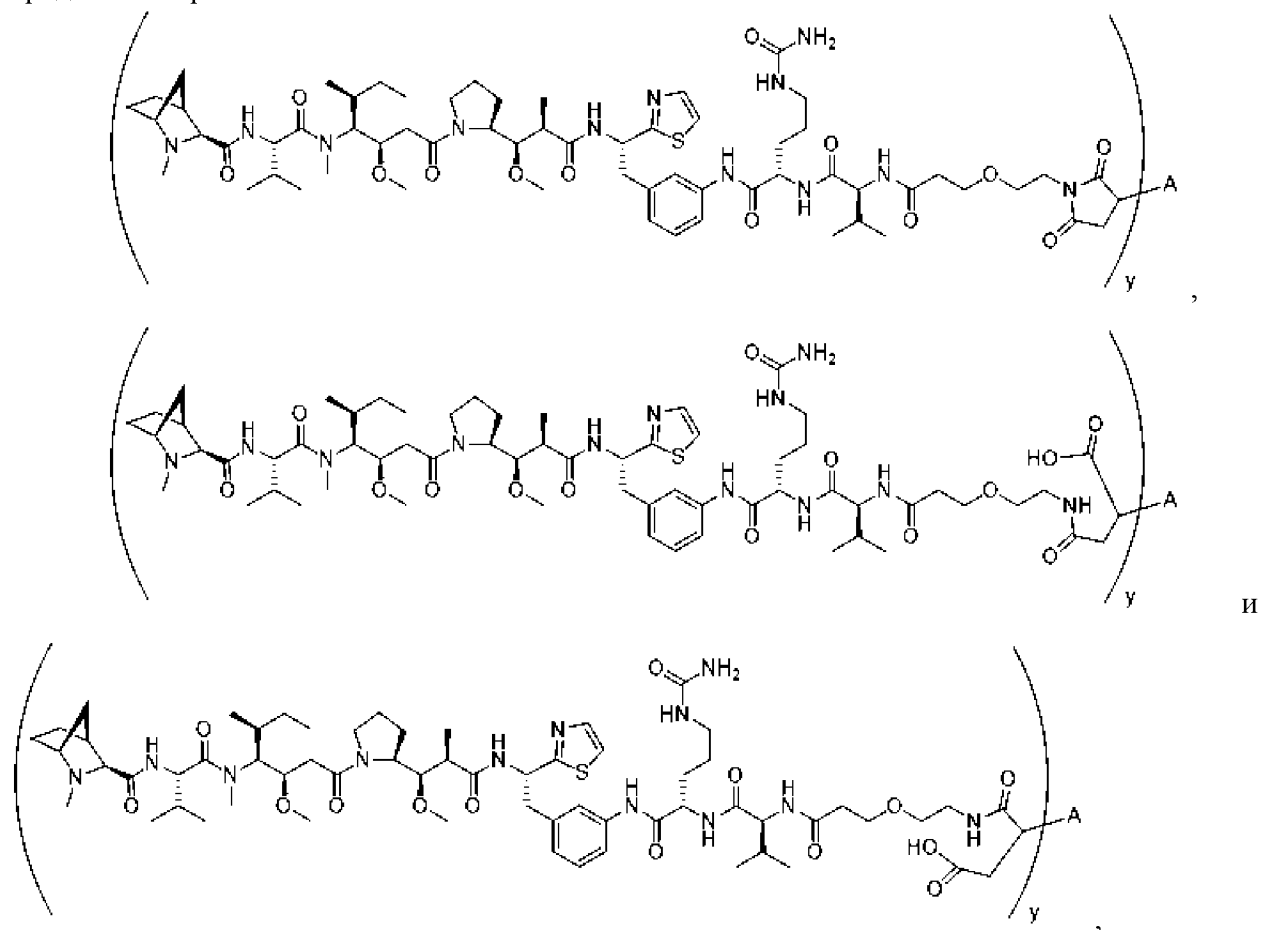
каждый R¹² независимо выбран из H, C₁₋₆алкила, фтора, бензилокси, замещенного -C(=O)ОН, бензила, замещенного -C(=O)ОН, C₁₋₄алкокси, замещенного -C(=O)ОН, и C₁₋₄алкила, замещенного -C(=O)ОН;

каждый R¹⁵ независимо выбран из H, -CH₃ и фенила;

каждый t независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10, и

каждый p независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14.

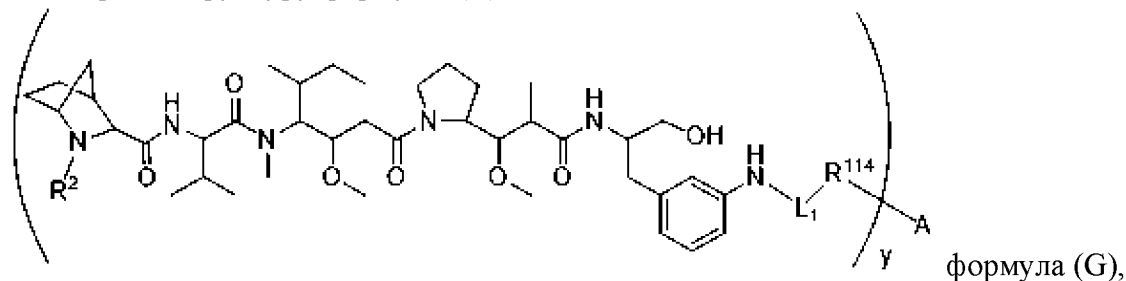
[0016] В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитела и лекарственного средства выбран из:



где

A представляет антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с CD48 человека, раскрытым в данном документе, и y представляет собой целое число от 1 до 10.

[0017] В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитела и лекарственного средства содержит структуру формулы (G):



где

A представляет антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с CD48 человека, раскрытым в данном документе;

y представляет собой целое число от 1 до 10;

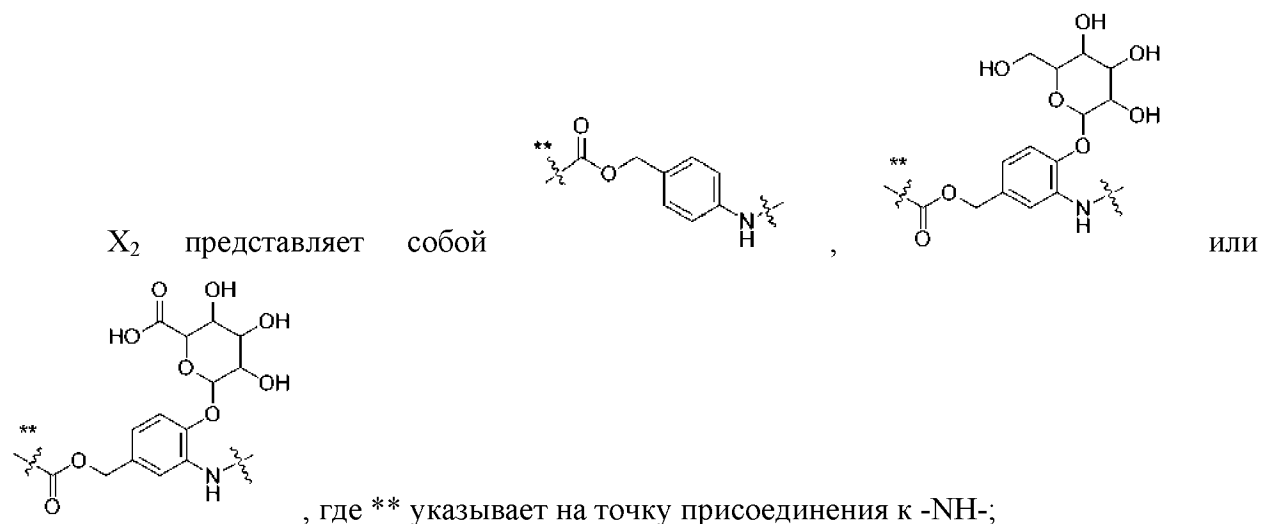
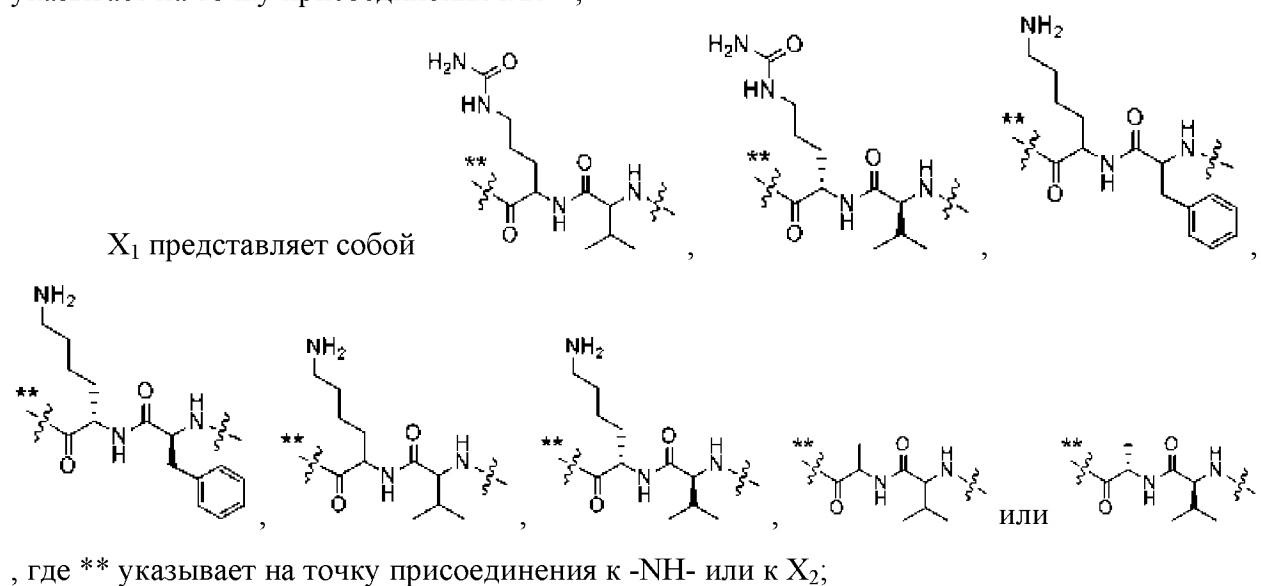
R^2 представляет собой H, C_1 - C_6 алкил, $-C(=O)R^3$, $-(CH_2)_mOH$, $-C(=O)(CH_2)_mOH$, -

$C(=O)((CH_2)_mO)_nR^4$, $-((CH_2)_mO)_nR^4$ или C_1 - C_6 алкил, который необязательно замещен $-CN$, $-C(=O)NH_2$ или 1-5 гидроксигруппами;

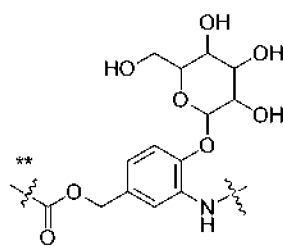
каждый R³ независимо выбран из C₁-C₆алкила и C₁-C₆алкила, который необязательно замещен 1-5 гидроксилами;

каждый R⁴ независимо выбран из H и C₁-C₆алкила;

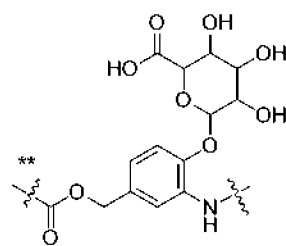
L_1 представляет собой $-X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_1C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_2X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_2X_1C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$, $-X_1C(=O)(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$, $-X_2X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$ или $-X_2X_1C(=O)(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$, где $**$ указывает на точку присоединения к R^{114} ;



X_3 представляет собой



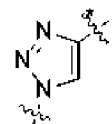
или



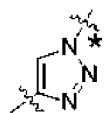
, где **

указывает на точку присоединения к -NH-;

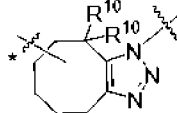
X_4 представляет собой



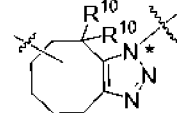
,



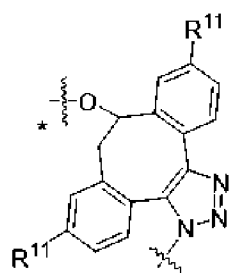
,



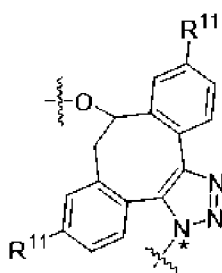
,



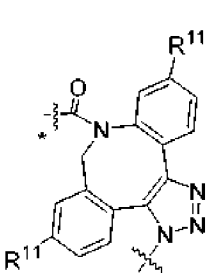
,



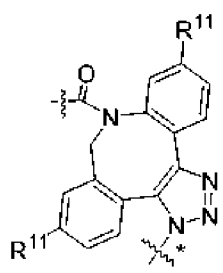
,



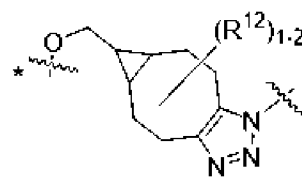
,



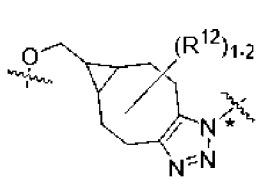
,



,



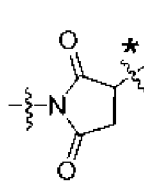
или



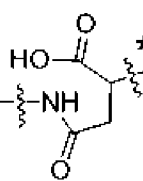
, где * указывает, что точка присоединения

направлена к R^{11} ;

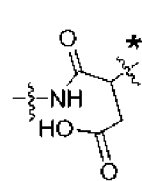
R^{114} представляет собой



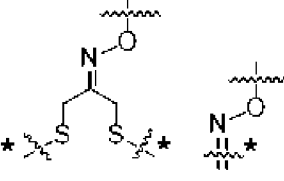
,



,



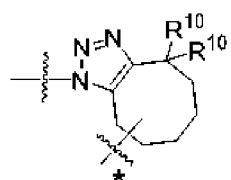
,



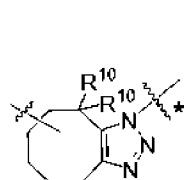
,

, $-NR^6C(=O)CH_2-$, $-NHC(=O)CH_2-$, $-S(=O)_2CH_2CH_2-$, $-(CH_2)_2S(=O)_2CH_2CH_2-$, $-NR^6S(=O)_2CH_2CH_2-$, $-NR^6C(=O)CH_2CH_2-$, $-NH-$, $-C(=O)-$, $-NHC(=O)-$, $-CH_2NHCH_2CH_2-$,

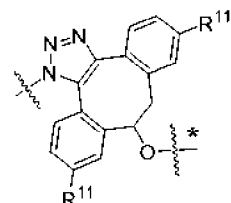
$-NHCH_2CH_2-$, $-S-$,



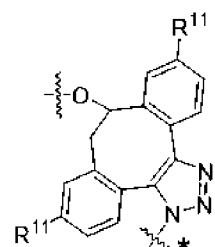
,



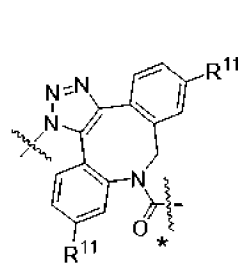
,



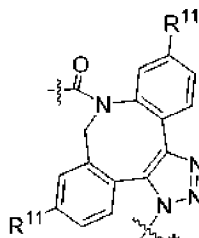
,



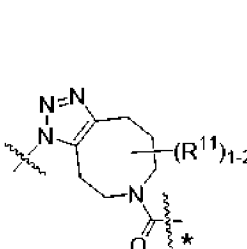
,



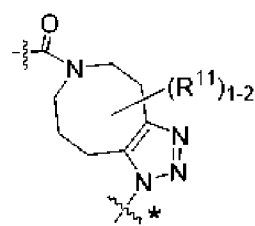
,



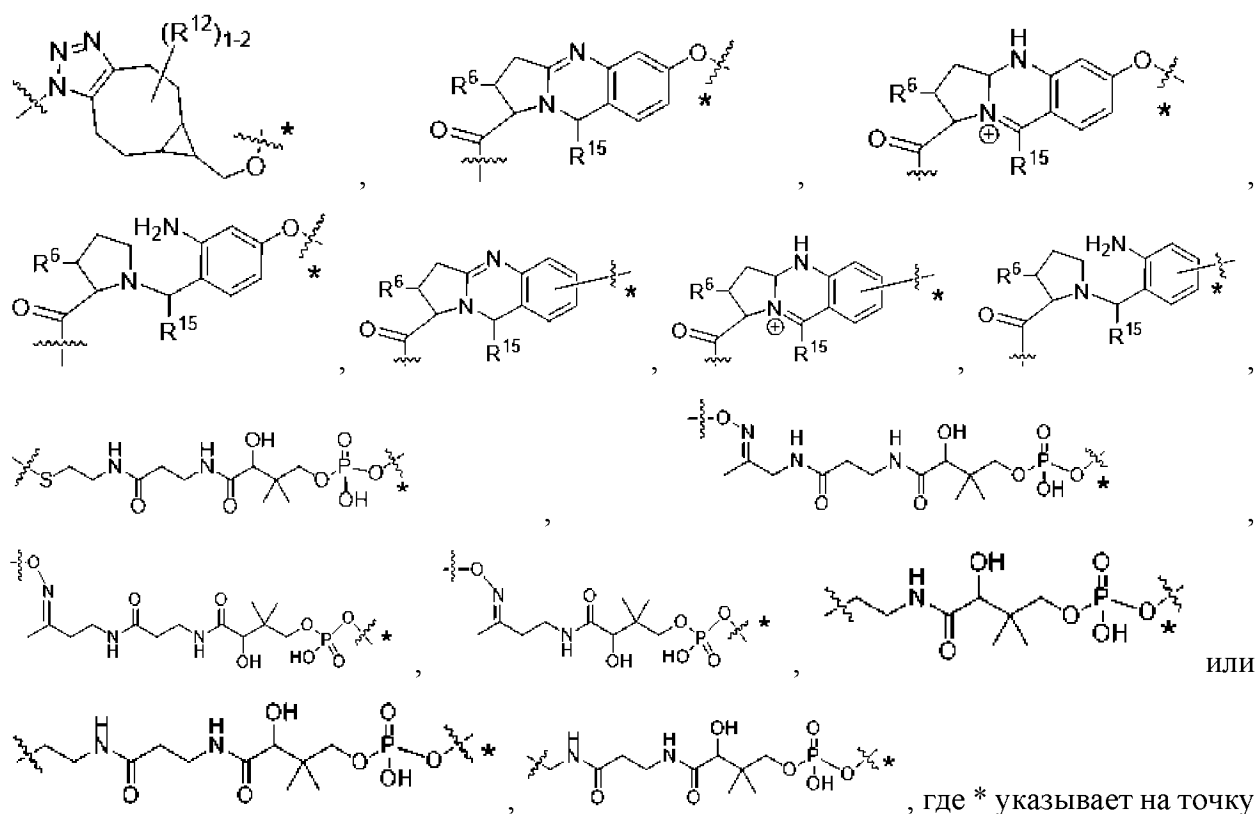
,



,



,



присоединения к А;

каждый R^6 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила;

каждый R^{10} независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила, F, Cl и -OH;

каждый R^{11} независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила, F, Cl, $-NH_2$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-CN$, $-NO_2$ и -OH;

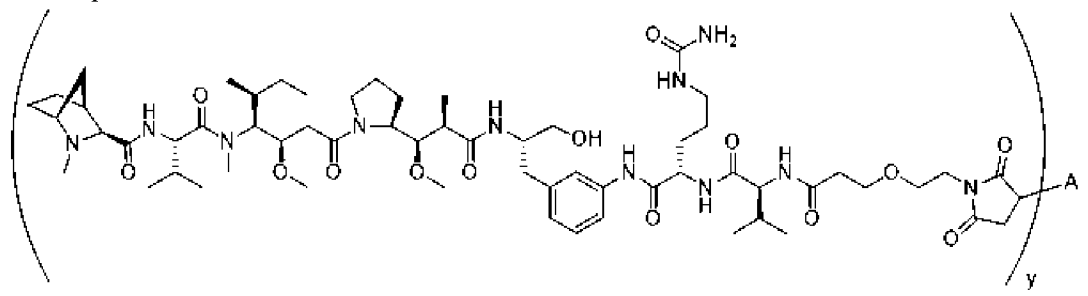
каждый R^{12} независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила, фтора, бензилокси, замещенного $-C(=O)OH$, бензила, замещенного $-C(=O)OH$, C_1 - C_4 алкокси, замещенного $-C(=O)OH$, и C_1 - C_4 алкила, замещенного $-C(=O)OH$;

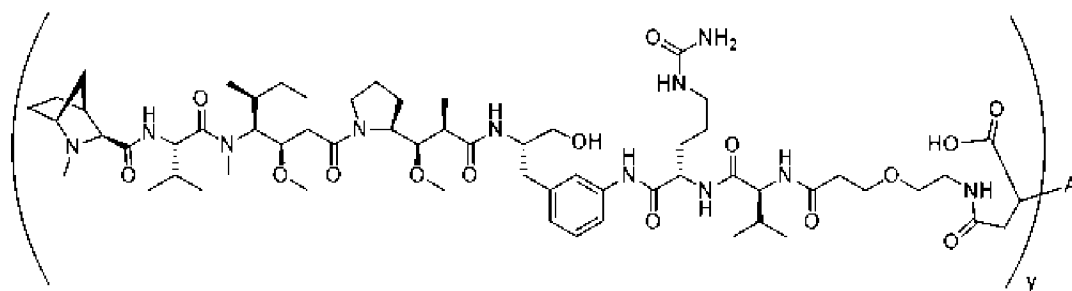
каждый R^{15} независимо выбран из H, $-CH_3$ и фенила;

каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10, и

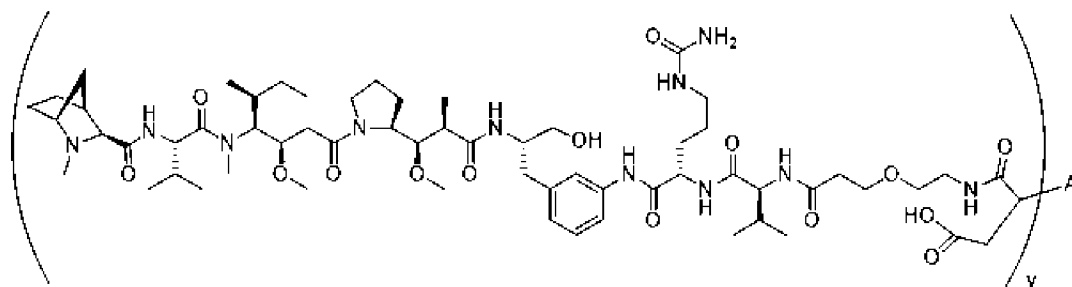
каждый p независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14.

[0018] В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитела и лекарственного средства выбран из:





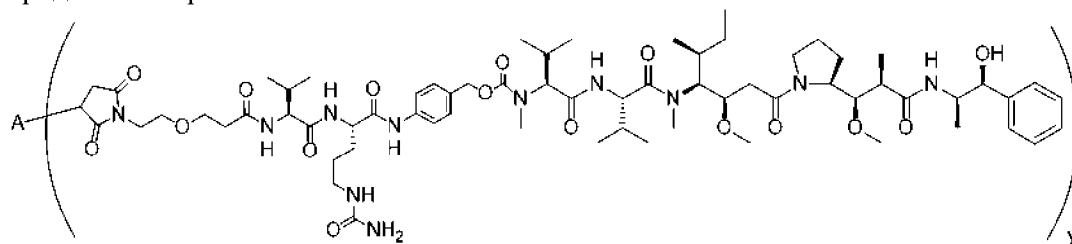
И



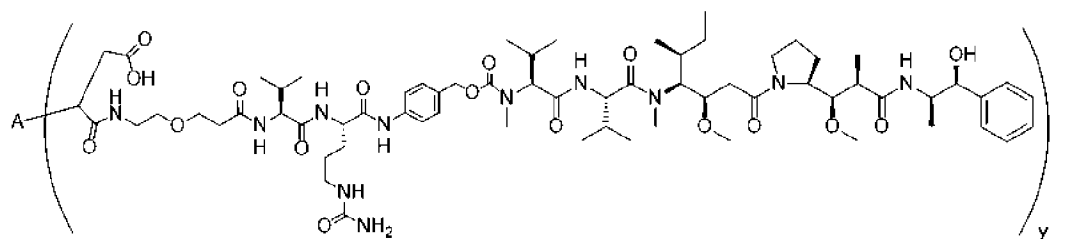
где

А представляет антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с CD48 человека, раскрытым в данном документе, и у представляет собой целое число от 1 до 10.

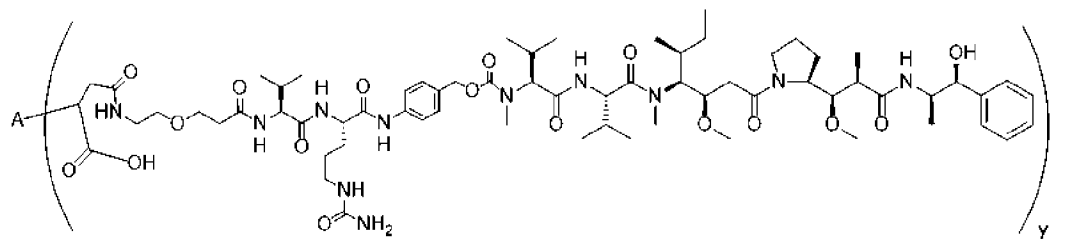
[0019] В другом варианте осуществления конъюгат антитела и лекарственного средства выбран из:



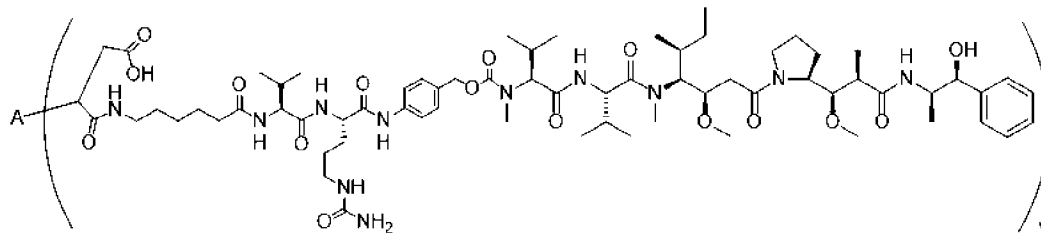
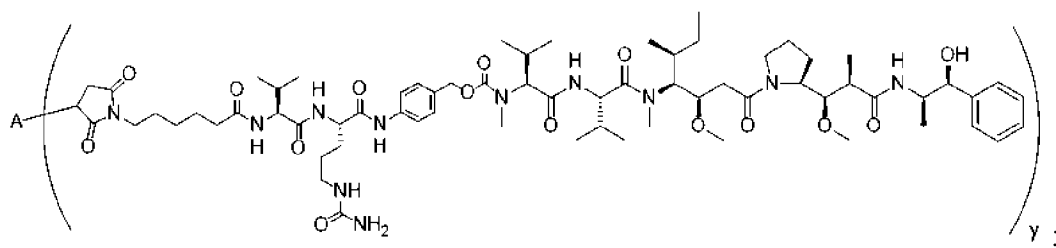
;



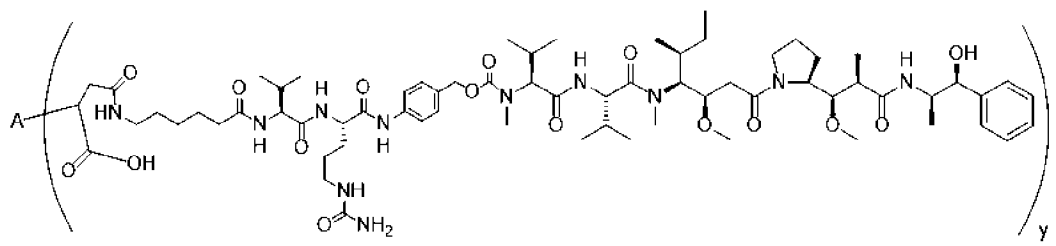
;



;



И



где

A представляет антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с CD48 человека, раскрытым в данном документе, и у представляет собой целое число от 1 до 10.

[0020] Также в данном документе раскрыты фармацевтические композиции, содержащие любое из антител к CD48, или их антигенсвязывающие фрагменты, или конъюгаты антитела и лекарственного средства, раскрытые в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит одно или несколько дополнительных терапевтических средств. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой лиофилизат.

[0021] В настоящей заявке также раскрыты способы лечения рака у субъекта, способы снижения или подавления роста опухоли у субъекта или способы снижения или замедления размножения популяции раковых клеток у субъекта, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества любого из антител к CD48 или их антигенсвязывающих фрагментов, конъюгатов антитела и лекарственного средства или фармацевтических композиций, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ обеспечивает снижение или подавление роста опухоли на по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 99%. В других вариантах осуществления способ обеспечивает снижение популяции раковых

клеток или замедление размножения популяции раковых клеток на по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 99%. В некоторых вариантах осуществления рак, опухоль или популяция раковых клеток экспрессирует CD48. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой опухоль или гематологический рак, предпочтительно рак представляет собой рак молочной железы, множественную миелому, В-клеточную лимфому, плазмноклеточную миелому, лейкоз, лимфому, рак желудка, острый миелоидный лейкоз, рак мочевого пузыря, рак головного мозга, рак костного мозга, рак шейки матки, хронический лимфоцитарный лейкоз, колоректальный рак, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, лимфобластный лейкоз, фолликулярную лимфому, лимфоидные злокачественные новообразования Т-клеточного или В-клеточного происхождения, меланому, миелогенный лейкоз, миелому, рак ротовой полости, рак яичника, немелкоклеточный рак легкого, хронический лимфоцитарный лейкоз, рак предстательной железы, мелкоклеточный рак легкого или рак селезенки.

[0022] Также в данном документе раскрыты антитела, которые конкурируют с любым из раскрытых в данном документе антител, в том числе NY920 или NY938, за связывание с CD48 человека. В некоторых вариантах осуществления антитела связываются с тем же или перекрывающимся эпитопом CD48 человека, что и NY920 или NY938. В одном варианте осуществления антитела связываются с одной или несколькими аминокислотами в пределах остатков 54-64 или 105-121 CD48 человека (SEQ ID NO: 53). В других вариантах осуществления антитело связывается с одной или несколькими аминокислотами, выбранными из остатков 54, 58, 60, 61, 62, 64, 105, 107, 119, 111, 114, 115, 117, 119 или 121 CD48 человека (SEQ ID NO: 53). В некоторых вариантах осуществления антитело взаимодействует с одной или несколькими аминокислотами в пределах 4,0 Å.

[0023] В настоящем изобретении также предусмотрены диагностические средства, содержащие любое из антител к CD48 или их антигенсвязывающих фрагментов, или конъюгаты антитела и лекарственного средства, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD48, или его антигенсвязывающий фрагмент, или конъюгат антитела и лекарственного средства являются мечеными или конъюгированными с помощью радиоактивной метки, флуорофора, хромофора, средства для визуализации или иона металла. Также раскрыты способы обнаружения CD48 человека в ткани или клетке, включающие приведение в контакт диагностического средства с тканью или клеткой и обнаружение связывания диагностического средства с тканью или клеткой.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0024] На фигуре 1 изображены кривые связывания трех (3) антител к CD48 с различными конструкциями на основе внеклеточного домена человеческого белка CD48.

Конструкция № 2248 несет мутированные остатки в пределах аминокислот 50-55 (ENYKQ (SEQ ID NO: 78), модифицированная в GSSKQ (SEQ ID NO: 79)). Конструкция № 2249 несет мутированные остатки в пределах аминокислот 70-74 (DSRK (SEQ ID NO: 80), модифицированная в AAGK (SEQ ID NO: 81)). Конструкция № 2250 несет мутированные остатки в пределах аминокислот 103-105 (KKTGNE (SEQ ID NO: 82), модифицированная в KKDASG (SEQ ID NO: 83)). На фигуре 1A представлен график, изображающий связывание антитела к CD48 NOV3731 (исходное антитело NY920) с конструкциями. На фигуре 1B представлен график, изображающий связывание антитела к CD48 NY254 (исходное антитело NY938) с конструкциями. На фигуре 1C представлен график, изображающий связывание гуманизированного антитела к CD48A (также известного как MEM102) с конструкциями. Графики показывают, что NOV3731 и NY920 не связываются с теми же конструкциями на основе внеклеточного домена CD48, что и CD48a.

[0025] На фигуре 2A представлена кривая доза-ответ антител к CD48 в анализах интернализации и пролиферации клеток против эндогенной линии раковых клеток KMS-27. Антитела к CD48 NY938 и NY920 были более эффективными, чем антитело к CD48A в этом анализе.

[0026] На фигуре 2B представлена кривая доза-ответ антител к CD48 в анализах интернализации и пролиферации клеток против эндогенной линии раковых клеток NCI-H929. Антитела к CD48 NY938 и NY920 были более эффективными, чем антитело к CD48A в этом анализе.

[0027] На фигуре 2C представлена кривая доза-ответ антител к CD48 в анализах интернализации и пролиферации клеток против эндогенной линии раковых клеток KMS-21-BM. Антитела к CD48 NY938 и NY920 были более эффективными, чем антитело к CD48A в этом анализе.

[0028] На фигуре 3 представлены графики, изображающие кинетику связывания антитела NY920 WT с антигеном CD48 человека. Были выполнены две экспериментальные работы (эксп. № 1 и эксп. № 2).

[0029] На фигуре 4 представлены графики, изображающие кинетику связывания антитела NY920 DAPA с антигеном CD48 человека. Были выполнены две экспериментальные работы (эксп. № 1 и эксп. № 2).

[0030] На фигуре 5 представлены графики, изображающие кинетику связывания антитела NY938 DAPA с антигеном CD48 человека. Были выполнены две экспериментальные работы (эксп. № 1 и эксп. № 2).

[0031] На фигуре 6 представлены графики, изображающие кинетику связывания антитела NY920 WT с антигеном CD48 яванского макака. Были выполнены две экспериментальные работы (эксп. № 1 и эксп. № 2).

[0032] На фигуре 7 представлены графики, изображающие кинетику связывания антитела NY920 DAPA с антигеном CD48 яванского макака. Были выполнены две экспериментальные работы (эксп. № 1 и эксп. № 2).

[0033] На фигуре 8 представлены графики, изображающие кинетику связывания антитела NY938 DAPA с антигеном CD48 яванского макака. Были выполнены две экспериментальные работы (эксп. № 1 и эксп. № 2).

[0034] На фигуре 9A представлена кривая доза-ответ ADC MMAE к CD48 в анализах пролиферации клеток и выживаемости против эндогенной линии раковых клеток KMS-21-BM. В качестве отрицательного контроля применяли ненацеливающийся ADC IgG-VC-MMAE.

[0035] На фигуре 9B представлена кривая доза-ответ ADC MMAE к CD48 в анализах пролиферации клеток и выживаемости против эндогенной линии раковых клеток KMS-27. В качестве отрицательного контроля применяли ненацеливающийся ADC IgG-VC-MMAE.

[0036] На фигуре 9C представлена кривая доза-ответ ADC MMAE к CD48 в анализах пролиферации клеток и выживаемости против эндогенной линии раковых клеток NCI-H929. В качестве отрицательного контроля применяли ненацеливающийся ADC IgG-VC-MMAE.

[0037] На фигуре 9D представлена кривая доза-ответ ADC MMAE к CD48 в анализах пролиферации клеток и выживаемости против эндогенной линии раковых клеток KMS-20. В качестве отрицательного контроля применяли ненацеливающийся ADC IgG-VC-MMAE.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0038] В настоящем изобретении представлены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с CD48. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD48 или его антигенсвязывающий фрагмент является частью конъюгата антитела и лекарственного средства, где антитело или фрагмент антитела, которые специфически связываются с CD48 человека, соединен с фрагментом, представляющим собой лекарственное средство (например, цитотоксическое средство, нацеленный ингибитор, иммуномодулирующее соединение, но исключая ВНЗ-миметические ингибиторы), необязательно посредством линкера. Такие конъюгаты антитела и лекарственного средства могут избирательно доставлять фрагмент, представляющий собой лекарственное средство, к клеткам, экспрессирующим CD48, например, В-лимфоцитам, с обеспечением таким образом лечения этих клеток у пациента, например, у пациента с В-клеточной лимфомой. В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в данном документе, их конъюгаты антитела и лекарственного средства и способы получения и применения таких фармацевтических композиций для лечения нуждающихся в этом пациентов.

Определения

[0039] Если не указано иное, подразумевается, что следующие термины и фразы, применяемые в данном документе, имеют следующие значения.

[0040] Применяемые в данном документе формы единственного числа включают формы множественного числа, если контекст явно не указывает на обратное. Термины "содержащий", "имеющий", "характеризующийся" в значении "характеризующийся"

химической формулой", "включающий" и "вмещающий" следует понимать как неограничивающие термины (т. е. означающие "включающий без ограничения"), если не указано иное. Дополнительно, в каждом случае, когда в варианте осуществления применяется "содержащий" или другой неограничивающий термин, следует понимать, что один и тот же вариант осуществления может быть заявлен в более узком смысле с применением промежуточного термина "по сути состоящий из" или ограничивающего термина "состоящий из".

[0041] Термин "приблизительно" или "примерно", если он применяется в контексте числовых значений и диапазонов, относится к значениям или диапазонам, которые примерно равны или близки к перечисленным значениям или диапазонам таким образом, чтобы вариант осуществления сохранял предполагаемые свойства, что является очевидным для специалиста в данной области техники из идей, содержащихся в данном документе. В некоторых вариантах осуществления приблизительно означает плюс или минус 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 0,5% или 0,1% от числовой величины. В одном варианте осуществления термин "приблизительно" относится к диапазону значений, которые на 10% больше или меньше от указанного значения. В другом варианте осуществления термин "приблизительно" относится к диапазону значений, которые на 5% больше или меньше от указанного значения. В другом варианте осуществления термин "приблизительно" относится к диапазону значений, которые на 1% больше или меньше от указанного значения.

[0042] Термин "алкил" относится к одновалентной насыщенной углеводородной цепи, содержащей указанное число атомов углерода. Например, C₁-C₆алкил относится к алкильной группе, содержащей от 1 до 6 атомов углерода. Алкильная группа может быть прямой или разветвленной. Типичная разветвленная алкильная группа содержит одну, две или три ветви. Примеры алкильных групп включают без ограничения, метил, этил, пропил (н-пропил и изопропил), бутил (н-бутил, изобутил, втор-бутил и трет-бутил), пентил (н-пентил, изопентил и неопентил) и гексил.

[0043] Применяемый в данном документе термин "антитело" относится к белку или полипептидной последовательности, полученным из молекулы иммуноглобулина, которая специфически связывается с антигеном. Антитела могут быть поликлональными или моноклональными, многоцепочечными или одноцепочечными или интактными иммуноглобулинами, и могут происходить из природных источников или из рекомбинантных источников. Встречающееся в природе "антитело" представляет собой гликопротеин, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой посредством дисульфидных связей. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначаемой в данном документе как VH) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно обозначаемой в данном документе как VL) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного

домена, CL. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), которые чередуются с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, в том числе с различными клетками иммунной системы (например, эффекторными клетками) и первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Антитело может быть моноклональным антителом, человеческим антителом, гуманизированным антителом, антителом верблюдовых или химерным антителом. Антитела могут относиться к любому изотипу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подклассу.

[0044] "Определяющие комплементарность домены" или "определяющие комплементарность области" ("CDR") взаимозаменяемо относятся к гипервариабельным областям VL и VH. У цепей антитела CDR представляют собой сайт для связывания белка-мишени, который обуславливает специфичность в отношении такого белка-мишени. В каждой человеческой VL или VH имеется по три CDR (CDR1-3, пронумерованные последовательно от N-конца), составляющие приблизительно 15-20% от вариабельных доменов. CDR могут обозначаться согласно области, к которой они принадлежат, и согласно порядку, в котором они расположены. Например, обе "VHCDR1" или "HCDR1" относятся к первой CDR вариабельной области тяжелой цепи. CDR являются структурно комплементарными эпитопу белка-мишени и, таким образом, непосредственно ответственны за специфичность связывания. Остальные отрезки VL или VH, так называемые каркасные области, проявляют меньшую изменчивость аминокислотной последовательности (Kuby, Immunology, 4th ed., Chapter 4. W.H. Freeman & Co., New York, 2000).

[0045] Точные границы аминокислотной последовательности указанной CDR могут быть определены с применением любой из ряда широко известных схем, в том числе описанных в Kabat *et al.* (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации "согласно Kabat"), Al-Lazikani *et al.*, (1997) JMB 273, 927-948 (схема нумерации "согласно Chothia") и нумерации согласно ImMunoGenTics (IMGT) (Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P. *et al.*, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003) (схема нумерации "согласно IMGT"). Например, в случае классических форматов согласно Kabat аминокислотные остатки CDR в домене тяжелой вариабельной цепи (VH) имеют номера 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); а аминокислотные остатки CDR в домене легкой вариабельной цепи (VL) имеют номера 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3). Согласно Chothia аминокислоты CDR в VH имеют номера 26-32 (HCDR1), 52-

56 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); а аминокислотные остатки в VL имеют номера 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 91-96 (LCDR3). Объединяя определения CDR по Kabat и по Chothia, CDR состоят из аминокислотных остатков 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в человеческой VH и аминокислотных остатков 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в человеческой VL. Согласно IMGT аминокислотные остатки CDR в VH пронумерованы как примерно 26-35 (CDR1), 51-57 (CDR2) и 93-102 (CDR3), и аминокислотные остатки CDR в VL пронумерованы как примерно 27-32 (CDR1), 50-52 (CDR2) и 89-97 (CDR3) (нумерация в соответствии с "Kabat"). Согласно IMGT области CDR антитела можно определять с применением программы IMGT/DomainGap Align.

[0046] Как легкая, так и тяжелая цепи подразделяются на области структурной и функциональной гомологии. Термины "константная" и "вариабельная" применяются в функциональном смысле. В связи с этим следует понимать, что вариабельные домены из частей как легкой (VL), так и тяжелой (VH) цепей определяют распознавание антигена и специфичность в его отношении. Напротив, константные домены легкой цепи (CL) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3 и в некоторых случаях CH4) придают важные биологические свойства, такие как секреция, перемещение через плаценту, связывание с рецептором FcRn, период полувыведения, фармакокинетические свойства и т. п. Принято, что номера доменов константной области увеличиваются по мере их удаления от антигенсвязывающего сайта или amino-конца антитела. N-конец представляет собой вариабельную область, а на C-конце находится константная область; домены CH3 и CL фактически содержат карбокси-концевые домены тяжелой и легкой цепи, соответственно.

[0047] Применяемый в данном документе термин "фрагмент антитела" или "антигенсвязывающий фрагмент" относится к одной или нескольким частям антитела, которые сохраняют способность специфически взаимодействовать (например, посредством связывания, стерического несоответствия, стабилизации/дестабилизации, пространственного распределения) с эпитопом антигена (например, CD48). Примеры фрагментов антител включают без ограничения Fab-фрагмент, который представляет собой одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; Fab'-фрагмент, который представляет собой одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL, CH1 и шарнирной области; F(ab')₂-фрагмент, который представляет собой двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; полуантитело, которое включает одну тяжелую цепь и одну легкую цепь, соединенные дисульфидным мостиком; антитело с одним плечом, которое содержит Fab-фрагмент, присоединенный к области Fc; антитело с удаленным доменом CH2, которое содержит два Fab-фрагмента, присоединенные к димерам домена CH3 (см. Glaser, J Biol Chem. 2005; 280(50):41494-503); одноцепочечный Fv (scFv); соединенный дисульфидным мостиком Fv (sdFv); Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH антитела с одним плечом; dAb-фрагмент (Ward *et al.*, Nature 341:544-546, 1989), который состоит из домена VH, и выделенную определяющую комплементарность область (CDR) или другие эпитопсвязывающие фрагменты антитела.

Например, Fab-фрагмент может содержать аминокислотные остатки 1-222 (нумерация EU) тяжелой цепи антитела; в то время как Fab'-фрагмент может содержать аминокислотные остатки 1-236 (нумерация EU) тяжелой цепи антитела. Fab-фрагмент или Fab'-фрагмент антитела может быть получен рекомбинантным путем или посредством ферментативного расщепления исходного антитела. Получаемые рекомбинантным путем Fab или Fab' можно конструировать, чтобы ввести аминокислоты для сайт-специфической конъюгации, такие как цистеины (Junutula, J. R.; *et al*, *Nature biotechnology* 2008, 26, 925), пирролинкарбоксилизины (Ou, W. *et al*, *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(26):10437-42) или неприродные аминокислоты (например, Tian, F. *et al*, *Proc Natl Acad Sci USA* 2014, 111, 1766, Ахур, J. Y. *et al*, *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012, 109, 16101. Аналогичным образом можно добавлять мутации или пептидные метки для облегчения конъюгации за счет фосфопантетеинтрансфераз (Grunewald, J. *et al.*, *Bioconjugate chemistry* 2015, 26, 2554), формилглицинообразующего фермента (Drake, P. M. *et al.*, *Bioconjugate chemistry* 2014, 25, 1331), трансклутаминаз (Strop, P. *et al.*, *Chemistry & Bioconjugate chemistry* 2013, 20, 161), сортазы (Beerli, R. R.; Hell, T.; Merkel, A. S.; Grawunder, U. *PloS one* 2015, 10, e0131177) или других стратегий конъюгации с применением ферментов. Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть соединены с применением рекомбинантных способов с помощью синтетического линкера, что обеспечивает их получение в виде одной белковой цепи, в которой области VL и VH соединяются в пару с образованием одновалентной молекулы (известной как одноцепочечный Fv ("scFv"); см., например, Bird *et al.*, *Science* 242:423-426, 1988; и Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5879-5883, 1988). Предусматривается, что такие одноцепочечные антитела также охватываются термином "антигенсвязывающий фрагмент". Такие антигенсвязывающие фрагменты получают с применением традиционных методик, известных специалистам в данной области техники, и фрагменты подвергают скринингу на применимость таким же способом, что и интактные антитела.

[0048] Фрагменты антител или антигенсвязывающие фрагменты также можно вводить в состав однодоменных антител, максител, минител, нанотел, интрател, диател, триател, тетрател, v-NAR и бис-scFv (см., например, Hollinger and Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136, 2005). Антигенсвязывающие фрагменты можно прививать на остовы на основе полипептидов, таких как фибронектин типа III (Fn3) (см. патент США № 6703199, в котором описаны монотела на основе полипептида фибронектина).

[0049] Фрагменты антител или антигенсвязывающие фрагменты можно вводить в состав одноцепочечных молекул, содержащих пару tandemных сегментов Fv (VH-CH1-VH-CH1), которые вместе с комплементарными полипептидами легкой цепи образуют пару антигенсвязывающих областей (Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8:1057-1062, 1995; и патент США № 5641870).

[0050] Применяемый в данном документе термин "моноклональное антитело" или "композиция на основе моноклонального антитела" относится к полипептидам, включающим антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые характеризуются по

сути идентичной аминокислотной последовательностью или происходят из одного генетического источника. Данный термин также охватывает препараты молекул антител одного молекулярного состава. Композиция на основе моноклонального антитела проявляет одну специфичность и аффинность связывания в отношении конкретного эпитопа.

[0051] Применяемый в данном документе термин "человеческое антитело" включает антитела, имеющие вариабельные области, в которых как каркасные, так и области CDR получены из последовательностей, происходящих от человека. Кроме того, если антитело содержит константную область, то константная область также происходит из таких человеческих последовательностей, например, последовательностей зародышевой линии человека, или мутантных версий последовательностей зародышевой линии человека, или антитела, содержащего консенсусные каркасные последовательности, полученные за счет анализа человеческих каркасных последовательностей, например, как описано в Knappik *et al.*, J. Mol. Biol. 296:57-86, 2000.

[0052] Человеческие антитела по настоящему описанию могут содержать аминокислотные остатки, закодированные в человеческих последовательностях (например, мутации, введенные посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или за счет соматических мутаций *in vivo*, или консервативные замены, которые содействуют стабильности или облегчают изготовление).

[0053] Применяемый в данном документе термин "распознавать" относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которые отыскивают свой эпитоп и взаимодействуют (например, связываются) с ним, независимо от того является ли эпитоп линейным или конформационным. Термин "эпитоп" относится к сайту на антигене, с которым специфически связываются антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению. Эпитопы могут быть образованы как смежными аминокислотами, так и несмежными аминокислотами, размещаемыми рядом за счет третичной укладки белка. Эпитопы, образуемые из смежных аминокислот, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, в то время как эпитопы, образуемые за счет третичной укладки, как правило, утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп, как правило, содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или больше аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают методики из уровня техники, например, рентгеноструктурную кристаллографию и 2-мерный ядерный магнитный резонанс (см., например, Epitope Mapping Protocols в Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)). "Паратоп" представляет собой часть антитела, которая распознает эпитоп антигена.

[0054] Фраза "специфически связывает" или "селективно связывает", когда она применяется в контексте описания взаимодействия между антигеном (например, белком) и антителом, фрагментом антитела или связывающим средством, происходящим из антитела, относится к реакции связывания, которая является определяющей для установления

присутствия антигена в неоднородной популяции белков и других биологических веществ, например, в биологическом образце, например, крови, сыворотке крови, плазме крови или образце ткани. Таким образом, при определенных обозначенных условиях проведения иммунологического анализа антитела или связывающие средства, характеризующиеся конкретной специфичностью связывания, связываются с конкретным антигеном в по меньшей мере два раза сильнее, чем фоновый уровень, и по сути не связываются в значительном количестве с другими антигенами, присутствующими в образце. В одном аспекте при обозначенных условиях иммунологического анализа антитело или связывающее средство с конкретной специфичностью связывания связывается с конкретным антигеном в по меньшей мере десять (10) раз сильнее относительно фонового уровня, и по сути не связывается в значительном количестве с другими антигенами, присутствующими в образце. Специфическое связывание с антителом или связывающим средством в таких условиях может предусматривать то, что антитело или средство должно отбираться на основе его специфичности в отношении конкретного белка. При желании или необходимости данный отбор можно проводить путем исключения антител, которые вступают в перекрестные реакции с молекулами от другого вида (например, мыши или крысы) или других подтипов. В качестве альтернативы в некоторых аспектах отбирают антитела или фрагменты антител, которые вступают в перекрестные реакции с некоторыми требуемыми молекулами.

[0055] Применяемый в данном документе термин "аффинность" относится к силе взаимодействия между антителом и антигеном в отдельных антигенных сайтах. В пределах каждого антигенного сайта переменная область "плеча" антитела взаимодействует с антигеном посредством слабых нековалентных сил в многочисленных сайтах; при этом чем больше взаимодействий, тем сильнее аффинность.

[0056] Термин "выделенное антитело" относится к антителу, которое по сути не содержит другие антитела с отличающейся антигенной специфичностью. Однако выделенное антитело, которое специфически связывается с одним антигеном, может характеризоваться перекрестной реактивностью в отношении других антигенов. Более того, выделенное антитело может практически не содержать другого клеточного материала и/или химических веществ.

[0057] Термин "соответствующая последовательность зародышевой линии человека" относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность или подпоследовательность человеческой переменной области, которые обладают наиболее высокой установленной идентичностью аминокислотной последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью или подпоследовательностью переменной области в сравнении со всеми другими всеми другими известными аминокислотными последовательностями переменной области, закодированными в последовательностях переменной области иммуноглобулина зародышевой линии человека. Соответствующая последовательность зародышевой линии человека также может относиться к аминокислотной последовательности или

подпоследовательности человеческой вариабельной области, характеризующимися самой высокой идентичностью аминокислотной последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью или подпоследовательностью вариабельной области в сравнении со всеми другими подвергнутыми оценке аминокислотными последовательностями вариабельной области. Соответствующей последовательностью зародышевой линии человека могут быть только каркасные области, только определяющие комплементарность области, каркасные и определяющие комплементарность области, вариабельный сегмент (как определено выше) или другие комбинации последовательностей или подпоследовательностей, которые содержат вариабельную область. Идентичность последовательности может быть определена с применением способов, описанных в данном документе, например, выравнивания двух последовательностей с применением BLAST, ALIGN или другого алгоритма выравнивания, известного из уровня техники. Соответствующая последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность зародышевой линии человека может характеризоваться по меньшей мере приблизительно 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или 100% идентичностью последовательности с эталонной последовательностью нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательностью вариабельной области.

[0058] Целый ряд форматов иммунологического анализа может применяться для отбора антител, характеризующихся специфической иммунной реактивностью в отношении конкретного белка. Например, твердофазные иммунологические анализы ELISA традиционно применяются для отбора антител, характеризующихся специфической реактивностью в отношении белка (см., например, Harlow & Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual* (1998), где описаны форматы и условия иммунологического анализа, которые можно применять для определения специфической иммунной реактивности). Как правило, реакция специфического или селективного связывания будет приводить к сигналу, в по меньшей мере два раза превышающему фоновый уровень, и, более типично, в по меньшей мере 10-100 раз превышающему фоновый уровень.

[0059] Термин "равновесная константа диссоциации ($KD [M]$)" относится к константе скорости диссоциации ($k_d [c^{-1}]$), поделенной на константу скорости ассоциации ($k_a [c^{-1}, M^{-1}]$). Равновесные константы диссоциации могут быть измерены с применением любого способа, известного из уровня техники. Обычно антитела по настоящему изобретению будут характеризоваться равновесной константой диссоциации, составляющей менее приблизительно 10^{-7} или 10^{-8} М, например, менее приблизительно 10^{-9} М или 10^{-10} М, в некоторых аспектах менее приблизительно 10^{-11} М, 10^{-12} М или 10^{-13} М.

[0060] Термин "биодоступность" относится к системной доступности (т. е. уровням в крови/плазме крови) заданного количества лекарственного средства, вводимого пациенту. Биодоступность представляет собой абсолютный термин, обозначающий показатель как времени (скорости), в течение которого лекарственное средство достигает общего кровообращения из введенной лекарственной формы, так и общего количества (степени)

лекарственного средства в нем.

[0061] Применяемая в данном документе фраза "состоящий по существу из" относится к родам или видам активных фармацевтических средств, включенных в способ или композицию, а также любым вспомогательным веществам, не проявляющим активность в отношении намеченной цели применения способов или композиций. В некоторых аспектах фраза "состоящий по существу из" однозначно исключает включение одного или нескольких дополнительных активных средств, отличных от конъюгата антитела и лекарственного средства по настоящему изобретению. В некоторых аспектах фраза "состоящий по существу из" однозначно исключает включение одного или нескольких дополнительных активных средств, отличных от конъюгата антитела и лекарственного средства по настоящему изобретению и второго средства, вводимого совместно.

[0062] Термин "аминокислота" относится к встречающимся в природе, синтетическим и неприродным аминокислотам, а также аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют подобно встречающимся в природе аминокислотам. Встречающиеся в природе аминокислоты представляют собой аминокислоты, закодированные в генетическом коде, а также такие аминокислоты, которые были впоследствии модифицированы, например, гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат и О-фосфосерин. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, которые характеризуются такой же основной химической структурой, что и встречающаяся в природе аминокислота, то есть имеют α -углерод, который связан с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой и R-группой, например, к гомосерину, норлейцину, метионинсульфоксиду, метионинметилсульфонию. Такие аналоги имеют модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные остовы, но сохраняют такую же основную химическую структуру, что и встречающаяся в природе аминокислота. Миметики аминокислот относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, отличающуюся от общей химической структуры аминокислоты, но которые функционируют подобно встречающейся в природе аминокислоте.

[0063] Термин "консервативно модифицированный вариант" применяется в отношении как аминокислотных последовательностей, так и последовательностей нуклеиновой кислоты. Применительно к конкретным последовательностям нуклеиновой кислоты, консервативно модифицированные варианты относятся к тем нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или по существу идентичные аминокислотные последовательности, или же, если нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, к по существу идентичным последовательностям. Вследствие вырожденности генетического кода любой заданный белок кодируется большим количеством функционально идентичных нуклеиновых кислот. Например, все из кодонов GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, в котором кодоном задан аланин, кодон может быть изменен на любой из соответствующих описанных кодонов без изменения кодируемого полипептида. Такие

варианты нуклеиновой кислоты являются "молчащими вариантами", которые представляют собой одну разновидность вариантов с консервативными модификациями. В данном документе каждая последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, также описывает каждую возможную молчащую вариацию нуклеиновой кислоты. Специалист в данной области техники будет осознавать, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) может быть модифицирован с получением функционально идентичной молекулы. Соответственно, каждая молчащая вариация нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид, неявно определена в каждой описанной последовательности.

[0064] Применительно к полипептидным последовательностям консервативно модифицированные варианты включают отдельные замены, делеции или добавления в полипептидную последовательность, которые приводят к замене аминокислоты химически сходной аминокислотой. Таблицы консервативных замен, обеспечивающие функционально аналогичные аминокислоты, хорошо известны из уровня техники. Такие консервативно модифицированные варианты дополняют, а не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели. Следующие восемь групп содержат аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг для друга: 1) аланин (A), глицин (G); 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E); 3) аспарагин (N), глутамин (Q); 4) аргинин (R), лизин (K); 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V); 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W); 7) серин (S), треонин (T); и 8) цистеин (C), метионин (M) (см., например, Creighton, *Proteins* (1984)). В некоторых аспектах термин "консервативные модификации последовательности" применяется для обозначения аминокислотных модификаций, которые не оказывают значительного влияния на характеристики связывания у антитела, содержащего аминокислотную последовательность, или не изменяют их.

[0065] Применяемый в данном документе термин "оптимизированная" относится к нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, которая была изменена с применением кодонов, предпочтительных в продуцирующей клетке или организме, обычно в эукариотической клетке, например, дрожжевой клетке, клетке *Pichia*, грибной клетке, клетке *Trichoderma*, клетке яичника китайского хомячка (CHO) или человеческой клетке. Оптимизированную нуклеотидную последовательность конструируют таким образом, чтобы полностью или насколько это возможно сохранить аминокислотную последовательность, изначально закодированную в исходной нуклеотидной последовательности, которая также известна как "родительская" последовательность.

[0066] Термины "процент идентичности" или "процентная идентичность" в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относятся к степени, в которой две или более последовательности или подпоследовательности являются одинаковыми. Две последовательности являются

"идентичными", если они имеют одинаковую последовательность из аминокислот или нуклеотидов на протяжении области, подлежащей сравнению. Две последовательности являются "по сути идентичными", если две последовательности имеют указанную процентную долю аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (т. е. 60% идентичность, необязательно 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичность на протяжении указанной области или, если не указано, на протяжении всей последовательности), при сравнении и выравнивании для обеспечения максимального соответствия на протяжении окна сравнения или обозначенной области, как измерено с применением одного из следующих алгоритмов сравнения последовательности или посредством ручного выравнивания и визуального просмотра. Необязательно идентичность существует на протяжении области, длина которой составляет по меньшей мере приблизительно 30 нуклеотидов (или 10 аминокислот), или более предпочтительно на протяжении области, длина которой составляет 100-500 или 1000 или более нуклеотидов (или 20, 50, 200 или более аминокислот).

[0067] При сравнении последовательностей как правило одна последовательность выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При применении алгоритма сравнения последовательностей тестируемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, если необходимо, устанавливают координаты подпоследовательностей и устанавливают программные параметры алгоритма для анализа последовательностей. Могут применяться программные параметры по умолчанию или можно устанавливать альтернативные параметры. На основании программных параметров алгоритм сравнения последовательностей затем рассчитывает значения процента идентичности последовательностей для тестируемых последовательностей относительно эталонной последовательности.

[0068] "Окно сравнения", как применяется в данном документе, включает ссылку на сегмент из любого числа смежных положений, выбранного из группы, состоящей из от 20 до 600, обычно от приблизительно 50 до приблизительно 200, чаще от приблизительно 100 до приблизительно 150, в котором последовательность можно сравнивать с эталонной последовательностью с таким же числом смежных положений после того, как две последовательности были подвергнуты оптимальному выравниванию. Способы выравнивания последовательностей для проведения сравнения хорошо известны из уровня техники. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма поиска локальной гомологии Смита-Уотермана, Adv. Appl. Math. 2:482c (1970), с помощью алгоритма выравнивания областей гомологии Нидлмана-Вунша, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), с помощью способа поиска сходства Пирсона-Липмана, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), с помощью компьютерных реализаций таких алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в составе пакета программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Мэдисон, Висконсин) или с помощью ручного выравнивания и визуального просмотра (см., например, Brent *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, 2003).

[0069] Два примера алгоритмов, которые подходят для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, представляют собой алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul *et al.*, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 1977; и Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990, соответственно. Программное обеспечение для осуществления анализов BLAST является общедоступным от Национального центра биотехнологической информации. На первом этапе данный алгоритм предусматривает идентификацию пар последовательностей с высоким показателем сходства (HSP) за счет идентификации коротких слов длиной W в запрашиваемой последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому пороговому баллу T с положительным значением при выравнивании со словом такой же длины в последовательности из базы данных. T известен под названием пороговый балл соседних слов (Altschul *et al.*, выше). Эти первоначальные совпадения соседних слов выступают в качестве "затравок" для начала поисков, чтобы найти более длинные HSP, содержащие их. Совпадения слов продлеваются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока может увеличиваться суммарный балл выравнивания. Суммарные баллы рассчитывают с применением, в случае нуклеотидных последовательностей, параметров M (вознаграждающий балл за пару совпадающих остатков; всегда >0) и N (штрафной балл за несовпадающие остатки; всегда <0). В случае аминокислотных последовательностей для подсчета суммарного балла применяют матрицу замен. Продление совпадений слов в каждом направлении останавливается, когда суммарный балл выравнивания уменьшается на величину X относительно своего максимального достигнутого значения; суммарный балл стремится к нулю или ниже вследствие накопления одного или нескольких выравниваний остатков с отрицательными баллами; или достигается конец любой из последовательностей. Параметры W , T и X алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) в качестве параметров по умолчанию применяется длина слова (W), составляющая 11, ожидание (E), составляющее 10, $M=5$, $N=-4$ и сравнение обеих нитей. В случае аминокислотных последовательностей в программе BLASTP в качестве параметров по умолчанию применяется длина слова, составляющая 3, и ожидание (E), составляющее 10, и матрица замен BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915), выравнивания (B), составляющие 50, ожидание (E), составляющее 10, $M=5$, $N=-4$ и сравнение обеих нитей.

[0070] Алгоритм BLAST также осуществляет статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993). Одной мерой сходства, предусмотренной в алгоритме BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), которая указывает на вероятность, с которой совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями возникло случайно. Например, нуклеиновая кислота считается схожей с эталонной последовательностью, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой

составляет менее приблизительно 0,2, более предпочтительно менее приблизительно 0,01 и наиболее предпочтительно менее приблизительно 0,001.

[0071] Процентную идентичность между двумя аминокислотными последовательностями также можно определить с использованием алгоритма из E. Meyers and W. Miller (Comput. Appl. Biosci. 4:11-17, (1988) который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), с применением таблицы весов замен остатков PAM120, штрафа за продление гэпа, составляющего 12, и штрафа за открытие гэпа, составляющего 4. Кроме того, процентная идентичность между двумя аминокислотными последовательностями может быть определена с применением алгоритма Нидлмана-Вунша, J. Mol. Biol. 48:444-453, (1970), который был включен в программу GAP в составе пакета программного обеспечения GCG (доступного во всемирной компьютерной сети по адресу gcg.com), с применением либо матрицы Blossum 62, либо матрицы PAM250, а также штрафа за открытие гэпа, составляющего 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4, и штрафа за продление гэпа, составляющего 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

[0072] Помимо процента идентичности последовательностей, упомянутого выше, еще одним показателем того, что две последовательности нуклеиновой кислоты или полипептида являются по сути идентичными, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, является иммунологически перекрестно реактивным с антителами, выработка которых индуцирована полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид, как правило, является по сути идентичным второму полипептиду, например, если два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим показателем того, что две последовательности нуклеиновой кислоты являются по сути идентичными, является то, что две молекулы или их комплементарные цепи гибридизируются друг с другом в жестких условиях, как описано ниже. Еще одним показателем того, что две последовательности нуклеиновой кислоты являются по сути идентичными, является то, что для амплификации последовательности могут применяться одни и те же праймеры.

[0073] Термин "нуклеиновая кислота" применяется в данном документе взаимозаменяемо с термином "полинуклеотид" и относится к дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам либо в одонитевой, либо в двунитевой форме. Термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги нуклеотидов или модифицированные остатки или связи в остове, которые являются синтетическими, встречающимися в природе и не встречающимися в природе, которые характеризуются свойствами связывания, подобными эталонной нуклеиновой кислоте, и которые метаболизируются подобно эталонным нуклеотидам. Примеры таких аналогов включают без ограничения фосфоротриааты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2-О-метилрибонуклеотиды, пептидонуклеиновые кислоты (PNA).

[0074] Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также в неявном виде охватывает ее консервативно модифицированные варианты (например, замены на основе вырожденных кодонов) и комплементарные

последовательности, а также последовательность, указанную явным образом. А именно, как подробно описано ниже, замены на основе вырожденных кодонов можно проводить за счет создания последовательностей, в которых третье положение в одном или нескольких выбранных (или всех) кодонах заменено на любой из канонических нуклеозидов и/или остаток дезоксиинозина (Batzer *et al.*, Nucleic Acid Res. 19:5081, 1991; Ohtsuka *et al.*, J. Biol. Chem. 260:2605-2608, 1985; и Rossolini *et al.*, Mol. Cell. Probes 8:91-98, 1994).

[0075] В контексте нуклеиновых кислот термин "функционально связанный" относится к функциональной взаимосвязи между двумя или более сегментами полинуклеотида (например, ДНК). Как правило, он относится к функциональной взаимосвязи регулирующей транскрипцию последовательности с транскрибируемой последовательностью. Например, промоторная или энхансерная последовательность является функционально связанной с кодирующей последовательностью, если она стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей последовательности в соответствующей клетке-хозяине или другой системе экспрессии. Как правило регулирующие транскрипцию промоторные последовательности, которые являются функционально связанными с транскрибируемой последовательностью, являются физически смежными с транскрибируемой последовательностью, т. е. они функционируют в цис-положении. Однако некоторые регулирующие транскрипцию последовательности, такие как энхансеры, не обязательно должны быть физически смежными или располагаться в непосредственной близости от кодирующих последовательностей, транскрипцию которых они усиливают.

[0076] Термины "полипептид" и "белок" применяются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимера из аминокислотных остатков. Термины применимы к полимерам из аминокислот, в которых один или несколько аминокислотных остатков представляют собой искусственный химический миметик соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также к полимерам из встречающихся в природе аминокислот и полимеру из не встречающихся в природе аминокислот. Если не указано иное, конкретная полипептидная последовательность также в неявном виде охватывает ее консервативно модифицированные варианты.

[0077] Применяемый в данном документе термин "конъюгат" или "конъюгат антитела и лекарственного средства" относится к связи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с другим средством, таким как химиотерапевтическое средство, токсин, иммунотерапевтическое средство, зонд для визуализации и т. п. Связь может представлять собой ковалентные связи или нековалентные взаимодействия, такие как посредством электростатических сил. Для образования конъюгата могут использоваться различные линкеры, известные из уровня техники. Кроме того, конъюгат может предусматриваться в форме слитого белка, который может экспрессироваться с полинуклеотида, кодирующего конъюгат. Применяемый в данном документе "слитый белок" относится к белкам, созданным благодаря соединению двух или нескольких генов или фрагментов генов, которые изначально кодировали отдельные белки (в том числе

пептиды и полипептиды). Трансляция слитого гена приводит к единому белку с функциональными свойствами, происходящими из каждого из исходных белков.

[0078] Термин "субъект" включает человека и отличных от человека животных. Отличные от человека животные охватывают всех позвоночных, например, млекопитающих и отличных от млекопитающих животных, как, например, отличных от человека приматов, овцу, собаку, корову, кур, амфибий и рептилий. За исключением случаев, когда это отмечено, термины "пациент" или "субъект" применяются в данном документе взаимозаменяемо.

[0079] Применяемый в данном документе термин "токсин", "цитотоксин" или "цитотоксическое средство" относится к любому средству, которое является вредным для роста и пролиферации клеток и которое может функционировать со уменьшением, подавлением или разрушением клетки или злокачественного новообразования.

[0080] Применяемый в данном документе термин "противораковое средство" относится к любому средству, которое может применяться для лечения нарушения пролиферации клеток, такого как рак, в том числе без ограничения к цитотоксическим средствам, химиотерапевтическим средствам, лучевой терапии и средствам для лучевой терапии, нацеливающим противораковым средствам и иммунотерапевтическим средствам.

[0081] Применяемый в данном документе термин "фрагмент, представляющий собой лекарственное средство" или "полезная нагрузка" относится к химическому фрагменту, который конъюгирован или является подходящим для конъюгации с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, и может включать любое терапевтическое или диагностическое средство, и метаболиту конъюгата антитела с лекарственным средством, раскрытому в данном документе, который имеет требуемые терапевтические или диагностические свойства, например, противораковому, противовоспалительному, противоинфекционному (например, противогрибковому, антибактериальному, антипаразитическому, противовирусному) или анестетическому средству. В определенных аспектах фрагмент, представляющий собой лекарственное средство, выбран из ингибитора Eg5, ингибитора V-АТФазы, ингибитора HSP90, ингибитора IAP, ингибитора mTog, стабилизатора микротрубочек, дестабилизатора микротрубочек, ауристатина, доластатина, майтанзиноида, MetAP (метионинаминопептидазы), ингибитора ядерного экспорта белков CRM1, ингибитора DPPIV, ингибитора реакций переноса фосфорильной группы в митохондриях, ингибитора синтеза белков, ингибитора киназ, ингибитора CDK2, ингибитора CDK9, ингибитора протеасом, ингибитора кинезина, ингибитора HDAC, ДНК-повреждающего средства, ДНК-алкилирующего средства, ДНК-интеркалятора, средства, связывающего малую бороздку ДНК, ингибитора РНК-полимеразы, аманитина, ингибитора сплайсосом, ингибитора топоизомеразы и ингибитора DHFR и проапоптотического средства.

[0082] Термин "фрагмент, представляющий собой лекарственное средство", применяемый в данном документе, не включает ВНЗ-миметические ингибиторы, которые специфически ингибируют MCL-1, BCL-2 или BCLXL, также называемые ингибиторами

MCL-1, ингибиторами BCL-2 и ингибиторами BCLXL. Термины "миелоидноклеточный лейкоз 1" или "Mcl-1" или "MCL1", применяемые в данном документе, относятся к любой нативной форме человеческого Mcl-1, охватывают полноразмерный человеческий Mcl-1 (например, эталонная последовательность UniProt: Q07820), а также любые сплайс-варианты, аллельные варианты и изоформы, которые сохраняют одну или несколько биологических функций человеческого Mcl-1. Специфические ингибиторы Mcl-1, исключенные из данного документа, раскрыты в заявках согласно РСТ под номерами РСТ/EP2014/078947, РСТ/EP2016/064417, РСТ/EP2016/064418, РСТ/EP2016/064433, РСТ/EP2016/064436 и РСТ/EP2016/081688, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0083] Термины "В-клеточная лимфома 2" или "Bcl-2" или "BCL2", применяемые в данном документе, относятся к любой нативной форме человеческого Bcl-2, охватывают полноразмерный человеческий Bcl-2 (например, эталонная последовательность UniProf **P10415-1** или **P10415-2**), а также любые сплайс-варианты, аллельные варианты и изоформы, которые сохраняют одну или несколько биологических функций человеческого Bcl-2. Специфические ингибиторы Bcl-2, исключенные из данного документа, раскрыты в заявках согласно РСТ под номерами РСТ/FR2013/050136, РСТ/FR2014/051888, РСТ/FR2014/051887, РСТ/FR2014/051884, РСТ/FR2014/051885, РСТ/EP2014/065764 и РСТ/EP2018/079113, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0084] Применяемые в данном документе термины "сверхкрупноклеточная В-клеточная лимфома" или "Bcl-xL" или "BCLXL" относятся к любой нативной форме человеческого Bcl-xL, в том числе к полноразмерному человеческому Bcl-xL (например, эталонная последовательность UniProt: Q07817-1), а также любые сплайс-варианты, аллельные варианты и изоформы, которые сохраняют одну или несколько биологических функций человеческого Bcl-xL. Специфические ингибиторы Bcl-xL, исключенные из данного документа, раскрыты в заявках согласно РСТ под номерами РСТ/EP2020/071179 и РСТ/EP2020/071181, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0085] Способы присоединения каждого из таких фрагментов, представляющих собой лекарственное средство, к линкеру, совместимому с антителами и способами по настоящему изобретению, известны из уровня техники. См., например, Singh *et al.*, (2009) *Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols*, vol. 525, 445-457. Кроме того, полезная нагрузка может представлять собой зонд для биофизического обнаружения, флуорофор, спиновую метку, зонд для инфракрасного обнаружения, зонд для обнаружения аффинности, хелатор, зонд для спектроскопического обнаружения, радиоактивный зонд, липидную молекулу, полиэтиленгликоль, полимер, спиновую метку, ДНК, РНК, белок, пептид, покрытие, антитело, фрагмент антитела, наночастицу, квантовую точку, липосому, частицу из PLGA, сахарид или полисахарид.

[0086] Термин "рак" охватывает первичные злокачественные опухоли (например,

опухоли, клетки которых не мигрировали в места локализации в организме субъекта, отличные от места локализации исходной опухоли) и вторичные злокачественные опухоли (например, опухоли, развившиеся за счет метастазирования, миграции опухолевых клеток во вторичные места локализации, которые отличны от места локализации исходной опухоли). Термин "рак" включает все типы рака и метастазы рака, в том числе гематологические виды рака, солидные опухоли, саркомы, карциномы и другие солидные и отличные от солидных опухолей виды рака. Гематологические виды рака могут включать В-клеточные злокачественные новообразования, виды рака крови (формы лейкоза), виды рака плазматических клеток (миеломы, например, множественная миелома) или виды рака лимфатических узлов (лимфомы). Иллюстративные В-клеточные злокачественные новообразования включают хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), фолликулярную лимфому, лимфому из клеток мантийной зоны и диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому. Формы лейкоза могут включать острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), хронический миелогенный лейкоз (CML), хронический миеломоноцитарный лейкоз (CMML), острый моноцитарный лейкоз (AMoL) и т. д. Лимфомы могут включать лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому и т. д. Другие гематологические виды рака могут включать синдром миелодисплазии (MDS). Сольные опухоли могут включать карциномы, такие как аденокарцинома, например, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак толстой кишки или колоректальный рак, рак легкого, рак желудка, рак шейки матки, рак эндометрия, рак яичника, холангиокарциному, глиома, меланома и т. д. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы, множественную миелому, плазмноклеточную миелому, лейкоз, лимфому, рак желудка, острый миелоидный лейкоз, рак мочевого пузыря, рак головного мозга, рак костного мозга, рак шейки матки, хронический лимфоцитарный лейкоз, колоректальный рак, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, лимфобластный лейкоз, фолликулярную лимфому, лимфоидные злокачественные новообразования Т-клеточного или В-клеточного происхождения, меланому, миелогенный лейкоз, миелому, рак ротовой полости, рак яичника, немелкоклеточный рак легкого, хронический лимфоцитарный лейкоз, рак предстательной железы, мелкоклеточный рак легкого или рак селезенки.

[0087] В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой, гематологический рак, например, лейкемию, лимфому или миелому. Например, комбинацию, описанную в данном документе, можно применять для лечения видов рака, представляющих собой злокачественные новообразования, и связанных с ними нарушений, включая без ограничения, например, острый лейкоз, например, В-клеточный острый лимфоидный лейкоз (BALL), Т-клеточный острый лимфоидный лейкоз (TALL), острый миелоидный лейкоз (AML), острый лимфоидный лейкоз (ALL); хронический лейкоз, например, хронический миелогенный лейкоз (CML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL); дополнительный гематологический рак или гематологическое состояние, например, В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз, новообразование из бластных плазмцитоподобных

дендритных клеток, лимфому Беркитта, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, волосатоклеточный лейкоз, мелкоклеточную или крупноклеточную фолликулярную лимфому, злокачественные лимфопролиферативные состояния, MALT-лимфому, лимфому из клеток мантийной зоны, лимфому из клеток маргинальной зоны, множественную миелому, миелодисплазию и миелодиспластический синдром, неходжкинскую лимфому, плазмобластную лимфому, новообразование из плазмацитоидных дендритных клеток, макроглобулинемию Вальденстрема, миелофиброз, амилоидоз, обусловленный отложением амилоида из легких цепей, хронический нейтрофильный лейкоз, эссенциальную тромбоцитемию, хронический эозинофильный лейкоз, хронический миеломоноцитарный лейкоз, синдром Рихтера, смешанный фенотрипный острый лейкоз, острый бифенотипический лейкоз и "прелейкемию", которые представляют собой разнообразную группу гематологических состояний, объединенных неэффективной продукцией (или дисплазией) миелоидных клеток крови и т. п.

[0088] Применяемый в данном документе термин "опухоль" относится к любой массе ткани, которая возникает в результате чрезмерного роста или пролиферации клеток, как доброкачественных, так и злокачественных, в том числе предраковые очаги поражения. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой рак молочной железы, рак желудка, рак мочевого пузыря, рак головного мозга, рак шейки матки, колоректальный рак, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, меланому, рак ротовой полости, рак яичника, немелкоклеточный рак легкого, рак предстательной железы, мелкоклеточный рак легкого или рак селезенки. В некоторых вариантах осуществления опухоль представляет собой рак желудка.

[0089] Термины "опухолевая клетка" и "раковая клетка" могут применяться в данном документе взаимозаменяемо и относятся к отдельным клеткам или общей популяции клеток, полученных из опухоли или рака, в том числе из как неопухолевых клеток, так и раковых стволовых клеток. Термины "опухолевая клетка" и "раковая клетка" будут модифицированы с помощью термина "неопухолевая", когда речь идет исключительно о клетках, лишенных способности к обновлению и дифференцировке, чтобы отличить эти клетки от раковых стволовых клеток.

[0090] Термин "CD48" относится к белку кластера дифференцировки 48, также известному как маркер активации В-лимфоцитов (BLAST-1) или сигнальная молекула активации лимфоцитов 2 (SLAMF2). В некоторых вариантах осуществления CD48 представляет собой изоформу CD48 человека. В некоторых вариантах осуществления изоформа CD48 человека представляет собой изоформу 1 (NP_001769.2), имеющую следующую аминокислотную последовательность:

MCSRGWDSCLALELLLLPLSLLVTSIQGHLVHMTVVSGSNVTLNISESLPENYKQ
LTWFYTFDQKIVEWDSRKSKEYFESKFKGRVRLDPQSGALYISKVQKEDNSTYIMRVLKK
TGNEQEWKIKLQVLDPVPKPVIKIEKIEDMDDNCYLKLSCVIPGESVNYTWYGDKRFPF
KELQNSVLETTLMPHNYSRCYTCQVSNSVSSKNGTVCLSPCTLARSFGVEWIASWLVV
TVPTILGLLLT (SEQ ID NO:53).

[0091] В некоторых вариантах осуществления изоформа CD48 человека представляет собой изоформу 2 (NP_001242959.1), имеющую следующую аминокислотную последовательность:

MCSRGWDSCLALELLLLPLSLLVTSIQGHLVHMTVVSGSNVTNLNISESLPENYKQLTWF
YTFDQKIVEWDSRKSKEYFESKFKGRVRLDPQSGALYISKVQKEDNSTYIMRVLKKTGNE
QEWKIKLQVLDPVPKPVIKIEKIEDMDDNCYLKLSVIPGESVNYTWYGDKRPFPELQ
NSVLETTLMPHNYSRCYTQVSNVSSKNGTVCLSPCTLGKKDPWELRGAQGNWSCF
EQRKAGGPPIQPPCTVWW (SEQ ID NO:54).

[0092] Применяемый в данном документе термин "CD48" применяется для совместного обозначения всех встречающихся в природе изоформ белка CD48 или его варианта.

[0093] Термин "вариант" относится к полипептиду, который имеет по сути идентичную аминокислотную последовательность с эталонным полипептидом, или кодируется по сути идентичной нуклеотидной последовательностью и может характеризоваться одной или несколькими активностями эталонного полипептида. Например, вариант может характеризоваться приблизительно 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более высокой идентичностью последовательности с эталонным полипептидом, при этом он сохраняет одну или несколько активностей эталонного полипептида.

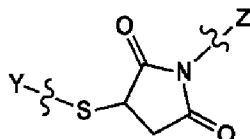
[0094] Применяемые в данном документе термины "лечить", "осуществление лечения" или "лечение" любого заболевания или нарушения в одном аспекте относятся к снижению тяжести заболевания или нарушения (т. е. к замедлению, или остановке, или снижению интенсивности развития заболевания или по меньшей мере одного из его клинических симптомов). В другом аспекте термин "лечить", "осуществление лечения" или "лечение" относятся к облегчению или снижению тяжести по меньшей мере одного физического параметра, в том числе таких, которые могут не ощущаться пациентом. В еще одном аспекте "лечить", "осуществление лечения" или "лечение" относятся к модулированию заболевания или нарушения либо физическому (например, посредством стабилизации осязаемого симптома), либо физиологическому (например, посредством стабилизации физического параметра), либо обоим. В еще одном аспекте "лечить", "осуществление лечения" или "лечение" относится к задержке возникновения, или развития, или прогрессирования заболевания или нарушения. В некоторых вариантах осуществления лечение включает модулирование заболевания, нарушения или состояния либо физическому (например, посредством стабилизации осязаемого симптома), либо физиологическому (например, посредством стабилизации физического параметра), либо обоим. В некоторых вариантах осуществления лечение включает введение описанного антитела, его антигенсвязывающего фрагмента, его ADC или композиции субъекту, например, пациенту, для получения преимущества лечения, перечисленного в данном документе. Лечение может быть направлено на излечение, исцеление, облегчение, отсрочку, ослабление, изменение, смягчение, улучшение или воздействие на заболевание,

нарушение или состояние (например, рак), симптомы заболевания, нарушения или состояния (например, рака).

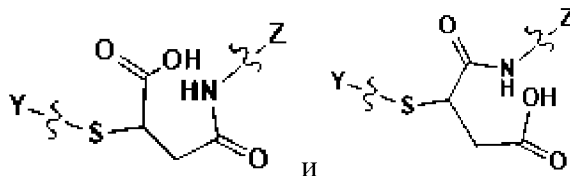
[0095] Термин "терапевтически приемлемое количество" или "терапевтически эффективная доза" взаимозаменяемо относится к количеству, достаточному для произведения требуемого результата (т. е. снижения размера опухоли, подавления роста опухоли, предупреждения метастазирования, подавления или предупреждения вирусной, бактериальной, грибковой или паразитарной инфекции). В некоторых аспектах терапевтически приемлемое количество не индуцирует или не вызывает нежелательные побочные эффекты. Терапевтически приемлемое количество можно определять, вводя вначале низкую дозу, а затем постепенно увеличивая данную дозу до тех пор, пока не будет достигнут требуемый эффект. "Терапевтически эффективная дозировка" молекул по настоящему изобретению может предупреждать возникновение или, соответственно, приводить к уменьшению тяжести симптомов заболевания, в том числе симптомов, ассоциированных с раком.

[0096] Термин "совместное введение" относится к одновременному присутствию двух активных средств в крови индивидуума. Активные средства, которые вводятся совместно, могут доставляться одновременно или последовательно.

[0097] Применяемый в данном документе термин "тиолмалеимид" относится к группе, образуемой за счет реакции тиола с малеимидом, характеризующейся такой общей формулой:



где Y и Z представляют собой группы, подлежащие соединению с помощью тиолмалеимидной связи, и они могут предусматривать линкерные компоненты, антитела или полезные нагрузки. Тиолмалеимид может образовывать следующие структуры с



открытым кольцом

[0098] Применяемый в данном документе термин "расщепляемый" относится к связывающей группе или линкерному компоненту, которые соединяют два фрагмента за счет ковалентных связей, но разъединяются с разрывом ковалентной связи между фрагментами при физиологически соответствующих условиях; как правило, расщепляемая связывающая группа разрывается *in vivo* быстрее во внутриклеточной среде, чем при нахождении вне клетки, что вызывает предпочтительное высвобождение полезной нагрузки внутри клетки-мишени. Расщепление может быть ферментативным или неферментативным, но обычно приводит к высвобождению полезной нагрузки из антитела

без разрушения антитела. При расщеплении некоторая часть связывающей группы или линкерного компонента может оставаться присоединенной к полезной нагрузке, или высвобождение полезной нагрузки может происходить без какого-либо остатка связывающей группы.

