

Даний винахід відноситься до способів одержання кон'югатів "мономерний цитотоксичний лікарський засіб/носії" ("кон'югатів") з високим навантаженням лікарським засобом і, в основному, з низьким вмістом низькомолекулярної фракції (LCF). Більш конкретно, даний винахід відноситься до кон'югатів "анти-CD22 антитіло-мономерний каліхеаміцин". Даний винахід також відноситься до вказаних кон'югатів даного винаходу, до способів очищення цих кон'югатів, до фармацевтичних композицій, що містять вказані кон'югати, і до використання цих кон'югатів.

Кон'югати лікарських засобів, розроблені для системної фармакотерапії, являють собою мішень-специфічні цитотоксичні агенти. Вказана фармакотерапія базується на зв'язуванні терапевтичного агента з молекулою-носієм, що володіє специфічністю до визначеної популяції клітин-мішеней. Антитіла з високою афінністю по відношенню до антигенів є природними молекулами, що розпізнають мішень. Завдяки доступності високоафінних моноклональних антитіл використання терапевтичних засобів, що доставляються антитілом, є особливо перспективним. Токсичними речовинами, які були кон'юговані з моноклональними антитілами, є токсини, низькомолекулярні цитотоксичні лікарські засоби, модифікатори біологічних відповідей і радіонукліди. Кон'югати "антитіло-токсин" часто називають імунотоксинами, а імункон'югати, що складаються з антитіл і низькомолекулярних лікарських засобів, таких як метотрексат і адриаміцин, називають хемоімункон'югатами. Імуномодулятори містять модифікатори біологічних відповідей, які, як відомо, володіють регуляторними функціями, такі як лімфокіни, фактори росту і комплемент-активуючий фактор отрути кобри (CVF). Радіоімункон'югати, які складаються з радіоактивних ізотопів, можуть бути використані як терапевтичні засоби для індукування загибелі клітин під дією їх випромінювання, або вони можуть бути використані для візуалізації. Передбачається, що опосередкована антитілом специфічна доставка цитотоксичних лікарських засобів у пухлинні клітини не тільки підвищує їх протипухлинну ефективність, але також і запобігає неспецифічному поглинанню цих лікарських засобів нормальними тканинами, і, тим самим, підвищує їх терапевтичні індекси.

Даний винахід відноситься до імункон'югатів, які включають антитіло як носій, що націлює, і які володіють специфічністю до антигенних детермінантів, що присутні на поверхні злоякісних клітин і кон'юговані з цитотоксичним лікарським засобом. Даний винахід відноситься до кон'югатів "цитотоксичний лікарський засіб - антитіло", де вказане антитіло володіє специфічністю до антигенних детермінантів, присутніх на клітинах, асоційованих зі злоякісними В-клітинними пухлинами, лімфопроліферативними розладами і хронічними запальними захворюваннями. Даний винахід також відноситься до способів продукування імункон'югатів і до їх використання у терапії.

Різні терапевтичні засоби, одержані на основі вказаних антитіл і призначені для лікування різних захворювань, включаючи рак і ревматоїдний артрит, були випробувані для клінічного застосування, або вони знаходяться на стадії клінічних випробувань щодо їх використання як лікарських засобів для лікування злоякісних пухлин, включаючи В-клітинні злоякісні пухлини, такі як неходжкінська лімфома. Одним з таких терапевтичних засобів на основі антитіл є ритуксимаб (Rituxan™), немічене химерне антитіло, яке містить ділянку $\gamma 1$ (+ $m\gamma 1V$ -ділянку) людського антитіла, і яке є специфічним до поверхнево-клітинного антигену CD20, що експресується на В-клітинах. Дані терапевтичні засоби базуються на використанні антитіл і володіють опосередкованою комплементом цитотоксичністю (CDCC) або антитіло-залежною клітинною цитотоксичністю (ADCC), направленою проти В-клітин, або ці терапевтичні засоби базуються на використанні радіонуклідів, таких як ^{131}I або ^{90}Y , і одержання і застосування таких терапевтичних засобів пов'язане з певними проблемами для лікарів-клініцистів і пацієнтів. Тому необхідність в одержанні імункон'югатів, які не мали б недоліків сучасних терапевтичних засобів, одержаних на основі антитіл і використовуваних для лікування різних злоякісних пухлин, включаючи гемопоетичні злоякісні пухлини, такі як неходжкінська лімфома (НХЛ), і які можна було б легко і ефективно продукувати, а також повторно використовувати без індукування імунної відповіді, все ще залишається актуальною.

Імункон'югати, що містять член сімейства ефективних антибактеріальних і протипухлинних агентів, відомих під загальною назвою каліхеаміцини або комплекс LL-E33288 (див. патент США №4970198 (1990)), були розроблені для лікування мієлом. Найбільш ефективним з каліхеаміцинів є агент, позначений $\gamma 1$, який у даному описі буде просто позначатися гамма. Дані сполуки містять метилтрисульфід, який може бути підданий реакції взаємодії з відповідними тіолами з утворенням дисульфідів і з одночасним введенням функціональної групи, такої як гідрозид, або іншої функціональної групи, яка може бути використана для приєднання похідного каліхеаміцину до носія (див. патент США №5053394). Використання кон'югатів "мономерне похідне каліхеаміцину/носії" у сучасній терапії раку різних типів обмежене через недостатню доступність специфічних агентів, що націлюють, (носіїв), а також через недосконалість технологій кон'югування, які, у випадку збільшення кількості похідного каліхеаміцину, кон'югованого з носієм (тобто збільшення навантаження кон'югату лікарським засобом), приводять до утворення білкових агрегатів. Оскільки більш високе навантаження лікарським засобом приводить до збільшення внутрішньої ефективності кон'югату, то бажано, щоб навантаження лікарським засобом було якомога вище, наскільки це дозволяють умови для збереження афінності білка-носія. Присутність агрегованого білка, який може бути неспецифічно токсичним та імунотоксичним, і який, тому, повинен бути видалений при терапевтичному застосуванні, утруднює процес великомасштабного виробництва даних кон'югатів і знижує вихід продуктів. Кількість каліхеаміцину, навантаженого на білок-носії (навантаження лікарським засобом), кількість агрегату, що утворюється внаслідок реакції кон'югування, і вихід одержуваного у результаті очищеного мономерного кон'югату є взаємопов'язаними факторами. Тому компроміс між більш високим навантаженням лікарським засобом і виходом кінцевого мономера може бути досягнутий шляхом вибору відповідної кількості реакційноздатного похідного каліхеаміцину, що додається у реакційну суміш для кон'югування.

Тенденція кон'югатів цитотоксичного лікарського засобу, а зокрема, кон'югатів каліхеаміцину утворювати агрегати, є особливо проблематичною у тому випадку, коли реакцію кон'югування здійснюють з використанням лінкерів, як описано у патентах США №5877296 і 5773001, які у своїй повноті вводяться у даний опис за допомогою посилання. У цьому випадку великий процент кон'югатів, що продукуються, знаходиться в

агрегованій формі, що значно утруднює очищення кон'югатів стандартними способами (СМА-способами) для їх подальшого терапевтичного використання. У випадку деяких білків-носіїв, кон'югати навіть з вельми помірним навантаженням неможливо фактично одержати, за винятком хіба що у лабораторних масштабах. Отже, розробка вдосконалених методів одержання кон'югатів цитотоксичних лікарських засобів, таких як каліхеаміцинів, з носіями, які забезпечували б мінімізацію агрегації, а тому дозволяли б одержувати кон'югати, по можливості, з більшим навантаженням лікарським засобом і у той же час з високим виходом продукту, є вельми необхідною.

Використовувані раніше методи кон'югування для одержання препаратів "мономерне похідне каліхеаміцину/носіїв" з високим навантаженням лікарським засобом/високим виходом і низьким ступенем агрегації були описані у літературі (див. патенти США №5712374 і США №5714586, які у всій своїй повноті вводяться у даний опис за допомогою посилання). І хоча ці способи дозволяють одержувати кон'юговані препарати зі значно зниженим вмістом агрегатів, однак, пізніше було виявлено, що дані способи дають можливість одержувати кон'югати, що мають неприйнятно високі рівні (45-65% ВЕРХ, % площі) низькокон'югованої фракції (LCF), тобто фракції, що складається, в основному, з некон'югованого антитіла. Присутність LCF у даному продукті означає неефективне використання антитіла, оскільки воно не містить цитотоксичного лікарського засобу. Це антитіло може також конкурувати з кон'югатом "каліхеаміцин-носіїв" за зв'язування з мішенню і, тим самим, потенційно знижувати ступінь доступності цієї мішені, що приводить до зниження ефективності цитотоксичного лікарського засобу. Тому, бажано розробити вдосконалений спосіб кон'югування, який забезпечував би значне зниження рівнів LCF і давав би прийнятні мінімальні рівні агрегації, але, при цьому, не впливав би значним чином на фізичні властивості вказаного кон'югату.

Даний винахід відноситься до способів одержання кон'югатів "похідне мономерного цитотоксичного лікарського засобу/носіїв" ("кон'югатів") з високим навантаженням лікарським засобом і, в основному, з низьким вмістом низькокон'югованої фракції (LCF). Зокрема, даний винахід відноситься до одержання кон'югатів "мономерне похідне каліхеаміцину/носіїв", до вказаних кон'югатів, до композицій, до способу очищення таких кон'югатів і до використання цих кон'югатів. Більш конкретно, даний винахід відноситься до способів одержання кон'югату "мономерне похідне каліхеаміцину - анти-CD22 антитіло" (СМС-544).

В одному з варіантів свого здійснення даний винахід відноситься до вдосконаленого способу одержання кон'югатів, що забезпечує значне зниження рівнів LCF (нижче 10%) але, при цьому, не здійснює значного впливу на фізичні або хімічні властивості вказаного кон'югату. Даний винахід також відноситься до додатково вдосконаленого способу кон'югування, який, у порівнянні з вже описаними способами, дозволяє не тільки значно знизити рівні LCF, а також значно знизити ступінь агрегації у порівнянні з раніше описаними способами, і значно збільшити навантаження кон'югату лікарським засобом. Кон'югати даного винаходу мають формулу:

$Pr(-X-W)_m$,

де:

Pr являє собою білковий носій;

X являє собою лінкер, що включає продукт реакції будь-якої реакційноздатної групи, яка може взаємодіяти з білковим носієм;

W являє собою цитотоксичний лікарський засіб;

m означає середнє навантаження для продукту очищеного кон'югату, таке, при якому вказаний цитотоксичний лікарський засіб складає 7-9% за масою кон'югату; і

$(-X-W)_m$ являє собою похідне цитотоксичного лікарського засобу.

В одному з варіантів кон'югати даного винаходу одержують способом даного винаходу, що включає стадії: (1) додавання похідного цитотоксичного лікарського засобу до білкового носія, де вказане похідне цитотоксичного лікарського засобу складає 4,5-11% за масою білкового носія; (2) інкубування цитотоксичного лікарського засобу і білкового носія у нуклеофільному і сумісному з білком буферному розчині, що має рН у межах приблизно від 7 до 9, з продукуванням кон'югату "мономерний цитотоксичний лікарський засіб/носіїв", де вказаний розчин, крім того, містить (а) органічний співрозчинник і (b) домішку, що містить, принаймні, одну C_6-C_{18} -карбонову кислоту або її сіль, і де вказане інкубування здійснюють при температурі у межах приблизно від 30°C до 35°C протягом періоду часу приблизно від 15 хвилин до 24 годин; і (3) хроматографії кон'югату, одержаного на стадії (2), для відділення кон'югатів "похідне мономерного цитотоксичного лікарського засобу/білковий носій", що мають навантаження цитотоксичним лікарським засобом, яке складає у межах 4-10мас.%, і вміст низькокон'югованої фракції (LCF), який складає менше 10 процентів від некон'югованого білкового носія, похідного цитотоксичного лікарського засобу і агрегованих кон'югатів.

В одному з варіантів здійснення винаходу білковий носій вказаного кон'югату вибраний з групи, що складається з гормонів, факторів росту, антитіл, фрагментів антитіл, міметиків антитіл, і їх генетично або ферментативно сконструйованих аналогів.

В одному з варіантів здійснення винаходу вказаним білковим носієм є антитіло. У переважному варіанті здійснення винаходу вказане антитіло вибране з групи, що складається з моноклонального антитіла, химерного антитіла, людського антитіла, гуманізованого антитіла, одноланцюгового антитіла, Fab-фрагмента і $F(ab)_2$ -фрагмента.

В іншому варіанті здійснення винаходу вказане гуманізоване антитіло направлене проти антигену клітинної поверхні CD22.

У переважному варіанті здійснення винаходу вказаним гуманізованим анти-CD22 антитілом є CDR-прищеплене антитіло, яке включає варіабельну ділянку легкого ланцюга 5/44-gL1 (SEQ ID NO:19) і варіабельну ділянку важкого ланцюга 5/44-gH7 (SEQ ID NO:27).

В іншому переважному варіанті здійснення винаходу вказаним гуманізованим анти-CD22 антитілом є CDR-прищеплене антитіло, яке містить легкий ланцюг, що має послідовність, наведену у SEQ ID NO:28.

У ще одному переважному варіанті здійснення винаходу вказаним гуманізованим анти-CD22 антитілом є CDR-прищеплене антитіло, яке містить важкий ланцюг, що має послідовність, наведену у SEQ ID NO:30.

В іншому переважному варіанті здійснення винаходу вказаним гуманізованим анти-CD22 антитілом є

CDR-прищеплене антитіло, яке містить легкий ланцюг, що має послідовність, наведену у SEQ ID NO:28, і важкий ланцюг, що має послідовність, наведену у SEQ ID NO:30.

В іншому варіанті здійснення винаходу вказаним гуманізованим анти-CD22 антитілом є CDR-прищеплене антитіло, яке являє собою варіант антитіла, одержаний відповідно до протоколу здійснення афінного дозрівання і який володіє підвищеною специфічністю до людського CD22.

В іншому своєму аспекті цитотоксичний лікарський засіб, що використовується для генерування кон'югату "мономерний цитотоксичний лікарський засіб/носіє" даного винаходу, являє собою інгібітор полімеризації тубуліну, алкілувальний агент, який зв'язується з ДНК і руйнує її, інгібітор синтезу білка або інгібітор тирозинкінази.

В одному з варіантів здійснення винаходу вказаний цитотоксичний лікарський засіб вибраний з каліхеаміцинів, тіотепі, таксанів, вінкрестину, даунорубіцину, доксорубіцину, епірубіцину, еспераміцинів, актиноміцину, аутраміцину, азасеринів, блеоміцинів, тамоксифену, ідарубіцину, доластатинів/ауристатинів, геміастерлінів та маїтанзиноїдів.

У переважному варіанті здійснення винаходу вказаним цитотоксичним лікарським засобом є каліхеаміцин. В особливо переважному варіанті здійснення винаходу вказаним каліхеаміцином є гамма-каліхеаміцин або похідне N-ацетил-гамма-каліхеаміцину.

У ще одному аспекті даного винаходу вказаний цитотоксичний лікарський засіб має функціональну 3-меркапто-3-метилбутаноїлгідрозидну групу і кон'югований з білковим носієм за допомогою лінкера, що гідролізують, здатного вивільняти цитотоксичний лікарський засіб з вказаного кон'югату після його зв'язування і проникнення у клітини-мішені.

У переважному варіанті даного аспекту вказаним лінкером, що гідролізують, є 4-(4-ацетилфенокси)бутанова кислота (AcBut).

У ще одному аспекті даного винаходу у процесі кон'югування використовується октанова кислота або її сіль, або деканова кислота або її сіль як домішка для зниження ступеня агрегації і збільшення навантаження лікарським засобом.

У ще одному аспекті даного винаходу кон'югати даного винаходу очищають методом хроматографічного розподілу.

В одному з варіантів здійснення винаходу вказаним методом хроматографічного розподілу, що використовується для розподілу кон'югату "похідне мономерного лікарського засобу - носій", є ексклюзійна хроматографія (SEC).

В іншому варіанті здійснення винаходу методом хроматографічного розподілу, що використовується для розподілу кон'югату "похідне мономерного лікарського засобу - носій", є ВЕРХ, РЕХБ або хроматографія на Сефакрилі S-200.

У переважному варіанті здійснення винаходу методом хроматографічного розподілу, що використовується для розподілу кон'югату "похідне мономерного лікарського засобу - носій", є гідрофобна хроматографія (ГФХ). В особливо переважному варіанті здійснення винаходу ГФХ здійснюють з використанням як хроматографічного середовища фенілсефарози 6 Fast Flow, бутілсефарози 4 Fast Flow, октилсефарози 4 Fast Flow, Toyopearl Ether-650M, метилового ГФХ-середовища Macro-Prep або трет-бутилового ГФХ-середовища Macro-Prep. У більш переважному варіанті здійснення винаходу ГФХ здійснюють з використанням як хроматографічного середовища бутілсефарози 4 Fast Flow.

В іншому своєму аспекті даний винахід відноситься до кон'югату "похідне мономерного цитотоксичного лікарського засобу/носіє", одержаного способом даного винаходу. У переважному варіанті цього аспекту використовуваним цитотоксичним лікарським засобом є каліхеаміцин, а використовуваним носієм є антитіло.

В іншому переважному варіанті здійснення винаходу вказане антитіло вибране з групи, що складається з моноклонального антитіла, химерного антитіла, людського антитіла, гуманізованого антитіла, одноланцюгового антитіла, Fab-фрагмента і F(ab)₂-фрагмента. У більш переважному аспекті винаходу використовується гуманізоване антитіло, направлене проти антигену клітинної поверхні CD22.

В одному з варіантів здійснення винаходу вказаним гуманізованим анти-CD22 антитілом є CDR-прищеплене антитіло, яке включає варіабельну ділянку легкого ланцюга 5/44-gL1 (SEQ ID NO:19) і варіабельну ділянку важкого ланцюга 5/44-gH7 (SEQ ID NO:27).

В іншому варіанті здійснення винаходу вказаним гуманізованим анти-CD22 антитілом є CDR-прищеплене антитіло, що містить легкий ланцюг, який має послідовність, наведену у SEQ ID NO:28.

У переважному варіанті здійснення винаходу вказаним гуманізованим анти-CD22 антитілом є CDR-прищеплене антитіло, що містить важкий ланцюг, який має послідовність, наведену у SEQ ID NO:30.

В іншому переважному варіанті здійснення винаходу вказаним гуманізованим анти-CD22 антитілом є CDR-прищеплене антитіло, що містить легкий ланцюг, який має послідовність, наведену у SEQ ID NO:28, і важкий ланцюг, який має послідовність, наведену у SEQ ID NO:30.

У ще одному варіанті здійснення винаходу вказаним гуманізованим анти-CD22 антитілом є CDR-прищеплене антитіло, яке являє собою варіант антитіла, одержаний відповідно до протоколу здійснення афінного дозрівання і який володіє підвищеною специфічністю до людського CD22.

У переважному варіанті здійснення винаходу вказаним каліхеаміцином є гамма-каліхеаміцин або N-ацетил-гамма-каліхеаміцин.

В одному з варіантів здійснення винаходу вказане похідне каліхеаміцину має функціональну 3-меркапто-3-метилбутаноїлгідрозидну групу.

В іншому варіанті здійснення винаходу лінкером, що використовується для кон'югування вказаного лікарського засобу з вказаним носієм, є лінкер, що гідролізують, здатний вивільняти цитотоксичний лікарський засіб з кон'югату після його зв'язування і проникнення у клітини-мішені. У переважному варіанті здійснення винаходу вказаним лінкером, що гідролізують, є 4-(4-ацетилфенокси)бутанова кислота (AcBut).

В іншому своєму аспекті даний винахід відноситься до кон'югату "похідне мономерного каліхеаміцину/анти-CD22 антитіло", що має формулу: Pr-(X-S-S-W)_m, де: Pr являє собою анти-CD22 антитіло;

X являє собою лінкер, що гідролізують, який включає продукт реакції будь-якої реакційноздатної групи, яка може взаємодіяти з антитілом; W являє собою радикал каліхеаміцину; m означає середнє навантаження для очищеного продукту кон'югування, таке, при якому вказаний каліхеаміцин складає 4-10% за масою кон'югату; а (-X-S-S-W)_m являє собою похідне каліхеаміцину, одержане способом даного винаходу.

В одному з варіантів цього аспекту вказане антитіло вибрано з групи, що складається з моноклонального антитіла, химерного антитіла, людського антитіла, гуманізованого антитіла, одноланцюгового антитіла, Fab-фрагмента і F(ab)₂-фрагмента.

У переважному варіанті здійснення винаходу вказаним антитілом є анти-CD22 антитіло, яке володіє специфічністю до людського CD22 і включає важкий ланцюг, де варіабельний домен містить CDR, що має, принаймні, одну з послідовностей, наведених на Фіг.1 і позначених H1 (SEQ ID NO:1) для CDR-H1, H2 (SEQ ID NO:2), H2' (SEQ ID NO:13), H2" (SEQ ID NO:15) або H2''' (SEQ ID NO:16) для CDR-H2; або H3 (SEQ ID NO:3) для CDR-H3; і легкий ланцюг, де варіабельний домен містить CDR, що має, принаймні, одну з послідовностей, наведених на Фіг.1 і позначених L1 (SEQ ID NO:4) для CDR-L1, L2 (SEQ ID NO:5) для CDR-L2 або L3 (SEQ ID NO:6) для CDR-L3.

В іншому переважному варіанті здійснення винаходу анти-CD22 антитіло включає важкий ланцюг, де варіабельний домен містить CDR, що має, принаймні, одну з послідовностей, наведених у SEQ ID NO:1 для CDR-H1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15 або SEQ ID NO:16 для CDR-H2, або SEQ ID NO:3 для CDR-H3, і легкий ланцюг, де варіабельний домен містить CDR, що має, принаймні, одну з послідовностей, наведених у SEQ ID NO:4 для CDR-L1, SEQ ID NO:5 для CDR-L2 або SEQ ID NO:6 для CDR-L3.

У ще одному переважному варіанті здійснення винаходу анти-CD22 антитіло містить SEQ ID NO:1 для CDR-H1; SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15 або SEQ ID NO:16 для CDR-H2; SEQ ID NO:3 для CDR-H3; SEQ ID NO:4 для CDR-L1; SEQ ID NO:5 для CDR-L2; або SEQ ID NO:6 для CDR-L3.

В іншому варіанті здійснення винаходу гуманізованим анти-CD22 антитілом є CDR-прищеплене анти-CD22 антитіло, яке містить варіабельний домен, що включає людські акцепторні каркасні ділянки і не людські донорні CDR.

В іншому варіанті здійснення винаходу гуманізоване анти-CD22 антитіло має людську акцепторну каркасну ділянку, де ділянки варіабельного домену важкого ланцюга вказаного антитіла базуються на людській консенсусній послідовності підгрупи I і включають не людські донорні залишки у положеннях 1, 28, 48, 71 і 93. В іншому варіанті здійснення винаходу вказане гуманізоване антитіло, крім того, включає не людські донорні залишки у положеннях 67 і 69.

В одному з переважних варіантів здійснення винаходу CDR-прищеплене гуманізоване антитіло містить варіабельний домен легкого ланцюга, що включає людську акцепторну каркасну ділянку, яка базується на людській консенсусній послідовності підгрупи I, і крім того, включає не людські донорні залишки у положеннях 2, 4, 37, 38, 45 і 60. В іншому варіанті здійснення винаходу, вказане CDR-прищеплене антитіло, крім того, включає не людський донорний залишок у положенні 3.

В іншому варіанті здійснення винаходу CDR-прищеплене антитіло включає варіабельну ділянку легкого ланцюга 5/44-gL1 (SEQ ID NO:19) і варіабельну ділянку важкого ланцюга 5/44-gH7 (SEQ ID NO:27).

В іншому варіанті здійснення винаходу вказане CDR-прищеплене антитіло включає легкий ланцюг, що має послідовність, наведену у SEQ ID NO:28, і важкий ланцюг, що має послідовність, наведену у SEQ ID NO:30.

В іншому переважному варіанті здійснення винаходу вказане CDR-прищеплене антитіло містить легкий ланцюг, що має послідовність, наведену у SEQ ID NO:28, і важкий ланцюг, що має послідовність, наведену у SEQ ID NO:30.

У ще одному варіанті здійснення винаходу вказаним CDR-прищепленим анти-CD22 антитілом є варіант антитіла, одержаний відповідно до протоколу здійснення афінного дозрівання і який володіє підвищеною специфічністю до людського CD22.

В іншому варіанті здійснення винаходу вказаним анти-CD22 антитілом є химерне антитіло, що містить послідовності варіабельних доменів легкого і важкого ланцюгів моноклонального антитіла, наведені у SEQ ID NO:7 і SEQ ID NO:8, відповідно.

У ще одному варіанті здійснення винаходу вказане анти-CD22 антитіло містить гібридну CDR зі зрізаною донорною послідовністю CDR, де на місці відсутньої частини донорної CDR знаходиться інша послідовність, що замінює її, внаслідок чого утворює функціональна CDR.

В особливо переважному варіанті здійснення винаходу вказаним похідним цитотоксичного лікарського засобу є або гамма-каліхеаміцин, або похідне N-ацетил-гамма-каліхеаміцин.

В іншому своєму аспекті даний винахід відноситься до способу одержання стабільної ліофілізованої композиції кон'югату "похідне мономерного цитотоксичного лікарського засобу/носії". У переважному варіанті здійснення винаходу стабільну ліофілізовану композицію кон'югату "похідне мономерного цитотоксичного лікарського засобу/носії" одержують шляхом (а) розчинення вказаного кон'югату "похідне мономерного цитотоксичного лікарського засобу/носії" до кінцевої концентрації 0,5-2мг/мл у розчині, що містить криозахисний агент у концентрації 1,5%-5мас.%, полімерний наповнювач у концентрації 0,5-1,5мас.%, електроліти у концентрації 0,01М-0,1М, агент, що сприяє розчиненню, у концентрації 0,005-0,05мас.%, агент, що забуферює, у концентрації 5-50мМ, необхідний для доведення кінцевого рН розчину до 7,8-8,2, і воду; (b) розподілу згаданого вище розчину по посудинах при температурі від +5°C до +10°C; (c) заморожування вказаного розчину при температурі заморожування від -35°C до -50°C; (d) проведення попередньої стадії ліофілізації замороженого розчину для його первинного сушіння під тиском 20-80 мікропаскаль і при температурі зберігання від -10°C до -40°C протягом 24-78 годин; і (e) проведення повторного сушіння ліофілізованого продукту стадії (d) під тиском 20-80 мікропаскаль і при температурі зберігання від +10°C до +35°C протягом 15-30 годин.

В одному з варіантів здійснення винаходу, криозахисний агент, що використовується для ліофілізації кон'югату "цитотоксичний лікарський засіб/носії", вибраний з альдиту, маніту, сорбіту, інозиту, поліетиленгліколю, альдонової кислоти, уронової кислоти, альдарової кислоти, альдоз, кетоз, аміноцукрів,

альдитів, інозитів, гліцеральдегідів, арабінози, ліксози, пентози, рибози, ксилози, галактози, глюкози, гексози, ідози, манози, талози, гептози, глюकोзи, фруктози, глюконової кислоти, сорбіту, лактози, маніту, метил- α -глюкопіранозиду, мальтози, ізоаскорбінової кислоти, аскорбінової кислоти, лактону, сорбози, глюкарової кислоти, еритрози, треози, арабінози, алози, альтрози, гулози, ідози, талози, еритролози, рибулози, ксилулози, психози, тагатози, глюкуронової кислоти, глюконової кислоти, глюкарової кислоти, галактуронової кислоти, мануронової кислоти, глюкозаміну, галактозаміну, сахарози, трегалози, нейрамінової кислоти, арабанів, фруктанів, фуканів, галактанів, галактуронанів, глюканів, мананів, ксиланів, левану, фукоідану, карагенану, галактокарлози, пектинів, пектинових кислот, амілози, пулулану, глікогену, амілопектину, целюлози, декстрану, пустилану, хітину, агарози, кератину, хондротину, дерматану, гіалуронової кислоти, альгінової кислоти, ксантанової камеді, крохмалю, сахарози, глюкози, лактози, трегалози, етиленгліколю, поліетиленгліколю, поліпропіленгліколю, гліцерину і пентаеритриолу.

У переважному варіанті здійснення винаходу вказаним криозахисним агентом є сахароза, яка присутня у концентрації 1,5мас. %.

В одному з варіантів здійснення винаходу вказаний полімерний наповнювач, що використовується у процесі ліофілізації, вибраний з декстрану 40 або гідроксіетильованого крохмалю 40, і присутній у концентрації 0,9мас. %.

В іншому варіанті здійснення винаходу електролітом, що використовується у розчині для ліофілізації, є хлорид натрію, який присутній у концентрації 0,05М.

У переважному варіанті здійснення винаходу у процесі ліофілізації використовується агент, що підвищує розчинність. Вказаним агентом, що підвищує розчинність, переважно, є поверхнево-активна речовина. В особливо переважному варіанті здійснення винаходу вказаною поверхнево-активною речовиною є полісорбат 80, який присутній у концентрації 0,01мас. %.

В одному з варіантів здійснення винаходу використовуваним агентом, що забуферює, є трометамін, який присутній у концентрації 0,02М. При цьому, переважно, щоб на початку ліофілізації рН розчину складав 8,0. Розчин, що містить кон'югат "цитотоксичний лікарський засіб/носії", розподіляють по посудинах при температурі +5°C до початку ліофілізації.

У переважному варіанті здійснення винаходу розчин у посудинах заморожують при температурі -45°C; потім проводять попередню стадію ліофілізації для первинного сушіння замороженого розчину під тиском 60 мікропаскаль і при температурі зберігання -30°C протягом 60 годин; після цього проводять другу стадію сушіння ліофілізованого продукту під тиском 60 мікропаскаль і при температурі зберігання +25°C протягом 24 годин.

В іншому своєму аспекті даний винахід відноситься до композиції, що містить терапевтично ефективну дозу кон'югату "похідне мономерного цитотоксичного лікарського засобу/носії", одержаного способом даного винаходу.

В одному з варіантів здійснення винаходу вказаним носієм у кон'югаті "похідне мономерного цитотоксичного лікарського засобу/носії" є білковий носій, вибраний з гормонів, факторів росту, антитіл і міметиків антитіл.

У переважному варіанті здійснення винаходу вказаним білковим носієм є людське моноклональне антитіло, химерне антитіло, людське антитіло або гуманізоване антитіло.

У переважному варіанті здійснення винаходу вказане гуманізоване антитіло направлене проти антигену клітинної поверхні CD22.

В особливо переважному варіанті цього аспекту винаходу вказане анти-CD22 антитіло володіє специфічністю до людського CD22 і включає важкий ланцюг, де варіабельний домен містить ділянку CDR, що має, принаймні, одну з послідовностей, наведених на Фіг.1 і позначених H1 (SEQ ID NO:1) для CDR-H1, H2 (SEQ ID NO:2), H2' (SEQ ID NO:13), H2" (SEQ ID NO:15) або H2''' (SEQ ID NO:16) для CDR-H2, або H3 (SEQ ID NO:3) для CDR-H3; і легкий ланцюг, де варіабельний домен містить CDR, що має, принаймні, одну з послідовностей, наведених на Фіг.1 і позначених L1 (SEQ ID NO:4) для CDR-L1, L2 (SEQ ID NO:5) для CDR-L2 або L3 (SEQ ID NO:6) для CDR-L3.

В іншому переважному варіанті винаходу анти-CD22 антитіло включає важкий ланцюг, де варіабельний домен містить CDR, що має, принаймні, одну з послідовностей, наведених у SEQ ID NO:1 для CDR-H1; SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15 або SEQ ID NO:16 для CDR-H2; або SEQ ID NO:3 для CDR-H3, і легкий ланцюг, де варіабельний домен містить CDR, що має, принаймні, одну з послідовностей, наведених у SEQ ID NO:4 для CDR-L1, SEQ ID NO:5 для CDR-L2 або SEQ ID NO:6 для CDR-L3.

У ще одному переважному варіанті винаходу анти-CD22 антитіло містить SEQ ID NO:1 для CDR-H1; SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:15 або SEQ ID NO:16 для CDR-H2; SEQ ID NO:3 для CDR-H3; SEQ ID NO:4 для CDR-L1; SEQ ID NO:5 для CDR-L2; SEQ ID NO:6 для CDR-L3.

В особливо переважному варіанті винаходу вказаним гуманізованим анти-CD22 антитілом є CDR-прищеплене гуманізоване анти-CD22 антитіло, яке включає варіабельну ділянку легкого ланцюга 5/44-gL1 (SEQ ID NO:19) і варіабельну ділянку важкого ланцюга 5/44-gH7 (SEQ ID NO:27).

В іншому особливо переважному варіанті винаходу вказаним гуманізованим анти-CD22 антитілом є CDR-прищеплене антитіло, яке володіє специфічністю до людського CD22 і містить легкий ланцюг, що має послідовність, наведену у SEQ ID NO:28, і важкий ланцюг, що має послідовність, наведену у SEQ ID NO:30.

В одному з варіантів здійснення винаходу вказаним CDR-прищепленим антитілом є варіант антитіла, що володіє підвищеною специфічністю до людського CD22 і одержаний відповідно до протоколу здійснення афінного дозрівання.

В одному з варіантів здійснення винаходу вказаним мономерним цитотоксичним лікарським засобом є каліхеаміцин, переважно вибраний з гамма-каліхеаміцину або N-ацетил-каліхеаміцину.

В одному з варіантів здійснення винаходу вказана композиція може, але необов'язково, містити додатковий біологічно активний агент. Таким біологічно активним агентом може бути цитотоксичний лікарський засіб, фактор росту або гормон.

У ще одному своєму аспекті даний винахід відноситься до способу лікування індивідуума з проліферативним розладом, що передбачає введення такому індивідууму терапевтично ефективної дози композиції даного винаходу. Вказана композиція може бути введена підшкірно, внутрішньочеревинно, внутрішньовенно, внутрішньоартеріально, інтрамедулярно, інтратекально, трансдермально, черезшкірно, інтраназально, місцево, внутрішньошлунково, інтравагінально, під'язиково або ректально. У переважному варіанті винаходу композицію даного винаходу вводять внутрішньовенно.

В одному з варіантів здійснення винаходу вказану композицію вводять індивідууму, який страждає проліферативним розладом, таким як рак. У переважному варіанті здійснення винаходу вказаним раковим захворюванням є злоякісна В-клітинна пухлина. Вказаною злоякісною В-клітинною пухлиною може бути лейкоз або лімфома, що експресує антиген клітинної поверхні CD22.

У ще одному варіанті винаходу вказаним раковим захворюванням є карцинома або саркома.