[0099] Применяемый в данном документе термин "нерасщепляемый" относится к связывающей группе или линкерному компоненту, которые практически не подвергаются разъединению при физиологических условиях, например, они устойчивы по меньшей мере в такой же степени, как и часть конъюгата, представляющая собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Такие связывающие группы иногда называют "устойчивыми", что означает, что они в достаточной степени устойчивы к разрушению, чтобы удерживать полезную нагрузку, присоединенную к антителу или антигенсвязывающему фрагменту до тех пор, пока антитело или антигенсвязывающий фрагмент сами по себе по меньшей мере частично не разрушатся, т. е. разрушение антитела или антигенсвязывающего фрагмента предшествует расщеплению связывающей группы *in vivo*. При разрушении части, представляющей собой антитело, у ADC с устойчивой или нерасщепляемой связывающей группой часть или вся связывающая группа, например, одна или несколько аминокислотных групп из антитела, могут оставаться присоединенными к полезной нагрузке или фрагменту, представляющему собой лекарственное средство, которые доставляются *in vivo*.

Антитела к CD48

[00100] В данном документе раскрыты антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты), которые специфически связываются с CD48 человека. Антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) по настоящему изобретению включают без ограничения человеческие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе.

[00101] Аминокислотные последовательности иллюстративных антител к CD48 по настоящему изобретению изложены в таблице 1, таблице 2 и таблице 3.

[00102] Как изложено в данном документе, антитела получают свое название по их обозначению, например, NY920. Если антитела подвергнуты модификации, они дополнительно обозначены с указанием модификации. Например, если отобранные аминокислоты в антителе были заменены на остатки цистеина (например, E152C, S375C в соответствии с нумерацией EU тяжелой цепи антитела для облегчения конъюгации с фрагментами, представляющими собой линкер-лекарственное средство), они обозначаются как "CysMab"; или если антитело было модифицировано мутациями D265A и P329A Fc-сайленсинга константной области IgG1 в соответствии с нумерацией EU, к названию антитела добавляется "DAPA". Если антитело применяется в конъюгате антитела и лекарственного средства, они получают название с применением следующего формата: обозначение антитела-линкер-нагрузка.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности CDR mAb к CD48

Обозначение Ab	SEQ ID NO	Цепь IgG	Аминокислотная последовательность
NY920 CysMab	SEQ ID NO: 1 (комбинированное)	HCDR1	GFTFSSFAMS
	SEQ ID NO: 2 (комбинированное)	HCDR2	AISGFGGSTYYADSVKG
	SEQ ID NO: 3 (комбинированное)	HCDR3	QFWEDQPFYFDY
	SEQ ID NO: 4 (согласно Kabat)	HCDR1	SFAMS
	SEQ ID NO: 2 (согласно Kabat)	HCDR2	AISGFGGSTYYADSVKG
	SEQ ID NO: 3 (согласно Kabat)	HCDR3	QFWEDQPFYFDY
	SEQ ID NO: 5 (согласно Chothia)	HCDR1	GFTFSSF
	SEQ ID NO: 6 (согласно Chothia)	HCDR2	SGFGGS
	SEQ ID NO: 3 (согласно Chothia)	HCDR3	QFWEDQPFYFDY
	SEQ ID NO: 7 (согласно IMGT)	HCDR1	GFTFSSFA
	SEQ ID NO: 8 (согласно IMGT)	HCDR2	ISGFGGST
	SEQ ID NO: 9 (согласно IMGT)	HCDR3	ARQFWEDQPFYFDY
	SEQ ID NO: 16 (комбинированное)	LCDR1	RASQSISSYLN
	SEQ ID NO: 17 (комбинированное)	LCDR2	AASSLQS
	SEQ ID NO: 18 (комбинированное)	LCDR3	QQSYSTPLT
	SEQ ID NO: 16 (согласно Kabat)	LCDR1	RASQSISSYLN

	SEQ ID NO: 17 (согласно Kabat)	LCDR2	AASSLQS
	SEQ ID NO: 18 (согласно Kabat)	LCDR3	QQSYSTPLT
	SEQ ID NO: 19 (согласно Chothia)	LCDR1	SQSISSY
	SEQ ID NO: 20 (согласно Chothia)	LCDR2	AAS
	SEQ ID NO: 21 (согласно Chothia)	LCDR3	SYSTPL
	SEQ ID NO: 22 (согласно IMGT)	LCDR1	QSISSY
	SEQ ID NO: 20 (согласно IMGT)	LCDR2	AAS
	SEQ ID NO: 18 (согласно IMGT)	LCDR3	QQSYSTPLT
NY920 CysMab DAPA	SEQ ID NO: 1 (комбинированное)	HCDR1	GFTFSSFAMS
	SEQ ID NO: 2 (комбинированное)	HCDR2	AISGFGGSTYYADSVKG
	SEQ ID NO: 3 (комбинированное)	HCDR3	QFWEDQPFYFDY
	SEQ ID NO: 4 (согласно Kabat)	HCDR1	SFAMS
	SEQ ID NO: 2 (согласно Kabat)	HCDR2	AISGFGGSTYYADSVKG
	SEQ ID NO: 3 (согласно Kabat)	HCDR3	QFWEDQPFYFDY
	SEQ ID NO: 5 (согласно Chothia)	HCDR1	GFTFSSF
	SEQ ID NO: 6 (согласно Chothia)	HCDR2	SGFGGS
	SEQ ID NO: 3 (согласно Chothia)	HCDR3	QFWEDQPFYFDY

	SEQ ID NO: 7 (согласно IMGT)	HCDR1	GFTFSSFA
	SEQ ID NO: 8 (согласно IMGT)	HCDR2	ISGFGGST
	SEQ ID NO: 9 (согласно IMGT)	HCDR3	ARQFWEDQPFYFDY
	SEQ ID NO: 16 (комбинированное)	LCDR1	RASQSISSYLN
	SEQ ID NO: 17 (комбинированное)	LCDR2	AASSLQS
	SEQ ID NO: 18 (комбинированное)	LCDR3	QQSYSTPLT
	SEQ ID NO: 16 (согласно Kabat)	LCDR1	RASQSISSYLN
	SEQ ID NO: 17 (согласно Kabat)	LCDR2	AASSLQS
	SEQ ID NO: 18 (согласно Kabat)	LCDR3	QQSYSTPLT
	SEQ ID NO: 19 (согласно Chothia)	LCDR1	SQSISSY
	SEQ ID NO: 20 (согласно Chothia)	LCDR2	AAS
	SEQ ID NO: 21 (согласно Chothia)	LCDR3	SYSTPL
	SEQ ID NO: 22 (согласно IMGT)	LCDR1	QSISSY
	SEQ ID NO: 20 (согласно IMGT)	LCDR2	AAS
	SEQ ID NO: 18 (согласно IMGT)	LCDR3	QQSYSTPLT
NY938 CysMab	SEQ ID NO: 27 (комбинированное)	HCDR1	GYTFTEYTMH
	SEQ ID NO: 28 (комбинированное)	HCDR2	GINPDTGDTSYNQKFTG

	SEQ ID NO: 29 (комбинированное)	HCDR3	AQFWTTPRFAY
	SEQ ID NO: 30 (согласно Kabat)	HCDR1	EYTMH
	SEQ ID NO: 28 (согласно Kabat)	HCDR2	GINPDTGDTSYNQKFTG
	SEQ ID NO: 29 (согласно Kabat)	HCDR3	AQFWTTPRFAY
	SEQ ID NO: 31 (согласно Chothia)	HCDR1	GYTFTEY
	SEQ ID NO: 32 (согласно Chothia)	HCDR2	NPDTGD
	SEQ ID NO: 29 (согласно Chothia)	HCDR3	AQFWTTPRFAY
	SEQ ID NO: 33 (согласно IMGT)	HCDR1	GYTFTEYT
	SEQ ID NO: 34 (согласно IMGT)	HCDR2	INPDTGDT
	SEQ ID NO: 35 (согласно IMGT)	HCDR3	ARAQFWTTPRFAY
	SEQ ID NO: 42 (комбинированное)	LCDR1	KASQDVGTAVA
	SEQ ID NO: 43 (комбинированное)	LCDR2	WASTRHT
	SEQ ID NO: 44 (комбинированное)	LCDR3	QQYSTYPIT
	SEQ ID NO: 42 (согласно Kabat)	LCDR1	KASQDVGTAVA
	SEQ ID NO: 43 (согласно Kabat)	LCDR2	WASTRHT
	SEQ ID NO: 44 (согласно Kabat)	LCDR3	QQYSTYPIT
	SEQ ID NO: 45 (согласно Chothia)	LCDR1	SQDVGTA

	SEQ ID NO: 46 (согласно Chothia)	LCDR2	WAS
	SEQ ID NO: 47 (согласно Chothia)	LCDR3	YSTYPI
	SEQ ID NO: 48 (согласно IMGT)	LCDR1	QDVGTA
	SEQ ID NO: 46 (согласно IMGT)	LCDR2	WAS
	SEQ ID NO: 44 (согласно IMGT)	LCDR3	QQYSTYPIT
NY938 CysMab DAPA	SEQ ID NO: 27 (комбинированное)	HCDR1	GYTFTEYTMH
	SEQ ID NO: 28 (комбинированное)	HCDR2	GINPDTGDTSYNQKFTG
	SEQ ID NO: 29 (комбинированное)	HCDR3	AQFWTTPRFAY
	SEQ ID NO: 30 (согласно Kabat)	HCDR1	EYTMH
	SEQ ID NO: 28 (согласно Kabat)	HCDR2	GINPDTGDTSYNQKFTG
	SEQ ID NO: 29 (согласно Kabat)	HCDR3	AQFWTTPRFAY
	SEQ ID NO: 31 (согласно Chothia)	HCDR1	GYTFTEY
	SEQ ID NO: 32 (согласно Chothia)	HCDR2	NPDTGD
	SEQ ID NO: 29 (согласно Chothia)	HCDR3	AQFWTTPRFAY
	SEQ ID NO: 33 (согласно IMGT)	HCDR1	GYTFTEYT
	SEQ ID NO: 34 (согласно IMGT)	HCDR2	INPDTGDT
	SEQ ID NO: 35 (согласно IMGT)	HCDR3	ARAQFWTTPRFAY

	SEQ ID NO: 42 (комбинированное)	LCDR1	KASQDVGTA
	SEQ ID NO: 43 (комбинированное)	LCDR2	WASTRHT
	SEQ ID NO: 44 (комбинированное)	LCDR3	QQYSTYPIT
	SEQ ID NO: 42 (согласно Kabat)	LCDR1	KASQDVGTA
	SEQ ID NO: 43 (согласно Kabat)	LCDR2	WASTRHT
	SEQ ID NO: 44 (согласно Kabat)	LCDR3	QQYSTYPIT
	SEQ ID NO: 45 (согласно Chothia)	LCDR1	SQDVGTA
	SEQ ID NO: 46 (согласно Chothia)	LCDR2	WAS
	SEQ ID NO: 47 (согласно Chothia)	LCDR3	YSTYPI
	SEQ ID NO: 48 (согласно IMGT)	LCDR1	QDVGTA
	SEQ ID NO: 46 (согласно IMGT)	LCDR2	WAS
	SEQ ID NO: 44 (согласно IMGT)	LCDR3	QQYSTYPIT

Таблица 2. Аминокислотная последовательность и последовательности нуклеиновых кислот переменных областей mAb к CD48

Ab	SEQ ID NO	Цепь IgG	Аминокислотная последовательность
NY920 CysMab	SEQ ID NO:10	VH	EVQLLES G GGLVQP G GSLRLSCAASGFTFSSF AMSWVRQAPGKGLEWVSAISGFGGSTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAV YYCARQFWEDQPFYFDYW GQGTLVTVSS
	SEQ ID NO:11	ДНК, кодирую щая VH	GAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGGGGTGG ACTGGTGCAGCCCGGAGGTTCCCTGCGGTT GTCTTGTGCCGCTCGGGATTCACCTTCTCG TCCTTCGCGATGAGCTGGGTCCGCCAAGCT

			CCTGGAAAAGGGCTCGAATGGGTGTCCGCG ATCAGCGGATTTGGCGGCTCCACCTACTAC GCCGATTCAGTGAAGGGCCGGTTCACCATC TCACGGGACAACAGCAAGAACACGCTGTA TCTGCAAATGAACTCCCTGCGCGCTGAGGA CACCGCAGTGTACTACTGCGCGAGACAGTT CTGGGAGGACCAGCCGTTCTACTTCGACTA CTGGGGACAGGGGACCCTCGTGACTGTCTC CTCC
	SEQ ID NO:23	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQSYSTPLT FGQGTKVEIK
	SEQ ID NO:24	ДНК, кодирую щая VL	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCGTCGTCG CTGAGCGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGAC CATTACCTGTCTGGGCCAGCCAGTCGATCTC CTCCTACCTTAACTGGTATCAGCAGAAGCC AGGAAAGGCACCGAAACTGCTGATCTACG CCGCGTCCTCCTTGCAATCCGGAGTGCCCT CAAGGTTCTCCGGGTCGGGTTCTGGCACTG ACTTTACCCTGACCATCAGCAGCCTCCAGC CCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGC AGTCATACTCCACCCCTCTGACATTCGGCC AAGGGACCAAGGTCGAAATCAAG
NY920 CysMab DAPA	SEQ ID NO:10	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSF AMSWVRQAPGKGLEWVSAISFGGSTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARQFWEDQPFYFDYWGGTLVTVSS
	SEQ ID NO:11	ДНК, кодирую щая VH	GAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGGGGTGG ACTGGTGCAGCCCGGAGGTTCCCTGCGGTT GTCTTGTGCCGCCTCGGGATTCACCTTCTCG TCCTTCGCGATGAGCTGGGTCCGCCAAGCT CCTGGAAAAGGGCTCGAATGGGTGTCCGCG ATCAGCGGATTTGGCGGCTCCACCTACTAC GCCGATTCAGTGAAGGGCCGGTTCACCATC

			TCACGGGACAACAGCAAGAACACGCTGTA TCTGCAAATGAACTCCCTGCGCGCTGAGGA CACCGCAGTGTACTACTGCGCGAGACAGTT CTGGGAGGACCAGCCGTTCTACTTCGACTA CTGGGGACAGGGGACCCTCGTGACTGTCTC CTCC
	SEQ ID NO:23	VL	DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLT FGQGTKVEIK
	SEQ ID NO:24	ДНК, кодирую щая VL	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCGTCGTCG CTGAGCGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGAC CATTACCTGTCTGGGCCAGCCAGTCGATCTC CTCCTACCTTAACTGGTATCAGCAGAAGCC AGGAAAGGCACCGAAACTGCTGATCTACG CCGCGTCCTCCTTGCAATCCGGAGTGCCCT CAAGGTTCTCCGGGTCGGGTTCTGGCACTG ACTTTACCCTGACCATCAGCAGCCTCCAGC CCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGC AGTCATACTCCACCCCTCTGACATTCGGCC AAGGGACCAAGGTCGAAATCAAG
NY938 CysMab	SEQ ID NO:36	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT EYTMHWVRQAPGQGLEWMGGINPDTGDTS YNQKFTGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARAQFWTTPRFAYWGQGTLVTVSS
	SEQ ID NO:37	ДНК, кодирую щая VH	CAAGTGCACTCGTGCACTCCGGAGCGGA AGTGAAAAAGCCCGGAGCCTCAGTGAAAG TGTCTTGCAAAGCCTCGGGGTACACCTTCA CCGAGTACACTATGCATTGGGTCCGCCAAG CTCCTGGTCAAGGCCTCGAATGGATGGGCG GCATCAATCCCGACACCGGCGACACCAGCT ATAACCAGAAGTTCACCGGACGCGCCACTC TGACTGTCGATAAGAGCACAAAGCACCGCCT ACATGGAAGTGTCTGTCCTTGCGGTCCGAGG ATACCGCCGTGTACTACTGCGCGAGAGCGC

			AGTTTTGGACTACCCCGCGGTTCGCCTACT GGGGACAGGGCACTCTCGTGACTGTGTGCAT CG
	SEQ ID NO:49	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTA VAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRHTGVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDVATYYCQQYSTYP ITFGQGTKLEIK
	SEQ ID NO:50	ДНК, кодирую щая VL	GACATCCAAATGACCCAGAGCCCTTCGAGC CTGTCAGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACC ATTACTTGCAAAGCCAGCCAGGACGTGGGA ACTGCAGTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCA GGAAAGGTCCCCAAGCTCCTGATCTACTGG GCTTCCACCCGGCACACTGGCGTGCCGTCA AGGTTTTTCGGGATCGGGTTCGGGACTGAT TTCACCCTGACCATTTCCTCCCTCCAACCCG AGGATGTGGCCACCTACTACTGCCAGCAGT ACTCCACCTACCCGATCACATTCGGACAGG GCACCAAGCTCGAAATCAAG
NY938 CysMab DAPA	SEQ ID NO:36	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT EYTMHWVRQAPGQGLEWMGGINPDTGDTS YNQKFTGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARAQFWTTPRFAYWGQGTLVTVSS
	SEQ ID NO:37	ДНК, кодирую щая VH	CAAGTGCAGCTCGTGCAGTCCGGAGCGGA AGTGAAAAAGCCCGGAGCCTCAGTGAAAG TGTCTTGCAAAGCCTCGGGGTACACCTTCA CCGAGTACACTATGCATTGGGTCCGCCAAG CTCCTGGTCAAGGCCTCGAATGGATGGGCG GCATCAATCCCGACACCGGCGACACCAGCT ATAACCAGAAGTTCACCGGACGCGCCACTC TGACTGTGATAAGAGCACAAAGACCGCCT ACATGGAAGTGTGTCCTTGCGGTCCGAGG ATACCGCCGTGTACTACTGCGCGAGAGCGC AGTTTTGGACTACCCCGCGGTTCGCCTACT GGGGACAGGGCACTCTCGTGACTGTGTGCAT CG

	SEQ ID NO:49	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVGTA VAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRHTGVPSRFS GSGSGTDFLTITSLQPEDVATYYCQYSTYP ITFGQGTKLEIK
	SEQ ID NO:50	ДНК, кодирую щая VL	GACATCCAAATGACCCAGAGCCCTTCGAGC CTGTCAGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACC ATTACTTGCAAAGCCAGCCAGGACGTGGGA ACTGCAGTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCA GGAAAGGTCCCCAAGCTCCTGATCTACTGG GCTTCCACCCGGCACACTGGCGTGCCGTCA AGGTTTTTCGGGATCGGGTTCCGGGACTGAT TTCACCCTGACCATTTCCTCCCTCCAACCCG AGGATGTGGCCACCTACTACTGCCAGCAGT ACTCCACCTACCCGATCACATTCGGACAGG GCACCAAGCTCGAAATCAAG

Таблица 3. Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот полноразмерных цепей mAb IgG полной длины

Ab	SEQ ID NO	Цепь IgG	Аминокислотная последовательность
NY920 CysMab	SEQ ID NO:12	Тяжелая цепь	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSF AMSWVRQAPGKGLEWVSAISGFGGSTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARQFWEDQPFYFDYWGGQGLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
	SEQ ID NO:13	ДНК, кодирую	GAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGGGGTGGA CTGGTGCAGCCCGGAGGTTCCCTGCGGTTGT

		щая тяжелую цепь	CTTGTGCCGCCTCGGGATTACCTTCTCGTC CTTCGCGATGAGCTGGGTCCGCCAAGCTCCT GGAAAAGGGCTCGAATGGGTGTCCGCGATC AGCGGATTTGGCGGCTCCACCTACTACGCCG ATTCAGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCACG GGACAACAGCAAGAACACGCTGTATCTGCA AATGAACTCCCTGCGCGCTGAGGACACCGC AGTGTACTACTGCGCGAGACAGTTCTGGGA GGACCAGCCGTTCTACTTCGACTACTGGGGA CAGGGGACCCTCGTGACTGTCTCCTCCGCCT CCACTAAGGGCCCATCCGTGTTCCCTCTGGC CCCTTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGCACC GCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT TCCCCTGTCCCGTGACCGTGTCTGGAAGTCT TGGCGCCCTGACCTCCGGCGTGACACACCTTC CCTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACT CCCTGTCTCCGTCTGTGACCGTGCCCTCCAG CTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC GTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAAGTG GACAAGCGGGTGGAACCCAAGTCCTGCGAC AAGACCCACACCTGTCCTCCCTGCCCTGCCC CTGAGCTGCTGGGCGGACCTCCGTGTTCTCT GTTCCCTCCAAAGCCCAAGGACACCCTGAT GATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTG GTGGTGGACGTGTCCACGAGGATCCCGAA GTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTG GAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGA GAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTG GTGTCCGTGCTGACCGTGTCTGCACCAGGACT GGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAG TGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCAATCGA AAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCC CCGCGAGCCCCAAGTGTACACACTGCCTCCC AGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAAGTG TCCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACC
--	--	------------------------	--

			CCTGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCA ACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCA CCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCATT CTTCCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAG TCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCT GCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCC CGGCAAG
	SEQ ID NO:25	Легкая цепь	DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPLTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	SEQ ID NO:26	ДНК, кодирую щая легкую цепь	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCGTCGTCGC TGAGCGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACCA TTACCTGTCGGGCCAGCCAGTCGATCTCCTC CTACCTTAACTGGTATCAGCAGAAGCCAGG AAAGGCACCGAAACTGCTGATCTACGCCGC GTCCTCCTTGCAATCCGGAGTGCCCTCAAGG TTCTCCGGGTCGGGTTCTGGCACTGACTTTA CCCTGACCATCAGCAGCCTCCAGCCCGAGG ACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTCATA CTCCACCCCTCTGACATTTCGGCCAAGGGACC AAGGTCGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCT CCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACG AGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGG TGTGCCTGCTGAACAACCTTACCCCCGGGA GGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGC CCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGT CACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTA CAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAA GGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGC CTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAG

			CCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGA GTGC
NY920 CysMab DAPA	SEQ ID NO:14	Тяжелая цепь	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSF AMSWVRQAPGKGLEWVSAISGFGGSTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARQFWEDQPFYFDYWGGQGLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCV VVA VSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPC DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
	SEQ ID NO:15	ДНК, кодирую щая тяжелую цепь	GAAGTGCAGCTGCTGGAGTCCGGGGGTGGA CTGGTGCAGCCCGGAGGTTCCCTGCGGTTGT CTTGTGCCGCCTCGGGATTACCTTCTCGTC CTTCGCGATGAGCTGGGTCCGCCAAGCTCCT GGAAAAGGGCTCGAATGGGTGTCCGCGATC AGCGGATTTGGCGGCTCCACCTACTACGCCG ATTCAGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCACG GGACAACAGCAAGAACACGCTGTATCTGCA AATGAACTCCCTGCGCGCTGAGGACACCGC AGTGTA CTACTGCGCGAGACAGTTCTGGGA GGACCAGCCGTTCTACTTCGACTACTGGGGA CAGGGGACCCTCGTGACTGTCTCCTCCGCCT CCACTAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCACTGGC GCCTTCCTCGAAATCGACTAGCGGGGGTAC CGCCGCTCTGGGATGCTTGGTGAAAGACTA CTTTCGTGTCCGGTGACCGTGAGCTGGAAC TCCGGGGCACTCACCTCCGGGTGTGCATACTT TCCCTGCTGTCTTGCACTCCTCGGGCCTGTA

			CAGCCTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCG TCGTCCCTGGGAACCCAGACGTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCGAGCAACACCAAAG TCGATAAGAGAGTCGAGCCCAAGAGCTGCG ATAAGACCCACACTTGTCCGCCTTGTCTGC CCCTGAGCTTCTGGGTGGCCCATCGGTGTTT CTGTTTCCCCCGAAGCCCAAGACACCCTGA TGATCTCGCGCACTCCGGAGGTCACTTGCGT GGTCGTGGCGGTGTCCACGAGGACCCAGA AGTGAAGTTTAACTGGTACGTGGACGGAGT GGAAGTCCACAACGCGAAAATAAGCCCCG GGAGGAACAATACTCCACCTACCGCGT CGTGTCCGTGCTCACTGTGCTGCACCAGGAT TGGCTGAACGGTAAAGAGTACAAGTGTAAG GTGTCGAACAAAGCCCTCGCCGCCCTATCG AAAAGACTATTTGAAAGCTAAGGGCCAGC CGCGAGAACCCCAAGTGTATACCCTGCCCC CTTCACGGGAAGAGATGACTAAGAATCAGG TGTCGCTCACCTGTCTGGTGAAGGGATTTTA TCCCTGCGACATTGCCGTGGAGTGGGAATC GAACGGCCAGCCTGAGAACAATAAGAC CACTCCGCCGGTGCTTGACAGCGACGGTTCG TTCTTCTCTACTCTAAGCTCACCGTGGACA AGTCACGGTGGCAACAGGGCAACGTGTTCT CGTGCTCTGTGATGCACGAAGCTCTCCACAA CCATTACACCAGAAGTCCCTCAGCCTCAGC CCGGGGAAG
	SEQ ID NO:25	Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	SEQ ID NO:26	ДНК,	GATATTCAAGATGACCCAGTCCCCGTCGTCGC

		кодирующая легкую цепь	TGAGCGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACCA TTACCTGTCGGGCCAGCCAGTCGATCTCCTC CTACCTTAACTGGTATCAGCAGAAGCCAGG AAAGGCACCGAAACTGCTGATCTACGCCGC GTCCTCCTTGCAATCCGGAGTGCCCTCAAGG TTCTCCGGGTCGGGTTCTGGCACTGACTTTA CCCTGACCATCAGCAGCCTCCAGCCCGAGG ACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTCATA CTCCACCCCTCTGACATTCGGCCAAGGGACC AAGGTCGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCT CCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACG AGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGG TGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGA GGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGC CCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGT CACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTA CAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAA GGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGC CTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAG CCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGA GTGC
NY938 CysMab	SEQ ID NO:38	Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTE YTMHWVRQAPGQGLEWMGGINPDTGDTSYN QKFTGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAV YYCARAQFWTTPRFAYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ

			KSLSLSPGK
	SEQ ID NO:39	ДНК, кодирую щая тяжелую цепь	CAAGTGCAGCTCGTGCAGTCCGGAGCGGAA GTGAAAAAGCCCGGAGCCTCAGTGAAAGTG TCCTGCAAAGCCTCGGGGTACACCTTCACCG AGTACACTATGCATTGGGTCCGCCAAGCTCC TGGTCAAGGCCTCGAATGGATGGGCGGCAT CAATCCCGACACCGGCGACACCAGCTATAA CCAGAAGTTCACCGGACGCGCCACTCTGAC TGTCGATAAGAGCACAAGCACCGCCTACAT GGAAGTGTCTGTCCTTGCGGTCCGAGGATACC GCCGTGTACTACTGCGCGAGAGCGCAGTTTT GGACTACCCCGCGGTTTCGCTACTGGGGAC AGGGCACTCTCGTGACTGTGTCATCGGCGTC CACCAAGGGCCCATCCGTGTTCCCTCTGGCC CCTTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGCACCG CCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTT CCCCTGTCCCGTGACCGTGTCTGGAAGTCT GGCGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCC CTGCCGTGCTGCAGTCCTCCGGCCTGTACTC CCTGTCCTCCGTCTGTGACCGTGCCCTCCAGC TCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG TGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAAGTGG ACAAGCGGGTGGAACCCAAGTCCTGCGACA AGACCCACACCTGTCCTCCCTGCCCTGCCCC TGAGCTGCTGGGCGGACCCTCCGTGTTCTGT TTCCCTCCAAGCCCAAGGACACCCTGATG ATCTCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGG TGGTGGACGTGTCCACGAGGATCCCGAAG TGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGG AAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAG AGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGG TGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGT GTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCAATCGA AAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCC

			CCGCGAGCCCCAAGTGTACACACTGCCTCCC AGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAAGTG TCCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACC CCTGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCA ACGGCCAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCA CCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCATT CTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAG TCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCT GCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCC CGGCAAG
	SEQ ID NO:51	Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTA VAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRHTGVPSRFS GSGSGTDFLTITSSLPEDVATYYCQQYSTYPI TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
	SEQ ID NO:52	ДНК, кодирую щая легкую цепь	GACATCCAAATGACCCAGAGCCCTTCGAGC CTGTCAGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACC ATTA CTTGCAAAGCCAGCCAGGACGTGGGA ACTGCAGTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCA GGAAAGGTCCCCAAGCTCCTGATCTACTGG GCTTCCACCCGGCACACTGGCGTGCCGTCAA GGTTTTCGGGATCGGGTTCCGGGACTGATTT CACCCTGACCATTTCCTCCCTCCAACCCGAG GATGTGGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACT CCACCTACCCGATCACATTCGGACAGGGCA CCAAGCTCGAAATCAAGCGTACGGTGGCCG CTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGA CGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGT GGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGG GAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC GCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGC GTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACC

			TACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTAC GCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCC AGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGC GAGTGC
NY938 CysMab DAPA	SEQ ID NO:40	Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTE YTMHWVRQAPGQGLEWMGGINPDTGDTSYN QKFTGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAV YYCARAQFWTTPRFAYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCV VVA VSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPC DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
	SEQ ID NO:41	ДНК, кодирую щая тяжелую цепь	CAAGTGCAGCTCGTGCAGTCCGGAGCGGAA GTGAAAAAGCCCGGAGCCTCAGTGAAAGTG TCCTGCAAAGCCTCGGGGTACACCTTCACCG AGTACACTATGCATTGGGTCCGCCAAGCTCC TGGTCAAGGCCTCGAATGGATGGGCGGCAT CAATCCCGACACCGGCGACACCAGCTATAA CCAGAAGTTCACCGGACGCGCCACTCTGAC TGTCGATAAGAGCACAAGCACCGCCTACAT GGAAGTGTCTGCTCCTTGCGGTCCGAGGATACC GCCGTGTACTACTGCGCGAGAGCGCAGTTTT GGACTACCCCGCGGTTCGCCTACTGGGGAC AGGGCACTCTCGTGACTGTGTCATCGGCGTC CACCAAGGGCCCTAGCGTGTTCCCACTGGC GCCTTCCTCGAAATCGACTAGCGGGGGTAC CGCCGCTCTGGGATGCTTGGTGAAAGACTA

			CTTTCCGTGTCCGGTGACCGTGAGCTGGAAC TCCGGGGCACTCACCTCCGGTGTGCATACTT TCCCTGCTGTCTTGCAGTCCTCGGGCCTGTA CAGCCTGTCCTCCGTGGTGACCGTGCCTTCG TCGTCCCTGGGAACCCAGACGTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCGAGCAACACCAAAG TCGATAAGAGAGTCGAGCCCAAGAGCTGCG ATAAGACCCACACTTGTCCGCCTTGTCTGCTG CCCTGAGCTTCTGGGTGGCCCATCGGTGTTT CTGTTTCCCCCGAAGCCCAAAGACACCCTGA TGATCTCGCGCACTCCGGAGGTCACCTGCGT GGTCGTGGCGGTGTCCACGAGGACCCAGA AGTGAAGTTTAACTGGTACGTGGACGGAGT GGAAGTCCACAACGCGAAAATAAGCCCCG GGAGGAACAATAACAATACTCCACCTACCGCGT CGTGTCCTGTGCTCACTGTGCTGCACCAGGAT TGGCTGAACGGTAAAGAGTACAAGTGTAAG GTGTCGAACAAAGCCCTCGCCGCCCTATCG AAAAGACTATTTTCGAAAGCTAAGGGCCAGC CGCGAGAACCCCAAGTGTATACCCTGCCCC CTTCACGGGAAGAGATGACTAAGAATCAGG TGTCGCTCACCTGTCTGGTGAAGGGATTTTA TCCCTGCGACATTGCCGTGGAGTGGGAATC GAACGGCCAGCCTGAGAACAATAACAAGAC CACTCCGCCGGTGCTTGACAGCGACGGTTCG TTCTTCCTCTACTCTAAGCTCACCGTGGACA AGTCACGGTGGCAACAGGGCAACGTGTTCT CGTGCTCTGTGATGCACGAAGCTCTCCACAA CCATTACACCAGAAGTCCCTCAGCCTCAGC CCGGGGAAG
	SEQ ID NO:51	Легкая цепь	DIQMTQSPSSLASVGDRTITCKASQDVGTA VAWYQQKPGKVPKLLIWASTRHTGVPSRFS GSGSGTDFLTITSLQPEDVATYYCQQYSTYPI TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS

			QESVTEQDSKDYSLSSTLTLISKADYKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	SEQ ID NO:52	ДНК, кодирую щая легкую цепь	GACATCCAAATGACCCAGAGCCCTTCGAGC CTGTCAGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACC ATTACTTGCAAAGCCAGCCAGGACGTGGGA ACTGCAGTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCA GGAAAGGTCCCCAAGCTCCTGATCTACTGG GCTTCCACCCGGCACACTGGCGTGCCGTCAA GGTTTTTCGGGATCGGGTTCCGGGACTGATTT CACCTGACCATTTCCTCCCTCCAACCCGAG GATGTGGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACT CCACCTACCCGATCACATTCGGACAGGGCA CCAAGCTCGAAATCAAGCGTACGGTGGCCG CTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGA CGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGT GGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGG GAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC GCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGC GTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACC TACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTAC GCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCC AGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGC GAGTGC
NY920	SEQ ID NO:63	Тяжелая цепь	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSF AMSWVRQAPGKGLEWVSAISGFGGSTYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARQFWEDQPFYFDYWGGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE

			PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
	SEQ ID NO:75	ДНК, кодирую щая тяжелую цепь	GAGGTCCAATTGCTGGAATCTGGCGGAGGA CTGGTTCAGCCTGGTGGCTCTCTGAGACTGT CTTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAG CTTTGCCATGTCCTGGGTTCGACAGGCCCT GGAAAAGGACTCGAGTGGGTGTCCGCTATC TCTGGCTTTGGCGGCAGCACATATTACGCCG ATAGCGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCC GGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGC AGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACAG CCGTGTATTACTGCGCGCGTCAGTTCTGGGA AGATCAGCCCTTCTACTTCGACTACTGGGGC CAGGGCACACTGGTCACAGTTAGCTCAGCT AGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCCCTG GCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGC ACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGAC TACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGA ACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACA CCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCT GTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCC CAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGA GCTGCGACAAGACCCACACATGCCCCCCT GCCCCGGCGCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCT CCGTGTTCTGTTCCTTCCCCCAAGCCCAAGGA CACCTGATGATCAGCAGGACCCCCGAGGT GACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA GGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGAC CAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCAC CTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTG

			CACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCA GCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCC AAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTAC ACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTG AAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAAC AACTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGAC AGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAG CTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAG GGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCAC GAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG AGCCTGAGCTTAAGCCCCGGCAAG
	SEQ ID NO:25	Легкая цепь	DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRASQSISSYL NWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	SEQ ID NO:26	ДНК, кодирую щая легкую цепь	GATATTTCAGATGACCCAGTCCCCGTCGTCGC TGAGCGCCAGCGTGGGAGACAGAGTGACCA TTACCTGTCGGGCCAGCCAGTCGATCTCCTC CTACCTTAACTGGTATCAGCAGAAGCCAGG AAAGGCACCGAAACTGCTGATCTACGCCGC GTCCTCCTTGCAATCCGGAGTGCCCTCAAGG TTCTCCGGGTCGGGTTCTGGCACTGACTTTA CCCTGACCATCAGCAGCCTCCAGCCCGAGG ACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTCATA CTCCACCCCTCTGACATTGGCCAAGGGACC AAGGTCGAAATCAAGCGTACGGTGGCCGCT CCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGACG AGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGG TGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGA

			GGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGC CCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGT CACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTA CAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAA GGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTACGC CTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAG CCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGA GTGC
NY938	SEQ ID NO:65	Тяжелая цепь	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTE YTMHWVRQAPGQGLEWMGGINPDTGDTSYN QKFTGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDYAV YYCARAQFWTTPRFAYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQK SLSLSPGK
	SEQ ID NO:77	ДНК, кодирую щая тяжелую цепь	CAGGTCCAATTGGTGCAGTCTGGCGCCGAA GTGAAGAAACCAGGCGCCAGCGTGAAGGTG TCCTGTAAAGCCAGCGGCTACACCTTTACCG AGTACACCATGCACTGGGTCCGACAGGCTC CAGGACAAGGACTCGAGTGGATGGGCGGCA TCAATCCTGATACCGGCGACACCAGCTACA ACCAGAAGTTCACAGGCAGAGCCACACTGA CCGTGGACAAGAGCACAAGCACCGCCTACA TGGAAGTGAAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACA CCGCCGTGTATTATTGCGCGCGTGGCCAGTT TTGGACCACACCTAGATTTGCCTACTGGGGC CAGGGCACCTGGTCACAGTTAGCTCAGCT

			AGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTG GCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGC ACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGAC TACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGA ACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACA CCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCT GTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACAGTGCC CAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGA GCTGCGACAAGACCCACACATGCCCCCCT GCCCCGGCGCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCT CCGTGTTCTGTTCCTGTTCCCCCAGCCCAAGGA CACCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGT GACCTGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGA GGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGAC CAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCAC CTACAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTG CACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCA GCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCC AAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTAC ACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTG AAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAAC AACTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGAC AGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAG CTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAG GGCAACGTGTTCACTGCAGCGTGATGCAC GAGGCCCTGCACAACCACTACCCAGAAG AGCCTGAGCTTAAGCCCCGGCAAG
	SEQ ID NO:51	Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCKASQDVGTA VAWYQQKPGKVPKLLIYWASTRHTGVPSRFS

			GSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQYSTYPI TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSSTLSSTLTLISKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	SEQ ID NO:52	ДНК, кодирую щая легкую цепь	GACATCCAAATGACCCAGAGCCCTTCGAGC CTGTCAGCCTCCGTGGGCGACAGAGTGACC ATTACTTGCAAAGCCAGCCAGGACGTGGGA ACTGCAGTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCA GGAAAGGTCCCCAAGCTCCTGATCTACTGG GCTTCCACCCGGCACACTGGCGTGCCGTCAA GGTTTTTCGGGATCGGGTTCCGGGACTGATTT CACCCTGACCATTTCCTCCCTCCAACCCGAG GATGTGGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACT CCACCTACCCGATCACATTCGGACAGGGCA CCAAGCTCGAAATCAAGCGTACGGTGGCCG CTCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCCCCCAGCGA CGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGT GGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGG GAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAAC GCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGC GTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACC TACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGC AAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTGTAC GCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCC AGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGC GAGTGC

[00103] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в данном документе, могут содержать любой набор переменных доменов тяжелой и легкой цепей, перечисленных в таблицах выше, или набор из шести CDR из любого набора переменных доменов тяжелой и легкой цепей, перечисленных в таблицах выше. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в данном документе, могут содержать аминокислотные последовательности, которые являются консервативно модифицированными и/или гомологичными последовательностям, перечисленным в таблицах выше, при условии, что антитело сохраняет способность связываться с его

раковым антигеном-мишенью (например, со значением KD, составляющим менее 1×10^{-8} M) и сохраняет одно или несколько функциональных свойств антител, раскрытых в данном документе (например, способность к интернализации, связыванию с антигеном-мишенью, например, антигеном, экспрессированным на опухолевой или другой раковой клетке, и т. д.).

[00104] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в данном документе, дополнительно содержат константные домены тяжелой и легкой цепей человека или их фрагменты. Например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент конъюгатов антитела и лекарственного средства (ADC), как описано в данном документе, могут содержать константный домен тяжелой цепи IgG человека (например, IgG1) и константный домен легкой каппа- или лямбда-цепи человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент ADC, как описывается в данном документе, содержит константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина G подтипа 1 (IgG1) человека с константным доменом легкой каппа-цепи Ig человека.

[00105] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD48 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи согласно следующему: CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), состоящая из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), состоящая из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), состоящая из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 3; CDR1 легкой цепи (LCDR1), состоящая из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 16, CDR2 легкой цепи (LCDR2), состоящая из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 17, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), состоящая из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 18.

[00106] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD48 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи согласно следующему: CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), состоящая из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 4, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), состоящая из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 2, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), состоящая из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 3; CDR1 легкой цепи (LCDR1), состоящая из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 16, CDR2 легкой цепи (LCDR2), состоящая из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 17, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), состоящая из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 18.

[00107] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD48 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи согласно следующему: CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), состоящая из аминокислотной

изложенной под SEQ ID NO: 44.

[00111] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD48 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи согласно следующему: CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), состоящая из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 31, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), состоящая из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 32, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), состоящая из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 29; CDR1 легкой цепи (LCDR1), состоящая из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 45, CDR2 легкой цепи (LCDR2), состоящая из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 46, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), состоящая из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 47.

[00112] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD48 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи согласно следующему: CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), состоящая из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 33, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), состоящая из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 34, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), состоящая из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 35; CDR1 легкой цепи (LCDR1), состоящая из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 48, CDR2 легкой цепи (LCDR2), состоящая из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 46, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), состоящая из аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 44.

[00113] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD48 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD48 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 10 и аминокислотную последовательность переменной области легкой цепи под SEQ ID NO: 23 или последовательности, которые на по меньшей мере 95% идентичны раскрытым последовательностям. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD48 или его антигенсвязывающий фрагмент имеют аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи, которая на по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 10 и/или аминокислотную последовательность переменной области легкой цепи, которая на по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 23.

[00114] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD48 или его

антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 36, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 49. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD48 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 36 и аминокислотную последовательность переменной области легкой цепи под SEQ ID NO: 49 или последовательности, которые на по меньшей мере 95% идентичны раскрытым последовательностям. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD48 или его антигенсвязывающий фрагмент имеют аминокислотную последовательность переменной области тяжелой цепи, которая на по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 36 и/или аминокислотную последовательность переменной области легкой цепи, которая на по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 49.

[00115] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD48 содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 12 или последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности под SEQ ID NO: 12, и аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 25 или последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности под SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD48 содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 12 и аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 25 или последовательности, которые на по меньшей мере 95% идентичны раскрытым последовательностям. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD48 имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи, которая на по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 12, и аминокислотную последовательность легкой цепи, которая на по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 25.

[00116] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD48 содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 14 или последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности под SEQ ID NO: 14, и аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 25 или последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности под SEQ ID NO: 25. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD48 содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 14 и аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 25 или последовательности, которые на по меньшей мере 95% идентичны раскрытым последовательностям. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD48 имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи,

которая на по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 14, и аминокислотную последовательность легкой цепи, которая на по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 25.

[00117] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD48 содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 38 или последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности под SEQ ID NO: 38, и аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 51 или последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности под SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD48 содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 38 и аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 51 или последовательности, которые на по меньшей мере 95% идентичны раскрытым последовательностям. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD48 имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи, которая на по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 38, и аминокислотную последовательность легкой цепи, которая на по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 51.

[00118] В некоторых вариантах осуществления антитело к CD48 содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 40 или последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности под SEQ ID NO: 40, и аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 51 или последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности под SEQ ID NO: 51. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD48 содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 40 и аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 51 или последовательности, которые на по меньшей мере 95% идентичны раскрытым последовательностям. В некоторых вариантах осуществления антитело к CD48 имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи, которая на по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 40, и аминокислотную последовательность легкой цепи, которая на по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентична последовательности под SEQ ID NO: 51.

[00119] Об остатках в двух или более полипептидах говорят, что они "соответствуют", если остатки занимают аналогичное положение в полипептидных структурах. Аналогичные положения в двух или более полипептидах могут быть определены путем выравнивания последовательностей полипептидов на основе последовательности аминокислот или структурных сходств. Специалистам в данной

области техники понятно, что для получения удовлетворительного выравнивания может потребоваться введение гэпов в любую из последовательностей.

[00120] В некоторых вариантах осуществления аминокислотные замены представляют собой замены отдельных остатков. Вставки обычно составляют порядка от приблизительно 1 до приблизительно 20 аминокислотных остатков, хотя могут допускаться и значительно большие вставки при условии сохранения биологической функции (например, связывания с целевым антигеном). Делеции обычно находятся в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 20 аминокислотных остатков, хотя в некоторых случаях делеции могут быть гораздо больше. Замены, делеции, вставки или любую их комбинацию можно применять для получения конечного производного или варианта. В целом эти изменения вносят в отношении небольшого количества аминокислот, чтобы свести к минимуму изменение молекулы, в частности, иммуногенности и специфичности антигенсвязывающего белка. Однако при определенных обстоятельствах могут быть допущены и более значительные изменения. Консервативные замены могут быть выполнены в соответствии со следующей схемой, представленной в таблице 4.

Таблица 4. Аминокислотные замены

Исходный остаток	Иллюстративные замены
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, HIs
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

[00121] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в данном документе, включают в свой объем любые антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с целевым антигеном (например, CD48 человека) на раковой клетке. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут связываться с целевым антигеном (например, CD48 человека) с константой диссоциации (KD), составляющей ≤ 1 мМ, ≤ 100 нМ или ≤ 10 нМ, или любым промежуточным значением, измеренным, например, с помощью анализа BIAcore®. В некоторых вариантах осуществления KD составляет от 1 пМ до 500 пМ. В некоторых вариантах осуществления KD составляет от 500 пМ до 1 мМ, от 1 мМ до 100 нМ или от 100 мМ до 10 нМ. В некоторых вариантах осуществления KD составляет от 500 нМ до 10 пМ.

[00122] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой четырехцепочечное антитело (также называемое иммуноглобулином или полноразмерным или интактным антителом), содержащее две тяжелые цепи и две легкие цепи. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент иммуноглобулина, который сохраняет способность связывать целевой раковый антиген (например, CD48) и/или обеспечивать по меньшей мере одну функцию иммуноглобулина.

[00123] В одном варианте осуществления молекула антитела представляет собой полноразмерное антитело или его фрагмент (например, Fab, Fab', F(ab')₂, dAb, Fd, Fv, соединенный дисульфидной связью Fv (sdFv) или одноцепочечный фрагмент Fv (scFv)). В других вариантах осуществления молекула антитела представляет собой полуантитело, антитело с одним плечом, однодоменное антитело, макситело, минитело, нанотело, интратело или диатело. В еще одних вариантах осуществления молекула антитела имеет константную область тяжелой цепи (Fc), выбранную, например, из константных областей тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE; в частности, выбранную, например, из константных областей тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, более конкретно, константной области тяжелой цепи IgG1 или IgG4 (например, IgG1 или IgG4 человека). В одном варианте осуществления константная область тяжелой цепи получена из IgG1 человека или IgG4 человека. В одном варианте осуществления константная область является измененной, например, подвергнутой мутации для модификации свойств молекулы антитела (например, увеличения или уменьшения одного или нескольких из уровня связывания с Fc-рецептором, уровня гликозилирования антител, числа цистеиновых остатков, функции эффекторных клеток или функции комплемента).

[00124] В определенных вариантах осуществления молекула антитела находится в форме биспецифической или полиспецифической молекулы антитела. В одном из вариантов осуществления молекула биспецифического антитела предусматривает первую специфичность связывания с CD48 человека и вторую специфичность связывания с CD3. В одном варианте осуществления антитело к CD48 представляет собой антитело в формате

биспецифического активатора, привлекающего Т-клетки (BiTE).

[00125] В одном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (например, фрагмент scFv) находятся в форме Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR-Т или CART).

[00126] Антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты по настоящему изобретению также можно конъюгировать с радиоактивным изотопом для создания цитотоксических радиофармацевтических препаратов, называемых радиоиммуноконъюгаты. Примеры радиоактивных изотопов, которые можно конъюгировать с антителами для применения в диагностических или терапевтических целях, включают без ограничения йод-131, индий-111, иттрий-90 и лютеций-177. Способы получения радиоиммуноконъюгатов определены из уровня техники. Примеры коммерчески доступных радиоиммуноконъюгатов включают Zevalin™ (DEC Pharmaceuticals) и Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), и аналогичные способы можно применять для получения радиоиммуноконъюгатов с применением антител, раскрытых в данном документе. В определенных вариантах осуществления макроциклический хелатор представляет собой 1,4,7,10-тетраазациклододекан-N,N',N'',N'''-тетрауксусную кислоту (DOTA), которая может быть присоединена к антителу через линкерную молекулу. Такие линкерные молекулы широко известны из уровня техники и описаны в Denardo *et al.*, (1998) Clin Cancer Res. 4(10):2483-90; Peterson *et al.*, (1999) Bioconjug. Chem. 10(4):553-7, и Zimmerman *et al.*, (1999) Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50, каждый из которых включен посредством ссылки во всей своей полноте.

[00127] Антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты по настоящему изобретению также можно конъюгировать с гетерологичным белком или полипептидом (или их фрагментом, предпочтительно с полипептидом из по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 или по меньшей мере 100 аминокислот) для создания слитых белков. В частности, в настоящем изобретении предусмотрены слитые белки, содержащие фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент), описанный в данном документе (например, Fab-фрагмент, Fd-фрагмент, Fv-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab)₂-фрагмент, домен VH, CDR VH, домен VL или CDR VL), и гетерологичный белок, полипептид или пептид.

[00128] Дополнительные слитые белки можно получать посредством методик перетасовки генов, перетасовки мотивов, перетасовки экзонов и/или перетасовки кодонов (в совокупности называемых "перетасовкой ДНК"). Перетасовку ДНК можно использовать для изменения активности антител по настоящему изобретению или их фрагментов (например, получения антител или их фрагментов с более высокими уровнями аффинности и более низкими значениями скорости диссоциации). См. в общем патенты США №№ 5605793, 5811238, 5830721, 5834252 и 5837458; Patten *et al.*, (1997) Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33; Narayana, (1998) Trends Biotechnol. 16(2):76-82; Hansson *et al.*, (1999) J. Mol. Biol.

287:265-76 и Lorenzo and Blasco, (1998) *Biotechniques* 24(2):308-313 (каждый из этих патентов и публикаций настоящим включен посредством ссылки во всей своей полноте). Антитела или их фрагменты или кодируемые антитела или их фрагменты можно изменять путем воздействия на них случайного мутагенеза посредством ПЦР с внесением ошибок, случайной вставки нуклеотидов или других способов до проведения рекомбинации. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его фрагмент, которые специфически связываются с антигеном, может быть подвергнут рекомбинации с одним или несколькими компонентами, мотивами, отрезками, частями, доменами, фрагментами и т. д. одной или нескольких гетерологичных молекул.

[00129] Более того, антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с маркерными последовательностями, такими как пептид, для облегчения очистки. В предпочтительных вариантах осуществления маркерная аминокислотная последовательность представляет собой гексагистидиновый пептид (SEQ ID NO: 84), такой как, среди прочего, метка, представленная в векторе pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Чатсворт, Калифорния, 91311, США), при этом многие из них являются коммерчески доступными. Как описано в Gentz *et al.*, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:821-824, например, гексагистидин (SEQ ID NO: 84) обеспечивает удобную очистку слитого белка. Другие пептидные метки, применимые для очистки, включают без ограничения гемагглютининовую ("НА") метку, которая соответствует эпитопу, полученному из белка гемагглютинаина вируса гриппа (Wilson *et al.*, (1984) *Cell* 37:767), и метку "FLAG" (A. Einhauer *et al.*, *J. Biochem. Biophys. Methods* 49: 455-465, 2001). Согласно настоящему изобретению для повышения эффективности антител или антигенсвязывающих фрагментов их также можно конъюгировать с проникающими в опухоль пептидами.

[00130] В других вариантах осуществления антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты по настоящему изобретению конъюгируют с диагностическим средством или средством, обеспечивающим выявление. Такие иммуноконъюгаты могут быть применимы для контроля или прогнозирования возникновения, развития, прогрессирования и/или степени тяжести заболевания или нарушения в рамках процедуры клинического тестирования, такой как определение эффективности конкретной терапии. Такую диагностику и обнаружение можно осуществлять путем сопряжения антитела с детектируемыми веществами, в том числе без ограничения с различными ферментами, такими как без ограничения пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или ацетилхолинэстераза; простетическими группами, такими как без ограничения стрептавидин/биотин и авидин/биотин; флуоресцентными материалами, такими как без ограничения Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 405, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 500, Alexa Fluor 514, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 610, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700, Alexa Fluor 750, умбеллиферон, флуоресцеин, флуоресцеина изотиоцианат, родамин,

дихлортриазиниламинфлуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; люминесцентными материалами, такими как без ограничения люминол; биолюминесцентными материалами, такими как без ограничения люцифераза, люциферин и экворин; радиоактивными материалами, такими как без ограничения йод (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I и ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In и ^{111}In), технеций (^{99}Tc), таллий (^{201}Ti), галлий (^{68}Ga , ^{67}Ga), палладий (^{103}Pd), молибден (^{99}Mo), ксенон (^{133}Xe), фтор (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{64}Cu , ^{113}Sn и ^{117}Sn , и позитронно-активными металлами с применением различных видов позитронной эмиссионной томографии, и нерадиоактивными ионами парамагнитных металлов.

[00131] Антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты по настоящему изобретению также могут быть прикреплены к твердым подложкам, которые особенно применимы для иммунологических анализов или очистки целевого антигена. Такие твердые подложки включают без ограничения стекло, целлюлозу, полиакриламид, нейлон, полистирол, поливинилхлорид или полипропилен.

[00132] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой интернализирующее антитело или его интернализирующий антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления интернализирующее антитело или его интернализирующий антигенсвязывающий фрагмент связывается с целевым раковым антигеном (например, CD48), экспрессированным на поверхности клетки, и проникает в клетку при связывании. В некоторых вариантах осуществления фрагмент ADC, представляющий собой лекарственное средство, высвобождается из антитела или антигенсвязывающего фрагмента ADC после того, как ADC попадает в клетку, экспрессирующую целевой раковый антиген, и присутствует в ней (т. е. после интернализации ADC), например, путем расщепления, разрушения антитела или антигенсвязывающего фрагмента или с помощью любого другого подходящего механизма высвобождения. В некоторых вариантах осуществления, когда в ADC применяются варианты последовательностей антител, варианты как правило проявляют аналогичную качественную биологическую активность и вызывают аналогичный иммунный ответ, хотя при необходимости варианты также могут быть выбраны для модификации характеристик антигенсвязывающих белков. Альтернативно, вариант может быть сконструирован таким образом, что биологическая активность антигенсвязывающего белка изменяется. Например, сайты гликозилирования могут быть подвергнуты изменениям или удалены.

[00133] Антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты по настоящему изобретению могут включать модифицированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые дополнительно содержат модификации каркасных остатков в пределах VH и/или VL, например, для улучшения свойств антитела. В некоторых вариантах осуществления модификации каркасной области осуществляются для уменьшения иммуногенности

антитела. Например, один из подходов заключается в осуществлении "обратной мутации" одного или нескольких каркасных остатков с восстановлением соответствующей последовательности зародышевого типа. Более конкретно, антитело, которое подверглось соматической мутации, может содержать остатки каркасной области, которые отличаются от остатков в последовательности зародышевого типа, из которой получено антитело. Такие остатки можно идентифицировать посредством сравнения последовательностей каркасной области антитела с последовательностями зародышевого типа, из которых получено антитело. Для возвращения последовательностей каркасных областей к их конфигурации зародышевого типа можно осуществлять "обратные" соматические мутации с восстановлением последовательности зародышевого типа посредством, например, сайт-направленного мутагенеза. Подразумевается, что такие подвергнутые "обратной мутации" антитела также охватываются в данном документе.

[00134] Другой тип модификации каркасной области предусматривает мутацию одного или нескольких остатков в пределах каркасной области или даже в пределах одной или нескольких областей CDR для удаления Т-клеточных эпитопов со снижением таким образом потенциальной иммуногенности антитела. Данный подход также называется "деиммунизацией" и более подробно описан в публикации заявки на патент США № 20030153043 авторства Carr *et al.*

[00135] В качестве дополнения или альтернативы модификациям, осуществляемым в пределах каркасных областей или областей CDR, антитела по настоящему изобретению можно конструировать таким образом, чтобы они включали модификации в пределах Fc-области, как правило, для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как период полувыведения в сыворотке крови, фиксация комплемента, связывание с Fc-рецептором и/или антигензависимая клеточная цитотоксичность (ADCC). Кроме того, антитело по настоящему изобретению может быть модифицировано химическим путем (например, к антителу можно присоединять один или несколько химических фрагментов), или оно может быть модифицировано для изменения характера его гликозилирования, чтобы снова изменить одно или несколько функциональных свойств антитела. Каждый из этих вариантов осуществления более подробно описан ниже.

[00136] В одном варианте осуществления шарнирную область СН1 модифицируют таким образом, что изменяется число цистеиновых остатков в шарнирной области, например, увеличивается или уменьшается. Этот подход дополнительно описан в патенте США № 5677425 авторства Bodmer *et al.* Число цистеиновых остатков в шарнирной области СН1 изменяют, чтобы, например, облегчить сборку легкой и тяжелой цепей или увеличить или уменьшить стабильность антитела.

[00137] В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент антитела, раскрытые в данном документе, содержат модифицированные или введенные путем конструирования аминокислотные остатки, например один или несколько цистеиновых остатков, в качестве сайтов для конъюгации с фрагментом, представляющим собой лекарственное средство (Junutula JR, *et al.*, Nat Biotechnol 2008, 26:925-932). В одном

варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрены модифицированные антитело или фрагмент антитела, содержащие замену одной или нескольких аминокислот на цистеин в положениях, описанных в данном документе. Сайты для цистеиновых замен расположены в константных областях антитела или фрагмента антитела и, таким образом, применимы к множеству антител или фрагментов антител, и сайты выбирают для обеспечения стабильных и однородных конъюгатов. Модифицированные антитело или фрагмент могут иметь одну, две или более цистеиновых замен, и такие замены могут применяться в комбинации с другими способами модификации и конъюгации, описанными в данном документе. Способы для вставки цистеина в специфические местоположения в антителе известны из уровня техники, см., например, Lyons *et al.*, (1990) Protein Eng., 3:703-708, WO 2011/005481, WO 2014/124316, WO 2015/138615. В определенных вариантах осуществления модифицированное антитело содержит замену одной или нескольких аминокислот на цистеин в своей константной области в положении, выбранном из положений 117, 119, 121, 124, 139, 152, 153, 155, 157, 164, 169, 171, 174, 189, 191, 195, 197, 205, 207, 246, 258, 269, 274, 286, 288, 290, 292, 293, 320, 322, 326, 333, 334, 335, 337, 344, 355, 360, 375, 382, 390, 392, 398, 400 и 422 тяжелой цепи антитела, и где нумерация положений соответствует системе EU. В некоторых вариантах осуществления модифицированные антитело или фрагмент антитела содержат замену одной или нескольких аминокислот на цистеин в своей константной области в положении, выбранном из положений 107, 108, 109, 114, 129, 142, 143, 145, 152, 154, 156, 159, 161, 165, 168, 169, 170, 182, 183, 197, 199, и 203 легкой цепи антитела или фрагмента антитела, где нумерация положений соответствует системе EU, и при этом легкая цепь представляет собой человеческую легкую каппа-цепь. В определенных вариантах осуществления модифицированные антитело или фрагмент данного антитела содержат комбинацию из замен двух или более аминокислот на цистеин в своих константных областях, где комбинации предусматривают замены в положениях 375 тяжелой цепи антитела, положении 152 тяжелой цепи антитела, положении 360 тяжелой цепи антитела или положении 107 легкой цепи антитела, и при этом нумерация положений соответствует системе EU. В определенных вариантах осуществления модифицированные антитело или фрагмент данного антитела содержат замену одной аминокислоты на цистеин в своих константных областях, где замена находится в положении 375 тяжелой цепи антитела, положении 152 тяжелой цепи антитела, положении 360 тяжелой цепи антитела, положении 107 легкой цепи антитела, положении 165 легкой цепи антитела или положении 159 легкой цепи антитела, и где нумерация положений соответствует системе EU, и при этом легкая цепь представляет собой каппа-цепь. В конкретных вариантах осуществления модифицированные антитело или фрагмент данного антитела содержат комбинацию из замен двух аминокислот на цистеин в своих константных областях, где комбинации предусматривают замены в положениях 375 тяжелой цепи антитела и положении 152 тяжелой цепи антитела, где нумерация положений соответствует системе EU. В конкретных вариантах осуществления модифицированные антитело или фрагмент данного антитела

содержат замену одной аминокислоты на цистеин в положении 360 тяжелой цепи антитела, где нумерация положений соответствует системе EU. В других конкретных вариантах осуществления модифицированные антитело или фрагмент данного антитела содержат замену одной аминокислоты на цистеин в положении 107 легкой цепи антитела, и где нумерация положений соответствует системе EU, и при этом легкая цепь представляет собой каппа-цепь.

[00138] В дополнительных вариантах осуществления антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающий фрагмент), применимые в иммуноконъюгатах по настоящему изобретению, включают модифицированные или сконструированные антитела, такие как антитело, модифицированное для введения одной или нескольких других реакционноспособных аминокислот (отличных от цистеина), в том числе Pcl, пирролизина, пептидных меток (таких как метки S6, A1 и ybbR) и неприродных аминокислот, вместо по меньшей мере одной аминокислоты из нативной последовательности, обеспечивая за счет этого реакционноспособный сайт на антителе или антигенсвязывающем фрагменте для конъюгации с фрагментом, представляющим собой лекарственное средство, или фрагментом, представляющим собой линкер-лекарственное средство, с комплементарной реакционной группой. Например, антитела или фрагменты антител могут быть модифицированы с введением Pcl или пирролизина (W. Ou, *et al.*, (2011) PNAS 108 (26), 10437-10442; WO 2014124258) или неприродных аминокислот (J.Y. Axup, *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 109 (2012), pp. 16101-16106; обзор см. в C.C. Liu and P.G. Schultz (2010) Annu Rev Biochem 79, 413-444; C.H. Kim, *et al.*, (2013) Curr Opin Chem Biol. 17, 412-419) в качестве сайтов для конъюгирования с лекарственным средством. Аналогичным образом в антитело могут быть введены пептидные метки для способов ферментативной конъюгации (Strop P., *et al.*, Chem Biol. 2013, 20(2):161-7; Rabuka D., Curr Opin Chem Biol. 2010 Dec;14(6):790-6; Rabuka D, *et al.*, Nat Protoc. 2012, 7(6):1052-67). Одним другим примером является применение 4'-фосфопантетеинилтрансфераз (PPTазы) для конъюгации аналогов кофермента A (WO 2013184514) и (Grünewald *et al.*, (2015) Bioconjugate Chem. 26 (12), 2554-62). Способы конъюгирования таких модифицированных или сконструированных антител с полезными нагрузками или комбинациями линкер-полезная нагрузка известны из уровня техники.

[00139] В другом варианте осуществления для уменьшения биологического периода полувыведения антитела подвергается мутации Fc-шарнирная область антитела. Более конкретно, одна или несколько аминокислотных мутаций вводятся в область контакта между доменами CH2-CH3 фрагмента Fc-шарнирная область таким образом, что антитело характеризуется нарушенным связыванием с белком A *Staphylococcy* (SpA) по сравнению со связыванием нативного домена Fc-шарнирная область с SpA. Данный подход более подробно описан в патенте США № 6165745 авторства Ward *et al.*

[00140] В еще одних вариантах осуществления Fc-область изменяют посредством замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток для изменения эффекторных функций антитела. Например, одну или несколько

аминокислот можно заменить другим аминокислотным остатком, чтобы антитело характеризовалось измененной аффинностью в отношении эффекторного лиганда, но сохраняло способность к связыванию с антигеном исходного антитела. Эффекторный лиганд, аффинность в отношении которого изменяют, может представлять собой, например, Fc-рецептор или компонент C1 системы комплемента. Данный подход описан, например, в патентах США №№ 5624821 и 5648260, оба авторства Winter *et al.*

[00141] В другом варианте осуществления одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков, можно заменить другим аминокислотным остатком таким образом, чтобы антитело характеризовалось измененным связыванием с C1q и/или сниженной или устраненной комплементзависимой цитотоксичностью (CDC). Данный подход описан, например, в патенте США № 6194551 авторства Idusogie *et al.*

[00142] В другом варианте осуществления один или несколько аминокислотных остатков изменяют с тем, чтобы таким образом изменить способность антитела к фиксации комплемента. Данный подход описан, например, в публикации согласно PCT WO 94/29351 авторства Bodmer *et al.* Аллотипические аминокислотные остатки включены без ограничения в константную область тяжелой цепи подклассов IgG1, IgG2 и IgG3, а также константную область легкой цепи изотипа каппа-цепи, как описано в Jefferis *et al.*, MAbs. 1:332-338 (2009).

[00143] В некоторых вариантах осуществления антитела содержат мутации, которые опосредуют сниженную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) или комплементзависимую цитотоксичность (CDC) или не опосредуют ее. В некоторых вариантах осуществления эти мутации известны как мутации, обеспечивающие сайленсинг Fc, мутации сайленсинга Fc или мутации типа Fc-сайленсинг. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки L234 и L235 в константной области IgG1 заменены на A234 и A235 (также известно как "LALA"). В некоторых вариантах осуществления аминокислотный остаток N297 в константной области IgG1 заменен на A297 (также известно как "N297A"). В некоторых вариантах осуществления аминокислотные остатки D265 и P329 в константной области IgG1 заменены на A265 и A329 (также известно как "DAPA"). Также можно применять другие мутации, обеспечивающие сайленсинг Fc антитела. В некоторых вариантах осуществления мутации, обеспечивающие сайленсинг Fc, применяют в комбинации, например, D265A, N297A и P329A (также известной как "DANAPA").

[00144] В другом варианте осуществления один или несколько аминокислотных остатков изменяют с тем, чтобы таким образом изменить способность антитела к фиксации комплемента. Данный подход описан, например, в публикации согласно PCT WO 94/29351 авторства Bodmer *et al.* В конкретном варианте осуществления одна или несколько аминокислот антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению заменены на один или несколько аллотипических аминокислотных остатков. Аллотипические аминокислотные остатки также включают без ограничения константную область тяжелой цепи подклассов IgG1, IgG2 и IgG3, а также константную область легкой

цепи изотипа каппа, как это описано в Jefferis *et al.*, MAbs. 1:332-338 (2009).

[00145] В еще одном варианте осуществления модифицируется характер гликозилирования антитела. Например, можно получать агликозилированное антитело (т. е. антитело, у которого отсутствует гликозилирование). Характер гликозилирования можно изменять, например, для увеличения аффинности антитела в отношении "антигена". Такие модификации углеводов можно осуществлять, например, посредством изменения одного или нескольких сайтов гликозилирования в пределах последовательности антитела. Например, можно осуществить одну или несколько аминокислотных замен, которые приводят к устранению одного или нескольких сайтов гликозилирования в каркасной области варибельной области, вследствие чего в данном сайте устраняется гликозилирование. Такое агликозилирование может увеличивать аффинность антитела в отношении антигена. Такой подход описан, например, в патентах США №№ 5714350 и 6350861 авторства Co *et al.*

[00146] В другом варианте осуществления антитело модифицируют для увеличения его биологического периода полувыведения. Возможны различные подходы. Например, можно вводить одну или несколько из следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, как описано в патенте США № 6277375 авторства Ward. В качестве альтернативы для увеличения биологического периода полувыведения антитело можно изменять в пределах области CH1 или CL таким образом, чтобы оно содержало эпитоп для связывания с рецептором реутилизации, взятый из двух петель домена CH2 из Fc-области IgG, как описано в патентах США №№ 5869046 и 6121022 авторства Presta *et al.*

Антитела, которые связываются с одним и тем же эпитопом

[00147] В настоящем изобретении предусмотрены антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент), которые специфически связываются с эпитопом во внеклеточном домене CD48 человека. В некоторых аспектах антитело или фрагмент антитела могут связываться с эпитопом в пределах аминокислот 29-130 CD48 человека. В некоторых вариантах осуществления эпитоп находится в пределах аминокислот 54-64 или аминокислот 105-121 CD48 человека (SEQ ID NO: 53). В некоторых вариантах осуществления эпитоп содержит одну или несколько из аминокислот 54, 58, 60, 61, 62, 64, 105, 107, 119, 111, 114, 115, 117, 119 и 121 аминокислотной последовательности, изложенной под SEQ ID NO: 53.

[00148] В настоящем изобретении также предусмотрены антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающий фрагмент), которые связываются с тем же эпитопом, что и антитело к CD48 или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент), описанные в таблице 1, таблице 2 и таблице 3. Следовательно, дополнительные антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающий фрагмент) могут быть идентифицированы на основе их способности к перекрестной конкуренции (например, к конкурентному ингибированию связывания статистически значимым образом) с другим антителом или фрагментом антитела в анализах связывания CD48. Высокопроизводительный способ "сортировки" антител на основании их перекрестной

конкуренции описан, например, в международной патентной публикации № WO 2003/48731. Способность тестируемых антитела или фрагмента антитела ингибировать связывание антитела или фрагмента антитела, раскрытых в данном документе, с белком CD48 (например, CD48 человека) демонстрирует, что тестируемые антитело или фрагмент антитела могут конкурировать с данными антителом или фрагментом антитела за связывании с CD48; при этом, согласно неограничивающей теории, такие антитело или фрагмент антитела могут связываться с одним и тем же, перекрывающимся или родственным (например, структурно подобным или пространственно близким) эпитопом на белке CD48, что и антитело или фрагмент антитела, с которыми они конкурируют. В определенном аспекте антитело или фрагмент антитела, которые связываются с тем же эпитопом на CD48, что и антитело или фрагмент антитела, раскрытые в данном документе, представляют собой человеческие или гуманизированные антитело или фрагмент антитела. Такие человеческие или гуманизированные антитело или фрагмент антитела могут быть получены и выделены, как описано в данном документе.

Получение антител или фрагментов антител к CD48

[00149] Антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающий фрагмент) к CD48 можно получать с помощью любых средств, известных из уровня техники, в том числе без ограничения рекомбинантной экспрессии, химического синтеза или ферментативного расщепления полноразмерных моноклональных антител, которые могут быть получены например, с помощью гибридомы или рекомбинантного продуцирования. Рекомбинантная экспрессия может происходить в любых подходящих клетках-хозяевах, известных из уровня техники, например, клетках-хозяевах, представляющих собой клетки млекопитающих, бактериальных клетках-хозяевах, дрожжевых клетках-хозяевах, клетках-хозяевах, представляющих собой клетки насекомых, или выполняться в бесклеточной системе (например, платформе Sutro's Xpress CFTTM по адресу <http://www.sutro.bio.com/technology/>).

[00150] В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены полинуклеотиды, кодирующие антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент), описанные в данном документе, например, полинуклеотиды, кодирующие переменные области или сегменты тяжелой или легкой цепей, содержащие определяющие комплементарность области, описанные в данном документе. В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий переменные области тяжелой цепи (VH), характеризуется по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом, выбранным из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 11 и 37. В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий переменные области легкой цепи (VL), характеризуется по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом, выбранным из группы, состоящей из последовательностей под SEQ ID NO: 24 и 50.

[00151] В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий тяжелую цепь антитела, характеризуется по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом под SEQ ID NO: 13 или 15. В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий легкую цепь антитела, характеризуется по меньшей мере 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом под SEQ ID NO: 26 или 52.

[00152] Полинуклеотиды по настоящему изобретению могут кодировать только последовательность вариабельной области антитела или фрагмента антитела к CD48 (например, антигенсвязывающего фрагмента). Они также могут кодировать как вариабельную область, так и константную область антитела или фрагмента антитела (например, антигенсвязывающего фрагмента). Некоторые из полинуклеотидных последовательностей кодируют полипептид, который содержит вариабельные области как тяжелой цепи, так и легкой цепи одного из иллюстративных антитела или фрагмента антитела к CD48 (например, антигенсвязывающего фрагмента).

[00153] Полинуклеотидные последовательности можно получать посредством твердофазного синтеза ДНК *de novo* или посредством ПЦР-мутагенеза существующей последовательности (например, последовательностей, которые описаны в разделе "Примеры" ниже), кодирующей антитело к CD48 или его связывающий фрагмент. Прямой химический синтез нуклеиновых кислот можно осуществлять с помощью способов, известных из уровня техники, таких как фосфотриэфирный способ из Narang *et al.*, Meth. Enzymol. 68:90, 1979; фосфодиэфирный способ из Brown *et al.*, Meth. Enzymol. 68:109, 1979; диэтилфосфорамидитный способ из Beaucage *et al.*, Tetra. Lett., 22:1859, 1981; и способ с использованием твердой подложки из патента США № 4458066. Введение мутаций в полинуклеотидную последовательность с помощью ПЦР можно осуществлять, как описано, например, в PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, NY, 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis *et al.* (Ed.), Academic Press, San Diego, CA, 1990; Mattila *et al.*, Nucleic Acids Res. 19:967, 1991; и Eckert *et al.*, PCR Methods and Applications 1:17, 1991.

[00154] Также в настоящем изобретении предусмотрены векторы экспрессии и клетки-хозяева для получения любого из антител к CD48 или фрагментов антител (например, антигенсвязывающих фрагментов), описанных в данном документе. Для экспрессии полинуклеотидов, кодирующих антитела или фрагменты антител к CD48 (например, антигенсвязывающие фрагменты), можно использовать различные векторы экспрессии. Как вирусные, так и невирусные векторы экспрессии можно применять для получения антител в клетке-хозяине, представляющей собой клетку млекопитающего. Невирусные векторы и системы включают плазмиды, эписомные векторы, как правило, с кассетой экспрессии для экспрессии белка или РНК, а также искусственные человеческие хромосомы (см., например, Harrington *et al.*, Nat Genet. 15:345, 1997). Например, невирусные векторы, применимые для экспрессии полинуклеотидов и полипептидов, связывающих

CD48, в клетках млекопитающих (например, человеческих), включают pThioHis A, B и C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B и C (Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния), векторы MPSV и многочисленные другие векторы, известные из уровня техники для экспрессии других белков. Применимые вирусные векторы включают векторы на основе ретровирусов, аденовирусов, аденоассоциированных вирусов, вирусов герпеса, векторы на основе SV40, папилломавируса, вируса Эпштейна-Барр НВР, векторы на основе вируса коровьей оспы и вируса леса Семлики (SFV). См., Brent *et al.*, выше; Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995; и Rosenfeld *et al.*, Cell 68:143, 1992.

[00155] Выбор вектора экспрессии зависит от предполагаемых клеток-хозяев, в которых следует экспрессировать вектор. Как правило, векторы экспрессии содержат промотор и другие регуляторные последовательности (например, энхансеры), которые функционально связаны с полинуклеотидами, кодирующими антитело или фрагмент антитела к CD48 (например, антигенсвязывающий фрагмент). В некоторых аспектах индуцируемый промотор используют для предотвращения экспрессии встроенных последовательностей в условиях, отличающихся от индуцирующих. Индуцируемые промоторы включают, например, арабинозный, lacZ, металлотионеиновый промотор или промотор белка теплового шока. Культуры трансформированных организмов можно размножать в неиндуцирующих условиях без смещения популяции в направлении кодирующих последовательностей, продукты экспрессии которых лучше переносятся клетками-хозяевами. Для эффективной экспрессии антитела или фрагмента антитела к CD48 (например, антигенсвязывающего фрагмента) кроме промоторов также могут быть необходимы или требоваться другие регуляторные элементы. Такие элементы, как правило, включают кодон инициации трансляции ATG и смежный сайт связывания рибосомы или другие последовательности. Кроме того, эффективность экспрессии можно повысить за счет включения энхансеров, соответствующих применяемой клеточной системе (см., например, Scharf *et al.*, Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994; и Bittner *et al.*, Meth. Enzymol., 153:516, 1987). Например, для повышения экспрессии в клетках-хозяевах, представляющих собой клетки млекопитающих, можно применять энхансер SV40 или энхансер CMV.

[00156] В векторах экспрессии также может быть предусмотрено положение сигнальной последовательности секреции для образования слитого белка с полипептидами, кодируемыми вставленными последовательностями антитела или фрагмента антитела (например, антигенсвязывающего фрагмента) к CD48. Чаще встраиваемые последовательности антитела или фрагмента антитела (например, антигенсвязывающего фрагмента) к CD48 соединяют с сигнальными последовательностями перед включением в вектор. Векторы, подлежащие применению для получения последовательностей, кодирующих переменные домены легкой и тяжелой цепей антитела или фрагмента антитела (например, антигенсвязывающего фрагмента) к CD48, иногда также кодируют константные области или их части. Такие векторы обеспечивают возможность экспрессии переменных областей в виде слитых белков с константными областями, приводя тем самым к получению интактных антител или их фрагментов.

[00157] Клетки-хозяева, несущие и экспрессирующие цепи антитела или фрагмента антитела (например, антигенсвязывающего фрагмента) к CD48, могут быть или прокариотическими, или эукариотическими. *E. coli* является одним прокариотическим хозяином, применимым для клонирования и экспрессии полинуклеотидов по настоящему изобретению. Другие подходящие для применения хозяев, представляющих собой микроорганизмы, включают бацилл, таких как *Bacillus subtilis*, и других энтеробактерий, таких как *Salmonella*, *Serratia* и различные виды *Pseudomonas*. Для этих прокариотических хозяев также можно создать векторы экспрессии, которые, как правило, содержат последовательности для управления экспрессией, совместимые с клеткой-хозяином (например, точку начала репликации). Кроме того, будет присутствовать любое число разнообразных хорошо известных промоторов, как, например, лактозная промоторная система, триптофановая (*trp*) промоторная система, бета-лактамазная промоторная система или промоторная система из фага лямбда. Как правило, промоторы управляют экспрессией, необязательно с помощью операторной последовательности, и имеют последовательности сайта связывания рибосомы и т. п. для инициации и завершения транскрипции и трансляции. Другие микроорганизмы, такие как дрожжи, также можно использовать для экспрессии полипептидов антитела или фрагмента антитела (например, антигенсвязывающего фрагмента) к CD48. Также можно применять клетки насекомых в сочетании с бакуловирусными векторами.

[00158] В других аспектах для экспрессии и получения полипептидов антитела или фрагмента антитела (например, антигенсвязывающего фрагмента) к CD48 по настоящему изобретению применяют клетки-хозяева, представляющие собой клетки млекопитающих. Например, они могут представлять собой либо линию клеток гибридомы, экспрессирующих эндогенные гены иммуноглобулинов (например, клоны гибридомы из клеток миеломы, как описано в Примерах), либо линию клеток млекопитающих, несущих экзогенный вектор экспрессии (например, клетки миеломы SP2/0, приведенные в качестве примера ниже). Они охватывают любые нормальные мортальные или нормальные или аномальные иммортальные клетки животных или человека. Например, был разработан ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные иммуноглобулины, в том числе линии клеток СНО, различные линии клеток COS, клетки HeLa, линии клеток миеломы, трансформированные В-клетки и гибридомы. Применение тканевой культуры клеток млекопитающих для экспрессии полипептидов в общих чертах обсуждается, например, в Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987. Векторы экспрессии для клеток-хозяев, представляющих собой клетки млекопитающих, могут включать последовательности для управления экспрессией, такие как точка начала репликации, промотор и энхансер (см., например, Queen *et al.*, *Immunol. Rev.* 89:49-68, 1986), и необходимые сайты, несущие информацию для процессинга, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминатора транскрипции. Такие векторы экспрессии обычно содержат промоторы, происходящие из генов млекопитающих или из вирусов

млекопитающих. Подходящие промоторы могут быть конститутивными, специфическими в отношении типа клеток, специфическими в отношении стадии развития и/или модулируемыми или регулируемыми. Применимые промоторы включают без ограничения металлотионеиновый промотор, конститутивный большой поздний промотор аденовируса, индуцируемый дексаметазоном промотор MMTV, промотор SV40, промотор polIII MRP, конститутивный промотор MPSV, индуцируемый тетрациклином промотор CMV (такой как немедленно-ранний промотор CMV человека), конститутивный промотор CMV и комбинации промотор-энхансер, известные из уровня техники.

[00159] Способы введения векторов экспрессии, содержащих представляющие интерес полинуклеотидные последовательности, варьируют в зависимости от типа клетки-хозяина. Например, трансфекцию с использованием хлорида кальция обычно используют для прокариотических клеток, тогда как обработку фосфатом кальция или электропорацию можно применять для других клеток-хозяев (см. в общих чертах Sambrook *et al.*, выше). Другие способы включают, например, электропорацию, обработку фосфатом кальция, трансформацию, опосредованную липосомами, инъекцию и микроинъекцию, баллистические способы, виросомы, иммунолипосомы, конъюгаты поликатион:нуклеиновая кислота, депротеинизированную ДНК, искусственные вирионы, слияние со структурным белком VP22 вируса герпеса (Elliot and O'Hare, Cell 88:223, 1997), усиленное средством поглощение ДНК и трансдукцию *ex vivo*. Чтобы обеспечить длительное получение рекомбинантных белков с высоким выходом, зачастую будет требоваться стабильная экспрессия. Например, линии клеток, которые стабильно экспрессируют цепи антитела или фрагмента антитела (например, антигенсвязывающего фрагмента) к CD48, могут быть получены с применением векторов экспрессии, которые содержат вирусные точки начала репликации или эндогенные элементы экспрессии и ген селективируемого маркера. После введения вектора клетки можно оставить расти в течение 1-2 дней в обогащенной среде перед их переносом на селективную среду. Задачей селективируемого маркера является придание устойчивости к факторам отбора, и его присутствие обеспечивает возможность роста клеток, которые успешно экспрессируют введенные последовательности, в селективных средах. Пролиферацию устойчивых стабильно трансфицированных клеток можно обеспечивать с применением методик тканевой культуры, соответствующих типу клеток.

[00160] Фрагменты антитела, такие как антигенсвязывающие фрагменты, можно получать за счет протеолитического расщепления молекул иммуноглобулина с применением ферментов, таких как папаин (для получения Fab-фрагментов) или пепсин (для получения Fab'-фрагментов) и т. д. В сравнении с Fab-фрагментами Fab'-фрагменты также содержат шарнирную область, которая содержит два природных цистеина, которые образуют дисульфидные связи между двумя тяжелыми цепями молекулы иммуноглобулина.

Фрагмент, представляющий собой лекарственное средство (D)

[00161] В одном аспекте в настоящей заявке представлены иммуноконъюгаты,

которые специфически связываются с CD48 человека. Конъюгаты антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению содержат антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) к CD48 или функциональные эквиваленты, которые конъюгированы с фрагментом, представляющим собой лекарственное средство, например, диагностическим средством, противораковым средством, средством лечения аутоиммунных заболеваний, противовоспалительным средством, противогрибковым средством, антибактериальным средством, антипаразитарным средством, противовирусным средством или анестетическим средством. Антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или их функциональные эквиваленты могут быть конъюгированы с несколькими идентичными или отличающимися фрагментами, представляющими собой лекарственное средство, с применением любых способов, известных из уровня техники.

[00162] В определенных вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой лекарственное средство, иммуноконъюгатов по настоящему изобретению выбран из группы, состоящей из ингибитора Eg5, ингибитора V-АТФазы, ингибитора HSP90, ингибитора IAP, ингибитора mTor, стабилизатора микротрубочек, дестабилизатора микротрубочек, ауристатина, доластатина, майтанзиноида, MetAP (метионинаминопептидазы), ингибитора ядерного экспорта белков CRM1, ингибитора DPPIV, ингибитора реакций переноса фосфорильной группы в митохондриях, ингибитора синтеза белков, ингибитора киназ, ингибитора CDK2, ингибитора CDK9, ингибиторов протеасом, ингибитора кинезина, ингибитора HDAC, ДНК-повреждающего средства, ДНК-алкилирующего средства, ДНК-интеркалятора, средства, связывающего малую бороздку ДНК, ингибитора РНК-полимеразы, аманитина, ингибитора сплайсосом, ингибитора топоизомеразы и ингибитора DHFR и проапоптотического средства, но исключая ингибиторы BCL-2, ингибиторы MCL-1 и ингибиторы BCL-XL.

[00163] В одном варианте осуществления фрагмент, представляющий собой лекарственное средство, иммуноконъюгатов по настоящему изобретению представляет собой фрагмент, представляющий собой майтанзиноидное лекарственное средство, такое как без ограничения DM1, DM3 или DM4.

[00164] Кроме того, антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с фрагментом, представляющим собой лекарственное средство, которое модифицирует заданный биологический ответ. Фрагменты, представляющие собой лекарственные средства, не следует рассматривать как ограниченные классическими химическими терапевтическими средствами. Например, фрагмент, представляющий собой лекарственное средство, может представлять собой белок, пептид или полипептид, обладающие необходимой биологической активностью. Такие белки могут включать, например, токсин, такой как абрин, рицин А, экзотоксин *Pseudomonas*, холерный токсин или дифтерийный токсин; белок, такой как фактор некроза опухоли, α -интерферон, β -интерферон, фактор роста нервов, фактор роста тромбоцитов, тканевой активатор

плазминогена, цитокин, апоптотическое средство, антиангиогенное средство или модификатор биологического ответа, такой как, например, лимфокин.

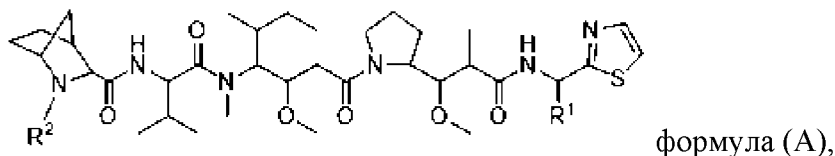
[00165] В одном варианте осуществления антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональные эквиваленты по настоящему изобретению конъюгированы с фрагментом, представляющим собой лекарственное средство, таким как цитотоксин, лекарственное средство (например, иммуносупрессор) или радиотоксин. Примеры цитотоксинов включают без ограничения пирролобензодиазепины (PBD, см., например, тезирин, описанный в Tiberghien *et al.*, ACS Med Chem Lett 7(11):983-987 (2016)), индолинобензодиазепиновые димерные полезные нагрузки (IGN, описанные в Singh *et al.*, Mol Pharm 2020 17(1),50-58), таксаны (см., например, Международные (согласно РСТ) патентные заявки №№ WO 01/38318 и PCT/US03/02675), ДНК-алкилирующие средства (например, аналоги CC-1065), антрациклины, аналоги тубулизина, аналоги дуокармина, ауристатин Е (ММАЕ), ауристатин F (ММАF), майтанзиноиды и цитотоксические средства, содержащие реактивный полиэтиленгликолевый фрагмент (см., например, Sasse *et al.*, J. Antibiot. (Tokyo), 53, 879-85 (2000), Suzawa *et al.*, Bioorg. Med. Chem., 8, 2175-84 (2000), Ichimura *et al.*, J. Antibiot. (Tokyo), 44, 1045-53 (1991), Francisco *et al.*, Blood (2003) (электронная публикация до печатной публикации), патенты США №№ 5475092, 6340701, 6372738 и 6436931, публикацию заявки на патент США № 2001/0036923 A1, находящиеся на рассмотрении заявки на патент США с порядковыми №№ 10/024290 и 10/116053 и международную (согласно РСТ) заявку на патент № WO 01/49698), таксон, цитохалазин В, грамицидин D, этидия бромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, t. колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрацидион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин, а также их аналоги или гомологи. Терапевтические средства также включают, например, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, декарбазин), разрушающие средства (например, мехлорэтамин, тиотепу, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманнит, стрептозотоцин, митомицин С и цис-дихлордиаминплатину (II) (DDP), цисплатин, антрациклины (например, даунорубин (ранее дауномицин) и доксорубин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (AMC)) и антимитотические средства (например, винкристин и винбластин) (см. например, US20090304721 от Seattle Genetics).

[00166] Другие примеры цитотоксинов, которые могут быть конъюгированы с антителами, фрагментами антител (антигенсвязывающими фрагментами) или функциональными эквивалентами по настоящему изобретению, включают дуокармицины, калихеамицины, майтанзины и ауристатины, а также их производные.

[00167] Различные типы цитотоксинов, линкеров и способы конъюгирования терапевтических средств с антителами известны из уровня техники, см., например, Saito *et al.*, (2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215; Trail *et al.*, (2003) Cancer Immunol. Immunother.

52:328-337; Payne, (2003) Cancer Cell 3:207-212; Allen, (2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763; Pastan and Kreitman, (2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091; Senter and Springer, (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264.

[00168] В одном аспекте фрагмент, представляющий собой лекарственное средство, по настоящему изобретению, представляет собой соединение формулы (A):



где

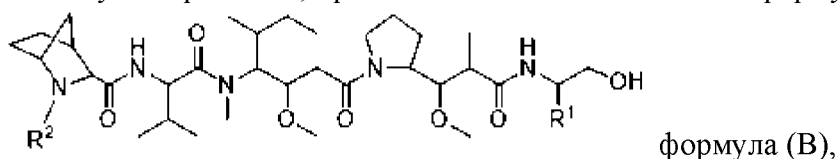


R² представляет собой H, C₁-C₆алкил, -C(=O)R³, -(CH₂)_mOH, -C(=O)(CH₂)_mOH, -C(=O)((CH₂)_mO)_nR⁴, -((CH₂)_mO)_nR⁴ или C₁-C₆алкил, который необязательно замещен -CN, -C(=O)NH₂ или 1-5 гидроксилами;

каждый R³ независимо выбран из C₁-C₆алкила и C₁-C₆алкила, который необязательно замещен 1-5 гидроксилами,

и каждый R⁴ независимо выбран из H и C₁-C₆алкила.

[00169] В одном аспекте фрагмент, представляющий собой лекарственное средство, по настоящему изобретению, представляет собой соединение формулы (B):



где



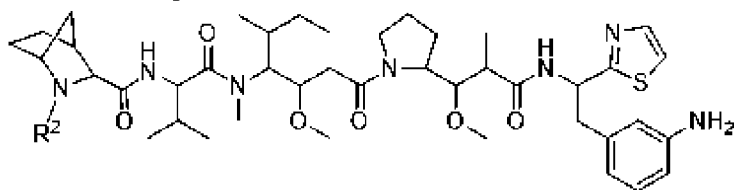
R² представляет собой H, C₁-C₆алкил, -C(=O)R³, -(CH₂)_mOH, -C(=O)(CH₂)_mOH, -C(=O)((CH₂)_mO)_nR⁴, -((CH₂)_mO)_nR⁴ или C₁-C₆алкил, который необязательно замещен -CN, -C(=O)NH₂ или 1-5 гидроксилами;

каждый R³ независимо выбран из C₁-C₆алкила и C₁-C₆алкила, который необязательно замещен 1-5 гидроксилами,

и каждый R⁴ независимо выбран из H и C₁-C₆алкила.

[00170] Определенные аспекты и примеры фрагмента, представляющего собой лекарственное средство, по настоящему изобретению предусмотрены в следующем перечне дополнительных пронумерованных вариантов осуществления. Следует понимать, что признаки, описанные в каждом варианте осуществления, можно объединять с другими указанными признаками с получением дополнительных вариантов осуществления настоящего изобретения.

[00171] Вариант осуществления 1. Соединение формулы (A) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (A-1) или ее фармацевтически приемлемой соли:



формула (A-1),

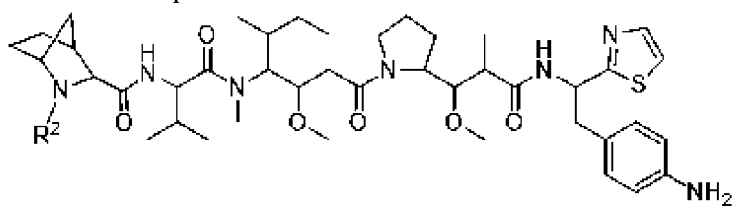
где

R^2 представляет собой H, C_1 - C_6 алкил, $-C(=O)R^3$, $-(CH_2)_mOH$, $-C(=O)(CH_2)_mOH$, $-C(=O)((CH_2)_mO)_nR^4$, $-((CH_2)_mO)_nR^4$ или C_1 - C_6 алкил, который необязательно замещен $-CN$, $-C(=O)NH_2$ или 1-5 гидроксилами;

каждый R^3 независимо выбран из C_1 - C_6 алкила и C_1 - C_6 алкила, который необязательно замещен 1-5 гидроксилами,

и каждый R^4 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила.

[00172] Вариант осуществления 2. Соединение формулы (A) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (A-2) или ее фармацевтически приемлемой соли:



формула (A-2),

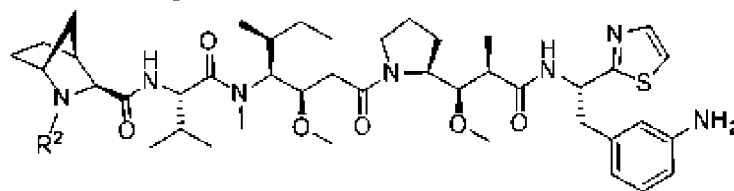
где

R^2 представляет собой H, C_1 - C_6 алкил, $-C(=O)R^3$, $-(CH_2)_mOH$, $-C(=O)(CH_2)_mOH$, $-C(=O)((CH_2)_mO)_nR^4$, $-((CH_2)_mO)_nR^4$ или C_1 - C_6 алкил, который необязательно замещен $-CN$, $-C(=O)NH_2$ или 1-5 гидроксилами;

каждый R^3 независимо выбран из C_1 - C_6 алкила и C_1 - C_6 алкила, который необязательно замещен 1-5 гидроксилами,

и каждый R^4 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила.

[00173] Вариант осуществления 3. Соединение формулы (A) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (A-3) или ее фармацевтически приемлемой соли:



формула (A-3),

где

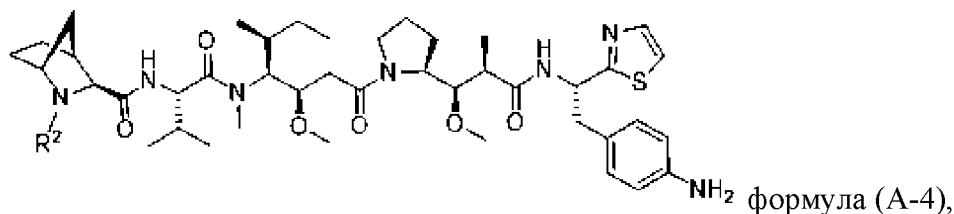
R^2 представляет собой H, C_1 - C_6 алкил, $-C(=O)R^3$, $-(CH_2)_mOH$, $-C(=O)(CH_2)_mOH$, $-C(=O)((CH_2)_mO)_nR^4$, $-((CH_2)_mO)_nR^4$ или C_1 - C_6 алкил, который необязательно замещен $-CN$, $-C(=O)NH_2$ или 1-5 гидроксилами;

$C(=O)NH_2$ или 1-5 гидроксилами;

каждый R^3 независимо выбран из C_1 - C_6 алкила и C_1 - C_6 алкила, который необязательно замещен 1-5 гидроксилами,

и каждый R^4 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила.

[00174] Вариант осуществления 4. Соединение формулы (A) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (A-4) или ее фармацевтически приемлемой соли:



где

R^2 представляет собой H, C_1 - C_6 алкил, $-C(=O)R^3$, $-(CH_2)_mOH$, $-C(=O)(CH_2)_mOH$, $-C(=O)((CH_2)_mO)_nR^4$, $-((CH_2)_mO)_nR^4$ или C_1 - C_6 алкил, который необязательно замещен $-CN$, $-C(=O)NH_2$ или 1-5 гидроксилами;

каждый R^3 независимо выбран из C_1 - C_6 алкила и C_1 - C_6 алкила, который необязательно замещен 1-5 гидроксилами,

и каждый R^4 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила.

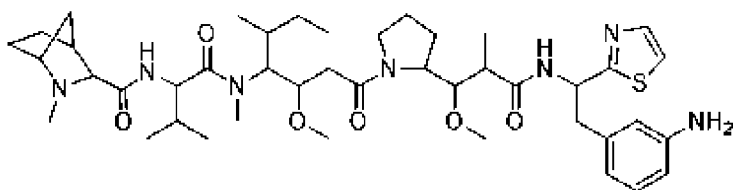
[00175] Вариант осуществления 5. Соединение формулы (A), формулы (A-1), формулы (A-2), формулы (A-3) или формулы (A-4) или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой H или C_1 - C_6 алкил.

[00176] Вариант осуществления 6. Соединение формулы (A), формулы (A-1), формулы (A-2), формулы (A-3) или формулы (A-4) или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой H или метил.

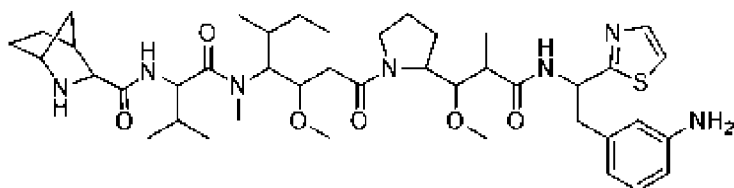
[00177] Вариант осуществления 7. Соединение формулы (A), формулы (A-1), формулы (A-2), формулы (A-3) или формулы (A-4) или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой H.

[00178] Вариант осуществления 8. Соединение формулы (A), формулы (A-1), формулы (A-2), формулы (A-3) или формулы (A-4) или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой метил.

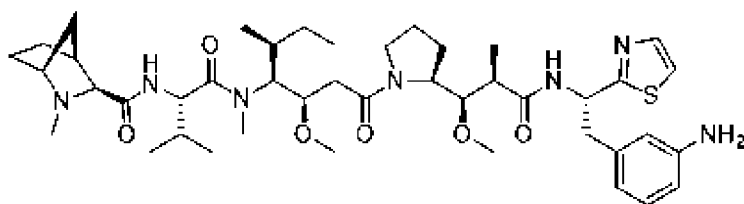
[00179] Вариант осуществления 9. Соединение формулы (A), формулы (A-1) или формулы (A-3) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение представляет собой:



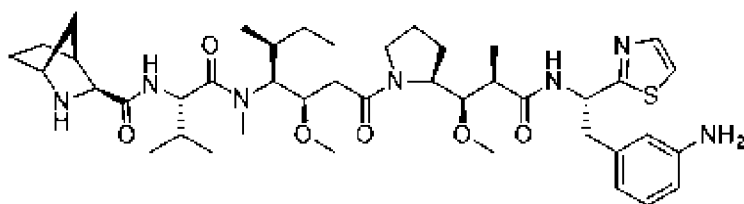
[00180] Вариант осуществления 10. Соединение формулы (A), формулы (A-1) или формулы (A-3) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение представляет собой:



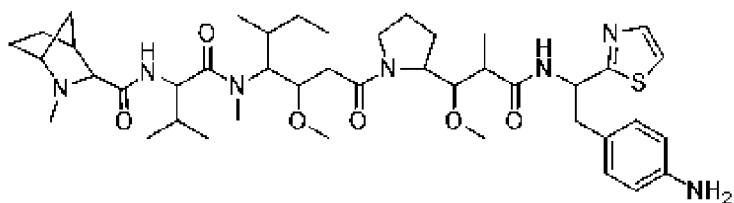
[00181] Вариант осуществления 11. Соединение формулы (A), формулы (A-1) или формулы (A-3) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение представляет собой:



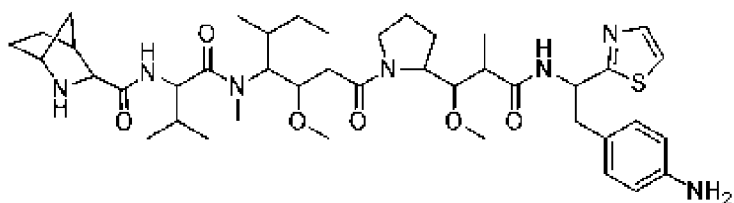
[00182] Вариант осуществления 12. Соединение формулы (A), формулы (A-1) или формулы (A-3) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение представляет собой:



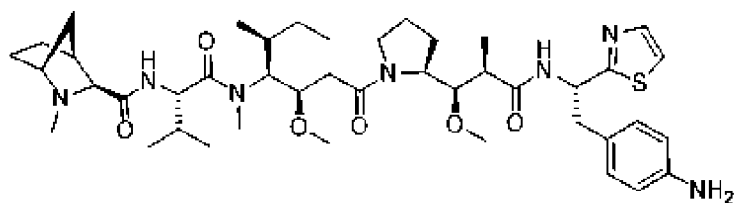
[00183] Вариант осуществления 13. Соединение формулы (A), формулы (A-2) или формулы (A-4) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение представляет собой:



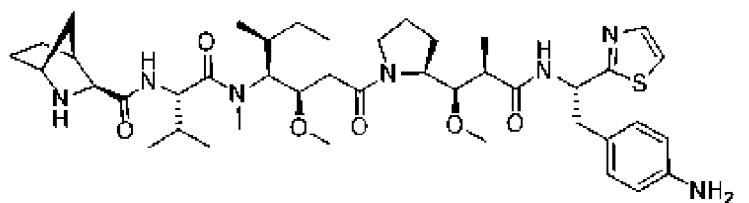
[00184] Вариант осуществления 14. Соединение формулы (A), формулы (A-2) или формулы (A-4) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение представляет собой:



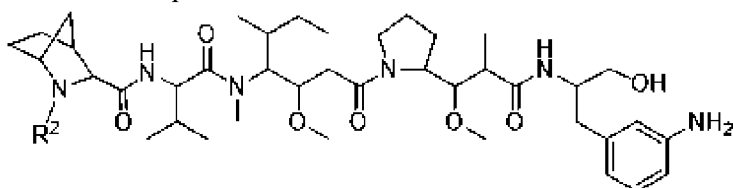
[00185] Вариант осуществления 15. Соединение формулы (A), формулы (A-2) или формулы (A-4) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение представляет собой:



[00186] Вариант осуществления 16. Соединение формулы (A), формулы (A-2) или формулы (A-4) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение представляет собой:



[00187] Вариант осуществления 17. Соединение формулы (B) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (B-1) или ее фармацевтически приемлемой соли:



формула (B-1),

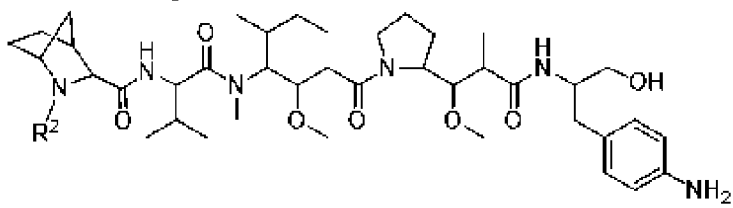
где

R^2 представляет собой H, C_1 - C_6 алкил, $-C(=O)R^3$, $-(CH_2)_mOH$, $-C(=O)(CH_2)_mOH$, $-C(=O)((CH_2)_mO)_nR^4$, $-((CH_2)_mO)_nR^4$ или C_1 - C_6 алкил, который необязательно замещен $-CN$, $-C(=O)NH_2$ или 1-5 гидроксилами;

каждый R^3 независимо выбран из C_1 - C_6 алкила и C_1 - C_6 алкила, который необязательно замещен 1-5 гидроксилами,

и каждый R^4 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила.

[00188] Вариант осуществления 18. Соединение формулы (B) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (B-2) или ее фармацевтически приемлемой соли:



формула (B-2),

где

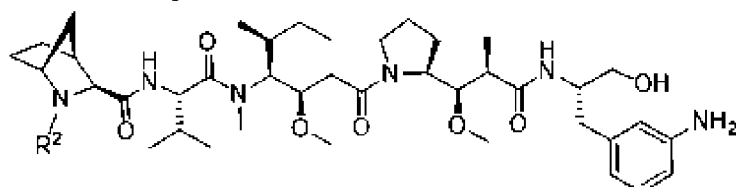
R^2 представляет собой H, C_1 - C_6 алкил, $-C(=O)R^3$, $-(CH_2)_mOH$, $-C(=O)(CH_2)_mOH$, -

$C(=O)((CH_2)_mO)_nR^4$, $-((CH_2)_mO)_nR^4$ или C_1 - C_6 алкил, который необязательно замещен $-CN$, $-C(=O)NH_2$ или 1-5 гидроксилами;

каждый R^3 независимо выбран из C_1 - C_6 алкила и C_1 - C_6 алкила, который необязательно замещен 1-5 гидроксилами,

и каждый R^4 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила.

[00189] Вариант осуществления 19. Соединение формулы (В) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (В-3) или ее фармацевтически приемлемой соли:



формула (В-3),

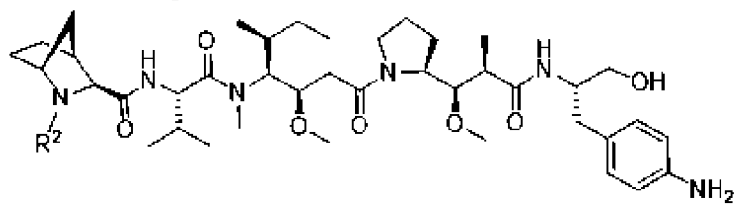
где

R^2 представляет собой H , C_1 - C_6 алкил, $-C(=O)R^3$, $-(CH_2)_mOH$, $-C(=O)(CH_2)_mOH$, $-C(=O)((CH_2)_mO)_nR^4$, $-((CH_2)_mO)_nR^4$ или C_1 - C_6 алкил, который необязательно замещен $-CN$, $-C(=O)NH_2$ или 1-5 гидроксилами;

каждый R^3 независимо выбран из C_1 - C_6 алкила и C_1 - C_6 алкила, который необязательно замещен 1-5 гидроксилами,

и каждый R^4 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила.

[00190] Вариант осуществления 20. Соединение формулы (В) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (В-4) или ее фармацевтически приемлемой соли:



формула (В-4),

где

R^2 представляет собой H , C_1 - C_6 алкил, $-C(=O)R^3$, $-(CH_2)_mOH$, $-C(=O)(CH_2)_mOH$, $-C(=O)((CH_2)_mO)_nR^4$, $-((CH_2)_mO)_nR^4$ или C_1 - C_6 алкил, который необязательно замещен $-CN$, $-C(=O)NH_2$ или 1-5 гидроксилами;

каждый R^3 независимо выбран из C_1 - C_6 алкила и C_1 - C_6 алкила, который необязательно замещен 1-5 гидроксилами,

и каждый R^4 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила.

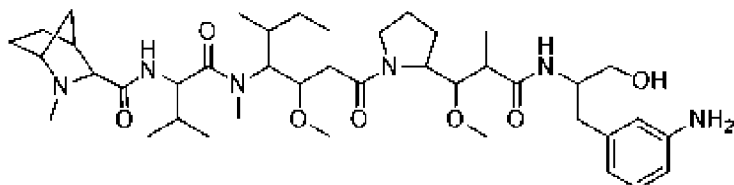
[00191] Вариант осуществления 21. Соединение формулы (В), формулы (В-1), формулы (В-2), формулы (В-3) или формулы (В-4) или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой H или C_1 - C_6 алкил.

[00192] Вариант осуществления 22. Соединение формулы (В), формулы (В-1), формулы (В-2), формулы (В-3) или формулы (В-4) или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой H или метил.

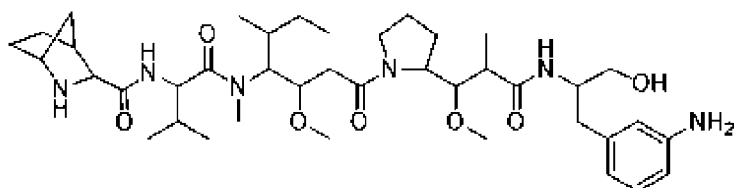
[00193] Вариант осуществления 23. Соединение формулы (B), формулы (B-1), формулы (B-2), формулы (B-3) или формулы (B-4) или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой H.

[00194] Вариант осуществления 24. Соединение формулы (B), формулы (B-1), формулы (B-2), формулы (B-3) или формулы (B-4) или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой метил.

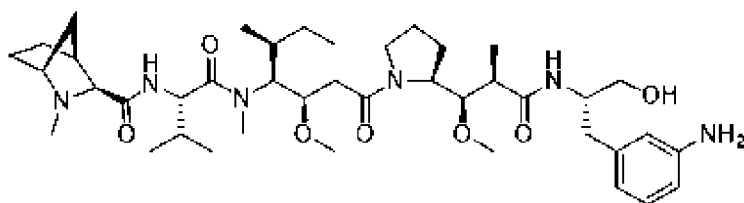
[00195] Вариант осуществления 25. Соединение формулы (B), формулы (B-1) или формулы (B-3) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение представляет собой:



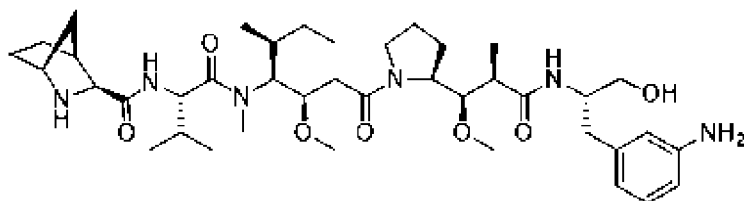
[00196] Вариант осуществления 26. Соединение формулы (B), формулы (B-1) или формулы (B-3) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение представляет собой:



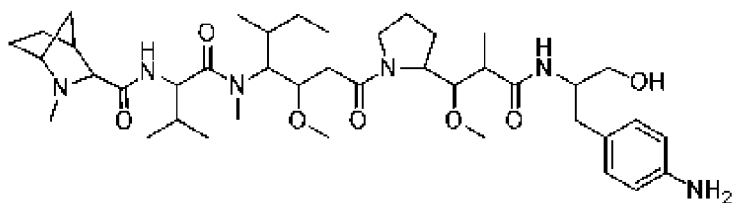
[00197] Вариант осуществления 27. Соединение формулы (B), формулы (B-1) или формулы (B-3) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение представляет собой:



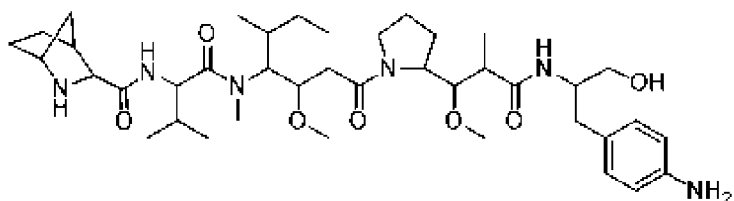
[00198] Вариант осуществления 28. Соединение формулы (B), формулы (B-1) или формулы (B-3) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение представляет собой:



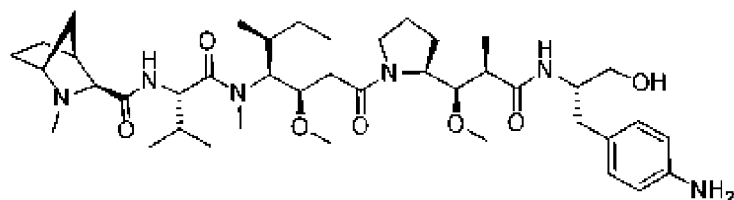
[00199] Вариант осуществления 29. Соединение формулы (B), формулы (B-2) или формулы (B-4) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение представляет собой:



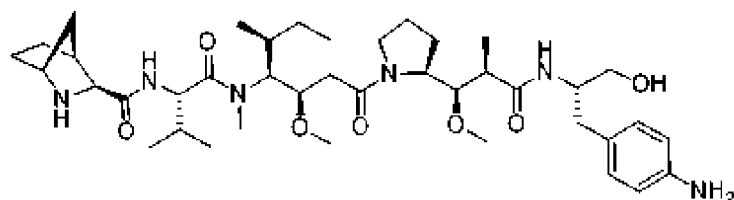
[00200] Вариант осуществления 30. Соединение формулы (B), формулы (B-2) или формулы (B-4) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение представляет собой:



[00201] Вариант осуществления 31. Соединение формулы (B), формулы (B-2) или формулы (B-4) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение представляет собой:



[00202] Вариант осуществления 32. Соединение формулы (A), формулы (A-2) или формулы (A-4) или его фармацевтически приемлемая соль, где соединение представляет собой:



Линкеры

[00203] В одном аспекте конъюгаты антитела и лекарственного средства по настоящему изобретению могут включать линкеры. Применяемый в данном документе "линкер" представляет собой любой химический фрагмент, который способен соединить антитело, фрагмент антитела (например, антигенсвязывающие фрагменты) или функциональный эквивалент с другим фрагментом, таким как фрагмент, представляющий собой лекарственное средство. Линкеры могут поддаваться расщеплению (расщепляемый линкер), такому как индуцированное кислотами расщепление, фотоиндуцированное расщепление, индуцированное пептидазами расщепление, индуцированное эстеразами расщепление и расщепление дисульфидной связи, в условиях, при которых соединение или антитело остаются активными. В качестве альтернативы линкеры могут быть по сути устойчивыми к расщеплению (например, стабильный линкер или нерасщепляемый линкер).

В некоторых аспектах линкер представляет собой предварительно заряженный линкер, гидрофильный линкер или линкер на основе дикарбоновой кислоты.

[00204] В одном аспекте линкер, применяемый в настоящем изобретении, получен из сшивающего реагента, такого как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)пентаноат (SPP), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)бутаноат (SPDB), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)-2-сульфобутаноат (сульфо-SPDB), N-сукцинимидилйодацетат (SIA), N-сукцинимидил-(4-йодацетил)аминобензоат (SIAB), малеимид-PEG-NHS, N-сукцинимидил-4-(малеимидометил)циклогексанкарбоксилат (SMCC), N-сульфосукцинимидил-4-(малеимидометил)циклогексанкарбоксилат (сульфо-SMCC) или 2,5-диоксопирролидин-1-ил-17-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-5,8,11,14-тетраоксо-4,7,10,13-тетраазагептадекан-1-оат (CX1-1).

[00205] Нерасщепляемые линкеры представляют собой любой химический фрагмент, который способен соединить лекарственное средство, такое как майтанзиноид, с антителом с помощью устойчивой ковалентной связи и не попадает в категории, перечисленные выше для расщепляемых линкеров. Таким образом, нерасщепляемые линкеры являются по сути устойчивыми к индуцированному кислотами расщеплению, фотоиндуцированному расщеплению, индуцированному пептидазами расщеплению, индуцированному эстеразами расщеплению и расщеплению дисульфидной связи. Кроме того, нерасщепляемый относится к способности химической связи в линкере или прикрепляемой к линкеру противостоять расщеплению, индуцированному кислотой, фотолabileм расщепляющим средством, пептидазой, эстеразой или химическим или физиологическим соединением, которое расщепляет дисульфидную связь, в условиях, при которых лекарственное средство, такое как майтанзиноид или антитело, не теряет свою активность.

[00206] Кислотолабильные линкеры представляют собой линкеры, расщепляемые при кислом pH. Например, определенные внутриклеточные компартменты, такие как эндосомы и лизосомы, имеют кислый pH (pH 4-5) и обеспечивают условия, подходящие для расщепления кислотолабильных линкеров.

[00207] Фотолabileные линкеры представляют собой линкеры, которые применимы на поверхности тела и во многих полостях тела, которые доступны для воздействия света. Кроме того, проникать внутрь ткани может инфракрасный свет.

[00208] Некоторые линкеры могут расщепляться под действием пептидаз, т. е. являются расщепляемыми пептидазами линкерами. Только определенные пептиды легко расщепляются внутри или вне клеток, см. например, Trout *et al.*, 79 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 626-629 (1982) и Umemoto *et al.* 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989). Кроме того, пептиды состоят из α -аминокислот и пептидных связей, которые по химической природе представляют собой амидные связи между карбоксильной группой одной аминокислоты и аминогруппой второй аминокислоты. Понятно, что другие амидные связи, такие как связь между карбоксильной группой и α -аминогруппой лизина, не являются пептидными связями

и считаются нерасщепляемыми.

[00209] Некоторые линкеры могут расщепляться под действием эстераз, т. е. являются расщепляемыми эстеразами линкерами. Опять-таки, только определенные сложные эфиры могут расщепляться с помощью эстераз, присутствующих внутри или за пределами клеток. Сложные эфиры образуются путем конденсации карбоновой кислоты и спирта. Простые сложные эфиры представляют собой сложные эфиры, полученные с помощью простых спиртов, таких как алифатические спирты, и небольших циклических и небольших ароматических спиртов.

[00210] Предварительно заряженные линкеры происходят из заряженных сшивающих реагентов, которые сохраняют свой заряд после введения в конъюгат антитела и лекарственного средства. Примеры предварительно заряженных линкеров можно найти в US 2009/0274713.

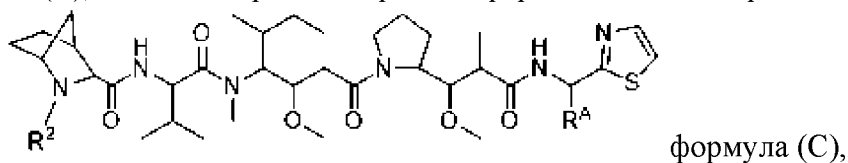
Фрагмент, представляющий собой линкер-лекарственное средство

[00211] В одном аспекте фрагмент **(L_B-(D)_n)**, представляющий собой линкер-лекарственное средство, по настоящему изобретению содержит один или несколько цитотоксинов, ковалентно присоединенных к линкеру (L_B), где один или несколько цитотоксинов независимо выбраны из соединения формулы (A), формулы (A-1), формулы (A-2), формулы (A-3), формулы (A-4), формулы (B), формулы (B-1), формулы (B-2), формулы (B-3) и формулы (B-4) или соединения по любому из вариантов осуществления 9-16 или по любому из вариантов осуществления 25-32.

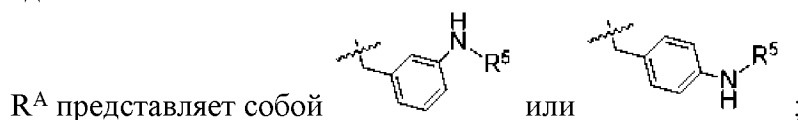
[00212] В одном аспекте, фрагмент, представляющий собой линкер-лекарственное средство, раскрытый в данном документе, содержит один или несколько цитотоксинов, ковалентно присоединенных к линкеру (L_B), где один или несколько цитотоксинов независимо выбраны из соединений формулы (A), формулы (A-1), формулы (A-2), формулы (A-3) и формулы (A-4) или соединения по любому из вариантов осуществления 7-14.

[00213] В одном аспекте фрагмент, представляющий собой линкер-лекарственное средство, по настоящему изобретению содержит один или несколько цитотоксинов, ковалентно присоединенных к линкеру (L_B), где один или несколько цитотоксинов независимо выбраны из соединения формулы (B), формулы (B-1), формулы (B-2), формулы (B-3) и формулы (B-4) или соединения по любому из вариантов осуществления 23-30.

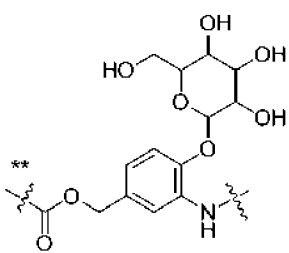
[00214] В одном аспекте фрагмент, представляющий собой линкер-лекарственное средство, по настоящему изобретению представляет собой соединение, имеющее структуру формулы (C), или его стереоизомеры или фармацевтически приемлемые соли,



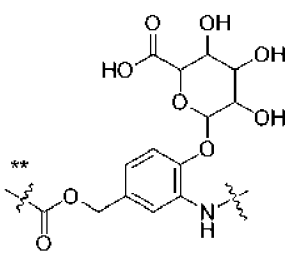
где



X_3 представляет собой

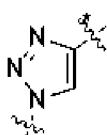


или

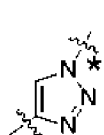


, где ** указывает на точку присоединения к -NH-;

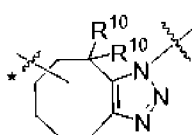
X_4 представляет собой



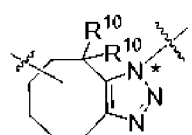
,



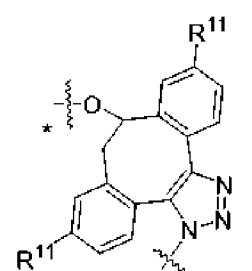
,



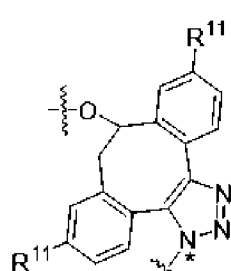
,



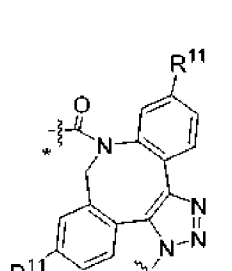
,



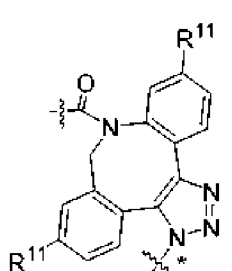
,



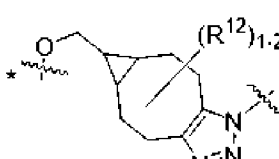
,



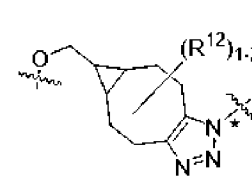
,



,

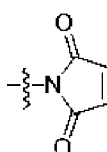


или



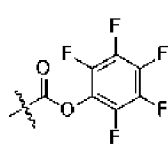
, где * указывает, что точка присоединения направлена к R^{14} , R^{24} , R^{34} или R^{44} ;

R^{14} представляет собой

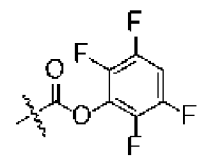


, $-N_3$, $-ONH_2$, $-NR^6C(=O)CH=CH_2$, SH , $-SSR^7$, $-S(=O)_2(CH=CH_2)$, $-NR^6S(=O)_2(CH=CH_2)$, $-NR^6C(=O)CH_2Br$, $-NR^6C(=O)CH_2I$, $-NHC(=O)CH_2Br$, $-NHC(=O)CH_2I$, $-C(=O)NHNH_2$,

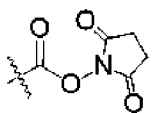
$-CO_2H$, $-NH_2$,



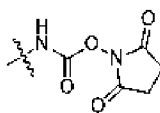
,



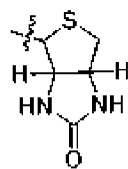
,



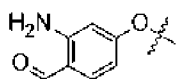
,



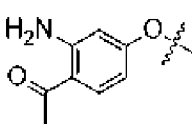
,



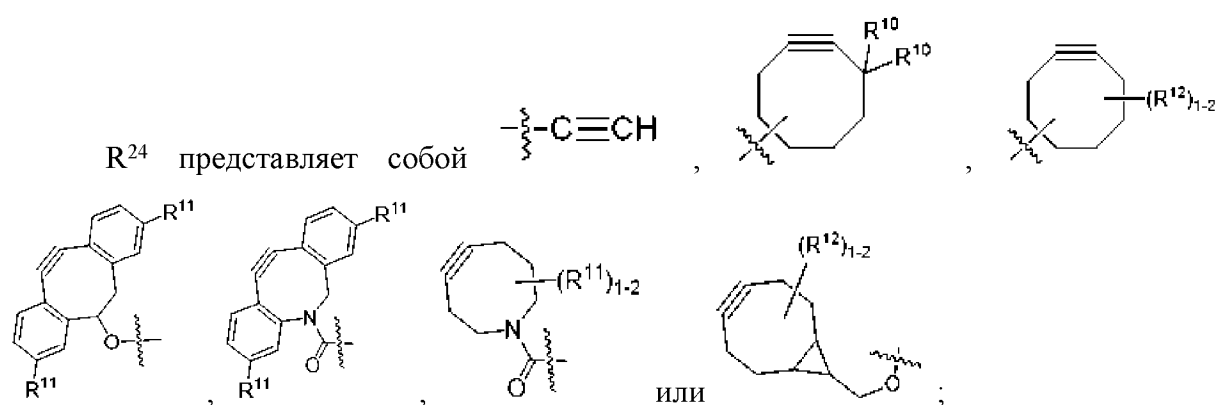
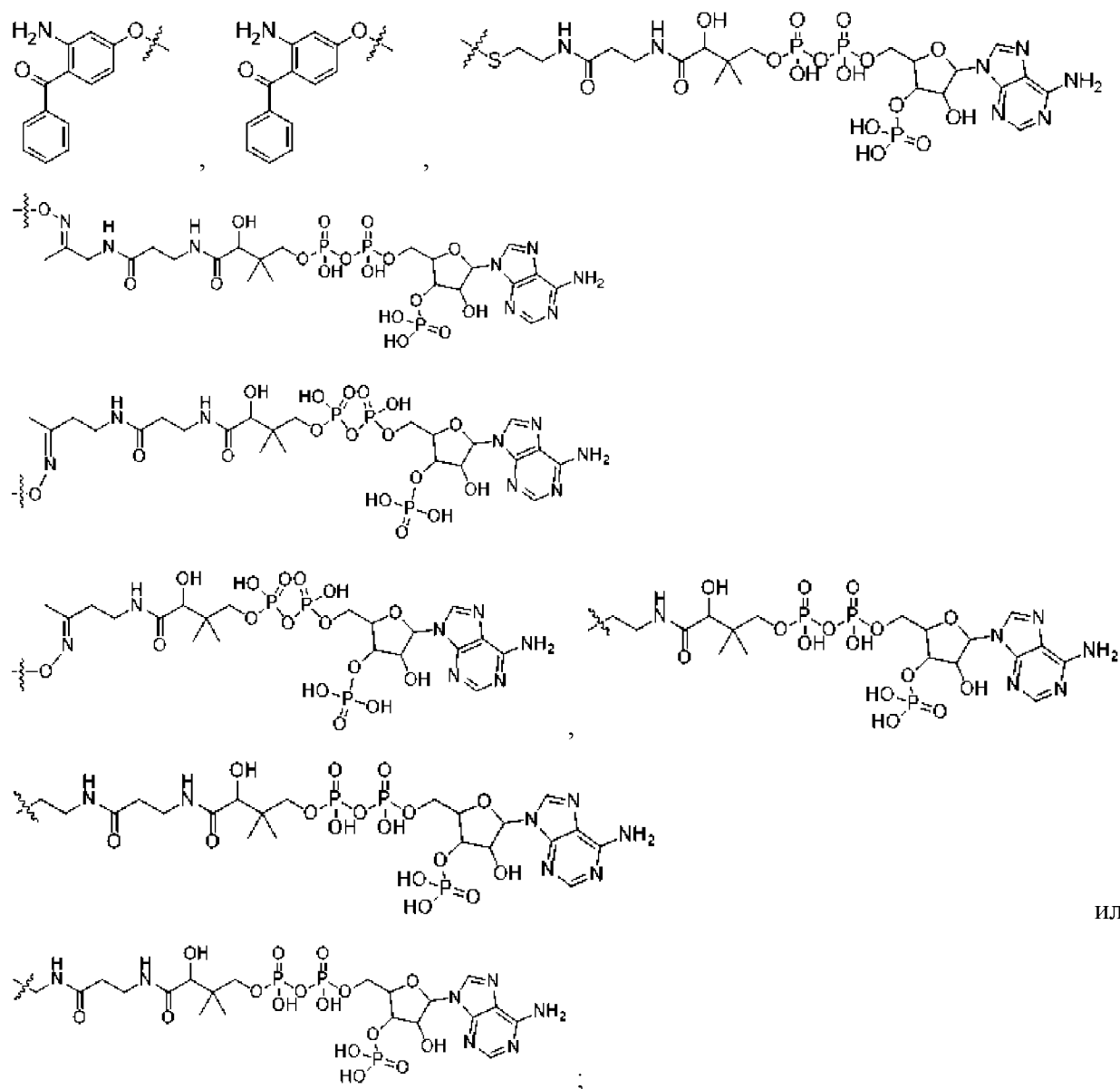
,



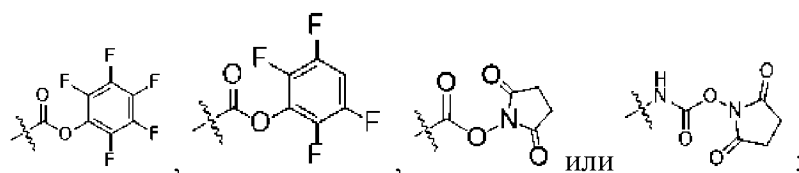
,

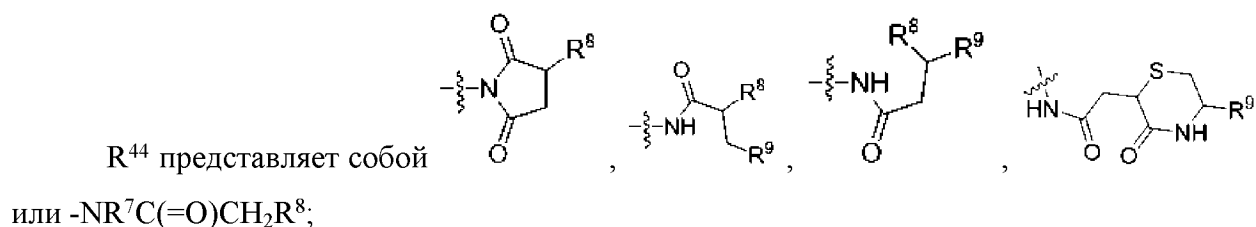


,



R^{34} представляет собой $-\text{N}_3$, $-\text{ONH}_2$, $-\text{NR}^7\text{C}(=\text{O})\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NHNH}_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{NH}_2$,





каждый R^6 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила;

R^7 представляет собой 2-пиридил или 4-пиридил;

R^8 представляет собой $-S(CH_2)_nCHR^9NH_2$;

R^9 представляет собой $-C(=O)OR^7$;

каждый R^{10} независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила, F, Cl и $-OH$;

каждый R^{11} независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила, F, Cl, $-NH_2$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-CN$, $-NO_2$ и $-OH$;

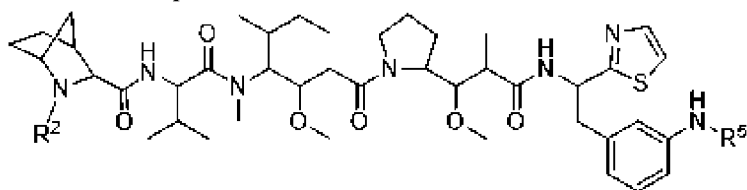
каждый R^{12} независимо выбран из H, C_{1-6} алкила, фтора, бензилокси, замещенного $-C(=O)OH$, бензила, замещенного $-C(=O)OH$, C_{1-4} алкокси, замещенного $-C(=O)OH$, и C_{1-4} алкила, замещенного $-C(=O)OH$;

каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10, и

каждый p независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14.

[00215] Определенные аспекты и примеры фрагмента, представляющего собой линкер-лекарственное средство, раскрытого в данном документе, предусмотрены в следующем перечне дополнительных пронумерованных вариантов осуществления. Следует понимать, что признаки, описанные в каждом варианте осуществления, можно объединять с другими указанными признаками с получением дополнительных вариантов осуществления настоящего изобретения.

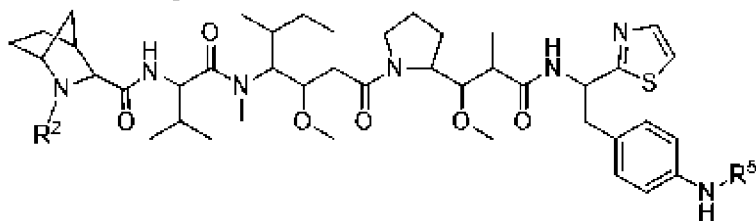
[00216] Вариант осуществления 33. Соединение формулы (C) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (C-1), или его фармацевтически приемлемой соли:



формула (C-1),

где R^2 и R^5 являются такими, как определено выше для соединений формулы (C).

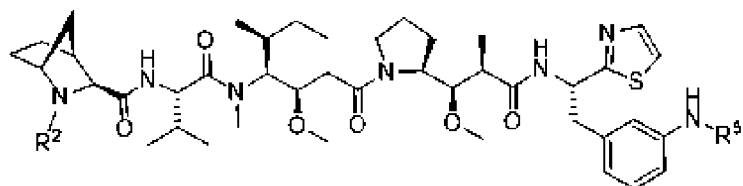
[00217] Вариант осуществления 34. Соединение формулы (C) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (C-2), или его фармацевтически приемлемой соли:



формула (C-2),

где R^2 и R^5 являются такими, как определено выше для соединений формулы (C).

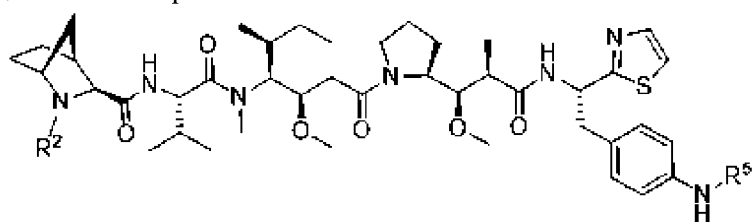
[00218] Вариант осуществления 35. Соединение формулы (C) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (C-3), или его фармацевтически приемлемой соли:



формула (C-3),

где R^2 и R^5 являются такими, как определено выше для соединений формулы (C).

[00219] Вариант осуществления 36. Соединение формулы (C) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (C-4), или его фармацевтически приемлемой соли:



формула (C-4),

где R^2 и R^5 являются такими, как определено выше для соединений формулы (C).

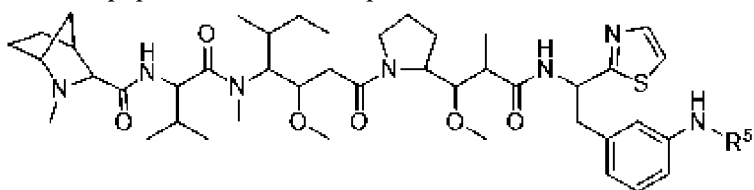
[00220] Вариант осуществления 37. Соединение формулы (C), формулы (C-1), формулы (C-2), формулы (C-3) или формулы (C-4) или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой H или C_1 - C_6 алкил.

[00221] Вариант осуществления 38. Соединение формулы (C), формулы (C-1), формулы (C-2), формулы (C-3) или формулы (C-4) или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой H или метил.

[00222] Вариант осуществления 39. Соединение формулы (C), формулы (C-1), формулы (C-2), формулы (C-3) или формулы (C-4) или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой H.

[00223] Вариант осуществления 40. Соединение формулы (C), формулы (C-1), формулы (C-2), формулы (C-3) или формулы (C-4) или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой метил.

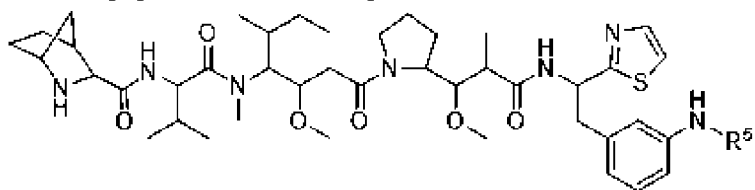
[00224] Вариант осуществления 41. Соединение формулы (C), формулы (C-1) или формулы (C-3) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (C-5), или его фармацевтически приемлемой соли:



формула (C-5),

где R^5 являются такими, как определено выше для соединений формулы (C).

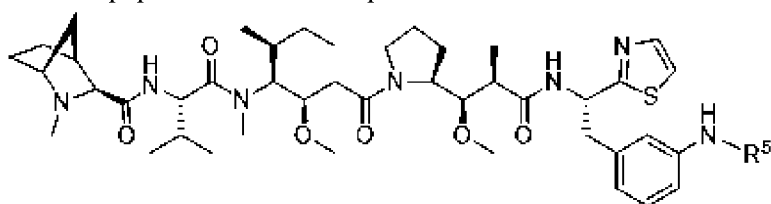
[00225] Вариант осуществления 42. Соединение формулы (C), формулы (C-1) или формулы (C-3) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (C-6), или его фармацевтически приемлемой соли:



формула (C-6),

где R^5 являются такими, как определено выше для соединений формулы (C).

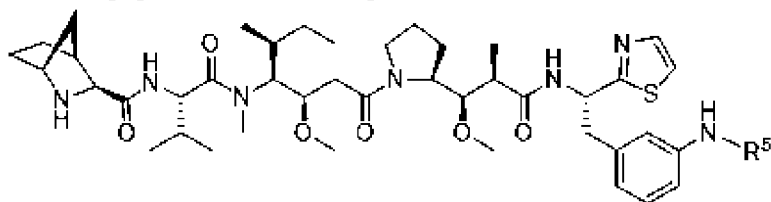
[00226] Вариант осуществления 43. Соединение формулы (C), формулы (C-1) или формулы (C-3) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (C-7), или его фармацевтически приемлемой соли:



формула (C-7),

где R^5 являются такими, как определено выше для соединений формулы (C).

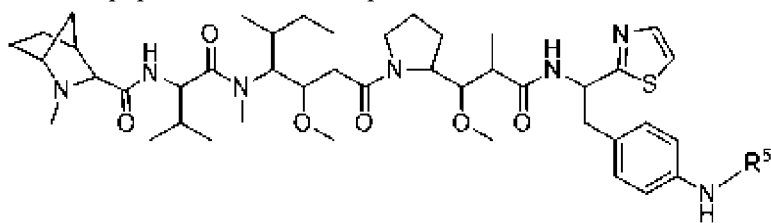
[00227] Вариант осуществления 44. Соединение формулы (C), формулы (C-1) или формулы (C-3) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (C-8), или его фармацевтически приемлемой соли:



формула (C-8),

где R^5 являются такими, как определено выше для соединений формулы (C).

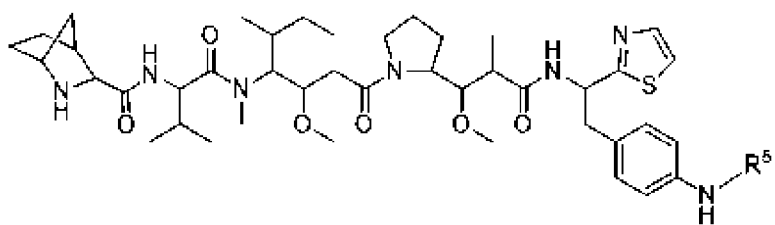
[00228] Вариант осуществления 45. Соединение формулы (C), формулы (C-1) или формулы (C-3) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (C-9), или его фармацевтически приемлемой соли:



формула (C-9),

где R^5 являются такими, как определено выше для соединений формулы (C).

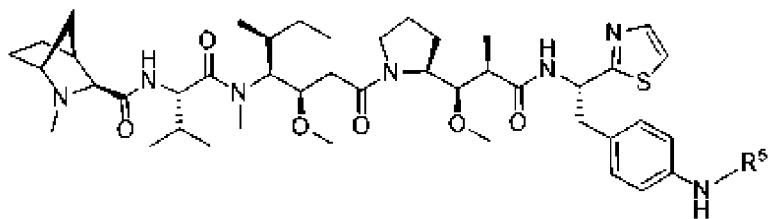
[00229] Вариант осуществления 46. Соединение формулы (C), формулы (C-1) или формулы (C-3) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (C-10), или его фармацевтически приемлемой соли:



формула (C-10),

где R^5 являются такими, как определено выше для соединений формулы (C).

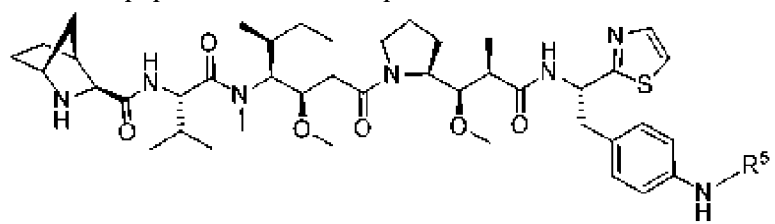
[00230] Вариант осуществления 47. Соединение формулы (C), формулы (C-1) или формулы (C-3) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (C-11), или его фармацевтически приемлемой соли:



формула (C-11),

где R^5 являются такими, как определено выше для соединений формулы (C).

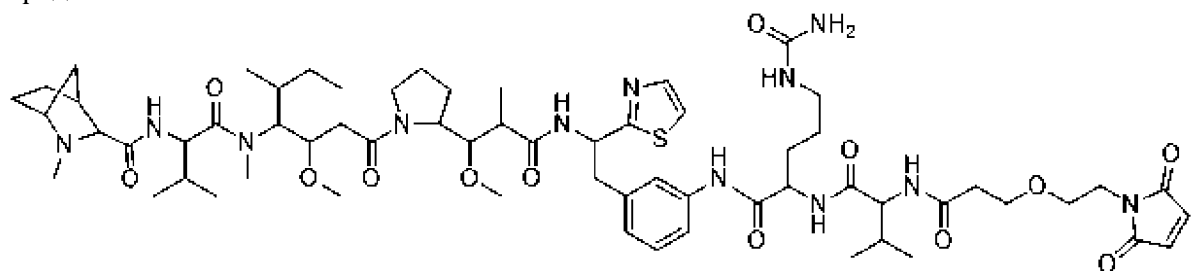
[00231] Вариант осуществления 48. Соединение формулы (C), формулы (C-1) или формулы (C-3) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (C-12), или его фармацевтически приемлемой соли:



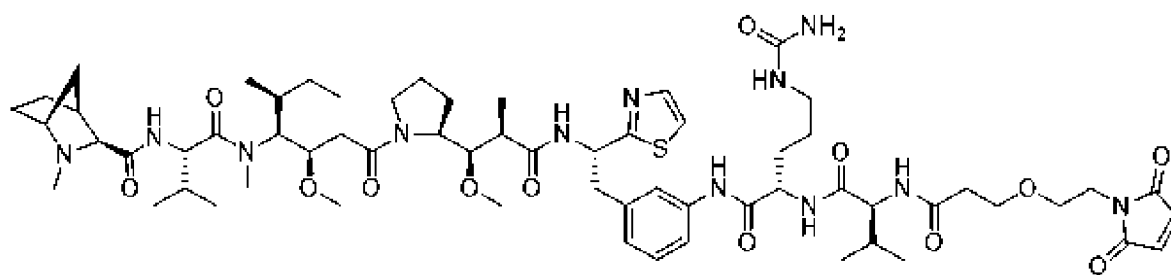
формула (C-12),

где R^5 являются такими, как определено выше для соединений формулы (C).

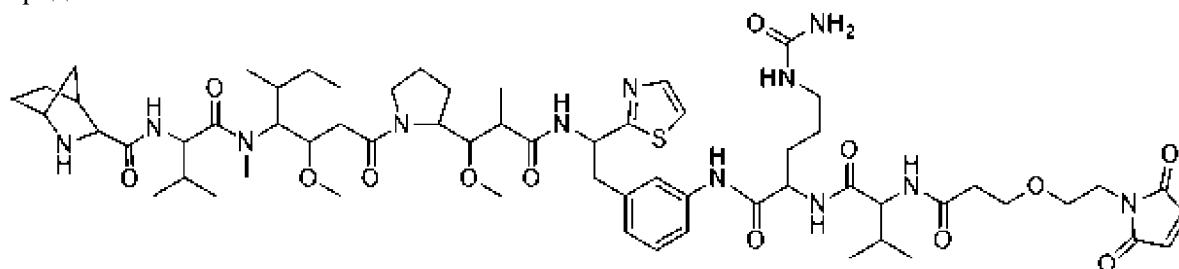
[00232] Вариант осуществления 49. Соединение формулы (C), формулы (C-1) или формулы (C-3) или соединение по варианту осуществления 37, где соединение представляет собой:



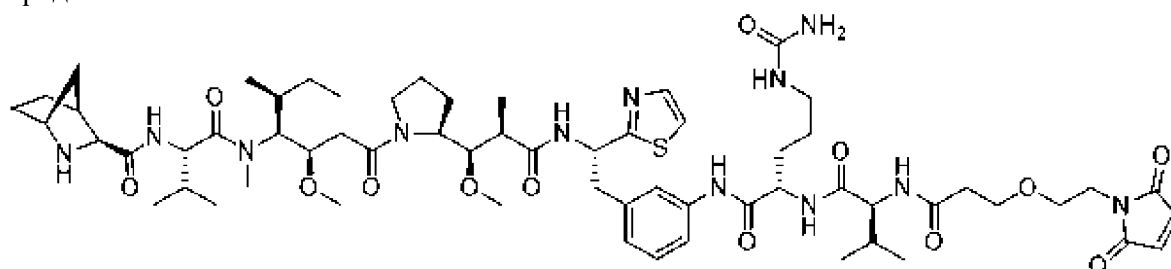
[00233] Вариант осуществления 50. Соединение формулы (C), формулы (C-1) или формулы (C-3) или соединение по варианту осуществления 37, где соединение представляет собой:



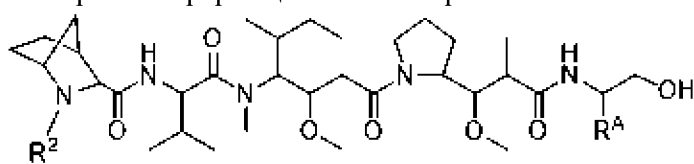
[00234] Вариант осуществления 51. Соединение формулы (C), формулы (C-1) или формулы (C-3) или соединение по варианту осуществления 38, где соединение представляет собой:



[00235] Вариант осуществления 52. Соединение формулы (C), формулы (C-1) или формулы (C-3) или соединение по варианту осуществления 38, где соединение представляет собой:

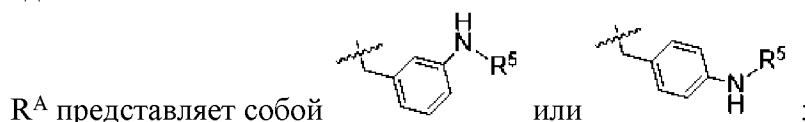


[00236] В одном аспекте фрагмент, представляющий собой линкер-лекарственное средство, представляет собой соединение, имеющее структуру формулы (C), или его стереоизомеры или фармацевтически приемлемые соли:



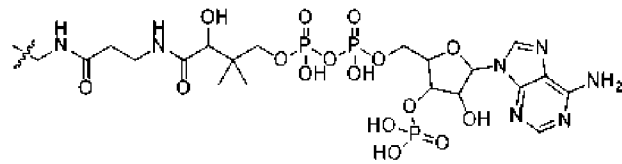
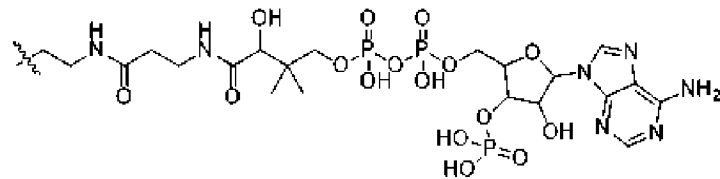
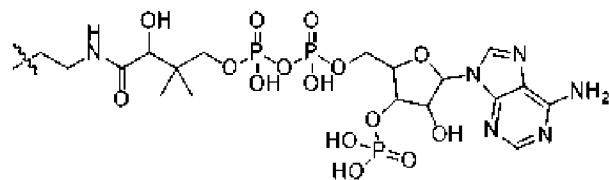
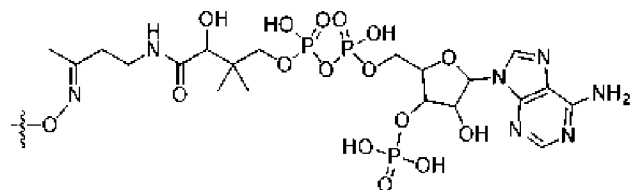
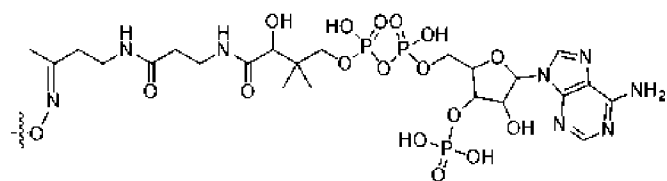
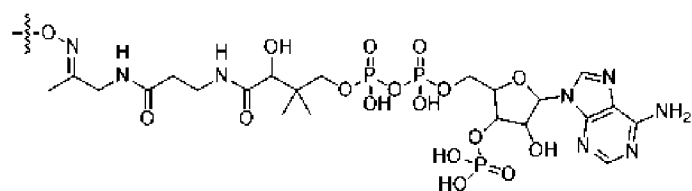
формула (D),

где

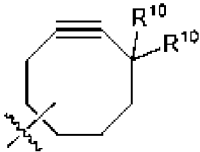
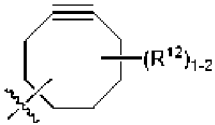


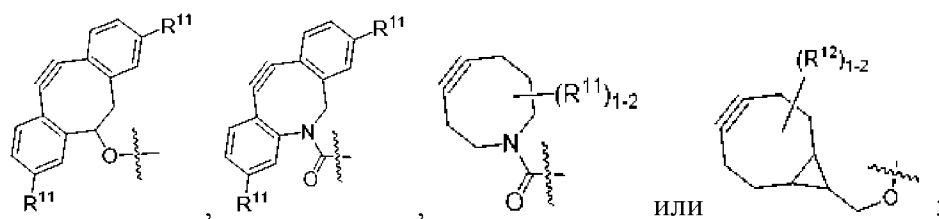
R^2 представляет собой H, C_1 - C_6 алкил, $-C(=O)R^3$, $-(CH_2)_mOH$, $-C(=O)(CH_2)_mOH$, $-C(=O)((CH_2)_mO)_nR^4$, $-((CH_2)_mO)_nR^4$ или C_1 - C_6 алкил, который необязательно замещен $-CN$, $-C(=O)NH_2$ или 1-5 гидроксилами;

каждый R^3 независимо выбран из C_1 - C_6 алкила и C_1 - C_6 алкила, который необязательно замещен 1-5 гидроксилами,

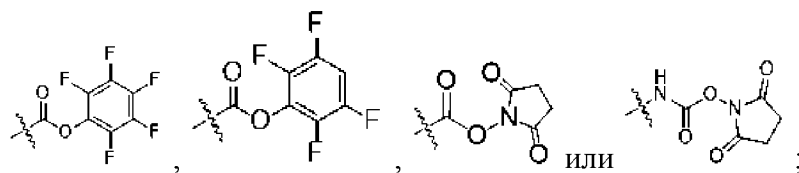


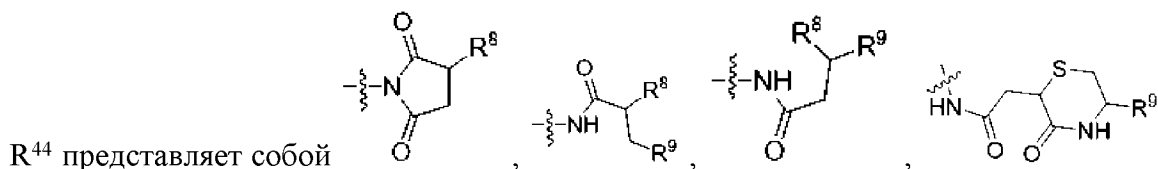
или

R^{24} представляет собой $-\text{C}\equiv\text{CH}$, , ,



R^{34} представляет собой $-\text{N}_3$, $-\text{ONH}_2$, $-\text{NR}^7\text{C}(=\text{O})\text{CH}=\text{CH}_2$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NHNH}_2$, $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{NH}_2$,



или $-\text{NR}^7\text{C}(=\text{O})\text{CH}_2\text{R}^8$;

каждый R⁶ независимо выбран из H и C₁-C₆алкила;

R⁷ представляет собой 2-пиридил или 4-пиридил;

R^8 представляет собой $-S(CH_2)_nCHR^9NH_2$;

R⁹ представляет собой -C(=O)OR⁷;

каждый R¹⁰ независимо выбран из H, C₁-C₆алкила, F, Cl и -OH;

каждый R¹¹ независимо выбран из H, C₁-C₆алкила, F, Cl, -NH₂, -OCH₃, -OCH₂CH₃, -N(CH₃)₂, -CN, -NO₂ и -OH;

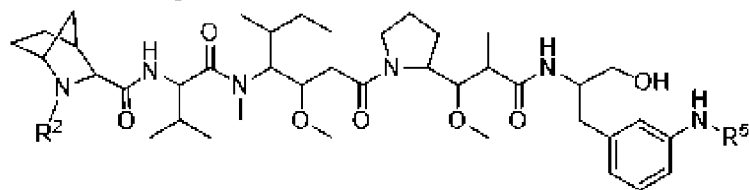
каждый R¹² независимо выбран из H, C₁₋₆алкила, фтора, бензилокси, замещенного -C(=O)ОН, бензила, замещенного -C(=O)ОН, C₁₋₄алкокси, замещенного -C(=O)ОН, и C₁₋₄алкила, замещенного -C(=O)ОН;

каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10, и

каждый p независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14.

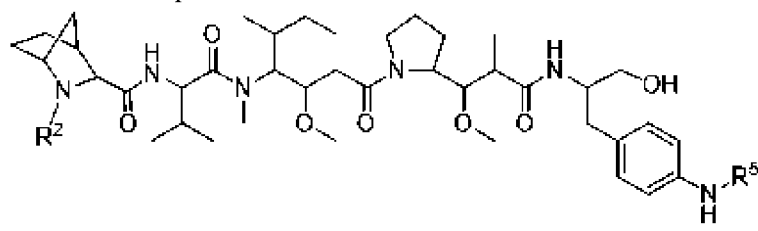
[00237] Определенные аспекты и примеры фрагмента, представляющего собой линкер-лекарственное средство, предусмотрены в следующем перечне дополнительных пронумерованных вариантов осуществления. Следует понимать, что признаки, описанные в каждом варианте осуществления, можно объединять с другими указанными признаками с получением дополнительных вариантов осуществления настоящего изобретения.

[00238] Вариант осуществления 53. Соединение формулы (D) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (D-1), или его фармацевтически приемлемой соли:



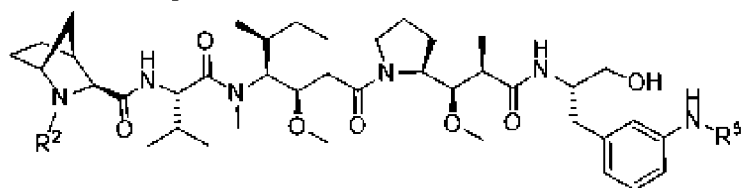
где R^2 и R^5 являются такими, как определено выше для соединений формулы (D).

[00239] Вариант осуществления 54. Соединение формулы (D) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (D-2), или его фармацевтически приемлемой соли:



где R^2 и R^5 являются такими, как определено выше для соединений формулы (D).

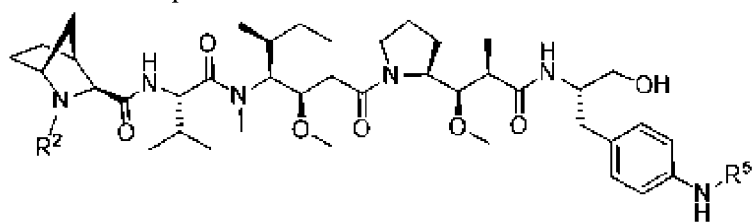
[00240] Вариант осуществления 55. Соединение формулы (D) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (D-3), или его фармацевтически приемлемой соли:



формула (D-3),

где R^2 и R^5 являются такими, как определено выше для соединений формулы (D).

[00241] Вариант осуществления 56. Соединение формулы (D) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (D-4), или его фармацевтически приемлемой соли:



формула (D-4),

где R^2 и R^5 являются такими, как определено выше для соединений формулы (D).

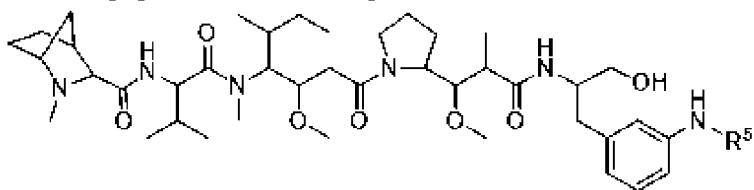
[00242] Вариант осуществления 57. Соединение формулы (D), формулы (D-1), формулы (D-2), формулы (D-3) или формулы (D-4) или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой H или C_1 - C_6 алкил.

[00243] Вариант осуществления 58. Соединение формулы (D), формулы (D-1), формулы (D-2), формулы (D-3) или формулы (D-4) или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой H или метил.

[00244] Вариант осуществления 59. Соединение формулы (D), формулы (D-1), формулы (D-2), формулы (D-3) или формулы (D-4) или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой H.

[00245] Вариант осуществления 60. Соединение формулы (D), формулы (D-1), формулы (D-2), формулы (D-3) или формулы (D-4) или его фармацевтически приемлемая соль, где R^2 представляет собой метил.

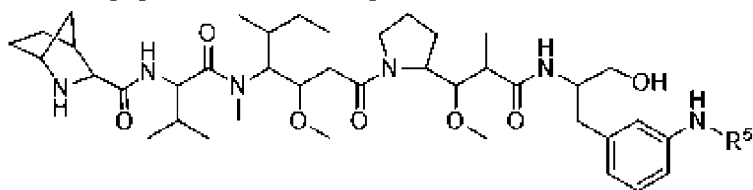
[00246] Вариант осуществления 61. Соединение формулы (D), формулы (D-1) или формулы (D-3) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (D-5), или его фармацевтически приемлемой соли:



формула (D-5),

где R^5 являются такими, как определено выше для соединений формулы (D).

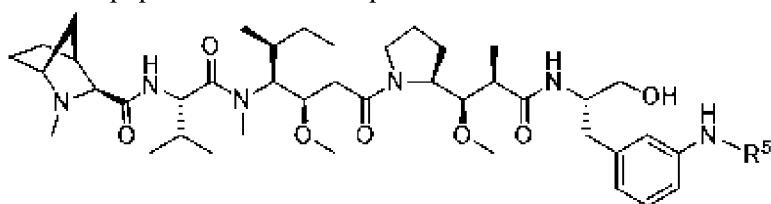
[00247] Вариант осуществления 62. Соединение формулы (D), формулы (D-1) или формулы (D-3) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (D-6), или его фармацевтически приемлемой соли:



формула (D-6),

где R^5 являются такими, как определено выше для соединений формулы (D).

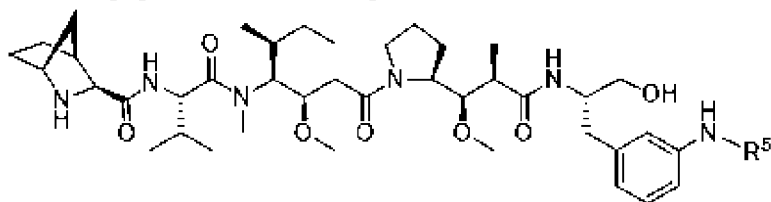
[00248] Вариант осуществления 63. Соединение формулы (D), формулы (D-1) или формулы (D-3) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (D-7), или его фармацевтически приемлемой соли:



формула (D-7),

где R^5 являются такими, как определено выше для соединений формулы (D).

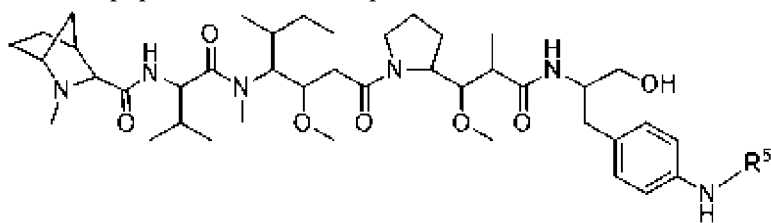
[00249] Вариант осуществления 64. Соединение формулы (D), формулы (D-1) или формулы (D-3) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (D-8), или его фармацевтически приемлемой соли:



формула (D-8),

где R^5 являются такими, как определено выше для соединений формулы (D).

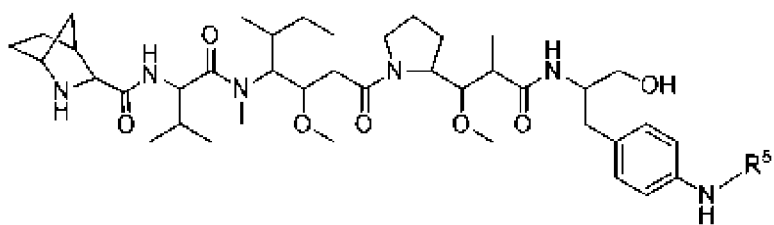
[00250] Вариант осуществления 65. Соединение формулы (D), формулы (D-1) или формулы (D-3) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (D-9), или его фармацевтически приемлемой соли:



формула (D-9),

где R^5 являются такими, как определено выше для соединений формулы (D).

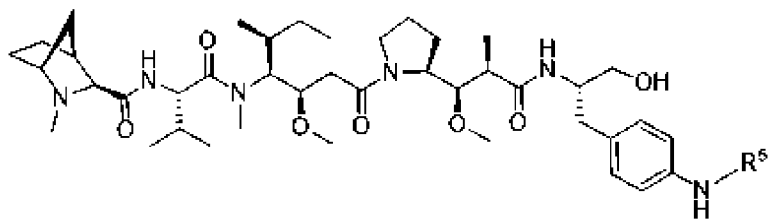
[00251] Вариант осуществления 66. Соединение формулы (D), формулы (D-1) или формулы (D-3) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (D-10), или его фармацевтически приемлемой соли:



формула (D-10),

где R^5 являются такими, как определено выше для соединений формулы (D).

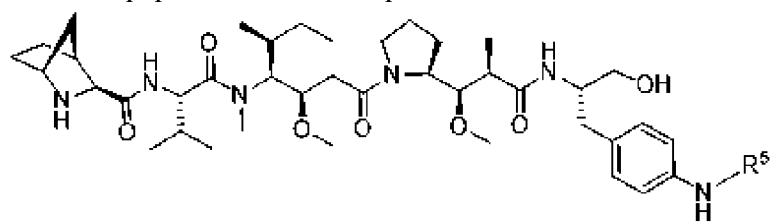
[00252] Вариант осуществления 67. Соединение формулы (D), формулы (D-1) или формулы (D-3) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (D-11), или его фармацевтически приемлемой соли:



формула (D-11),

где R^5 являются такими, как определено выше для соединений формулы (D).

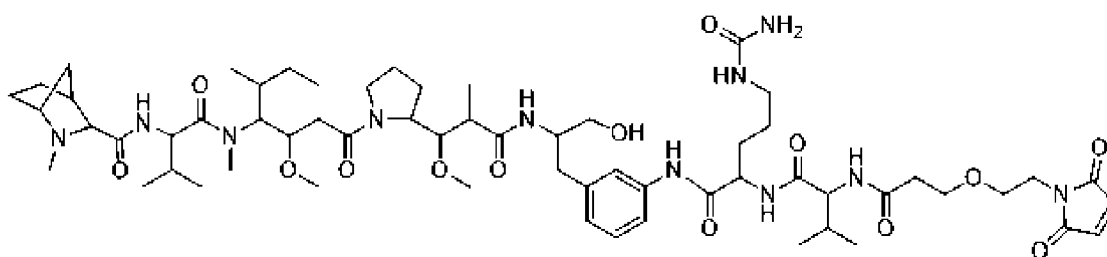
[00253] Вариант осуществления 68. Соединение формулы (D), формулы (D-1) или формулы (D-3) или его фармацевтически приемлемая соль, имеющее структуру формулы (D-12), или его фармацевтически приемлемой соли:



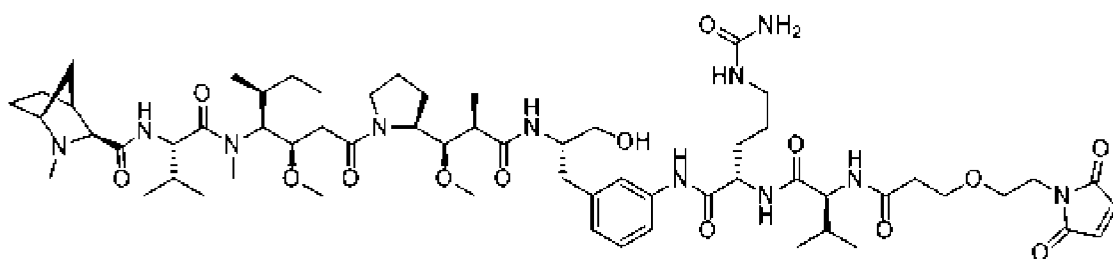
формула (D-12),

где R^5 являются такими, как определено выше для соединений формулы (D).

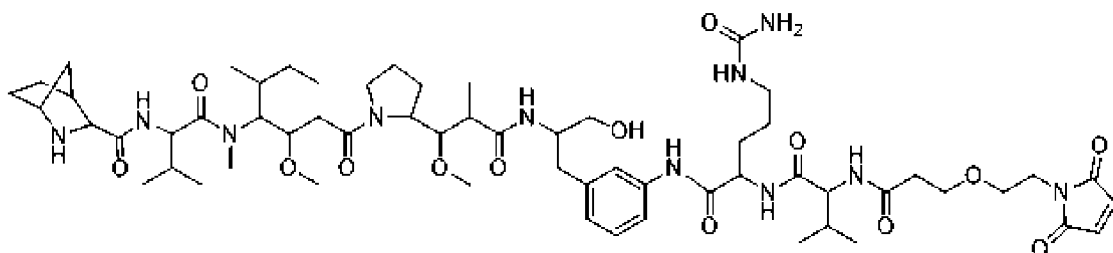
[00254] Вариант осуществления 69. Соединение формулы (D), формулы (D-1) или формулы (D-3) или соединение по варианту осуществления 61, где соединение представляет собой:



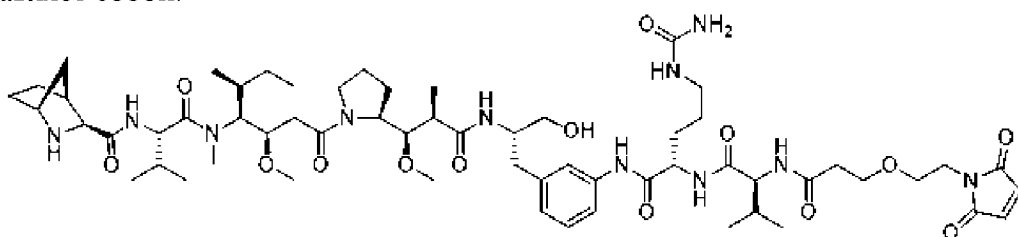
[00255] Вариант осуществления 70. Соединение формулы (D), формулы (D-1) или формулы (D-3) или соединение по варианту осуществления 61, где соединение представляет собой:



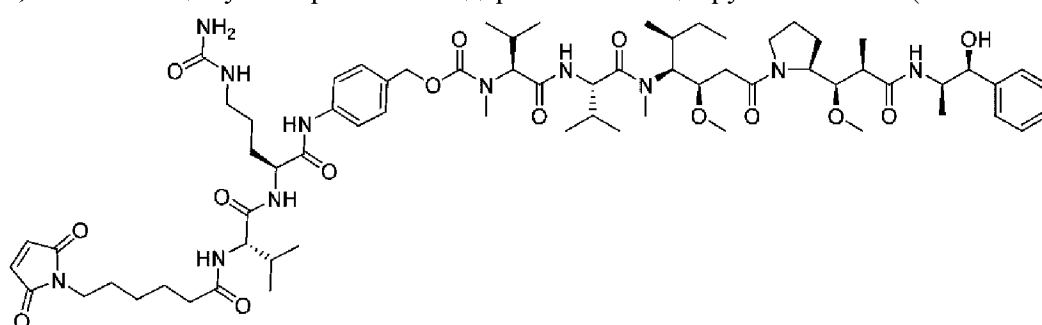
[00256] Вариант осуществления 71. Соединение формулы (D), формулы (D-1) или формулы (D-3) или соединение по варианту осуществления 62, где соединение представляет собой:



[00257] Вариант осуществления 72. Соединение формулы (D), формулы (D-1) или формулы (D-3) или соединение по варианту осуществления 62, где соединение представляет собой:



[00258] В одном аспекте фрагмент, представляющий собой линкер-лекарственное средство, по настоящему изобретению содержит валин-цитрулин MMAE (ValCit-MMAE):



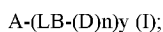
Конъюгаты антитела и лекарственного средства

[00259] В настоящем изобретении предусмотрены конъюгаты антитела и лекарственного средства, где антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент) (например, антигенсвязывающий фрагмент), которые специфически связываются с CD48, соединены с фрагментом, представляющим собой лекарственное средство (например, цитотоксическое средство), необязательно с помощью линкера. В одном аспекте антитело или фрагмент антитела (например,

антигенсвязывающий фрагмент) (например, антигенсвязывающий фрагмент) соединены посредством ковалентной связи за счет линкера с фрагментом, представляющим собой лекарственное средство, которое представляет собой цитотоксическое средство.

[00260] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрены конъюгаты, содержащие антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент) (например, антигенсвязывающий фрагмент), который специфически связывается с CD48, соединенный с фрагментом, представляющим собой лекарственное средство (например, цитотоксическое средство), необязательно с помощью линкера.

[00261] В одном аспекте в настоящем изобретении предусмотрен конъюгат формулы (I):



где

A представляет собой антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент), которые специфически связываются с CD48 человека;

L_B представляет собой линкер;

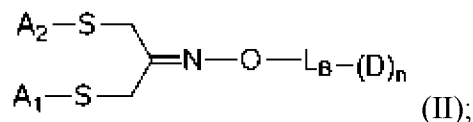
D представляет собой цитотоксическое средство;

n представляет собой целое число от 1 до 10, и

y представляет собой целое число от 1 до 10,

где фрагмент, представляющий собой линкер-лекарственное средство ($L_B-(D)_n$), ковалентно присоединен к антителу или фрагменту антитела (A).

[00262] В одном аспекте настоящее изобретение направлено на конъюгат формулы (II):



A_1 представляет собой антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент), которые специфически связываются с CD48 человека;

A_2 представляет собой антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент), которые специфически связываются с CD48 человека;

L_B представляет собой линкер;

D представляет собой цитотоксическое средство, и

n представляет собой целое число от 1 до 10,

где фрагмент, представляющий собой линкер-лекарственное средство ($L_B-(D)_n$), ковалентно связывает антитело или фрагменты антитела A_1 и A_2 .