В іншому своєму аспекті даний винахід відноситься до способу лікування В-клітинної злоякісної пухлини, що передбачає введення пацієнту з вказаною злоякісною пухлиною терапевтично ефективної композиції, що містить кон'югат "цитотоксичний лікарський засіб - анти-CD22 антитіло" даного винаходу. У переважному варіанті здійснення винаходу, вказаною В-клітинною злоякісною пухлиною є лімфома, а зокрема, неходжкінська лімфома.

В одному з варіантів здійснення винаходу вказаний цитотоксичний лікарський засіб, що використовується для одержання кон'югатів даного винаходу, вибраний з групи, що складається з каліхеаміцинів, тіотепі, таксанів, вінкристину, даунорубіцину, доксорубіцину, епірубіцину, актиноміцину, аутраміцину, азасеринів, блеоміцинів, тамоксифену, ідарубіцину, доластатинів/ауристатинів, геміастерлінів, маїтанзиноїдів і еспераміцинів.

У переважному варіанті здійснення винаходу вказаним цитотоксичним лікарським засобом є гамма-каліхеаміцин або N-ацетил-каліхеаміцин.

В іншому варіанті винаходу вказане лікування передбачає введення кон'югату цитотоксичного лікарського засобу даного винаходу у комбінації з одним або декількома біологічно активними агентами, вибраними з антитіл, факторів росту, гормонів, цитокінів, антигормонів, ксантинів, інтерлейкінів, інтерферонів і цитотоксичних лікарських засобів.

У переважному варіанті винаходу вказаним біологічно активним агентом є антитіло, направлене проти антигену клітинної поверхні, що експресується на В-клітинних злоякісних пухлинах. В іншому переважному варіанті винаходу вказане антитіло, направлене проти антигенів клітинної поверхні, що експресуються на В-клітинних злоякісних пухлинах, вибране з групи, що складається з анти-CD19, анти-CD20 і анти-CD33 антитіл. Такі антитіла включають анти-CD20 антитіло, ритуксимаб (Rituxan™).

В іншому варіанті винаходу вказаними біологічно активними агентами є цитокіни або фактори росту, які включають, але не обмежуються ними, інтерлейкін 2 (IL-2), TNF, CSF, GM-CSF і G-CSF.

В іншому варіанті винаходу вказаними біологічно активними агентами є гормони, а саме, естрогени, андрогени, прогестини і кортикостероїди.

У ще одному варіанті здійснення винаходу вказаним біологічно активним агентом є цитотоксичний лікарський засіб, вибраний з доксорубіцину, даунорубіцину, ідарубіцину, акларубіцину, зорубіцину, мітоксантрону, епірубіцину, карубіцину, ноґаламіцину, меногарилу, пітарубіцину, валрубіцину, цитарабіну, гемцитабіну, трифлуридину, анцитабіну, еноцитабіну, азацитидину, доксифлуридину, пентостатину, бруксуридину, капецитабіну, кладрибіну, децитабіну, флоксуридину, флударабіну, гугеротину, пуроміцину, тегафуру, тіазофуру, адриаміцину, цисплатину, карбоплатину, циклофосфаміду, дакарбазину, вінбластину, вінкристину, мітоксантрону, блеоміцину, мехлоретаміну, преднізону, прокарбазину, метотрексату, фторурацилів, етопозиду, таксолу, аналогів таксолу і мітоміцину.

У переважному варіанті здійснення винаходу терапевтично ефективну композицію кон'югату "цитотоксичний лікарський засіб - анти-CD22 антитіло" вводять разом з однією або декількома комбінаціями цитотоксичних агентів, що використовуються як складова частина курсу лікування, де вказану комбінацію цитотоксичних агентів вибирають з: CHOPP (циклофосфамід, доксорубіцин, вінкристин, преднізон і прокарбазин); CHOP (циклофосфамід, доксорубіцин, вінкристин і преднізон); COP (циклофосфамід, вінкристин і преднізон); CAP-BOP (циклофосфамід, доксорубіцин, прокарбазин, блеоміцин, вінкристин і преднізон); m-BACOD (метотрексат, блеоміцин, доксорубіцин, циклофосфамід, вінкристин, дексаметазон і лейковорин); ProMACE-MOPP (преднізон, метотрексат, доксорубіцин, циклофосфамід, етопозид, лейковорин, мехлоретамін, вінкристин, преднізон і прокарбазин); ProMACE-CytaBOM (преднізон, метотрексат, доксорубіцин, циклофосфамід, етопозид, лейковорин, цитарабін, блеоміцин і вінкристин); MACOP-B (метотрексат, доксорубіцин, циклофосфамід, вінкристин, преднізон, блеоміцин і лейковорин); MOPP (мехлоретамін, вінкристин, преднізон і прокарбазин); ABVD (адриаміцин/доксорубіцин, блеоміцин, вінбластин і дакарбазин); MOPP (мехлоретамін, вінкристин, преднізон і прокарбазин), що вводиться почергово з ABV (адриаміцин/доксорубіцин, блеоміцин і вінбластин); MOPP (мехлоретамін, вінкристин, преднізон і прокарбазин), що вводиться почергово з ABVD (адриаміцин/доксорубіцин, блеоміцин, вінбластин і дакарбазин); Ch1VPP (хлорамбуцил, вінбластин, прокарбазин і преднізон); IMVP-16 (іфосфамід, метотрексат і етопозид); MIME (метил-гад, іфосфамід, метотрексат і етопозид); DHAP (дексаметазон, висока доза цитарабіну і цисплатин); ESHAP (етопозид, метилпреднізолон, висока доза цитарабіну і цисплатин); CEPP(B) (циклофосфамід, етопозид, прокарбазин, преднізон і блеоміцин); CAMP (ломустин, мітоксантрон, цитарабін і преднізон) і CVP-1 (циклофосфамід, вінкристин і преднізон).

У переважному варіанті здійснення винаходу терапевтично ефективну композицію кон'югату "цитотоксичний лікарський засіб - анти-CD22 антитіло" вводять перед введенням однієї або декількох згаданих вище комбінацій цитотоксичних лікарських засобів. В іншому переважному варіанті здійснення винаходу терапевтично ефективну композицію кон'югату "цитотоксичний лікарський засіб - анти-CD22 антитіло" вводять після введення однієї або декількох згаданих вище комбінацій цитотоксичних лікарських засобів, що використовуються як складова частина курсу лікування.

В іншому своєму аспекті даний винахід відноситься до способу лікування агресивних лімфом, що передбачає введення пацієнту, який потребує такого лікування, терапевтично ефективної композиції кон'югату "похідне мономерного каліхеаміцину-анти-CD22 антитіло" разом з одним або декількома біологічно активними агентами.

У ще одному своєму аспекті даний винахід відноситься до використання композиції даного винаходу для лікування індивідуума з проліферативним розладом, таким як рак. Зокрема, вказаним раком є В-клітинна злоякісна пухлина, що експресує антиген CD22 на клітинній поверхні. Зокрема, такою злоякісною В-клітинною пухлиною є лейкоз або лімфома. В одному з варіантів здійснення винаходу вказаним раком є карцинома або лейкоз.

В одному з варіантів здійснення винаходу терапевтично ефективну дозу вказаної композиції вводять підшкірно, внутрішньочеревинно, внутрішньовенно, внутрішньоартеріально, інтрамедулярно, інтратекально, трансдермально, черезшкірно, інтраназально, місцево, внутрішньошлунково, інтравагінально, під'язиково або ректально.

У переважному варіанті винаходу терапевтично ефективну дозу вказаної фармацевтичної композиції даного- винаходу вводять внутрішньовенно.

В іншому своєму аспекті даний винахід відноситься до використання кон'югату "похідне мономерного каліхеаміцину/анти-CD22 антитіло" даного винаходу для лікування індивідуума з В-клітинною злоякісною пухлиною, такою як неходжкінська лімфома. В одному з варіантів винаходу вказаний кон'югат "похідне мономерного каліхеаміцину/анти-CD22 антитіло" даного винаходу вводять разом з одним або декількома біологічно активними агентами.

В одному з варіантів винаходу вказані біологічно активні агенти вибрані з групи, що складається з антитіл, факторів росту, гормонів, цитокінів, антигормонів, ксантинів, інтерлейкінів, інтерферонів і цитотоксичних лікарських засобів.

У переважному варіанті здійснення винаходу вказаним біологічно активним агентом є антитіло, направлене проти антигену клітинної поверхні, що експресується на В-клітинних злоякісних пухлинах, таке як антитіло проти CD19, CD20 або CD33. У переважному варіанті вказаним анти-CD20 антитілом є ритуксимаб (Rituxan™).

В іншому варіанті здійснення винаходу вказаними біологічно активними агентами є цитокіни або фактори росту, такі як інтерлейкін 2 (IL-2), TNF, CSF, GM-CSF і G-CSF, або гормони, включаючи естрогени, андрогени, прогестини і кортикостероїди.

В іншому варіанті здійснення винаходу біологічно активним агентом є цитотоксичний лікарський засіб, вибраний з доксорубіцину, даунорубіцину, ідарубіцину, аklarубіцину, зорубіцину, мітоксантрону, епірубіцину, карубіцину, ногамаміцину, меногарилу, пітарубіцину, валрубіцину, цитарабіну, гемцитабіну, трифлуридину, анцитабіну, еноцитабіну, азацитидину, доксифлуридину, пентостатину, бруксуридину, капецитабіну, кладрибіну, децитабіну, флуксуридину, флударабіну, гугеротину, пуроміцину, тегафуру, тіазофуру, адриаміцину, цисплатину, карбоплатину, циклофосфаміду, дакарбазину, вінбластину, вінкрістину, мітоксантрону, блеоміїшну, мехлоретаміну, преднізону, прокарбазину, метотрексату, фторурацилів, етопозиду, таксолу, аналогів таксолу і мітоміцину.

У переважному варіанті здійснення винаходу терапевтично ефективну дозу кон'югату "похідне мономерного каліхеаміцину/анти-CD22 антитіло" вводять разом з однією або декількома комбінаціями цитотоксичних агентів, що використовуються як складова частина курсу лікування, де вказану комбінацію цитотоксичних агентів вибирають з: CHOPP (циклофосфамід, доксорубіцин, вінкрістин, преднізон і прокарбазин); CHOP (циклофосфамід, доксорубіцин, вінкрістин і преднізон); COP (циклофосфамід, вінкрістин і преднізон); CAP-BOP (циклофосфамід, доксорубіцин, прокарбазин, блеоміцин, вінкрістин і преднізон); m-BACOD (метотрексат, блеоміцин, доксорубіцин, циклофосфамід, вінкрістин, дексаметазон і лейковорин); ProMACE-MOPP (преднізон, метотрексат, доксорубіцин, циклофосфамід, етопозид, лейковорин, мехлоретамін, вінкрістин, преднізон і прокарбазин); ProMACE-CytaBOM (преднізон, метотрексат, доксорубіцин, циклофосфамід, етопозид, лейковорин, цитарабін, блеоміцин і вінкрістин); MACOP-B (метотрексат, доксорубіцин, циклофосфамід, вінкрістин, преднізон, блеоміцин і лейковорин); MOPP (мехлоретамін, вінкрістин, преднізон і прокарбазин); ABVD (адриаміцин/доксорубіцин, блеоміцин, вінбластин і дакарбазин); MOPP (мехлоретамін, вінкрістин, преднізон і прокарбазин), що вводиться по чергову з ABV (адриаміцин/доксорубіцин, блеоміцин і вінбластин); MOPP (мехлоретамін, вінкрістин, преднізон і прокарбазин), що вводиться по чергову з ABVD (адриаміцин/доксорубіцин, блеоміцин, вінбластин і дакарбазин); CHlVPP (хлорамбуцил, вінбластин, прокарбазин і преднізон); IMVP-16 (іфосфамід, метотрексат і етопозид); MIME (метил-gag, іфосфамід, метотрексат і етопозид); DHAP (дексаметазон, висока доза цитарабіну і цисплатин); ESHAP (етопозид, метилпреднізолон, висока доза цитарабіну і цисплатин); CEPP(B) (циклофосфамід, етопозид, прокарбазин, преднізон і блеоміцин); CAMP (ломустин, мітоксантрон, цитарабін і преднізон); CVP-1 (циклофосфамід, вінкрістин і преднізон); ESHOP (етопозид, метилпреднізолон, висока доза цитарабіну, вінкрістин і цисплатин); EPOCH (етопозид, вінкрістин і доксорубіцин), що вводиться протягом 96 годин з ударними дозами циклофосфаміду і преднізону, що вводиться перорально, ICE (іфосфамід, циклофосфамід і етопозид), CEPP(B) (циклофосфамід, етопозид, прокарбазин, преднізон і блеоміцин), CHOP-B (циклофосфамід, доксорубіцин, вінкрістин, преднізон і блеоміцин), CEPP-B (циклофосфамід, етопозид, прокарбазин і блеоміцин) і P/DOCE (епірубіцин або доксорубіцин, вінкрістин, циклофосфамід і преднізон).

В одному з переважних варіантів здійснення винаходу кон'югат "похідне мономерного каліхеаміцину/анти-CD22 антитіло" вводять перед введенням однієї або декількох комбінацій цитотоксичних агентів як частину курсу лікування.

В іншому переважному варіанті здійснення винаходу терапевтично ефективну дозу кон'югату "похідне мономерного каліхеаміцину/анти-CD22 антитіло" вводять після введення однієї або декількох комбінацій цитотоксичних агентів як частину курсу лікування.

В іншому переважному варіанті здійснення винаходу терапевтично ефективну дозу кон'югату "похідне

мономерного каліхеаміцину/анти-CD22 антитіло" вводять разом з антитілом, направленим проти антигену клітинної поверхні, присутнього на В-клітинних злоякісних пухлинах, і ця терапевтично ефективна доза необов'язково містить одну або декілька комбінацій цитотоксичних агентів як частину курсу лікування.

В іншому своєму аспекті даний винахід відноситься до використання кон'югату "похідне мономерного каліхеаміцину/анти-CD22 антитіло" з метою виготовлення лікарського засобу для лікування проліферативного розладу. Такий лікарський засіб може бути використаний для лікування В-клітинних проліферативних розладів або окремо, або у комбінації з іншими біологічно активними агентами.

Короткий опис графічного матеріалу

На Фіг.1 наведена амінокислотна послідовність CDR мишачого моноклонального антитіла 5/44 (SEQ ID NO:1-6).

На Фіг.2 наведена ДНК і амінокислотна послідовність варіабельного домену (VL) легкого ланцюга мишачого моноклонального антитіла 5/44.

На Фіг.3 наведена ДНК і амінокислотна послідовність варіабельного домену (VH) важкого ланцюга мишачого моноклонального антитіла 5/44.

На Фіг.4 показана стратегія видалення сайту глікозилювання і реакційноздатного лізину з CDR-H2.

На Фіг.5 показана прищеплена конструкція для послідовності легкого ланцюга 5/44. DPK-9 являє собою акцепторну каркасну послідовність людської зародкової лінії. Вертикальні лінії вказують на відмінності між мишачими і людськими залишками. Підкреслені послідовності вказують на донорні залишки, які були збережені у трансплантаті. CDR позначені курсивом, набраним жирним шрифтом (для DPK-9 не показано). Трансплантат gL1 має 6 донорних каркасних залишків, а gL2 має 7 таких залишків.

На Фіг.6 показана прищеплена конструкція для послідовності важкого ланцюга 5/44. DP7 являє собою акцепторну каркасну послідовність людської зародкової лінії. Вертикальні лінії вказують на відмінності між мишачими і людськими залишками. Підкреслені послідовності вказують на донорні залишки, які були збережені у трансплантаті. CDR позначені курсивом, набраним жирним шрифтом (для DP7 не показано). Трансплантати gH4 і gH6 мають 6 донорних каркасних залишків. Трансплантати gH5 і gH7 мають 4 донорних каркасних залишки.

На Фіг.7 наведена карта вектора pMRR14.

На Фіг.8 наведена карта вектора pMRR10.1.

На Фіг.9 наведені результати Вісого-аналізу химерних мутантів 5/44.

На Фіг.10 наведені олігонуклеотиди для збирання генів gH1 і gL1 5/44.

На Фіг.11 наведена плазмідна карта проміжного вектора pCR2.1 (544gH1).

На Фіг.12 наведена плазмідна карта проміжного вектора pCR2.1 (544gL1).

На Фіг.13 наведені олігонуклеотидні кластери, що використовуються для створення додаткових трансплантатів.

На Фіг.14 наведений графік, який ілюструє аналіз на конкуренцію між флуоресцентно міченим мишачим антитілом 5/44 і прищепленими варіантами.

На Фіг.15 наведений графік, який ілюструє аналіз на конкуренцію між флуоресцентно міченим мишачим антитілом 5/44 і прищепленими варіантами.

На Фіг.16 наведена повнорозмірна ДНК і амінокислотна послідовність прищеплених важкого і легкого ланцюгів.

На Фіг.17 схематично наведений кон'югат "антитіло-NAc-гамма-каліхеаміцин-DMH".

На Фіг.18 наведений графік, що ілюструє вплив CMC-544 на ріст В-клітинної лімфоми RAMOS.

На Фіг.19 наведений графік, що ілюструє вплив CMC-544 на ріст великоклітинної В-лімфоми у моделі ксенотрансплантату in vivo у "голих" мишей.

На Фіг.20 наведений графік, що ілюструє порівняння впливу CMC-544, одержаного методом кон'югування CMA-676 і методом кон'югування CMC-544, на ріст RL-лімфоми.

На Фіг.21 наведений графік, який вказує на те, що оброблена ритуксимабом (Rituxan™) великоклітинна RL-лімфома є чутливою до CMC-544-обробки.

На Фіг.22 наведений графік, що ілюструє вплив ритуксимабу (Rituxan™) на цитотоксичну дію CMC-544.

На Фіг.23 наведений графік, що ілюструє вплив CMC-544, ритуксимабу (Rituxan™) і CMA-676 на виживання мишей SCID з дисемінованою ранньою В-клітинною лімфомою RAMOS.

На Фіг.24 наведений графік, що ілюструє вплив CMC-544, ритуксимабу (Rituxan™) і CMA-676 на виживання мишей SCID з дисемінованою пізньою В-клітинною лімфомою RAMOS.

На Фіг.25 наведений графік, що ілюструє вплив CMC-544, ритуксимабу (Rituxan™) і CMA-676 на виживання мишей SCID з дисемінованою пізньою В-клітинною лімфомою RAMOS.

На Фіг.26 наведений графік, що ілюструє вплив CMC-544, ритуксимабу (Rituxan™) і CMA-676 на виживання мишей SCID з дисемінованою пізньою В-клітинною лімфомою RAMOS.

На Фіг.27 наведений графік, що ілюструє вплив CMC-544, ритуксимабу (Rituxan™) і CMA-676 на виживання мишей SCID з дисемінованою пізньою В-клітинною лімфомою RAMOS.

На Фіг.28 наведений графік, що ілюструє протипухлинну активність CMC-544 з ритуксимабом (Rituxan™) або без нього, направлену проти неходжкінської RL-лімфоми.

На Фіг.29 наведений графік, що ілюструє протипухлинну активність CMC-544 і CHOP, направлену проти неходжкінської RL-лімфоми.

Кон'югати даного винаходу містять цитотоксичний лікарський засіб, дериватизований лінкером, який включає будь-яку реакційноздатну групу, що реагує з білковим носієм з утворенням кон'югату "похідне цитотоксичного лікарського засобу - білковий носій". Зокрема, кон'югати даного винаходу містять цитотоксичний лікарський засіб, дериватизований лінкером, який включає будь-яку реакційноздатну групу, що реагує з антитілом, використовуваним як білковий носій, з утворенням кон'югату "похідне цитотоксичного лікарського засобу - антитіло". Зокрема, вказане антитіло реагує з антигеном клітинної поверхні на В-клітинних злоякісних пухлинах. Нижче описаний вдосконалений спосіб одержання і очищення таких кон'югатів.

Використання конкретних співрозчинників, домішок і конкретних реакційних умов у комбінації з процедурою розподілу приводить до утворення кон'югату "похідне мономерного цитотоксичного лікарського засобу/антитіла" зі значно більш низьким вмістом LCF. На противагу агрегованій формі, мономерна форма має значно більш високий терапевтичний індекс, а мінімізація LCF і значне зниження ступеню агрегації дозволяє використовувати вказане антитіло як вихідний матеріал в ефективному терапевтичному лікуванні завдяки запобіганню конкуренції LCF з більш високо кон'югованою фракцією (HCF).

1. Носії

Носії/агенти, що націлюють, даного винаходу, переважно, являють собою білкові носії/агенти, що націлюють. Такими носіями/агентами, що націлюють, є гормони, фактори росту, антитіла, фрагменти антитіл, міметики антитіл і їх генетично або ферментативно сконструйовані аналоги, які, незалежно від того, чи згадуються вони окремо або групою, будуть далі називатися "носіями" або "групами носіїв". Головною властивістю носія є його здатність розпізнавати антиген або рецептор, асоційований з небажаними клітинами, і зв'язуватися з ним з подальшою його інтерналізацією. Прикладами носіїв, що використовуються у даному винаході, є носії, описані у патенті США №5053394, який у всій своїй повноті вводиться у даний опис за допомогою посилання. Носіями, переважними для використання у даному винаході, є антитіла і міметики антитіл.

Для генерування міметиків антитіла, які зв'язуються з антигенними детермінантами зі специфічністю антитіла, були використані не імуноглобулінові білкові каркасні молекули (публікація PCT №WO 00/34784). Так, наприклад, каркас "мініантитіла", яке має укладку, подібну до імуноглобулінової укладки, був сконструйований шляхом делеції трьох бета-ланцюгів з варіабельного домену важкого ланцюга-моноклонального антитіла (Tramontano et al., J. Mol. Recognit. 7:9, 1994). Цей білок включає 61 залишок і може бути використаний для представлення двох гіперваріабельних петель. Ці дві петлі були рандомізовані, а продукти були відібрані для зв'язування з антигеном, однак абсолютно очевидно, що каркасна ділянка має досить обмежене застосування через погану розчинність. Іншою каркасною ділянкою, що використовується для представлення петель, є тендамістат, тобто білок, який специфічно інгібує альфа-амілази ссавців і являє собою "сендвіч"-структуру із 74 залишків, що складається з 6-ланцюгових бета-складчастих шарів, зв'язаних разом двома дисульфідними зв'язками (McConnell & Hoess, J. Mol. Biol. 250: 460, 1995). Даний каркас включає три петлі, але у наш час тільки дві з цих петель були оцінені на можливість рандомізації.

Інші білки були протестовані на каркасні ділянки і були використані для представлення рандомізованих залишків на альфа-спіральных поверхнях (Nord et al., Nat. Biotechnol. 15: 772, 1997; Nord et al., Protein Eng. 8:601, 1995) і для представлення петель між альфа-спіралями у пучках альфа-спіралей (Ku & Schultz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 6552, 1995) і петель, обмежених дисульфідними містками, такими як дисульфідні містки інгібіторів малих протеаз (Markland et al., Biochemistry 35: 8045, 1996; Markland et al., Biochemistry 35: 8058, 1996; Rottgen & Collins, Gene 164:243, 1995; Wang et al., J. Biol. Chem. 270: 12250, 1995).

Прикладами антитіл-носіїв, які можуть бути використані у даному винаході, є моноклональні антитіла, химерні антитіла, гуманізовані антитіла, людські антитіла і їх біологічно активні фрагменти. Переважно, такі антитіла направлені проти антигенів клітинної поверхні, що експресуються на клітинах-мішенях і/або тканинах, асоційованих з проліферативними розладами, такими як рак. Прикладами специфічних антитіл, направлених проти антигенів клітинної поверхні на клітинах-мішенях, є, але не обмежуються ними, антитіла проти антигену CD22, який понадекспресується на більшості В-клітинних лімфом; G5/44, гуманізована форма мишачого анти-CD22 моноклонального антитіла; антитіла проти антигену клітинної поверхні CD33, який переважає на деяких людських мієлоїдних пухлинах, зокрема, при гострому мієлоїдному лейкозі; hP67.6, гуманізована форма мишачого анти-CD33 антитіла (див. патент США №5773001); антитіло проти антигену PEM, що виявляється на множині пухлин епітеліального походження, яка була позначена mP67.6 (див. I.D. Bernstein et al., J. Clin. Invest. 79: 1153 (1987) і I.D. Bernstein et al., J. Immunol. 128: 867-881 (1992)); і гуманізоване антитіло проти вуглецевого антигену Lewis Y, понадекспресованого на багатьох солідних пухлинах, позначене hu3S193 (див. патент США №6310185 B1). Крім того, як носії/агенти для доставки можуть бути також використані декілька комерційно доступних антитіл, таких як ритуксимаб (Rituxan™) і трастузумаб (Herceptin™). Ритуксимаб (Rituxan™) являє собою химерне анти-CD20 антитіло, що використовується для лікування різних В-клітинних лімфом, а трастузумаб (Herceptin™) являє собою гуманізоване анти-Her2 антитіло, що використовується для лікування раку молочної залози.

Прикладом антитіла, що використовується у даному винаході як носій, є молекула CDR-прищепленого гуманізованого антитіла, направлена проти антигену клітинної поверхні CD22 і позначена G5/44. Це антитіло являє собою гуманізовану форму мишачого моноклонального анти-CD22 антитіла, направленого проти антигену клітинної поверхні CD22, який переважає на деяких людських лімфомах. Використовуваний тут термін "молекула CDR-прищепленого антитіла" означає молекулу антитіла, в якій важкий і/або легкий ланцюги містять одну або декілька ділянок (CDR), що визначають комплементарність, включаючи, якщо необхідно, модифіковану CDR (далі називану просто CDR), де CDR від донорного антитіла (наприклад, мишачого моноклонального антитіла) була прищеплена до каркасної варіабельної ділянки важкого і/або легкого ланцюгів акцепторного антитіла (наприклад, людського антитіла). Переважно, щоб таке CDR-прищеплене антитіло мало варіабельний домен, що містить людські акцепторні каркасні ділянки, а також одну або декілька донорних CDR, визначених вище.

Якщо CDR є прищепленими, то може бути використана будь-яка придатна послідовність каркасної акцепторної варіабельної ділянки, що відноситься до такого ж класу/типу, як і донорне антитіло, від якого походять вказані CDR, включаючи каркасні ділянки миші, приматів і людини. Прикладами каркасних людських ділянок, які можуть бути використані у даному винаході, є KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY і POM (Kabat et al., Seq. of Proteins of Immunol. Interest, 1: 310-334 (1994)). Так, наприклад, KOL і NEWM можуть бути використані для важкого ланцюга, REI може бути використана для легкого ланцюга, а EU, LAY і POM можуть бути використані як для важкого, так і для легкого ланцюга.

У CDR-прищепленому антитілі даного винаходу як акцепторне антитіло переважно використовувати

антитіло, що має ланцюги, гомологічні ланцюгам донорного антитіла. Акцепторні важкі та легкі ланцюги необов'язково повинні походити від одного і того ж антитіла, і, якщо це необхідно, то вони можуть містити складові ланцюги, що мають каркасні ділянки, які походять від інших ланцюгів.

Крім того, у CDR-прищепленому антитілі даного винаходу каркасні ділянки необов'язково повинні мати послідовність, яка точно співпадає з послідовністю акцепторного антитіла. Так, наприклад, незвичайні залишки можуть бути замінені залишками, які більш часто зустрічаються в антитілах, що належать до такого ж класу або типу, як і акцепторне антитіло. Альтернативно, вибрані залишки в акцепторних каркасних ділянках можуть бути замінені так, щоб вони відповідали залишкам, присутнім у тому ж положенні донорного антитіла, або вони можуть бути замінені консервативним залишком, що знаходиться у тому ж положенні донорного антитіла. Таких умов заміни потрібно дотримуватися, принаймні, для збереження афінності донорного антитіла. Протокол відбору залишків в акцепторних каркасних ділянках, які, якщо це необхідно, повинні бути замінені, описаний у публікації PCT №WO 91/09967, яка у всій своїй повноті вводиться у даний опис за допомогою посилання.

Донорними залишками є залишки, що походять від донорного антитіла, тобто антитіла, від якого походять CDR.

Антитіло даного винаходу може містити важкий ланцюг, де варіабельний домен як CDR-H2 (як визначено Kabat et al. (див. вище)) включає ділянку H2', в якій можлива послідовність сайту глікозилювання була видалена з метою підвищення афінності антитіла до антигену.

Альтернативно або додатково, антитіло даного винаходу може містити важкий ланцюг, де варіабельний домен як CDR-H2 включає (як визначено Kabat et al. (див. вище)) ділянку H2", в якій лізиновий залишок знаходиться у положенні 60. Цей лізиновий залишок, який локалізований у доступному положенні у ділянці CDR-H2, і який розглядається як залишок, здатний вступати у реакцію з агентами кон'югування, що приводить до зниження афінності зв'язування з антигеном, замінений альтернативною амінокислотою.

Крім того, антитіло даного винаходу може містити важкий ланцюг, де варіабельний домен як CDR-H2 (як визначено Kabat et al. (див. вище)) включає ділянку H2'", в якій можлива послідовність сайту глікозилювання і лізиновий залишок у положенні 60 замінені альтернативними амінокислотами.

Антитіло даного винаходу може включати: ціле антитіло, що має повнорозмірні важкі і легкі ланцюги; його біологічно активний фрагмент, такий як Fab, модифікований Fab, Fab', F(ab')₂ або Fv-фрагмент; мономер або димер легкого ланцюга або важкого ланцюга, або одностанцюгове антитіло, наприклад, одностанцюговий Fv, в якому варіабельні домени важкого і легкого ланцюга зв'язані пептидним лінкером. Аналогічним чином, варіабельні ділянки важкого і легкого ланцюгів можуть бути об'єднані, якщо це необхідно, з іншими доменими антитіла.

Антитіло даного винаходу може також включати модифікований Fab-фрагмент, де вказаною модифікацією є додавання однієї або декількох амінокислот, необхідних для приєднання ефекторної або репортерної молекули до С-кінця його важкого ланцюга. Переважно, щоб додаткові амінокислоти утворювали модифіковану шарнірну ділянку, що містить один або два цистеїнових залишки, до яких може бути приєднана ефекторна або репортерна молекула.

Домени константної ділянки антитіла даного винаходу, якщо вони присутні, можуть бути вибрані, виходячи з передбачуваної функції вказаного антитіла, а зокрема, ефекторних функцій, які можуть бути, а можуть і не бути, необхідними. Так, наприклад, як домени константної ділянки можуть служити домени людського IgA, IgD, IgE, IgG або IgM. Зокрема, якщо дане антитіло призначене для терапевтичного використання і його ефекторні функції є необхідними, то можуть бути використані домени константної ділянки людського IgG, особливо ізотипів IgG1 і IgG3. Альтернативно, якщо вказане антитіло призначене для терапевтичного використання, але його ефекторні функції не є необхідними або бажаними, то можуть бути використані ізотипи IgG2 і IgG4, або Fc-ділянка IgG1 може бути мутована для скасування ефекторної функції.

Афінність зв'язування антитіла даного винаходу складає, принаймні, 5×10^{-8} M, переважно, принаймні, 1×10^{-9} M, більш переважно, принаймні, $0,75 \times 10^{-10}$ M, а найбільш переважно, принаймні, $0,5 \times 10^{-10}$ M.

В одному зі своїх варіантів даний винахід відноситься до кон'югатів імунотоксину і до способів одержання таких кон'югатів з використанням варіантів антитіл або міметиків антитіл. У переважному варіанті здійснення винаходу варіанти антитіла даного винаходу направлені проти CD22 і володіють підвищеною афінністю по відношенню до CD22. Такі варіанти можуть бути одержані відповідно до різних протоколів забезпечення дозрівання афінності, включаючи мутовані CDR (Yang et al., J. Mol. Biol. 254, 392-403, 1995), перестановку ланцюгів (Marks et al., Bio/Technology, 10, 779-783, 1992), використання штамів-мутантів E.coli (Low et al., J. Mol. Biol., 250, 359-368, 1996), перестановку ДНК (Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8, 724-733, 1997), фагове представлення (Thompson et al., J. Mol. Biol. 256, 77-88, 1996) і ПЛР за алельним виключенням (тільки алелю, що відповідає одній статі) (Cramer et al., Nature, 391, 288-291, 1998).

Для експресії ДНК-послідовностей, що кодують носій, включаючи антитіла даного винаходу, може бути використана будь-яка придатна система клітина-хазяїн/вектор. При цьому можуть бути використані бактеріальні системи, наприклад, E.coli, та інші мікробні системи, частково для експресії фрагментів антитіл, таких як Fab- і F(ab')₂-фрагменти, а особливо Fv-фрагменти і фрагменти одностанцюгового антитіла, наприклад, одностанцюгові Fv-фрагменти. Для продукування більш великого антитіла, включаючи повнорозмірні молекули антитіл, можуть бути використані еукаріотичні експресійні системи клітин-хазяїв, наприклад, клітини ссавців. Придатними клітинами-хазяями ссавців є CHO, міеломні клітини, дріжджові клітини, клітини комах, гібридомні клітини, клітини NSO, VERO або PER C6. Придатними експресійними системами також є трансгенні тварини і рослини.

II. Терапевтичні агенти

Терапевтичні агенти, придатні для використання у даному винаході, являють собою цитотоксичні лікарські засоби, які інгібують або переривають полімеризацію тубуліну; алкілувальні агенти, які зв'язуються з ДНК і руйнують її, і агенти, які інгібують синтез білка або основних клітинних білків, таких як протеїнази, ферменти і цикліни. Прикладами таких цитотоксичних лікарських засобів є, але не обмежуються ними, тіотеп, таксани,

вінкристин, даунорубіцин, доксорубіцин, епірубіцин, актиноміцин, аутраміцин, азасерини, блеоміцини, тамоксифен, ідарубіцин, доластатини/ауристатини, геміастерліни, каліхеаміцини, еспераміцини та маїтанзиноїди. Переважними цитотоксичними лікарськими засобами є каліхеаміцини, які відносяться до метилтрисульфідних протипухлинних антибіотиків. Приклади каліхеаміцинів, які можуть бути використані у даному винаході, описані, наприклад, у патентах США №№4671958, 4970198, 5053394, 5037651 і 5079233, які у своїй повноті вводяться у даний опис за допомогою посилання. Переважними каліхеаміцинами є похідні гамма-каліхеаміцину або похідні N-ацетил-гамма-каліхеаміцину.

III. Кон'югати "похідне цитотоксичного лікарського засобу/носії"

Кон'югати даного винаходу мають формулу $Pr(-X-W)_m$,

де:

Pr являє собою білковий носій;

X являє собою лінкер, що включає продукт реакції будь-якої реакційноздатної групи, яка може взаємодіяти з білковим носієм;

W являє собою цитотоксичний лікарський засіб;

m означає середнє навантаження для очищеного продукту кон'югування, таке, при якому вказаний каліхеаміцин складає 4-10% за масою кон'югату; і

$(-X-W)_m$ являє собою цитотоксичний лікарський засіб.