[00263] В одном аспекте конъюгаты, раскрытые в данном документе, содержат один или несколько цитотоксинов, ковалентно присоединенных к линкеру (L_B), где один или несколько цитотоксинов независимо выбраны из соединения формулы (A), формулы (A-1), формулы (A-2), формулы (A-3), формулы (A-4), формулы (B), формулы (B-1), формулы (B-2), формулы (B-3) и формулы (B-4) или соединения по любому из вариантов осуществления 7-14 или по любому из вариантов осуществления 23-30.

[00264] В одном аспекте конъюгаты по настоящему изобретению содержат один или несколько цитотоксинов, ковалентно присоединенных к линкеру (L_B), где один или несколько цитотоксинов независимо выбраны из соединения формулы (A), формулы (A-1), формулы (A-2), формулы (A-3) и формулы (A-4) или соединения по любому из вариантов осуществления 7-14.

[00265] В одном аспекте конъюгаты по настоящему изобретению содержат один или несколько цитотоксинов, ковалентно присоединенных к линкеру (L_B), где один или несколько цитотоксинов независимо выбраны из соединения формулы (B), формулы (B-1), формулы (B-2), формулы (B-3) и формулы (B-4) или соединения по любому из вариантов осуществления 23-30.

[00266] В конъюгатах формулы (I) один или несколько фрагментов, представляющих собой линкер-лекарственное средство ($L_B-(D)_n$), могут быть ковалентно присоединены к антителу или фрагменту антитела, A (например, антигенсвязывающему фрагменту), тем самым соединяя ковалентной связью один или несколько фрагментов, представляющих собой лекарственные средства D, с антителом или фрагментом антитела, A (например, антигенсвязывающим фрагментом) с помощью линкера L_B . L_B представляет собой любой химический фрагмент, который способен соединить антитело или фрагмент антитела, A (например, антигенсвязывающий фрагмент) с одним или несколькими фрагментами, представляющими собой лекарственные средства D. Конъюгаты формулы (I), где один или несколько фрагментов, представляющих собой лекарственные средства D, ковалентно связаны с антителом или фрагментом антитела, A (например, антигенсвязывающим фрагментом), могут быть образованы с применением реагента на основе бифункционального или мультифункционального линкера, имеющего одну или несколько реакционноспособных функциональных групп, которые являются одинаковыми или отличающимися. Одну из реакционноспособных функциональных групп реагента на основе бифункционального или мультифункционального линкера применяют для осуществления реакции с группой на антителе или фрагменте антитела, A, в качестве примера, тиольной или аминной (например, на цистеине, N-конце или боковой цепи аминокислоты, такой как лизин), с образованием ковалентной связи с одним концом линкера L_B . Такие реакционноспособные функциональные группы реагента на основе бифункционального или мультифункционального линкера включают без ограничения малеимидную, тиольную и NHS-сложноэфирную. Другую реакционноспособную функциональную группу или группы реагента на основе бифункционального или мультифункционального линкера применяют для ковалентного присоединения одного или нескольких фрагментов, представляющих собой лекарственные средства D, к линкеру L_B .

[00267] В конъюгатах формулы (II) кетоновый мостик образуется за счет реакции боковых тиолов на антителе или фрагментах антитела A_1 и A_2 и 1,3-дигалогенацетона, такого как 1,3-дихлорацетон, 1,3-дибромацетон, 1,3-дийодацетон и биссульфонатные сложные эфиры 1,3-дигидроксиацетона, который тем самым ковалентно связывает антитело или фрагменты антитела A_1 и A_2 . Данный фрагмент, представляющий собой

кетонный мостик, применяют для ковалентного присоединения одного или нескольких фрагментов, представляющих собой лекарственные средства D, к антителу или фрагментам антитела A_1 и A_2 с помощью линкера L_B . L_B представляет собой любой химический фрагмент, который способен соединить антитело или фрагмент антитела, A_1 и A_2 , с одним или несколькими фрагментами, представляющими собой лекарственные средства D. Конъюгаты формулы (II), где один или несколько фрагментов, представляющих собой лекарственные средства D, ковалентно связаны с антителом или фрагментами антитела A_1 и A_2 , могут быть образованы с применением реагента на основе бифункционального или мультифункционального линкера, имеющего одну или несколько реакционноспособных функциональных групп, которые являются одинаковыми или отличающимися. В одном варианте осуществления одна из реакционноспособных функциональных групп реагента на основе бифункционального или мультифункционального линкера представляет собой алкоксиамин, который применяют для осуществления реакции с кетоновым мостиком с образованием оксимной связи с одним концом линкера L_B , а другую реакционноспособную функциональную группу или группы реагента на основе бифункционального или мультифункционального линкера применяют для ковалентного присоединения одного или нескольких фрагментов, представляющих собой лекарственные средства D, к линкеру L_B . В другом варианте осуществления одна из реакционноспособных функциональных групп реагента на основе бифункционального или мультифункционального линкера представляет собой гидразин, который применяют для осуществления реакции с кетоновым мостиком с образованием гидразоновой связи с одним концом линкера L_B , а другую реакционноспособную функциональную группу или группы реагента на основе бифункционального или мультифункционального линкера применяют для ковалентного присоединения одного или нескольких фрагментов, представляющих собой лекарственные средства D, к линкеру L_B .

[00268] В одном аспекте L_B представляет собой расщепляемый линкер. В другом аспекте L_B представляет собой нерасщепляемый линкер. В некоторых аспектах L_B представляет собой кислотолабильный линкер, фотоллабильный линкер, расщепляемый пептидазами линкер, расщепляемый эстеразами линкер, расщепляемый гликозидазами линкер, расщепляемый фосфодиэстеразами линкер, линкер с восстанавливаемой дисульфидной связью, гидрофильный линкер или линкер на основе дикарбоновой кислоты.

[00269] Хотя в конкретной молекуле конъюгата соотношение лекарственного средства к антителу имеет точное целочисленное значение (например, произведение n и y в формуле (I) и " n " в формуле (II)), известно, что зачастую значение будет представлять собой среднее значение, когда его применяют для описания образца, содержащего множество молекул, вследствие некоторой степени неоднородности, как правило, ассоциированной со стадией конъюгации. Средняя нагрузка для образца конъюгата обозначается в данном документе как соотношение лекарственного средства и антитела (или фрагмента антитела) или "DAR". В некоторых аспектах DAR составляет от приблизительно 1 до приблизительно 5, и обычно составляет приблизительно 1, 2, 3 или 4.

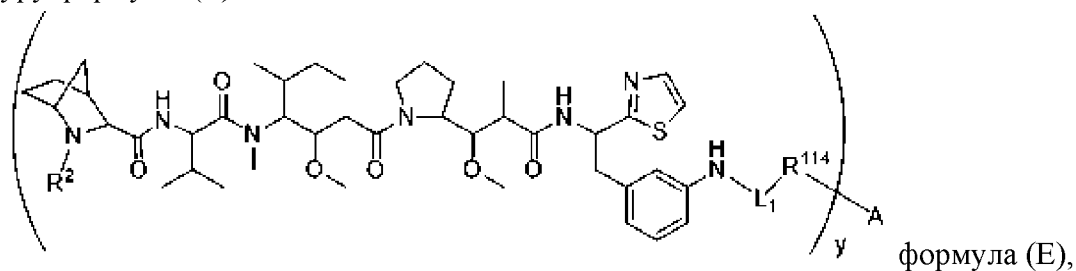
В некоторых аспектах по меньшей мере 50% образца по весу составляет соединение, характеризующееся средним DAR плюс или минус 2, и предпочтительно по меньшей мере 50% образца составляет конъюгат, который подразумевает среднее DAR плюс или минус 1. Другие аспекты включают конъюгаты, в которых DAR составляет приблизительно 2. В некоторых аспектах DAR, составляющее "приблизительно у", означает, что измеренное значение DAR находится в пределах 20% от произведения n и y в формуле (I). В некоторых аспектах DAR, составляющее "приблизительно n ", означает, что измеренное значение DAR находится в пределах 20% от n в формуле (II).

[00270] В одном аспекте среднее молярное соотношение лекарственного средства и антитела или фрагмента антитела в конъюгатах формулы (I) (т. е. среднее значение произведения n и y , также известное как соотношение лекарственного средства и антитела (DAR)) составляет от приблизительно 1 до приблизительно 10, от приблизительно 1 до приблизительно 6 (например, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 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), от приблизительно 1 до приблизительно 5, от приблизительно 1,5 до приблизительно 4,5 или от приблизительно 2 до приблизительно 4.

[00271] В одном аспекте среднее молярное соотношение лекарственного средства и антитела или фрагментов антитела A_1 и A_2 в конъюгатах формулы (II) (т. е. среднее значение n , также известное как соотношение лекарственного средства и антитела (DAR)) составляет от приблизительно 1 до приблизительно 10, от приблизительно 1 до приблизительно 6 (например, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 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), от приблизительно 1 до приблизительно 5, от приблизительно 1,5 до приблизительно 4,5 или от приблизительно 2 до приблизительно 4.

[00272] В одном аспекте предусмотренный в настоящем изобретении конъюгат характеризуется в значительной степени высокой чистотой и имеет один или несколько из следующих признаков: (a) более приблизительно 90% (например, более или равно приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%), предпочтительно более приблизительно 95% видов конъюгата являются мономерными, (b) уровень неконъюгированного линкера в препарате конъюгата составляет менее приблизительно 10% (например, менее или равно приблизительно 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или 0%) (относительно общего количества линкера), (c) менее 10% видов конъюгата являются сшитыми (например, менее или равно приблизительно 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или 0%), (d) уровень свободного лекарственного средства (например, ауристатина, амантина, майтанзиноида или сапорина) в препарате конъюгата составляет менее приблизительно 2% (например, менее или равно приблизительно 1,5%, 1,4%, 1,3%, 1,2%, 1,1%, 1,0%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1% или 0%) (моль/моль относительно общего количества цитотоксического средства).

[00273] В одном аспекте конъюгаты, раскрытые в данном документе, имеют структуру формулы (E):



где

A представляет антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент), которые специфически связываются с CD48 человека;

y представляет собой целое число от 1 до 10;

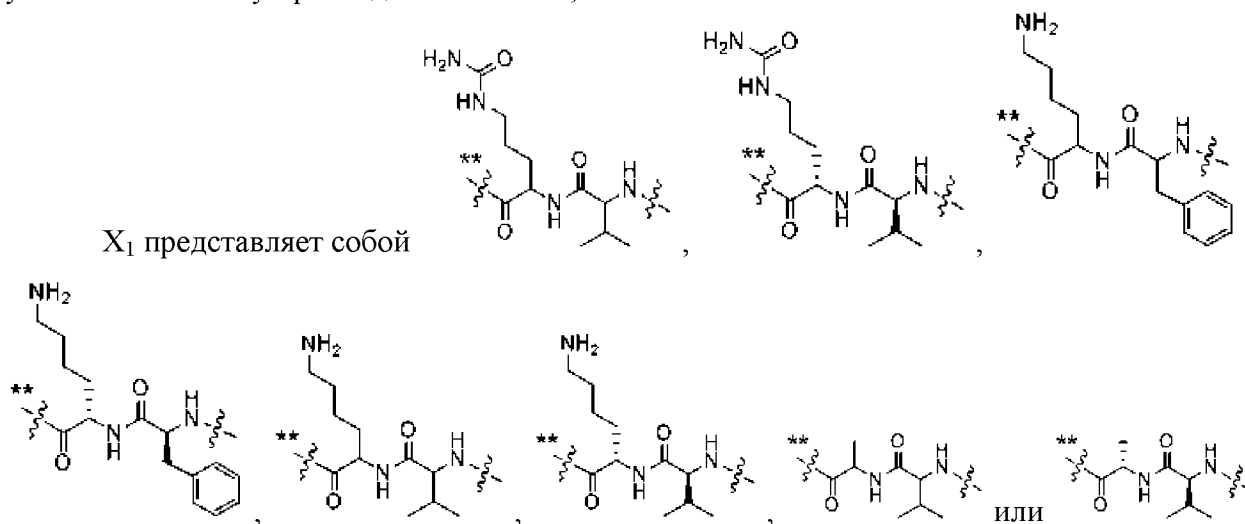
R^2 представляет собой H, C_1 - C_6 алкил, $-C(=O)R^3$, $-(CH_2)_mOH$, $-C(=O)(CH_2)_mOH$, $-C(=O)((CH_2)_mO)_nR^4$, $-((CH_2)_mO)_nR^4$ или C_1 - C_6 алкил, который необязательно замещен $-CN$, $-C(=O)NH_2$ или 1-5 гидроксис;

каждый R^3 независимо выбран из C_1 - C_6 алкила и C_1 - C_6 алкила, который необязательно замещен 1-5 гидроксислами;

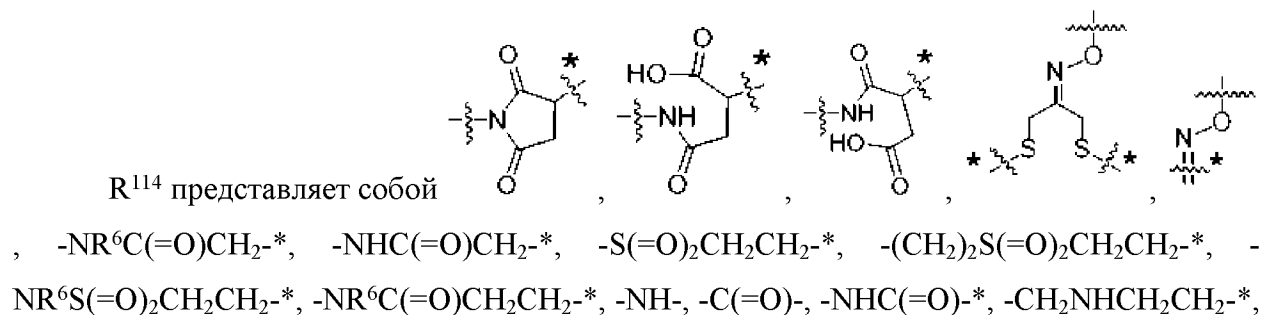
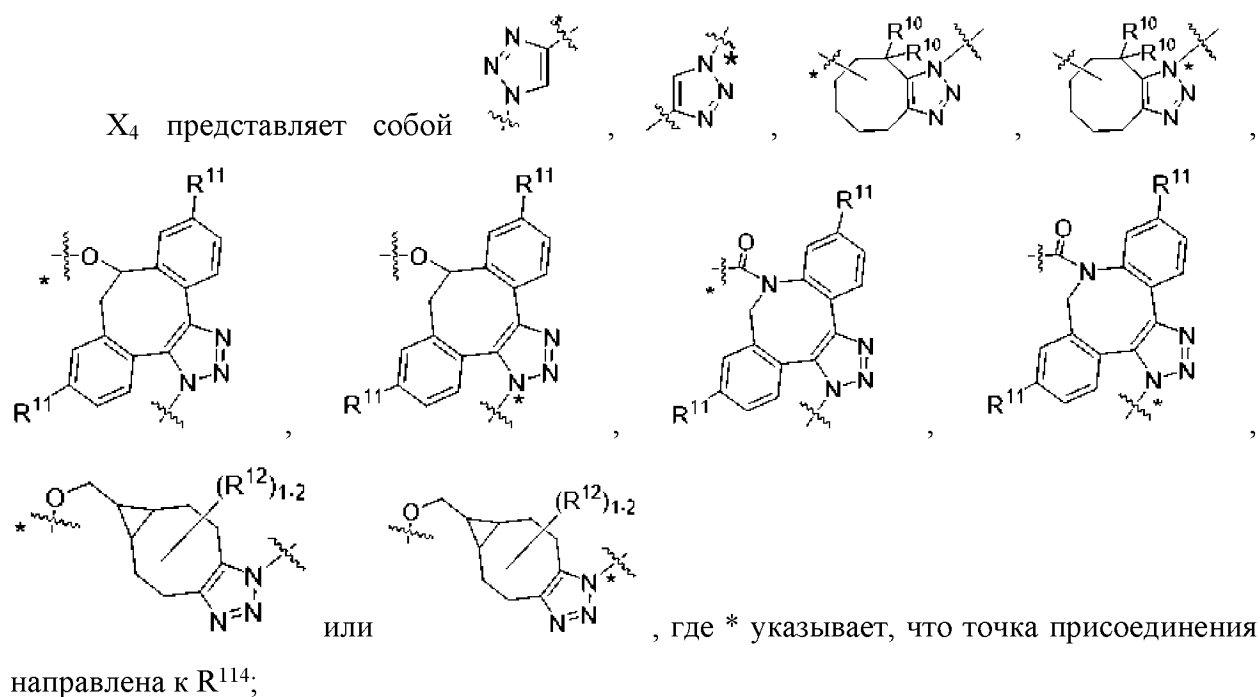
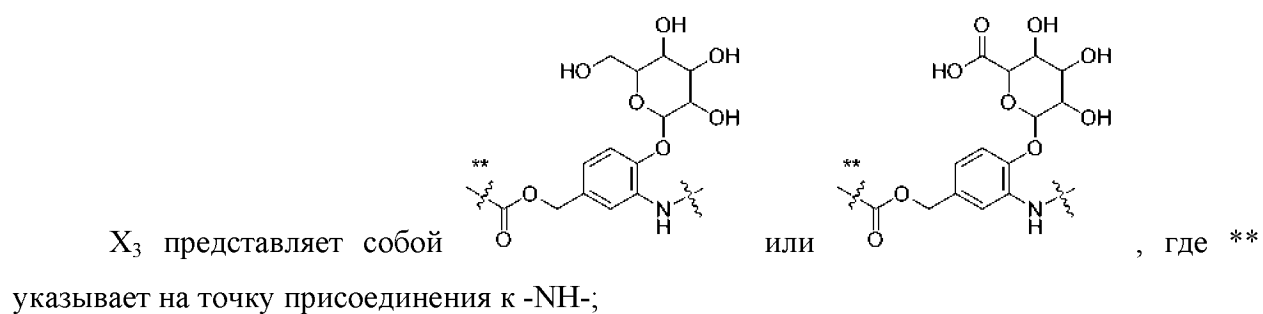
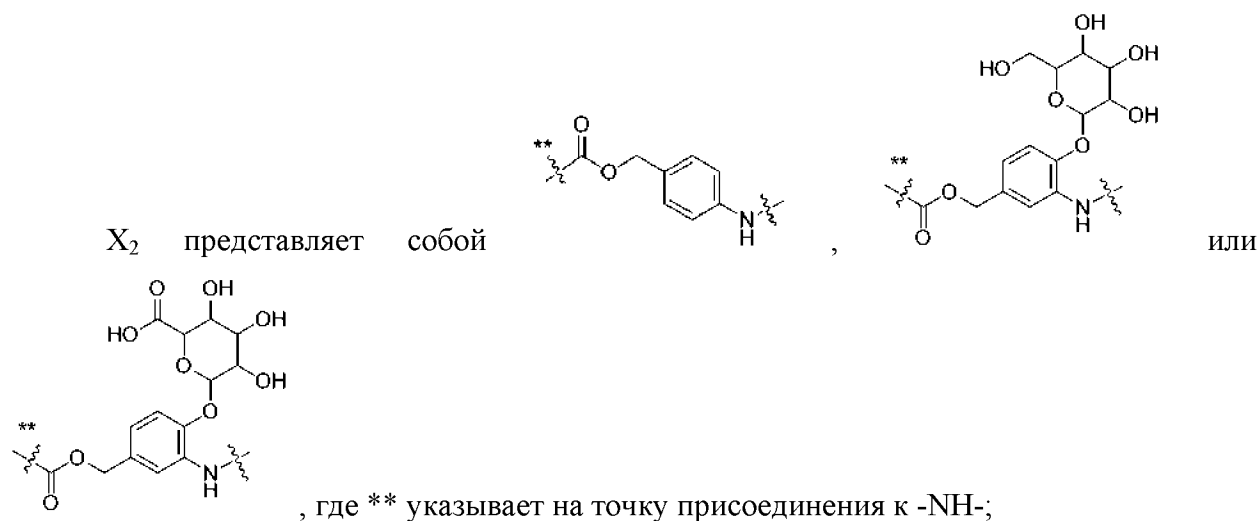
каждый R^4 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила;

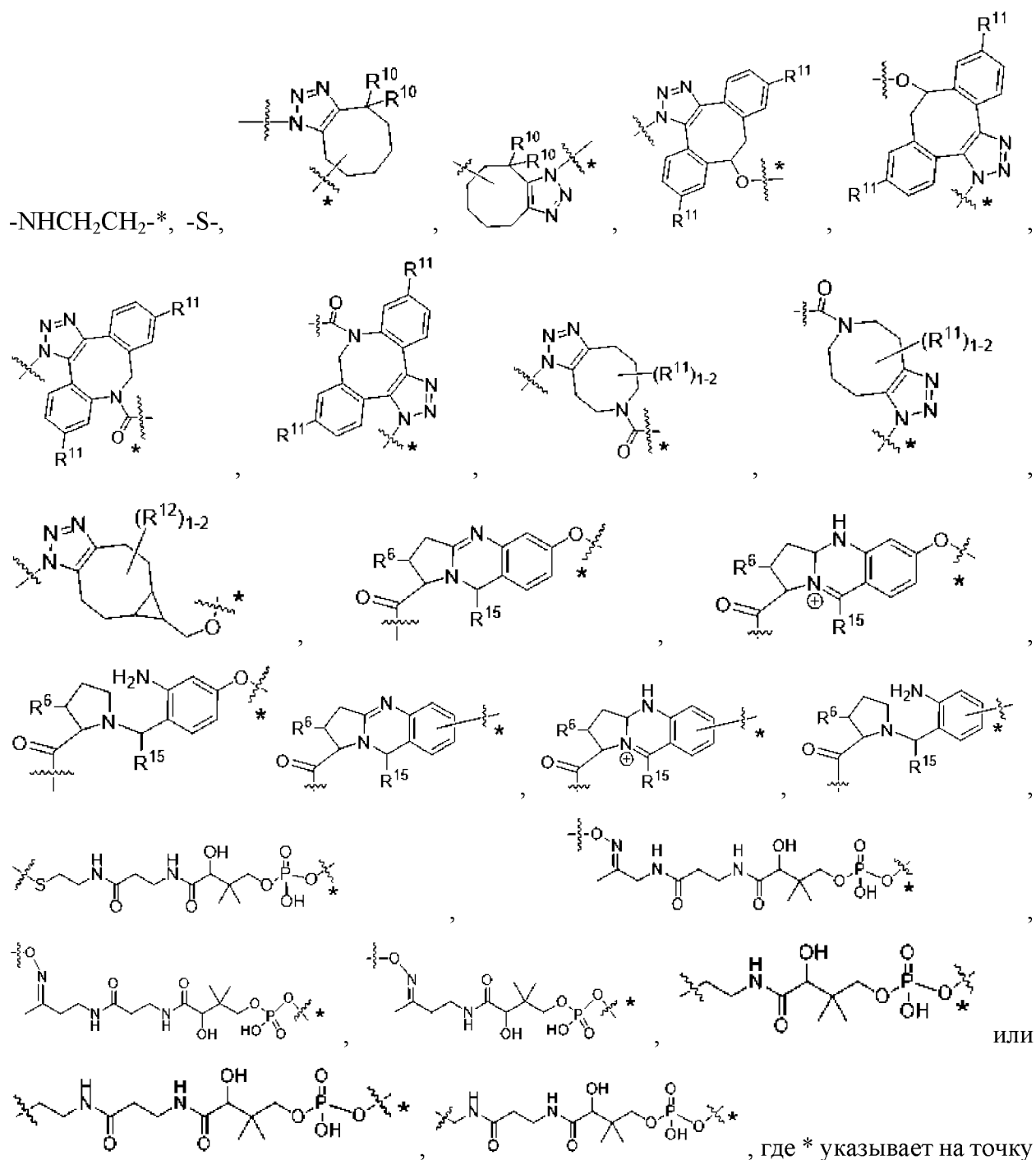
L_1 представляет собой $-X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_1C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_2X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_2X_1C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$, $-X_1C(=O)(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$, $-X_2X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$ или $-X_2X_1C(=O)(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$, где ** указывает на точку присоединения к R^{114} ;

X_1 представляет собой



, где ** указывает на точку присоединения к $-NH-$ или к X_2 ;





каждый R^6 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила;

каждый R^{10} независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила, F, Cl и -OH;

каждый R^{11} независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила, F, Cl, $-\text{NH}_2$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$ и -OH;

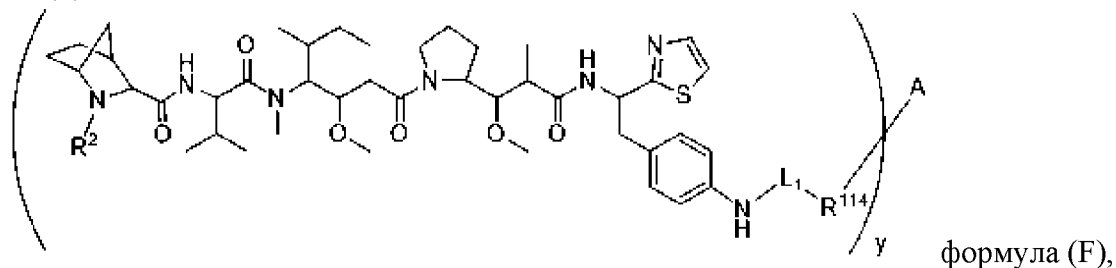
каждый R^{12} независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила, фтора, бензилокси, замещенного - $\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, бензила, замещенного - $\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, C_1 - C_4 алкокси, замещенного - $\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, и C_1 - C_4 алкила, замещенного - $\text{C}(=\text{O})\text{OH}$;

каждый R^{15} независимо выбран из H, $-\text{CH}_3$ и фенила;

каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10, и

каждый p независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14.

[00274] В одном аспекте конъюгаты по настоящему изобретению имеют структуру формулы (F):



где

A представляет антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент), которые специфически связываются с CD48 человека;

y представляет собой целое число от 1 до 10;

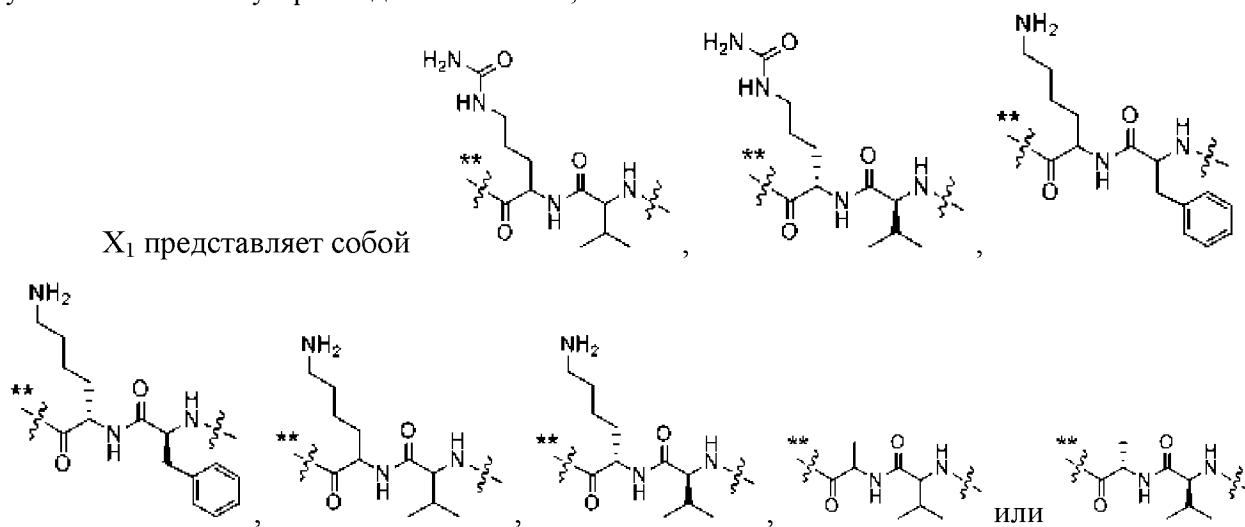
R^2 представляет собой H , C_1 - C_6 алкил, $-C(=O)R^3$, $-(CH_2)_mOH$, $-C(=O)(CH_2)_mOH$, $-C(=O)((CH_2)_mO)_nR^4$, $-((CH_2)_mO)_nR^4$ или C_1 - C_6 алкил, который необязательно замещен $-CN$, $-C(=O)NH_2$ или 1-5 гидроксигруппами;

каждый R^3 независимо выбран из C_1 - C_6 алкила и C_1 - C_6 алкила, который необязательно замещен 1-5 гидроксигруппами;

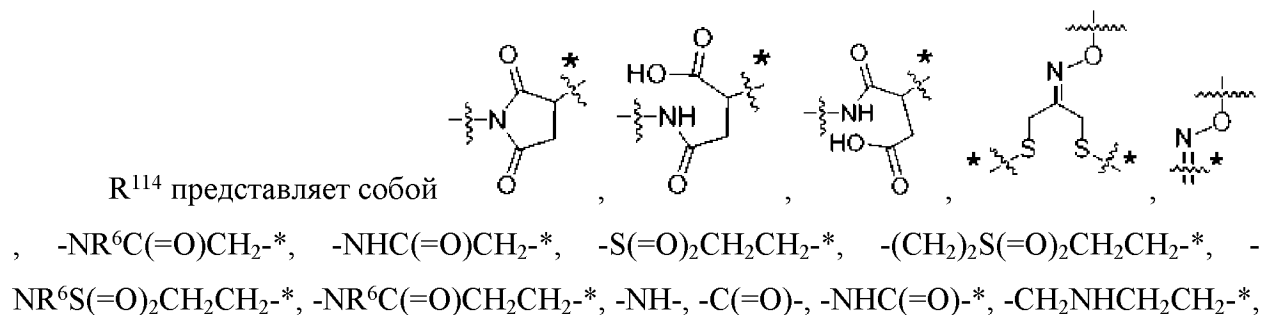
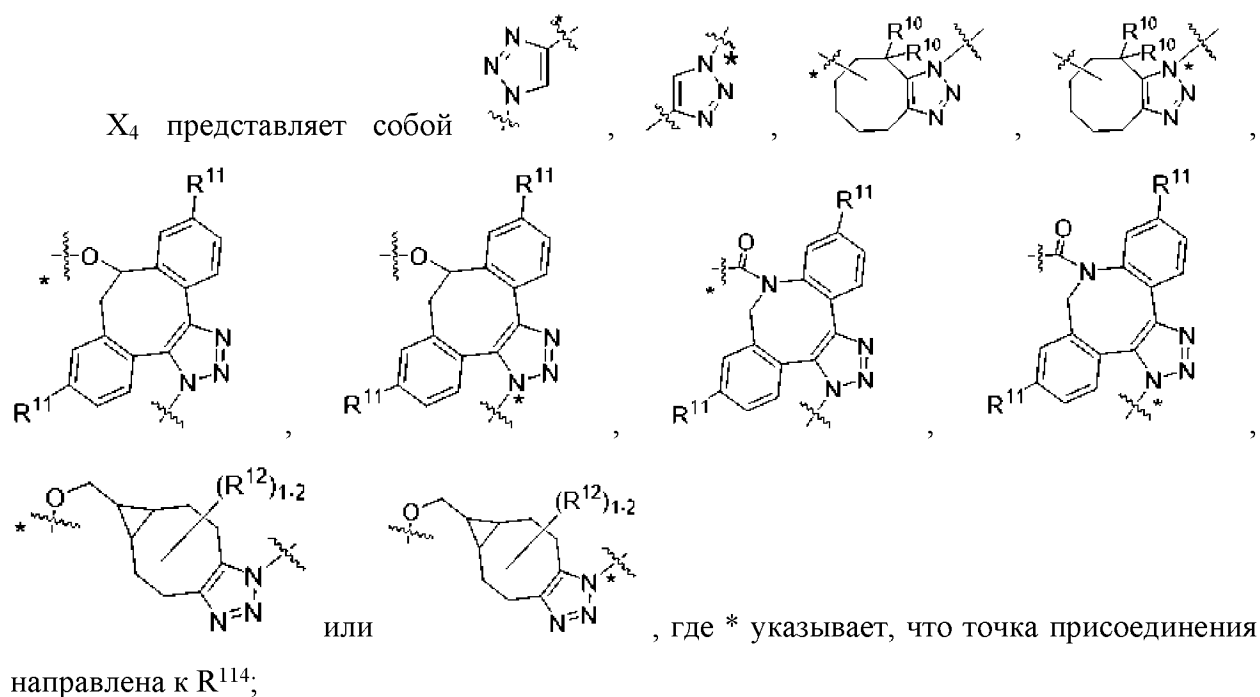
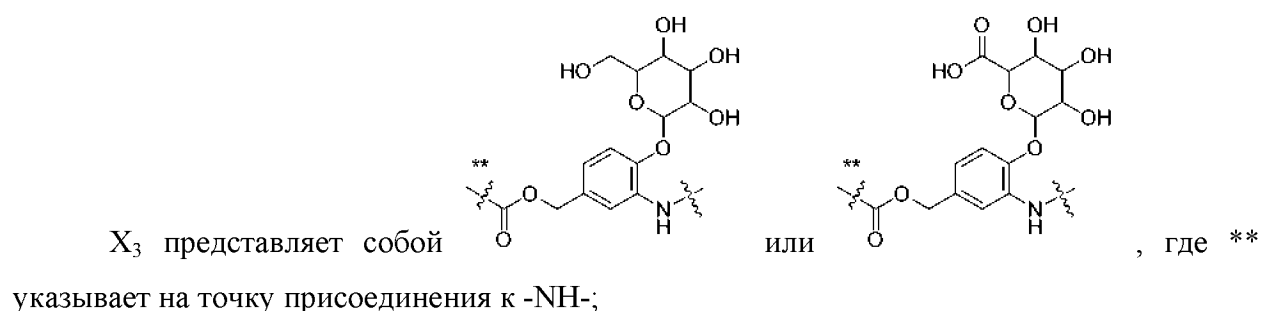
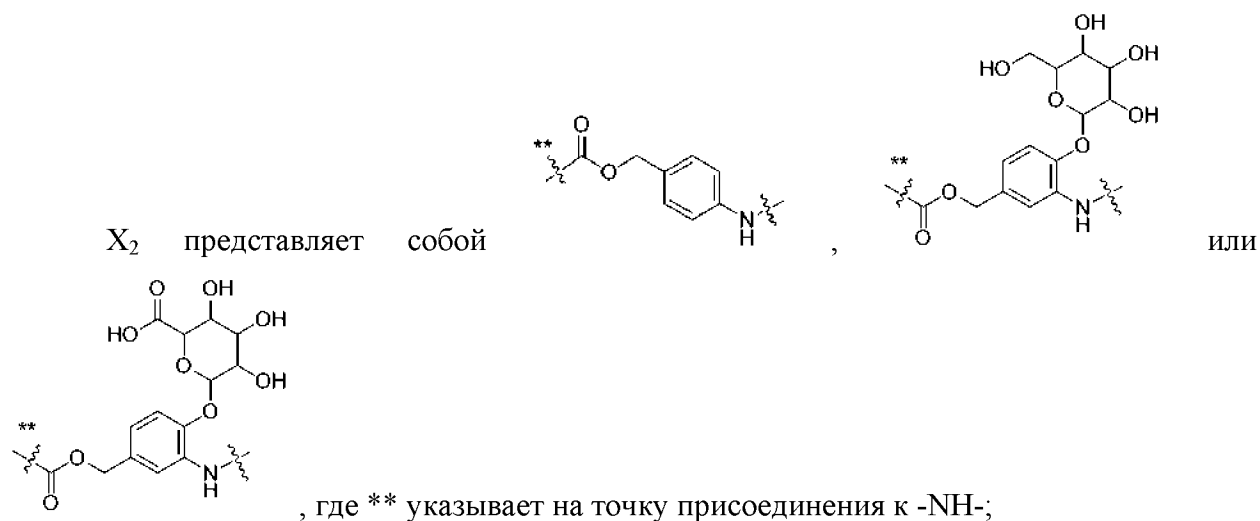
каждый R^4 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила;

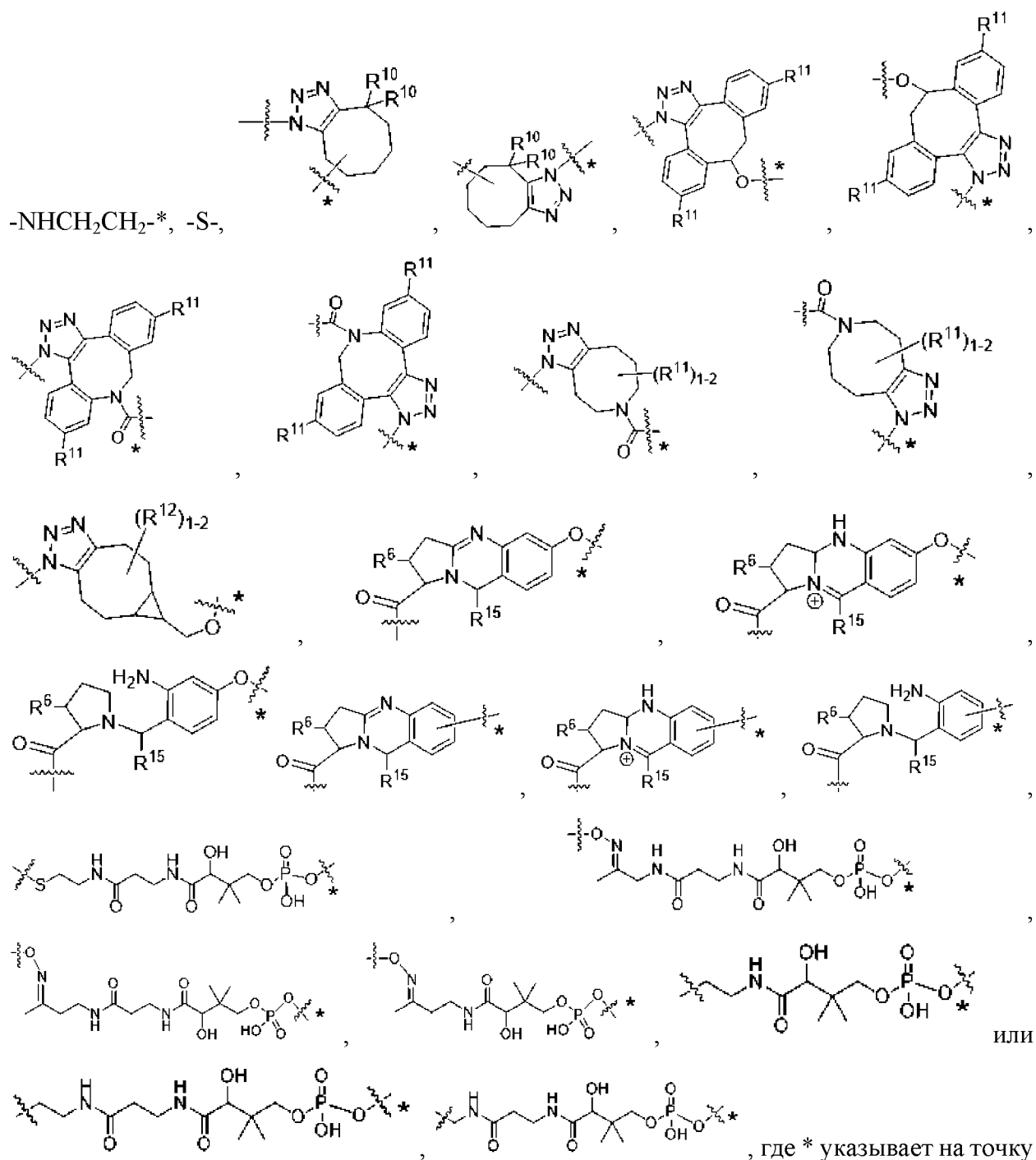
L_1 представляет собой $-X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_1C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_2X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_2X_1C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$, $-X_1C(=O)(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$, $X_2X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$ или $-X_2X_1C(=O)(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$, где $**$ указывает на точку присоединения к R^{114} ;

X_1 представляет собой



, где $**$ указывает на точку присоединения к $-NH-$ или к X_2 ;





каждый R^6 независимо выбран из H и $C_1\text{-}C_6$ алкила;

каждый R^{10} независимо выбран из H, $C_1\text{-}C_6$ алкила, F, Cl и -OH;

каждый R^{11} независимо выбран из H, $C_1\text{-}C_6$ алкила, F, Cl, -NH_2 , -OCH_3 , $\text{-OCH}_2\text{CH}_3$, $\text{-N(CH}_3)_2$, -CN , -NO_2 и -OH;

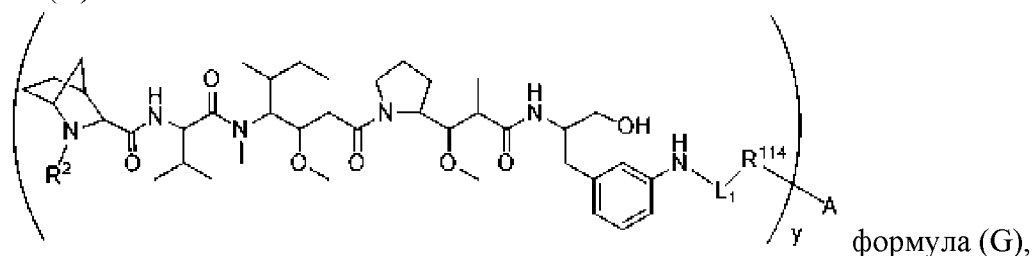
каждый R^{12} независимо выбран из H, $C_1\text{-}C_6$ алкила, фтора, бензилокси, замещенного -C(=O)OH , бензила, замещенного -C(=O)OH , $C_1\text{-}C_4$ алкокси, замещенного -C(=O)OH , и $C_1\text{-}C_4$ алкила, замещенного -C(=O)OH ;

каждый R^{15} независимо выбран из H, -CH_3 и фенила;

каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10, и

каждый p независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14.

[00275] В одном аспекте конъюгаты по настоящему изобретению имеют структуру формулы (G):



где

A представляет антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент), которые специфически связываются с CD48 человека;

y представляет собой целое число от 1 до 10;

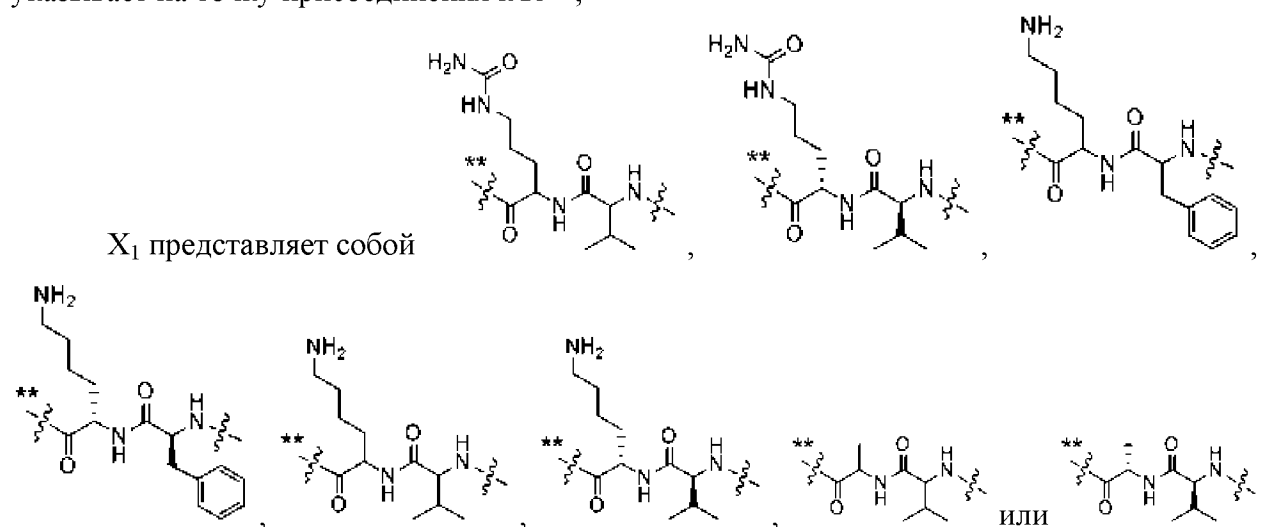
R^2 представляет собой H , C_1 - C_6 алкил, $-C(=O)R^3$, $-(CH_2)_mOH$, $-C(=O)(CH_2)_mOH$, $-C(=O)((CH_2)_mO)_nR^4$, $-((CH_2)_mO)_nR^4$ или C_1 - C_6 алкил, который необязательно замещен $-CN$, $-C(=O)NH_2$ или 1-5 гидроксильными группами;

каждый R^3 независимо выбран из C_1 - C_6 алкила и C_1 - C_6 алкила, который необязательно замещен 1-5 гидроксильными группами;

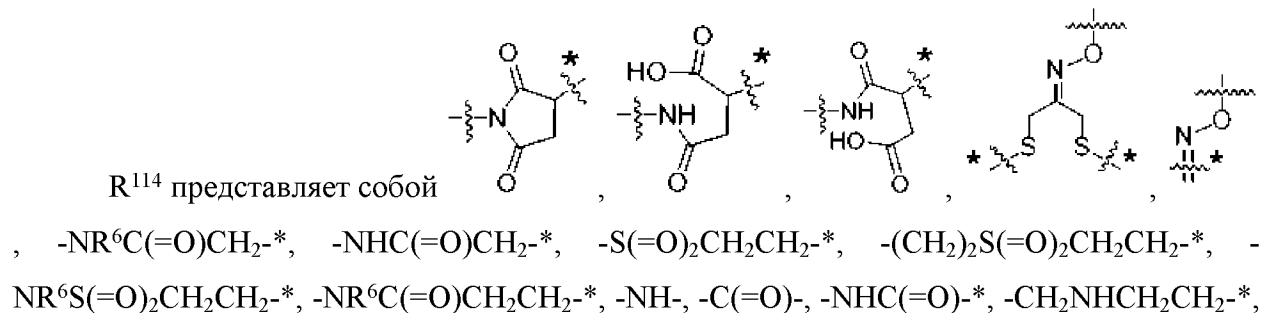
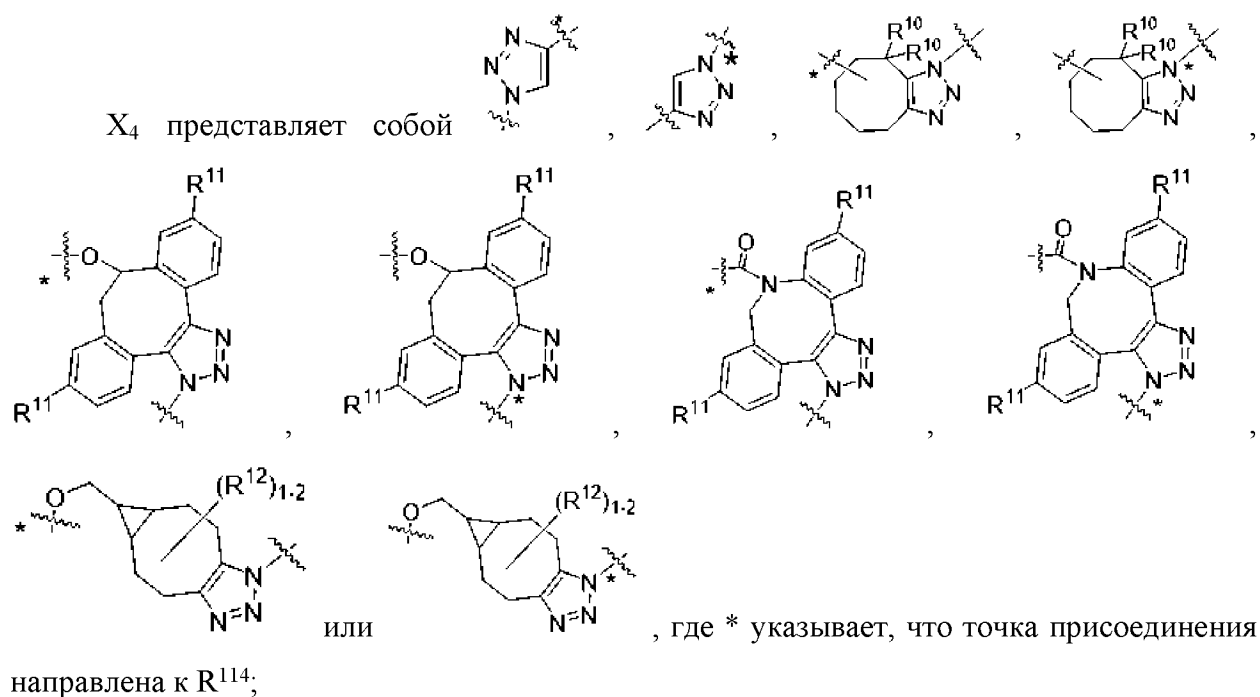
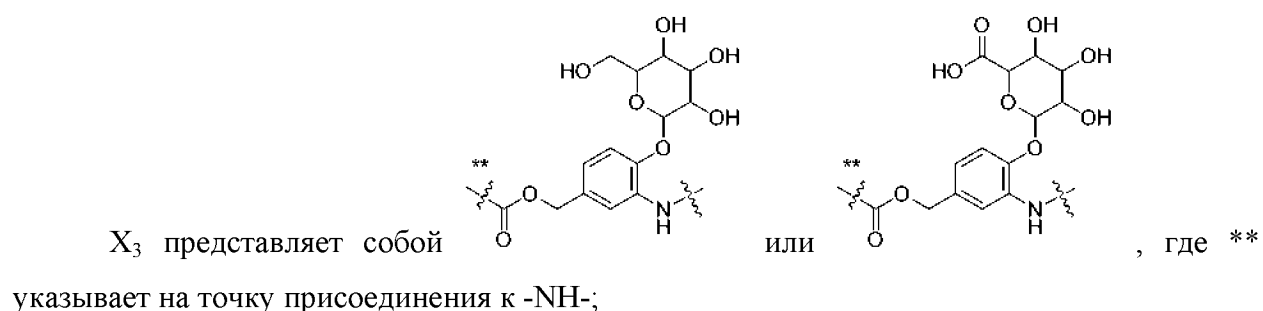
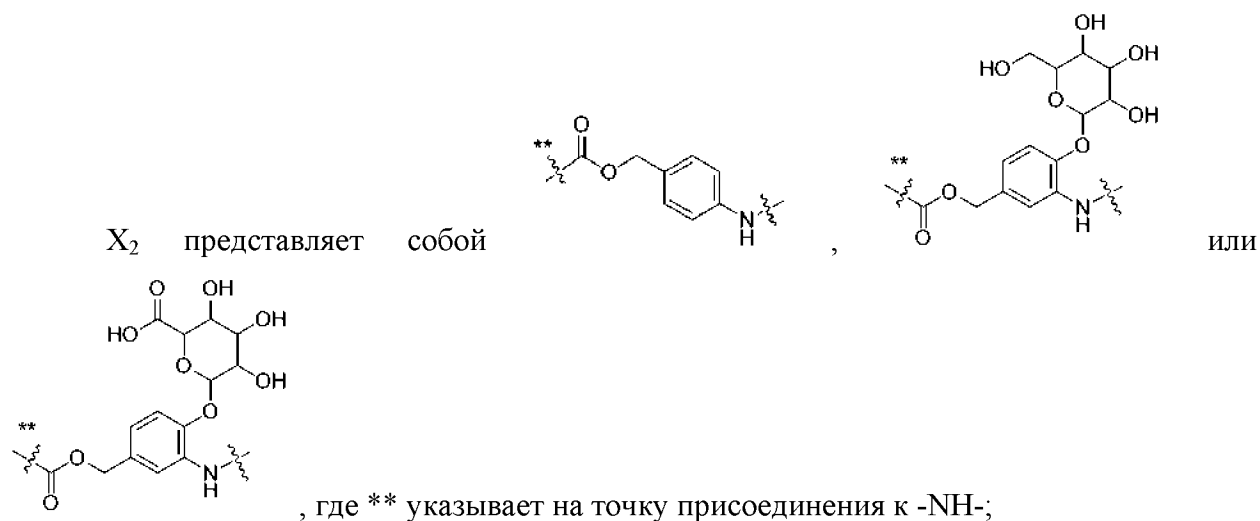
каждый R^4 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила;

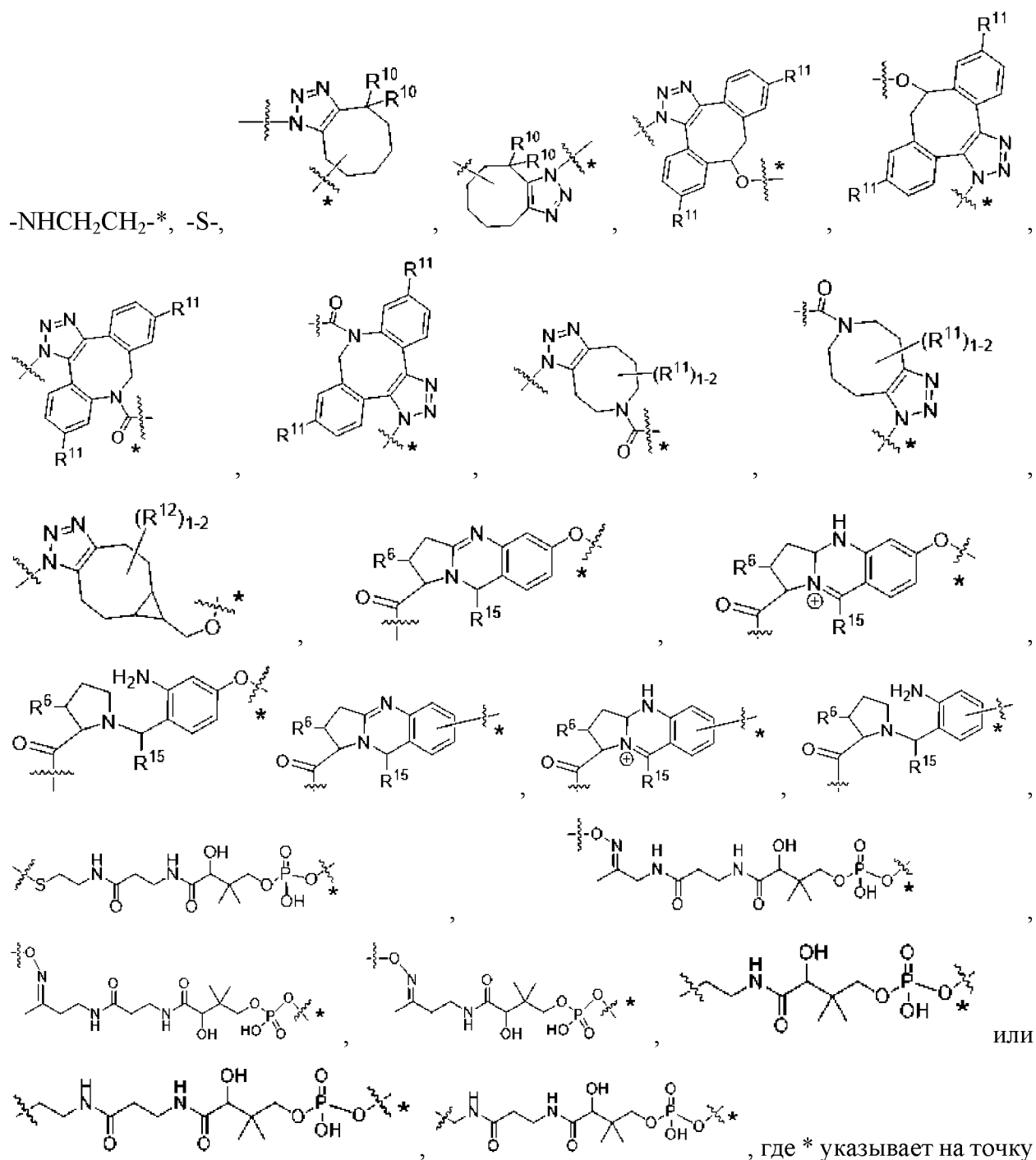
L_1 представляет собой $-X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_1C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_2X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_2X_1C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$, $-X_1C(=O)(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$, $-X_2X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$ или $-X_2X_1C(=O)(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$, где $**$ указывает на точку присоединения к R^{114} ,

X_1 представляет собой



, где $**$ указывает на точку присоединения к $-NH-$ или к X_2 ;





каждый R^6 независимо выбран из H и $C_1\text{-}C_6$ алкила;

каждый R^{10} независимо выбран из H, $C_1\text{-}C_6$ алкила, F, Cl и -OH;

каждый R^{11} независимо выбран из H, $C_1\text{-}C_6$ алкила, F, Cl, -NH_2 , -OCH_3 , $\text{-OCH}_2\text{CH}_3$, $\text{-N(CH}_3)_2$, -CN , -NO_2 и -OH;

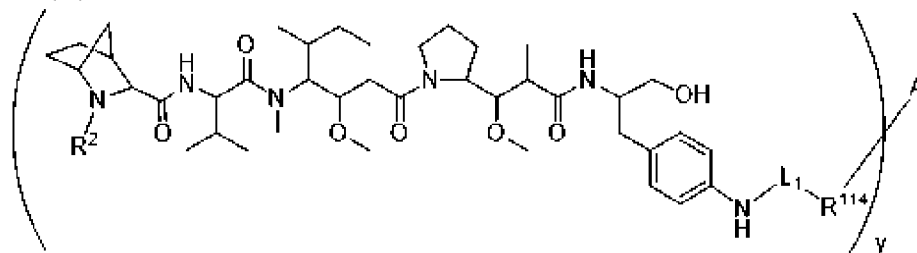
каждый R^{12} независимо выбран из H, $C_1\text{-}C_6$ алкила, фтора, бензилокси, замещенного -C(=O)OH , бензила, замещенного -C(=O)OH , $C_1\text{-}C_4$ алкокси, замещенного -C(=O)OH , и $C_1\text{-}C_4$ алкила, замещенного -C(=O)OH ;

каждый R^{15} независимо выбран из H, -CH_3 и фенила;

каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10, и

каждый p независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14.

[00276] В одном аспекте конъюгаты по настоящему изобретению имеют структуру формулы (H):



формула (H),

где

A представляет антитело или фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент), которые специфически связываются с CD48 человека;

y представляет собой целое число от 1 до 10;

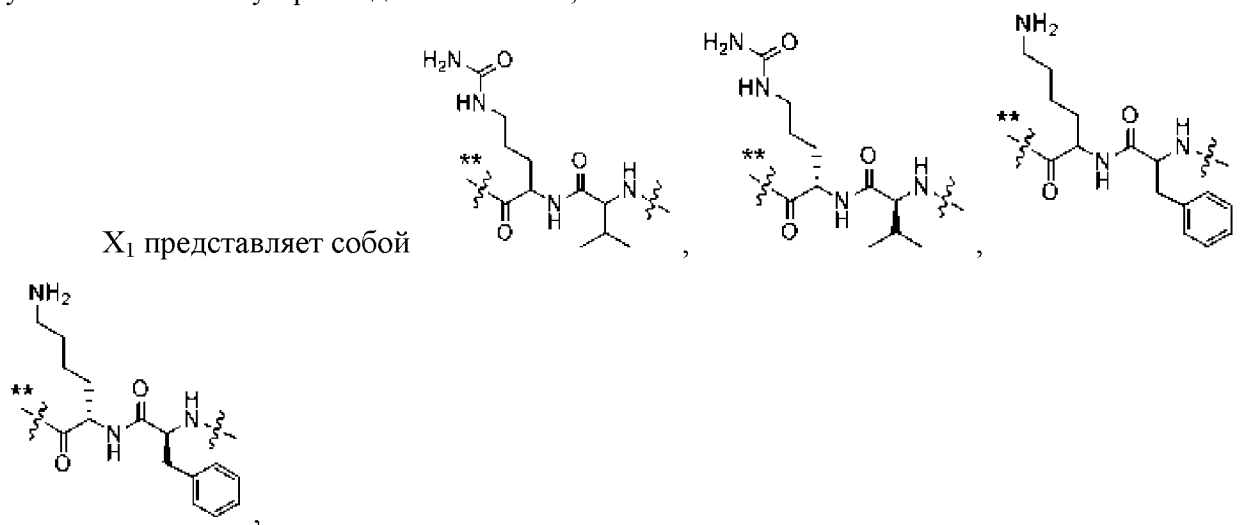
R^2 представляет собой H, C_1 - C_6 алкил, $-C(=O)R^3$, $-(CH_2)_mOH$, $-C(=O)(CH_2)_mOH$, $-C(=O)((CH_2)_mO)_nR^4$, $-((CH_2)_mO)_nR^4$ или C_1 - C_6 алкил, который необязательно замещен $-CN$, $-C(=O)NH_2$ или 1-5 гидроксими;

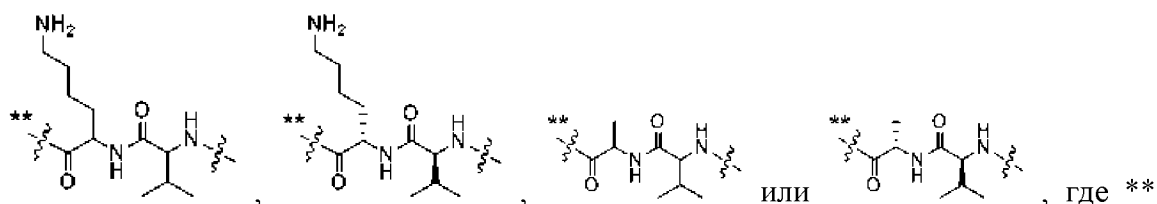
каждый R^3 независимо выбран из C_1 - C_6 алкила и C_1 - C_6 алкила, который необязательно замещен 1-5 гидроксими;

каждый R^4 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила;

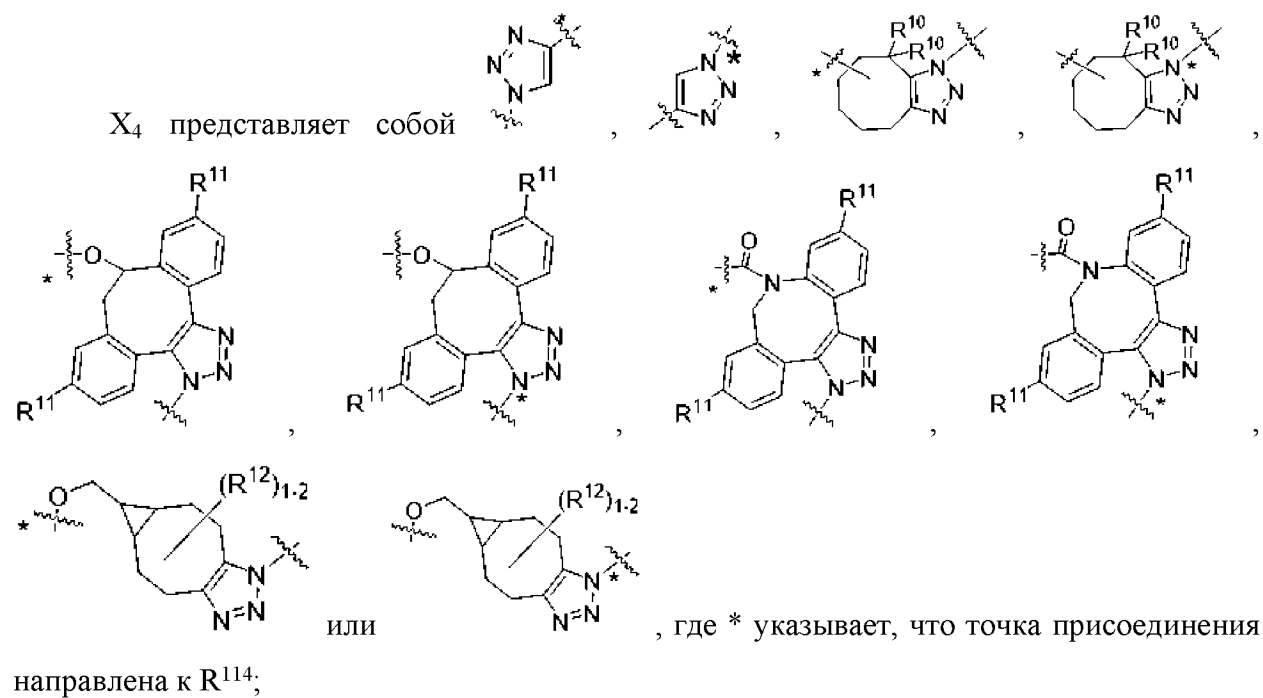
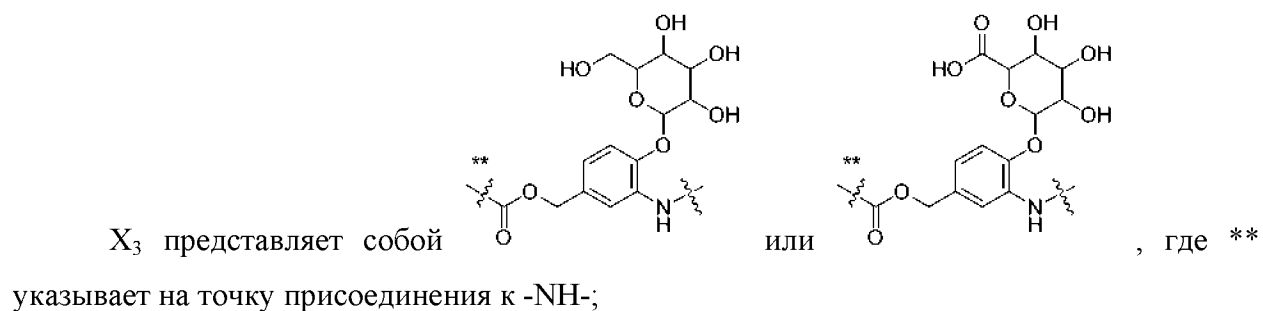
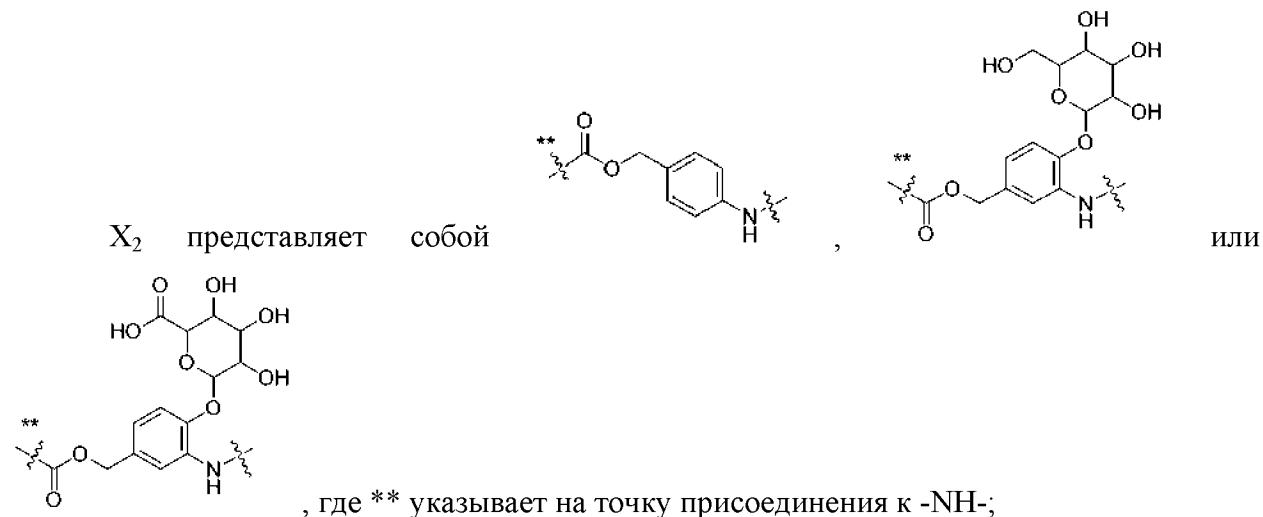
L_1 представляет собой $-X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_1C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_2X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_2X_1C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$, $-X_1C(=O)(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$, $X_2X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$ или $-X_2X_1C(=O)(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$, где $**$ указывает на точку присоединения к R^{114} ;

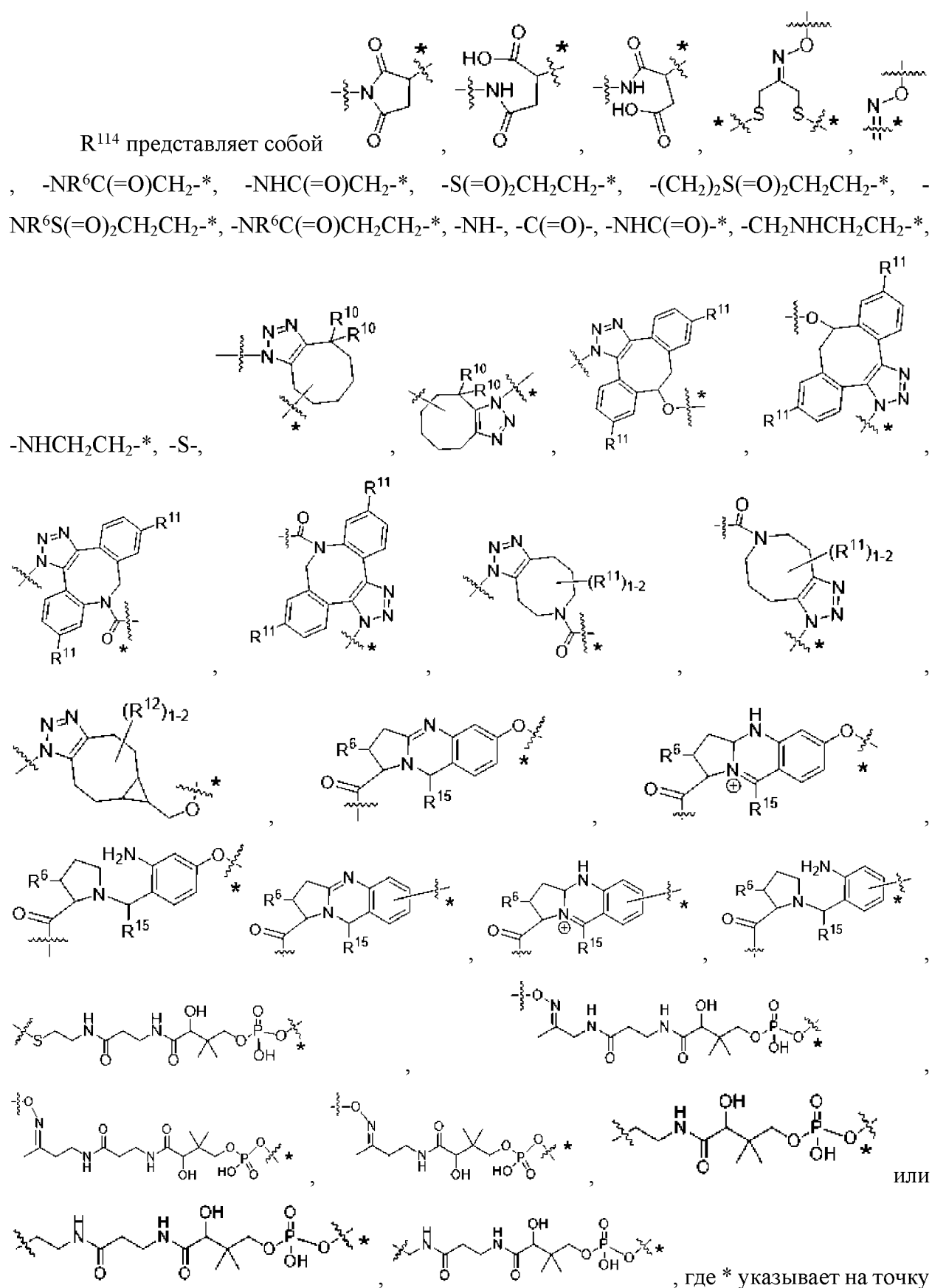
X_1 представляет собой





указывает на точку присоединения к -NH- или к X₂;





каждый R^6 независимо выбран из H и C_1-C_6 алкила;

каждый R^{10} независимо выбран из H, C_1-C_6 алкила, F, Cl и -OH;

каждый R^{11} независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила, F, Cl, $-NH_2$, $-OCH_3$, $-OCH_2CH_3$, $-N(CH_3)_2$, $-CN$, $-NO_2$ и $-OH$;

каждый R^{12} независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила, фтора, бензилокси, замещенного $-C(=O)OH$, бензила, замещенного $-C(=O)OH$, C_1 - C_4 алкокси, замещенного $-C(=O)OH$, и C_1 - C_4 алкила, замещенного $-C(=O)OH$;

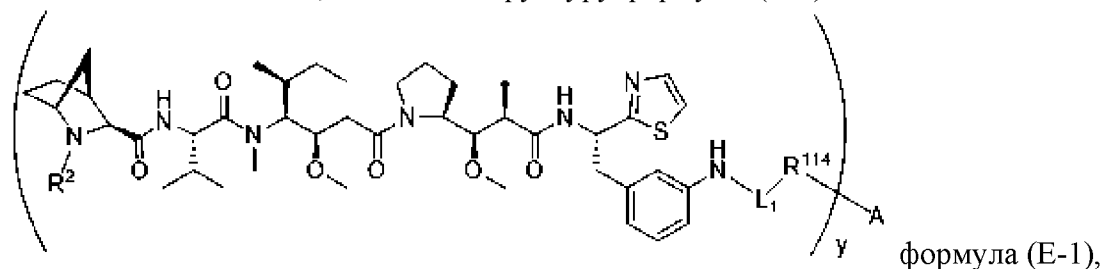
каждый R^{15} независимо выбран из H, $-CH_3$ и фенила;

каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10, и

каждый p независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14.

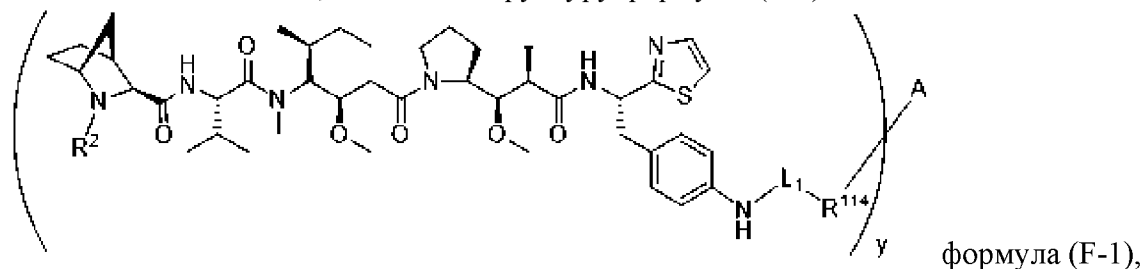
[00277] Определенные аспекты и примеры конъюгатов предусмотрены в следующем перечне дополнительных пронумерованных вариантов осуществления. Следует понимать, что признаки, описанные в каждом варианте осуществления, можно объединять с другими указанными признаками с получением дополнительных вариантов осуществления настоящего изобретения.

[00278] Вариант осуществления 73. Конъюгат, имеющий структуру формулы (E), представляет собой конъюгат, имеющий структуру формулы (E-1):



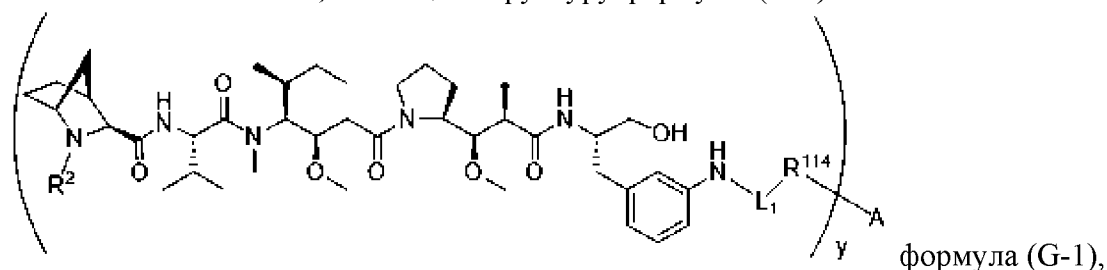
где R^2 , R^{114} , A, y и L_1 являются такими, как определено для конъюгатов формулы (E) выше.

[00279] Вариант осуществления 74. Конъюгат, имеющий структуру формулы (F), представляет собой конъюгат, имеющий структуру формулы (F-1):



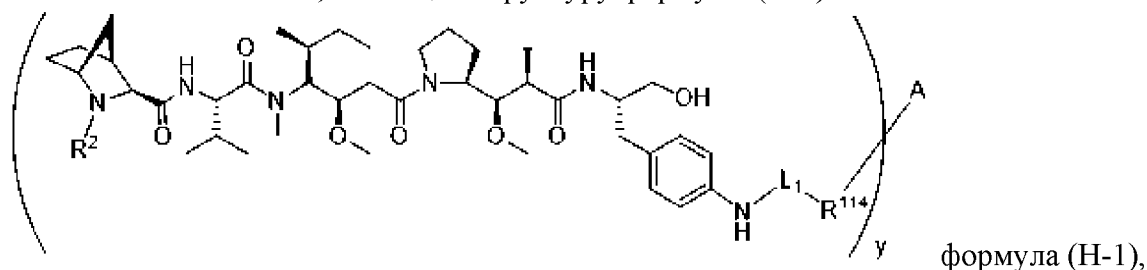
где R^2 , R^{114} , A, y и L_1 являются такими, как определено для конъюгатов формулы (F) выше.

[00280] Вариант осуществления 75. Конъюгат, имеющий структуру формулы (G), представляет собой конъюгат, имеющий структуру формулы (G-1):



где R^2 , R^{114} , A, y и L_1 являются такими, как определено для конъюгатов формулы (G) выше.

[00281] Вариант осуществления 76. Конъюгат, имеющий структуру формулы (H), представляет собой конъюгат, имеющий структуру формулы (H-1):



где R^2 , R^{114} , A, y и L_1 являются такими, как определено для конъюгатов формулы (H) выше.

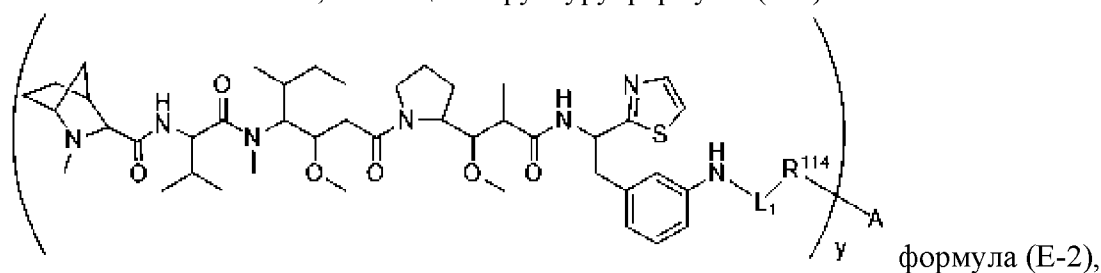
[00282] Вариант осуществления 77. Конъюгат формулы (E), формулы (F), формулы (G), формулы (H) или по любому из вариантов осуществления 69-72, где R^2 представляет собой H или C_1 - C_6 алкил.

[00283] Вариант осуществления 78. Конъюгат формулы (E), формулы (F), формулы (G), формулы (H) или по любому из вариантов осуществления 69-72, где R^2 представляет собой H или метил.

[00284] Вариант осуществления 79. Конъюгат формулы (E), формулы (F), формулы (G), формулы (H) или по любому из вариантов осуществления 69-72, где R^2 представляет собой H.

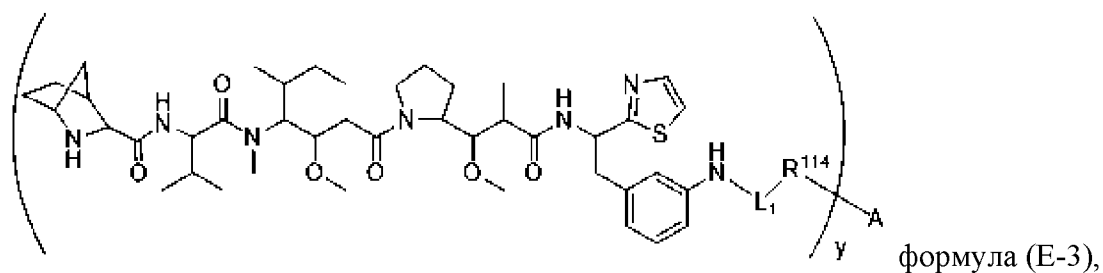
[00285] Вариант осуществления 80. Конъюгат формулы (E), формулы (F), формулы (G), формулы (H) или по любому из вариантов осуществления 69-72, где R^2 представляет собой метил.

[00286] Вариант осуществления 81. Конъюгат, имеющий структуру формулы (E), представляет собой конъюгат, имеющий структуру формулы (E-2):



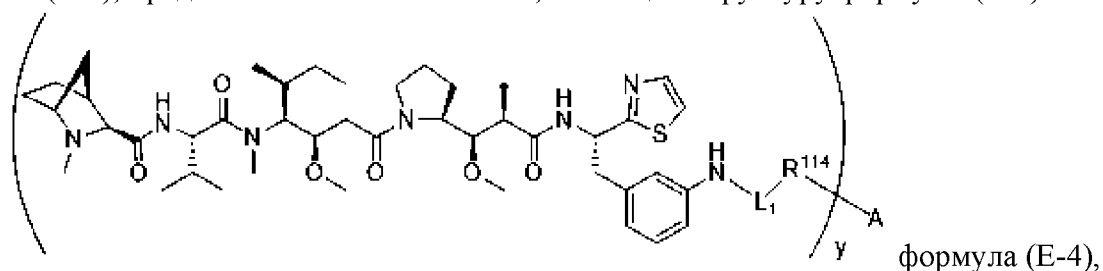
где R^{114} , A, y и L_1 являются такими, как определено для конъюгатов формулы (E) выше.

[00287] Вариант осуществления 82. Конъюгат, имеющий структуру формулы (E), представляет собой конъюгат, имеющий структуру формулы (E-3):



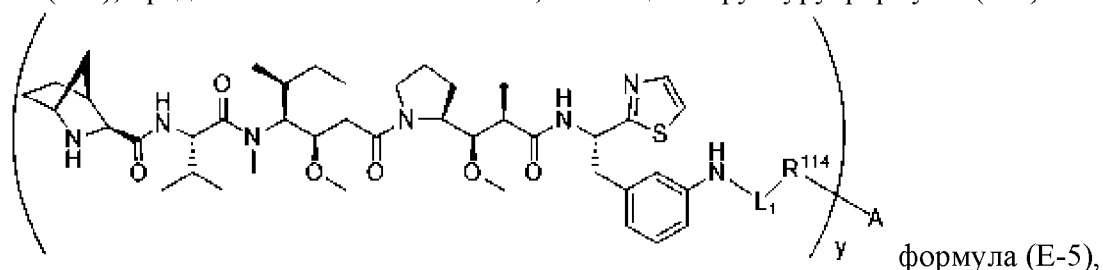
где R^{114} , A, y и L_1 являются такими, как определено для конъюгатов формулы (E) выше.

[00288] Вариант осуществления 83. Конъюгат, имеющий структуру формулы (E) или формулы (E-1), представляет собой конъюгат, имеющий структуру формулы (E-4):



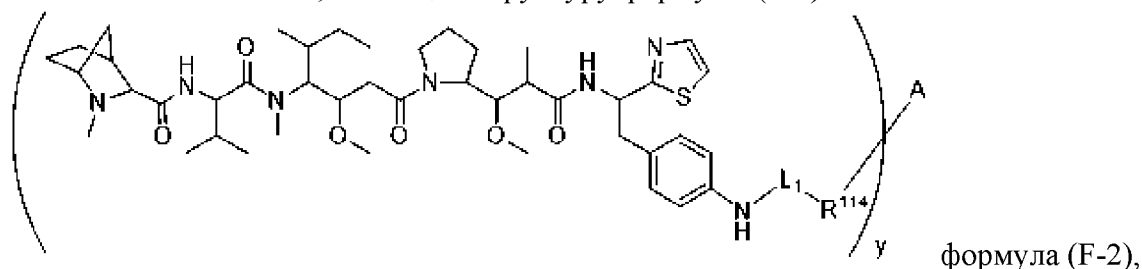
где R^{114} , A, y и L_1 являются такими, как определено для конъюгатов формулы (E) выше.