Переважно, X має формулу:

$(CO-Alk^1-Sp^1-Ar-Sp^2-Alk^2-C(Z^1)=Q-Sp)$,

де:

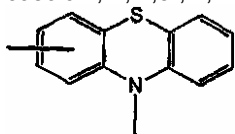
Alk^1 і Alk^2 незалежно являють собою зв'язок або розгалужений або нерозгалужений (C_1-C_{10}) алкіленовий ланцюг;

Sp^1 являє собою зв'язок, -S-, -O-, -CONH-, -NHCO-, -NR'-, -N(CH₂CH₂)₂N- або -X-Ar¹-Y-(CH₂)_n-Z, де X, Y і Z незалежно являють собою зв'язок, -NR'-, -S- або -O-, за умови, що якщо n=0, то, принаймні, один з Y і Z повинен являти собою зв'язок, а Ar являє собою 1,2-, 1,3- або 1,4-фенілен, необов'язково заміщений однією, двома або трьома групами, вибраними з (C_1-C_5) алкілу, (C_1-C_4) алкокси, (C_1-C_4) тіоалкокси, галогену, нітро, -COOR', -CONHR', -(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)_nCOOR', -O(CH₂)_nCONHR' або -S(CH₂)_nCONHR', за умови, що якщо Alk^1 являє собою зв'язок, то Sp^1 також являє собою зв'язок;

n дорівнює цілому числу від 0 до 5;

R' являє собою розгалужений або нерозгалужений (C_1-C_5) ланцюг, необов'язково заміщений однією або двома групами, вибраними з -OH, (C_1-C_4) алкокси, (C_1-C_4) тіоалкокси, галогену, нітро, (C_1-C_3) діалкіламіно або (C_1-C_3) триалкіламоній-A', де A' являє собою фармацевтично прийнятний аніон, що утворює сіль;

Ag являє собою 1,2-, 1,3- або 1,4-фенілен, необов'язково заміщений однією, двома або трьома групами, вибраними з (C_1-C_6) алкілу, (C_1-C_5) алкокси, (C_1-C_4) тіоалкокси, галогену, нітро, -COOR', -CONHR', -O(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)_nCOOR', -O(CH₂)_nCONHR' або -S(CH₂)_nCONHR', де n і R' визначені вище, або Ag являє собою 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, 2,6- або 2,7-нафтіліден, або



де кожний нафтіліден або фенотіазин необов'язково заміщені однією, двома, трьома або чотирма групами, вибраними з (C_1-C_6) алкілу, (C_1-C_5) алкокси, (C_1-C_4) тіоалкокси, галогену, нітро, -COOR', -CONHR', -O(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)_nCOOR' або -S(CH₂)_nCONHR', де n і R' визначені вище, за умови, що якщо Ag являє собою фенотіазин, то Sp являє собою зв'язок, приєднаний тільки до азоту;

Sp^2 являє собою зв'язок, -S- або -O-, за умови, що якщо Alk^2 являє собою зв'язок, то Sp^2 також являє собою зв'язок;

Z^1 являє собою H, (C_1-C_5) алкіл або феніл, необов'язково заміщений однією, двома або трьома групами, вибраними з (C_1-C_5) алкілу, (C_1-C_5) алкокси, (C_1-C_4) тіоалкокси, галогену, нітро, -COOR', -ONHR', -O(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)_nCOOR', -O(CH₂)_nCONHR' або -S(CH₂)_nCONHR', де n і R' визначені вище;

Sp являє собою прямий або розгалужений двовалентний або тривалентний (C_1-C_{18}) радикал, двовалентний або тривалентний арильний або гетероарильний радикал, двовалентний або тривалентний (C_3-C_{18}) циклоалкільний або гетероциклоалкільний радикал, двовалентний або тривалентний арил- або гетероариларил (C_1-C_{18}) радикал, двовалентний або тривалентний циклоалкіл- або гетероциклоалкілалкіл (C_1-C_{18}) радикал або двовалентний або тривалентний ненасичений (C_2-C_{18}) алкільний радикал, де гетероарил, переважно, являє собою фурил, тієніл, N-метилпіроліл, піридиніл, N-метилімідазоліл, оксазоліл, піримідиніл, хіноліл, ізохіноліл, N-метилкарбазоліл, амінокумариніл або феназиніл, і де, у тому випадку, якщо Sp являє собою тривалентний радикал, то Sp може бути, крім того, заміщений нижчою (C_1-C_5) діалкіламіногрупою, нижчою (C_1-C_5) алкоксигрупою, гідроксигрупою або нижчою (C_1-C_5) алкілтіогрупою; і

Q являє собою =HNHCO-, =HNHCS-, =HNHCONH-, =HNHCSNH- або =NHO-.

Alk^1 переважно являє собою розгалужений або нерозгалужений (C_1-C_{10}) алкіленовий ланцюг; Sp' являє собою зв'язок, -S-, -O-, -CONH-, -NHCO- або -NR', де R' визначений вище, за умови, що якщо Alk^1 являє собою зв'язок, то Sp' також являє собою зв'язок;

Ag являє собою 1,2-, 1,3- або 1,4-фенілен, необов'язково заміщений однією, двома або трьома групами, вибраними з (C_1-C_6) алкілу, (C_1-C_5) алкокси, (C_1-C_4) тіоалкокси, галогену, нітро, -COOR', -CONHR', -O(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)_nCOOR', -O(CH₂)_nCONHR' або -S(CH₂)_nCONHR', де n і R' визначені вище, або Ag являє собою 1,2-, 1,3-, 1,4-, 1,5-, 1,6-, 1,7-, 1,8-, 2,3-, 2,6- або 2,7-нафтіліден, кожний з яких необов'язково заміщений однією, двома, трьома або чотирма групами, вибраними з (C_1-C_6) алкілу, (C_1-C_5) алкокси, (C_1-C_4) тіоалкокси, галогену, нітро, -COOR', -CONHR', -O(CH₂)_nCOOR', -S(CH₂)_nCOOR', -O(CH₂)_nCONHR' або -S(CH₂)_nCONHR'.

Z^1 являє собою (C_1-C_5) алкіл або феніл, необов'язково заміщений однією, двома або трьома групами,

вибраними з (C_1-C_5) алкілу, (C_1-C_4) алкокси, (C_1-C_4) тіоалкокси, галогену, нітро, $-COOR'$, $-CONHR'$, $-O(CH_2)_nCOOR'$, $-S(CH_2)_nCOOR'$, $-O(CH_2)_nCONHR'$ або $-S(CH_2)_nCONHR'$; Alk^2 і Sp^2 , взяті разом, утворюють зв'язок, а Sp і Q є такими, як вони були визначені вище.

У патенті США №5773001, який у своїй повноті вводиться у даний опис за допомогою посилання, описані лінкери, які можуть бути використані разом з нуклеофільними похідними, а зокрема, гідразидами і спорідненими нуклеофілами, одержаними з каліхеаміцинів. Дані лінкери є особливо придатними у тих випадках, коли найкраща активність досягається при утворенні зв'язку між лікарським засобом і лінкером, що гідролізують. Дані лінкери містять дві функціональні групи. Однією з таких груп звичайно є карбонова кислота, що використовується для реакції взаємодії з носієм. Така кислотна функціональна група, якщо вона є відповідним чином активованою, може утворювати амідний зв'язок з вільною аміногрупою вказаного носія, такою як амін бічного ланцюга лізину антитіла або іншого білкового носія. Іншою функціональною групою звичайно є карбонільна група, тобто альдегід або кетон, які реагують з відповідним чином модифікованим терапевтичним агентом. Дані карбонільні групи можуть реагувати з гідразидною групою на вказаному лікарському засобі з утворенням гідразонного зв'язку. Такий зв'язок є таким, що гідролізують, що дозволяє терапевтичному агенту вивільнятися з кон'югату після зв'язування з клітинами-мішенями.

Найбільш переважним біфункціональним лінкером для використання у даному винаході є 4-(4-ацетилфенокси)бутанова кислота (AcBut), яка утворює переважний кон'югат, що складається з β -каліхеаміцину, γ -каліхеаміцину або N-ацетил- γ -каліхеаміцину, функціоналізованого за допомогою реакції взаємодії з 3-меркапто-3-метилбутаноїл гідразидом, AcBut-лінкером, і з людського або гуманізованого антитіла IgG, використовуваного як носій, що націлює.

IV. Мономерне кон'югування

Гідрофобна природа багатьох цитотоксичних лікарських засобів, включаючи каліхеаміцини, створює певні труднощі в одержанні кон'югатів мономерного лікарського засобу з високим навантаженням лікарським засобом і з прийнятними виходами, необхідними для його терапевтичного застосування. Дана проблема ще більш ускладнюється збільшенням гідрофобності зв'язку, що надається лінкерами, такими як AcBut-лінкер, як описано у патенті США №5773001, а також збільшенням довжини ковалентного зв'язку, що розділяє терапевтичний агент і носій (антитіло).

Агрегація кон'югатів "похідне цитотоксичного лікарського засобу/носії" з підвищеним навантаженням лікарським засобом обумовлена гідрофобною природою лікарських засобів. Навантаження лікарським засобом часто має обмеження і не дозволяє одержувати прийнятні кількості мономерного продукту. У деяких випадках, наприклад, у випадку кон'югатів, описаних у патенті США №5877296, одержання кон'югату з потрібним виходом і з потрібним навантаженням терапевтичним засобом у реакційних умовах, описаних у патенті США №5053394, часто представляє певні труднощі через надмірну агрегацію. Ці реакційні умови передбачають використання ДМФ як співрозчинника у реакції кон'югування. Тому необхідно розробити способи, які дозволяли б збільшити навантаження лікарським засобом з одержанням більш високого виходу, але без агрегації і, відповідно, без втрати матеріалу.

Методи зниження агрегації описані у патентах США №№5712374 і 5714586, які у своїй повноті вводяться у даний опис за допомогою посилання. У цих патентах описані білкові носії, включаючи, але не обмежуючись ними, білки, такі як людські або гуманізовані антитіла, що використовуються для доставки цитотоксичних терапевтичних агентів, такі як, наприклад, hP67.6 та інші описані там гуманізовані антитіла. Як вказується у даних патентах, було виявлено, що використання нуклеофільного, сумісного з білком забуференого розчину, що містить (i) пропіленгліколь як співрозчинник і (ii) домішку, що включає, принаймні, одну C_6-C_{18} карбонову кислоту, звичайно дозволяє продукувати кон'югати "похідне мономерного цитотоксичного лікарського засобу/носії" з більш високим навантаженням лікарським засобом, з більш високим виходом та зі зниженим ступенем агрегації, що володіють чудовою активністю. Описаними у цих патентах кислотами, переважно, є C_7-C_{12} -кислоти, а найбільш переважно кислотою є октанова кислота (така як каприлова кислота) або її солі. Переважними забуференими розчинами для кон'югатів, одержаних з N-гідроксисукцинімідоєфірів (OSu) або інших аналогічним чином активованих складних ефірів, є забуферений фосфатом фізіологічний розчин (PBS) або N-2-гідроксietилпіперазин-N'-2-етансульфонова кислота (буфер HEPES). Забуферений розчин, що використовується у таких реакціях кон'югування, не може містити вільних амінів або нуклеофілів. Буфери, придатні для кон'югатів інших типів, можуть бути легко визначені фахівцем. Альтернативно, було виявлено, що використання нуклеофільного, сумісного з білком, забуференого розчину, що містить трет-бутанол і не містить яких-небудь інших домішок, дозволяє продукувати кон'югати "похідне мономерного каліхеаміцину/носії" з більш високим навантаженням лікарським засобом, з більш високим виходом та зі зниженим ступенем агрегації.

Кількість співрозчинника, необхідного для утворення мономерного кон'югату, до деякої міри варіюється в залежності від використовуваного білка і може бути визначена будь-яким фахівцем без зайвого експериментування.

Кількість домішок, необхідних для ефективного утворення мономерного кон'югату, також варіюється в залежності від використовуваного антитіла. Така кількість також може бути визначена будь-яким фахівцем без зайвого експериментування. Як описано у патентах США №№5712374 і 5714586, додавання пропіленгліколю у кількості від 10% до 60%, переважно, від 10% до 40%, а найбільш переважно приблизно 30% за об'ємом всього розчину, і домішки, що містить, принаймні, одну C_6-C_{18} карбонову кислоту або її сіль, а переважно, каприлову кислоту або її сіль у кількості від 20мМ до 100мМ, переважно, від 40мМ до 90мМ, а найбільш переважно, приблизно від 60мМ до 90мМ у реакційну суміш для кон'югування дозволяє продукувати кон'югати "похідне мономерного цитотоксичного лікарського засобу/носії" з більш високим навантаженням лікарським засобом, з більш високим виходом та зі зниженим ступенем агрегації. Можуть бути також використані й інші сумісні з білком органічні співрозчинники, що не є пропіленгліколем, такі як етиленгліколь, етанол, ДМФ, ДМСО і т.п. Деякі з цих органічних співрозчинників або всі вказані співрозчинники були використані для перенесення лікарського засобу у суміш для кон'югування.

Альтернативно, як описано у вказаних патентах, концентрація C₆-C₁₈карбонової кислоти або її солі може бути збільшена до 150-300мМ, а концентрація співрозчинника може бути знижена до 1-10%. В одному з варіантів вказано карбоновою кислотою є октанова кислота або її сіль. У переважному варіанті карбоновою кислотою є деканова кислота або її сіль. В іншому переважному варіанті вказано карбоновою кислотою є каприлова кислота або її сіль, де вказана каприлова кислота присутня у концентрації 200мМ разом з 5% пропіленгліколем або етанолом.

В іншому альтернативному варіанті, описаному у даних патентах, для одержання кон'югатів "похідне мономерного цитотоксичного лікарського засобу/носії" з більш високим навантаженням лікарським засобом, з більш високим виходом та зі зниженим ступенем агрегації, у реакційну суміш для кон'югування може бути доданий трет-бутанол у концентраціях від 10% до 25%, а переважно, 15% за об'ємом всього розчину.

Ці встановлені умови кон'югування були використані для одержання кон'югату CMA-676 (Gemtuzumab Ozogamicin), який у наш час є у продажу під торговим знаком Мілотарг™ (Mylotarg™). При розробці цього способу лікування гострого мієлоїдного лейкозу (ГМЛ), було проведено дослідження за допомогою іонообмінної хроматографії, яке показало, що каліхеаміцин не виявляє однорідного розподілу по всьому антитілу. Велика частина каліхеаміцину локалізується, приблизно, на одній половині антитіла, а інша його частина присутня в LCF, яка містить лише невеликі кількості каліхеаміцину. Отже, необхідність у розробці вдосконалених способів кон'югування цитотоксичних лікарських засобів, таких як каліхеаміцини, з носіями, які мінімізували б ступінь агрегації і дозволяли б досягти більш високого однорідного навантаження лікарським засобом зі значно більш високим виходом продукту - кон'югату, залишається вельми актуальною.

Конкретним прикладом може служити кон'югат C5/44-Мас-гамма-каліхеаміцин-DMH-AcBut, який буде далі називатися СМС-544 і який, у загальних рисах, показаний на Фіг.17. Для продукування СМС-544 бажане зниження кількості LCF до <10% від загальної кількості антитіла, і при цьому розглядаються різні варіанти такого зниження рівнів LCF. Кінцевий вибір параметрів не повинен впливати на інші властивості вказаного імунокон'югату, такі як зв'язування з антигеном і цитотоксичність. Параметрами, що розглядаються, є генетична або фізична модифікація вказаного антитіла, методи хроматографічного розподілу або зміна умов реакції.

Реакція антитіла G5/44 з Мас-гамма-каліхеаміцин-DMH-AcBut-OSu з використанням старих реакційних умов (умов одержання CMA-676) приводила до одержання продукту, що має фізичні властивості (навантаження лікарським засобом, LCF і агрегація), аналогічні властивостям CMA-676. Однак, у даному випадку, після кон'югування спостерігалось утворення небажаних високих рівнів LCF (50-60%). Оптимальні реакційні умови були визначені за допомогою методики планування статистичного експерименту, де оцінювалися ключові параметри реакції, такі як температура, рН, вихідна кількість похідного каліхеаміцину і концентрація домішки. Аналіз цих експериментів продемонстрував, що вихідна кількість каліхеаміцину і концентрація домішки здійснювали дуже великий вплив на рівень низькокон'югованої фракції LCF і утворення агрегатів, але набагато менший вплив на температуру і рН. У додаткових експериментах було також продемонстровано, що концентрації білка-носія (антитіла) і співрозчинника (етанолу) у рівній мірі здійснювали менший вплив (у порівнянні з вихідною кількістю каліхеаміцину і концентрацією домішки) на регуляцію рівнів LCF і агрегату. Для зниження LCF до рівня <10%, кількість вихідного похідного каліхеаміцину збільшували з 3% до 8,5% (мас/мас.) у порівнянні з кількістю антитіла у даній реакційній суміші. Октанову кислоту або її сіль, використовувану як домішку з концентрацією 200мМ (спосіб CMA-676), замінювали на деканову кислоту або її сіль у концентрації 37,5мМ. Реакція кон'югування проходила більш ефективно при злегка підвищеній температурі (30-35°C) і при рН8,2-8,7. Реакційні умови, що забезпечують здійснення таких замінів, дозволяють знизити LCF до рівня нижче 10%, і при цьому збільшити навантаження каліхеаміцином, і такі умови далі будуть називатися умовами технології одержання СМС-544 або "новими" умовами даної технології. Порівняння результатів, одержаних в умовах, що застосовуються у способах продукування CMA-676 і СМС-544, проілюстроване у таблиці 1.