[00289] Вариант осуществления 84. Конъюгат, имеющий структуру формулы (E) или формулы (E-1), представляет собой конъюгат, имеющий структуру формулы (E-5):



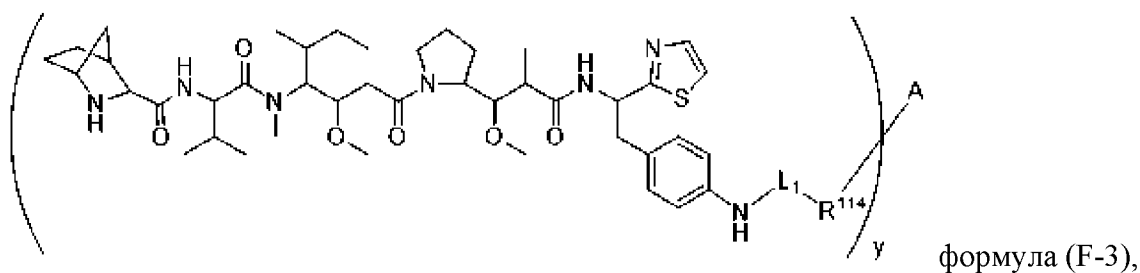
где R^{114} , A, y и L_1 являются такими, как определено для конъюгатов формулы (E) выше.

[00290] Вариант осуществления 85. Конъюгат, имеющий структуру формулы (F), представляет собой конъюгат, имеющий структуру формулы (F-2):



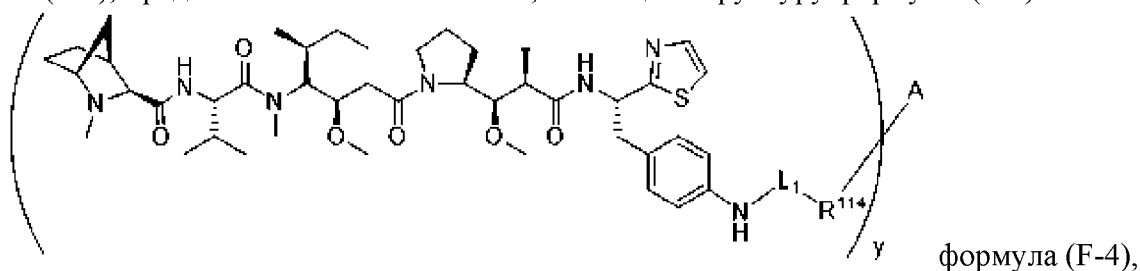
где R^{114} , A, y и L_1 являются такими, как определено для конъюгатов формулы (F) выше.

[00291] Вариант осуществления 86. Конъюгат, имеющий структуру формулы (F), представляет собой конъюгат, имеющий структуру формулы (F-3):



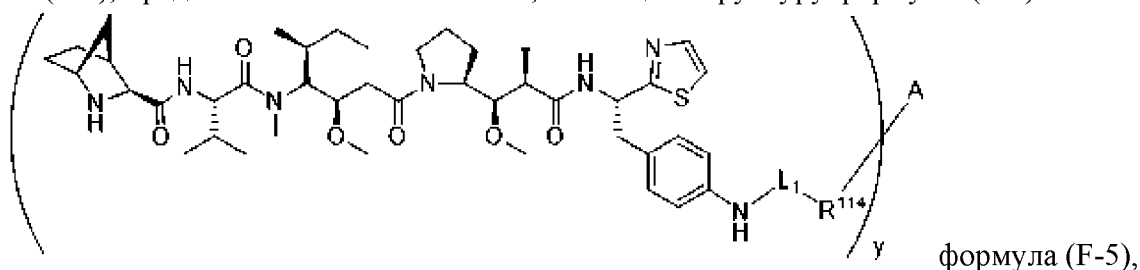
где R^{114} , A, y и L_1 являются такими, как определено для конъюгатов формулы (F) выше.

[00292] Вариант осуществления 87. Конъюгат, имеющий структуру формулы (F) или формулы (F-1), представляет собой конъюгат, имеющий структуру формулы (F-4):



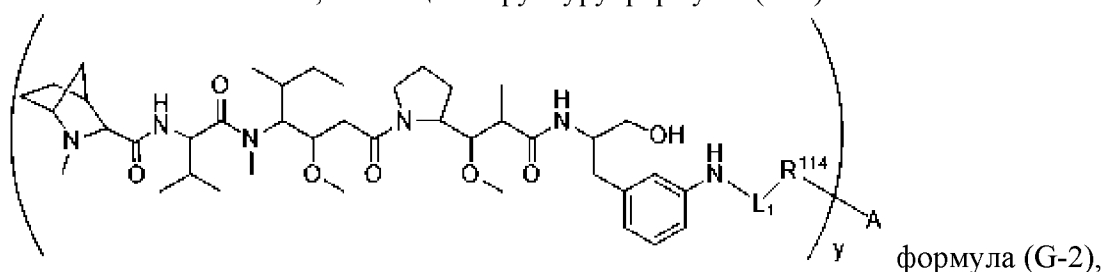
где R^{114} , A, y и L_1 являются такими, как определено для конъюгатов формулы (F) выше.

[00293] Вариант осуществления 88. Конъюгат, имеющий структуру формулы (F) или формулы (F-1), представляет собой конъюгат, имеющий структуру формулы (F-5):



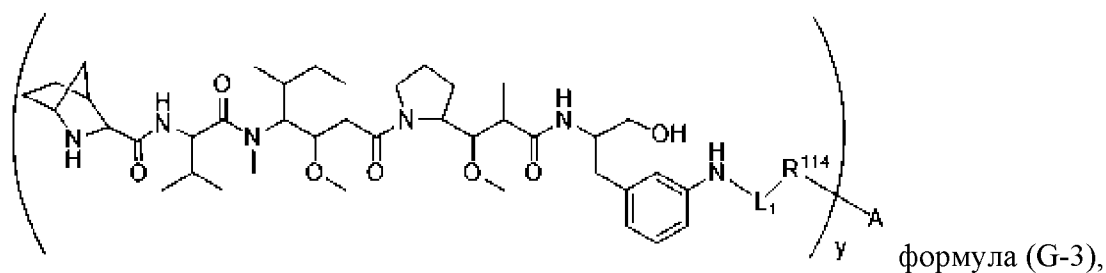
где R^{114} , A, y и L_1 являются такими, как определено для конъюгатов формулы (F) выше.

[00294] Вариант осуществления 89. Конъюгат, имеющий структуру формулы (G), представляет собой конъюгат, имеющий структуру формулы (G-2):



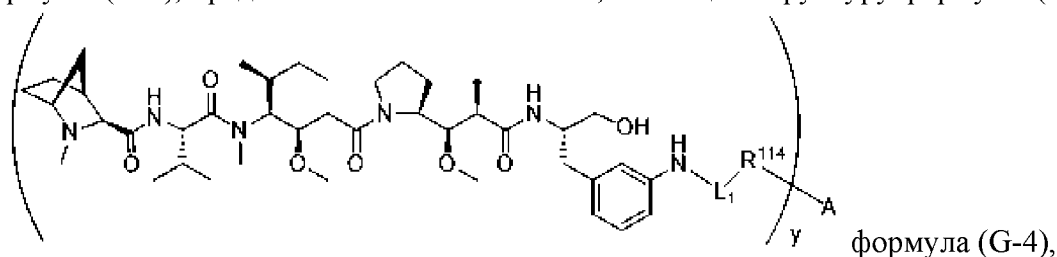
где R^{114} , A, y и L_1 являются такими, как определено для конъюгатов формулы (G) выше.

[00295] Вариант осуществления 90. Конъюгат, имеющий структуру формулы (G), представляет собой конъюгат, имеющий структуру формулы (G-3):



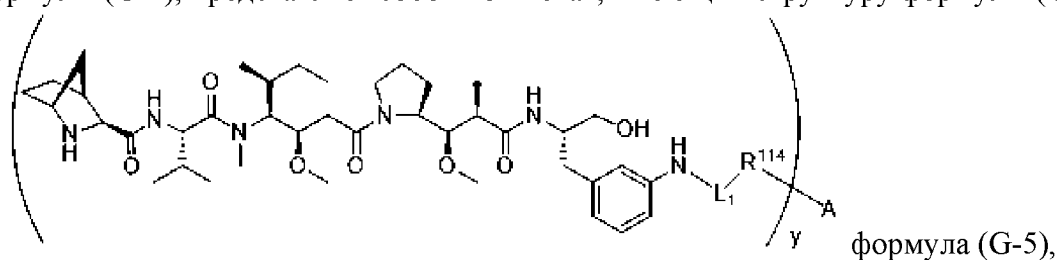
где R^{114} , A , y и L_1 являются такими, как определено для конъюгатов формулы (G) выше.

[00296] Вариант осуществления 91. Конъюгат, имеющий структуру формулы (G) или формулы (G-1), представляет собой конъюгат, имеющий структуру формулы (G-4):



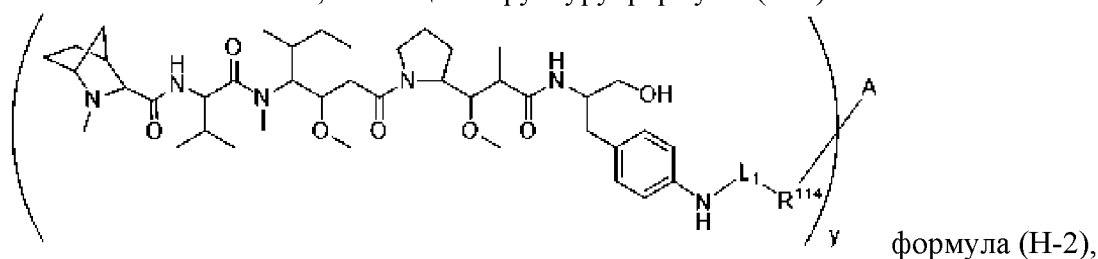
где R^{114} , A , y и L_1 являются такими, как определено для конъюгатов формулы (G) выше.

[00297] Вариант осуществления 92. Конъюгат, имеющий структуру формулы (G) или формулы (G-1), представляет собой конъюгат, имеющий структуру формулы (G-5):



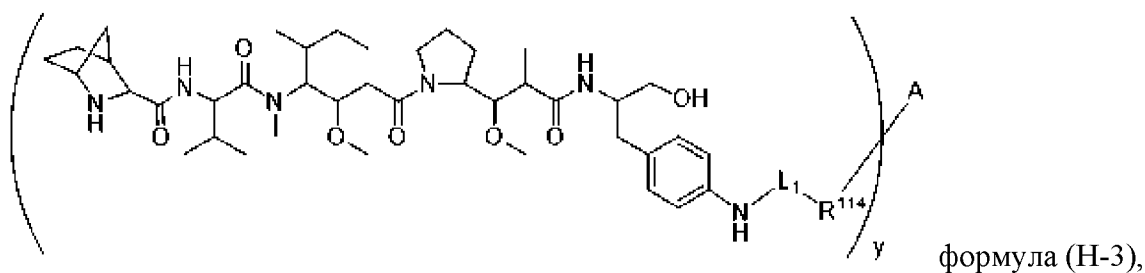
где R^{114} , A , y и L_1 являются такими, как определено для конъюгатов формулы (G) выше.

[00298] Вариант осуществления 93. Конъюгат, имеющий структуру формулы (H), представляет собой конъюгат, имеющий структуру формулы (H-2):



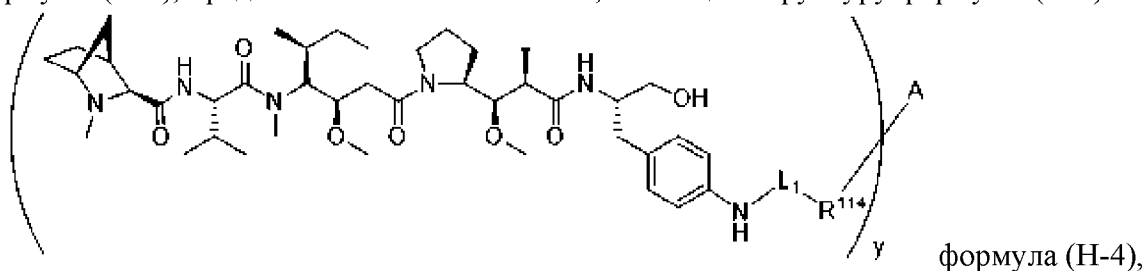
где R^{114} , A , y и L_1 являются такими, как определено для конъюгатов формулы (H) выше.

[00299] Вариант осуществления 94. Конъюгат, имеющий структуру формулы (H), представляет собой конъюгат, имеющий структуру формулы (H-3):



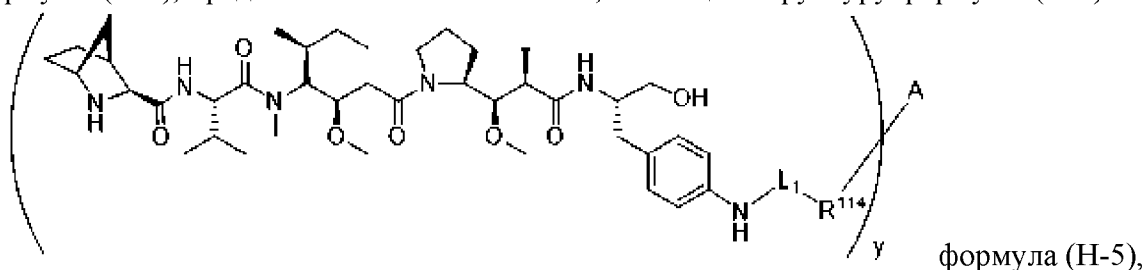
где R^{114} , A, y и L_1 являются такими, как определено для конъюгатов формулы (H) выше.

[00300] Вариант осуществления 95. Конъюгат, имеющий структуру формулы (H) или формулы (H-1), представляет собой конъюгат, имеющий структуру формулы (H-4):



где R^{114} , A, y и L_1 являются такими, как определено для конъюгатов формулы (H) выше.

[00301] Вариант осуществления 96. Конъюгат, имеющий структуру формулы (H) или формулы (H-1), представляет собой конъюгат, имеющий структуру формулы (H-5):

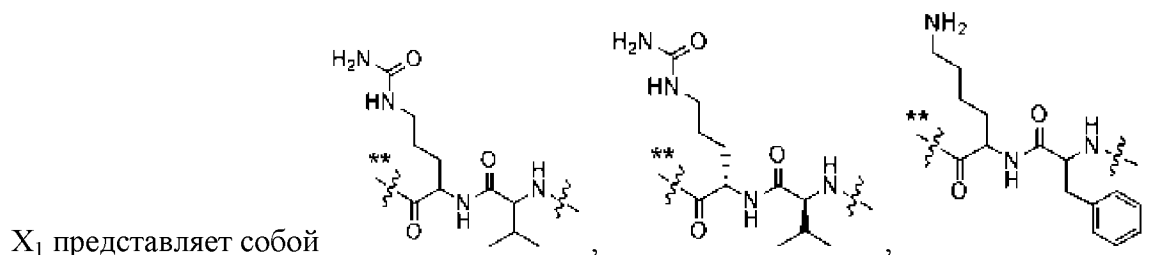


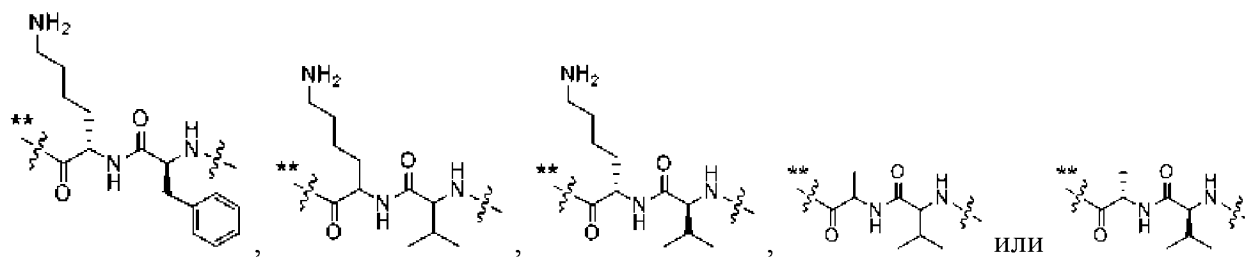
где R^{114} , A, y и L_1 являются такими, как определено для конъюгатов формулы (H) выше.

[00302] Вариант осуществления 97. Конъюгат формулы (E), формулы (F), формулы (G), формулы (H) или конъюгат по любому из вариантов осуществления 73-96, где

L_1 представляет собой $-X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$ ** или $-X_1C(=O)(CH_2)_m-$ **, где ** указывает на точку присоединения к R^{114} ,

и



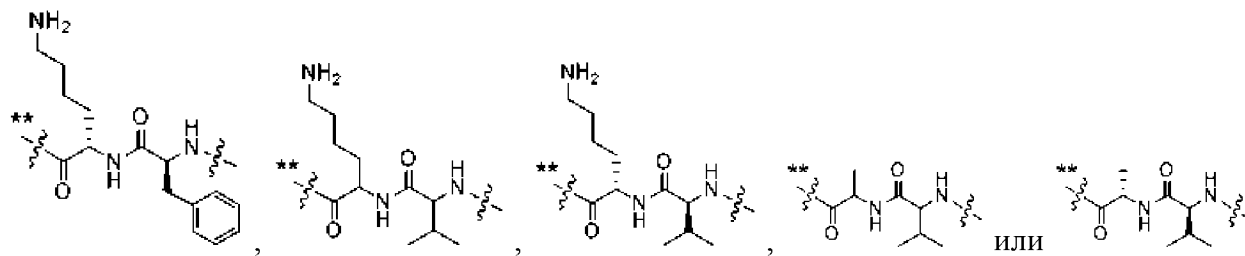
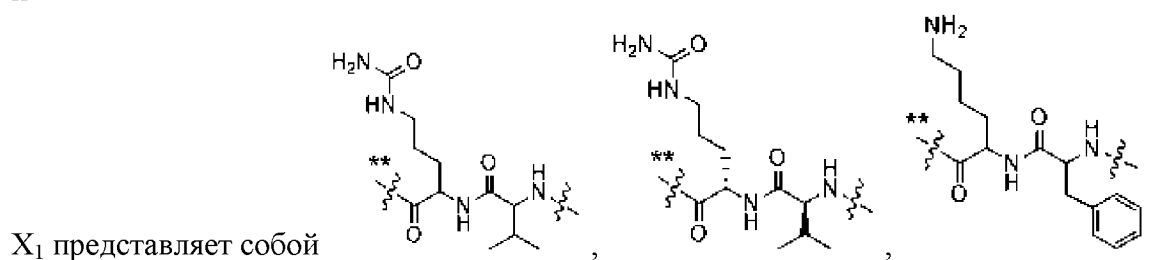


, где ** указывает на точку присоединения к -NH- или к X_2 .

[00303] Вариант осуществления 98. Конъюгат формулы (E), формулы (F), формулы (G), формулы (H) или конъюгат по любому из вариантов осуществления 73-96, где

L_1 представляет собой $-X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m-$, где ** указывает на точку присоединения к R^{114} ;

и



, где ** указывает на точку присоединения к -NH- или к X_2 .

[00304] Вариант осуществления 99. Конъюгат формулы (E), формулы (F), формулы (G), формулы (H) или конъюгат по любому из вариантов осуществления 73-98, где каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5 и 6.

[00305] Вариант осуществления 100. Конъюгат формулы (E), формулы (F), формулы (G), формулы (H) или конъюгат по любому из вариантов осуществления 73-98, где каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4 и 5.

[00306] Вариант осуществления 101. Конъюгат формулы (E), формулы (F), формулы (G), формулы (H) или конъюгат по любому из вариантов осуществления 73-98, где каждый m независимо выбран из 1, 2, 3 и 4.

[00307] Вариант осуществления 102. Конъюгат формулы (E), формулы (F), формулы (G), формулы (H) или конъюгат по любому из вариантов осуществления 73-98, где каждый m независимо выбран из 1, 2 и 3.

[00308] Вариант осуществления 103. Конъюгат формулы (E), формулы (F), формулы (G), формулы (H) или конъюгат по любому из вариантов осуществления 73-98, где каждый m независимо выбран из 1 и 2.

[00322] Вариант осуществления 117. Конъюгат формулы (Е), формулы (F), формулы (G), формулы (H) или конъюгат по любому из вариантов осуществления 73-113, где каждый у независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9.

[00323] Вариант осуществления 118. Конъюгат формулы (Е), формулы (F), формулы (G), формулы (H) или конъюгат по любому из вариантов осуществления 73-113, где каждый у независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8.

[00324] Вариант осуществления 119. Конъюгат формулы (Е), формулы (F), формулы (G), формулы (H) или конъюгат по любому из вариантов осуществления 73-113, где каждый у независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7.

[00325] Вариант осуществления 120. Конъюгат формулы (Е), формулы (F), формулы (G), формулы (H) или конъюгат по любому из вариантов осуществления 73-113, где каждый у независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5 и 6.

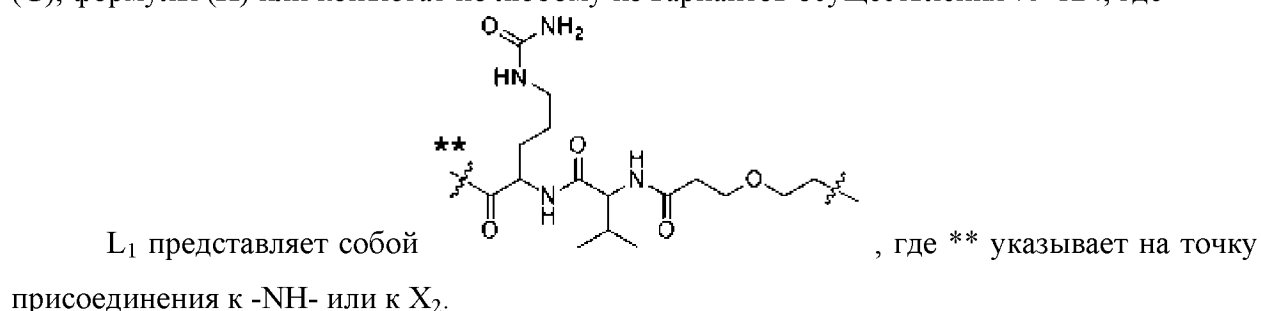
[00326] Вариант осуществления 121. Конъюгат формулы (Е), формулы (F), формулы (G), формулы (H) или конъюгат по любому из вариантов осуществления 73-113, где каждый у независимо выбран из 1, 2, 3, 4 и 5.

[00327] Вариант осуществления 122. Конъюгат формулы (Е), формулы (F), формулы (G), формулы (H) или конъюгат по любому из вариантов осуществления 73-113, где каждый у независимо выбран из 1, 2, 3 и 4.

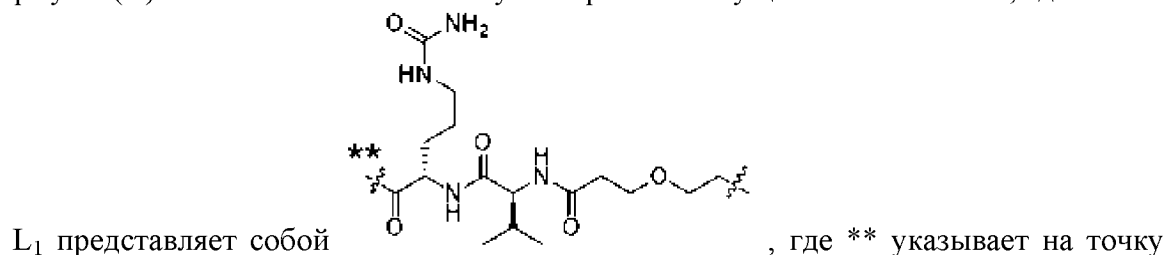
[00328] Вариант осуществления 123. Конъюгат формулы (Е), формулы (F), формулы (G), формулы (H) или конъюгат по любому из вариантов осуществления 73-113, где каждый у независимо выбран из 1, 2 и 3.

[00329] Вариант осуществления 124. Конъюгат формулы (Е), формулы (F), формулы (G), формулы (H) или конъюгат по любому из вариантов осуществления 73-113, где каждый у независимо выбран из 1 и 2.

[00330] Вариант осуществления 125. Конъюгат формулы (Е), формулы (F), формулы (G), формулы (H) или конъюгат по любому из вариантов осуществления 73-124, где

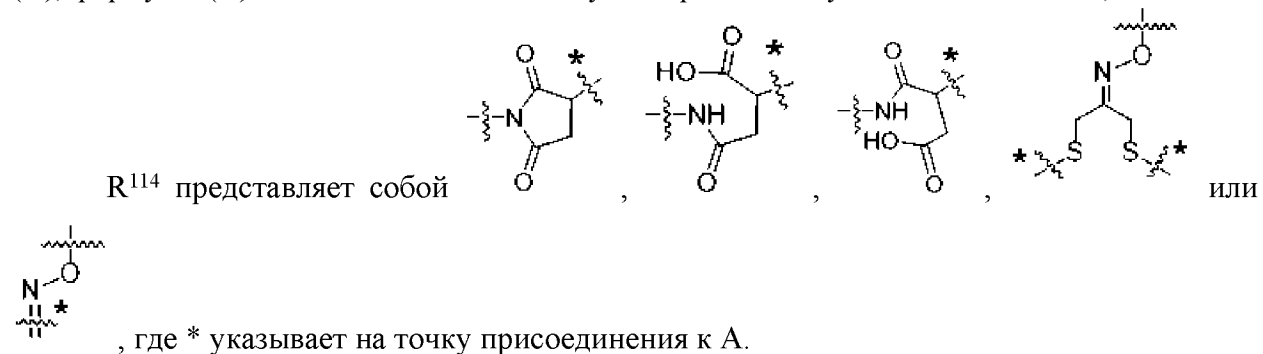


[00331] Вариант осуществления 126. Конъюгат формулы (Е), формулы (F), формулы (G), формулы (H) или конъюгат по любому из вариантов осуществления 73-124, где

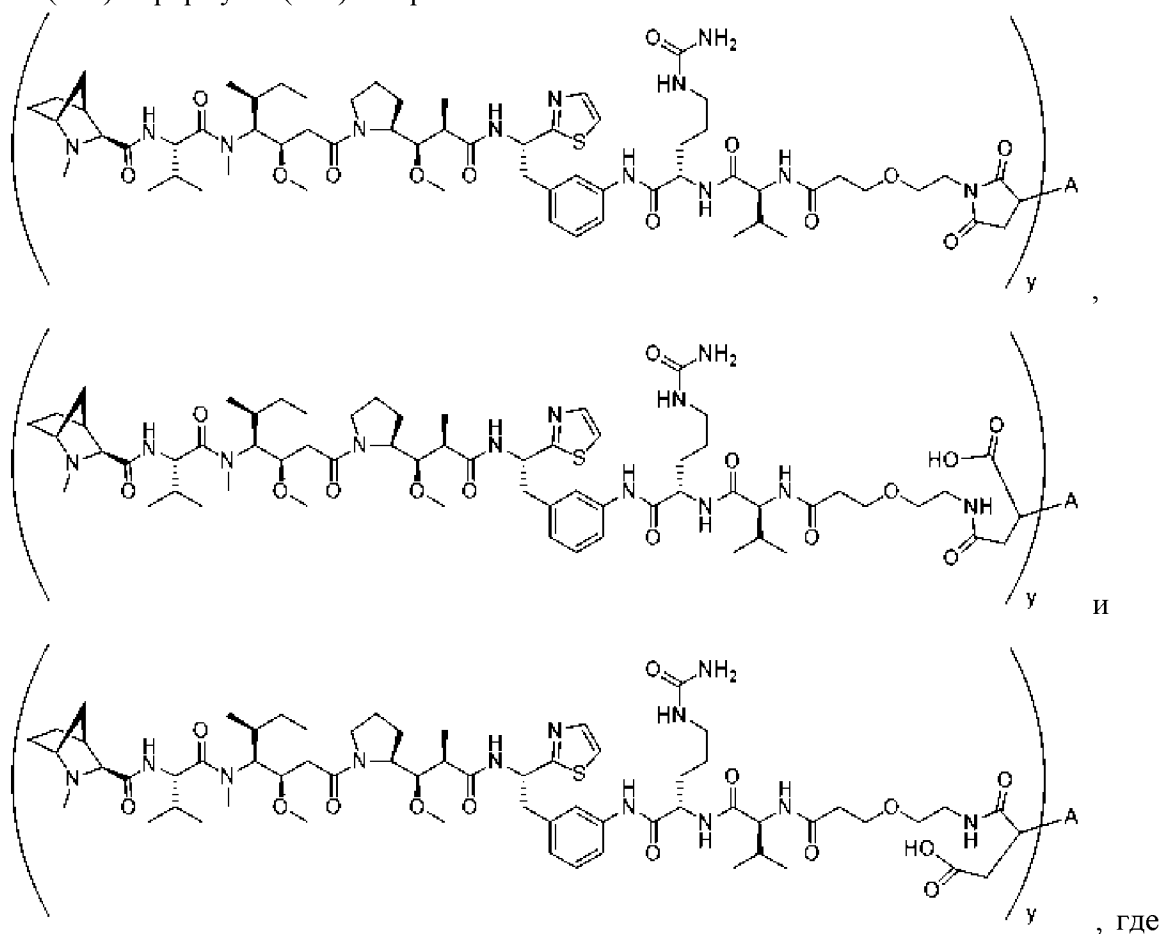


присоединения к -NH- или к X₂.

[00332] Вариант осуществления 127. Конъюгат формулы (E), формулы (F), формулы (G), формулы (H) или конъюгат по любому из вариантов осуществления 73-126, где

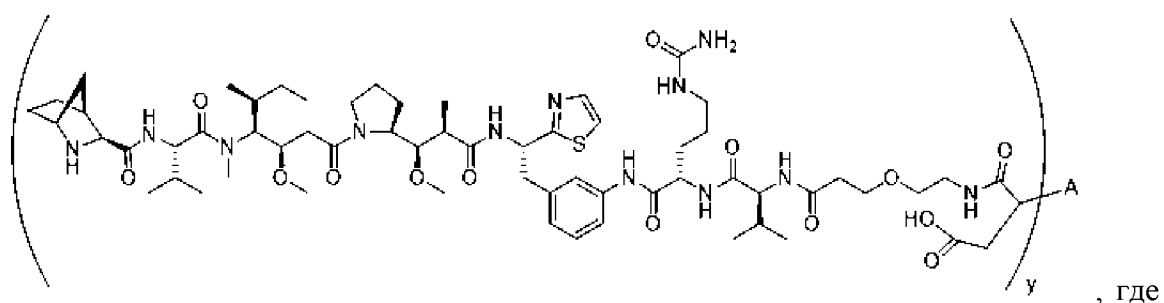
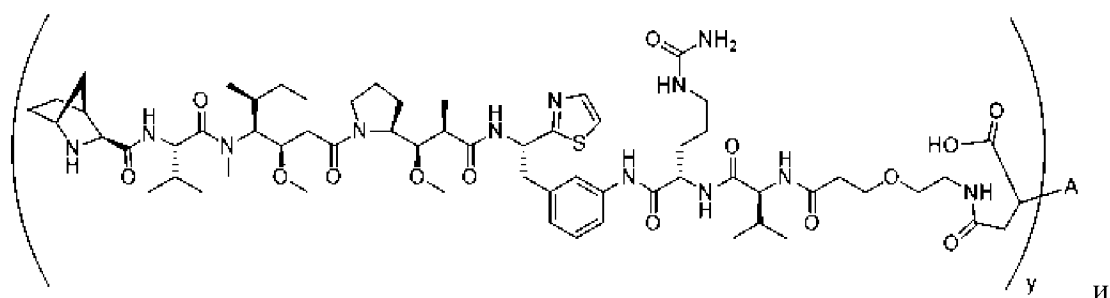
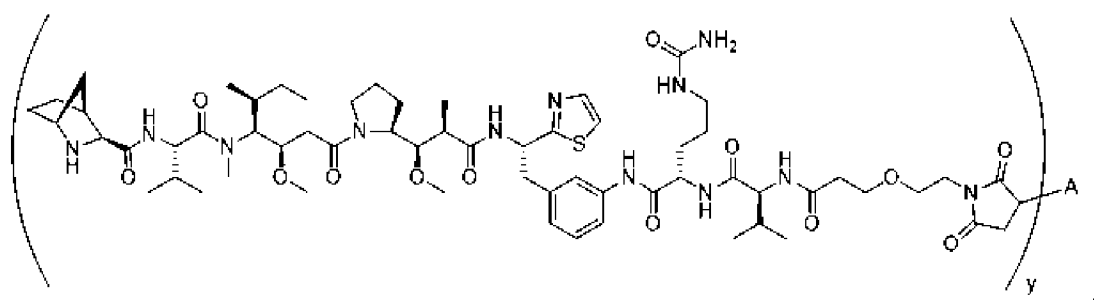


[00333] Вариант осуществления 128. Конъюгат формулы (E), формулы (E-1), формулы (E-2) и формулы (E-4) выбран из:



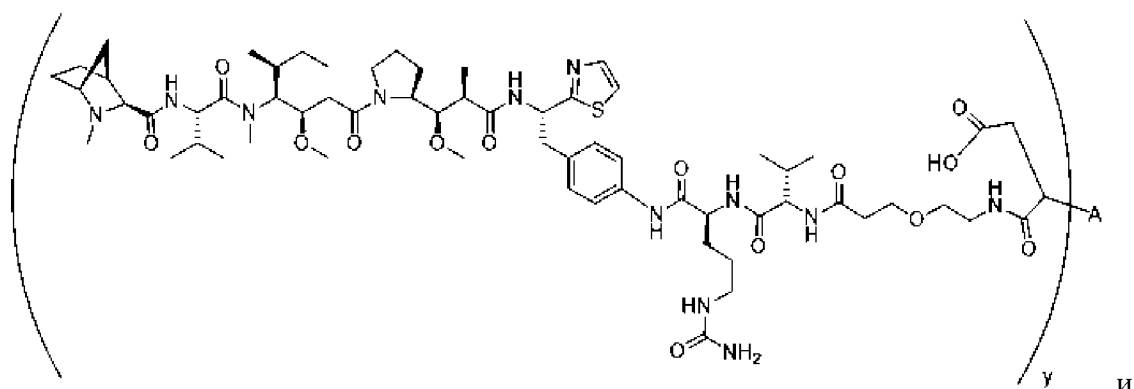
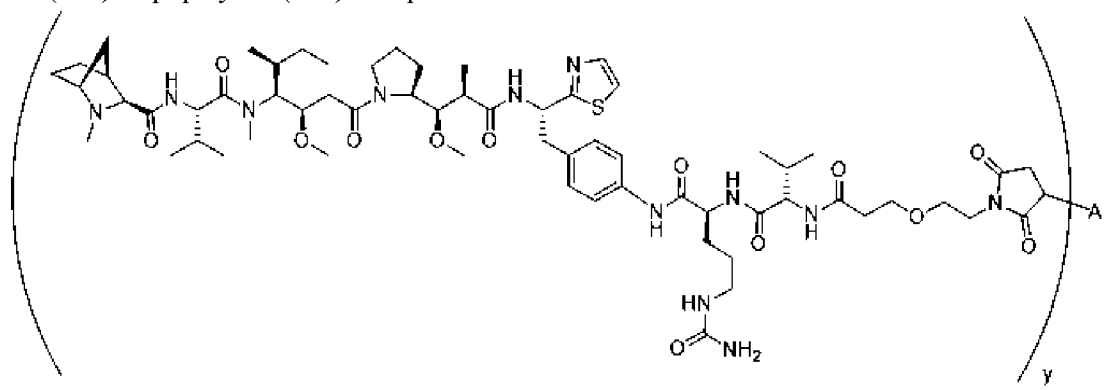
у и A являются такими, как определено для конъюгатов формулы (E) выше.

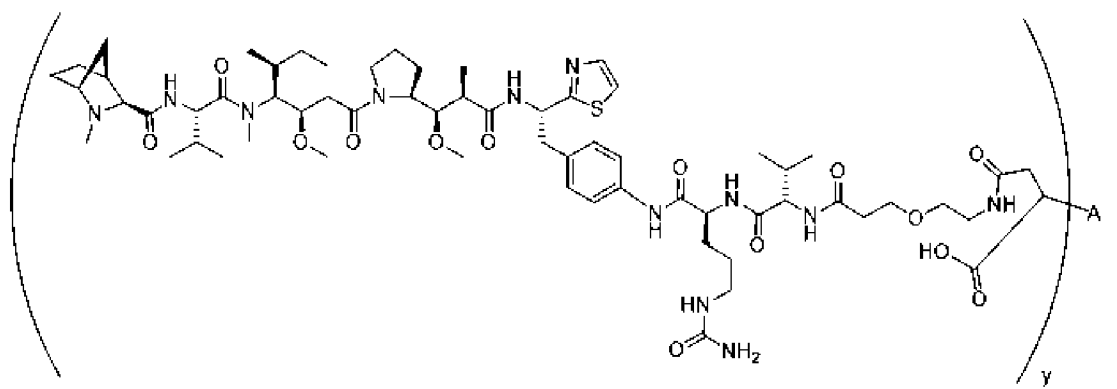
[00334] Вариант осуществления 129. Конъюгат формулы (E), формулы (E-1), формулы (E-3) и формулы (E-5) выбран из:



у и А являются такими, как определено для конъюгатов формулы (Е) выше.

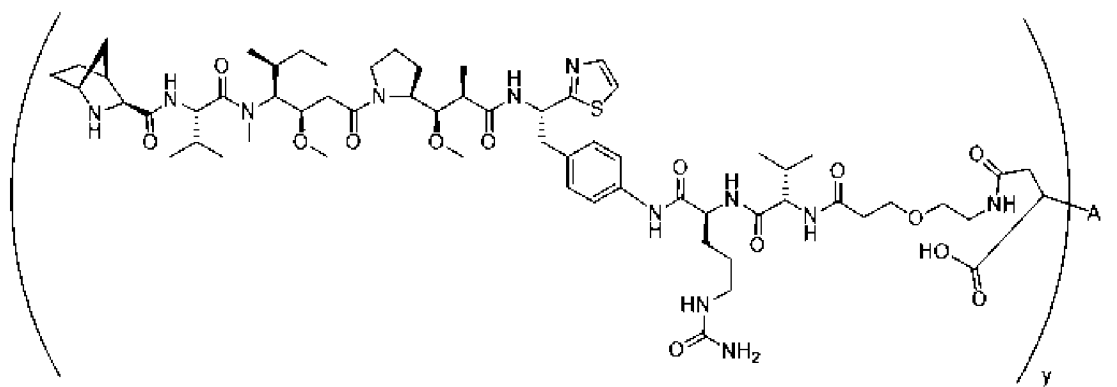
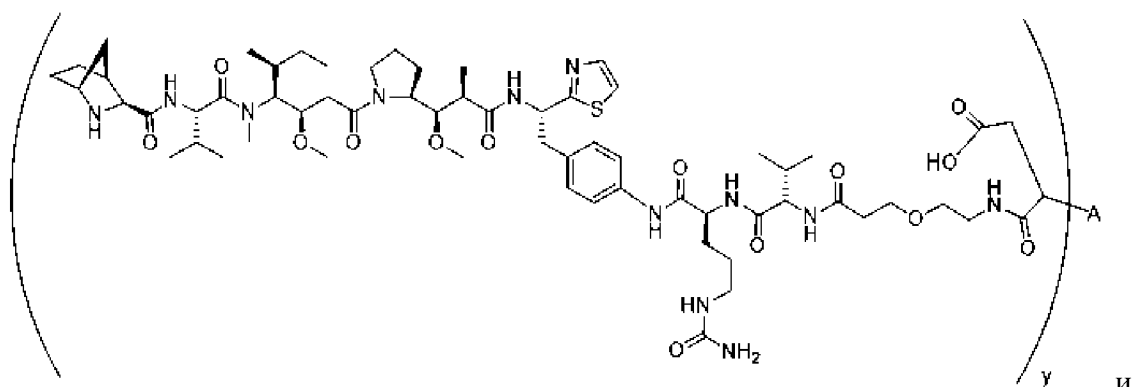
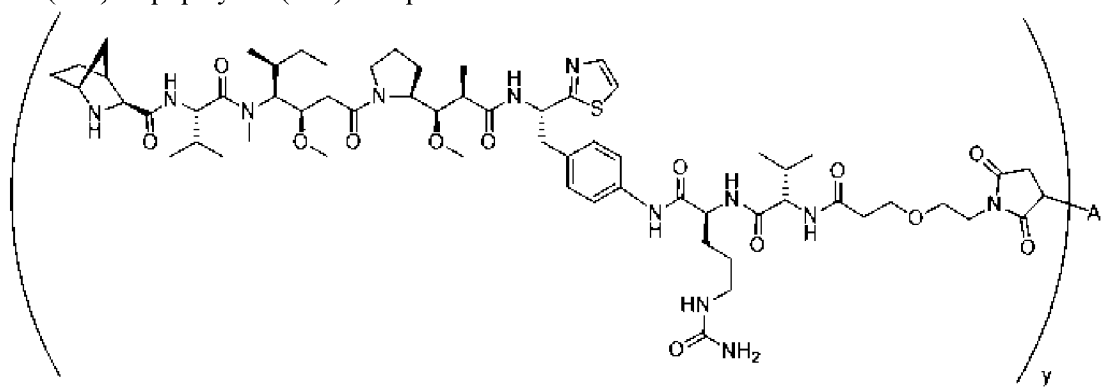
[00335] Вариант осуществления 130. Конъюгат формулы (F), формулы (F-1), формулы (F-2) и формулы (F-4) выбран из:





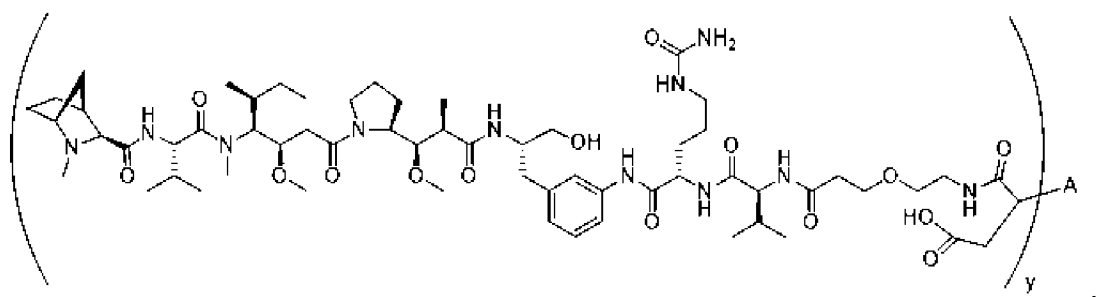
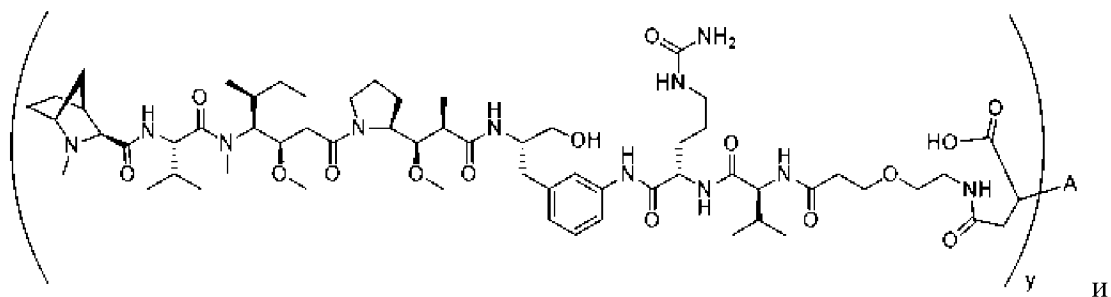
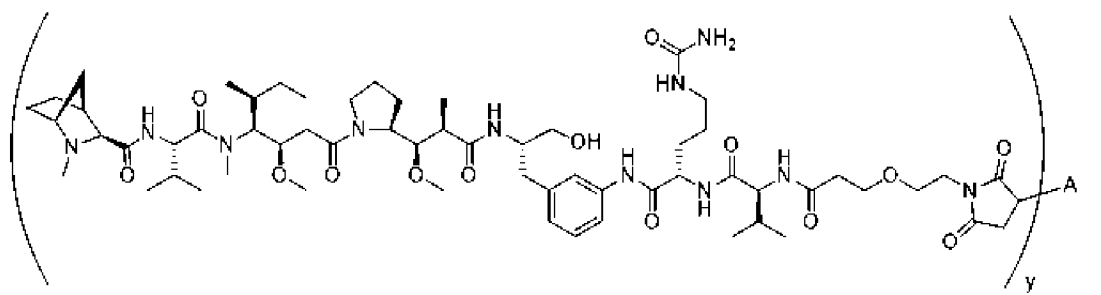
где y и A являются такими, как определено для конъюгатов формулы (F) выше.

[00336] Вариант осуществления 131. Конъюгат формулы (F), формулы (F-1), формулы (F-3) и формулы (F-5) выбран из:



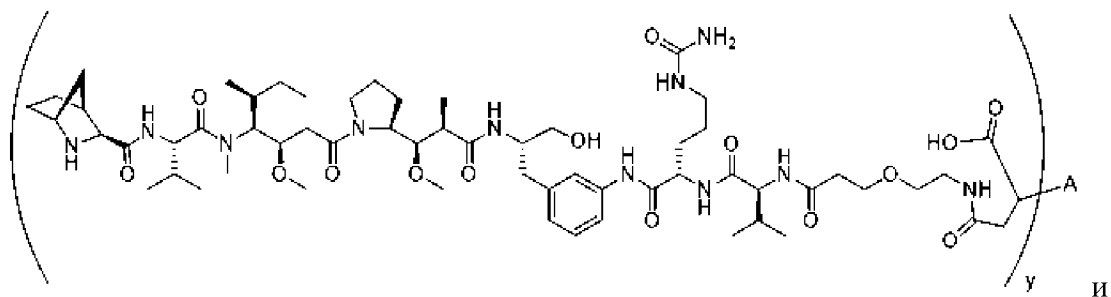
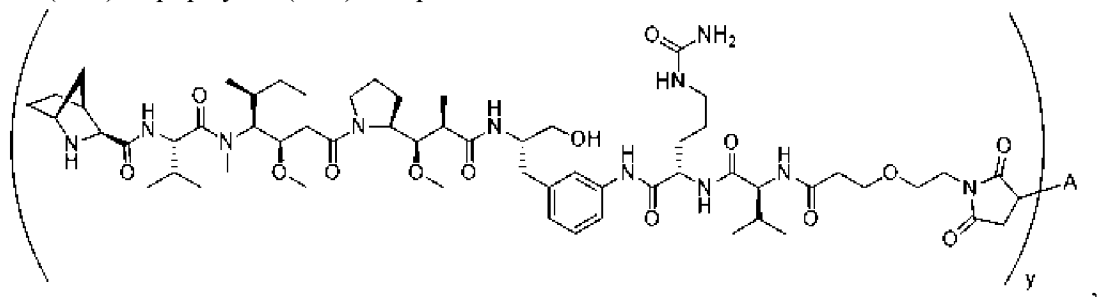
где y и A являются такими, как определено для конъюгатов формулы (F) выше.

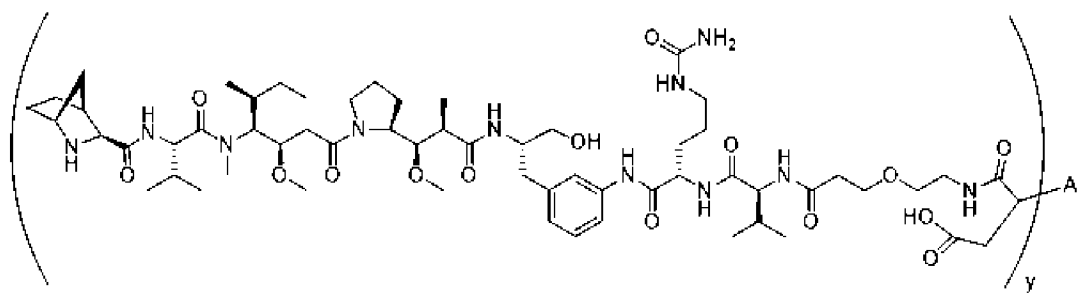
[00337] Вариант осуществления 132. Конъюгат формулы (G), формулы (G-1), формулы (G-2) и формулы (G-4) выбран из:



где y и A являются такими, как определено для конъюгатов формулы (G) выше.

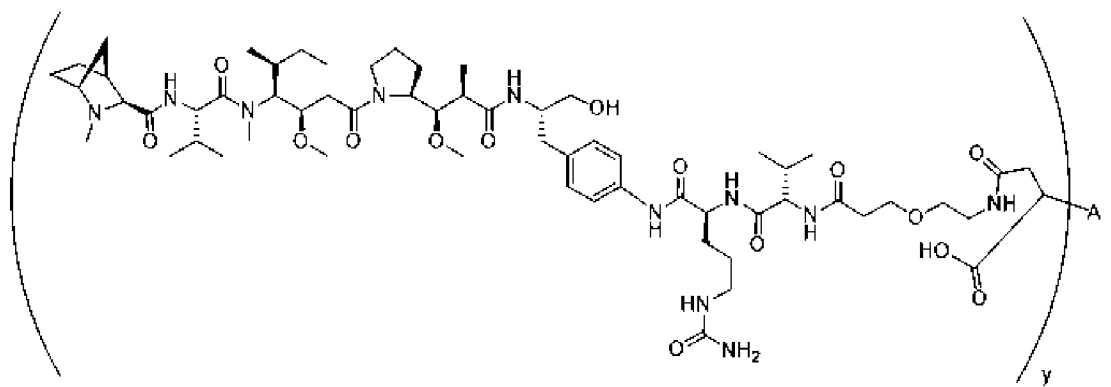
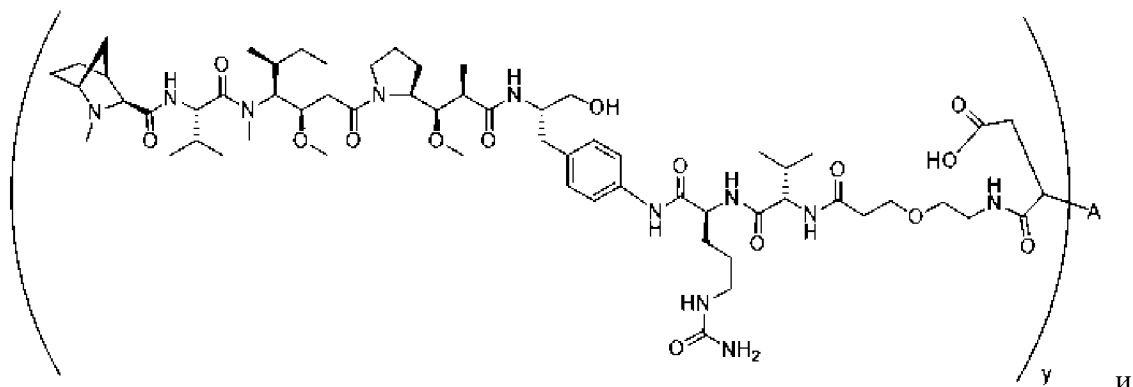
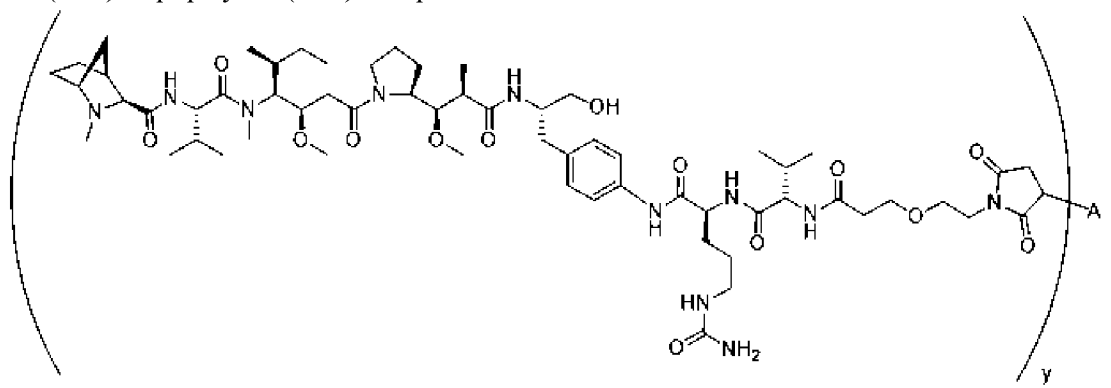
[00338] Вариант осуществления 133. Конъюгат формулы (G), формулы (G-1), формулы (G-3) и формулы (G-5) выбран из:





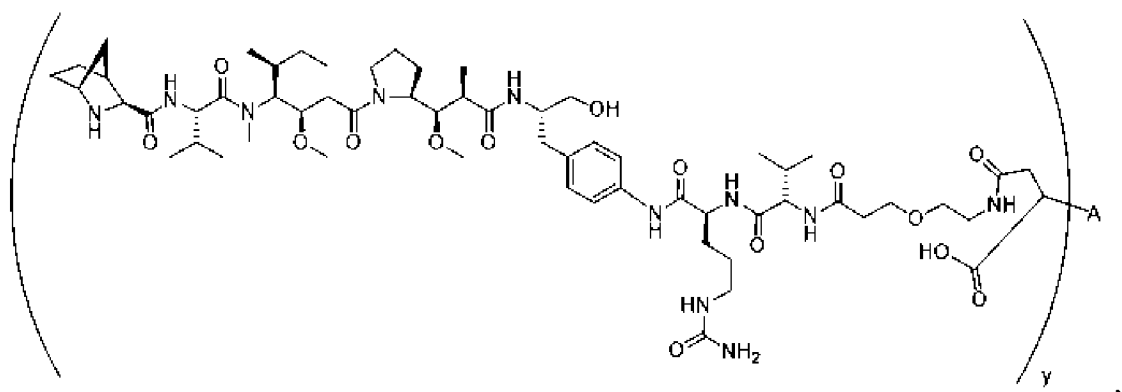
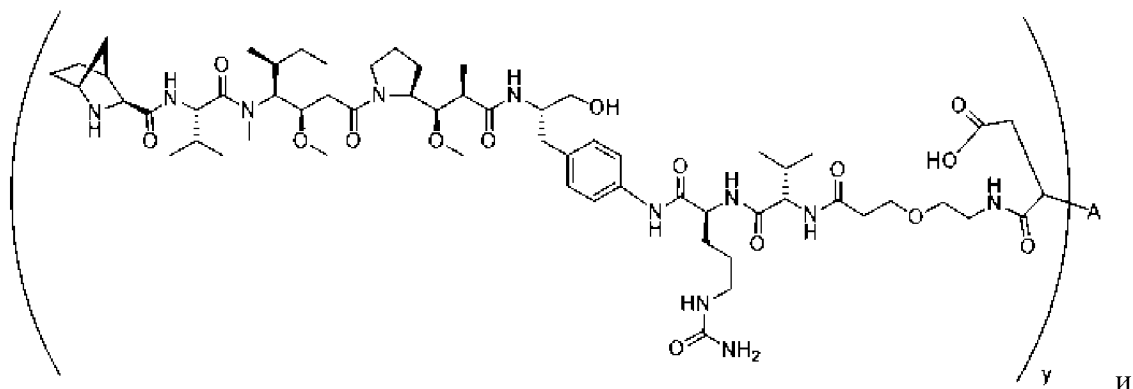
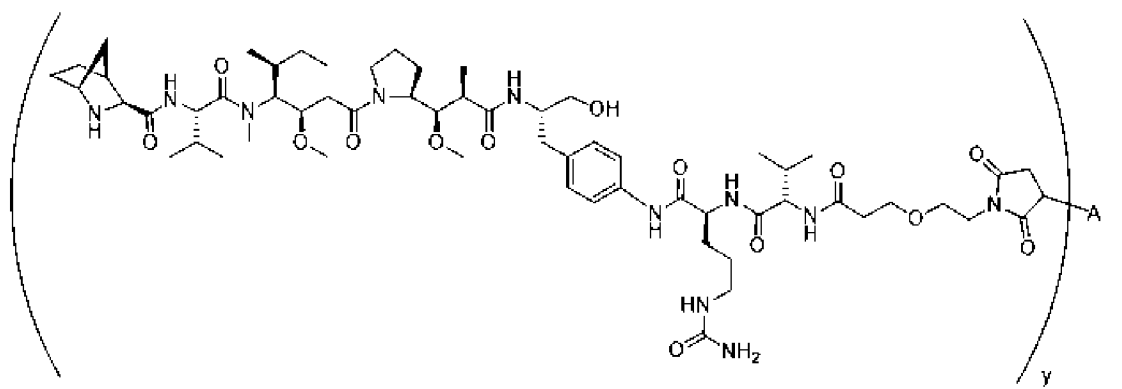
где y и A являются такими, как определено для конъюгатов формулы (G) выше.

[00339] Вариант осуществления 134. Конъюгат формулы (H), формулы (H-1), формулы (H-2) и формулы (H-4) выбран из:



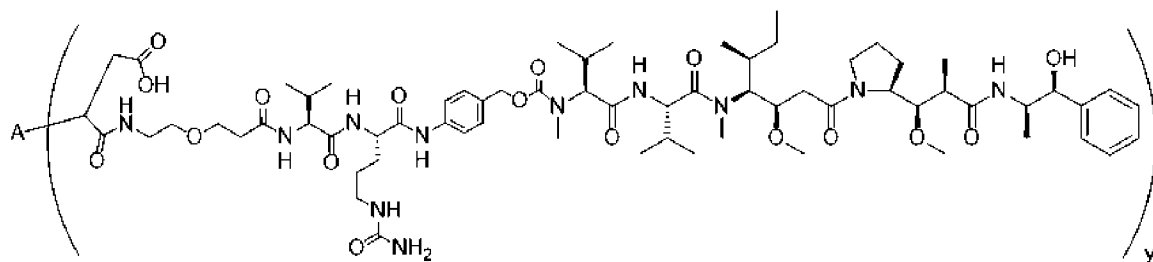
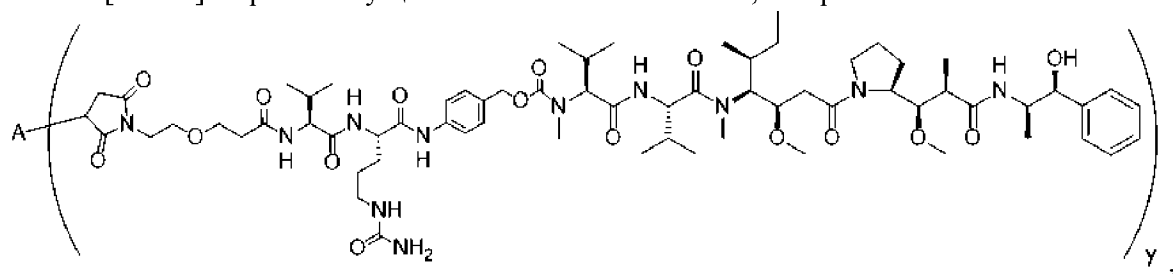
где y и A являются такими, как определено для конъюгатов формулы (H) выше.

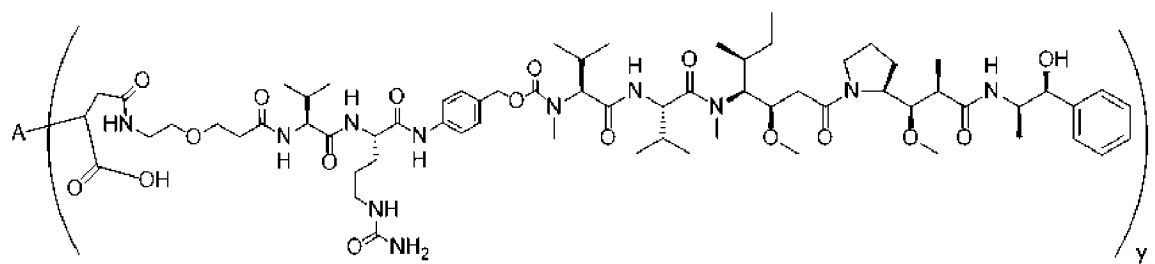
[00340] Вариант осуществления 135. Конъюгат формулы (H), формулы (H-1), формулы (H-3) и формулы (H-5) выбран из:



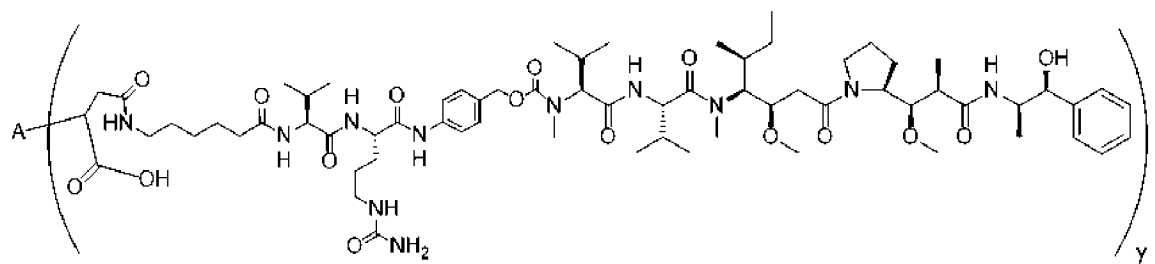
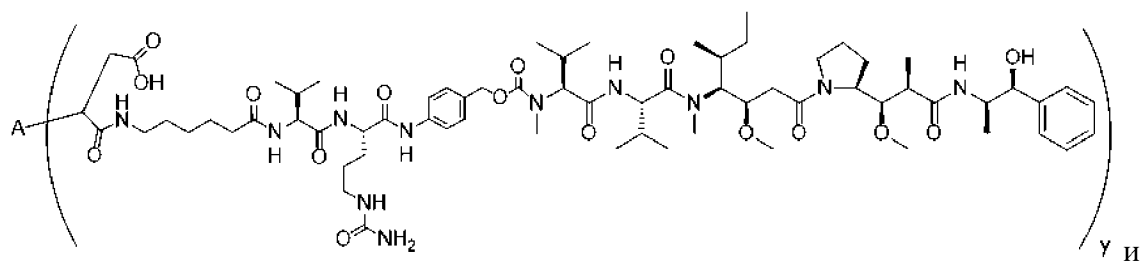
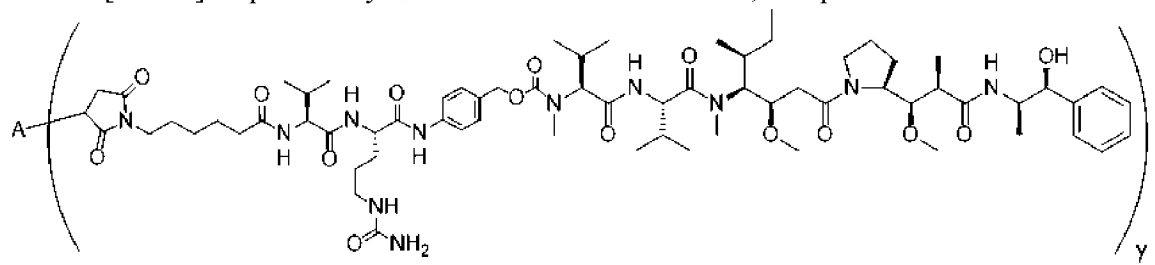
где y и A являются такими, как определено для конъюгатов формулы (H) выше.

[00341] Вариант осуществления 136. Конъюгат, выбранный из:





[00342] Вариант осуществления 137. Конъюгат, выбранный из:



[00343] Соединения любой из формул, раскрытых в данном документе, таких как формула (A), формула (B), формула (C), формула (D), формула (E), формула (F), формула (G) и формула (H) можно получать с применением способов, описанных в следующих примерах. Следующие примеры предназначены для иллюстрации настоящего изобретения, и их не следует истолковывать как ограничивающие его. Значения температуры приведены в градусах Цельсия. Если не указано иное, все операции выпаривания осуществляют при пониженном давлении, как правило, от приблизительно 15 мм рт. ст. до 100 мм рт. ст. (= 20-133 мбар). Структура конечных продуктов, промежуточных соединений и исходных материалов подтверждена посредством стандартных аналитических методов, например микроанализа и спектроскопических характеристик, например MS, IR, ЯМР. Используемые сокращения представляют собой стандартные сокращения, используемые в данной области техники.

Сокращения:

водн.: водный	Woc ₂ O: ди-трет-бутилдикарбонат
br: широкий	cbz: карбоксибензил

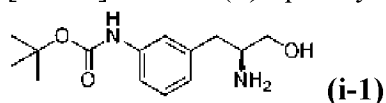
d: дублет; dd: дублет дублетов	DCM: дихлорметан
m: мультиплет	DEAD: диэтилазодикарбоксилат,
q: квартет	DIEA: N,N-диизопропилэтиламин
s: синглет	DIP-chloride TM : (+)-В-хлордиизопинокамфеилборан
t: триплет	DIPEA: N,N-диизопропилэтиламин
ч, час.: час (часы)	DMF: диметилформамид
ESI-MS: масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением	DMSO: диметилсульфоксид
HPLC: жидкостная хроматография высокого давления	DPPA: дифенилфосфорилазид
Isco, ISCO: картридж для флэш-хроматографии, содержащий силикагель, предоставленный Teledyne Isco	EtOAc: этилацетат
LC и LCMS: жидкостная хроматография и жидкостная хроматография с масс-спектрометрией	EEDQ: 2-этокси-1-этоксикарбонил-1,2-дигидрохиолин
MS: масс	HATU: гексафторфосфат 1-[бис(диметиламино)метиле]-1 <i>H</i> -1,2,3-триазоло[4,5- <i>b</i>]пиридиний-3-оксида
мин.: минута (минуты)	MeCN: ацетонитрил
масса/заряд: отношение массы к заряду	TFA: трифторуксусная кислота
М и mM: молярный и миллимолярный	THF: тетрагидрофуран
мг: миллиграмм	TMEDA: N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин
мкл, мл и л: микролитр, миллилитр и литр	к. т.: комнатная температура
ммоль и мкмоль: миллимоль и микромоль	

ЯМР: ядерный магнитный резонанс	
вес.: вес	

[00344] Все исходные материалы, структурные элементы, реагенты, кислоты, основания, дегидрирующие средства, растворители и катализаторы, используемые для синтеза соединений по настоящему изобретению, являются либо коммерчески доступными, либо могут быть получены посредством способов органического синтеза, известных специалисту в данной области техники, либо могут быть получены посредством способов органического синтеза, описанных в данном документе.

Синтез промежуточных соединений

[00345] Синтез (S)-трет-бутил(3-(2-амино-3-гидроксипропил)фенил)карбамата (**i-1**)



Стадия 1. Добавляли NH_3 в THF (1 M, 10 мл) к (S)-2-((трет-бутоксикарбонил)амино)-3-(3-нитрофенил)пропановой кислоте (562 мг, 1,81 ммоль) в THF (10 мл) при перемешивании при 0°C . Затем реакционную смесь перемешивали при 50°C в течение 1 ч. Реакционную смесь охлаждали при 0°C , гасили водой, разбавляли с помощью EtOAc и промывали 10%-ным водным K_2CO_3 , высушили над MgSO_4 , фильтровали и концентрировали. Неочищенный материал очищали с помощью колонки, содержащей силикагель (30-70% EtOAc-гексаны), с получением (S)-трет-бутил(1-гидрокси-3-(3-нитрофенил)пропан-2-ил)карбамата в виде белого твердого вещества. MS масса/заряд: 319,1 (M+Na). Время удерживания: 1,183 минуты. ^1H ЯМР (600 МГц, Хлороформ-d) δ 8,13-8,04 (m, 2H), 7,57 (d, $J=7,7$ Гц, 1H), 7,46 (dd, $J=8,9, 7,6$ Гц, 1H), 4,76 (s, 1H), 3,87 (dq, $J=8,0, 4,6, 4,1$ Гц, 1H), 3,69 (dd, $J=10,9, 3,9$ Гц, 1H), 3,58 (dd, $J=10,8, 4,7$ Гц, 1H), 2,97 (td, $J=13,1, 12,5, 7,3$ Гц, 2H), 1,37 (s, 9H).

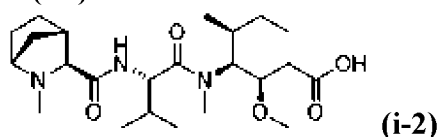
Стадия 2. К (S)-трет-бутил(1-гидрокси-3-(3-нитрофенил)пропан-2-ил)карбамату (0,31 г, 1,0 ммоль) в ацетонитриле (5 мл) добавляли 10% хлористоводородную кислоту (5 мл). Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 48 ч, а затем концентрировали с получением (S)-2-амино-3-(3-нитрофенил)пропан-1-ола в виде соли HCl. MS масса/заряд: 197,2 (M+H). Время удерживания: 0,775 мин.

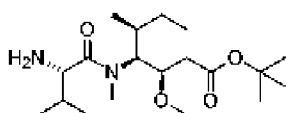
Стадия 3. Соль HCl (S)-2-амино-3-(3-нитрофенил)пропан-1-ола (0,243 г, 1,046 ммоль) растворяли в MeOH (10 мл) и добавляли 10% палладий на угле (50 мг, 0,047 ммоль). Присоединяли баллон с водородом объемом 2 л. Реакционную смесь продували с помощью H_2 трижды, а затем перемешивали при к. т. в течение 1 ч. С помощью LCMS определяли, что реакция завершена. Реакционную смесь фильтровали через слой целита и концентрировали с получением (S)-2-амино-3-(3-аминофенил)пропан-1-ола в виде соли HCl. MS масса/заряд: 167,2 (M+H). Время удерживания: 0,373 мин.

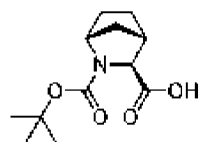
Стадия 4. Соль HCl (S)-2-амино-3-(3-аминофенил)пропан-1-ола (0,212 г, 1,046 ммоль) и Woc_2O (228 мг, 1,05 ммоль) и смесь диоксана, воды, и AcOH (10:9:1, 20 мл)

соединяли и перемешивали при к. т. в течение 3 дней. С помощью LCMS определяли, что реакция завершена на 75%. Добавляли дополнительное количество Wos_2O (150 мг) и реакционную смесь дополнительно перемешивали в течение 6 ч. Реакционную смесь затем концентрировали и очищали посредством препаративной HPLC (10-40% ацетонитрил в воде с 0,05% TFA) с получением (S)-трет-бутил(3-(2-амино-3-гидроксипропил)фенил)карбамата (**i-1**) в виде масла. MS масса/заряд: 267,2 (M+H). Время удерживания: 1,011 мин.

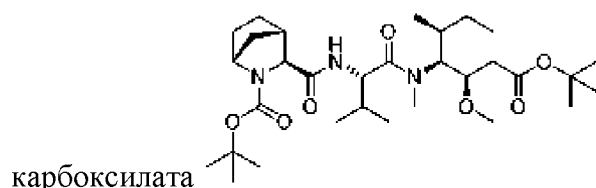
[00346] Синтез (3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((1R,3S,4S)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамидо)бутанамидо)-3-метокси-5-метилгептановой кислоты (**i-2**)



Стадия 1. Соль HCl Dil-OtBu ( : 388 мг, 0,982 ммоль), (1R,3S,4S)-2-(трет-бутоксикарбонил)-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоновую кислоту (

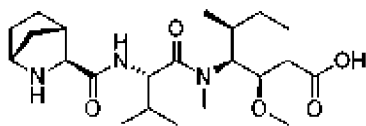


, 287 мг, 1,19 ммоль), HATU (411 мг, 1,08 ммоль) и DIEA (0,42 мл, 2,38 ммоль), и DMF (5 мл) соединяли и перемешивали при к. т. в течение 30 мин. Реакционную смесь разбавляли водой (10 мл) и очищали с помощью ISCO RP-C18 с получением трет-бутил-(1R,3S,4S)-3-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-(трет-бутоксикарбонил)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил)(метил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамоил)-2-азабицикло[2.2.1]гептан-2-



. MS (m+1)=582,5, пик HPLC к. т.=1,542 мин

Стадия 2. Продукт, полученный на стадии 1 (540 мг, 0,93 ммоль), в 4 М HCl в 1,4-диоксане (10 мл) перемешивали при к. т. в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали с получением (3R,4S,5S)-4-((S)-2-((1R,3S,4S)-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамидо)-N,3-диметилбутанамидо)-3-метокси-5-метилгептановой кислоты,

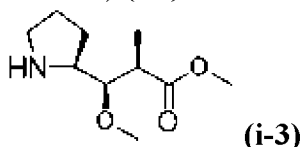


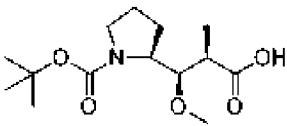
. MS (m+1)=426,2, пик HPLC к. т.=0,736 мин

Стадия 3. Продукт, полученный на стадии 2 (430 мг, 0,93 ммоль), 37% раствор формальдегида (0,38 мл, 4,7 ммоль), уксусную кислоту (0,27 мл, 4,65 ммоль), NaBH_3CN (585 мг, 9,31 ммоль) и MeOH (10 мл) соединяли и перемешивали при к. т. в течение 30 мин,

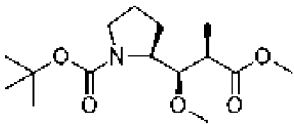
а затем концентрировали. Остаток очищали с помощью ISCO RP-C18 с получением 450 мг (3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((1R,3S,4S)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамидо)бутанамидо)-3-метокси-5-метилгептановой кислоты (**i-2**) в виде соли TFA. Соль TFA обрабатывали с помощью 10 мл 12 н. раствора HCl и концентрировали дважды с получением HCl-соли (3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((1R,3S,4S)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамидо)бутанамидо)-3-метокси-5-метилгептановой кислоты. MS (m+1)=440,2, пик HPLC к. т.=0,754 мин.

[00347] Синтез Дар-ОМе: ((2R,3R)-метил-3-метокси-2-метил-3-((S)-пирролидин-2-ил)пропаноата) (**i-3**)



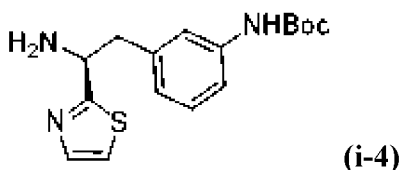
Стадия 1. Соединяли Вос-Дар-ОН (, 3,11 г, 10,8 ммоль),

K₂CO₃ (2,99 г, 21,6 ммоль), йодметан (2,95 г) и ацетон (55 мл). Реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 2 ч. Дополнительное количество метилиодида (2,28 г) добавляли к реакционной смеси и реакционную смесь перемешивали при 40°C в течение 3 ч. Реакционную смесь концентрировали. Остаток разделяли между 200 мл EtOAc и 100 мл H₂O. Органический слой отделяли, промывали с помощью 50 мл насыщенного водн. раствора NaCl, высушивали над MgSO₄, фильтровали и концентрировали с получением

Вос-Дар-ОМе, , в виде желтого масла. Время удерживания: 1,245 мин. MS (ESI+) расщ. масса/заряд: 324,2, обнар. 324,2 (M+23).

Стадия 2. Вос-Дар-ОМе (3,107 г, 10,3 ммоль) соединяли с HCl в диэтиловом эфире (2 М, 10 мл) и концентрировали. Данную операцию повторяли. Реакцию завершали после 7-ой обработки. Соль HCl Дар-ОМе (**i-3**) получали в виде белого твердого вещества после концентрирования. MS (ESI+) масса/заряд расщ. 202,1, обнар. 202,2 (M+1). Время удерживания 0,486 мин. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃): δ 4,065-4,041 (m, 1H), 3,732 (br.s, 1H), 3,706 (s, 3H), 3,615 (s, 3H), 3,368 (br.s, 1H), 3,314 (br.s, 1H), 2,795 (q, 1H, J=6,8Гц), 2,085-1,900 (m, 4H), 1,287 (d, 3H, J=7,2Гц).

[00348] Синтез трет-бутил-(S)-(3-(2-амино-2-(тиазол-2-ил)этил)фенил)карбамата (**i-4**)



Стадия 1. К раствору 2-(3-нитрофенил)уксусной кислоты (3 г, 16,56 ммоль) в DMF (сухой, 17 мл) добавляли NATU (6,93 г, 18,22 ммоль), гидрохлорид N, O-диметилгидроксиламина (1,615 г, 16,56 ммоль) и DIPEA (14,46 мл, 83 ммоль) при к. т. Реакционную смесь перемешивали в течение ночи при к. т. Реакционную смесь концентрировали под высоким вакуумом для удаления большей части растворителя. Затем остаток экстрагировали между DCM и водой. Водн. фазу экстрагировали с помощью 2 x DCM. Объединенные фазы DCM концентрировали под вакуумом. Остаток разделяли с помощью флэш-колонки, содержащей силикагель (EtOAc/гептан 0-70%, затем 70%), с получением 3,5 г N-метокси-N-метил-2-(3-нитрофенил)ацетамида в виде белого твердого вещества. MS масса/заряд: 225,1 (M+1). Время удерживания: 1,09 мин. ^1H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-*d*) δ 8,28-8,09 (m, 2H), 7,67 (m, 1H), 7,63-7,46 (m, 1H), 3,90 (s, 2H), 3,74 (s, 3H), 3,24 (s, 3H).

Стадия 2. К раствору TMEDA (2,63 мл, 17,39 ммоль) в THF (сухой, 30 мл) в атмосфере N_2 при -78°C (баня из ацетона и сухого льда) добавляли по каплям н-бутиллитий (2,5 М в гексане) (1,028 г, 16,06 ммоль). Затем при -78°C также добавляли по каплям 2-бромтиазол (2,63 г, 16,06 ммоль) к реакционной смеси. Реакционную смесь перемешивали при -78°C в течение 1 ч. Смесь N-метокси-N-метил-2-(3-нитрофенил)ацетамида (3 г, 13,38 ммоль) в THF (30 мл) добавляли по каплям к реакционной смеси при -78°C . Реакционную смесь перемешивали при -78°C в течение 1 ч., затем при -10°C (баня из ацетона и сухого льда) в течение 2 ч. Реакционную смесь гасили насыщ. водн. раствором KHSO_4 , затем экстрагировали с помощью 3x EtOAc. Объединенные фазы EtOAc высушивали над насыщ. NaCl, NaSO_4 и концентрировали. Остаток разделяли с помощью флэш-колонки, содержащей силикагель (EtOAc/гептан 0-30%, затем 30%), с получением 1,95 г 2-(3-нитрофенил)-1-(тиазол-2-ил)этан-1-она в виде светло-желтого масла. MS масса/заряд: 249,0 (M+1). Время удерживания 1,34 мин. ^1H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-*d*) δ 8,33-8,22 (m, 1H), 8,17 (ddd, $J=8,1, 2,3, 1,0$ Гц, 1H), 8,10 (d, $J=3,0$ Гц, 1H), 7,79-7,67 (m, 2H), 7,54 (t, $J=7,9$ Гц, 1H), 4,62 (s, 2H).

Стадия 3. К раствору (+)-DIP-chlorideTM (9,22 г, 28,8 ммоль) в диэтиловом эфире (7 мл) в атмосфере N_2 при 0°C (баня с ледяной водой) добавляли по каплям раствор 2-(3-нитрофенил)-1-(тиазол-2-ил)этан-1-она (2,38 г, 9,59 ммоль) в диэтиловом эфире (37 мл). Реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 24 ч. Затем смесь нейтрализовали с помощью 30 мл смеси 10% NaOH и 30% H_2O_2 (1:1) при 10°C на ледяной бане. Смесь перемешивали в течение 1 ч. при к. т. Затем смесь разбавляли водой, экстрагировали с помощью 3x EtOAc. Объединенные фазы EtOAc промывали насыщ. K_2CO_3 , насыщ. NaCl, и высушивали над NaSO_4 , и концентрировали. Остаток разделяли с помощью флэш-колонки, содержащей силикагель (EtOAc/гептан 0-60%, затем 60%), с получением 1,639 г (R)-2-(3-нитрофенил)-1-(тиазол-2-ил)этан-1-ола в виде светло-желтого твердого вещества. MS масса/заряд: 251,1 (M+1). Время удерживания 1,09 мин. ^1H ЯМР (400 МГц, Хлороформ-*d*) δ 8,33-8,07 (m, 2H), 8,07-7,80 (m, 1H), 7,74-7,55 (m, 1H), 7,55-7,36 (m, 2H), 5,55 (dd, $J=7,9, 4,1$ Гц, 1H), 4,48 (s, 1H), 3,53 (dd, $J=13,9, 4,0$ Гц, 1H), 3,32 (dd, $J=13,9, 8,1$ Гц, 1H). 92% э. и.,

определенный с помощью хиральной SFC.

Стадия 4. К раствору (R)-2-(3-нитрофенил)-1-(тиазол-2-ил)этан-1-ола (1,636 г, 6,54 ммоль) в MeOH (20 мл) добавляли Pd/C (10%, 0,696 г, 0,654 ммоль). В реакционную смесь загружали H₂ (1 атм.) после трех циклов вакуум/H₂ и перемешивали при к. т. После перемешивания в течение ночи реакционную смесь фильтровали через целит и промывали с помощью MeOH. Фильтрат концентрировали под вакуумом с получением 1,3 г (R)-2-(3-аминофенил)-1-(тиазол-2-ил)этан-1-ола в виде твердого вещества, которое непосредственно применяли на следующей стадии без дополнительной очистки. MS масса/заряд: 221,1 (M+1). Время удерживания 0,50 мин. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 7,72 (d, *J*=3,2 Гц, 1H), 7,59 (d, *J*=3,2 Гц, 1H), 6,88 (t, *J*=7,7 Гц, 1H), 6,46 (t, *J*=1,9 Гц, 1H), 6,42-6,29 (m, 2H), 6,14 (d, *J*=5,7 Гц, 1H), 5,03-4,78 (m, 3H), 3,03 (dd, *J*=13,7, 4,0 Гц, 1H), 2,72 (dd, *J*=13,7, 8,7 Гц, 1H).

Стадия 5. К смеси (R)-2-(3-аминофенил)-1-(тиазол-2-ил)этан-1-ола (1,3 г, 5,92 ммоль) в диоксане/воде (1/1, 16 мл/16 мл) добавляли Вos₂O (1,512 мл, 6,51 ммоль) и NaOH (0,284 г, 7,10 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение ночи. К реакционной смеси добавляли 10 мл воды, затем экстрагировали с помощью EtOAc (3 * 40 мл). Органические фазы объединяли, высушивали над Na₂SO₄, затем концентрировали под вакуумом. Остаток затем разделяли с помощью флэш-колонки, содержащей силикагель (EtOAc/гептан от 0 до 80% затем 80%), с получением 1,24 г трет-бутил-(R)-(3-(2-гидрокси-2-(тиазол-2-ил)этил)фенил)карбамата в виде твердого вещества. MS масса/заряд: 321,3 (M+1). Время удерживания 1,26 мин. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 9,24 (s, 1H), 7,73 (d, *J*=3,2 Гц, 1H), 7,60 (d, *J*=3,3 Гц, 1H), 7,39 (t, *J*=1,8 Гц, 1H), 7,25 (ddd, *J*=8,2, 2,3, 1,1 Гц, 1H), 7,11 (t, *J*=7,8 Гц, 1H), 6,80 (dt, *J*=7,7, 1,2 Гц, 1H), 6,20 (d, *J*=5,7 Гц, 1H), 4,97 (ddd, *J*=8,6, 5,7, 4,0 Гц, 1H), 3,13 (dd, *J*=13,7, 4,0 Гц, 1H), 2,83 (dd, *J*=13,7, 8,7 Гц, 1H), 1,47 (s, 9H).

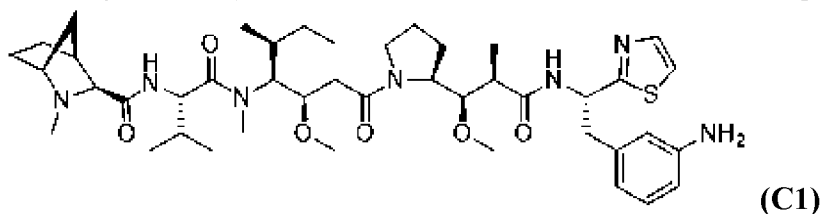
Стадия 6. К охлажденному в ледяной бане раствору трет-бутил-(R)-(3-(2-гидрокси-2-(тиазол-2-ил)этил)фенил)карбамата (1,2 г, 3,75 ммоль) в THF (сухой, 25 мл) в атмосфере N₂ добавляли PPh₃ (1,670 г, 6,37 ммоль). Затем добавляли по каплям DEAD (40% вес. в толуоле) (2,90 мл, 6,37 ммоль) при 0°C с последующим добавлением DPPA (1,372 мл, 6,37 ммоль). Затем ледяную баню удаляли, реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали под вакуумом и затем подвергали разделению с помощью флэш-колонки, содержащей силикагель (EtOAc/гептан от 0 до 30%, затем 30%), с получением 1,03 г трет-бутил-(S)-(3-(2-азидо-2-(тиазол-2-ил)этил)фенил)карбамата в виде масла. MS масса/заряд: 346,3 (M+1). Время удерживания 1,55 мин. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 9,29 (s, 1H), 7,86 (d, *J*=3,2 Гц, 1H), 7,76 (d, *J*=3,2 Гц, 1H), 7,41 (t, *J*=1,9 Гц, 1H), 7,29 (ddd, *J*=8,3, 2,2, 1,1 Гц, 1H), 7,16 (t, *J*=7,8 Гц, 1H), 6,86 (dt, *J*=7,9, 1,2 Гц, 1H), 5,31 (dd, *J*=8,7, 5,7 Гц, 1H), 3,17 (d, *J*=5,3 Гц, 1H), 3,09 (dd, *J*=13,9, 8,7 Гц, 1H), 1,47 (s, 9H).