Таблиця 1

Порівняння умов, що застосовуються у технології одержання CMA-676 і СМС-544

Умови/результати	Умови технології одержання CMA-676	Умови технології одержання СМС-544
Вихідна кількість каліхеаміцину	3,0% (мас./мас. порошку)	8,5% (мас./мас.)
Тип домішки і концентрація	Октанова кислота/октаноат натрію; 200мМ	Деканова кислота/деканоат натрію; 37,5мМ
Температура	26°C	31-35°C
РН	7,8	8,2-8,7
Завантаження каліхеаміцину (мас.%; УФ-аналіз)	2,4-3,5	7,0-9,0
Фракція з низьким рівнем кон'югування (LCF) (перед очищенням)	45-65% площі ВЕРХ	<10%
Агрегація (перед очищенням)	~5%	<5%
Агрегація (після очищення)	2%	<2%

Збільшення кількості вихідного каліхеаміцину приводить до збільшення навантаження лікарським засобом з 2,5-3,0мас.% до 7,0-9,0 (а в основному, 7,5-8,5)мас.%, і не приводить до збільшення рівня агрегації білка у реакційній суміші. Завдяки зниженню рівнів агрегату і LCF, умови способу одержання СМС-544 дозволяють одержувати більш гомогенний продукт. Ця нова процедура кон'югування дозволяє одержувати відтворювані

рівні СМС-544 у мультиграмовому масштабі.

В описаних вище реакціях концентрація антитіла може варіюватися у межах від 1 до 15мг/мл, а концентрація похідного каліхеаміцину, наприклад, сполуки N-ацетил-гамма-каліхеаміцин-DMH-AcBut.-OSu-ефір (що використовується для одержання кон'югатів, наведених на Фіг.17), складає у межах приблизно від 4,5 до 11% за масою антитіла. Співрозчинником є етанол, використання якого дало хороші результати при концентраціях від 6 до 11,4% (за об'ємом). Реакції здійснювали у PBS, HEPES, N-(2-гідроксіетил)піперазин-N'-(4-бутансульфонова кислота) (HEPBS) або в іншому сумісному буфері при pH8-9, при температурі приблизно від 30°C до 35°C, і протягом періоду часу від 15 хвилин до 24 годин. Фахівець може самостійно легко визначити прийнятні межі pH для інших типів кон'югатів. Було встановлено, що для різних антитіл незначні зміни у комбінації зазначених вище домішок приводять до збільшення навантаження лікарським засобом і збільшення виходу мономерного кон'югату, при цьому потрібно зазначити, що для досягнення оптимальних результатів при використанні будь-якого конкретного білка-носія може бути потрібне внесення невеликих змін у конкретні умови або вибір домішок.

V. Очищення і виділення кон'югату

Після кон'югування мономерні кон'югати можуть бути відділені від некон'югованих реагентів (таких як білковий носій і вільний цитотоксичний лікарський засіб/каліхеаміцин) і/або від агрегованої форми вказаних кон'югатів стандартними методами, такими як, наприклад, ексклюзійна хроматографія (ЕХ), гідрофобна хроматографія (ГФХ), іонообмінна хроматографія (ІОХ) або хроматографічне фокусування (ХФ). Очищені кон'югати є мономерними і звичайно містять від 4 до 10мас.% цитотоксичного лікарського засобу/каліхеаміцину. У переважному варіанті вказані кон'югати очищають гідрофобною хроматографією (ГФ). У способах, використовуваних раніше для промислового виробництва кон'югатів "цитотоксичний лікарський засіб/каліхеаміцин - антитіло" (спосіб GMA-676), після кон'югування проводили одну стадію розподілу за допомогою ексклюзійної хроматографії (ЕХ). Хоча дана стадія є досить ефективною як для видалення агрегованого кон'югату, так і для заміни буфера для препарату, однак ця стадія виявилася неефективною для зниження вмісту LCF. Отже, для регулювання вмісту LCF у кінцевому продукті, ЕХ-спосіб базується виключно на хімічній реакції кон'югування. Іншим недоліком ЕХ є обмеження об'єму реакційної суміші для кон'югування, що подається на колонку (звичайно не вище 5 процентів за об'ємом шару на колонці у даному процесі). Це значною мірою обмежує розмір партії (а отже і пропускну здатність), який може підтримуватися у даній продуктивній зоні. І нарешті, очищення за допомогою ЕХ також приводить до значного розведення розчину кон'югату, що накладає певні обмеження на концентрацію білка, яка повинна бути досягнута у даному препараті.

Якщо цитотоксичний лікарський засіб, наприклад, такий як похідне каліхеаміцину, має у високій мірі гідрофобну природу і використовується у кон'югаті, то для здійснення ефективного розподілу кон'югованого і некон'югованого антитіла гідрофобна хроматографія (ГФХ) є переважним вибором. У порівнянні з ЕХ, ГФХ має три важливих переваги: (1) вона є ефективною для зниження вмісту LCF, а також рівня агрегату; (2) завантажувальна місткість колонки для ГФХ набагато вище; і (3) вона дозволяє уникнути надмірного розбавлення продукту.

Різні середовища для високоефективної ГФХ, придатні для використання у промисловому виробництві, наприклад, такі як бутіл-, феніл і октилсефароза 4 Fast Flow (Amersham Biosciences Piscataway, NJ), можуть забезпечувати ефективне відділення некон'югованих компонентів і агрегатів кон'югату від мономерних кон'югованих компонентів після завершення кон'югування.

VI. Композиції і препарати

Даний винахід також відноситься до способу одержання терапевтичної або діагностичної композиції/терапевтичного або діагностичного препарату, що передбачає змішування кон'югату "похідне мономерного цитотоксичного лікарського засобу/носія" даного винаходу з фармацевтично прийнятним наповнювачем, розріджувачем або носієм.

Кон'югат "похідне мономерного цитотоксичного лікарського засобу/носія" може бути єдиним активним інгредієнтом у терапевтичній або діагностичній композиції/терапевтичному або діагностичному препараті, або він може бути використаний у поєднанні з іншими активними інгредієнтами, включаючи інші антитіла, наприклад, антитіла проти CD19, CD20, CD33, Т-клітин, IFN γ або ЛПС, або інгредієнти, що не відносяться до антитіл, такі як цитокіни, фактори росту, гормони, антигормони, цитотоксичні лікарські засоби і ксантини.

Цитокінами і факторами росту, які можуть бути використані для лікування проліферативних розладів, таких як рак, і які можуть бути використані разом з кон'югатами "похідне цитотоксичного лікарського засобу/носія" даного винаходу, є інтерферони, інтерлейкіни, такі як інтерлейкін 2 (IL-2), TNF, CSF, GM-CSF і G-CSF.

Гормонами, що звичайно використовуються для лікування проліферативних розладів, таких як рак, і які можуть бути використані разом з кон'югатами "похідне цитотоксичного лікарського засобу/носія" даного винаходу, є естрогени, такі як діетилstilбестрол і естрадіол, андрогени, такі як тестостерон і галотестин, прогестини, такі як Megace і Provera, і кортикостероїди, такі як преднізон, дексаметазон і гідрокортизон.

Для лікування проліферативних розладів, таких як рак, звичайно застосовуються антигормони, такі як антиестрогени, тобто тамоксифен, антиандрогени, тобто, флутамід і антиадреналові агенти, і ці антигормони можуть бути використані разом з кон'югатом "похідне цитотоксичного лікарського засобу/носія" даного винаходу.

Хіміотерапевтичними/протипухлинними агентами, які звичайно використовуються для лікування проліферативних розладів, таких як рак, і які можуть бути використані разом з кон'югатом "похідне цитотоксичного лікарського засобу/носія" даного винаходу, є, але не обмежуються ними, адриаміцин, цисплатин, карбоплатин, вінбластин, вінкрисин, блеоміцин, метотрексат, доксорубіцин, фторурацили, етопозид, таксол і його різні аналоги, та мітоміцин.

Вказані композиції повинні переважно містити терапевтично ефективну кількість кон'югату даного винаходу. Використовуваний тут термін "терапевтично ефективна кількість" означає кількість терапевтичного

агента, необхідну для лікування, ослаблення або попередження даного захворювання або стану, або для продукування терапевтичного або профілактичного ефекту, що детектується. Для будь-якого кон'югату терапевтично ефективна доза може бути заздалегідь оцінена або в аналізах клітинних культур, або на тваринах з моделлю захворювання, звичайно на гризунах, кроликах, собаках, свинях або приматах. Тварина з моделлю захворювання може бути також використана для визначення відповідних інтервалів концентрацій і способу введення. Така інформація може бути потім використана для визначення придатних доз і способів їх введення людині.

Конкретна ефективна кількість для введення людині буде залежати від тяжкості захворювання, загального стану здоров'я індивідуума, його віку, ваги і статі, режиму харчування, часу і частоти введення, комбінації(й) лікарських засобів, алергічної реакції і толерантності/сприйнятливості до даної терапії. Ця кількість може бути визначена за допомогою рутинного експериментування і виходячи з досвіду лікаря-клініциста. В основному, ефективна доза буде складати від $0,1 \text{ мг/м}^2$ до 50 мг/м^2 , переважно, від $0,4 \text{ мг/м}^2$ до 30 мг/м^2 , а більш переважно, від 2 мг/м^2 до 9 мг/м^2 , де вказана доза обчислена у розрахунку на білковий носій.

Композиції можуть бути введені пацієнту або окремо, або у комбінації з іншими агентами, лікарськими засобами або гормонами. Доза кон'югату "похідне мономерного цитотоксичного лікарського засобу/антитіло", що вводиться, даного винаходу залежить від природи стану, що піддається лікуванню, стадії розвитку злоякісної лімфоми або лейкозу, і від мети введення даного кон'югату, де такою метою може бути попередження захворювання або лікування вже наявного захворювання.

Частота введення дози буде залежати від часу напівжиття даного кон'югату і тривалості його дії. Якщо даний кон'югат має короткий час напівжиття (наприклад, 2-10 годин), то він може бути введений у вигляді однієї або декількох доз на день. Альтернативно, якщо дана молекула кон'югату має тривалий час напівжиття (наприклад, від 2 до 15 днів), то у цьому випадку може виявитися достатнім введення однієї дози на день, однієї дози на тиждень або навіть однієї дози через кожні 1 або 2 місяці.

Композиція може також містити фармацевтично прийнятний носій для введення вказаного кон'югату антитіла. Такий носій сам по собі не повинен індукувати вироблення антитіл, що негативно впливають на індивідуума, який приймає вказану композицію, і не повинен бути токсичним. Придатними носіями можуть бути великі макромолекули з уповільненим метаболізмом, такі як білки, поліпептиди, ліпосоми, полісахариди, полімолочні кислоти, полігліколеві кислоти, полімерні амінокислоти, співполімери амінокислот і неактивні вірусні частинки.

При цьому можуть бути використані фармацевтично прийнятні солі, наприклад, солі мінеральних кислот, такі як гідрохлориди, гідроброміди, фосфати і сульфати, або солі органічних кислот, такі як ацетати, пропіонати, малонати і бензоати.

Фармацевтично прийнятні носії у даних композиціях можуть, крім того, містити рідини, такі як вода, фізіологічний розчин, гліцерин і етанол. Крім того, у таких композиціях можуть бути присутніми домішки, такі як змочувальні або емульгуювальні агенти або речовини, що забуферюють, для корекції рН. Вказані носії дозволяють виготовляти композиції у вигляді таблеток, пілюль, драже, капсул, рідин, гелів, сиропів, зависей або суспензій для їх введення пацієнту.

Переважними формами є форми, придатні для парентерального введення, наприклад, шляхом ін'єкції або вливання, а саме, шляхом ін'єкції ударної дози або безперервного вливання. Якщо даний продукт призначений для ін'єкції або вливання, то він може бути приготований у формі суспензії, розчину або емульсії у масляному або водному носії, і може містити технологічні домішки, такі як агенти, що суспендують, консерванти, стабілізатори і/або диспергуючі агенти.

Хоча стабільність забуферених розчинів кон'югату може забезпечити короточасну стабільність кон'югату, однак вона є недостатньою для забезпечення довготривалої стабільності. Для підвищення стабільності кон'югату і збільшення його терміну дії, кон'югат "антитіло - лікарський засіб" може бути ліофілізований з одержанням сухої форми для подальшого розведення у придатній стерильній рідині перед його використанням. Проблеми, пов'язані з ліофілізацією розчину білка, добре описані у літературі. Під час заморожування і сушіння може відбуватися руйнування вторинної, третинної і четвертинної структури. А тому можуть бути додані криозахисні агенти, які будуть діяти як аморфний стабілізатор кон'югату і будуть зберігати структурну цілісність білка у процесі ліофілізації. В одному з варіантів здійснення винаходу криозахисним агентом, що використовується у даному винаході, є спирт ряду цукрів, такий як альдит, маніт, сорбіт, інозит, поліетиленгліколь та їх комбінації. В іншому варіанті здійснення винаходу вказаним криозахисним агентом є цукрова кислота, включаючи альдонову кислоту, уронову кислоту, альдарову кислоту та їх комбінації.

Кріозахисним агентом даного винаходу може бути також вуглевод. Придатними вуглеводами є альдегідні або кетоніві сполуки, що містять дві або більше гідроксильних групи. Ці вуглеводи можуть бути циклічними або прямими, і такими вуглеводами є, наприклад, альдози, кетози, аміноцукри, альдити, інозити, альдонові кислоти, уронові кислоти, альдарові кислоти або їх комбінації. Таким вуглеводом може бути також моно-, ди- або полівуглевод, такий як, наприклад, дисахарид або полісахарид. Придатними вуглеводами є, наприклад, гліцеральдегіди, арабіноза, ліксоза, пентоза, рибоза, ксилоза, галактоза, глюкоза, гексоза, ідоза, маноза, талоза, гептоза, глюкоза, фруктоза, глюконова кислота, сорбіт, лактоза, маніт, метил- α -глюкопіранозид, мальтоза, ізоаскорбінова кислота, аскорбінова кислота, лактон, сорбоза, глюкарова кислота, еритроза, треоза, арабіноза, алоза, альтроза, гулоза, ідоза, талоза, еритрулоза, рибулоза, ксилулоза, псикоза, тагатоza, глюкуронова кислота, глюконова кислота, глюкарова кислота, галактуринова кислота, мануринова кислота, глюкозамін, галактозамін, сахароза, трегалоза, нейрамінова кислота або їх похідні. Придатними полівуглеводами є, наприклад, арабінани, фруктани, фукани, галактани, галактуронани, глюкани, манани, ксилани (такі як, наприклад, інулін), леван, фукоїдан, карагенан, галактокаролоза, пектини, пектинові кислоти, амілоза, пулулан, глікоген, амілопектин, целюлоза, декстран, пустилан, хітин, агароза, кератин, хондроїтин, дерматан, гіалуринова кислота, альгінова кислота, ксантанова камедь або крохмаль. З них найбільш придатними вуглеводами є сахароза, глюкоза, лактоза, трегалоза та їх комбінації. Особливо переважним криозахисним агентом є сахароза.

Переважним криозахисним агентом даного винаходу є вуглевод або спирт ряду "цукрів", яким може бути багатоатомний спирт. Багатоатомними спиртами є сполуки, що містять більш ніж одну гідроксильну групу. Переважними багатоатомними сполуками є сполуки з прямим ланцюгом. Придатними багатоатомними сполуками є, наприклад, гліколі, такі як етиленгліколь, поліетиленгліколь і поліпропіленгліколь, гліцерин або пентаеритрит, або їх комбінації.

У деяких переважних варіантах здійснення винаходу вказаним криозахисним агентом є сахароза, трегалоза, маніт або сорбіт.

Композиції даного винаходу, після їх приготування, можуть бути безпосередньо введені індивідууму. Індивідуумами, які піддаються лікуванню, можуть бути тварини. Однак переважно, щоб вказані композиції були адаптовані для введення людині.

Композиції даного винаходу можуть бути введені будь-якими способами введення, включаючи, але не обмежуючись ними, пероральне, внутрішньовенне, внутрішньом'язове, внутрішньоартеріальне, інтрамедулярне, інтратекальне, інтравентрикулярне, трансдермальне, черезшкірне (див. публікацію РСТ №WO98/20734), підшкірне, внутрішньочеревинне, інтраназальне, внутрішньошлункове, місцеве, під'язикове, інтравагінальне або ректальне введення. Для введення композицій даного винаходу можуть бути також використані безголкові шприци. Звичайно вказані композиції можуть бути одержані у вигляді препаратів для ін'єкцій або у вигляді рідких розчинів, або у вигляді суспензій. Можуть бути також одержані тверді форми, придатні для приготування розчинів або суспензій у рідких носіях перед їх ін'єкцією.

Пряма доставка даних композицій може бути здійснена, в основному, шляхом підшкірної, внутрішньочеревної, внутрішньовенної або внутрішньом'язової ін'єкції, або така доставка може бути здійснена в інтерстиціальний простір тканини. Дані композиції можуть бути також введені у ділянку ураження. Схема лікування може передбачати введення разової дози або дробних доз.

Потрібно зазначити, що активним інгредієнтом, який входить до складу даної композиції, є кон'югат "цитотоксичний лікарський засіб/білковий носій". Цей кон'югат може піддаватися розкладанню у шлунково-кишковому тракті. Тому, якщо вказану композицію вводять через шлунково-кишковий тракт, то необхідно, щоб вказана композиція містила агенти, які захищали б даний кон'югат від розкладання у шлунково-кишковому тракті, але при цьому забезпечували б вивільнення вказаного кон'югату відразу після його абсорбції у шлунково-кишковому тракті.

Детальне обговорення фармацевтично прийнятних носіїв можна зйати у Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J., 1991).

Більш конкретно, даний винахід відноситься до кон'югату "похідне мономерного каліхеаміцину/гуманізоване анти-CD22 антитіло (G5/44), СМС-544", призначеного для лікування проліферативних розладів, що характеризуються експресією антигену CD22 на клітинній поверхні.

Даний винахід, крім того, відноситься до використання СМС-544 з метою виготовлення композиції або лікарських засобів для лікування проліферативного розладу, що характеризується експресією CD22 на клітинній поверхні.

СМС-544 може бути також використаний у будь-якій терапії, при якій може виявитися бажаним зниження рівня експресії CD22 на клітинній поверхні у індивідуума, який піддається лікуванню описаними тут композиціями або лікарськими засобами. Зокрема, вказану композицію або лікарський засіб використовують для лікування людини або тварин з проліферативними розладами, а саме, з лімфомою і лейкозом, при яких на клітинній поверхні експресується антиген CD22. Ці клітини, що експресують CD22, можуть циркулювати в організмі, або вони можуть бути присутніми у небажано великій кількості у конкретній ділянці організму.

СМС-544 може бути також, що переважно, використаний для лікування В-лімфоцитарних злоякісних пухлин, включаючи лімфоми і лейкоз, а найбільш переважно, неходжкінську лімфому (НХЛ), множинну мієлому, гострий лімфоцитарний лейкоз (ГЛЛ) і хронічний лімфоцитарний лейкоз (ХЛЛ). СМС-544 може бути використаний окремо або у комбінації з іншими біологічно активними агентами для лікування індивідуумів, які страждають В-клітинними злоякісними пухлинами.

Біологічно активними агентами звичайно є фактори росту, цитокіни і цитотоксичні лікарські засоби. Цитотоксичними лікарськими засобами, які звичайно використовуються для лікування проліферативних розладів, таких як рак, і такими засобами, які можуть бути також використані у комбінації з СМС-544, є антрациклін, такий як доксорубіцин, даунорубіцин, ідарубіцин, акларубіцин, зорубіцин, мітоксантрон, епірубіцин, карубіцин, ногаламіцин, меногарил, пітарубіцин і валрубіцин, протягом періоду часу до трьох днів; і піримідиновий або пуриновий нуклеозид, такий як цитарабін, гемцитабін, трифлуридин, анцитабін, еноцитабін, азацидин, доксифлуридин, пентостатин, бруксуридин, капецитабін, кладрибін, децитабін, флоксуридин, флударабін, гугеротин, пуроміцин, тегафур і тіазофуридин. Іншими хімотерапевтичними/протипухлинними агентами, які можуть бути введені у комбінації з СМС-544, є адріаміцин, цисплатин, карбоплатин, циклофосфамід, дакарбазин, вінбластин, вінкрестин, мітоксантрон, блеоміцин, мехлоретамін, преднізон, прокарбазин, метотрексат, фторурацил, етопозид, таксол і різні його аналоги, та мітоміцин. СМС-544 може бути введений одночасно з одним або декількома з вказаних терапевтичних агентів. Альтернативно, СМС-544 може бути введений по чергово з одним або декількома з вказаних терапевтичних агентів.

СМС-544 може бути введений окремо, одночасно або по чергово з комбінацією інших біологічно активних агентів, таких як фактори росту, цитокіни, стероїди, антитіла, такі як анти-CD20 антитіло, ритуксимаб (Rituxan™), і хімотерапевтичних засобів, що використовуються як складова частина схеми лікування. Розроблені схеми лікування злоякісних лімфо-проліферативних захворювань включають: CHOPR (циклофосфамід, доксорубіцин, вінкрестин, преднізон і прокарбазин); CHOP (циклофосфамід, доксорубіцин, вінкрестин і преднізон); COP (циклофосфамід, вінкрестин і преднізон); CAP-BOP (циклофосфамід, доксорубіцин, прокарбазин, блеоміцин, вінкрестин і преднізон); m-BACOD (метотрексат, блеоміцин, доксорубіцин, циклофосфамід, вінкрестин, дексаметазон і лейковорин); ProMACE-MOPP (преднізон, метотрексат, доксорубіцин, циклофосфамід, етопозид, лейковорин, мехлоретамін, вінкрестин, преднізон і прокарбазин); ProMACE-CytaBOM (преднізон, метотрексат, доксорубіцин, циклофосфамід, етопозид,

лейковорин, цитарабін, блеоміцин і вінкрисдин); MACOP-B (метотрексат, доксорубіцин, циклофосфамід, вінкрисдин, фіксована доза преднізону, блеоміцин і лейковорин); MOPP (мехлоретамін, вінкрисдин, преднізон і прокарбазин); ABVD (адріаміцин/доксорубіцин, блеоміцин, вінбластин і дакарбазин); MOPP почергово з ABV (адріаміцин/доксорубіцин, блеоміцин і вінбластин); MOPP (мехлоретамін, вінкрисдин, преднізон і прокарбазин) почергово з ABVD (адріаміцин/доксорубіцин, блеоміцин, вінбластин і дакарбазин); і Ch1VPP (хлорамбуцил, вінбластин, прокарбазин і преднізон). Застосовувана терапія може включати індуктивну фазу Терапії, консолідовану фазу терапії і підтримуючу фазу терапії. СМС-544 може бути також введений окремо, одночасно або почергово з будь-якою з комбінацій, що використовуються у зазначених вище схемах терапії як складова частина індуктивної фази терапії, консолідованої фази терапії і підтримуючої фази терапії.

Кон'югати даного винаходу можуть бути також введені разом з іншими біологічно активними і хіміотерапевтичними агентами, що використовуються як складова частина комбінованої схеми терапії, застосовуваної для лікування рецидивних агресивних лімфом. Такі схеми лікування передбачають використання комбінацій IMVP-16 (іфосфамід, метотрексат і етопозид); MIME (метил-gag, іфосфамід, метотрексат і етопозид); DHAP (дексаметазон, висока доза цитарабіну і цисплатин); ESHAP (етопозид, метилпреднізолон, висока доза цитарабіну і цисплатин); EPOCH (етопозид, вінкрисдин і доксорубіцин, що вводяться протягом 96 годин разом з ударними дозами циклофосфаміду і з преднізоном, що вводиться перорально), SEPP(B) (циклофосфамід, етопозид, прокарбазин, преднізон і блеоміцин); CAMP (ломустин, мітоксантрон, цитарабін і преднізон); CVP-1 (циклофосфамід, вінкрисдин і преднізон); CHOP-B (циклофосфамід, доксорубіцин, вінкрисдин, преднізон і блеоміцин), SEPP-B (циклофосфамід, етопозид, прокарбазин і блеоміцин) і P/DOCE (епірубіцин або доксорубіцин, вінкрисдин, циклофосфамід і преднізон). Додаткові схеми лікування агресивних лімфом можуть включати, у фазі 1, первинну терапію комбінацією CHOP (циклофосфамід, доксорубіцин, вінкрисдин і преднізон)-ритуксимаб (Rituxan™)-СМС-544, а потім, у фазі 2 та у фазі 3, комбінацією CHOP-ритуксимаб (Rituxan™)-СМС-544, CHOP-СМС-544 або CHOP-ритуксимаб (Rituxan™)-СМС-544. Альтернативно, лікування у фазі 1 може передбачати первинну терапію комбінацією COP (циклофосфамід, вінкрисдин і преднізон)-ритуксимаб (Rituxan™)-СМС-544, а потім, у фазі 2 та у фазі 3, комбінацією COP-ритуксимаб (Rituxan™), COP-СМС-544 або COP-ритуксимаб (Rituxan™)-СМС-544. В іншому варіанті здійснення винаходу лікування агресивних лімфом може передбачати первинну або повторну терапію, у фазі 1, з використанням кон'югату СМС-544 "антитіло - лікарський засіб", а потім, у фазі 2 та у фазі 3, комбінацій СМС-544 і CHOP (циклофосфамід, доксорубіцин, вінкрисдин і преднізон), СМС-544 і COP (циклофосфамід, вінкрисдин і преднізон) або СМС-544 і ритуксимабу (Rituxan™), або одного ритуксимабу (Rituxan™). У ще одному варіанті здійснення винаходу, лікування агресивних лімфом у фазі 1 може передбачати первинну терапію кон'югатом СМС-544 "антитіло - лікарський засіб", а потім, у фазі 2 та у фазі 3, одним СМС-544 або у комбінації з іншими схемами лікування, включаючи, але не обмежуючись ними, ESHOP (етопозид, метилпреднізолон, висока доза цитарабіну, вінкрисдин і цисплатин); EPOCH (етопозид, вінкрисдин і доксорубіцин, що вводяться протягом 96 годин з ударними дозами циклофосфаміду і з преднізоном, що вводиться перорально), IMVP-16 (іфосфамід, метотрексат і етопозид), ASHAP (адріаміцин, солюмедрол, Ага-С і цисплатин), MIME (метил-gag, іфосфамід, метотрексат і етопозид) та ICE (іфосфамід, циклофосфамід і етопозид). Докладний опис різних цитотоксичних лікарських засобів, що використовуються у хіміотерапії злоякісних пухлин, включаючи комбіновану хіміотерапію, схему введення доз і т.п., описаних у даній заявці, можна знайти у роботах Cancer Principles and Practice of Oncology, Eds. Vincent T. DeVita, Samuel Hellman, Steven A. Rosenberg, 6th Edition, Publishers: Lippincott, Williams & Wilkins (2001) and Physician's Cancer Chemotherapy Drug Manual, Eds. Edward Chu and Vincent T. DeVita, Publishers: Jones and Bartlett (2002).

Даний винахід також відноситься до способу лікування людини або тварини, яка страждає проліферативним захворюванням, що характеризується експресією CD22 на клітинній поверхні, або попередження проліферативного захворювання у людини або тварини, схильної до ризику розвитку такого захворювання, де вказаний спосіб передбачає введення вказаному індивідууму ефективної кількості СМС-544 даного винаходу.

Даний винахід більш детально описаний на викладених нижче прикладах, які наводяться в ілюстративних цілях і не повинні розглядатися як обмеження об'єму винаходу.

Приклад 1 Генерування антитіл-кандидатів

Панель антитіл проти CD22 була відібрана з гібридом відповідно до наступних критеріїв: зв'язування з клітинами Дауді, інтерналізація на клітинах Дауді, зв'язування з мононуклеарними клітинами периферичної крові (МКПК), інтерналізація на МКПК, афінність (більш ніж 10^{-9} M), продукування мишачого $\gamma 1$ і рівень його продукування. Як переважне антитіло було вибрано антитіло 5/44.

1. Клонування генів і експресія химерної молекули антитіла 5/44

a) Одержання клітин гібридами 5/44 і виділення РНК з цих клітин

Гібридом 5/44 генерували відповідно до стандартної гібридомної техніки після імунізації мишей людським білком CD22. РНК виділяли з клітин гібридами 5/44 з використанням набору RNEasy kit (Qiagen, Crawley, UK; Catalogue №74106). Одержану РНК піддавали зворотній транскрипції у кДНК, як описано нижче.

b) Розподіл CD22 на пухлинах НХЛ

Імуностереохімічне дослідження було проведене з метою оцінки сфери поширення і розподілу забарвлення з використанням моноклональних антитіл анти-CD22 антитіл 5/44. Як контроль у дослідженні, що проводиться для підтвердження ділянок, уражених В-клітинними пухлинами, були включені антитіла проти CD20 і проти CD79a.

Було досліджено всього 50 пухлин, і вони були класифіковані з використанням робочої розробки і систем класифікації REAL наступним чином:

- 7 В-лімфобластних лейкозів/лімфом (High/L)
- 4 В-CLL/дрібноклітинних лімфоцитарних лімфом (Low/A)
- 3 лімфоплазмацитоїдів/імуноцитом (Low/A)
- 1 клітина кори головного мозку (Int/F)

- 14 фолікулярних лімфом (Low-Int/D)
- 13 дифузних великоклітинних лімфом (Int-Low/G, H)
- 6 некласифікованих клітин (K)
- 2 Т-клітинних лімфом

Сорок В-клітинних лімфом були позитивними на антиген CD22, при цьому антитіло 5/44 у концентрації 0,1мкг/мл, а інші шість лімфом стали позитивними при збільшенні концентрації до 0,5мкг/мл. Що стосується інших двох В-клітинних пухлин, які були негативними при 0,1мкг/мл, то кількості тканин для їх тестування при більш високій концентрації виявилось недостатньо. Однак, паралельне тестування з іншим анти-CD22 антитілом, позначеним 6/13 (Celltech, Slough, UK), яке давало більш інтенсивне забарвлення, ніж 5/44, показало, що всі 48 В-клітинних лімфом давали позитивне забарвлення на CD22.

Таким чином, можна зробити висновок, що антиген CD22 широко експресується на В-клітинних лімфомах, а тому він являє собою придатну мішень для імунотерапії НХЛ.

с) ПЛР-клонування V_H і V_L антитіла 5/44

кДНК-послідовності, що кодують варіабельний домен важкого і легкого ланцюгів антитіла 5/44, синтезували з використанням зворотної транскриптази для продукування одноланцюгових кДНК-копій мРНК, присутньої у повнорозмірній РНК. Потім ці послідовності використовували як матриці для ампліфікації послідовностей мишачої V-ділянки з використанням специфічних олігонуклеотидних праймерів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

(i) Синтез кДНК

кДНК синтезували у реакційному об'ємі 20мкл, що містить наступні реагенти: 50мМ Трис-HCl, pH8,3, 75мМ KCl, 10мМ дитіотреїтолу, 3мМ MgCl₂, 0,5мМ dATP, dTTP, dCTP і dGTP, 20 одиниць РНКазину, 75нг рандомізованого гексануклеотидного праймеру, 2мкг РНК 5/44 і 200 одиниць зворотної транскриптази вірусу мишачого лейкозу Молоні. Після інкубування протягом 60 хвилин при 42°C, реакцію припиняли шляхом нагрівання при 95°C протягом 5 хвилин.

(ii) ПЛР

Аліквоти кДНК піддавали ПЛР з використанням комбінацій праймерів, специфічних для важких і легких ланцюгів. Потім пули вироджених праймерів, сконструйовані для відпалу з консервативними послідовностями сигнального пептиду, використовували як прямі праймери. Всі ці послідовності містили, у вказаному порядку, рестрикційний сайт (SM для V_L ; HindIII для V_H), починаючи з 7 нуклеотиду від їх 5'-кінця; послідовність GCCGCCACC (SEQ ID NO:50) для оптимальної трансляції одержаних мРНК; ініціюючий кодон і 20-30 нуклеотидів на основі лідерних пептидних послідовностей відомих мишачих антитіл (Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition, 1991, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health).

3'-праймери конструювали так, щоб вони включали стик J-C каркасної ділянки 4 вказаного антитіла і містили рестрикційний сайт ферменту BsiWI для полегшення клонування ПЛР-фрагменту V_L . 3'-праймери важкого ланцюга являють собою суміш, одержану так, щоб вона охоплювала стик J-C вказаного антитіла. 3'-праймер включав рестрикційний AраI-сайт для полегшення клонування. 3'-ділянка вказаних праймерів містить змішану послідовність, одержану на основі відомих послідовностей мишачих антитіл (Kabat et al., 1991, див. вище).

Комбінації праймерів, описаних вище, дозволяють одержати ПЛР-продукти для V_H і V_L , що клонуються безпосередньо у відповідний вектор, що експресує, (див. нижче) для продукування химерних ("миша-людина") важких і легких ланцюгів, і для їх генів, що експресуються у клітинах ссавців для продукування химерних антитіл потрібного ізо типу.

Інкубування (100мкл) для ПЛР проводили наступним чином. Кожна реакційна суміш містила 10мМ Трис-HCl, pH8,3, 1,5мМ MgCl₂, 50мМ KCl, 0,01% мас/об, желатину, 0,25мМ dATP, dTTP, dCTP і dGTP, 10пмоль 5'-праймерної суміші, 10пмоль 3'-праймеру, 1мкл кДНК і 1 одиницю полімерази Taq. Реакційну суміш інкубували при 95°C протягом 5 хвилин, а потім проводили цикли: 94°C, 1 хвилина, 55°C, 1 хвилина і 72°C, 1 хвилина. Після проведення 30 циклів, аліквоти кожної реакційної суміші аналізували шляхом електрофорезу на агарозному гелі.

Для V-ділянки важкого ланцюга ампліфікований ДНК-продукт одержували лише у тому випадку, коли праймерний пул сигнального пептиду був замінений праймерним пулом, що гібридується на початку каркасної ділянки I. Фрагменти клону вал и у вектори, що секвенують ДНК. ДНК-послідовність визначали і піддавали трансляції з одержанням виведеної амінокислотної послідовності. Цю виведену послідовність підтверджували шляхом порівняння з експериментально визначеною N-кінцевою послідовністю білка. На Фіг.1 показана амінокислотна послідовність CDR мишачого моноклонального антитіла 5/44. На Фіг.2 і 3 показана послідовність ДНК/білка V-ділянок зрілих легкого і важкого ланцюгів мишачого моноклонального антитіла 5/44, відповідно.