Стадия 7. К раствору трет-бутил-(S)-(3-(2-азидо-2-(тиазол-2-ил)этил)фенил)карбамата (861 мг, 2,493 ммоль) в MeOH (4 мл) добавляли Pd/C (влажный, 10%, 265 мг, 0,249 ммоль). В реакционную смесь загружали H₂ (1 атм.) после трех циклов вакуум/H₂ и перемешивали при к. т. После перемешивания в течение ночи реакционную

смесь концентрировали, а затем фильтровали через целит и промывали с помощью MeOH. Фильтрат концентрировали под вакуумом с получением 781 мг трет-бутил-(S)-(3-(2-амино-2-(тиазол-2-ил)этил)фенил)карбамата (**i-4**) в виде липкого масла. MS масса/заряд: 320,2 (M+1). Время удерживания 0,91 мин. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆) δ 9,26 (s, 1H), 7,71 (d, J=3,3 Гц, 1H), 7,55 (d, J=3,3 Гц, 1H), 7,36 (t, J=1,9 Гц, 1H), 7,26 (dt, J=8,3, 1,5 Гц, 1H), 7,13 (t, J=7,8 Гц, 1H), 6,78 (dt, J=7,6, 1,3 Гц, 1H), 4,31 (dd, J=8,7, 4,7 Гц, 1H), 3,14 (dd, J=21,2, 5,0 Гц, 1H), 2,73 (dd, J=13,4, 8,7 Гц, 1H), 2,11 (s, 2H), 1,47 (s, 9H).

Синтез иллюстративных фрагментов, представляющих собой лекарственное средство

[00349] Пример А. Синтез (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-2-(3-аминофенил)-1-(тиазол-2-ил)этил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил)(метил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамида (**C1**)

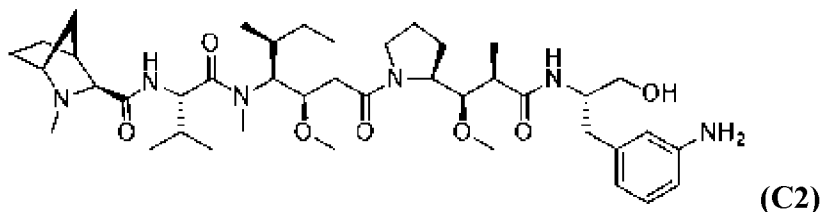


Стадия 1. К раствору (2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((1R,3S,4S)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамидо)бутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропановой кислоты (250 мг, 0,346 ммоль) в DMF (4 мл) добавляли трет-бутил-(S)-(3-(2-амино-2-(тиазол-2-ил)этил)фенил)карбамат (**i-4**) (110 мг, 0,346 ммоль), HATU (158 мг, 0,415 ммоль) и DIPEA (362 мкл, 2,075 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали под вакуумом. Остаток затем растворяли в MeOH и разделяли с помощью колонки весом 100 грамм с обращенной фазой gold C-18 ISCO (MeCN/H₂O 0-100%) с получением 173 мг трет-бутил-(3-((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((1R,3S,4S)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамидо)бутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-2-(тиазол-2-ил)этил)фенил)карбамата в виде белого порошка. MS масса/заряд: 911,0 (M+1). Время удерживания: 1,15 мин.

Стадия 2. Трет-бутил-(3-((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((1R,3S,4S)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамидо)бутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-2-(тиазол-2-ил)этил)фенил)карбамат (173 мг, 0,190 ммоль) растворяли в 1 мл диоксана, затем к смеси добавляли 10 мл 4 н. HCl в диоксане. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин. Реакционную смесь концентрировали в условиях высокого вакуума, а затем разделяли между насыщ. NaHCO₃ и DCM с получением значения pH водн. фазы 8. Основную водн. фазу экстрагировали с помощью 3 x DCM. Объединенные фазы DCM высушивали над насыщ. раствором NaCl и Na₂SO₄ и затем концентрировали в

глубоком вакууме с получением 155 мг (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-2-(3-аминофенил)-1-(тиазол-2-ил)этил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил)(метил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамида в виде твердого вещества. MS масса/заряд: 810,5 (M+1). Время удерживания: 0,90 мин.

[00350] Пример В. Синтез (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-(3-аминофенил)-3-гидроксипропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил)(метил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамида (**C2**)



Стадия 1. DIEA (0,105 мл, 0,60 ммоль) и HATU (45,5 мг, 0,12 ммоль) добавляли к (3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((1R,3S,4S)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамидо)бутанамидо)-3-метокси-5-метилгептановой кислоте (**i-2**) (57 мг, 0,12 ммоль) в DMF (2 мл). Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 5 мин., а затем добавляли DarOMe (**i-3**) (28,5 мг, 0,12 ммоль) в DMF (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 1 ч и затем очищали посредством препаративной HPLC (10-50% смеси ацетонитрила и H₂O, содержащей 0,05% TFA) с получением (2R,3R)-метил-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((1R,3S,4S)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамидо)бутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропаноата. MS масса/заряд: 623,5 (M+H). Время удерживания: 1,225 мин.

Стадия 2. LiOH (30 мг, 1,25 ммоль) добавляли к (2R,3R)-метил-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((1R,3S,4S)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамидо)бутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропаноату (43,2 мг, 0,059 ммоль) в MeOH-H₂O (1:1, 4 мл). Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 18 ч., концентрировали и подкисляли с помощью HCl (1 н., 1 мл). Неочищенный материал очищали посредством препаративной HPLC (10-38% ацетонитрил-H₂O, содержащий 0,05% TFA) с получением (2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((1R,3S,4S)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамидо)бутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропановой кислоты в виде соли TFA. MS масса/заряд: 609,5 (M+H). Время удерживания: 0,962 мин.

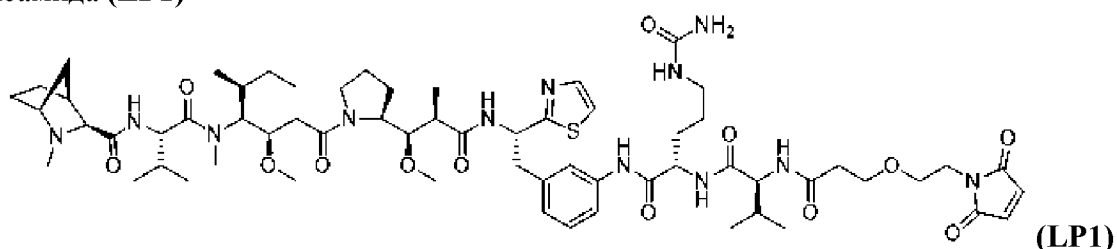
Стадия 3. К (2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((1R,3S,4S)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамидо)бутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропановой кислоте (45,7 мг, 0,063 ммоль) в DMF (1 мл) добавляли DIEA (0,055 мл, 0,32 ммоль) и HATU (24,0 мг, 0,063 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 10 мин, а затем добавляли к соли TFA

(S)-трет-бутил(3-(2-амино-3-гидроксипропил)фенил)карбамата (**i-1**) (24,1 мг, 0,063 ммоль) в DMF (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 1 ч., а затем концентрировали. Неочищенный материал очищали посредством препаративной HPLC (20-70% ацетонитрил-Н₂O, содержащий 0,05% TFA) с получением трет-бутил(3-((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((1R,3S,4S)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамидо)бутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-гидроксипропил)фенил)карбамата в виде соли TFA. MS масса/заряд: 857,5 (M+H). Время удерживания: 1,145 мин.

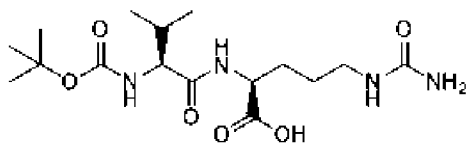
Стадия 4. Раствор трет-бутил(3-((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((1R,3S,4S)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамидо)бутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-гидроксипропил)фенил)карбамата (61,4 мг, 0,063 ммоль) в смеси ацетонитрила и воды (1:1, 4 мл) с 5% HCl перемешивали при к. т. в течение 24 ч. Реакционную смесь затем концентрировали и очищали с помощью препаративной HPLC (10-30% ацетонитрил-Н₂O, содержащий 0,05% TFA) с получением (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-(3-аминофенил)-3-гидроксипропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил)(метил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамидо) (**C2**) в виде соли TFA. MS масса/заряд: 757,5 (M+H). Время удерживания: 0,744 мин.

Синтез иллюстративных соединений, представляющих собой линкер-лекарственное средство

[00351] **Пример С.** Синтез (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-2-(3-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксипропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)фенил)-1-(тиазол-2-ил)этил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил)(метил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамидо) (**LP1**)



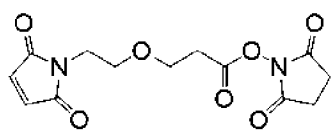
Стадия 1. К смеси (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-2-(3-аминофенил)-1-(тиазол-2-ил)этил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил)(метил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамидо) (**C1**) (154 мг, 0,190 ммоль) и Boc-Val-Cit-



ОН (, 92 мг, 0,247 ммоль) в DCM (5 мл)/MeOH (0,1 мл) добавляли EEDQ (94 мг, 0,380 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение ночи. Реакционную смесь концентрировали под вакуумом. Остаток затем растворяли в MeOH и разделяли с помощью колонки весом 50 грамм с обращенной фазой gold C-18 ISCO (MeCN/H₂O, содержащей 0,05% TFA, 0-100%) с получением 232 мг трет-бутил-((S)-1-(((S)-1-((3-((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((1R,3S,4S)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамидо)бутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-2-(тиазол-2-ил)этил)фенил)амино)-1-оксо-5-уреидопентан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамата в виде соли TFA. MS масса/заряд: 1167,3 (M+1). Время удерживания: 1,10 мин.

Стадия 2. К трет-бутил-((S)-1-(((S)-1-((3-((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((1R,3S,4S)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамидо)бутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-2-(тиазол-2-ил)этил)фенил)амино)-1-оксо-5-уреидопентан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамату (232 мг, 0,181 ммоль) добавляли охлажденный раствор TFA/DCM(25%, 6 мл) при 0°C на ледяной бане, затем смесь перемешивали при 0°C в течение 15 мин, затем обеспечивали нагревание до к. т. Смесь перемешивали при к. т. в течение 30 мин. Реакционную смесь концентрировали под вакуумом. Остаток затем растворяли в DMSO и разделяли с помощью колонки весом 50 грамм с обращенной фазой gold C-18 ISCO (MeCN/H₂O, содержащий 0,05% TFA, 0-100%) с получением 219 мг ((1R,2R)-3-(((S)-2-(3-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)фенил)-1-(тиазол-2-ил)этил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил)(метил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамид в виде соли TFA. MS масса/заряд: 1067,2 (M+1). Время удерживания: 0,88 мин.

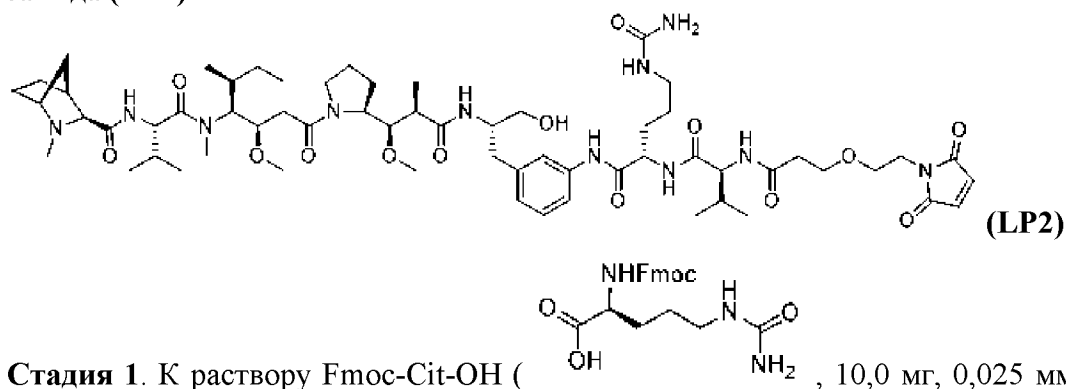
Стадия 3. ((1R,2R)-3-(((S)-2-(3-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)фенил)-1-(тиазол-2-ил)этил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил)(метил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамид (219 мг 0,18 ммоль) растворяли в DMF (2 мл), затем добавляли сложный эфир MAL-PEG1-NHS (



, 73,1 мг, 0,236 ммоль) и DIPEA (190 мкл, 1,087 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 1 ч. Реакционную смесь

концентрировали под вакуумом. Остаток затем растворяли в DMSO и разделяли с помощью колонки весом 50 грамм с обращенной фазой gold C-18 ISCO (смесь MeCN/H₂O, содержащая 0,05% TFA, 0-100%) с получением 174 мг (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-2-(3-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)фенил)-1-(тиазол-2-ил)этил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил)(метил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамида (**LP1**) в виде соли TFA. MS масса/заряд: 1262,4 (M+1). Время удерживания: 1,02 мин.

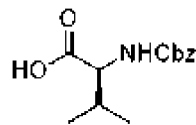
[00352] Пример D. Синтез (1R,3S,4S)-N-(((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-(3-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этоксипропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)фенил)-3-гидроксипропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил)(метил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамид (**LP2**)

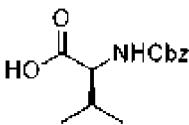


Стадия 1. К раствору Fmoc-Cit-OH (OH NH_2 , 10,0 мг, 0,025 ммоль) в DMF (1 мл) добавляли DIEA (13,0 мг, 0,10 ммоль), а затем HATU (9,6 мг, 0,025 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 5 мин, а затем раствор добавляли к (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-(3-аминофенил)-3-гидроксипропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил)(метил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамиду (**C2**) (20 мг, 0,025 ммоль). Данную реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 1 часа, а затем очищали посредством HPLC с обращенной фазой с применением колонки C18 элюировали с помощью 10-45% ацетонитрил- H_2O , содержащего 0,05% TFA. Фракции, содержащие требуемый продукт, концентрировали с получением (9H-флуорен-9-ил)метил-((S)-1-((3-((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((1R,3S,4S)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамидо)бутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-гидроксипропил)фенил)амино)-1-оксо-5-уреидопентан-2-ил)карбамата в виде соли TFA. LCMS масса/заряд: 1136,6 (M+1), время удерживания: 1,042

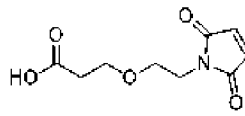
минуты.

Стадия 2. Соль TFA (9H-флуорен-9-ил)метил ((S)-1-((3-((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((1R,3S,4S)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамидо)бутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-гидроксипропил)фенил)амино)-1-оксо-5-уреидопентан-2-ил)карбамата (31,5 мг, 0,025 ммоль) растворяли в MeOH (1 мл). Затем добавляли Pd/C (10 мг, 9,40 мкмоль). Присоединяли баллон с водородом объемом 2 л и реакционную смесь продували в вакууме с помощью H₂ трижды, а затем перемешивали под H₂ при к. т. в течение 30 мин. Катализатор затем удаляли посредством фильтрации через целит и смесь концентрировали и обрабатывали 1 н. NaOH. Неочищенную смесь очищали с помощью HPLC с обращенной фазой с применением колонки C18, элюировали с помощью 5-37% ацетонитрил-H₂O, содержащего 0,05% TFA. Фракции, содержащие требуемый продукт, лиофилизировали с получением (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-(3-((S)-2-амино-5-уреидопентанамидо)фенил)-3-гидроксипропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил)(метил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамида в виде соли TFA. LCMS масса/заряд: 914,6 (M+1), время удерживания: 0,773 мин.



Стадия 3. К раствору Cbz-Val-OH (, 2,6 мг, 0,011 ммоль) в DMF (1 мл) добавляли DIEA (0,011 мл, 0,061 ммоль), а затем HATU (3,86 мг, 0,011 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 5 мин, а затем добавляли к раствору соли TFA (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-(3-((S)-2-амино-5-уреидопентанамидо)фенил)-3-гидроксипропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил)(метил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамида (11,6 мг, 0,011 ммоль) в DMF (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 1 часа, а затем неочищенный материал очищали посредством HPLC с обращенной фазой с применением колонки C18, элюировали с помощью 10-50% ацетонитрил-H₂O, содержащего 0,05% TFA. Фракции, содержащие требуемый продукт, лиофилизировали с получением бензил-((S)-1-(((S)-1-((3-((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((1R,3S,4S)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамидо)бутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-гидроксипропил)фенил)амино)-1-оксо-5-уреидопентан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамата в виде соли TFA. LCMS масса/заряд: 1147,6 (M+1), время удерживания: 0,986 мин.

Стадия 4. Соль TFA бензил-((S)-1-(((S)-1-((3-((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((1R,3S,4S)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамидо)бутанамидо)-3-метокси-5-метилгептаноил)пирролидин-2-ил)-3-метокси-2-метилпропанамидо)-3-гидроксипропил)фенил)амино)-1-оксо-5-уреидопентан-2-ил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)карбамата (7,7 мг, 0,006 ммоль) растворяли в MeOH (2 мл), а затем добавляли Pd/C (5 мг, 4,70 мкмоль). Присоединяли баллон с водородом объемом 2 л и реакционную смесь продували H₂ в вакууме трижды, а затем перемешивали под H₂ в течение 30 мин. С помощью LCMS определяли, что реакция завершена. Затем катализатор удаляли с помощью фильтрации через целит и затем смесь концентрировали с получением (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-(3-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)фенил)-3-гидроксипропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил)(метил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамид в виде соли TFA. LCMS масса/заряд: 1013,6 (M+1), время удерживания: 0,774 мин.



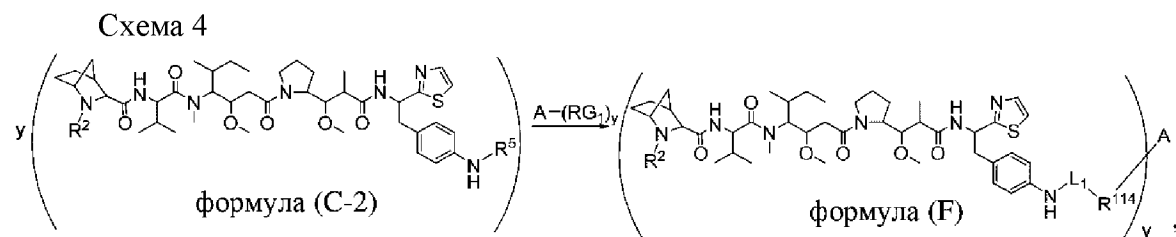
Стадия 5. К раствору Mal-PEG1-кислота (, 1,0 мг, 0,005 ммоль) в DMF (0,5 мл) добавляли DIEA (2,8 мг, 0,022 ммоль), а затем HATU (1,8 мг, 0,005 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 5 мин., а затем добавляли к раствору соли TFA (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-(3-((S)-2-((S)-2-амино-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)фенил)-3-гидроксипропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил)(метил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамид (4,8 мг, 0,005 ммоль) в DMF (1 мл). Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 1 часа, а затем неочищенный материал очищали посредством HPLC с обращенной фазой с применением колонки C18, элюировали с помощью 10-38% ацетонитрил-H₂O, содержащего 0,05% TFA. Фракции, содержащие требуемый продукт, лиофилизировали с получением (1R,3S,4S)-N-((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((S)-1-(3-((S)-2-((S)-2-(3-(2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)пропанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)фенил)-3-гидроксипропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-ил)(метил)амино)-3-метил-1-оксобутан-2-ил)-2-метил-2-азабицикло[2.2.1]гептан-3-карбоксамид в виде соли TFA (**LP-2**). LCMS масса/заряд: 1208,5 (M+1), время удерживания: 0,882 мин.

Конъюгация и получение ADC

Способы получения конъюгата антитела формулы (I)

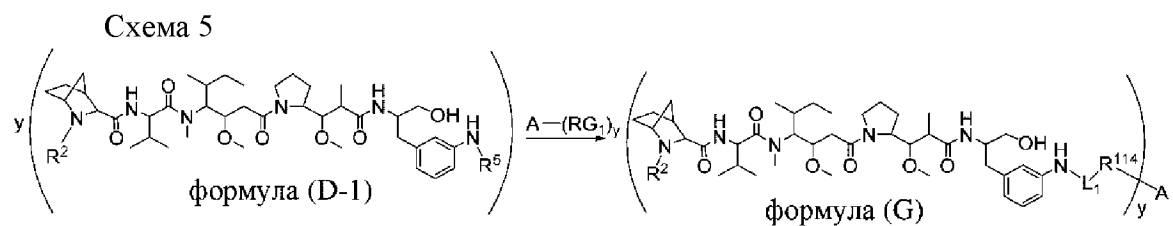
или гидроксилламинная группа реагирует с кетонной с получением оксима. А, у, L_1 , R^2 , R^5 и R^{114} являются такими, как определено в данном документе.

[00356] Общая схема реакции образования конъюгатов формулы (F) показана на схеме 4 ниже:



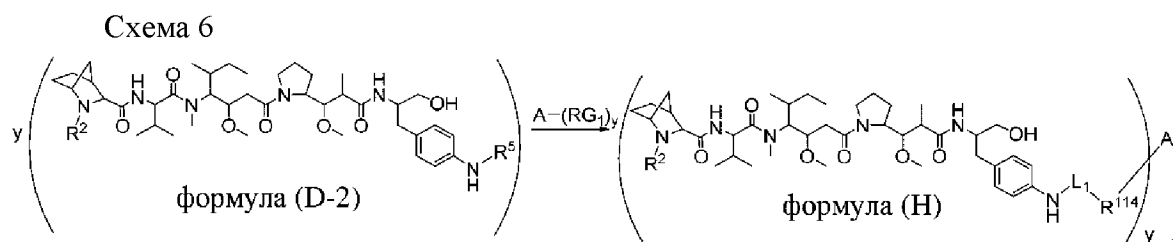
где R^5 представляет собой $-L_1R^{14}$, $-L_1R^{24}$, $-L_1R^{34}$ или $-L_1R^{44}$ и RG_1 представляет собой реакционно-способную группу, исключительно в качестве примера тиольная, или аминная, или кетонная, которая вступает в реакцию с совместимой группой R^{14} , R^{24} , R^{34} или R^{44} соединения формулы (C-2) с образованием соответствующей группы R^{114} . В качестве примера, малеимидная группа реагирует с тиольной с получением сукцинимидного кольца, или гидроксилламинная группа реагирует с кетонной с получением оксима. А, у, L_1 , R^2 , R^5 и R^{114} являются такими, как определено в данном документе.

[00357] Общая схема реакции образования конъюгатов формулы (G) показана на схеме 5 ниже:



где R^5 представляет собой $-L_1R^{14}$, $-L_1R^{24}$, $-L_1R^{34}$ или $-L_1R^{44}$ и RG_1 представляет собой реакционно-способную группу, исключительно в качестве примера тиольная, или аминная, или кетонная, которая вступает в реакцию с совместимой группой R^{14} , R^{24} , R^{34} или R^{44} соединения формулы (D-1) с образованием соответствующей группы R^{114} . В качестве примера, малеимидная группа реагирует с тиольной с получением сукцинимидного кольца, или гидроксилламинная группа реагирует с кетонной с получением оксима. А, у, L_1 , R^2 , R^5 и R^{114} являются такими, как определено в данном документе.

[00358] Общая схема реакции образования конъюгатов формулы (H) показана на схеме 6 ниже:



где R^5 представляет собой $-L_1R^{14}$, $-L_1R^{24}$, $-L_1R^{34}$ или $-L_1R^{44}$ и RG_1 представляет собой

реакционно-способную группу, исключительно в качестве примера тиольная, или аминная, или кетонная, которая вступает в реакцию с совместимой группой R^{14} , R^{24} , R^{34} или R^{44} соединения формулы (D-2) с образованием соответствующей группы R^{114} . В качестве примера, малеимидная группа реагирует с тиольной с получением сукцинимидного кольца, или гидроксилламинная группа реагирует с кетонной с получением оксима. А, у, L_1 , R^2 , R^5 и R^{114} являются такими, как определено в данном документе.

Терапевтические варианты применения

[00359] Антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) и конъюгаты антитела и лекарственного средства, раскрытые в данном документе, применимы для лечения любого рака, экспрессирующего CD48, например, гематологических заболеваний или гематологических злокачественных новообразований. Гематологические заболевания/злокачественные новообразования, которые можно подвергать лечению с помощью антител, фрагментов антител (например, антигенсвязывающих фрагментов) и конъюгатов антитела и лекарственного средства, раскрытых в данном документе, включают множественную миелому, острый лимфобластный лейкоз (ALL), острый миелогенный лейкоз (AML), острый моноцитарный лейкоз (AMoL), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), хронический миелогенный лейкоз (CML), волосатоклеточный лейкоз (HCL), Т-клеточный пролимфоцитарный лейкоз (T-PLL), лейкоз из больших зернистых лимфоцитов и Т-клеточный лейкоз взрослых, лимфому, В-клеточную лимфому, лейкоз/лимфому из предшественников Т-клеток, лимфому Беркитта, фолликулярную лимфому, диффузную крупноклеточную В-лимфому, лимфому из клеток мантийной зоны, В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз/лимфому, MALT-лимфому, фунгоидный микоз, неутонченную периферическую Т-клеточную лимфому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, форму ходжкинской лимфомы с нодулярным склерозом, смешанноклеточный подтип лимфомы Ходжкина и миелодиспластический синдром.

[00360] В некоторых вариантах осуществления антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) и конъюгаты антитела и лекарственного средства, раскрытые в данном документе, применимы для лечения любых CD48-экспрессирующих солидных опухолей, выбранных из любого из следующих: рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), мелкоклеточного рака легкого (SCLC), рака толстой кишки, колоректального рака, рака прямой кишки, почечноклеточной карциномы, рака печени, гепатоцеллюлярной карциномы, рака тонкой кишки, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака головы и шеи, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака щитовидной железы, рака шейки матки, рака яичника, рака кожи, меланомы и рака предстательной железы. Рак может быть на ранней, промежуточной, поздней стадии или представлять собой метастатический рак.

[00361] В некоторых вариантах осуществления антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) и конъюгаты антитела и лекарственного средства, раскрытые в данном документе, применимы для лечения рака молочной железы,

множественной миеломы, В-клеточной лимфомы, плазмоклеточной миеломы, лейкемии, лимфомы, рака желудка, острой миелоидной лейкемии, рака мочевого пузыря, рака головного мозга, рака костного мозга, рака шейки матки, хронической лимфоцитарной лейкемии, колоректального рака, рака пищевода, гепатоцеллюлярного рака, лимфобластной лейкемии, фолликулярной лимфомы, лимфоидных злокачественных новообразований Т-клеточного или В-клеточного происхождения, меланомы, миелогенной лейкемии, миеломы, рака ротовой полости, рака яичника, немелкоклеточного рака легкого, хронической лимфоцитарной лейкемии, рака предстательной железы, мелкоклеточного рака легкого или рака селезенки.

Комбинированная терапия

[00362] В определенных случаях антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) и конъюгаты антитела и лекарственного средства по настоящему изобретению могут применяться в комбинации с другой схемой кондиционирования, такой как лучевая терапия или химиотерапия.

[00363] В определенных случаях антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) и конъюгаты антитела и лекарственного средства по настоящему изобретению могут применяться в комбинации с другим терапевтическим средством, таким как противораковое средство, средство против тошноты (или противорвотное средство), обезболивающее средство, средство для мобилизации или их комбинации.

[00364] Распространенные химиотерапевтические средства, рассматриваемые для применения в видах комбинированной терапии, включают анастрозол (Arimidex[®]), бикалутамид (Casodex[®]), блеомицина сульфат (Blenoxane[®]), бусульфан (Myleran[®]), бусульфан в виде инъекции (Busulfex[®]), капецитабин (Xeloda[®]), N4-пентоксикарбонил-5-дезоксид-5-фторцитидин, карбоплатин (Paraplatin[®]), кармустин (BiCNU[®]), хлорамбуцил (Leukeran[®]), цисплатин (Platinol[®]), кладрибин (Leustatin[®]), циклоспорин (Sandimmune[®], Neoral[®] или Restasis[®]), циклофосфамид (Cytosan[®] или Neosar[®]), цитарабин, цитозина арабинозид (Cytosar-U[®]), цитарабин в виде липосомной инъекции (DepoCyt[®]), дакарбазин (DTIC-Dome[®]), дактиномицин (актиномицин D, Cosmegen), даунорубицина гидрохлорид (Cerubidine[®]), даунорубицина цитрат в виде липосомной инъекции (DaunoXome[®]), дексаметазон, доцетаксел (Taxotere[®]), доксорубицина гидрохлорид (Adriamycin[®], Rubex[®]), этопозид (Vepesid[®]), флударабина фосфат (Fludara[®]), 5-фторурацил (Adrucil[®], Efudex[®]), флутамид (Eulexin[®]), тезацитибин, гемцитабин (дифтордезоксидцитидин), гидроксимочевину (Hydrea[®]), идарубицин (Idamycin[®]), ифосфамид (IFEX[®]), иринотекан (Camptosar[®]), L-аспарагиназу (ELSPAR[®]), лейковорин кальция, мелфалан (Alkeran[®]), 6-меркаптопурин (Purinethol[®]), метотрексат (Folex[®]), митоксантрон (Novantrone[®]), милотарг, паклитаксел (Taxol[®]), феникс (иттрий 90/MX-DTPA), пентостатин, полифероспан 20 с имплантатом кармустина (Gliadel[®]), тамоксифена цитрат (Nolvadex[®]), тенипозид (Vumon[®]), 6-тиогуанин, тиотепу, тирапазамин (Tirazone[®]), топотекана гидрохлорид для инъекции (Hycamptin[®]), винбластин (Velban[®]), винкрестин (Oncovin[®]) и винорелбин (Navelbine[®]).

[00365] В одном аспекте антитела, фрагменты антитела (например, антигенсвязывающие фрагменты) или конъюгаты антитела и лекарственного средства по настоящему изобретению можно объединять в фармацевтическом комбинированном составе со вторым соединением, характеризующимся противораковыми свойствами, или схема введения доз предусматривает комбинированную терапию с ним. Второе соединение фармацевтического комбинированного состава или схемы введения доз может характеризоваться видами активности, которые взаимно дополняют конъюгат из комбинации, вследствие чего они не оказывают неблагоприятного эффекта друг на друга.

[00366] Применяемый в данном документе термин "фармацевтическая комбинация" относится к фиксированной комбинации в одной стандартной лекарственной форме либо к нефиксированной комбинации или набору из частей для комбинированного введения, при этом два или более терапевтических средства можно вводить независимо в одно и то же время или по отдельности в пределах временных интервалов, в частности, если данные временные интервалы обеспечивают возможность проявления партнерами по комбинации совместного, например, синергического, эффекта.

[00367] Термин "комбинированная терапия" относится к введению двух или более терапевтических средств для лечения терапевтического состояния или нарушения, описанных в настоящем изобретении. Такое введение охватывает совместное введение этих терапевтических средств практически одновременно, например, в одной капсуле, имеющей фиксированное отношение активных ингредиентов. В качестве альтернативы такое введение охватывает совместное введение в виде нескольких или отдельных контейнеров (например, капсулы, порошки и жидкости) для каждого активного ингредиента. Порошки и/или жидкости могут быть восстановлены или разбавлены до требуемой дозы перед введением. Кроме того, такое введение также охватывает применение каждого типа терапевтического средства последовательным образом, либо приблизительно в одно и то же время, либо в разное время. В любом случае схема лечения будет обеспечивать приносящие пользу эффекты комбинации лекарственных средств при лечении состояний или нарушений, описанных в данном документе.

[00368] Комбинированная терапия может обеспечивать "синергию" и оказаться "синергической", т. е. эффект, достигаемый при совместном применении активных ингредиентов, превышает сумму эффектов, которые являются результатом применения соединений по отдельности. Синергетический эффект может быть достигнут, когда активные ингредиенты: (1) составлены вместе и вводятся или доставляются одновременно в виде комбинированного состава с однократной дозой; (2) доставляются по очереди или параллельно как отдельные составы или (3) применяется какая-либо другая схема. При доставке в виде терапии с чередованием синергетический эффект может достигаться, когда соединения вводят или доставляют одно за другим, например, посредством различных инъекций в отдельных шприцах. В целом, во время терапии с чередованием эффективную дозу каждого активного ингредиента вводят одну за другой, т. е. сериями, в то время как при комбинированной терапии эффективную дозу двух или более активных ингредиентов

вводят вместе.

[00369] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения, где раскрытые в данном документе конъюгаты антитела и лекарственного средства вводят в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами. Иллюстративные партнеры по комбинации раскрыты в данном документе.

[00370] В определенных вариантах осуществления комбинация, описанная в данном документе, содержит ингибитор PD-1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 выбран из PDR001 (Novartis), ниволумаба (Bristol-Myers Squibb), пембролизумаба (Merck & Co), пидилизумаба (CureTech), MEDI0680 (Medimmune), REGN2810 (Regeneron), TSR-042 (Tesarо), PF-06801591 (Pfizer), BGB-A317 (Beigene), BGB-108 (Beigene), INCSHR1210 (Incyte) или AMP-224 (Amplimmune). В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой PDR001. PDR001 также известен как спартализумаб.

[00371] В определенных вариантах осуществления комбинация, описанная в данном документе, содержит ингибитор LAG-3. В некоторых вариантах осуществления ингибитор LAG-3 выбран из LAG525 (Novartis), BMS-986016 (Bristol-Myers Squibb) или TSR-033 (Tesarо).

[00372] В определенных вариантах осуществления комбинация, описанная в данном документе, содержит ингибитор TIM-3. В некоторых вариантах осуществления ингибитор TIM-3 представляет собой MBG453 (Novartis), TSR-022 (Tesarо), LY-3321367 (Eli Lilly), Sym23 (Symphogen), BGB-A425 (Beigene), INCAGN-2390 (Agenus), BMS-986258 (BMS), RO-7121661 (Roche) или LY-3415244 (Eli Lilly). MBG453 также известен как сабатолимаб.

[00373] В определенных вариантах осуществления комбинация, описанная в данном документе, содержит ингибитор PDL1. В одном варианте осуществления ингибитор PDL1 выбран из FAZ053 (Novartis), атезолизумаба (Genentech), дурвалумаба (Astra Zeneca) или авелумаба (Pfizer).

[00374] В определенных вариантах осуществления комбинация, описанная в данном документе, содержит агонист GITR. В некоторых вариантах осуществления агонист GITR выбран из GWN323 (NVS), BMS-986156, MK-4166 или MK-1248 (Merck), TRX518 (Leap Therapeutics), INCAGN1876 (Incyte/Agenus), AMG 228 (Amgen) или INBRX-110 (Inhibrx).

[00375] В некоторых вариантах осуществления комбинация, описанная в данном документе, содержит ингибитор IAP. В некоторых вариантах осуществления ингибитор IAP предусматривает LCL161 или соединение, раскрытое в публикации международной заявки № WO 2008/016893.

[00376] В одном варианте осуществления комбинация содержит ингибитор mTOR, например, RAD001 (также известный как эверолимус).

[00377] В одном варианте осуществления комбинация содержит ингибитор HDAC, например, LBH589. LBH589 также известен как панобиностат.

[00378] В одном варианте осуществления комбинация содержит ингибитор IL-17, например, CJM112.

[00379] В некоторых вариантах осуществления комбинация, описанная в данном документе, содержит антагонист эстрогенового рецептора (ER). В некоторых вариантах осуществления антагонист эстрогенового рецептора применяется в комбинации с ингибитором PD-1, ингибитором CDK4/6 или с обоими из них. В некоторых вариантах осуществления комбинация применяется для лечения ER-положительного (ER+) рака или рака молочной железы (например, ER+ рака молочной железы).

[00380] В некоторых вариантах осуществления антагонист эстрогенового рецептора представляет собой селективный декструктор эстрогенового рецептора (SERD). SERD представляют собой антагонисты эстрогенового рецептора, которые связываются с рецептором и приводят к, например, деградации или супрессии функции рецептора (Boer K. *et al.*, (2017) *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 9(7): 465-479). ER представляет собой активируемый гормонами транскрипционный фактор, важный, например, для роста, развития и физиологии репродуктивной системы человека. ER активируется, например, гормоном эстрогеном (17-бета-эстрадиолом). Экспрессия и передача сигнала ER задействованы при видах рака (например, рака молочной железы), например, при ER-положительном (ER+) раке молочной железы. В некоторых вариантах осуществления SERD выбран из LSZ102, фулвестранта, бриланестранта или элацестранта.

[00381] В некоторых вариантах осуществления SERD предусматривает соединение, раскрытое в публикации международной заявки № WO 2014/130310, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00382] В некоторых вариантах осуществления SERD предусматривает LSZ102. LSZ102 имеет химическое название (E)-3-(4-((2-(2-(1,1-дифторэтил)-4-фторфенил)-6-гидроксibenzo[b]тиофен-3-ил)окси)фенил)акриловая кислота. В некоторых вариантах осуществления SERD предусматривает фулвестрант (регистрационный номер по CAS: 129453-61-8) или соединение, раскрытое в публикации международной заявки № WO 2001/051056, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления SERD предусматривает элацестрант (регистрационный номер по CAS: 722533-56-4) или соединение, раскрытое в патенте США № 7612114, который включен посредством ссылки во всей своей полноте. Элацестрант также известен как RAD1901, ER-306323 или (6R)-6-{2-[этил({4-[2-(этиламино)этил]фенил}метил)амино]-4-метоксифенил}-5,6,7,8-тетрагидронафталин-2-ол. Элацестрант представляет собой нестероидный комбинированный селективный модулятор эстрогенового рецептора (SERM) и SERD, характеризующийся биодоступностью при пероральном применении. Элацестрант также раскрыт, например, в Garner F *et al.*, (2015) *Anticancer Drugs* 26(9):948-56. В некоторых вариантах осуществления SERD представляет собой бриланестрант (регистрационный номер по CAS: 1365888-06-7) или соединение, раскрытое в публикации международной заявки № WO 2015/136017, которая включена посредством ссылки во всей своей полноте.

[00383] В некоторых вариантах осуществления SERD выбран из RU 58668, GW7604, AZD9496, базедоксифена, пипендоксифена, арзоксифена, OP-1074 или аколбифена,

например, как раскрыто в *et al.* (2015) *Journal of Medicinal Chemistry* 58(12) 4883-4887.

[00384] Другие иллюстративные антагонисты эстрогенового рецептора раскрыты, например, в WO 2011/156518, WO 2011/159769, WO 2012/037410, WO 2012/037411 и US 2012/0071535, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00385] В определенных вариантах осуществления комбинация, описанная в данном документе, содержит ингибитор циклинзависимых киназ 4 или 6 (CDK4/6). В некоторых вариантах осуществления ингибитор CDK4/6 применяется в комбинации с ингибитором PD-1, антагонистом эстрогенового рецептора (ER) или обоими из них. В некоторых вариантах осуществления комбинация применяется для лечения ER-положительного (ER+) рака или рака молочной железы (например, ER+ рака молочной железы). В некоторых вариантах осуществления ингибитор CDK4/6 выбран из рибоциклиба, абемациклиба (Eli Lilly) или палбоциклиба.

[00386] В некоторых вариантах осуществления ингибитор CDK4/6 предусматривает рибоциклиб (регистрационный номер по CAS: 1211441-98-3) или соединение, раскрытое в патентах США №№ 8415355 и 8685980, которые включены посредством ссылки во всей своей полноте.

[00387] В некоторых вариантах осуществления ингибитор CDK4/6 предусматривает соединение, раскрытое в публикации международной заявки № WO 2010/020675 и патентах США №№ 8415355 и 8685980, которые включены посредством ссылки во всей своей полноте.

[00388] В некоторых вариантах осуществления ингибитор CDK4/6 предусматривает рибоциклиб (регистрационный номер по CAS: 1211441-98-3). Рибоциклиб также известен как LEE011, KISQALI® или 7-циклопентил-N,N-диметил-2-((5-(пиперазин-1-ил)пиридин-2-ил)амино)-7H-пирроло[2,3-d]пиримидин-6-карбоксамид.

[00389] В некоторых вариантах осуществления ингибитор CDK4/6 предусматривает абемациклиб (регистрационный номер по CAS: 1231929-97-7). Абемациклиб также известен как LY835219 или N-[5-[(4-этил-1-пиперазинил)метил]-2-пиридирил]-5-фтор-4-[4-фтор-2-метил-1-(1-метилэтил)-1H-бензимидазол-6-ил]-2-пиримидинамин. Абемациклиб представляет собой ингибитор CDK, селективный в отношении CDK4 и CDK6, и раскрытый, например, в Torres-Guzman R *et al.* (2017) *Oncotarget* 10.18632/oncotarget.17778.

[00390] В некоторых вариантах осуществления ингибитор CDK4/6 предусматривает палбоциклиб (регистрационный номер по CAS: 571190-30-2). Палбоциклиб также известен как PD-0332991, IBRANCE® или 6-ацетил-8-циклопентил-5-метил-2-{[5-(1-пиперазинил)-2-пиридирил]амино}пиридо[2,3-d]пиримидин-7(8H)-он. Палбоциклиб ингибирует CDK4 с IC₅₀, составляющей 11 нМ, и ингибирует CDK6 с IC₅₀, составляющей 16 нМ, и раскрыт, например, в Finn *et al.* (2009) *Breast Cancer Research* 11(5):R77.

[00391] В определенных вариантах осуществления комбинация, описанная в данном документе, содержит ингибитор хемокинового (C-X-C мотив) рецептора 2 (CXCR2). В некоторых вариантах осуществления ингибитор CXCR2 выбран из 6-хлор-3-((3,4-диоксо-

2-(пентан-3-иламино)циклобут-1-ен-1-ил)амино)-2-гидрокси-N-метокси-N-метилбензолсульфонамида, данириксина, репариксина или навариксина.

[00392] В некоторых вариантах осуществления средство, связывающее CSF-1/1R, выбрано из ингибитора макрофагального колониестимулирующего фактора (M-CSF), например, моноклонального антитела или Fab к M-CSF (например, MCS110), ингибитора тирозинкиназы CSF-1R (например, 4-((2-(((1R,2R)-2-гидроксициклогексил)амино)бензо[d]тиазол-6-ил)окси)-N-метилпиколинамида или BLZ945), ингибитора рецепторной тирозинкиназы (RTK) (например, пексидартиниба) или антитела, нацеливающегося на CSF-1R (например, эмактузумаба или FPA008). В некоторых вариантах осуществления ингибитор CSF-1/1R представляет собой BLZ945. В некоторых вариантах осуществления средство, связывающее CSF-1/1R, представляет собой MCS110. В других вариантах осуществления средство, связывающее CSF-1/1R, представляет собой пексидартиниб.

[00393] В определенных вариантах осуществления комбинация, описанная в данном документе, содержит ингибитор c-MET. C-MET, рецепторная тирозинкиназа, сверхэкспрессированная или мутировавшая во многих типах опухолевых клеток, играет ключевую роль в пролиферации опухолевых клеток, выживании, инвазии, метастазировании и ангиогенезе опухоли. Ингибирование c-MET может индуцировать гибель клеток среди опухолевых клеток, сверхэкспрессирующих белок c-MET или экспрессирующих конститутивно активируемый белок c-MET. В некоторых вариантах осуществления ингибитор c-MET выбран из капматиниба (INC280), JNJ-3887605, AMG 337, LY2801653, MSC2156119J, кризотиниба, тивантиниба или голватиниба.

[00394] В определенных вариантах осуществления комбинация, описанная в данном документе, содержит ингибитор трансформирующего фактора роста бета (также известного как TGF- β , TGF β , TGFb или TGF-бета, применяемые взаимозаменяемо в данном документе). В некоторых вариантах осуществления ингибитор TGF- β выбран из фрезолимумаба или ХОМА 089.

[00395] В определенных вариантах осуществления комбинация, описанная в данном документе, содержит антагонист аденозинового рецептора A2a (A2aR) (например, ингибитор A2aR пути, например, ингибитор аденозина, например, ингибитор A2aR или CD-73). В некоторых вариантах осуществления антагонист A2aR применяется в комбинации с ингибитором PD-1 и одним или несколькими (например, двумя, тремя, четырьмя, пятью или всеми) из ингибитора CXCR2, средства, связывающего CSF-1/1R, ингибитора LAG-3, агониста GITR, ингибитора c-MET или ингибитора IDO. В некоторых вариантах осуществления комбинация применяется для лечения рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака желудка или меланомы (например, рефрактерной меланомы). В некоторых вариантах осуществления антагонист A2aR выбран из PBF509 (NIR178) (Palobiofarma/Novartis), CPI444/V81444 (Corvus/Genentech), AZD4635/HTL-1071 (AstraZeneca/Heptares), випаденанта (Redox/Juno), GBV-2034 (Globavir), AB928 (Arcus Biosciences), теофиллина, истрадефиллина (Kyowa Hakko Kogyo), тозадананта/SYN-115

(Acorda), KW-6356 (Kyowa Hakko Kogyo), ST-4206 (Leadiant Biosciences) или преладенанта/SCH 420814 (Merck/Schering). Без ограничения какой-либо теорией, считается, что в некоторых вариантах осуществления ингибирование A2aR приводит к повышению уровня IL-1b.

[00396] В определенных вариантах описанная в данном документе комбинация содержит ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) и/или триптофан-2,3-диоксигеназы (TDO). В некоторых вариантах осуществления ингибитор IDO применяется в комбинации с ингибитором PD-1 и одним или несколькими (например, двумя, тремя, четырьмя или всеми) из ингибитора TGF- β , антагониста A2aR, средства, связывающего CSF-1/1R, ингибитора с-MET или агониста GTR. В некоторых вариантах осуществления комбинация применяется для лечения рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака желудка или меланомы (например, рефрактерной меланомы). В некоторых вариантах осуществления ингибитор IDO выбран из (4E)-4-[(3-хлор-4-фторанилино)нитрозометилиден]-1,2,5-оксадиазол-3-амин (также известного как эпакдостат или INCB24360), индоксимода (NLG8189), (1-метил-D-триптофана), α -циклогексил-5H-имидазо[5,1-a]изоиндол-5-этанола (также известного как NLG919), индоксимода, BMS-986205 (ранее F001287).

[00397] В определенных вариантах осуществления комбинация, описанная в данном документе, содержит ингибитор галектина, например, галектина-1 или галектина-3. В некоторых вариантах осуществления комбинация содержит ингибитор галектина-1 и ингибитор галектина-3. В некоторых вариантах осуществления комбинация содержит биспецифический ингибитор (например, молекулу биспецифического антитела), нацеливающийся как на галектин-1, так и на галектин-3. В некоторых вариантах осуществления ингибитор галектина применяется в комбинации с одним или несколькими терапевтическими средствами, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления ингибитор галектина выбран из молекулы антитела к галектину, GR-MD-02 (Galectin Therapeutics), галектин-3C (Mandal Med), ангинокса или OTX-008 (OncoEthix, Merck).

[00398] В некоторых вариантах осуществления комбинация, описанная в данном документе, содержит ингибитор MEK. В некоторых вариантах осуществления ингибитор MEK выбран из траметиниба, селуметиниба, AS703026, BIX 02189, BIX 02188, CI-1040, PD0325901, PD98059, U0126, XL-518, G-38963 или G02443714. В некоторых вариантах осуществления ингибитор MEK представляет собой траметиниб.

[00399] В одном варианте осуществления комбинация, описанная в данном документе, содержит ингибитор интерлейкина-1 бета (IL-1 β). В некоторых вариантах осуществления ингибитор IL-1 β выбран из канакинумаба, гевокизумаба, анакинры или рилонцепта.

[00400] В определенных вариантах осуществления комбинация, описанная в данном документе, содержит комплекс IL-15/IL-15Ra. В некоторых вариантах осуществления комплекс IL-15/IL-15Ra выбран из NIZ985 (Novartis), ATL-803 (Altor) или CYP0150

(Cytune).

[00401] В некоторых вариантах осуществления комбинация, описанная в данном документе, содержит ингибитор гомолога мышинового двойного микробелка 2 (MDM2). Гомолог MDM2 человека также известен как HDM2. В некоторых вариантах осуществления ингибитор MDM2, описанный в данном документе, также известен как ингибитор HDM2. В некоторых вариантах осуществления ингибитор MDM2 выбран из HDM201 или CGM097.

[00402] В одном варианте осуществления ингибитор MDM2 включает (S)-1-(4-хлорфенил)-7-изопропокси-6-метокси-2-(4-(метил(((1*r*,4*S*)-4-(4-метил-3-оксопиперазин-1-ил)циклогексил)метил)амино)фенил)-1,2-дигидроизохинолин-3(4*H*)-он (также известный как CGM097) или соединение, раскрытое в публикации согласно РСТ № WO 2011/076786, для лечения нарушения, например, нарушения, описанного в данном документе). В одном варианте осуществления терапевтическое средство, раскрытое в данном документе, применяется в комбинации с CGM097.

[00403] В некоторых вариантах осуществления комбинация, описанная в данном документе, содержит гипометилирующее средство (HMA). В одном из некоторых вариантов осуществления HMA выбран из децитабина или азацитидина.

Фармацевтические композиции

[00404] Для получения фармацевтических или стерильных композиций, содержащих одно или несколько из антител, фрагментов антител (например, антигенсвязывающих фрагментов) или конъюгатов антитела и лекарственного средства, описанных в данном документе, предусмотренный(-ые) конъюгат(-ы) можно смешивать с фармацевтически приемлемым носителем или вспомогательным веществом.

[00405] Составы на основе терапевтических и диагностических средств могут быть получены путем смешивания с физиологически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами или стабилизаторами в форме, например, лиофилизированных порошков, взвесей, водных растворов, лосьонов или суспензий (см., например, Hardman *et al.*, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y., 2001; Gennaro, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y., 2000; Avis, *et al.* (eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY, 1993; Lieberman, *et al.* (eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY, 1990; Lieberman, *et al.* (eds.) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY, 1990; Weiner and Kotkoskie, Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 2000).

[00406] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или конъюгат антитела и лекарственного средства по настоящему изобретению, представляет собой лиофилизированный препарат. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или конъюгат антитела и лекарственного

средства, представляет собой лиофилизат во флаконе, содержащий антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или конъюгат антитела и лекарственного средства в буферном растворе. Лيوфилизат может быть восстановлен, например, с помощью воды, солевого раствора для инъекции. Для внутривенного введения полученный раствор можно дополнительно разбавлять в растворе носителя.

[00407] Выбор схемы введения для терапевтического средства зависит от нескольких факторов, в том числе интенсивности метаболизма сыворотки или ткани для объекта, уровня симптомов, иммуногенности объекта и доступности клеток-мишеней в биологической матрице. В определенных вариантах осуществления схема введения максимизирует количество терапевтического средства, доставляемого пациенту, в соответствии с приемлемым уровнем побочных эффектов. Соответственно, количество доставляемого биологического средства частично зависит от конкретного объекта и тяжести состояния, подлежащего лечению. Руководства по подбору подходящих доз антител, цитокинов и малых молекул являются доступными (см., например, Wawrzynczak, *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK, 1996; Kresina (ed.), *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1991; Bach (ed.), *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1993; Baert *et al.*, *New Engl. J. Med.* 348:601-608, 2003; Milgrom *et al.*, *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973, 1999; Slamon *et al.*, *New Engl. J. Med.* 344:783-792, 2001; Beniaminovitz *et al.*, *New Engl. J. Med.* 342:613-619, 2000; Ghosh *et al.*, *New Engl. J. Med.* 348:24-32, 2003; Lipsky *et al.*, *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602, 2000).

[00408] Определение подходящей дозы выполняет лечащий врач, например, с применением параметров или факторов, которые, как известно или ожидаемо из уровня техники, воздействуют на лечение или, как прогнозируют, воздействуют на лечение. Обычно начинают дозирование с количества, несколько меньшего, чем оптимальная доза, и после этого ее повышают небольшими шагами до тех пор, пока не достигается требуемый или оптимальный эффект по сравнению с любыми отрицательными побочными эффектами. Важные диагностические показатели включают, например, показатели, являющиеся симптомами воспаления или уровень продуцируемых воспалительных цитокинов.

[00409] Фактические уровни дозировок активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению можно варьировать для того, чтобы получить количество активного ингредиента, которое является эффективным для достижения требуемого терапевтического ответа у конкретного пациента, эффективного в плане композиции и способа введения, не будучи токсичным для пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от ряда фармакокинетических факторов, в том числе активности конкретных используемых композиций по настоящему изобретению, пути введения, времени введения, скорости выведения конкретного используемого соединения, длительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, применяемых в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраста, пола, веса тела, состояния, общего состояния здоровья и предшествующего анамнеза пациента,

подлежащего лечению, и аналогичных факторов, известных в области техники медицины.

[00410] Композиции, содержащие антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или конъюгат антитела и лекарственного средства, раскрытые в данном документе, могут вводиться с помощью непрерывной инфузии или с помощью доз с интервалами, составляющими, например, один день, одну неделю, или вводиться 1-7 раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели, раз в четыре недели, раз в пять недель, раз в шесть недель, раз в семь недель или раз в восемь недель. Дозы могут вводиться внутривенно, подкожно или внутрикостно. Специфический протокол введения доз является таким, который предусматривает максимальную дозу или частоту введения доз, которые позволяют избежать значительных нежелательных побочных эффектов.

[00411] Для антител, фрагментов антител (например, антигенсвязывающих фрагментов) или конъюгатов антитела и лекарственного средства, описанных в данном документе, дозировка, вводимая пациенту, может составлять от 0,0001 мг/кг до 100 мг/кг веса тела пациента. Дозировка может составлять от 0,001 мг/кг до 50 мг/кг, от 0,005 мг/кг до 20 мг/кг, от 0,01 мг/кг до 20 мг/кг, от 0,02 мг/кг до 10 мг/кг, от 0,05 до 5 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 8 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 5 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 2 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 1 мг/кг веса тела пациента. Дозировка антител, фрагментов антител (например, антигенсвязывающих фрагментов) или конъюгатов антитела и лекарственного средства может быть рассчитана с применением значения веса тела пациента в килограммах (кг), умноженного на величину подлежащей введению дозы в мг/кг.

[00412] Дозы антител, фрагментов антител (например, антигенсвязывающих фрагментов) или конъюгатов антитела и лекарственного средства по настоящему изобретению могут быть повторными, а введения могут быть разделены менее чем 1 днем, по меньшей мере 1 днем, 2 днями, 3 днями, 5 днями, 10 днями, 15 днями, 30 днями, 45 днями, 2 месяцами, 75 днями, 3 месяцами, 4 месяцами, 5 месяцами или по меньшей мере 6 месяцами. В некоторых вариантах осуществления антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или конъюгаты антитела и лекарственного средства по настоящему изобретению вводят два раза в неделю, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в четыре недели или менее часто.

[00413] Эффективное количество для конкретного пациента может варьироваться в зависимости от таких факторов, как подлежащее лечению состояние, общее состояние здоровья пациента, способ, путь и доза введения и тяжесть побочных эффектов (см., например, Maynard *et al.*, A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla., 1996; Dent, Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., London, UK, 2001).

[00414] Путем введение может быть, например, местное нанесение или нанесение на кожу, инъекция или инфузия посредством подкожного, внутривенного, внутрибрюшинного, внутримозгового, внутримышечного, внутриглазного, внутриартериального, внутриспинномозгового, внутриочагового введения, или системы замедленного высвобождения или имплантат (см., например, Sidman *et al.*, Biopolymers

22:547-556, 1983; Langer *et al.*, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277, 1981; Langer, Chem. Tech. 12:98-105, 1982; Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692, 1985; Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034, 1980; патенты США №№ 6350466 и 6316024). При необходимости композиция может также содержать солюбилизирующее средство и местный анестетик, такой как лидокаин, для облегчения боли в месте инъекции, или их оба. Кроме того, также можно использовать ингаляционное введение, например, за счет применения ингалятора или распылителя и состава со средством в виде аэрозоля. См., например, патенты США №№ 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 и 4880078; и публикации согласно РСТ №№ WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 и WO 99/66903, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00415] Способы совместного введения или лечения с применением второго терапевтического средства, например, цитокина, стероида, химиотерапевтического средства, антибиотика, или облучения (такого как тотальное облучение тела (TBI)), известны из уровня техники (см., например, Hardman *et al.*, (eds.) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10.sup.th ed., McGraw-Hill, New York, N.Y.; Poole and Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.; Chabner and Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.). Эффективное количество терапевтического средства может снижать симптомы на по меньшей мере 10%; по меньшей мере 20%; по меньшей мере приблизительно 30%; по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50%.

[00416] Дополнительные средства терапии, которые можно вводить в комбинации с антителами, фрагментами антител (например, антигенсвязывающими фрагментами) или конъюгатами антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению можно вводить с интервалом менее 5 минут, с интервалом менее 30 минут, с интервалом 1 час, с интервалом приблизительно 1 час, с интервалом от приблизительно 1 до приблизительно 2 часов, с интервалом от приблизительно 2 часов до приблизительно 3 часов, с интервалом от приблизительно 3 часов до приблизительно 4 часов, с интервалом от приблизительно 4 часов до приблизительно 5 часов, с интервалом от приблизительно 5 часов до приблизительно 6 часов, с интервалом от приблизительно 6 часов до приблизительно 7 часов, с интервалом от приблизительно 7 часов до приблизительно 8 часов, с интервалом от приблизительно 8 часов до приблизительно 9 часов, с интервалом от приблизительно 9 часов до приблизительно 10 часов, с интервалом от приблизительно 10 часов до приблизительно 11 часов, с интервалом от приблизительно 11 часов до приблизительно 12 часов, с интервалом от приблизительно 12 часов до 18 часов, с интервалом от 18 часов до 24 часов, с интервалом от 24 часов до 36 часов, с интервалом от 36 часов до 48 часов, с интервалом от 48 часов до 52 часов, с интервалом от 52 часов до 60 часов, с интервалом от 60 часов до 72 часов, с интервалом от 72 часов до 84 часов, с интервалом от 84 часов до 96 часов или с интервалом от 96 часов до 120 часов от введения антител, фрагментов антител

(например, антигенсвязывающих фрагментов) или конъюгатов антитела и лекарственного средства по настоящему изобретению. Два или более средства терапии можно вводить во время одного и того же визита пациента.

[00417] В настоящем изобретении предусмотрены протоколы введения фармацевтической композиции, содержащей антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) или конъюгаты антитела и лекарственного средства отдельно или в комбинации с другими средствами терапии субъекту, нуждающемуся в этом. Средства комбинированной терапии, раскрытые в данном документе, можно вводить субъекту одновременно или последовательно. Средства комбинированной терапии по настоящему изобретению также можно вводить циклически. Циклическая терапия предусматривает введение первого средства терапии в течение некоторого периода времени, а затем введения второго средства терапии в течение некоторого периода времени и повторения такого последовательного введения, т. е. цикла, с целью снижения развития устойчивости к одному из видов терапии (например, средствам), для недопущения или снижения побочных эффектов одного из видов терапии (например, средств) и/или для улучшения эффективности видов терапии.

[00418] Средства терапии из средств комбинированной терапии, раскрытых в данном документе, можно вводить субъекту одновременно.

[00419] Термин "одновременно" не ограничивается введением средств терапии в одно и то же время, а скорее означает, что фармацевтическая композиция, содержащая антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты), и конъюгаты антитела и лекарственного средства, раскрытые в данном документе, вводятся субъекту в такой последовательности и в течение временного интервала таким образом, что антитела, фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) и конъюгаты антитела и лекарственного средства могут действовать вместе с другими средствами терапии для обеспечения большей пользы, чем если бы их вводили иным образом. Например, каждое средство терапии можно вводить субъекту в одно и то же время или последовательно в любом порядке в различные моменты времени; однако, если их не вводят в одно и то же время, их следует вводить достаточно близко по времени, чтобы обеспечить требуемый терапевтический эффект. Каждое средство терапии можно вводить субъекту отдельно в любой подходящей форме и с помощью любого подходящего пути. В различных вариантах осуществления средства терапии вводят субъекту с интервалом менее 5 минут, с интервалом менее 15 минут, с интервалом менее 30 минут, с интервалом менее 1 часа, с интервалом приблизительно 1 час, с интервалом от приблизительно 1 часа до приблизительно 2 часов, с интервалом от приблизительно 2 часов до приблизительно 3 часов, с интервалом от приблизительно 3 часов до приблизительно 4 часов, с интервалом от приблизительно 4 часов до приблизительно 5 часов, с интервалом от приблизительно 5 часов до приблизительно 6 часов, с интервалом от приблизительно 6 часов до приблизительно 7 часов, с интервалом от приблизительно 7 часов до приблизительно 8 часов, с интервалом от приблизительно 8 часов до приблизительно 9 часов, с интервалом

от приблизительно 9 часов до приблизительно 10 часов, с интервалом от приблизительно 10 часов до приблизительно 11 часов, с интервалом от приблизительно 11 часов до приблизительно 12 часов, с интервалом 24 часа, с интервалом 48 часов, с интервалом 72 часа или с интервалом 1 неделя. В других вариантах осуществления два или более средства терапии применяют во время одного и того же визита пациента.

[00420] Средства комбинированной терапии можно вводить субъекту в одной фармацевтической композиции. В качестве альтернативы терапевтические средства из средств комбинированной терапии можно вводить субъекту одновременно в отдельных фармацевтических композициях. Терапевтические средства можно вводить субъекту с помощью одного и того же или различных путей введения.

[00421] Следует понимать, что примеры и варианты осуществления, описанные в данном документе, предназначены только для иллюстративных целей, и что различные модификации или изменения в их свете будут предложены специалистам в данной области техники и должны быть включены в сущность и область действия настоящей заявки и объем прилагаемой формулы изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение антител к CD48

Получение конструкций экспрессии для слитого белка CD48 человека-IgG1 мыши в качестве иммуногена

[00422] CD48 человека амплифицировали из коммерческого вектора "Trueclone, CD48 (немеченый)-молекула CD48 человека" (Origene, NM_001778.2). Амплифицированный фрагмент ДНК клонировали в соответствующие векторы экспрессии.

[00423] Клетки НЕК293Т высевали по 1 x 10⁶ клеток/лунка в 6-луночный планшет для клеточных культур в предварительно нагретую DMEM (Gibco, 32430-027) и 10% FBS (Gibco, 10082-137). На следующий день для каждой лунки отдельно разбавляли 3 мкг ДНК-конструкции в 150 мкл Opti-MEM (Gibco, 31985070) и 12 мкл Lipofectamine™ 2000 (ThermoFischer Scientific, 1051561) в 150 мкл Opti-MEM. Разбавленную ДНК добавляли в каждую соответствующую пробирку с разбавленным реагентом для трансфекции Lipofectamine™ 2000 и инкубировали в течение 5 мин при к. т. По 250 мкл комплексов ДНК/реагент Lipofectamine™ 2000 добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 6 часов в среде для культивирования при 37°C, 5% CO₂. Через 6 часов среду для культивирования заменяли на предварительно нагретую DMEM+10% FBS и клетки инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение дополнительных 72 часов.

[00424] Рекомбинантный белок CD48 человека-IgG мыши очищали с применением набора "Набор для очистки антител сыворотки крови - Белок G" (Abcam № ab128751). В соответствии с рекомендациями поставщика кондиционированные среды смешивали с буфером для связывания и инкубировали в течение 2 часов при к. т. на смоле с белком G перед упаковкой колонок. Колонки промывали для удаления несвязанных белков, а белок CD48 человека-IgG мыши элюировали при низком pH и немедленно нейтрализовали. Присутствие белка в элюирующих фракциях подтверждали определением OD A280.

Элюирующие фракции объединяли в пул, обессоливали и концентрировали с применением устройства Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter (30K). Количественное определение очищенного белка осуществляли посредством ELISA антитела к мышиному IgG.

Экспрессия рекомбинантных белков CD48 человека и яванского макака

[00425] Белки человека и яванского макака получали посредством генного синтеза (GeneArt, Швейцария) на основе аминокислотных последовательностей (см. таблицу 5). Все синтезированные фрагменты ДНК клонировали в соответствующие векторы экспрессии с отличающимися С-концевыми метками (hFc1P, APP6-Avi, His), чтобы обеспечить возможность очистки и мечения.

Таблица 5. Белковые последовательности CD48

Название	Описание	Последовательность	SEQ ID NO
CD48 человека	CD48 человека	MCSRGWDSCLALELLLLPLSLLVTS IQGHLVHMTVVSGSNVTNLNISESLP ENYKQLTWFYTFDQKIVEWDSRKS KYFESKFKGRVRLDPQSGALYISKV QKEDNSTYIMRVLKKTGNEQEWKI KLQVLDPVPKPVIEKIEDMDDNC YLKLSCVIPGESVNYTWYGDKRPF KELQNSVLETTLMPHNYSRCYTCQ VNSVSSKNGTVCLSPCTLARSFG VEWIASWL VVTVP TILGLLLT	53
CD48 человека	Met-CD48 человека (aa29-130)-APP6-Avi- His для Fab-комплекса кристаллизация	MHLVHMTVVSGSNVTNLNISESLPEN KQLTWFYTFDQKIVEWDSRKS KYFESKFKGRVRLDPQSGALYISKV QKEDNSTYIMRVLKKTGNEQEWKI KLQVLDPVPKPVIEKIEDMDDNC YLKLSCVIPGESVNYTWYGDKRPF KELQNSVLETTLMPHNYSRCYTCQ VNSVSSKNGTVCLSPCTLARSFG VEWIASWL VVTVP TILGLLLT	68
CD48 обезьяны, представляющей собой яванского макака	CynoCD48(aa29-217)	MGSRGWNRCLELLLLLSLLAIS QGRVHMTVVSGSNVTNLNISESLPE NYKQLTWFYTFDQKIVEWDSGKSK YFESKFKGRVRLDPQSGALYISKV QKEDNSTYVMRVLKDGYEQEWKI KLQVLDPVPKPVIEKEDVDDNCYLKL SCVIPGESVNYTWYGELPKYQNSV LETTLPKPHKHSRCYTCQVSVSSKNG	69

		TFCFSPPCTAARSFGVIEWIASWLVV TVPIILGLLLI	
--	--	---	--

[00426] Клетки HEK293T высевали по 1×10^6 клеток/лунка в 6-луночный планшет для клеточных культур в предварительно нагретую DMEM (Gibco, 32430-027) и 10% FBS (Gibco, 10082-137). На следующий день для каждой лунки отдельно разбавляли 2 мкг ДНК-конструкции в 100 мкл Opti-MEM (Gibco, 31985070) и добавляли 7 мкл FuGENE HD (Promega, 104810). Смесь инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре и добавляли в клетки. Планшеты инкубировали в течение 72 часов в среде для культивирования при 37°C, 5% CO₂.

[00427] Рекомбинантные белки CD48-huIgG-Fc человека и яванского макака и меченого APP очищали с помощью колонок с анти-APP или белком-A. Колонки промывали и уравнивали с удалением несвязанных белков с помощью PBS, pH 7,4. Связанный белок элюировали 0,1 М глицином, pH 2,7 и немедленно нейтрализовали. Концентрацию белка определяли путем измерения OD A280.

Линии клеток, сверхэкспрессирующие белок CD48 человека и яванского макака

[00428] Клетки CHO и 300.19 конструировали для экспрессии CD48 человека в комбинации с маркером GFP. Клетки HKB11 трансфицировали вектором, экспрессирующим либо CD48 человека, либо яванского макака. Для линий клеток CHO и 300.19 кодирующую экспрессию CD48-EGFP плазмиду получали с помощью Amaxa 4D Nucleofection. Для каждого образца $2,5 \times 10^5$ клеток суспендировали в 20 мкл раствора 4DNucleofector™ Solution (Lonza, V4XC-9064), добавляли ДНК и помещали в кювету. После электропорации кюветы инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре. Клетки суспендировали в предварительно нагретой среде для культивирования (RPMI 1640, (Gibco, 72400-021), 10% FBS (Gibco, 16000044), пенициллин-стрептомицин (Gibco, 15140122) и 2-меркаптоэтанол (Gibco, 31350010)) и инкубировали в увлажненном инкубаторе при 37°C/5% CO₂. Для отбора добавляли G418 (Gibco, 10131-027) в конечной концентрации, составляющей 1 мг/мл. Пулы клеток анализировали посредством проточной цитометрии после окрашивания клеток флуоресцентно меченым антителом к CD48 человека, клон CD48A-PE (PE-меченное антитело от Molecular Probes, A15768), применяя нетрансфицированные клетки 300.19 или клетки CHO в качестве CD48-отрицательных контрольных клеток. Для обеих линий клеток идентифицировали один пул, который демонстрировал высокую и однородную экспрессию соответствующего целевого белка. Флаконы с этим пулом замораживали; стабильность сверхэкспрессии рекомбинантного CD48 подтверждали после продолжения культивирования клеток в G418-содержащей среде для культивирования клеток на протяжении двух недель.

[00429] Для сверхэкспрессирующих НКВ11 линий клеток синтезировали полноразмерный ген CD48 человека на основе аминокислотных последовательностей из базы данных Uniprot. Последовательность, кодирующая полноразмерный CD48 яванского макака, была синтезирована на основе информации об аминокислотной последовательности, полученной с применением мРНК, выделенной из различных тканей яванского макака. Все последовательности синтезированы компанией GenArt (Швейцария). Для конструирования линий клеток НКВ11 синтезированные фрагменты ДНК клонировали в транспозонные векторы pD2529-CMVα Leap-In (Atum, Ньюарк/Калифорния, США). Клетки НКВ11 (ATCC, CRL-12568) трансфицировали в трех повторностях с применением реактива для трансфекции JetMessenger (Polyplus, 150-07). Транспозонные векторы совместно трансфицировали в клетки вместе с мРНК, кодирующей фермент транспозазы Leap-In (Atum, Ньюарк/Калифорния, США). Трансфицированные клетки культивировали в присутствии антибиотика пурамицина в среде для культивирования в течение 4 недель для отбора стабильно трансфицированных клеток. Пулы клеток анализировали посредством проточной цитометрии после окрашивания клеток первичным антителом к CD48 (CD48A) и флуоресцентно меченным вторичным антителом, при этом нетрансфицированные клетки НКВ11 выступали в качестве CD48-отрицательных контрольных клеток. Для каждого из CD48 человека и яванского макака идентифицировали один пул, который проявлял высокую и однородную экспрессию соответствующего целевого белка. Флаконы с этим пулом замораживали; стабильность сверхэкспрессии рекомбинантного CD48 подтверждали после продолжения культивирования клеток в пурамицин-содержащей среде для культивирования клеток на протяжении двух недель.

[00430] Все синтезированные фрагменты ДНК клонировали в транспозонные векторы pD2529-CMVα Leap-In (Atum, Ньюарк/Калифорния, США). Клетки НКВ11 (ATCC, CRL-12568) трансфицировали в трех повторностях с применением реагента для трансфекции JetMessenger. Транспозонные векторы совместно трансфицировали в клетки вместе с мРНК, кодирующей фермент транспозазы Leap-In (Atum, Ньюарк/Калифорния, США). Трансфицированные клетки культивировали в присутствии антибиотика пурамицина в среде для культивирования в течение 4 недель для отбора стабильно трансфицированных клеток. Пулы клеток анализировали посредством проточной цитометрии после окрашивания клеток первичным антителом к CD48 (MEM-102, PE-меченный, Molecular Probes, A15768) и флуоресцентно меченным вторичным антителом, при этом нетрансфицированные клетки НКВ11 выступали в качестве CD48-отрицательных контрольных клеток. Для каждого из CD48 человека и яванского макака идентифицировали один пул, который проявлял высокую и однородную экспрессию соответствующего целевого белка. Флаконы с этим пулом замораживали; стабильность сверхэкспрессии рекомбинантного CD48 подтверждали после продолжения культивирования клеток в пурамицин-содержащей среде для культивирования клеток на протяжении двух недель.

Таблица 6. Конструкции, применяемые для создания сверхэкспрессирующей линии клеток

Название (Идентификатор Uniprot)	Последовательность
CD48 человека- <i>IRES</i> _EGFP (P09326- не применимо)	MCSRGWDSCLALELLLLPLSLLVTSIQGHLVHMTVVSGSNVTLNI SESLPENYKQLTWFYTFDQKIVEWDSRKSKYFESKFGRVRLDP QSGALYISKVQKEDNSTYIMRVLKKTGNEQEWKIKLQVLDPVPK PVIKIEKIEDMDDNCYLKLSCVIPGESVNYTWYGDKRPFPELQN SVLETTLMPHNYSRCYTCQVSNSVSSKNGTVCLSPCTLARSFGV EWIASWLVVTVPTILGLLLT (SEQ ID NO: 53) - <i>IRES</i> - MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFFKSA MPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKE DGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSV QLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHML LEFVTAAGITLGMDELYKSGSDYKDDDDKSGSDYKDDDDKSG (SEQ ID NO:72)
CD48 человека (P09326)	MCSRGWDSCLALELLLLPLSLLVTSIQGHLVHMTVVSGSNVTLNI SESLPENYKQLTWFYTFDQKIVEWDSRKSKYFESKFGRVRLDP QSGALYISKVQKEDNSTYIMRVLKKTGNEQEWKIKLQVLDPVPK PVIKIEKIEDMDDNCYLKLSCVIPGESVNYTWYGDKRPFPELQN SVLETTLMPHNYSRCYTCQVSNSVSSKNGTVCLSPCTLARSFGV EWIASWLVVTVPTILGLLLT (SEQ ID NO:53)

Культура CD48-экспрессирующих линий клеток Raji и U266

[00431] Raji, ATCC® CCL-86™ и U266 ATCC® TIB-196™ с высоким уровнем экспрессии CD48 выращивали в RPMI с Glutamax (Gibco, 11835-063), дополненной 10% FCS (Gibco, 16000-044), 10 mM HEPES (Gibco, 15630080) и с пенициллином/стрептомицином (Gibco, 15140-122) при 37°C с 5% CO₂ и достаточной влажностью. Экспрессия CD48 на клетках Raji была очень вариабельной. Клетки окрашивали с помощью α-CD48-PE (Invitrogen A-15768) и α-CD45-APC (BD Pharmingen, 555485). Клетки с высоким уровнем экспрессии CD48 сортировали на FACS ARIA и впоследствии культивировали как Raji-CD48high при различных концентрациях посева, низкой и высокой, в вышеупомянутой среде с добавлением ZellShield, Minerva Biolabs 13-0150, при 37°C с 5% CO₂ и достаточной влажностью. После размножения как низко-, так и высокоплотные посевы клеток Raji CD48high+ показали одинаково высокую экспрессию CD48.

Иммунизация мышей и получение гибридом

[00432] Растворы антигена готовили в PBS. Для рекомбинантного человеческого CD48 (R&D, 3644-CD-050) при 125 мкг/мл и линий клеток при 200 x 10⁶ клеток/мл. Мыши

BALB/c и Biozzi ABH/RjHSD, по три самца и три самки, получали примиряющую и бустерную инъекцию антигена два раза с применением либо рекомбинантного человеческого CD48 (R&D, 3644-CD-050), либо клеток Raji или U266. Для слияния отбирали четырех мышей. Селезенки, не примененные для слияния, замораживали в виде суспензии отдельных клеток.

Определение антител в сыворотке крови и скрининг гибридом посредством ELISA

[00433] Для определения титра планшеты F96 cent Maxisorp Nunc Immuno (Thermo Scientific, 439454) покрывали рекомбинантным человеческим CD48 при концентрации, составляющей 1 мкг/мл, 100 мкл/лунку в буфере для покрытия (Biolegend, 421701) и инкубировали при 4°C в течение ночи. Мышиное антитело к α -CD48 человека, клон MEM-102 (Invitrogen, MA-19119S) (также описано в данном документе как "CD48A") и мышиное антитело к α -CD48 человека, клон 156-4H9 (eBioscience, 16-0489-85) применяли в качестве калибратора и разбавляли в растворителе для анализа (PBS с 2% FCS и 0,05% Tween 20) до 1000 нг/мл. Серийные разведения 1:3 проводили до 1,37 нг/мл. В качестве фона на покрытых лунках не применяли антитела. В целях исключения неспецифических эффектов отрицательным контролем служили лунки с разведением антител, не покрытые белком. Для скрининга гибридом образцы надосадочной жидкости разбавляли 1:10. По 100 мкл/лунка наносили в двух повторностях для каждой концентрации калибратора и разбавления надосадочной жидкости сыворотки крови мыши или гибридомы. Планшеты инкубировали в течение 1 часа при 37°C при 300 х об/мин на орбитальном шейкере.

[00434] После инкубации планшеты встряхивали для удаления образцов надосадочной жидкости и каждую лунку промывали пять раз с помощью 300 мкл промывочного буфера. Вторичное антитело козы к α -IgG мыши (H+L) HRP (Invitrogen, 31430) разбавляли 1:10000 в разбавителе для анализа и наносили по 100 мкл на каждую лунку. Планшеты инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре при 300 х об/мин на орбитальном шейкере. Планшеты снова встряхивали для удаления надосадочной жидкости и каждую лунку промывали семь раз с помощью 300 мкл промывочного буфера. Реакцию обнаружения начинали с добавления 100 мкл раствора субстрата (Life Technology, 002023) на лунку. Планшеты инкубировали в темноте при к. т. без перемешивания в течение 15-30 мин. В зависимости от кинетики развития цвета анализ останавливали добавлением 100 мкл/лунка стоп-раствора (Life Technology, SS04). Показатели поглощения считывали при 450 нм и 570 нм в течение 30 мин после остановки реакции с помощью прибора SpectraMax.

Определение антител в сыворотке крови и скрининг гибридом посредством FACS

[00435] Все образцы сывороток крови анализировали на специфичность к нативному белку CD48 посредством инкубации и анализа FACS с использованием клеточных линий, примененных для иммунизации, RajiCD48high+ и U266. CD48-отрицательная линия Т-клеток СЕМ (ATCC, CCL-119™) служила контролем. По 1 мкл неразбавленного, разбавленного 1:10 и 1:100 образца сыворотки крови от каждой мыши инкубировали с $0,5 \times 10^6$ клеток/лунка соответствующих линий клеток в буфере FACS (промывочный буфер

AutoMACS, Milteny; 130-091-222 и разбавленный 1:20 исходный раствор BSA; Milteny; 130-091-376) в течение 30 мин на льду. После инкубации образцы дважды промывали буфером FACS, окрашивали вторичным антителом α -IgG мыши-FITC; BD Pharmingen, 554001 (разбавление 1:50 в буфере FACS) и инкубировали в течение 30 мин на льду в темноте. После инкубации клетки дважды промывали буфером FACS, клеточные осадки суспендировали в буфере FACS и измеряли на приборе FACS CANTO II.

[00436] Для скрининга гибридом применяли $1,5 \times 10^5$ 300-19 WT и $0,5 \times 10^5$ трансфектантов huCD48 GFP. Клетки суспендировали в 100 мкл надосадочной жидкости гибридомы (чистой или разбавленной 1:10). В качестве контроля наносили 0,2 мкл/лунка немеченого CD48A (MEM-102, Invitrogen, A-15768) и осуществляли обнаружение с помощью 0,1 мкл/лунка антитела к мышиному IgG APC (BD Bioscience, 550826).

Получение гибридом

[00437] Получали растворы отдельных клеток из селезенки иммунизированных CD48 мышей. Слияние проводили с помощью раствора PEG Hybrimax (Sigma, P7181) и клетки высевали на 96-луночные планшеты, (100 мл/лунку) в среду HAT (RPMI 1640 с Glutamax и 25 мМ HEPES, 50 мкМ β -меркаптоэтанола, 100 мкМ гипоксантина, 400 нМ аминоптерина, 16 мкМ тимидина, 10% FCS со сверхнизким содержанием IgG и 100 мкг/мл нормоцина), содержащей слой питающих клеток из 50 мкл перитонеальных клеток мыши (BALB/c, запрос ID107701). Слитые клетки высевали при трех отличающихся концентрациях: 10×10^4 , 3×10^4 и 5×10^3 клеток/лунка.

[00438] Скрининг начинали на 13-й день после слияния с применением ELISA и FACS. На 15-й день среду HAT заменяли на среду HT без аминоптерина.

[00439] Положительные по результатам ELISA и FACS клоны субклонировали в свободной от питающих клеток среде для клонирования и размножения (RPMI 1640 с Glutamax и 25 мМ HEPES, 10% FCS с ультра низким содержанием IgG, 50 мкМ β -меркаптоэтанол, 100 мкг/мл нормоцин, добавка HT (Gibco, 41056-012) и кондиционированная добавка для клонирования гибридомы H1; Roche Diagnostics 11088947001) до концентрации клеток 2,5 клеток/мл в двух 96-луночных планшетах для каждой гибридомы.

Клонирование отобранных клонов гибридомы

[00440] Выделение РНК из осажденных клеток гибридомы проводили с помощью набора RNeasy Mini Kit в соответствии с протоколом производителя (Qiagen, 74104). Выход РНК определяли с помощью NanoDrop (Thermo Fischer).

[00441] РНК преобразовывали в кДНК с применением системы Superscript III First-Strand Synthesis для RT PCR от LifeTechnologies (180880-051) в соответствии с инструкциями производителя. Амплификацию синтезированной кДНК проводили с применением набора мышиных Ig-праймеров от Novagen (69831-3) и Taq-полимеразы от Fermentas (K0171) в соответствии с инструкциями производителя. По 25 мкл образцов ПЦР-реакции анализировали на 1,2% агарозном геле и окрашивали этидием бромидом. Полосы вырезали с применением скальпеля и осуществляли гель-экстракцию ДНК с помощью

набора QIAquick Gel Extraction от Qiagen (28704) в соответствии с протоколом производителя. Экстрагированную ДНК применяли для ПЦР-клонирования с применением набора для ПЦР-клонирования от Qiagen (231122) в соответствии с инструкциями производителя, а конечные плазмидные продукты применяли для трансформации химически компетентных клеток TOP10 (Invitrogen, C-404010). Трансформированные клетки высевали на планшеты с LB-канамицином, обработанные с помощью X-gal (Invitrogen, R-0402). Клетки, трансформированные клонирующими векторами pDrive, которые не содержат продукта ПЦР, будут экспрессировать α -пептид LacZ и будут образовывать синие колонии при выращивании в присутствии X-gal. Поэтому отбирали только белые колонии и культивировали для получения плазмид с применением набора QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen 27106) в соответствии с протоколом производителя.

[00442] Трансфекцию клеток НЕК для экспрессии антител, а также очистку проводили, как описано для получения иммуногена CD48.

Получение гуманизированных последовательностей

[00443] Последовательности ДНК, кодирующие гуманизированные домены VL и VH, были заказаны в компании GeneArt (Life Technologies Inc. Цуг, Швейцария), в том числе с оптимизацией кодонов для *Homo sapiens*. Последовательности, кодирующие домены VL и VH, субклонировали посредством вырезания из векторов, полученных в GeneArt, и вставки в векторы экспрессии, подходящие для секреции в клетках млекопитающих. Тяжелые и легкие цепи клонировали в отдельные векторы экспрессии для обеспечения возможности котрансфекции. Элементы вектора экспрессии включают промотор (тандем энхансер-промотор цитомегаловируса (CMV)), сигнальную последовательность для облегчения секреции, сигнал полиаденилирования и терминатор транскрипции (ген гормона роста крупного рогатого скота (BGH)), элемент, обеспечивающий возможность эписомальной репликации и репликации у прокариот (например, точку начала репликации SV40 и ColE1 или другие, известные из уровня техники), и элементы для обеспечения возможности отбора (ген устойчивости к ампициллину).

Экспрессия и очищение антител

[00444] Клетки CAP-T® (амниоциты человека; CEVEC Pharmaceuticals GmbH, Кельн, Германия) подвергали транзитной трансфекции соответствующей плазмидой для экспрессии тяжелой и легкой цепи в среде для экспрессии FreeStyle293™ (Invitrogen, 12338) с применением 40 кДа линейного PEI (PEI Max, Polysciences, VWR, POLS24765-2) в качестве средства доставки генов.

[00445] Вкратце, 30 мкг легкой и тяжелой цепей плазмидной ДНК в 1 мл среды OptiMEM (Invitrogen, 51985) добавляли по каплям в колбу объемом 250 мл, содержащую 1×10^8 клеток в 18 мл среды FreeStyle, затем 1 мл раствора PEI Max при встряхивании. После этого колбу инкубировали в течение 4 часов при 37°C, 6% CO₂, 85% влажности при 100 об./мин. Впоследствии в культуру добавляли 20 мл предварительно нагретой среды для экспрессии белка (PEM, Invitrogen, 12661), содержащей 4 mM L-глутамина и 5 мкг/мл

бластицидина (Invitrogen R21001), а также вальпроевую кислоту (Sigma-Aldrich, P4543) до конечной концентрации, составляющей 4 мМ. Культуру клеток продолжали выращивать при 37°C, 6% CO₂, 85% влажности, 115 об./мин в течение 7 дней.

[00446] Образцы надосадочной жидкости фильтровали с помощью Steri-Flip и очищали антитела с помощью робота Tecan MabSelect Sure на 200 мкл смолы. Вкратце, колонку промывали с помощью 10 объемов воды и PBS (Novartis). Образцы загружали и снова промывали с помощью 10 объемов воды. Элюирование антител осуществляли с помощью трех объемов 50 мМ цитрата, 70 мМ NaCl, pH 3,2 с последующей нейтрализацией с помощью 140 мкл 1 М Tris, pH 9,0 и фильтрацией через мембрану 0,22 мкм (Millipore Steriflip).

[00447] Для концентрации определение антител измеряли при 280 нм на спектрофотометре ND-1000 (NanoDrop), а концентрацию белка рассчитывали на основании данных о последовательности. Элюат исследовали на наличие агрегации (SEC-MALS).

Антитела, подвергнутые пэннингу, из фаговой библиотеки Novartis Pallas

[00448] Для отбора фагового дисплея применяли библиотеку синтетических человеческих Fab-фагемид (Институтом биомедицинских исследований Novartis). Фрагмент гена, кодирующий зародышевые каркасные комбинацииIGHV3-23 и IGKV1-39, IGHV3-23 и IGLV3-9, IGHV1-46 и IGKV1-39, IGHV3-15 и IGLV1-47, синтезировали компанией GeneArt (Life Technologies Inc. Цуг, Швейцария) в формате Fab и клонирован в фагемидный вектор, служивший основной матрицей. Эти зародышевые линии человека применяли в качестве благоприятных для отображения каркасных комбинаций для библиотеки фагового дисплея. Фагемидный вектор состоит из устойчивости к ампициллину, точки начала репликации Cile1, точки начала репликации M13 и бицистронной кассеты экспрессии под промотором lac с OmpA - легкая цепь, затем phoA-тяжелая цепь -Flag -6xHis (SEQ ID NO: 84) - Amber stop - усеченный рIII (аминокислоты 231-406).

[00449] Только HCDR3 был диверсифицирован, и праймер был разработан для включения до 11 аминокислот в определенных соотношениях, имитирующих их естественное присутствие: аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аргинин, гистидин, серин, глицин, аланин, пролин, валин, тирозин и триптофан. Лейцин и фенилаланин также обеспечивали в определенном положении HCDR3. Определенные остатки намеренно были пропущены, чтобы удалить потенциальные сайты посттрансляционной модификации. Рандомизированный синтез праймеров осуществляли с применением технологии Trinucleotide (ELLA Biotech), чтобы исключить стоп-кодона, метионин, цистеин и аспарагин.

[00450] Допускалась длина в пределах 8, 10, 12, 14, 16 и 20 аминокислот, при этом последние две аминокислоты оставались постоянными с последовательностью Asp-Туг для длины 8-16 и Asp-Val для длины 20. Дизайн последних двух аминокислот HCDR3 отражает рекомбинацию VDJ человека. Короткие HCDR3 чаще применяют J-фрагментIGHJ4 с "DY" в конце HCDR3, а более длинные HCDR3 (здесь 20 aa) чаще применяют IGHJ6 с "DV" в

конце HCDR3. Вставки библиотеки получали с помощью ПЦР с применением ДНК-полимеразы Phusion High-Fidelity (NEB Biolabs). Полученные вставки библиотеки HCDR3 лигировали в основные матрицы, трансформировали в *E. coli* TG1F+ DUO (Lucigen) с минимальным размером библиотеки 3×10^8 трансформантов на длину HCDR3, а фаги получали с помощью хелперного фага VCSM13 (Agilent Technologies) с применением стандартных протоколов.

[00451] Для выделения антител, распознающих CD48 человека, использовали пэннинг цельных клеток. Фаговые библиотеки блокировали в 1 мл PBS/ 5%FBS (Gibco, 16000044) в течение 2 часов при комнатной температуре с последующим добавлением 1×10^7 клеток CHO дикого типа. Смесь инкубировали на протяжении ночи при 4°C, 30 об./мин с последующим центрифугированием в течение 5 мин при 300 g, 4°C. Образец надосадочной жидкости предварительно адсорбированного фага добавляли к клеткам-мишеням.

[00452] Клетки CHO дикого типа и сверхэкспрессирующие CD48 человека метили отличающимися флуорохромами (Vibrant Cell-Labelling Solutions, Invitrogen, № V22885, № V22886, № V22887) и смешивали в разных соотношениях. Пэннинг продолжали на ротаторе при 4°C в течение 4 часов. Клетки трижды промывали в 5 мл 5% FBS/PBS и центрифугировали при 300 g, 4°C. Клетки суспендировали в буфере FACS (PBS, 0,5% FBS) и фильтровали в пробирки FACS. Клетки сортировали с помощью FACS на BD Aria II в соответствии с цветом в две пробирки, клетки CHO WT и CHO CD48⁺.

[00453] Для элюирования связанных фагов клеточные осадки суспендировали в 1 мл 100 mM глицина-HCl, 500 mM NaCl, pH 2,2 (GE Healthcare, BR-1003-55). Инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, центрифугировали при 300 об./мин в течение 2 мин и элюированные фаги (надосадочную жидкость) переносили в новую пробирку, содержащую 110 мкл 1 M Tris, pH 8 (Fluka, 93350) для нейтрализации.

[00454] Элюированные фаги применяли для инфицирования экспоненциально растущих клеток Amber suppressor TG1F+ (Lubio Science). Инфицированные бактерии культивировали в среде 2YT (16 г/л бактотриптона; Becton-Dickinson 211699, 10 г/л экстракта bacto yeast; Becton-Dickinson 212720), 5 г/л NaCl; Merck 6404), 100 мкг/мл ампициллина (Sigma, A0166) и 1% глюкозы (Sigma, G8270) в течение ночи при 37°C, 200 об./мин и суперинфицировали хелперными фагами VCSM13.

[00455] Продуцирование фаговых частиц затем индуцировали путем культивирования суперинфицированных бактерий в среде 2YT/ампициллин/канамицин (Calbiochem, 420411), содержащей 0,25 mM изопропил b-D-1-тиогалактопиранозид (IPTG, Roche, 11 411 446 001)), в течение ночи при 22°C, 180 об./мин. Образец надосадочной жидкости, содержащий фаги из ночной культуры, очищали осаждением PEG/NaCl, титровали и отбирали в следующем раунде.

Извлечение обогащенных последовательностей антител с посредством скрининга NGS

[00456] После каждого раунда фагового отбора получали поликлональную

плазмидную ДНК из извлеченных связывающих клеток дикого типа и CD48 экспрессирующих клеток CHO с помощью набора QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). В первом ПЦР-анализе CDR-H3 амплифицировали в течение 9 циклов с праймерами с липкими концами, обеспечивающими отжиг стандартных праймеров TruSeq на последовательной стадии. Во втором ПЦР-анализе праймеры с универсальным прямым адаптером TruSeq и одним из 24 обратных праймеров индекса TrueSeq применяли на протяжении 12 циклов. Полученные фрагменты очищали с помощью 1,5% агарозного геля и системы очистки геля и ПЦР Wizard SV Gel (Promega, A9282). Концентрацию ДНК измеряли с применением набора Qubit DNA High sensitivity (Invitrogen, Q32B54). Образцы анализировали на MiSeq с применением набора MiSeq Reagent 5 v3 (Illumina) при 150 прямых циклах.

[00457] Анализ данных выходных файлов NGS FastQ осуществляли, как описано (Liu *et al*, 2019, BMC Bioinformatics, 20, 401.). Для каждого результата пэннинга было проанализировано 100000 последовательностей с применением фиксированных фланкирующих последовательностей на границе варибельной области в качестве шаблона для поиска и сегментации последовательности HCDR3. Было идентифицировано ~ от 40000 до 70000 последовательностей HCDR3 в зависимости от пулов результатов пэннинга, которые были включены в отчеты о частоте в формате CSV. Для экспрессии антител отбирали клоны с частотой встречаемости более 2%.

Созревание аффинности фаговых и полученных из гибридомы/гуманизированных антител

[00458] Отобранные посредством Pallas антитела NOV3731 дополнительно конструировали в формате Fab для улучшения аффинности с применением библиотек кассет созревания аффинности с диверсификацией в HCDR1, HCDR2 и CDR всех легких цепей. CDR диверсифицировали в соответствии с естественно встречающимся репертуаром реаранжированных последовательностей CDR человека. Праймеры конструировали для включения соответствующих аминокислот CDR тяжелой и легкой цепи в определенных соотношениях, имитирующих их природные показатели встречаемости: аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, аргинин, гистидин, треонин, серин, глицин, аланин, лейцин, валин и тирозин. Глутамин, пролин и триптофан также обеспечивали в определенных положениях LCDR3.

[00459] Для кассет созревания CDR синтез рандомизированного праймера осуществляли с применением технологии Trinucleotide (ELLA Biotech), чтобы исключить стоп-кодоны, метионин, цистеин и аспарагин. Рандомизацию CDR осуществляли с помощью двух стадий ПЦР с применением ДНК-полимеразы Phusion High-Fidelity (NEB Biolabs). Сначала проводили рандомизационную ПЦР с последующим амплифицированием рандомизированных фрагментов с применением праймеров, вносящих сайты рестрикции на обоих концах. Затем эти полученные амплификационные продукты ПЦР лигировали в основные матрицы фагемидных векторов с применением соответствующих сайтов рестрикции, трансформировали в *E. coli* TG1F+DUO (Lucigen) с минимальным размером

библиотеки трансформантов $1E+08$.

[00460] Библиотеки CDR тяжелой и легкой цепи, специфичные для созревания аффинности, подвергали рестрикции с помощью релевантных ферментов и клонировали по отдельности в исходное антитело, заменяя исходные CDR рандомизированными кассетами с диверсифицированными последовательностями. Библиотеки трансформировали в TG1F+ компетентные клетки (Invitrogen). Фаговые частицы получали путем суперинфекции хелперным фагом VCSM13 и затем осаждали с помощью PEG/NaCl.

[00461] Полученное из гибридомы и гуманизированное антитело NY258 было далее конструировали в формате Fab путем создания библиотек NNK для LCDR1 и LCDR3, а также HCDR1, HCDR2 и HCDR3. Амплифицированные библиотеки клонировали посредством соответствующих сайтов рестрикции в фагемидный вектор, трансформировали в *E. coli* TG1F+DUO (Lucigen) с минимальным размером библиотеки трансформантов $1E+08$. Фаговые частицы получали путем суперинфекции хелперным фагом VCSM13 и затем осаждали с помощью PEG/NaCl.

[00462] Эти пять библиотек созревания аффинности для каждого кандидата, NOV3731 и NY258, подвергали двум раундам твердофазного пэннинга на рекомбинантном CD48-huIgG-FC человека (Acrobiosystems, BC1-H5255) и яванского макака (получен в лаборатории iProt 112617). По 5×10^9 фагов на библиотеку блокировали в объеме, составляющем 500 мкл, 2,5% молочного порошка в PBS (PanReas AppliChem, A0830), 0,05% Tween (Sigma, P9416) в течение ночи. 96-луночные планшеты maxisorb (Nunc, 442404) покрывали 300 мкл нерелевантного FC-белка в концентрации, составляющей 5 мкг/мл в PBS. Планшеты промывали 3 раза с помощью 300 мкл PBS и блокированные фаговые библиотеки инкубировали для предварительной адсорбции потенциальных фагов, связывающих IgG-FC человека, в количестве 250 мкл/лунка при комнатной температуре в течение 30 минут при покачивании.

[00463] После этого предварительно адсорбированные фаги переносили в планшеты, покрытые CD48 человека или яванского макака, и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре при покачивании. Планшеты покрывали с помощью 300 мкл белка CD48-IgGFc в концентрации, составляющей 5 мкл/мл, и промывали 3 раза с помощью PBS. Кроме того, фаговые библиотеки инкубировали с нерелевантным белком и BSA. Фаги также переносили только из раунда в раунд, имитируя пэннинг.

[00464] Режим промывки усиливали во время раундов отбора с 2 циклами (3 раза быстро и 2 раза по 5 минут) с применением PBS с 0,05% Tween20 для быстрой промывки и PBS для промывки продолжительностью 5 минут, затем 2 цикла (5 раз быстро и 4 раза по 5 минут) во втором раунде. Фаги элюировали с помощью 10 mM глицина/HCl, pH 2,0. TG1F+ *E.coli* инфицировали элюированными фагами, которые предварительно нейтрализовали с помощью 1 M Tris/HCl, pH 8,0. Обеспечивали размножение фагов между раундами с применением хелперного фага VCSM13 (Agilent). После второго раунда пэннинга минипрепараты ДНК применяли для скрининга NGS. Отобранные последовательности клонировали упорядоченно в отдельные векторы экспрессии тяжелых и легких цепей в

GenArt. Экспрессию IgG осуществляли в клетках HEK293, а антитела очищали с помощью робота Tecan MabSelect Sure на 200 мкл смолы.

Анализ антител, прошедших скрининг NGS, перекрестное связывание с CD48 человека и яванского макака

[00465] Очищенные антитела, исследованные с помощью ELISA на связывание с рекомбинантным CD48 человека и яванского макака. Покрывали 384-луночные планшеты Black Maxisorp™ (Nunc) (ThermoFischer, 460518) с помощью 20 мкл huCD48-huFc, cyCD48-huFc, huCD48-bio или BSA в качестве контроля (Sigma, A7906), разбавленными в PBS в концентрации, составляющей 5 мкг/мл, в течение ночи при 4°C. На следующий день планшеты промывали три раза по 120 мкл/лунка с помощью TBST (TBS-0,05% Tween20). Планшеты блокировали с помощью 120 мкл/лунка смеси 5% молочного порошка/PBS в течение 3 ч при комнатной температуре и трижды промывали 120 мкл/лунка с помощью TBST. Антитела разбавляли 1:3 от 100 нМ до 45 пМ и добавляли по 20 мкл/лунка. После 1 часа инкубации при комнатной температуре планшеты промывали 3 раза по 120 мкл/лунка с помощью TBST. Для обнаружения в каждую лунку добавляли по 20 мкл AP-конъюгированного антитела к huIgG, специфического Fab-фрагмента (Jackson, 109-055-097) в смеси 0,25% молочного порошка/PBS+0,05% Tween20 при разбавлении 1:5000. После 1 часа инкубации при комнатной температуре планшеты промывали 3 раза по 120 мкл/лунка с помощью TBST. Флуоресцентный субстрат Attophos (Roche, 11681982001) разбавляли 1:5 в воде и добавляли по 20 мкл/лунка, инкубировали в течение 10 мин и измеряли поглощение при 405 нм. Используя методику ELISA, было обнаружено специфическое связывание антител-кандидатов NY920 и NY938 к CD48 человека и яванского макака.

[00466] Очищенные антитела исследовали на предмет связывания с экспрессированным на клетках CD48 человека и яванского макака. По 5×10^5 клеток НКВ11, сверхэкспрессирующих CD48 человека или яванского макака, а также клеток дикого типа наносили для окрашивания в одну лунку 96-луночного планшета (Thermo Fischer, Nunclon Delta Surface 163320). Антитела применяли в 3 концентрациях: 100, 10 и 1 мкг/мл. Антитела разбавляли в 50 мкл смеси PBS/1% FCS (буфер FACS) на лунку и инкубировали в течение 30 минут на льду. Лунки промывали 2 раза с помощью 250 мкл буфера FACS путем центрифугирования при 300 g в течение 2 минут и удаления надосадочной жидкости путем переворачивания планшета и похлопывания на бумаге. Для обнаружения в каждую лунку добавляли 50 мкл 1:2000 в буфере FACS разбавленного мышинового антитела к Fab человека, конъюгированного с PE (Jackson-109-116-097) и инкубировали в течение 30 минут на льду в темноте. Клетки промывали 2 раза с помощью 250 мкл буфера FACS и суспендировали в 200 мкл буфера FACS на лунку для анализа FACS. Клетки анализировали на BD Calibur. Использование анализа связывания клеток и FACS выявило специфическое связывание антител-кандидатов NY920 и NY938 к CD48 человека и яванского макака.

Пример 2. Значение аффинности антител к CD48 в отношении белка CD48 человека и яванского макака

[00467] Аффинность различных антител к CD48 человека и его ортологу *Macaca fascicularis* определяли с применением технологии SPR на приборе Biacore T200 (Cytiva), оснащенном сенсорным чипом с белком А (Cytiva, заказ № 29-1275-56). HBS-EP+, pH 7,4, содержащий 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0,05% (об./об.) поверхностно-активного вещества P20 (Текнова, заказ № H8022), применяли в качестве подвижного буфера, а также для разбавления образцов.

[00468] Антитела к CD48 разбавляли в концентрации, составляющей 5 мкг/мл, и вводили в проточные кюветы 2 и 4 в течение 20 сек со скоростью, составляющей 10 мкл/мин. Уровень захвата для всех антител составлял 370-440 RU. Проточные кюветы 1 и 3 оставляли пустыми (антитела не захватывались) и применяли в качестве эталонной поверхности. В качестве аналитов в растворе служили CD48 человека и яванского макака. Кинетические данные получали путем последующих инъекций серий разведений аналита 1:2 (CD48 человека: 100-0,8 нМ, CD48 яванского макака: 500-3,9 нМ) во всех проточных кюветах в течение 180 с при скорости потока, составляющей 50 мкл/мин, с последующим временем диссоциации, составляющим 360 с. После каждого цикла захвата антител и инъекции аналита поверхность чипа регенерировали с помощью 10 mM глицина-HCl, pH 1,5 (Cytiva, заказ № BR100354) в течение 2×30 с при скорости потока, составляющей 50 мкл/мин. Было выполнено три прогона с дублирующими измерениями и холостыми инъекциями буфера. Измерения проводили при 25°C, и данные собирали при частоте, составляющей 10 Гц.

[00469] Данные оценивали с применением оценочного программного обеспечения Biacore 8K. Из необработанных данных вычитали две эталонные величины, т. е. ответ в измерительных проточных кюветах корректировали с учетом ответа в эталонных проточных кюветах (без захваченного антитела), и на второй стадии вычитали ответ введенной холостой пробы (буфер). Наконец, сенсограммы аппроксимировали с помощью модели взаимодействия 1:1 с постоянной аппроксимации RI (0) и глобальной аппроксимацией R_{max} . Рассчитывали кинетические константы скорости (k_a , k_d) и равновесные константы диссоциации (K_D). Данные обрабатывали отдельно для каждого прогона. Полученные значения применяли для расчета средних значений и стандартных отклонений соответствующих равновесных констант диссоциации и кинетических констант скорости.

Таблица 7. Оценки аффинности антител к CD48, полученных против CD48 человека и яванского макака

Конструкция к CD48	Анализируемое соединение	k_a [1/Мс]	k_d [1/с]	K_D [М]
NY920	CD48 яванского макака	1,7E ⁴	1,6E ⁻³	9,4E ⁻⁸
	CD48 человека	7,2E ⁴	7,4E ⁻⁴	1,0E ⁻⁸

NY938	CD48 яванского макака	2,5E ⁵	3,7E ⁻⁴	1,5E ⁻⁹
	CD48 человека	2,5E ⁵	1,3E ⁻⁴	5,0E ⁻¹⁰

Пример 3. Эпитоп-специфическая сортировка с применением мутированных белковых конструкций на основе CD48 человека

[00470] Применяя модели 3D-структуры белка CD48, отобрали три открытые петли белка и изменяли их с помощью сайт-направленного мутагенеза с использованием ПЦР. Эпитопы, связывающие антитела, определяли посредством ELISA. Обозначенные сайты представляли собой остатки 50-55; ENYKQ (SEQ ID NO: 78), модифицированная в GSSKQ (SEQ ID NO: 79), остатки 70-74; DSRK (SEQ ID NO: 80), модифицированные в AAGK (SEQ ID NO: 81) и остатки 103-108; KKTGNE (SEQ ID NO: 82), модифицированная в KKDASG (SEQ ID NO: 83). Матричная конструкция, hCD48EC:мышиный-Ig, происходит от экспрессионной плазмиды, созданной для экспрессии слитого белка CD48 человека-мышиный IgG1 для иммунизации, амплифицированного из коммерческого вектора "Trueclone, молекула CD48 (немеченый)-CD48 человека" (Origene, NM_001778.2). Праймеры для сайт-направленного мутагенеза были синтезированы компанией Microsynth (Швейцария).

[00471] Анализ ELISA для эпитоп-специфической сортировки осуществляли с использованием разведений 1:10 образцов надосадочной жидкости культуры НЕКТ293 и антител к CD48 NY938, NY920 и гуманизированного CD48А (также известного как гуманизированное антитело MEM102: последовательность тяжелой цепи QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTDFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTFTGE PSYGNVFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARRHGNGNVFDSWGQGTLV TVSSATKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:73); последовательность легкой цепи EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSNHWYQQKPDQSPKLLIKYTSESISGVPSRF SGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQSNSWPLTFGGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:74)) при 500, 250 и 25 нг/мл. Нетрансфицированная конструкция со слиянием CD48 с IgG мыши служила в качестве положительного контроля, а надосадочная жидкость нетрансфицированных клеток служила в качестве отрицательного контроля. Обнаружение проводили с помощью антитела козы к α-IgG мыши (H+L) HRP (Invitrogen, 31430).

[00472] Конструкция № 2248 несет мутированные остатки в аминокислоте 50-55, №

2249 несет мутированные остатки в аминокислотах 70-74 и № 2250 несет мутированные остатки в аминокислотах 103-105. Антитела-кандидаты NOV3731 (фигура 1A) и NY258 (фигура 1B) утратили связывание с конструкцией № 2250 и продемонстрировали пониженное связывание с конструкцией № 2248, при этом на NY258 в большей степени повлияла мутация аминокислот 50-55. Контрольное гуманизированное антитело CD48A (фигура 1C) продемонстрировало связывание с конструкцией № 2250 в том же диапазоне, что и с не мутированным белком CD48, и не связывалось с конструкцией № 2248. Эти анализы показывают, что антитела NOV3731 и NY258 связываются с отличным от CD48A эпитопом.

Пример 4. Определение структуры ЕС-домена CD48 человека в комплексе с IgG NY938 посредством рентгеноструктурного анализа

[00473] Трехмерная структура CD48 человека до сих пор была неизвестна. Определена кристаллическая структура фрагмента внеклеточного домена CD48 человека в комплексе с антителом к CD48 NY938-hIgG1_каппа (a-fuc). Как подробно описано ниже, CD48 человека, аминокислоты 29-130, экспрессировали, очищали и смешали с антителом к CD48-NY938-hIgG1_каппа (a-fuc) с образованием комплекса, который впоследствии кристаллизировали. Затем с помощью белковой кристаллографии получали данные с атомным разрешением для CD48 человека, связанного с NY938, чтобы определить эпитоп.

Таблица 8. Аминокислотные последовательности CD48 ECD человека и антитела к CD48-NY938-hIgG1_каппа (a-fuc), полученные для кристаллографии

Met-CD48 человека (aa29-130)- APP6-Avi-His для NY938, образование комплексов и кристаллизация	MHLVHMTVVSGSNVTLNISESLPENKQLTWFYTFDQKIVE WDSRKSKYFESKFKGRVRLDPQSGALYISKVQKEDNSTYI MRVLKKTGNEQEWKIKLQVLDPGLNDIFEAQKIEWHEHH HHHH (SEQ ID NO:68)
Тяжелая цепь Антитело к CD48-NY938- hIgG1_каппа (a-fuc)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTMHWVR QAPGQGLEWMGGINPDTGDTSYNQKFTGRATLTVDKSTS TAYMELSSLRSEDТАVYYCARAQFWTTPRFAYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:65)
Легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGTAVAWYQQK

Антитело к CD48-NY938-hIgG1_kappa (a-fuc)	PGKVPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDVATYYCQQYSTYPITFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:51)
---	---

Получение белка внеклеточного домена CD48 человека и антитела к CD48-NY938-hIgG1 kappa (a-fuc) для кристаллографии

Получение NY938-hIgG1 kappa (a-fuc)

[00474] Для получения NY938-hIgG1 клетки HEK293T подвергали транзитной трансфекции конструкциями экспрессии с помощью PeiMAX (Polyscience, 24765). Вкратце, клетки культивировали в бессывороточной среде M11V3 (Biosconcept, CH, кат.: V3K) и регулировали до $2,8 \times 10^6$ клеток/мл в 36% от конечного объема. Раствор ДНК (раствор 1) получали посредством разбавления 0,8 мг/л конечного объема ДНК в 7% конечного объема M11V3 и осторожного перемешивания. Для предотвращения загрязнения культур данный раствор можно отфильтровать с применением фильтра на 0,22 мкм (например, Millipore Stericup). Затем конечный объем, составляющий 2,4 мг/л, раствора PEI разбавляли в 7% конечного объема M11V3 и осторожно перемешивали (раствор 2). Оба раствора инкубировали в течение 5-10 мин при комнатной температуре. Затем раствор 2 добавляли в раствор 1 при осторожном перемешивании и инкубировали в течение еще 5-15 минут при к. т. После инкубации смесь для трансфекции добавляли к клеткам, и культуру культивировали в течение периода времени, составляющего 4-6 часов. В конечном итоге, для регулирования оставшегося 50% объема культуры добавляли среду ExCell VPRO (SigmaAldrich, кат.: 14561C). Культуру клеток поддерживали в течение 7 дней. Образец надосадочной жидкости центрифугировали при 4500 об./мин, 20 мин, 4°C (Heraeus, Multifuge 3 SR) и очищали с помощью стерильного фильтра, 0,22 мкм (фильтр Stericup). По 950 мл надосадочной жидкости клеточной культуры (2,6 мг/мл) загружали на колонку Mab Select SuRe объемом 25 мл (очищенную 2 CV 0,1 M NaOH; уравновешенную PBS, pH 7,4) со скоростью 1 мл/мин в течение ночи. После основной промывки PBS, pH 7,4, связанный материал элюировали с помощью смеси 50 mM цитрата/140 mM NaCl, pH 2,7, pH регулировали до 7,2 с помощью 5 M NaOH и фильтровали в стерильных условиях. Теоретическое значение pI: 9,2, выход: 130,0 мг при 2,6 мг/мл. Анализ показал 14,3% агрегации белка. Элюат Mab Select SuRe концентрировали до 10 мл с помощью перемешивающей кюветы Amicon, MWCO 30 кДа (Millipore; № PLTK04310) и концентрированный материал вводили в колонку HiLoad XK26/600 Superdex 200 PrepGrade через петлю для образца объемом 10 мл. Подвижный буфер: PBS, pH 7,4; скорость потока: 1,0 мл/мин.; собирали фракции по 5 мл. Фракции, содержащие белок, объединяли, выявляя 34 мл при концентрации 2,48 мг/мл.

Получение белка Met-CD48 человека (aa29-130)-APP6-Avi-His

[00475] Met-CD48 человека (aa29-130)-APP6-Avi-His экспрессировали в масштабе 1

л в *E. coli*. Сначала плазмиду, кодирующую фрагмент белка, трансформировали в химически компетентные клетки TG1F⁻ *E.coli*. После роста бактерий в течение ночи на планшете со смесью LB/агар/1% глюкозы/25 мкг/мл канамицина при 37°C одну колонию применяли для инокуляции предварительной культуры объемом 3 мл (2хYT/1,0% глюкозы/34 мкг/мл канамицина). Культуру инкубировали при 37°C, встряхивании при 220 об./мин до достижения OD_{600 нм}=2. Затем предварительную культуру переносили в 100 мл предварительной культуры (2 х YT/1,0% глюкозы/25 мкг/мл канамицина). Эту культуру инкубировали при 37°C, встряхивании при 220 об./мин до достижения OD_{600 нм}=2. На следующий день 10 мл предварительной культуры переносили в 1000 мл культуры для экспрессии (2 х YT/0,1% глюкозы/25 мкг/мл канамицина). Культуру для экспрессии инкубировали при 37°C, встряхивании при 200 об./мин до достижения величины OD_{600 нм}, составляющей 1,0-1,2. Экспрессию индуцировали добавлением IPTG до конечной концентрации, составляющей 1 mM. Экспрессию проводили в течение ночи при 20°C и 200 об./мин. На следующий день клетки осаждали и замораживали при -80°C.

[00476] Осажденные бактерии суспендировали в 10 мл буфера для лизиса (0,1 M Tris/HCl, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 3 mM метионин, 0,1% лизоцим) на 1 грамм осадка и инкубировали при осторожном перемешивании при 4°C в течение 30 минут. Добавляли 10 mM MgCl₂ и 10 ед./мл бензоназы и клетки снова осторожно перемешивали при 4°C в течение 30 минут. Лизированные клетки дважды пропускали через пресс Френча при давлении 800 бар. Добавляли 0,5 объема 60 mM EDTA, 1,5 M NaCl, 5% (об./об.) раствора Triton X-100 с последующим инкубированием при 4°C в течение 60 минут при перемешивании.

[00477] Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 10000 g в течение 30 мин. Осадок промывали дважды одним объемом 50 mM Tris/HCl, 0,8 M NaCl, 30 mM EDTA, 3 mM метионина и 3 раза 50 mM Tris/HCl, 0,3 M NaCl, 10 mM EDTA, 3 mM метионина.

[00478] Тельца включения (IB) солюбилизировали в 10 мл 6 M гуанидина, pH 8,5, 20 mM Tris, 1 mM EDTA и 5 mM DTT на каждый грамм при комнатной температуре в течение ночи. К солюбилизированным IB добавляли 20 mM DTT и применяли для рефолдинга. Рефолдинг осуществляли в 50 mM Tris, pH 8,5, 0,5 M Arg, 5 mM EDTA, 4 mM GSH, 1,5 mM GSSG при 4°C и продукт рефолдинга концентрировали на устройстве TFF (отсечение 5 кДА). Концентрированный продукт рефолдинга загружали на колонку HisTrap Excel объемом 5 мл, предварительно уравновешенную с помощью 10 mM Hepes, 100 mM NaCl, pH 7. Колонку промывали до исходного уровня тем же буфером и элюирование осуществляли с помощью линейного градиента от 0 до 100% 500 mM имидазола в 20 мл буфера. Фракции, содержащие белок, объединяли и подвергали диализу против 10 mM Hepes, 100 mM NaCl, pH 7 для удаления имидазола. Белок замораживали при -80°C.

[00479] Комплекс CD48 человека с NY938-IgG получали путем смешивания белков в молярном соотношении 1,5:1,0 в 25 mM Hepes, pH 7, 150 mM NaCl с общей концентрацией, составляющей 1,4 мг/мл. Кристаллы выращивали в 96-луночном кристаллизационном планшете Swissci 2-Drop MRC посредством метода диффузии паров в сидячей капле. Более

подробно, 0,2 мкл белка смешивали с 0,2 мкл резервуарного раствора, и каплю уравнивали против 80 мкл того же резервуарного раствора при 20°C. Кристаллы, пригодные для рентгенодифракционного анализа, получали в за 10 дней с применением резервуарного раствора, состоящего из 0,1 М тригидрата ацетата натрия, 40% вес/об. PEG200.

[00480] Для сбора данных один кристалл антитела к CD48 (29-130)-Avi-His // антитела к CD48 (NY938)-hIgG1_каппа устанавливали в криопетлю и непосредственно мгновенно охлаждали в жидком азоте. Данные по дифракции собирали в канале синхротронного излучения X10SA (PX-II) Swiss Light Source (Paul Scherrer Institute, Швейцария), с пиксельным детектором Pilatus и рентгеновским излучением с длиной волны, составляющей 0,99984 Å. Всего было зарегистрировано 720 изображений с колебаниями по 0,25 градуса каждое при расстоянии от кристалла до детектора, составляющем 430 мм. Данные обрабатывали и масштабировали с разрешением 2,38 Å с применением инструментария autoPROC (Vonrhein, C., Flensburg, C., Keller, P., Sharff, A., Smart, O., Paciorek, W., Womack, T. & Bricogne, G. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2011 Apr;67(Pt 4):293-302). Кристалл находился в пространственной группе $P2_12_12_1$ с размерами ячейки $a=60,58$ Å, $b=85,25$ Å, $c=246,62$ Å, $\alpha=90^\circ$, $\beta=90,0^\circ$, $\gamma=90^\circ$. Структура комплекса остатка CD48 29-130/NY938 Fab была раскрыта с помощью молекулярной замены с применением Phaser (McCoy *et al.*, (2007) *J. Appl. Cryst.* 40:658-674). Итоговая модель была построена в программе COOT (Emsley *et al.*, (2010) *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* 66:486-501) и уточнена с помощью Buster (Global Phasing, LTD) до значений R_{work} и R_{free} 20,1% и 24,8% соответственно со значением $rmsd$, составляющим 0,007 Å и $1,11^\circ$, для длин связей и углов связей соответственно. Остатки из остатков 29-130 CD48 человека, которые содержат атомы в пределах 4,0 Å от любого атома в Fab NY938, были идентифицированы с помощью программы Ncont из программного пакета CCP4 (Collaborative Computing Project, Number 4 (1994) *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* 50:760-763) и перечислены в таблице 9 и таблице 10.

Эпитоп CD48 для NY938

[00481] Кристаллическую структуру комплекса CD48-NY938 IgG применяли для идентификации эпитопа CD48 для NY938 IgG. Поверхность взаимодействия IgG NY938 на CD48 человека образована двумя прерывистыми (т. е. несмежными) последовательностями, охватывающими аминокислотные остатки с 54 по 64 и с 105 по 121. Среди них остатки 54, 58, 60, 61, 62, 64, 105, 107, 119, 111, 114, 115, 117, 119 и 121 могут быть отображены в виде прямых межмолекулярных контактов короче 4,0 Å (между атомами, отличными от водорода), как подробно описано в таблице 9 и таблице 10. Эти остатки образуют трехмерную поверхность на CD48 человека, которая распознается NY938.

Таблица 9. Взаимодействия между CD48 человека и тяжелой цепью NY938-IgG (H). Нумерация остатков CD48 основана на последовательности CD48 человека (SEQ ID NO:53). Остатки тяжелой цепи NY938-IgG пронумерованы на основании их линейной аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:65. Показанные остатки CD48 имеют

по меньшей мере один атом в пределах 4,0 Å от атома в IgG NY938.

CD48 человека		Тяжелая цепь NY938		
Аминокислота	Номер	Аминокислота	Номер	Цепь
Phe	58	Thr	103	H
Thr	60	Asp	57	H
Phe	61	Thr	33	H
		Gly	50	H
		Asn	52	H
		Asp	57	H
		Thr	103	H
Asp	62	Ser	59	H
Thr	105	Trp	102	H
Ile	107	Trp	102	H
		Thr	103	H
Arg	109	Thr	103	H
		Thr	104	H
Glu	117	Gln	100	H
		Phe	101	H
		Thr	104	H
		Arg	106	H
Glu	119	Phe	101	H
		Trp	102	H
		Thr	103	H
Lys	121	Trp	102	H

Таблица 10. Взаимодействия между CD48 человека и легкой цепью NY938-IgG (L). Нумерация остатков CD48 основана на CD48 человека (SEQ ID NO:53). Нумерация остатков легкой цепи NY938-IgG основана на аминокислотной последовательности под SEQ ID NO:51. Показанные остатки CD48 имеют по меньшей мере один атом в пределах 4,0 Å от атома в IgG NY938.

CD48 человека		Легкая цепь NY938		
Остаток	Номер	Остаток	Номер	Цепь
Gln	54	Thr	31	L
		Trp	50	L
Phe	61	Tyr	94	L

Asp	62	Tyr	94	L
Lys	64	Ser	92	L
Arg	109	Trp	50	L
Leu	111	Trp	50	L
Thr	114	Thr	53	L
Gly	115	Tyr	49	L
		Trp	50	L
		Thr	53	L
Glu	117	Trp	50	L

[00482] NY938 характеризовалось созреванием аффинности на основе исходного антитела NY258. Эпитоп-специфическая сортировка с мутировавшими белковыми конструкциями CD48 человека (стр. 23) показала, что основной контакт NY258 с CD48 находится в области аминокислот 50-55 и 105-108 белка CD48. Этот результат согласуется с результатами кристаллизации и определения структуры комплекса NY938 IgG-CD48.

Пример 5. Конъюгация антитела к CD48 Синтез CD48A-ValCit-MMAE

[00483] Векторы экспрессии, кодирующие тяжелую и легкую цепи антитела CD48A-CysMab (последовательность тяжелой цепи: QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTDFGMNWVRQAPGQGLEWMGWINTFTGE PSYGNVFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARRHGNGNVFDSWGQGTLV TVSSATKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:70); Последовательность легкой цепи: EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSNHWHYQQKPDQSPKLLIKYTSEISGVPSRF SGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQNSWPLTFGGGKTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:74)) трансфицировали в клетки HEK293 в суспензии с применением полиэтиленimina и культивировали в течение 5 дней. Образец надосадочной жидкости культуры собирали центрифугированием, фильтровали и антитела очищали с помощью аффинной хроматографии с белком А. При необходимости агрегаты удаляли посредством эксклюзионной хроматографии. Чистота антител после аффинной хроматографии определялась посредством аналитической эксклюзионной хроматографии с исключением по размеру и составляла >98% мономера. Антитела были забуференными в фосфатном забуференном солевом растворе, pH 7,2. По 10 мг антитела CD48A (0,068 мкмоль, 1,0 эквив.) инкубировали с 1 мл отстоявшейся смолы

RMP с белком А (GE Lifesciences, 17513803) и перемешивали в течение 15 минут. Моногидрат цистеина-HCl добавляли до конечной концентрации, составляющей 20 мМ, и инкубировали при перемешивании в течение 30 мин при комнатной температуре для обеспечения деблокировки реакционноспособных цистеинов. Смолу быстро промывали 50 объемами колонки PBS на вакуумном коллекторе. Затем смолу ресуспендировали в равном объеме PBS, содержащем 250 нМ CuCl_2 . Преобразование межцепочечных дисульфидов антител контролировали по временным точкам. В каждой временной точке извлекали 25 мкл суспензии смолы, добавляли 1 мкл 20 мМ MC-ValCit-PAB-MMAE (Levena Biopharm; SET0201) и пробиркой осторожно постукивали несколько раз. Смолу центрифугировали, надосадочную жидкость удаляли, а затем элюировали с использованием 50 мкл элюирующего буфера для антител (Thermo Scientific, 21004). Смолу осаждали и надосадочную жидкость анализировали посредством обращенно-фазовой хроматографии с применением колонки Agilent PLRP-S 4000A, 5 мкм, 4,6×50 мм (буфер А представляет собой воду, 0,1% TFA, буфер В представляет собой ацетонитрил, 0,1% TFA, колонку выдерживают при 80°C, скорость потока 1,5 мл/мин.; градиент 0 минут - 30% В, 5 минут - 45% В, 6,5 минут - 100% В, 8 минут - 100% В, 10 минут - 30%). Через 60 минут после добавления CuCl_2 удаляли путем промывки 50 объемами колонки PBS на вакуумном коллекторе, затем добавляли 2 мл PBS для ресуспендирования. К этой суспензии смолы и антитела добавляли MC-ValCit-MMAE (27,5 мкл 20 мМ раствора в DMSO, 0,544 мкмоль, 8 эквив.). Полученную смесь затем инкубировали при температуре окружающей среды в течение 3 часов. Затем смолу промывали 50 объемами колонки PBS. ADC элюировали из смолы с помощью буфера для элюирования антител (Thermo Scientific, 21004). Затем ADC заменяли буфером в 1 X PBS (20 X PBS, Teknova P0191) путем диализа. Затем материал концентрировали с применением центрифужного концентратора с применением Amicon Ultra-15, 50 кДа, регенерированной целлюлозы (Millipore, UFC0905024) до 1 мг/мл, фильтровали в стерильных условиях с помощью 0,22 мкм стерильного PVDF фильтра, 25 мм (Millipore, SLGV013SL) и хранили при 4°C. Конечный выход составил 1,7 мг (0,011 мкмоль). Были проведены следующие анализы: аналитическая эксклюзионная хроматография (SEC) для определения процента мономера, масс-спектрометрия (MS) для определения DAR, тест LAL для определения эндотоксиновой нагрузки и определение концентрации белка с помощью A280 с применением коэффициента экстинкции и молекулярной массы антитела. Данные HRMS (белковый способ) показали, что доминирующая масса тяжелой цепи составляла 53042 Да, что дало значение, составляющее DAR 3,9, рассчитанный путем сравнения интенсивностей MS пиков для разновидностей DAR1 DAR2 и DAR3. SEC указывает на агрегацию < 1,3%, как определено посредством сравнения площади пика поглощения высокомолекулярного соединения при 210 и 280 нм с площадью пика поглощения для мономерного ADC.

[00484] **Общая методика (1)**. Соотношение лекарственное средство-антитело (DAR) в иллюстративных ADC определяли посредством жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (LC/MS) согласно следующему способу. Для всех способов LC

подвижная фаза А представляла собой очищенную воду класса MS (Honeywell, LC015-1), подвижная фаза В представляла собой смесь 80% изопропанол класса MS (Honeywell LC323-1): 20% ацетонитрил (Honeywell, LC015-1), LC323-1), дополненного 1% муравьиной кислоты (FA) (Thermo Scientific, 85178). Температура колонки была установлена на 80°C. Общий способ MS был оптимизирован для всех синтезированных ADC. Для анализа применяли колонку Agilent PLRP-S 4000 A; 2,1×150 мм, 8 мкм (Agilent, PL1912-3803). Применяемая скорость потока составляла 0,3 мл/мин. Применяемый градиент представлял собой 0-0,75 минуты 95% А, 0,76-1,9 минуты 75% А, 1,91-11,0 минуты 50% А, 11,01-11,50 10% А, 11,51-13,50 минуты 95% А, 13,51-18 минут 95% А на an Acquity Bio H-Class Quaternary UPLC (Waters). MS система представляла собой масс-спектрометр Xevo G2-XS QToF ESI (Waters), данные получали в течение 1,5-11 минут, а массы анализировали в диапазоне 15000-80000 дальтон. DAR определяли из подвергнутых деконволюции спектров или УФ-хроматограмм путем суммирования интегрированных площадей MS (общий ионный ток) или УФ (280 нм) пиков неконъюгированного и конъюгированного заданной разновидности (mAb или связанный фрагмент), взвешенных путем умножения каждой площади на число присоединенного лекарственного средства. Суммированные, взвешенные площади делили на сумму общей площади, и в результате получали окончательное среднее значение DAR для всего ADC.

[00485] Для определения качества ADC и процента агрегации (%) после очистки проводили **эксклюзионную хроматографию (SEC) (1)**. Анализ проводили на аналитической колонке Superdex 200 Increase 5/150 GL (GE Healthcare, 28990945) в изократических условиях, 100% PBS, pH 7,2 (Hyclone SH30028.03), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, поток 0,45 мл/мин в течение 8 минут. Количественное определение % фракции агрегатов в образце ADC проводили на основе площади пика поглощения при 280 нм. Расчет производили на основе соотношения между высокомолекулярным элюентом при 280 нм, деленного на сумму площадей пиков поглощения при той же длине волны высокомолекулярного и мономерного элюентов, умноженную на 100%. Данные получали на HPLC Agilent Bio-Inert 1260, оснащенном детекторами светорассеяния Wyatt miniDAWN и показателя преломления Treos (Wyatt Technologies, Санта-Барбара, Калифорния).

Синтез NY920-ValCit-MMAE

[00486] Антитело NY920 синтезировали и подвергали экспрессии, как описано выше. По 20 мг антитела CysMab NY920 (0,136 мкмоль, 1,0 эквив.) инкубировали с 2 мл отстоявшейся смолы RMP с белком А (GE Lifesciences, 17513803) и перемешивали в течение 15 минут. Моногидрат цистеина-HCl добавляют до конечной концентрации, составляющей 20 mM, и инкубируют при перемешивании в течение 30 мин при комнатной температуре для обеспечения деблокировки реакционноспособных цистеинов. Смолу быстро промывают 50 объемами колонки PBS на вакуумном коллекторе. Затем смолу ресуспендируют в равном объеме PBS, содержащем 250 нМ CuCl₂. Преобразование межцепочечных дисульфидов антител контролируют по временным точкам. В каждой временной точке извлекали 25 мкл суспензии смолы, добавляли 1 мкл 20 mM MC-ValCit-

РАВ-ММАЕ и пробиркой осторожно постукивали несколько раз. Смолу центрифугируют, надосадочную жидкость удаляют, а затем элюируют с использованием 50 мкл элюирующего буфера для антител (Thermo Scientific, 21004). Смолу осаждают и надосадочную жидкость анализируют посредством обращенно-фазовой хроматографии с применением колонки Agilent PLRP-S 4000A, 5 мкм, 4,6×50 мм (буфер А представляет собой воду, 0,1% TFA, буфер В представляет собой ацетонитрил, 0,1% TFA, колонку выдерживают при 80°C, скорость потока 1,5 мл/мин.; градиент 0 минут - 30% В, 5 минут - 45% В, 6,5 минут - 100% В, 8 минут - 100% В, 10 минут - 30%). Через 60 минут после добавления CuCl_2 CuCl_2 удаляют путем промывки 50 объемами колонки PBS на вакуумном коллекторе, затем добавляют 2 мл PBS для ресуспендирования. К этой суспензии смолы и антитела добавляют MC-ValCit-MMAE (55 мкл 20 mM раствора в DMSO, 1,088 мкмоль, 8 эквив.). Полученную смесь затем инкубируют при температуре окружающей среды в течение 3 часов. Затем смолу промывают 50 объемами колонки PBS. ADC элюируют из смолы с помощью буфера для элюирования антител (Thermo Scientific, 21004). Затем ADC заменяют буфером в 1 X PBS (20 X PBS, TeknovaP0191) путем диализа и осуществляют препаративную эксклюзионную хроматографию, элюируя в PBS Дульбекко, pH 7,2 (HyClone SH30028.03) для удаления агрегатов с помощью HiLoad 16/600 Superdex, 200 μm (GE Healthcare, 28989335). Затем материал концентрируют на центрифужном концентраторе с применением Amicon Ultra-15, 50 кДа, регенерированной целлюлозы (Millipore, UFC0905024) до 4,5 мг/мл, фильтруют в стерильных условиях с помощью 0,22 мкм стерильного PVDF фильтра, 25 мм (Millipore, SLGV013SL) и хранят при 4°C. Проводили следующие анализы: аналитическая эксклюзионная хроматография (SEC) для определения процента мономера, масс-спектропия (MS) для определения DAR (соотношение лекарственное средство-антитело), тест LAL для определения эндотоксиновой нагрузки и определение концентрации белка с помощью A280 с применением коэффициента экстинкции и молекулярной массы антитела. Данные HRMS (белковый способ) могут указывать на доминирующую массу тяжелой цепи+2 разновидности, что дает значение DAR, составляющее 4,0, которое рассчитывают путем сравнения интенсивности MS пиков для разновидностей DAR1, DAR2 и DAR3. SEC может указывать на агрегацию, как определено посредством сравнения площади пика поглощения высокомолекулярного соединения при 210 и 280 нм с площадью пика поглощения для мономерного ADC.

[00487] Дополнительные ADC с различными антителами CD48, раскрытыми в данном документе, получают с применением протоколов, аналогичных раскрытым выше.

Пример 6. Интернализация и подавление пролиферации клеток антителами к CD48

[00488] Активность интернализации антител к CD48 исследовали в отношении трех эндогенных линий раковых клеток: **KMS-27**: JCRB № JCRB1188 культивировали в RPMI-1640+10% FBS; **NCI-H929**: ATCC № CRL-9068 культивировали в RPMI-1640+10% FBS+0,05 mM 2-меркаптоэтанола и **KMS-21-BM**: JCRB № JCRB1185 культивировали в

RPMI-1640+10% FBS. Способность антител к CD48 NY920, NY938 и гуманизированного CD48A к интернализации при связывании со вторичным конъюгатом ADC к Fc человека, что приводит к подавлению пролиферации и выживания клеток, оценивалась с помощью анализа пролиферации Promega CellTiter-Glo®.

[00489] Антитела к CD48 синтезировали и подвергали экспрессии, как описано в примере 5. Линии клеток культивировали в среде, которая является оптимальной для их роста при 5% CO₂, 37°C, в инкубаторе для тканевых культур. Перед посевом для анализа пролиферации клетки разделяли за по меньшей мере 2 дня до анализа для обеспечения оптимальной плотности роста. В день посева определяли жизнеспособность клеток и плотность клеток с применением цитометра (анализатора жизнеспособности клеток Vi-Cell XR, Beckman Coulter). Клетки с жизнеспособностью выше 85% высевали в белые 384-луночные планшеты с прозрачным дном, обработанные с помощью TC (Corning, кат. № 3765). Клетки высевали при плотности 1000 клеток на лунку в 40 мкл стандартной среды для роста. Планшеты инкубировали при 5% CO₂, 37°C в течение ночи в инкубаторе для тканевых культур. На следующий день полезная нагрузка свободного MMAE, CD48A-CysMab-VC-MMAE ADC (синтез описан в примере 5), антитела к CD48 и не нацеливающее изотипное антитело были получены при 10 X в стандартной среде для роста. Полезную нагрузку свободного MMAE и CD48A-CysMab-VC-MMAE ADC добавляли в клетки в конечных концентрациях 0,007-150 нМ и в конечном объеме 50 мкл на лунку. Полученные антитела, в том числе IgG к CD48 и не нацеливающее изотипное антитело, добавляли к клеткам в конечных концентрациях 0,001-20 нМ и в конечном объеме 45 мкл на лунку. ADC к Fc человека-VC-MMAE (DAR2.0) получали в 10-кратной концентрации в стандартной среде для роста. Полученный ADC добавляли в клетки с конечной концентрацией 60 нМ и конечным объемом 50 мкл на лунку. Каждую концентрацию лекарственного средства тестировали в четырех повторностях. Планшеты инкубировали при 5% CO₂, 37°C в течение 5 дней в инкубаторе для тканевых культур, после чего жизнеспособность клеток оценивали посредством добавления 25 мкл CellTiter Glo® (Promega, кат. № G7573), реагента, который обеспечивает лизис клеток и измерение общего содержания аденозинтрифосфата (АТФ). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут для стабилизации люминесцентных сигналов перед считыванием с применением ридера люминесценции (многоканального планшет-ридера EnVision, PerkinElmer). С целью оценивания эффекта обработок лекарственным средством для нормализации обработанных образцов применяли подсчитанные значения люминесценции для лунок, содержащих необработанные клетки (100% жизнеспособность). Модель переменного наклона применяли для аппроксимации кривой нелинейной регрессии с данными в программном обеспечении GraphPad PRISM версии 7.02. Значения IC₅₀ и A_{max} экстраполировали из полученных кривых.

[00490] Концентрации обработки mAb, необходимые для 50%-ного подавления роста или выживаемости клеток (IC₅₀), рассчитывали с иллюстративными значениями IC₅₀ для тестируемых линий клеток, приведенными в таблице 11. Кривые доза-ответ для репрезентативных линий раковых клеток показаны на фигуре 2A (KMS-27), фигуре 2B

(NCI-H929) и фигуре 2С (KMS-21-BM).

[00491] Было показано, что репрезентативные линии раковых клеток чувствительны к полезной нагрузке MMAE со значениями IC_{50} в диапазоне 0,021-0,116 нМ активности. Изотипический контрольный IgG, дозированный в комбинации с ADC к Fc человека-VC-MMAE, не вызывал нецелевой активности. Репрезентативные линии раковых клеток были чувствительны к ADC CD48A-CysMab-VC-MMAE со значениями IC_{50} в диапазоне 0,062-6,1 нМ, что указывает на возможность интернализации и цитотоксичности при использовании ADC, нацеленных на CD48. NY938 и NY920 при дозировании в комбинации с ADC к Fc человека вызывали гибель клеток с активностью, превышающей активность CD48A. Два кандидата, NY938 и NY920, оказались наиболее эффективными в трех линиях раковых клеток.

[00492] Эти исследования показывают, что кандидаты IgG CD48 были способны к интернализации и, в конечном итоге, к подавлению пролиферации клеток на различных линиях раковых клеток, экспрессирующих CD48. Антитела NY938 и NY920 к CD48 были более эффективными, по сравнению с CD48A. На линиях раковых клеток была продемонстрирована незначительная цитотоксическая активность по сравнению с соответствующим по изотипу ненацеливающим контрольным IgG.

Таблица 11. Кандидаты IgG к CD48: IC_{50}

Обработка	KMS-27		NCI-H929		KMS-21-BM	
	IC_{50} (нМ)	Span (Amax)	IC_{50} (нМ)	Span (Amax)	IC_{50} (нМ)	Span (Amax)
NY938+антитело к Fc человека-VC-MMAE	< 0,001	> 100	0,004	99,7	0,008	98,9
NY920+антитело к Fc человека-VC-MMAE	< 0,001	81,5	0,004	98,1	0,008	93,3
CD48A+антитело к Fc человека-VC-MMAE	0,001	93,4	0,007	100,3	0,016	92,0
IgG+антитело к Fc человека-VC-MMAE	--	--	--	--	--	--
MMAE	0,021	83,9	0,116	88,5	0,024	72,9
CD48A-CysMab-VC- MMAE	6,10	92,9	2,10	142,4	0,062	100,4

Пример 7. Определение K_D антител к CD48

[00493] Связывание с CD48 человека и яванского макака для IgG WT и варианта DARA (мутация D265A и P329A) оценивали по результатам определения аффинности с применением Biacore. Кинетические константы скорости определяли посредством SPR с

применением прибора Biacore T200 (Cytiva, ранее GE Healthcare Lifesciences), как описано ниже.

[00494] Для определения кинетики антител применяли способ захвата белка А. Применяли коммерчески доступный сенсорный чип с белком А (Cytiva, № по кат. 29127556), на поверхности которого белок А захватывал вариант WT и DAPA, а растворимый CD48 человека и яванского макака перетекал в качестве аналита. Концентрации CD48 человека и CD48 яванского макака начинались с 50 нМ и 200 нМ соответственно, и их серийно разбавляли в соотношении одна часть к одной части для получения девяти концентраций. Регенерацию проводили в конце промывки каждой концентрации с помощью глицина, pH 1,5 (Cytiva, № по кат. BR100354).

[00495] Вычитание двух эталонных значений завершали с получением конечных данных. Необработанные данные аппроксимировали к модели связывания 1:1 с параметром(параметрами) R_{max} , установленным(установленными) на локальном уровне. Результаты измерения кинетики для вариантов IgG WT и DAPA к антигену человека показаны на фигурах 3-5 и в таблице 12. Результаты измерения кинетики для вариантов IgG WT и DAPA к антигену яванского макака показаны на фигурах 6-8 и в таблице 13.

Таблица 12. Аффинность связывания кандидатов IgG WT и DAPA с CD48 человека

Эксп. №	Образец	Антиген	k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	KD (M)
1	WT для NY920	CD48 человека	2,57E+05	7,21E-04	2,81E-09
2	WT для NY920	CD48 человека	2,24E+05	6,98E-04	3,11E-09
1	DAPA для NY920	CD48 человека	2,74E+05	7,26E-04	2,65E-09
2	DAPA для NY920	CD48 человека	2,06E+05	3,43E-04	1,67E-09
1	DAPA для NY938	CD48 человека	3,52E+05	1,04E-04	2,96E-10
2	DAPA для NY938	CD48 человека	4,56E+05	1,15E-04	2,52E-10

Таблица 13. Аффинность связывания кандидатов IgG WT и DAPA с CD48 яванского макака

Эксп. №	Образец	Антиген	k_a (1/Mc)	k_d (1/c)	KD (M)
1	WT для NY920	CD48 яванского макака	3,25E+05	4,47E-03	1,38E-08
2	WT для NY920	CD48 яванского макака	3,11E+05	4,01E-03	1,29E-08
1	DAPA для	CD48 яванского	3,19E+05	4,25E-03	1,34E-08

	NY920	макака			
2	DAPA для NY920	CD48 яванского макака	3,01E+05	3,92E-03	1,30E-08
1	DAPA для NY938	CD48 яванского макака	2,71E+05	2,89E-04	1,07E-09
2	DAPA для NY938	CD48 яванского макака	4,09E+05	3,16E-04	7,74E-10

Пример 8. Оценка *in vitro* ADC MMAE к CD48

Линии клеток

[00496] Конъюгаты антитело-лекарственное средство к CD48 (ADC) исследовали в отношении четырех эндогенных линий раковых клеток: **NCI-H929**: ATCC № CRL-9068 культивировали в RPMI-1640+10% FBS+0,05 mM 2-меркаптоэтанол; **KMS-21-BM**: JCRB № JCRB1185 культивировали в RPMI-1640+10% FBS; **KMS-27**: JCRB № JCRB1188 культивировали в RPMI-1640+10% FBS; и **KMS-20**: JCRB № JCRB1196 культивировали в RPMI-1640+10% FBS.

Подавление пролиферации и выживаемости клеток

[00497] Способность ADC к CD48 подавлять пролиферацию и выживаемость клеток оценивали с применением анализа пролиферации Promega CellTiter-Glo®. Линии клеток культивировали в среде, которая является оптимальной для их роста при 5% CO₂, 37°C, в инкубаторе для тканевых культур. Перед посевом для анализа пролиферации клетки разделяли за по меньшей мере 2 дня до анализа для обеспечения оптимальной плотности роста. В день посева определяли жизнеспособность клеток и плотность клеток с применением цитометра (анализатора жизнеспособности клеток Vi-Cell XR, Beckman Coulter). Клетки с жизнеспособностью выше 85% высевали в белые 384-луночные планшеты с прозрачным дном, обработанные с помощью TC (Corning, кат. № 3765). Клетки высевали при плотности 1000 клеток на лунку в 45 мкл стандартной среды для роста. Планшеты инкубировали при 5% CO₂, 37°C в течение ночи в инкубаторе для тканевых культур.

[00498] На следующий день ADC MMAE, нацеливающиеся на CD48, и ADC с изотипом без нацеливания получали при 10X в стандартной среде для роста. Полученные нацеливающиеся CD48 и соответствующие по изотипу ненацеливающиеся контрольные ADC добавляли к клеткам в конечных концентрациях 0,001-25 нМ и в конечном объеме 50 мкл на лунку. Каждую концентрацию лекарственного средства тестировали в четырех повторностях.

[00499] Планшеты инкубировали при 5% CO₂, 37°C в течение 5 дней в инкубаторе для тканевых культур, после чего жизнеспособность клеток оценивали посредством добавления 25 мкл CellTiter Glo® (Promega, кат. № G7573), реагента, который обеспечивает лизис клеток и измерение общего содержания аденозинтрифосфата (АТФ). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут для стабилизации

люминесцентных сигналов перед считыванием с применением ридера люминесценции (многоканального планшет-ридера EnVision, PerkinElmer). С целью оценивания эффекта обработок лекарственным средством для нормализации обработанных образцов применяли подсчитанные значения люминесценции для лунок, содержащих необработанные клетки (100% жизнеспособность). Модель переменного наклона применяли для аппроксимации кривой нелинейной регрессии с данными в программном обеспечении GraphPad PRISM версии 7.02. Значения IC50 и Amax экстраполировали из полученных кривых.

[00500] Кривые доза-ответ пяти иллюстративных линий раковых клеток показаны на фигурах 9A - 9D. Концентрации обработки, необходимые для 50%-ного подавления роста или выживаемости клеток (IC50), рассчитывали с иллюстративными значениями IC50 для тестируемых линий клеток, приведенными в таблице 14.

[00501] Было показано, что репрезентативные линии раковых клеток чувствительны к ADC MMAE, нацеленным на CD48, по сравнению с соответствующими по изотипу не нацеливающими контрольными ADC, IgG-VC-MMAE, со значениями IC50 в диапазоне 0,014 нМ - 0,077 нМ. Антитела NY920 и NY938 к CD48 исследовали как ADC в формате с Fc-сайлингом, DAPA, и в формате дикого типа, CysMab. При конъюгировании с VC-MMAE не было обнаружено разницы в активности между различными форматами антител. ADC MMAE NY920 и ADC MMAE NY938 были эквивалентны по активности на данной модели линии клеток, что было продемонстрировано в анализе пролиферации клеток. Эти исследования показывают, что нацеленные на CD48 ADC VC-MMAE были способны подавлять клеточную пролиферацию на различных линиях раковых клеток, экспрессирующих CD48.

Таблица 14. Активность ADC к CD48 *In Vitro*

ADC	KMS-21-BM		KMS-27		NCI-H929		KMS-20	
	IC50 (нМ)	Amax (Span)	IC50 (нМ)	Amax (Span)	IC50 (нМ)	Amax (Span)	IC50 (нМ)	Amax (Span)
NY920-DAPA-VC-MMAE	0,026	92,9	0,028	83,9	0,027	89,7	0,077	94
NY920-CysMab-VC-MMAE	0,021	97,4	0,022	89,2	0,021	92,9	0,070	94,2
NY938-DAPA-VC-MMAE	0,021	104,6	0,014	107,5	0,016	104,8	0,037	99,8
NY938-CysMab-VC-MMAE	0,021	104,8	0,017	98,6	0,018	100,7	0,043	99,2
IgG-DANAPA-VC-MMAE	--	--	--	--	--	--	--	--

IgG-CysMab-VC-MMAE	--	--	--	--	--	--	--	--
--------------------	----	----	----	----	----	----	----	----

[00502] Если не определено иное, технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

[00503] Если не указано иное, все способы, стадии, методики и манипуляции, которые конкретно не описаны подробно, можно было осуществлять и их осуществляли широко известным способом, как будет ясно специалисту в данной области техники. Например, снова сделана ссылка на стандартные руководства и общий уровень техники, упоминаемый в данном документе, а также на дополнительные литературные источники, цитируемые в данном документе. Если не указано иное, каждый из литературных источников, цитируемых в данном документе, включен посредством ссылки во всей своей полноте.

[00504] Пункты формулы изобретения являются неограничивающими и представлены ниже.

Хотя конкретные аспекты и пункты формулы изобретения были подробно раскрыты в данном документе, это было выполнено в качестве примера лишь в целях иллюстрации, и не предназначено для ограничений с точки зрения объема прилагаемой формулы изобретения или объема объекта формулы изобретения с любым соответствующим будущим применением. В частности, авторы настоящего изобретения подразумевают, что различные замены, изменения и модификации могут быть выполнены в настоящем изобретении без отклонения от сути и объема настоящего изобретения, определяемого формулой изобретения. Считается, что выбор исходного материала в виде нуклеиновой кислоты, представляющего интерес клона или типа библиотеки, является обычным делом для рядового специалиста в данной области техники, располагающего сведениями об аспектах, описанных в данном документе. Считается, что другие аспекты, преимущества и модификации находятся в пределах объема следующей формулы изобретения. Специалистам в данной области техники будут понятны многие эквиваленты конкретных аспектов настоящего изобретения, описанного в данном документе, или путем проведения всего лишь обычных экспериментов они будут способны установить такие эквиваленты. Предусмотрено, что такие эквиваленты охвачены следующей формулой изобретения. Изменение объема пункта формулы изобретения в позднее поданных соответствующих заявках может быть обусловлено ограничениями патентных законов различных стран и не должно пониматься как отказ от объекта формулы изобретения.

NO: 31, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), состоящая из последовательности под SEQ ID NO: 32, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), состоящая из последовательности под SEQ ID NO: 29; CDR1 легкой цепи (LCDR1), состоящая из последовательности под SEQ ID NO: 45, CDR2 легкой цепи (LCDR2), состоящая из последовательности под SEQ ID NO: 46, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), состоящая из последовательности под SEQ ID NO: 47, или

(viii) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), состоящая из последовательности под SEQ ID NO: 33, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), состоящая из последовательности под SEQ ID NO: 34, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), состоящая из последовательности под SEQ ID NO: 35; CDR1 легкой цепи (LCDR1), состоящая из последовательности под SEQ ID NO: 48, CDR2 легкой цепи (LCDR2), состоящая из последовательности под SEQ ID NO: 46, и CDR3 легкой цепи (LCDR3), состоящая из последовательности под SEQ ID NO: 44.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где антитело к CD48 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 23, или

(ii) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 36, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 49.

3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или п. 2, где антитело к CD48 содержит:

(a) аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 12 и аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 25;

(b) аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 14 и аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 25;

(c) аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 63 и аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 25;

(e) аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 38 и аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 51;

(f) аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 40 и аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 51 или

(g) аминокислотную последовательность тяжелой цепи под SEQ ID NO: 65 и аминокислотную последовательность легкой цепи под SEQ ID NO: 51.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент предусматривает Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент, одноцепочечный Fv (scFv), Fv, стабилизированный дисульфидными связями (sdFv), Fd-фрагмент, Fv-фрагмент, dAb-фрагмент, однодоменное антитело, макситело, минитело, нанотело, интратело, диатело, полуантитело, антитело с одним плечом, моноклональное антитело, биспецифическое антитело, антитело, представляющее собой биспецифический активатор, привлекающий Т-клетки,

полиспецифическое антитело, химерный антигенный рецептор, Т-клетку с химерным антигенным рецептором или радиоиммуноконъюгат.

5. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4.

6. Нуклеиновая кислота по п. 5, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 50.

7. Нуклеиновая кислота по п. 5, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты под SEQ ID NO: 13, 15, 39, 41, 75, 77, 26 или 52.

8. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп. 5-7.

9. Линия клеток, содержащая вектор по п. 8 или нуклеиновую кислоту по любому из пп. 5-7.

10. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-4, включающий культивирование линии клеток по п. 9 в подходящих условиях для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, затем очистку и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

11. Конъюгат антитела и лекарственного средства формулы (I):

$A-(L_B-(D)_n)_y$ (I);

где

A представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с CD48 человека;

L_B представляет собой линкер;

D представляет собой цитотоксическое средство;

n представляет собой целое число от 1 до 10, и

y представляет собой целое число от 1 до 10,

при этом фрагмент, представляющий собой линкер-лекарственное средство ($L_B-(D)_n$), ковалентно присоединен к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (A).

12. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 11, где фрагмент, представляющий собой лекарственное средство, является ингибитором Eg5, ингибитором V-АТФазы, ингибитором HSP90, ингибитором IAP, ингибитором mTor, стабилизатором микротрубочек, дестабилизатором микротрубочек, ауристатином, доластатином, майтанзиноидом, MetAP (метионинаминопептидазой), ингибитором ядерного экспорта белков CRM1, ингибитором DPPIV, ингибитором реакций переноса фосфорильной группы в митохондриях, ингибитором синтеза белков, ингибитором киназ, ингибитором CDK2, ингибитором CDK9, ингибитором протеасом, ингибитором кинезина, ингибитором HDAC, ДНК-повреждающим средством, ДНК-алкилирующим средством, ДНК-интеркалятором, средством, связывающим малую бороздку ДНК, ингибитором РНК-полимеразы, амантином, ингибитором сплайсосом, ингибитором топоизомеразы и ингибитором DHFR или проапоптотическим средством, но исключая ингибиторы BCL-2, ингибиторы MCL-1 и ингибиторы BCL-XL.

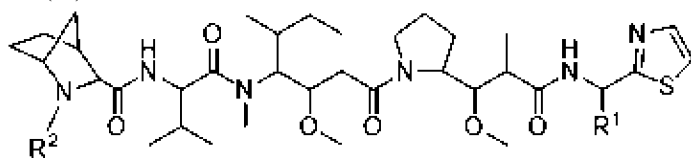
13. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 11, где фрагмент,

представляющий собой лекарственное средство, является ингибитором Eg5, ингибитором V-АТФазы, ингибитором HSP90, ингибитором IAP, ингибитором mTor, стабилизатором микротрубочек, дестабилизатором микротрубочек, ауристатином, доластатином, майтанзиноидом, MetAP (метионинаминопептидазой), ингибитором ядерного экспорта белков CRM1, ингибитором DPPIV, ингибитором реакций переноса фосфорильной группы в митохондриях, ингибитором синтеза белков, ингибитором киназ, ингибитором CDK2, ингибитором CDK9, ингибитором протеасом, ингибитором кинезина, ингибитором HDAC, ДНК-повреждающим средством, ДНК-алкилирующим средством, ДНК-интеркалятором, средством, связывающим малую бороздку ДНК, ингибитором РНК-полимеразы, амантином, ингибитором сплайсосом, ингибитором топоизомеразы или ингибитором DHFR.

14. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 11-13, где фрагмент, представляющий собой лекарственное средство, является ауристатином.

15. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 11, где

D представляет собой цитотоксическое средство, выбранное из соединения формулы (A):



формула (A),

где



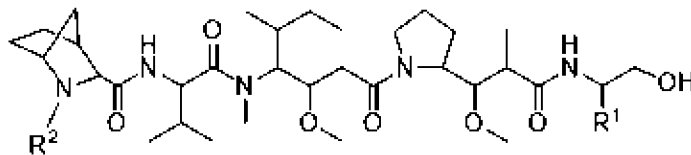
R^2 представляет собой H, C_1 - C_6 алкил, $-C(=O)R^3$, $-(CH_2)_mOH$, $-C(=O)(CH_2)_mOH$, $-C(=O)((CH_2)_mO)_nR^4$, $-((CH_2)_mO)_nR^4$ или C_1 - C_6 алкил, который необязательно замещен $-CN$, $-C(=O)NH_2$ или 1-5 гидроксилами;

каждый R^3 независимо выбран из C_1 - C_6 алкила и C_1 - C_6 алкила, который необязательно замещен 1-5 гидроксилами,

и

каждый R^4 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила,

или D представляет собой цитотоксическое средство, выбранное из соединения формулы (B):



формула (B),

где



R^2 представляет собой H, C_1 - C_6 алкил, $-C(=O)R^3$, $-(CH_2)_mOH$, $-C(=O)(CH_2)_mOH$, $-C(=O)((CH_2)_mO)_nR^4$, $-((CH_2)_mO)_nR^4$ или C_1 - C_6 алкил, который необязательно замещен $-CN$, $-C(=O)NH_2$ или 1-5 гидроксилами;

каждый R^3 независимо выбран из C_1 - C_6 алкила и C_1 - C_6 алкила, который необязательно замещен 1-5 гидроксилами, и

каждый R^4 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила.

16. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 11-15, где n равняется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8.

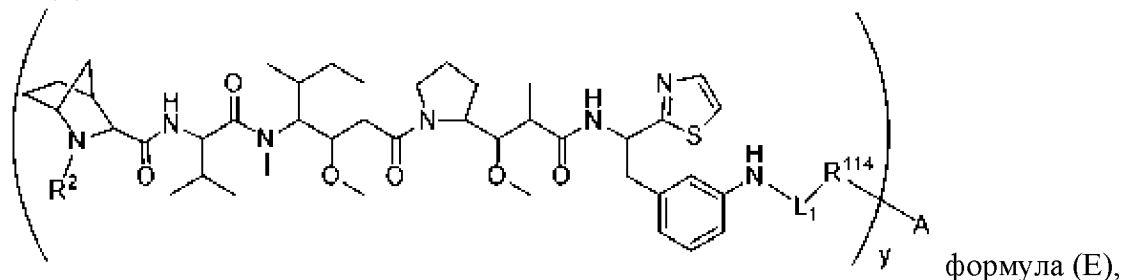
17. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 11-16, где y равняется 1, 2, 3 или 4.

18. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 11-17, где каждый L_B независимо выбран из расщепляемого линкера или нерасщепляемого линкера.

19. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 11-18, где каждый L_B представляет собой расщепляемый линкер.

20. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 11-18, где каждый L_B представляет собой нерасщепляемый линкер.

21. Конъюгат антитела и лекарственного средства, предусматривающий структуру формулы (E):



где

A представляет антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с CD48 человека;

y представляет собой целое число от 1 до 10;

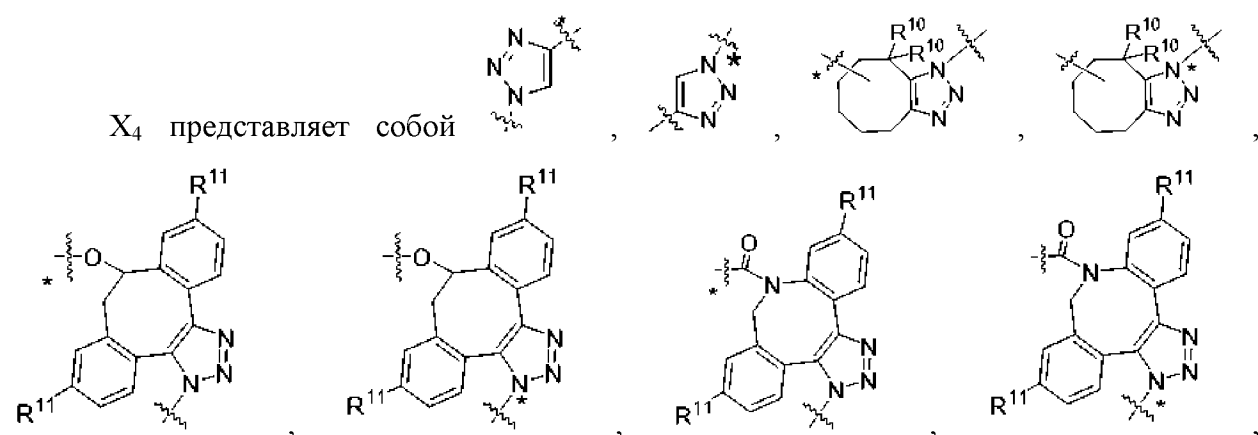
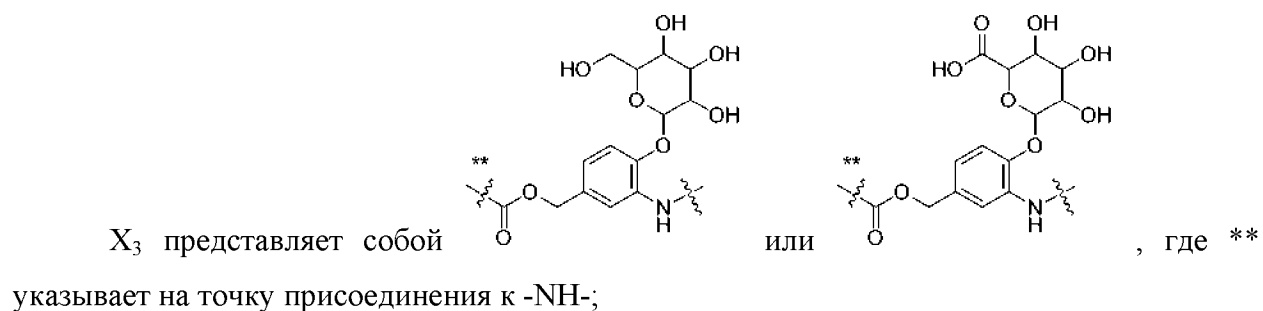
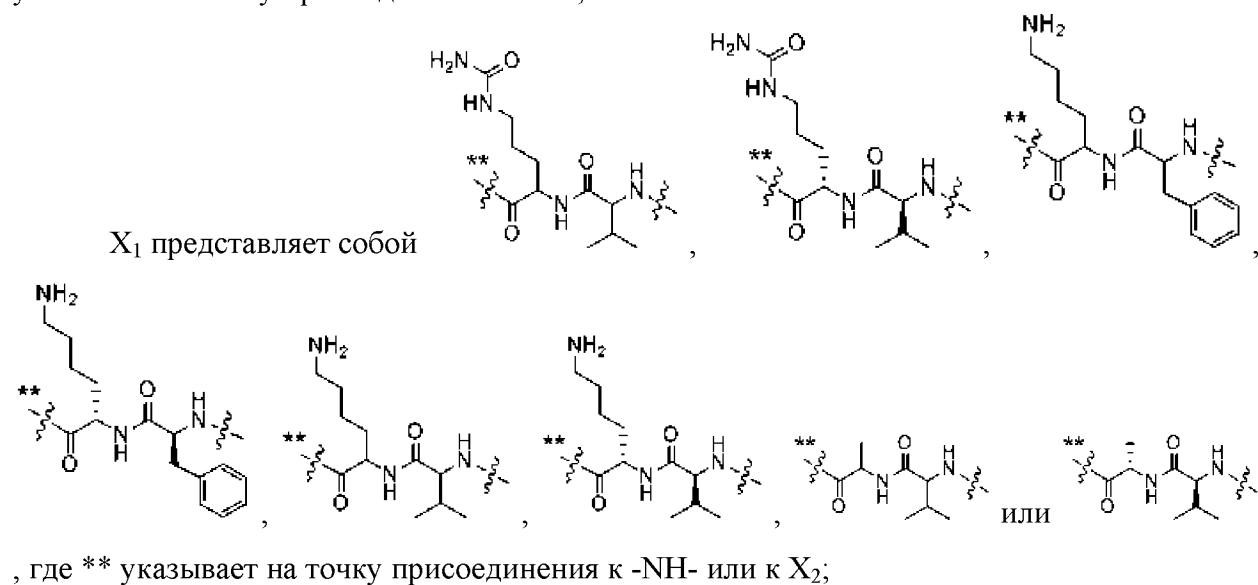
R^2 представляет собой H, C_1 - C_6 алкил, $-C(=O)R^3$, $-(CH_2)_mOH$, $-C(=O)(CH_2)_mOH$, $-C(=O)((CH_2)_mO)_nR^4$, $-((CH_2)_mO)_nR^4$ или C_1 - C_6 алкил, который необязательно замещен $-CN$, $-C(=O)NH_2$ или 1-5 гидроксид;

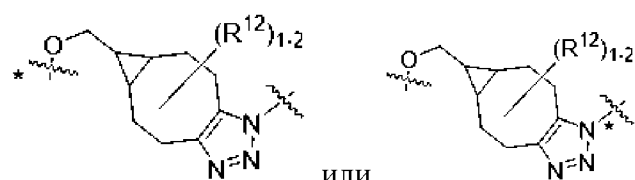
каждый R^3 независимо выбран из C_1 - C_6 алкила и C_1 - C_6 алкила, который необязательно замещен 1-5 гидроксид;

каждый R^4 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила;

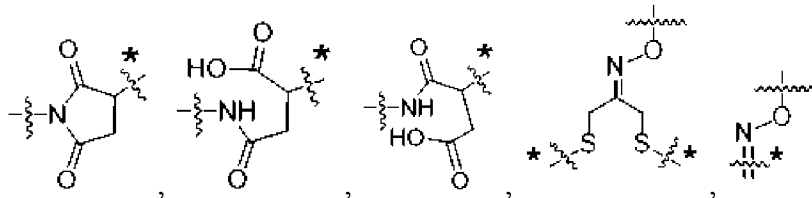
L_1 представляет собой $-X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_1C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_2X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_2X_1C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$, $-X_1C(=O)(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$, $X_2X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$ или $-X_2X_1C(=O)(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$, где **

указывает на точку присоединения к R^{114} ;

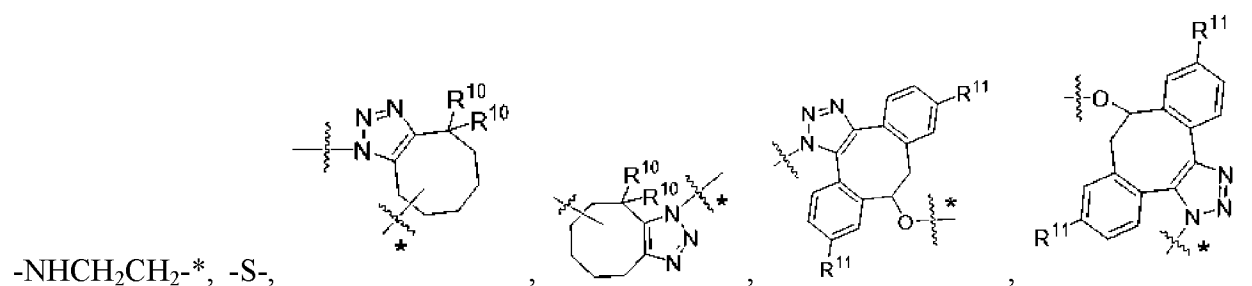
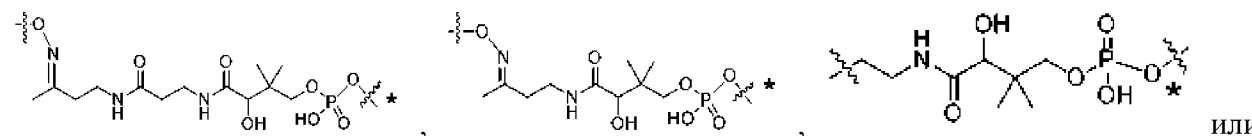
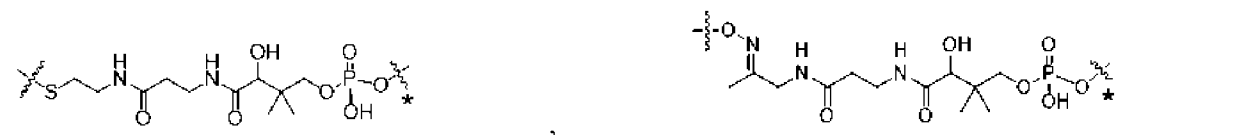
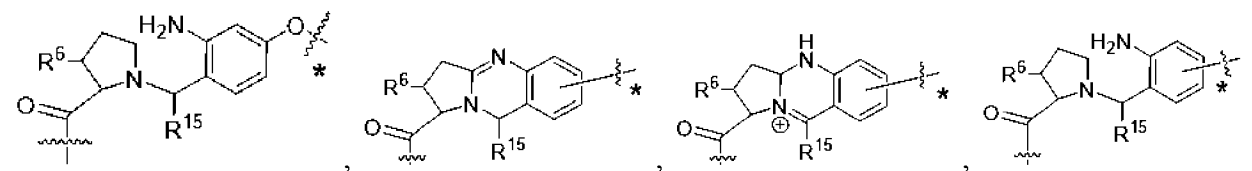
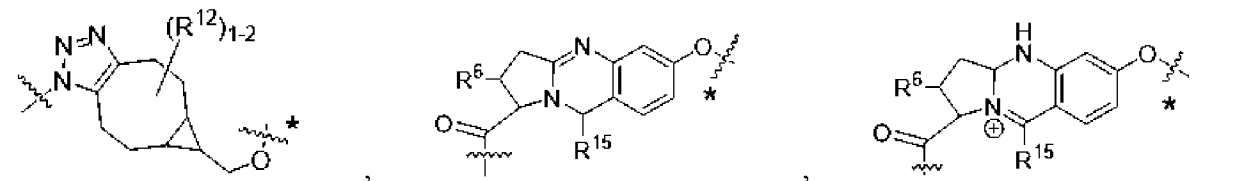
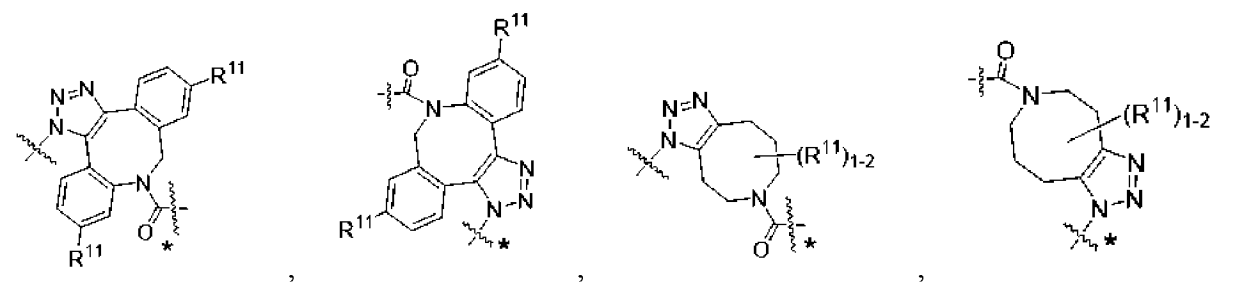




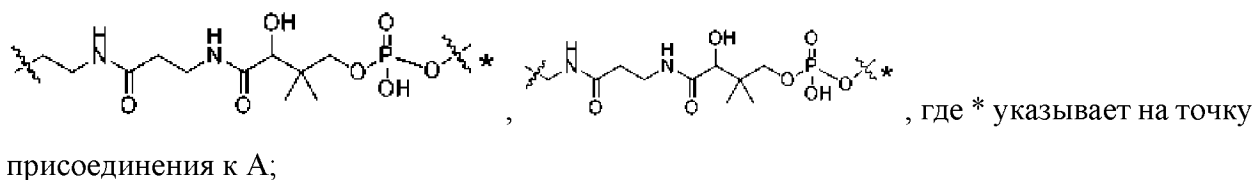
или

, где $*$ указывает, что точка присоединениянаправлена к R^{114} ; R^{114} представляет собой

, $-NR^6C(=O)CH_2-$, $-NHC(=O)CH_2-$, $-S(=O)_2CH_2CH_2-$, $-(CH_2)_2S(=O)_2CH_2CH_2-$, $-NR^6S(=O)_2CH_2CH_2-$, $-NR^6C(=O)CH_2CH_2-$, $-NH-$, $-C(=O)-$, $-NHC(=O)-$, $-CH_2NHCH_2CH_2-$,

 $-NHCH_2CH_2-$, $-S-$,

или



каждый R^6 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила;

каждый R^{10} независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила, F, Cl и -OH;

каждый R^{11} независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила, F, Cl, - NH_2 , - OCH_3 , - OCH_2CH_3 , - $N(CH_3)_2$, -CN, - NO_2 и -OH;

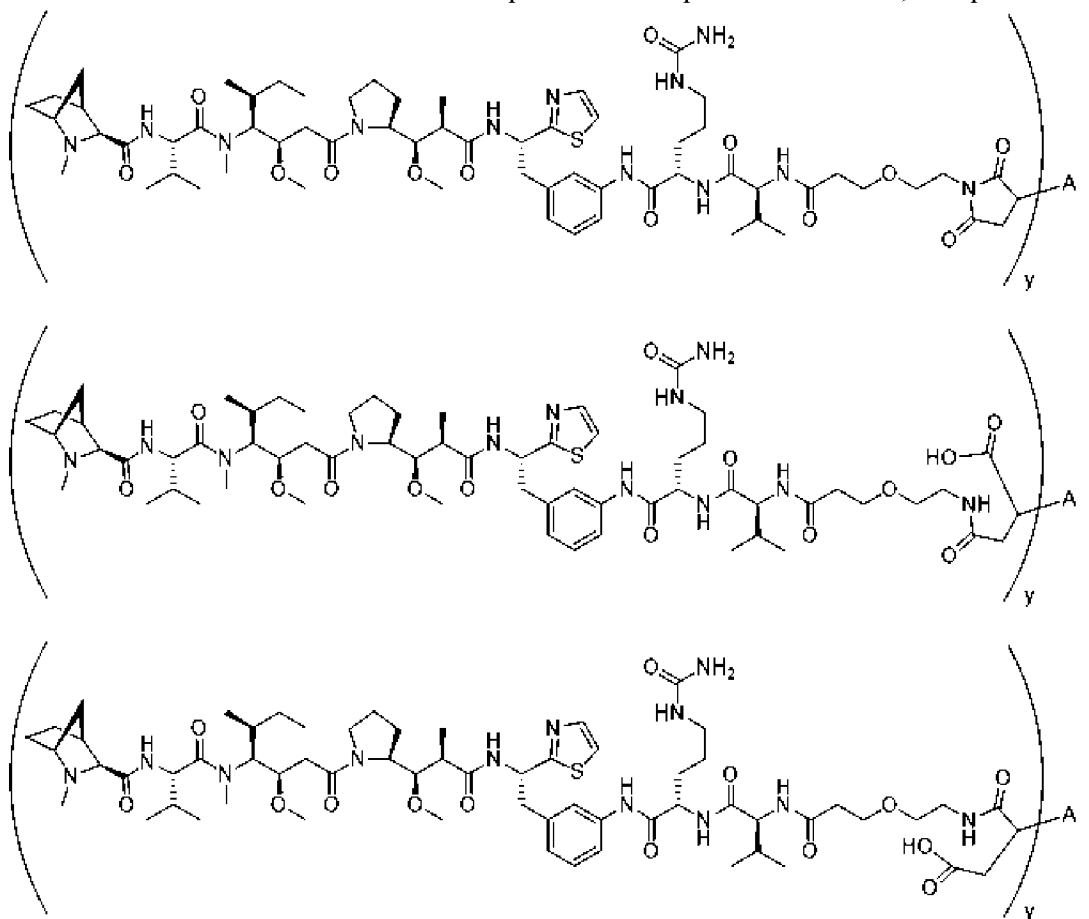
каждый R^{12} независимо выбран из H, C_{1-6} алкила, фтора, бензилокси, замещенного - $C(=O)OH$, бензила, замещенного - $C(=O)OH$, C_{1-4} алкокси, замещенного - $C(=O)OH$, и C_{1-4} алкила, замещенного - $C(=O)OH$;

каждый R^{15} независимо выбран из H, - CH_3 и фенила;

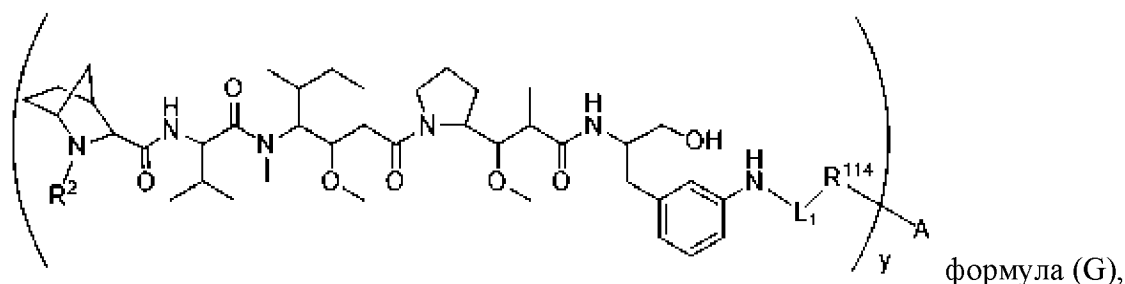
каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10, и

каждый p независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14.

22. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 21, выбранный из



23. Конъюгат антитела и лекарственного средства, предусматривающий структуру формулы (G):



где

A представляет антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с CD48 человека;

y представляет собой целое число от 1 до 10;

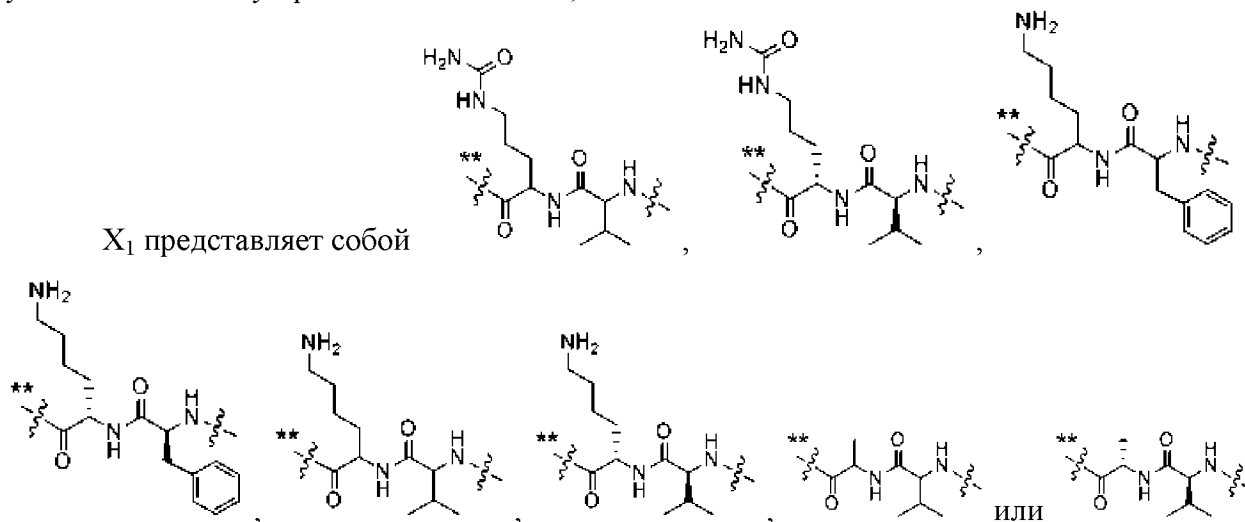
R^2 представляет собой H, C_1 - C_6 алкил, $-C(=O)R^3$, $-(CH_2)_mOH$, $-C(=O)(CH_2)_mOH$, $-C(=O)((CH_2)_mO)_nR^4$, $-((CH_2)_mO)_nR^4$ или C_1 - C_6 алкил, который необязательно замещен $-CN$, $-C(=O)NH_2$ или 1-5 гидроксими;

каждый R^3 независимо выбран из C_1 - C_6 алкила и C_1 - C_6 алкила, который необязательно замещен 1-5 гидроксими;

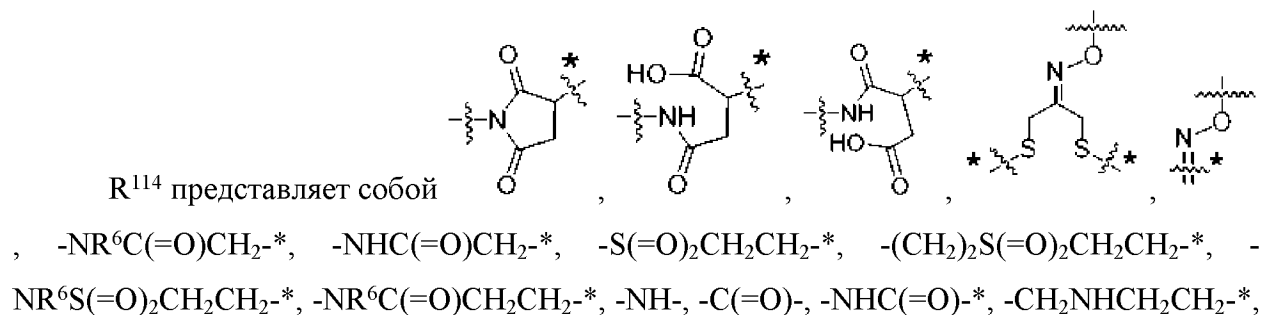
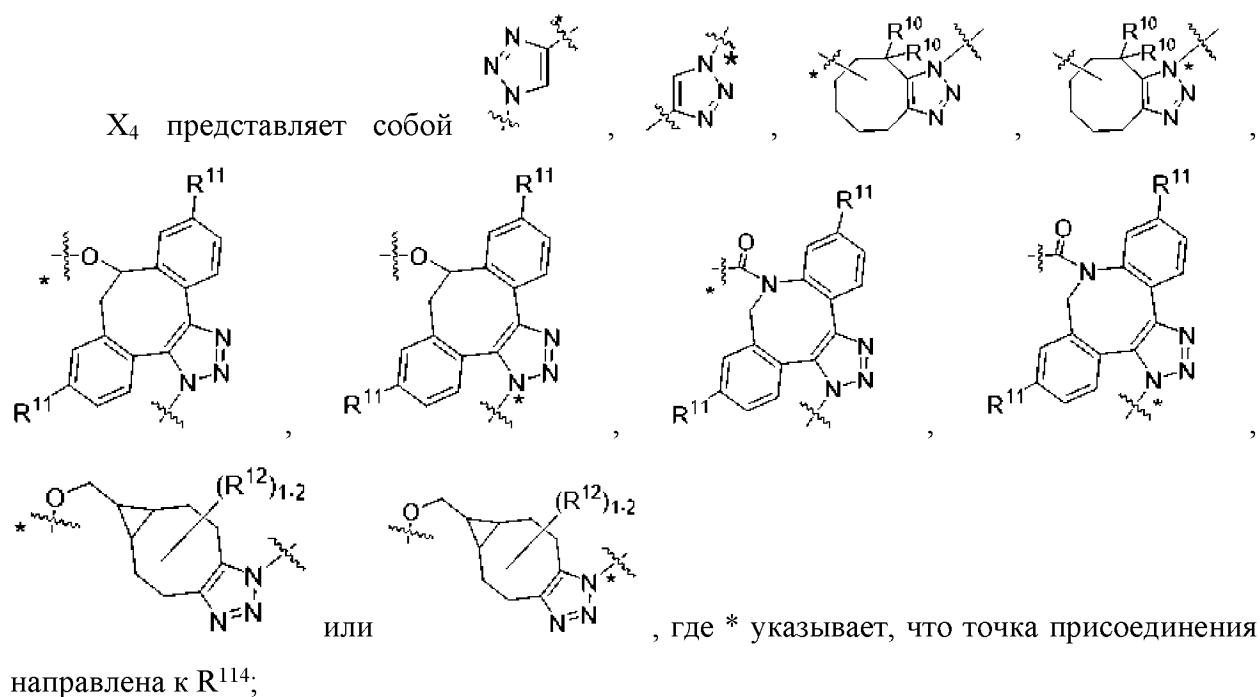
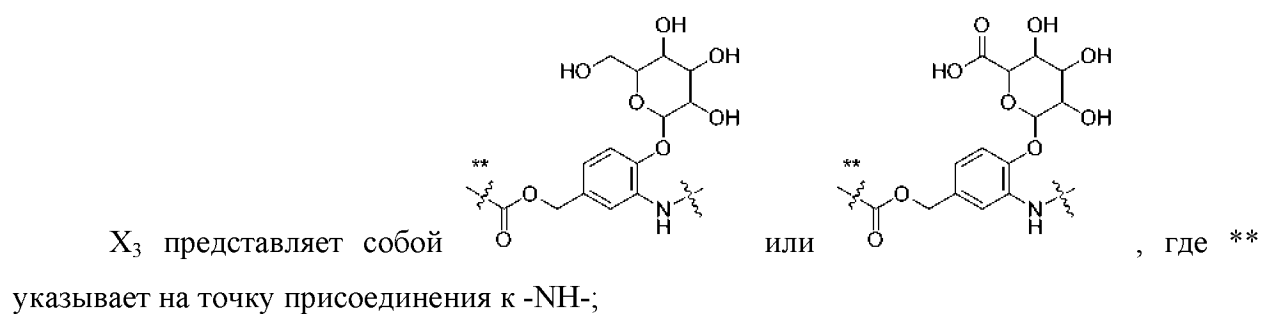
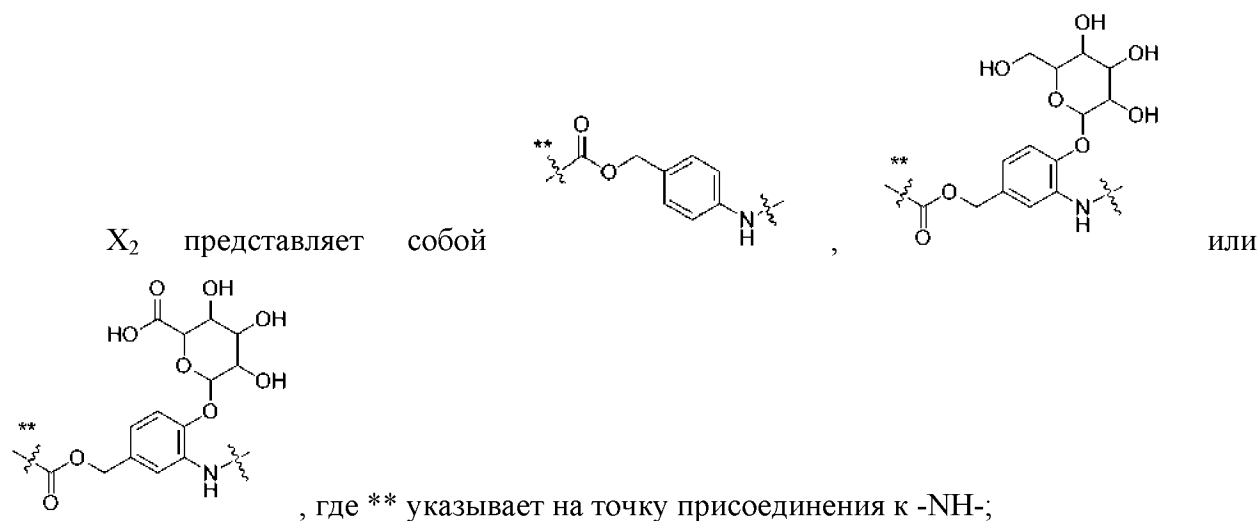
каждый R^4 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила;

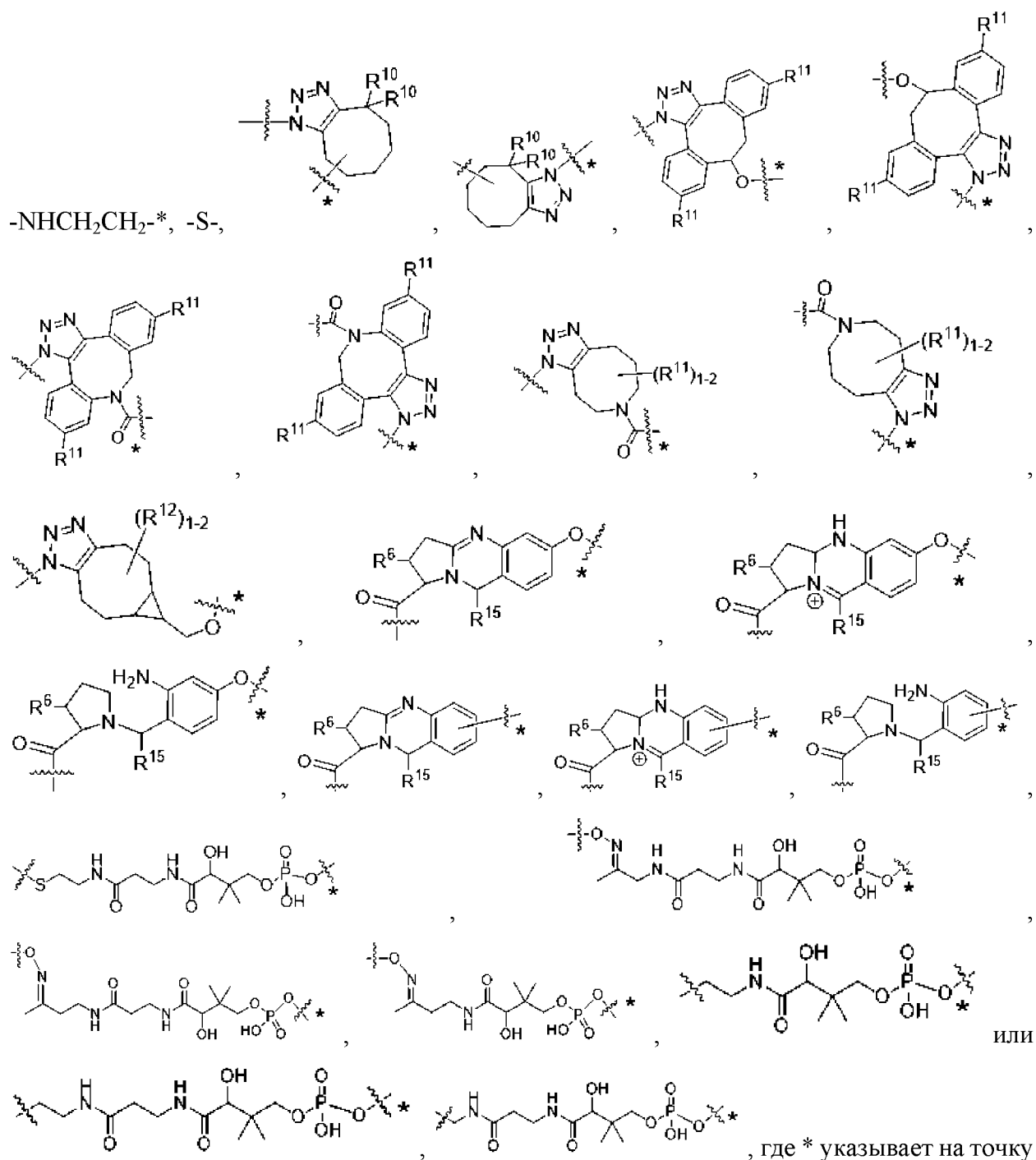
L_1 представляет собой $-X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_1C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_2X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_2X_1C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_mNHC(=O)(CH_2)_m^{**}$, $-X_3C(=O)(CH_2)_m^{**}$, $X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$, $-X_1C(=O)(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$, $X_2X_1C(=O)((CH_2)_mO)_p(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$ или $-X_2X_1C(=O)(CH_2)_mX_4(CH_2)_m^{**}$, где ** указывает на точку присоединения к R^{114} ;

X_1 представляет собой



, где ** указывает на точку присоединения к $-NH-$ или к X_2 ;





каждый R^6 независимо выбран из H и C_1 - C_6 алкила;

каждый R^{10} независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила, F, Cl и -OH;

каждый R^{11} независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила, F, Cl, $-\text{NH}_2$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$, $-\text{CN}$, $-\text{NO}_2$ и -OH;

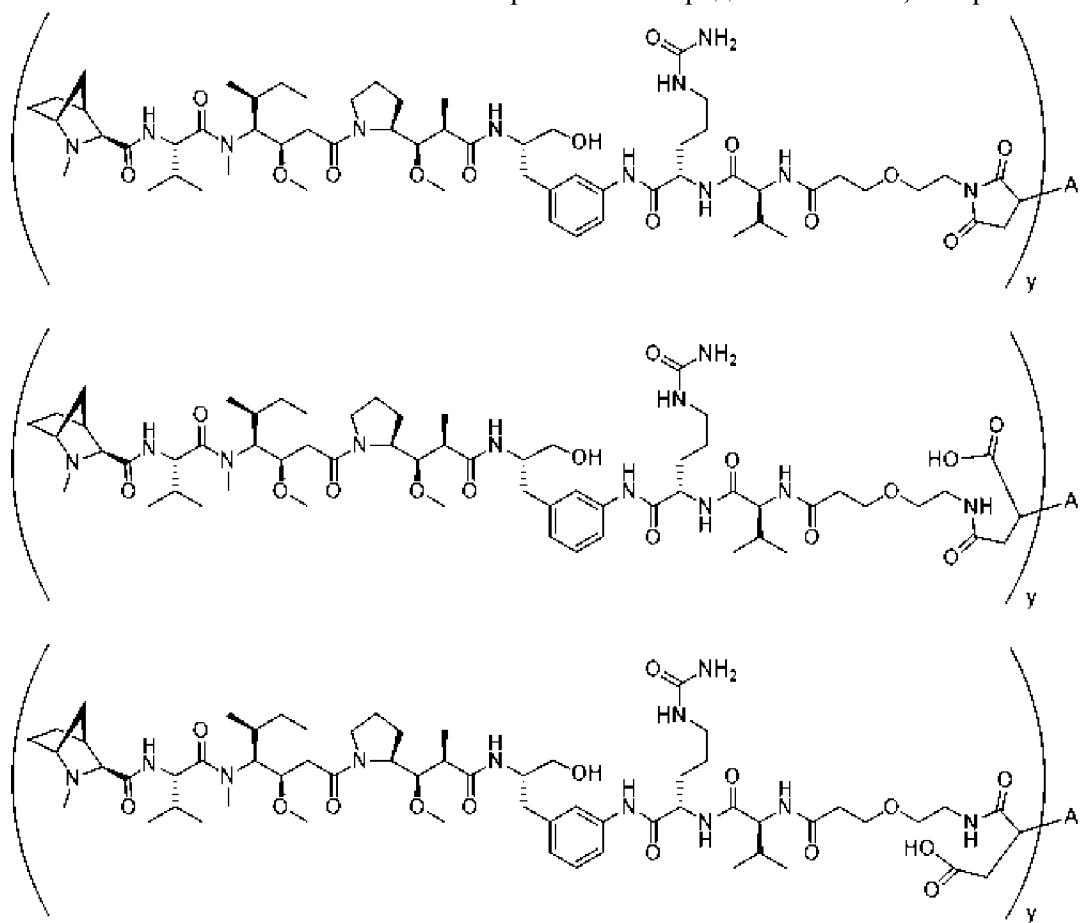
каждый R^{12} независимо выбран из H, C_1 - C_6 алкила, фтора, бензилокси, замещенного - $\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, бензила, замещенного - $\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, C_1 - C_4 алкокси, замещенного - $\text{C}(=\text{O})\text{OH}$, и C_1 - C_4 алкила, замещенного - $\text{C}(=\text{O})\text{OH}$;

каждый R^{15} независимо выбран из H, $-\text{CH}_3$ и фенила;

каждый m независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10, и

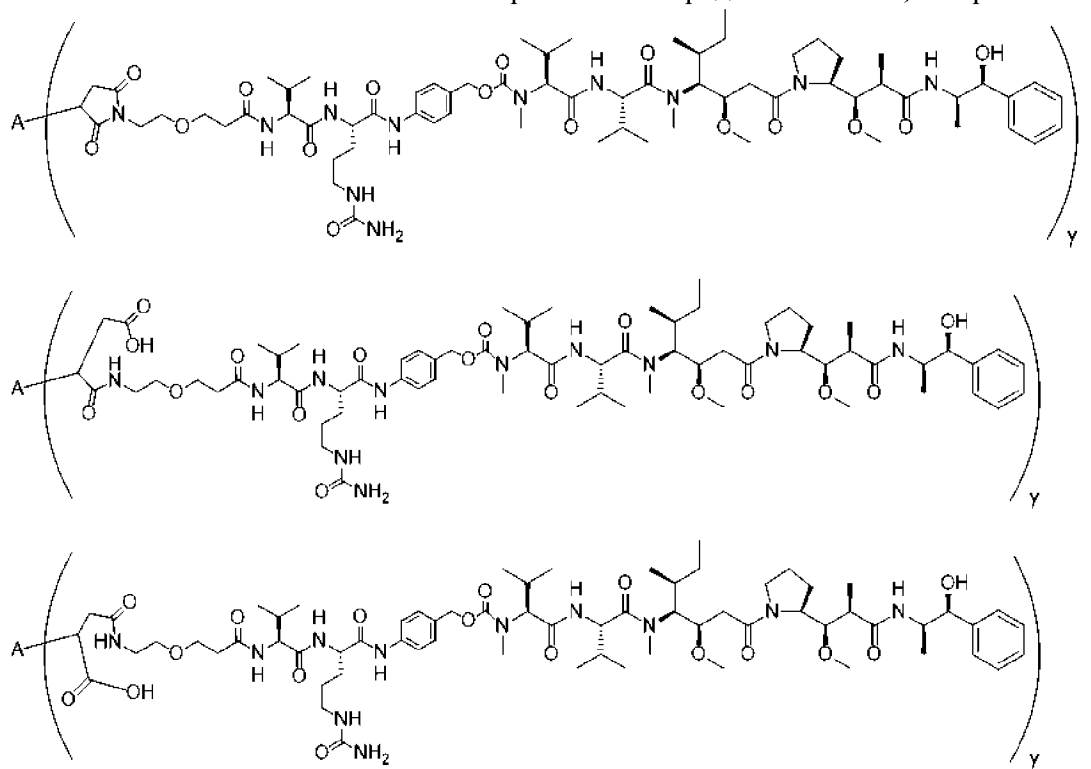
каждый p независимо выбран из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 и 14.

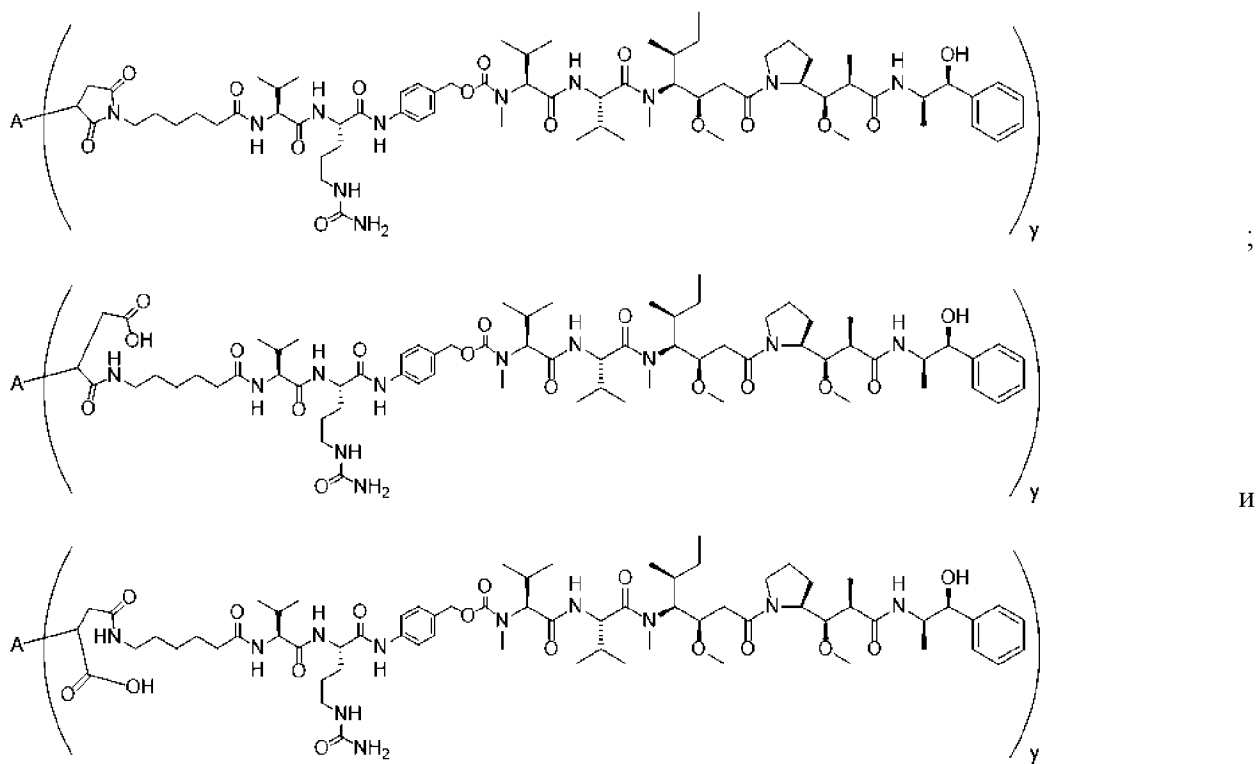
24. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 23, выбранный из



и

25. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 11, выбранный из





лимфому, плазмноклеточную миелому, лейкоз, лимфому, рак желудка, острый миелоидный лейкоз, рак мочевого пузыря, рак головного мозга, рак костного мозга, рак шейки матки, хронический лимфоцитарный лейкоз, колоректальный рак, рак пищевода, гепатоцеллюлярный рак, лимфобластный лейкоз, фолликулярную лимфому, лимфоидные злокачественные новообразования Т-клеточного или В-клеточного происхождения, меланому, миелогенный лейкоз, миелому, рак ротовой полости, рак яичника, немелкоклеточный рак легкого, хронический лимфоцитарный лейкоз, рак предстательной железы, мелкоклеточный рак легкого или рак селезенки.

35. Способ по п. 30, применение по п. 31 или фармацевтическая композиция по п. 32, дополнительно предусматривающие введение или применение одного или нескольких дополнительных терапевтических средств.

36. Способ снижения или подавления роста опухоли у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-4, конъюгата антитела и лекарственного средства по любому из пп. 11-26 или фармацевтической композиции по любому из пп. 27-29.

37. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-4, конъюгата антитела и лекарственного средства по любому из пп. 11-26 или фармацевтической композиции по любому из пп. 27-29 для снижения или подавления роста опухоли у нуждающегося в этом субъекта.

38. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 27-29 для применения в снижении или подавлении роста опухоли у нуждающегося в этом субъекта.

39. Способ по п. 36, применение по п. 37 или фармацевтическая композиция по п. 38, где при опухоли наблюдается экспрессия CD48.

40. Способ по п. 36, применение по п. 37 или фармацевтическая композиция по п. 38, где введение или применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата антитела и лекарственного средства или фармацевтической композиции снижает или подавляет рост опухоли на по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 99%.

41. Способ снижения или замедления размножения популяции раковых клеток у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-4, конъюгата антитела и лекарственного средства по любому из пп. 11-26 или фармацевтической композиции по любому из пп. 27-29.

42. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-4, конъюгата антитела и лекарственного средства по любому из пп. 11-26 или

фармацевтической композиции по любому из пп. 27-29 для снижения или подавления роста опухоли у нуждающегося в этом субъекта.

43. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 27-29 для применения в снижении или подавлении роста опухоли у нуждающегося в этом субъекта.

44. Способ по п. 41, применение по п. 42 или фармацевтическая композиция по п. 43, где популяция раковых клеток экспрессирует CD48.

45. Способ по п. 41, применение по п. 42 или фармацевтическая композиция по п. 43, где популяция раковых клеток получена из опухоли или гематологического рака, предпочтительно популяция раковых клеток получена из рака молочной железы, множественной миеломы, В-клеточной лимфомы, плазмоклеточной миеломы, лейкоза, лимфомы, рака желудка, острого миелоидного лейкоза, рака мочевого пузыря, рака головного мозга, рака костного мозга, рака шейки матки, хронического лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака пищевода, гепатоцеллюлярного рака, лимфобластного лейкоза, фолликулярной лимфомы, лимфоидных злокачественных новообразований Т-клеточного или В-клеточного происхождения, меланомы, миелогенного лейкоза, миеломы, рака ротовой полости, рака яичника, немелкоклеточного рака легкого, хронического лимфоцитарного лейкоза, рака предстательной железы, мелкоклеточного рака легкого или рака селезенки.

46. Способ по п. 41, применение по п. 42 или фармацевтическая композиция по п. 43, где введение или применение конъюгата антитела и лекарственного средства, композиции или фармацевтической композиции снижает популяцию раковых клеток или замедляет размножение популяции раковых клеток на по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 99%.

47. Антитело, которое конкурирует с NY920 или NY938 за связывание с CD48 человека.

48. Антитело, которое конкурирует с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-4 за связывание с CD48 человека.

49. Антитело по п. 47 или п. 48, где антитело связывается с таким же или перекрывающимся эпитопом CD48 человека, что и NY920 или NY938.

50. Антитело по п. 49, где антитело связывается с одной или несколькими аминокислотами в пределах остатков 54-64 или 105-121 CD48 человека (SEQ ID NO: 53).

51. Антитело по п. 49, где антитело связывается с одной или несколькими аминокислотами, выбранными из остатков 54, 58, 60, 61, 62, 64, 105, 107, 119, 111, 114, 115, 117, 119 и 121 CD48 человека (SEQ ID NO: 53).

52. Антитело по п. 51, где антитело взаимодействует с одной или несколькими аминокислотами в пределах 4,0 Å.

53. Диагностическое средство, содержащее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4 или конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 11.

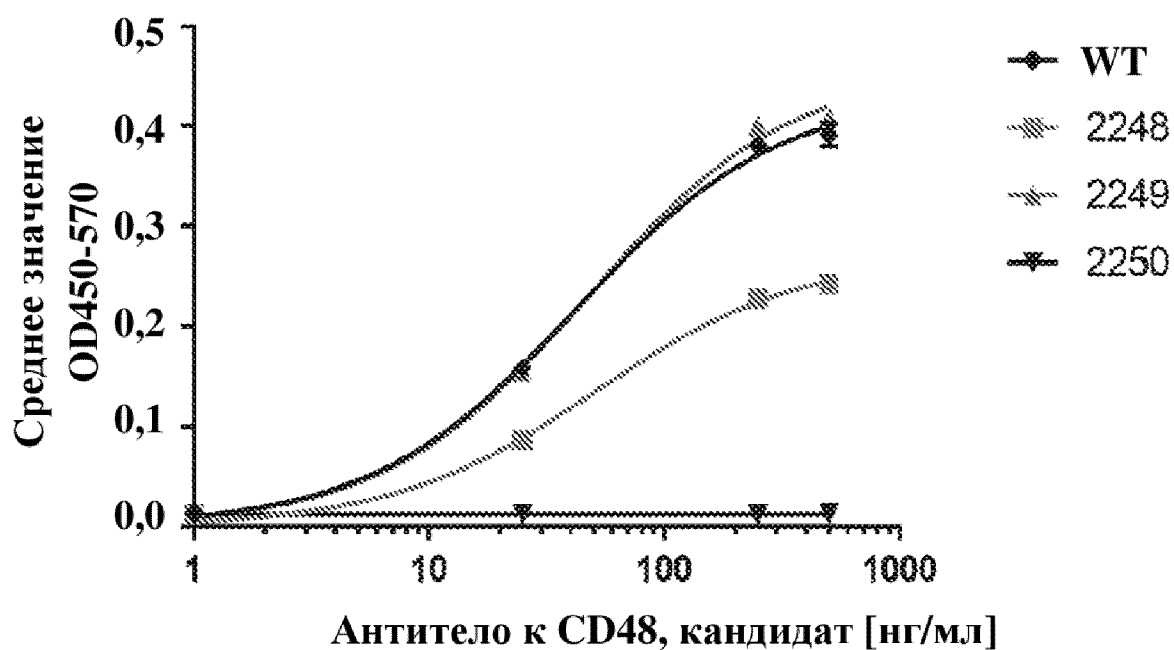
54. Диагностический реагент по п. 53, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или конъюгат антитела и лекарственного средства являются мечеными с помощью радиоактивной метки, флуорофора, хромофора, средства для визуализации или иона металла.

55. Способ обнаружения CD48 человека в ткани или клетке, включающий приведение в контакт диагностического средства по п. 53 или п. 54 с тканью или клеткой и обнаружение связывания диагностического средства с тканью или клеткой.

По доверенности

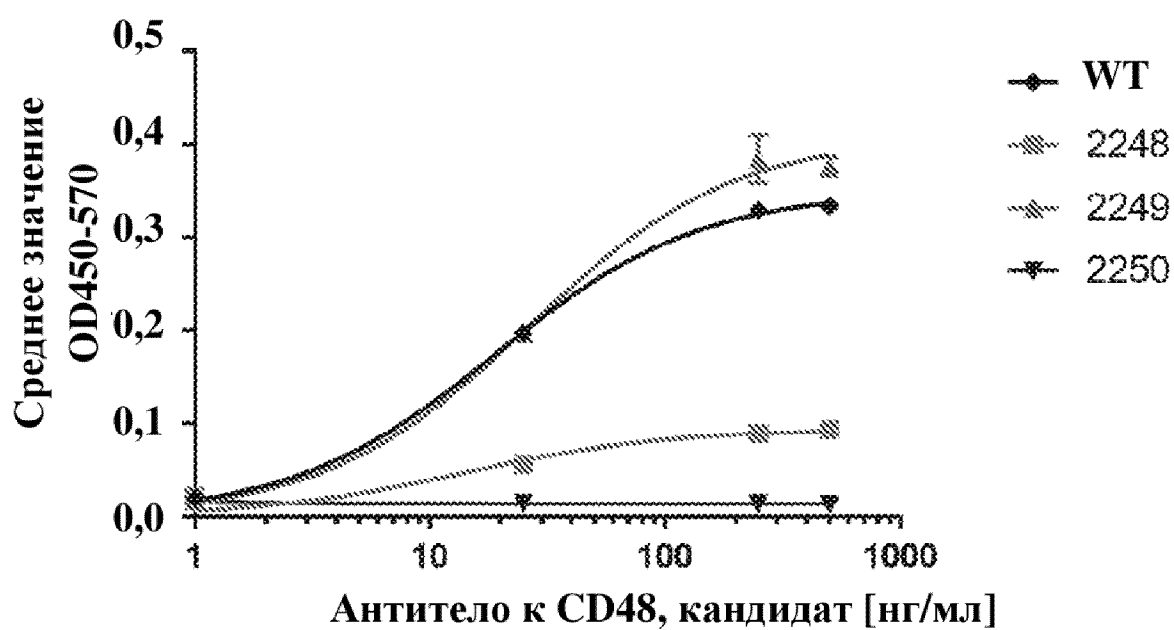
1/15

NOV3731

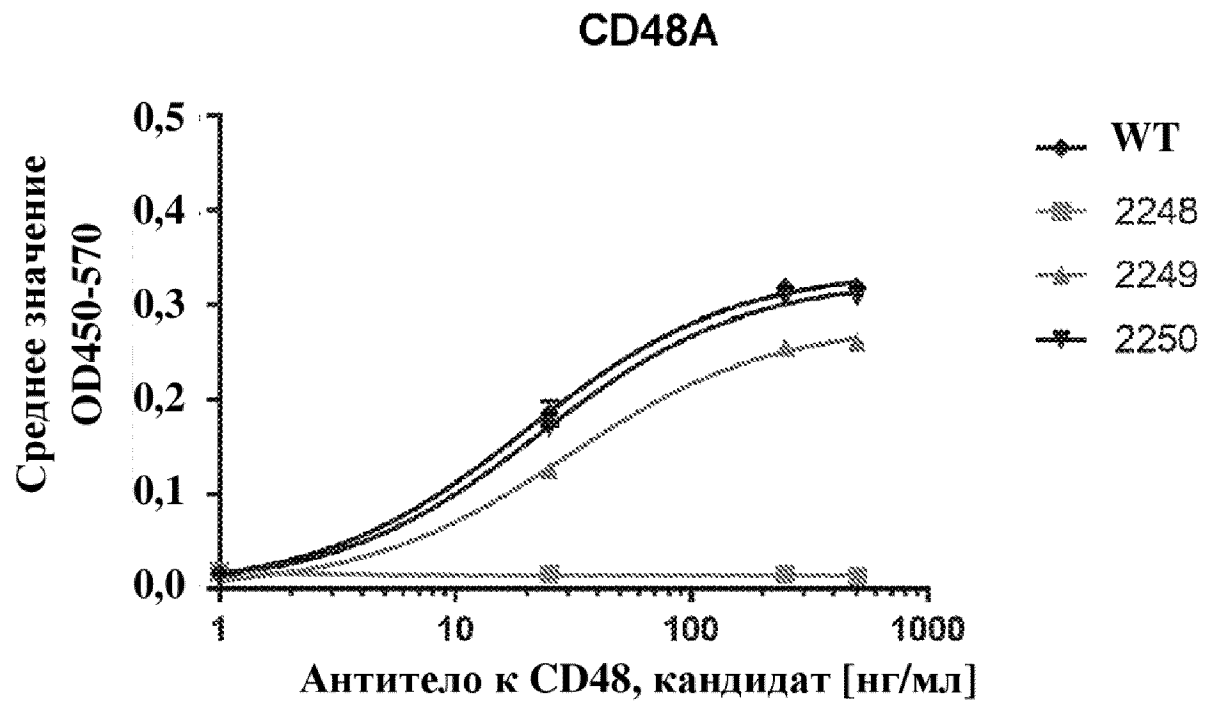


Фигура 1А

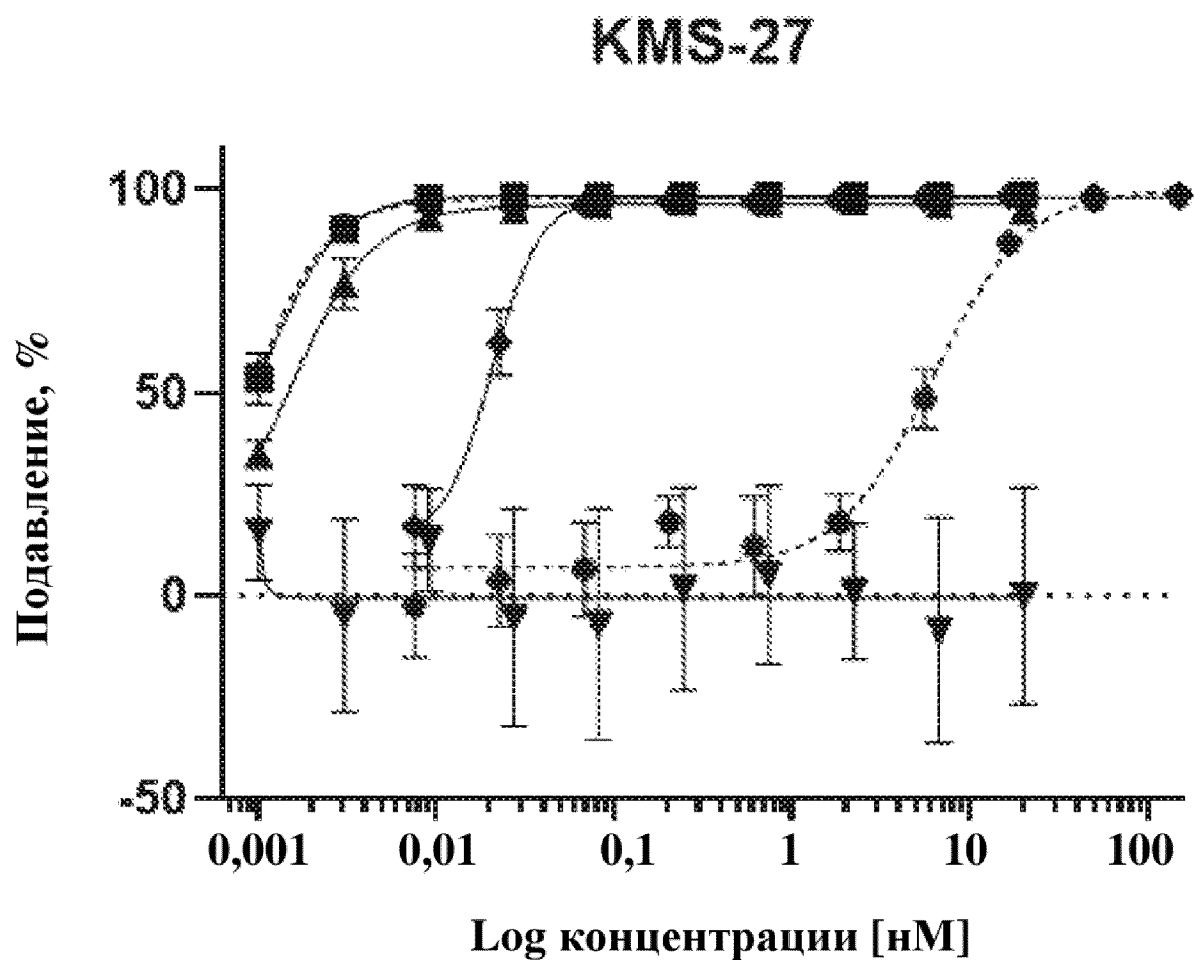
NY258



Фигура 1В

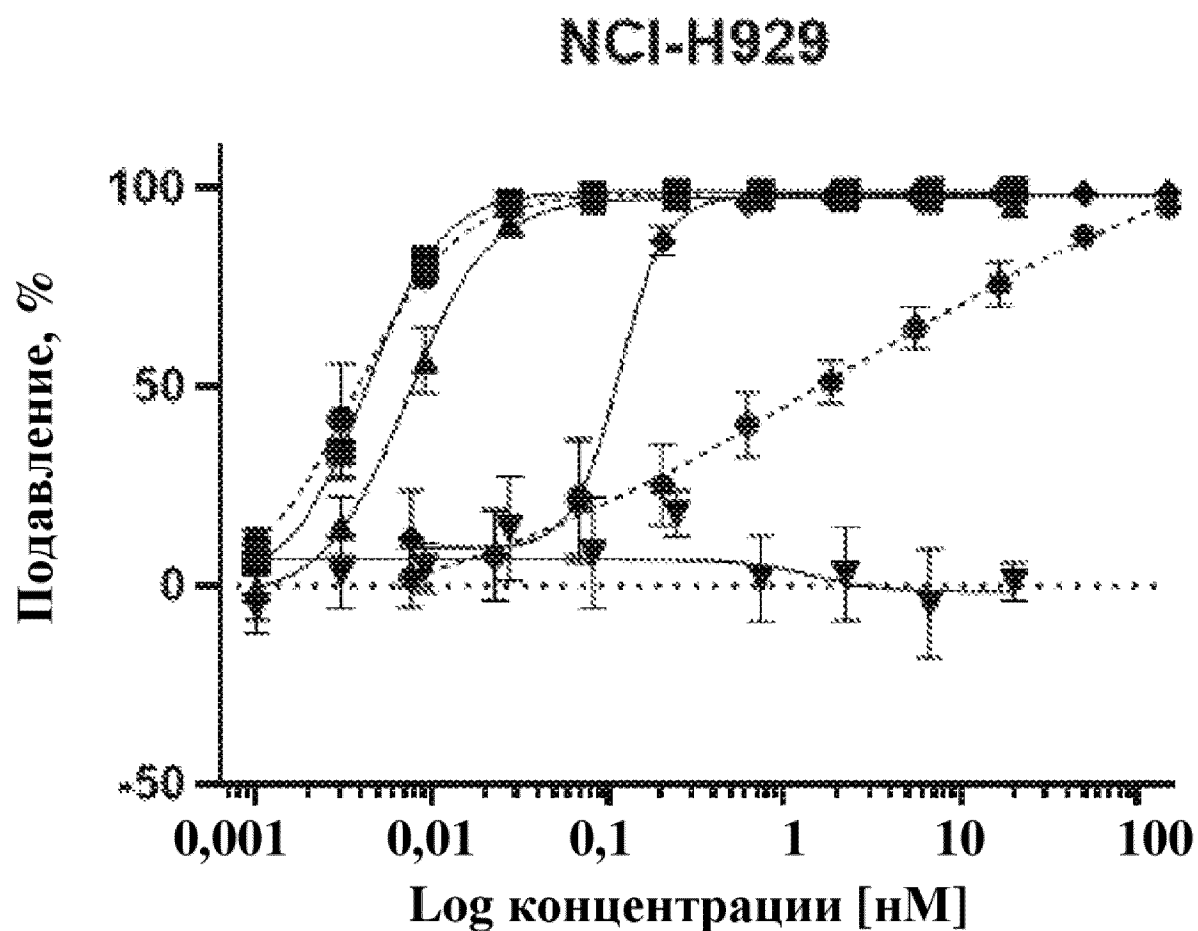


Фигура 1С



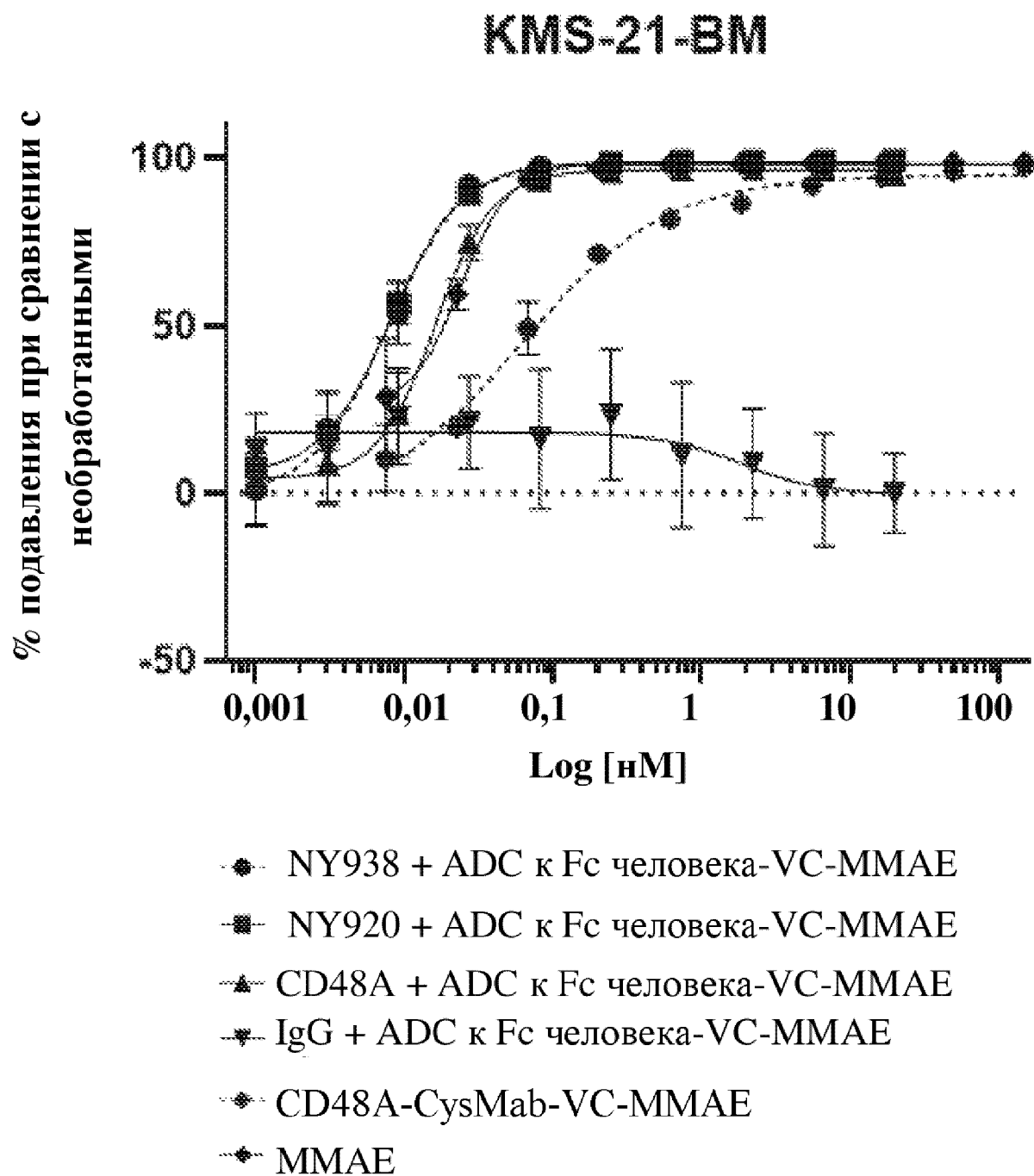
- NY938 + ADC к Fc человека-VC-MMAE
- NY920 + ADC к Fc человека-VC-MMAE
- ▲ CD48A + ADC к Fc человека-VC-MMAE
- ▼ IgG + ADC к Fc человека-VC-MMAE
- CD48A-CysMab-VC-MMAE
- ◆ MMAE

Фигура 2А

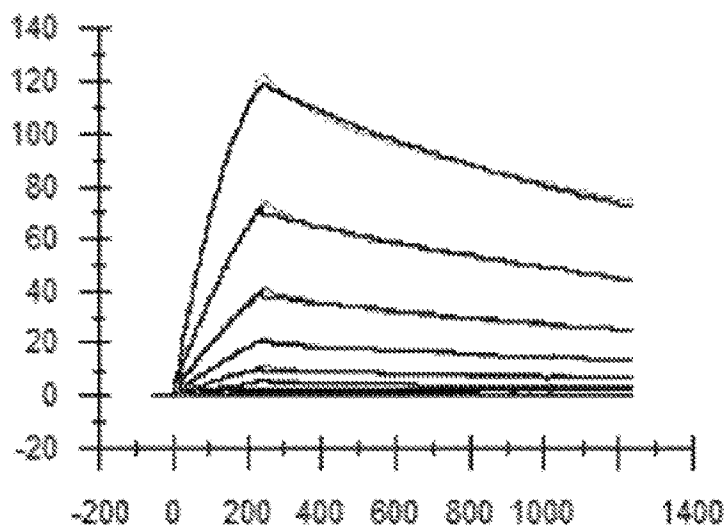


- NY938 + ADC к Fc человека-VC-MMAE
- NY920 + ADC к Fc человека-VC-MMAE
- ▲ CD48A + ADC к Fc человека-VC-MMAE
- ▼ IgG + ADC к Fc человека-VC-MMAE
- ◆ CD48A-CysMab-VC-MMAE
- ◇ MMAE

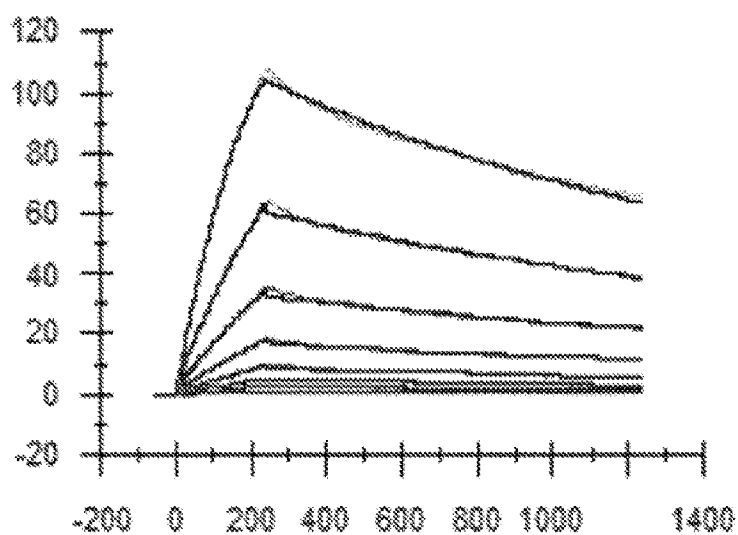
Фигура 2В



Фигура 2С

Связывание NY920 WT с CD48 человека

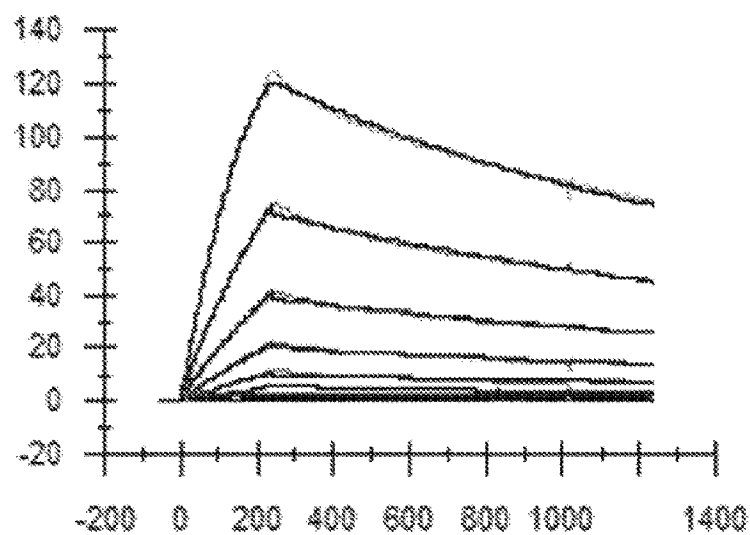
Эксп. № 1: k_a (1/мс) = $2,57E+05$, k_d (1/с) = $7,21E-04$, KD (M) = $2,81E-09$



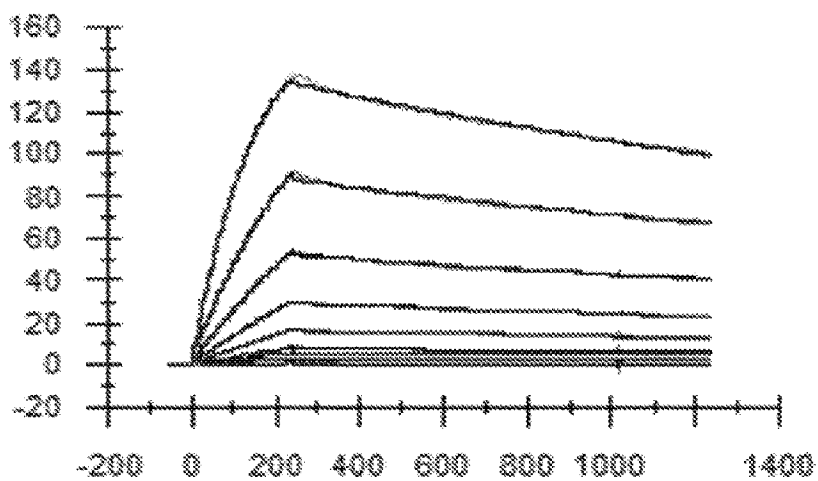
Эксп. № 2: k_a (1/мс) = $2,24E+05$, k_d (1/с) = $6,98E-04$, KD (M) = $3,11E-09$

Фигура 3

Связывание NY920 DAPA с CD48 человека

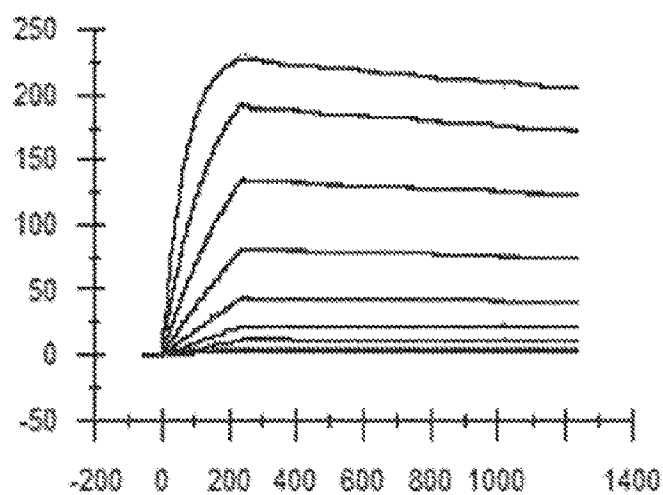


Эксп. № 1: k_a (1/мс) = $2,74E+05$, k_d (1/с) = $7,26E-04$, KD (M) = $2,65E-09$

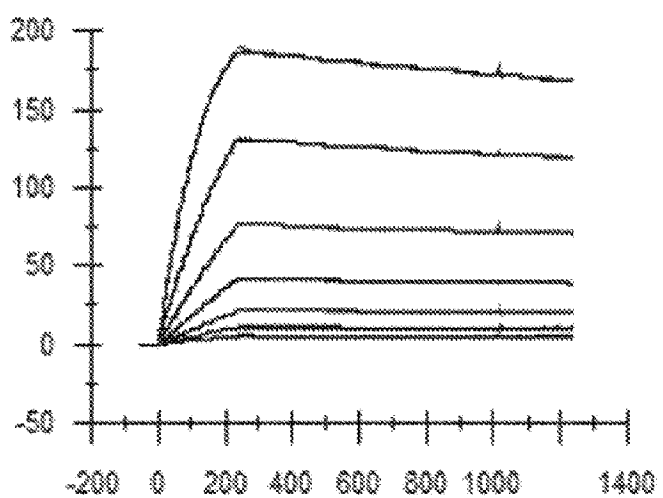


Эксп. № 2: k_a (1/мс) = $2,06E+05$, k_d (1/с) = $3,43E-04$, KD (M) = $1,67E-09$

Фигура 4

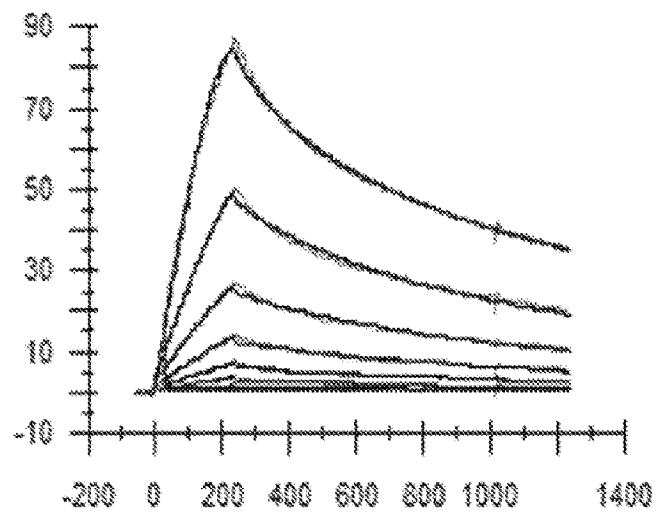
Связывание NY938 DAPA с CD48 человека

Эксп. №1: k_a (1/мс) = $3,52E+05$, k_d (1/с) = $1,04E-04$, KD (M) = $2,96E-10$

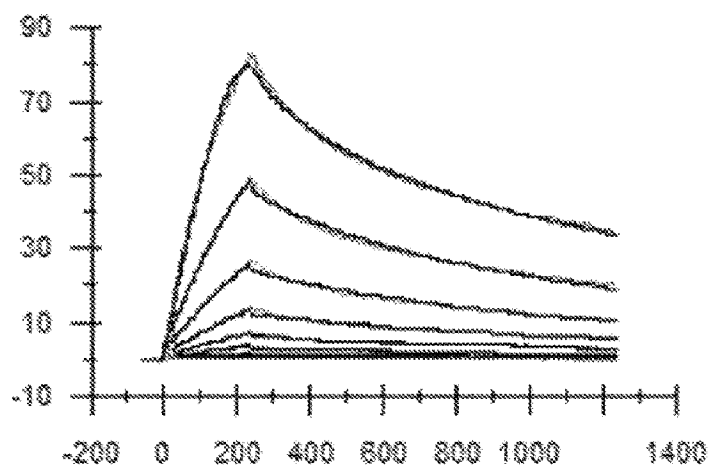


Эксп. № 2: k_a (1/мс) = $4,56E+05$, k_d (1/с) = $1,15E-04$, KD (M) = $2,52E-10$

Фигура 5

Связывание NY920 WT с CD48 яванского макака

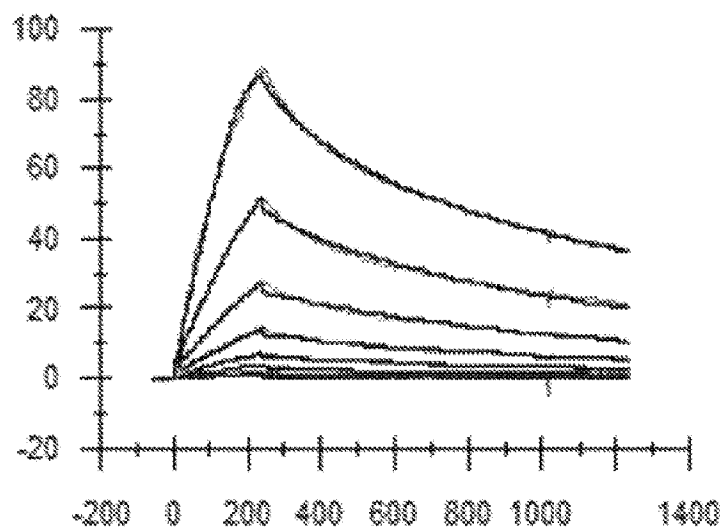
Эксп. № 1: k_a (1/мс) = $3,25E+05$, k_d (1/с) = $4,47E-03$, KD (M) = $1,38E-08$



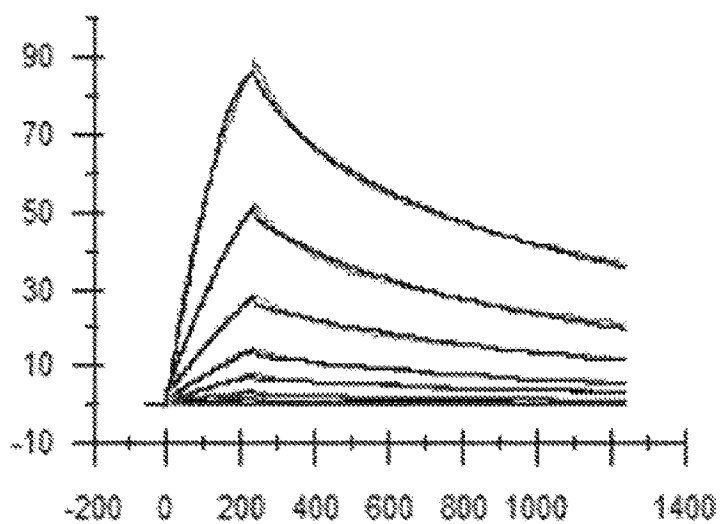
Эксп. № 2: k_a (1/мс) = $3,11E+05$, k_d (1/с) = $4,01E-03$, KD (M) = $1,29E-08$

Фигура 6

**Связывание NY920 DAPA с CD48 яванского
макака**



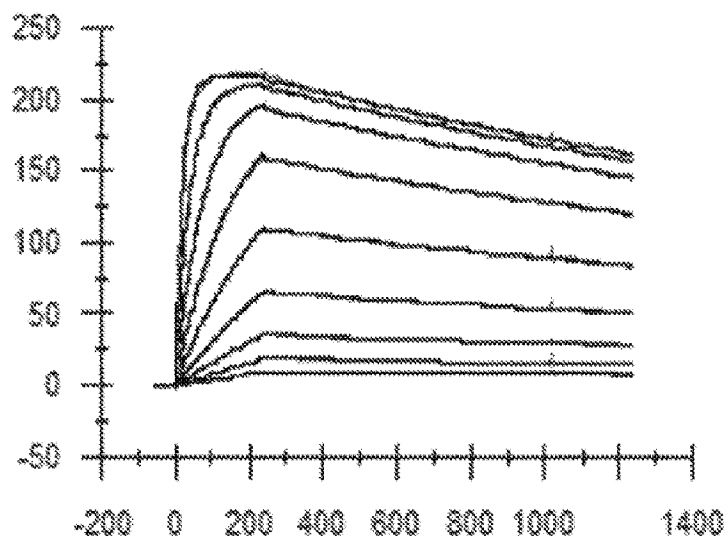
Эксп. № 1: k_a (1/мс) = $3,19E+05$, k_d (1/с) = $4,25E-03$, KD (M) = $1,34E-08$



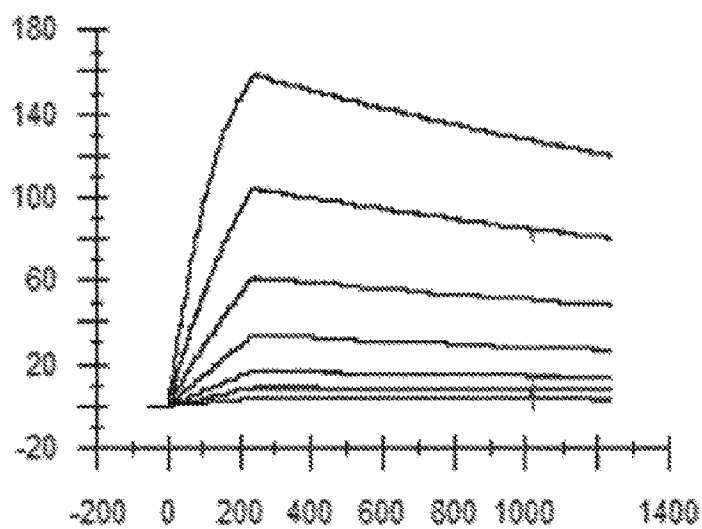
Эксп. № 2: k_a (1/мс) = $3,01E+05$, k_d (1/с) = $3,92E-03$, KD (M) = $1,30E-08$

Фигура 7

**Связывание NY938 DAPA с CD48 яванского
макака**

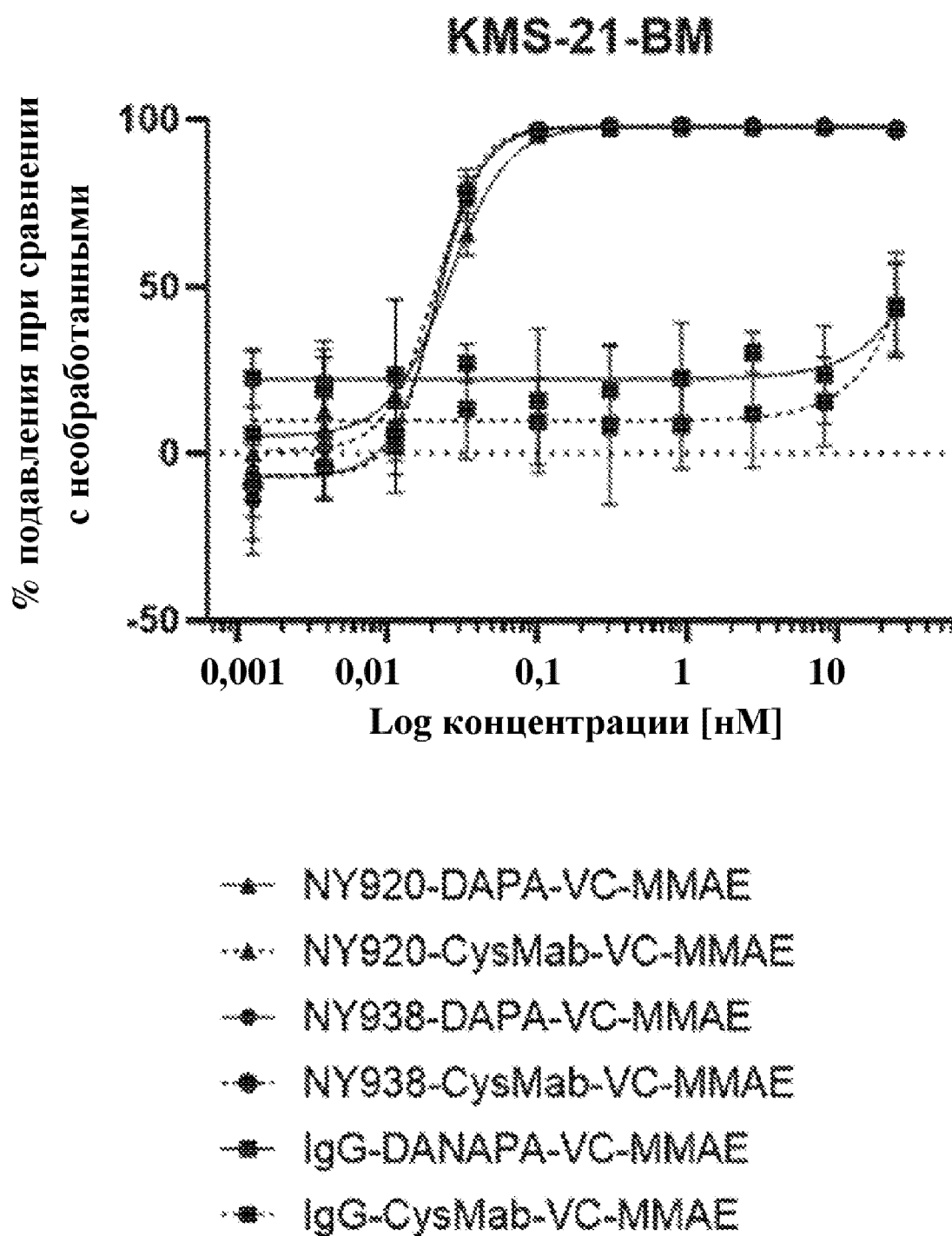


Эксп. № 1: k_a (1/мс) = $2,71E+05$, k_d (1/с) = $2,89E-04$, KD (M) = $1,07E-09$

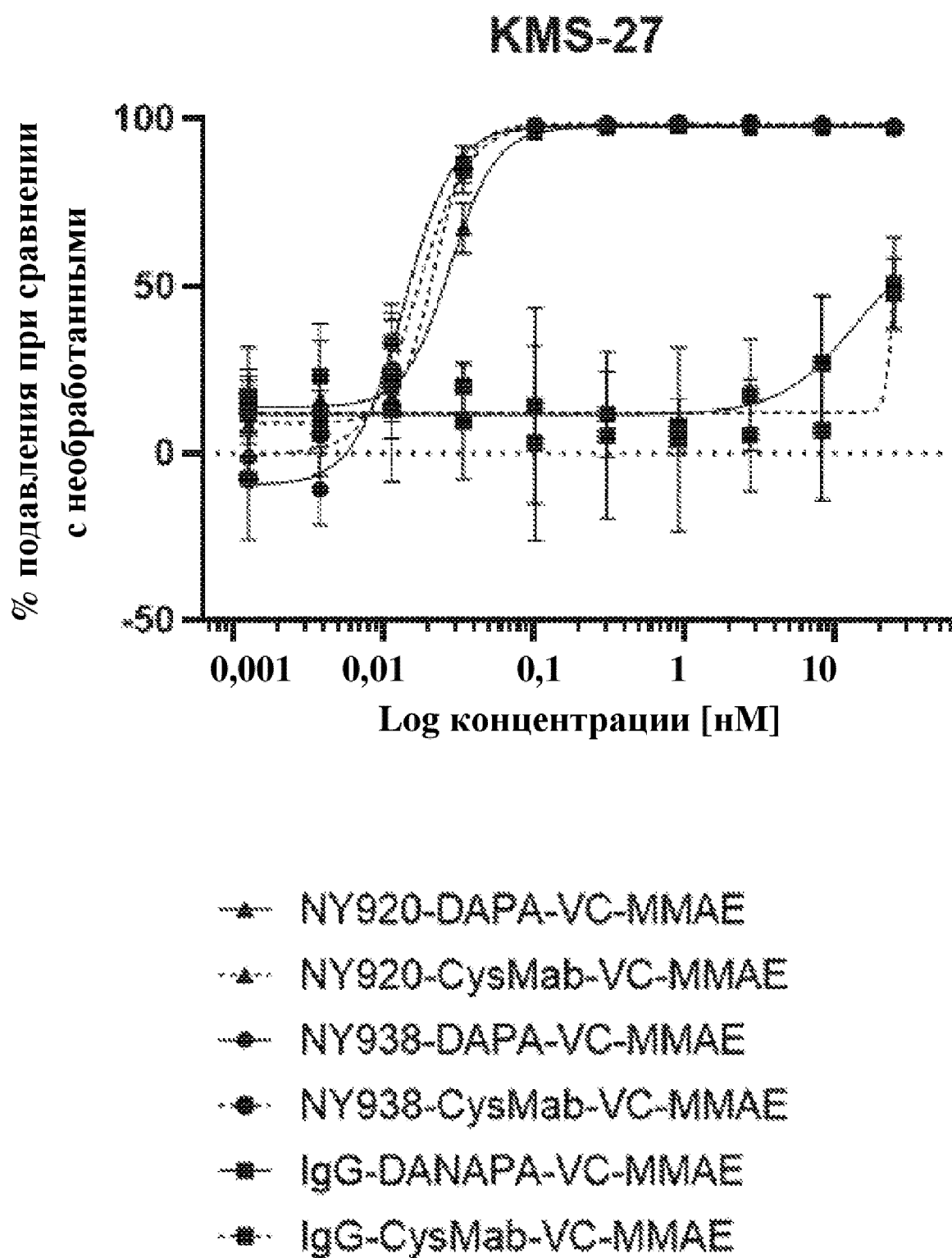


Эксп. № 2: k_a (1/мс) = $4,09E+05$, k_d (1/с) = $3,16E-04$, KD (M) = $7,74E-10$

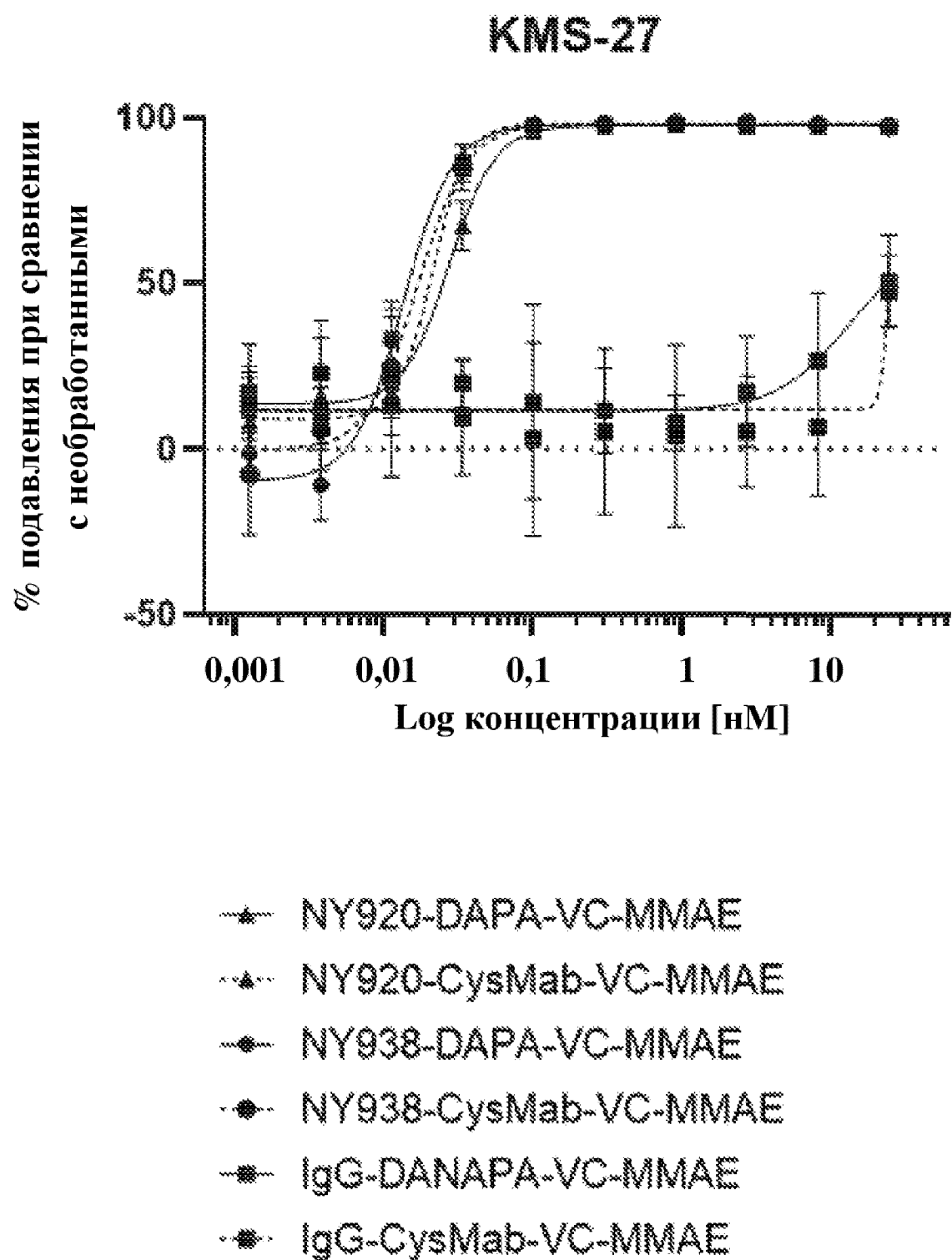
Фигура 8



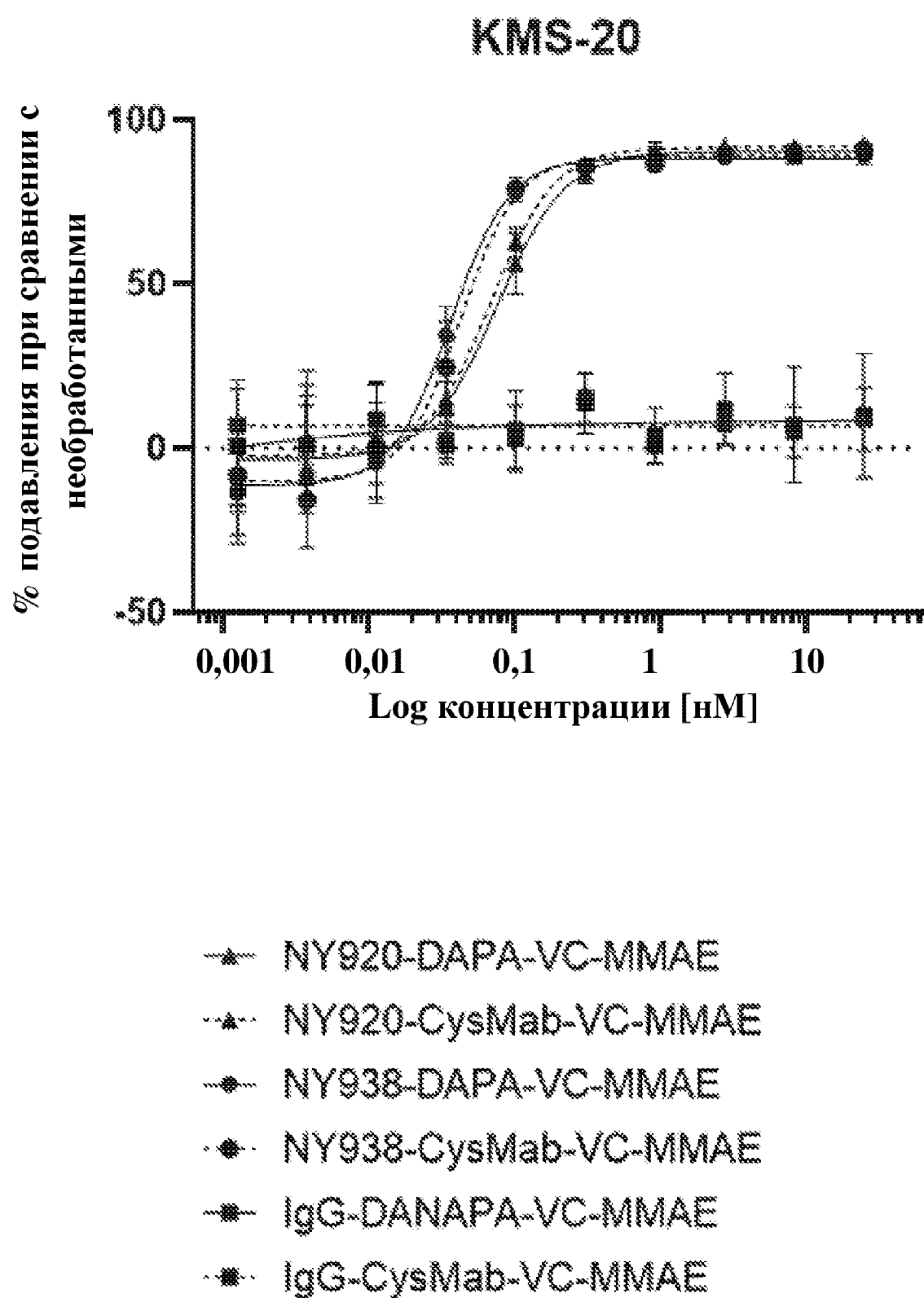
Фигура 9А



Фигура 9В



Фигура 9С



Фигура 9D