(iii) Молекулярне клонування ПЛР-фрагментів

V-ділянки мишачих послідовностей клонували у вектори, що експресують, pMRR10.1 і pMRR14 (Фіг.7 і 8). Ці вектори призначені для експресії ДНК легкого і важкого ланцюга, що кодує константні ділянки людського легкого ланцюга-капа і людського важкого ланцюга гамма-4. V_L -ділянку субклонували у вектор, що експресує, шляхом рестрикційного гідролізу та лігування з вектора, що секвенує, з використанням рестрикційних SfuI-BsiWI-сайтів, внаслідок чого одержували плазмиду pMRR10(544cL) (Фіг.8). ДНК важкого ланцюга ампліфікували за допомогою ПЛР з використанням 5'-праймеру для введення сигнального пептиду, оскільки він не був одержаний при здійсненні стратегії клонування, де використовували лідерну послідовність важкого ланцюга мишачого антитіла, що походить від іншої внутрішньовидової гібридоми (позначеної 162). 5'-праймер мав наступну послідовність: 5'GCGCGCAAGCTTGCCGCCACCATGGACTTCGGAT TCTCTCGTGTTCTGCTGCTCAAGGGAGTGCAGTGTGAGGTGCAG CTCGTGAGTCTGG 3' (SEQ ID NO:51)

Зворотний праймер був ідентичний праймеру, що використовується у клонуванні вихідного гена V_H .

Одержаний ПЛР-продукт гідролізували ферментами HindIII і AраI, субклонували і його ДНК-послідовність підтверджували, внаслідок чого одержували плазмиду pMRR14(544сН) (Фіг.7). Короткочасна ко-трансфекція обох векторів, що експресують, у клітини CHO приводила до генерування химерного антитіла с5/44. Цього було досягнуто з використанням реагенту ліпофектаміну відповідно до протоколів, наведених виробниками (InVitrogen: Life Technology, Groningen, The Netherlands. Catalogue №11668-027).

II. Видалення сайту глікозилювання і реакційноздатного лізину

Потенційна послідовність сайту N-зв'язаного глікозилювання виявлялася в CDR-H2, що має амінокислотну послідовність N-Y-T (Фіг.3). Електрофорез у ДСН-ПААГ, Вестерн-блотинг і вуглеводне забарвлення гелів для антитіла 5/44 і його фрагментів (включаючи Fab) показали, що цей сайт був дійсно глікозильованим (не показано). Крім того, лізиновий залишок спостерігався у положенні, що експонується, у ділянці CDR-H2, що, ймовірно, знижує афінність зв'язування з антитілом завдяки присутності додаткового сайту для кон'югування з агентом, з яким може бути кон'юговане вказане антитіло.

Для введення амінокислотних замін у послідовність CDR-H2 з метою видалення сайту глікозилювання і/або реакційноздатного лізину використовували ПЛР-стратегію, як показано на Фіг.4. Прямі праймери, що кодують мутації N55Q, T57A або T57V, використовували для видалення сайту глікозилювання (Фіг.4), а четвертий прямий праймер, що містить заміну K60R, генерували для видалення реакційноздатного лізинового залишку (Фіг.4). У кожній з цих ПЛР-ампліфікацій використовували зворотний праймер каркасної ділянки 4. ПЛР-продукти гідролізували ферментами XbaI і AраI і вбудовували в pMRR14(544сН) (також розщеплену ферментами XbaI і AраI), внаслідок чого одержували експресійні плазмиди, що кодують ці мутанти. Мутації N55Q, T57A і T57V видаляють сайт глікозилювання шляхом заміни амінокислотної послідовності у консенсусній послідовності N-X-T/S, а мутація K60R приводить до заміни потенційного реакційноздатного лізину аналогічним позитивно зарядженим аргініновим залишком. Одержані плазмідні варіанти сН ко-трансфікували плазмидою сL, внаслідок чого одержували експресовані варіанти химерного антитіла.

III. Оцінка активності химерних генів

Активності химерних генів оцінювали після короткочасної трансфекції у клітини CHO і визначення константи афінності за допомогою аналізу BiaCore.

Афінності химерного 5/44 або його варіантів, в яких був видалений їх сайт глікозилювання або реакційноздатний лізин, досліджували з використанням BIA-технології на зв'язування з конструкціями CD22-mFc. Результати наводяться на Фіг.9. Всі вимірювання щодо зв'язування здійснювали на приладах BIAcore™ 2000 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden). Цей аналіз був здійснений шляхом захоплення CD22mFc за допомогою іммобілізованого антитіла проти мишачого Fc. Це антитіло знаходилося у розчинній фазі. Поверх іммобілізованого антитіла проти мишачого Fc ін'єктували зразки, стандарти і контроль (50мкл), а потім антитіло у розчинній фазі. Після кожного циклу поверхню відновлювали додаванням 50мкл 40мМ HCl при концентрації 30мкл/хв. Кінетичний аналіз проводили з використанням програми BIAevaluation 3.1 (Pharmacia).

Видалення сайту глікозилювання у конструкції T57A приводило до невеликого прискорення асоціації і до значного сповільнення дисоціації у порівнянні з химерним антитілом 5/44, що забезпечувало приблизно 5-разове збільшення афінності. Мутація N55Q не впливала на афінність. Цей результат був несподіваним, оскільки передбачалося, що видалення самого вуглеводу не буде здійснювати помітного впливу на зв'язування (як у випадку заміни N55Q).

Збільшення афінності спостерігалось тільки у випадку заміни T57A. Це можна пояснити тим, що, незалежно від присутності вуглеводу, треонін у положенні 57, який не був видалений після заміни треоніну на аланін, здійснює негативний вплив на зв'язування. Припущення про те, що невеликий розмір аланіну грає важливу роль, і що негативна дія треоніну пов'язана з його розміром, підтверджується результатом, одержаним з використанням мутації T57V, тобто заміна валіном у положенні 57 не давала позитивного ефекту (дані не наводяться).

Видалення лізинового залишку за допомогою мутації K60R мало нейтральний ефект відносно афінності, тобто введення аргінінового залишку приводило до видалення потенційного реакційноздатного сайту, але при цьому не здійснювало негативного впливу на афінність.

Тому введення мутації для видалення сайту глікозилювання і для видалення реакційноздатного лізину було передбачене у протоколі "гуманізації".

Приклад 2

CDR-прищеплення антитіла 5/44

Молекулярне клонування генів варіабельних ділянок важкого і легкого ланцюгів антитіла 5/44 і їх використання для продукування химерних (миша/людина) антитіл 5/44 було описано вище. Нуклеотидні і амінокислотні послідовності доменів V_L і V_H мишачого антитіла 5/44 показані на Фіг.2 і 3 (SEQ ID NO:7 і 8), відповідно. У цьому прикладі показано, що введення CDR у людські каркасні ділянки антитіла 5/44, що проводиться відповідно до методу Adair et al. (заявка PCT №W091/09967), приводить до зниження потенційної імуногенності цього антитіла у людини.

I. CDR-прищеплення легкого ланцюга антитіла 5/44

Зіставлення первинної послідовності білка з консенсусними послідовностями V-ділянки людського легкого ланцюга-каппа підгрупи I вказувало на 64%-ну ідентичність цих послідовностей. Тому для конструювання CDR-прищепленого легкого ланцюга акцепторні каркасні ділянки були вибрані так, щоб вони відповідали ділянкам послідовності людської VK підгрупи I зародкової лінії O12, DPK9. Акцепторна послідовність каркасної ділянки 4 походила від послідовності людської J-ділянки зародкової лінії JK1.

Порівняння амінокислотних послідовностей каркасних ділянок мишачого антитіла 5/44 і акцепторної послідовності проілюстроване на Фіг.5, і це порівняння показало, що між донорними і акцепторними ланцюгами є 27 відмінностей. Для того щоб визначити, чи може мишачий залишок у кожному положенні або у ділянці стику V_H/V_L прямо або опосередковано брати участь у зв'язуванні з антигеном, проводили аналіз на вплив цього залишку на упаковку. Якщо підтверджувалося, що даний мишачий залишок має важливу функцію і значно відрізняється від людського залишку за розміром, полярністю або зарядом, то такий мишачий залишок

був збережений. Виходячи з цього аналізу були сконструйовані два варіанти CDR-прищепленого легкого ланцюга, що мають послідовності, наведені у SEQ ID NO:19 і SEQ ID NO:20 (Фіг.5).

II. CDR-прищеплення важкого ланцюга антитіла 5/44

CDR-прищеплення важкого ланцюга антитіла 5/44 здійснювали відповідно до тієї ж самої стратегії, описаної для легкого ланцюга. Було виявлено, що V-домен важкого ланцюга антитіла 5/44 був гомологічний V-домону людських важких ланцюгів, що належать до підгрупи I (70%-на ідентичність послідовностей), а тому послідовність людської каркасної ділянки VH1-3, DP7 підгрупи I зародкової лінії була використана як акцепторна каркасна ділянка. Акцепторні послідовності каркасної ділянки 4 походили від послідовності людської J-ділянки JH4 зародкової лінії.

Порівняння важкого ланцюга антитіла 5/44 з каркасними ділянками показано на Фіг.6, де можна бачити, що важкий ланцюг антитіла 5/44 відрізняється від акцепторної послідовності у 22 положеннях. Для того щоб визначити, яку роль грає будь-яка з вказаних ділянок у зв'язуванні з антигеном, було сконструйовано 5 варіантів CDR-прищеплених важких ланцюгів, що мають послідовності, наведені у SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 і SEQ ID NO:27 (Фіг.6).

III. Конструювання генів для прищеплених послідовностей

Були сконструйовані гени, що кодують прищеплені послідовності gH1 і gL1, а також були розроблені і сконструйовані серії олігонуклеотидів, що перекриваються, (Фіг.10). Для конструювання генів CDR-прищепленої V-ділянки використовували техніку ПЛР-збирання. Була одержана реакційна суміш в об'ємі 100мкл, що містить 10мМ Трис-HCl, pH8,3, 1,5мМ MgCl₂, 50мМ KCl, 0,001% желатину, 0,25мМ dATP, dTTP, dCTP і dGTP, 1пмоль кожного з "внутрішніх" праймерів (T1, T2, T3, B1, B2, B3), 10пмоль кожного із "зовнішніх" праймерів (F1, R1) і 1 одиницю полімерази Taq (AmpliTaq, Applied BioSystems, № за каталогом N808-0171). 30 циклів ПЛР проводили у наступному режимі: 94°C, 1 хвилина, 55°C, 1 хвилина і 72°C, 1 хвилина. Потім продукти реакції піддавали електрофорезу в 1,5% агарозному гелі, вирізали і виділяли на центрифужних колонках QIAGEN (набір для гель-екстракції QIAquick, № за каталогом 28706). ДНК елювали в об'ємі 30мкл. Потім аліквоти (1мкл) ДНК для gH1 і gL1 клонували у вектор, що клонує, In Vitrogen TOPO TA, pCR2.1 TOPO (№ за каталогом K4500-01) відповідно до інструкцій виробників. Цей вектор, що не експресує, служив як проміжний вектор, що клонує, для полегшення секвенування великого числа клонів. Потім, для ідентифікації "правильних" клонів, що містять gH1 і gL1, проводили ДНК-секвенування з використанням вектор-специфічних праймерів, внаслідок чого одержували плазмідні pCR2.1(544gH1) і pCR2.1(544gL1) (Фіг.11 і 12).

Для створення гуманізованих трансплантатів gH4, 5, 6 і 7 і gL2 використовували метод заміни олігонуклеотидних кластерів. На Фіг.13 проілюстроване конструювання олігонуклеотидних кластерів. Для конструювання кожного варіанту, вектор pCR2.1(544gH1) або pCR2.1(544gL1) розрізали ферментами, що рестрикують (XmaI/SacI для важкого ланцюга, XmaI/BstEII для легкого ланцюга). Великий фрагмент вектора піддавали очищенню на агарозному гелі і використовували для лігування з олігонуклеотидним кластером. Ці кластери складалися з 2 комплементарних олігонуклеотидів (як показано на Фіг.13), змішаних у концентрації 0,5пмоль/мкл в об'ємі 200мкл 12,5мМ Трис-HCl, pH7,5, 2,5мМ MgCl₂, 25мМ NaCl, 0,25мМ дитіоеритрол. Відпал проводили шляхом нагрівання до 95°C протягом 3 хвилин у водяній бані (в об'ємі 500мл), а потім реакційну суміш залишали для повільного охолодження до кімнатної температури. Потім гібридизований олігонуклеотидний кластер десятикратно розводили у воді, а після цього лігували у відповідним чином розрізаний вектор. Для підтвердження одержання потрібної послідовності при конструюванні плазмід pCR2.1(5/44-gH4-7) і pCR2.1(5/44-gL2) проводили ДНК-секвенування. Потім підтверджені прищеплені послідовності субклонували у вектори, що експресують, pMRR14 (важкий ланцюг) і pMR.10.1 (легкий ланцюг).

IV. Активність зв'язування CDR-прищеплених послідовностей з CD22

Вектори, що кодують прищеплені варіанти, ко-трансфікували у клітини CHO у різних комбінаціях разом з вихідними ланцюгами химерних антитіл. Активність зв'язування порівнювали в аналізі на конкурентне зв'язування вихідного мишачого антитіла 5/44 з клітинами Ramos (одержаними з ATCC, лімфобластна клітинна лінія людської лімфоми Беркіта, що експресує на своїй поверхні CD22). Цей аналіз розглядався як найкращий спосіб порівняння здатності трансплантатів до зв'язування з CD22 клітинної поверхні. Результати наведені на Фіг.14 і 15. Як можна бачити, дані трансплантати мали дуже незначні відмінності, і всі вони виявилися більш ефективними, ніж химерні антитіла, при конкуренції з мишачим батьківським антитілом. Введення 3 додаткових людських залишків у кінець CDR-H3 (gH5 і gH7) не здійснювало якого-небудь впливу на зв'язування.

Була відібрана комбінація трансплантатів з найменшим числом мишачих залишків gL1gH7. Трансплантат легкого ланцюга gL1 має 6 донорних залишків. Залишки V2, V4, L37 і Q45, можливо, грають важливу роль в упаковці. Залишок H38 знаходиться у ділянці стику V_H/V_L. Залишок D60 являє собою поверхневий залишок, близький до ділянки CDR-L2 і може безпосередньо брати участь у зв'язуванні з антигеном. З цих залишків залишки V2, L37, Q45 і D60 були виявлені у зародковій лінії у послідовностях генів для людських кап-ланцюгів інших підгруп. Трансплантат важкого ланцюга gH7 мав 4 донорних каркасних залишки (залишок R28 вважався частиною CDR-H1, як було встановлено при визначенні структури, що використовується для CDR-прищеплення (див. Adair et al. (1991), заявка PCT №WO91/09967)). Залишки E1 і A71 являють собою поверхневі залишки, близькі до CDR. Залишок 148 є залишком, який, можливо, бере участь в упаковці. Залишок T93 присутній у ділянці стику V_H/V_L. З цих залишків залишки E1 і A71 знаходяться в інших генах підгрупи I людської зародкової лінії. Залишок 148 знаходиться у підгрупі 4 людської зародкової лінії, а T73 знаходиться у підгрупі 3 людської зародкової лінії.

Послідовності повнорозмірної ДНК і білка для важкого і легкого ланцюгів, включаючи приблизне положення нітронів у генах константної ділянки, присутніх векторах, показані на Фіг.16, і наведені у SEQ ID NO:29 і SEQ ID NO:28, відповідно, для легкого ланцюга, та у SEQ ID NO:31 і SEQ ID NO:30, відповідно, для важкого ланцюга.

З цих векторів вирізали ДНК генів, що кодують вказані легкі і важкі ланцюги. ДНК важкого ланцюга гідролізували у 5'-кінцевому HindIII-сайті, а потім обробляли фрагментом Кленова ДНК-полімерази I E.coli для

затуплення 5'-кінця. Розщеплення в 3'-EcoRI-сайті приводило до утворення фрагмента важкого ланцюга, який виділяли з агарозних гелів. Аналогічним чином був продукований фрагмент легкого ланцюга, який затупляли в 5'-SfuI-сайті та у 3'-EcoRI-сайті. Обидва фрагменти клонували у вектори, що експресують, на основі DHFR і використовували у клітинах CHO для генерування стабільних клітинних ліній.

Приклад 3

Кон'югування NAc-гамма-каліхеаміцин-DMH-AcBut з гуманізованим анти-CD22 антитілом (G5/44)

У типовій реакції кон'югування гуманізоване анти-CD22 антитіло (G5/44) кон'югували з № ацетил-гамма-каліхеаміцин-DMH-AcBut-OSu (похідним каліхеаміцину) (див. Фіг.17), де концентрація потрібного білка складала 7,5мг/мл, а навантаження потрібним похідним каліхеаміцину складало 8,5% за масою білка. pH потрібної реакційної суміші складав $8,5 \pm 0,2$, а потрібні концентрації інших реакційних компонентів складали: 50мМ N-(2-гідроксіетил)піперазин-N'-4-бутансульфонової кислоти (HEPBS), 37,5мМ деканоату натрію і 9об.% етанолу. Реакцію проводили при $33^\circ \pm 2^\circ \text{C}$ протягом однієї години. Результати аналізу цієї типової реакції, що проводиться перед очищенням, були наступними: білок - 7,34мг/мл; навантаження каліхеаміцином - 82,7мкг/мл; агрегація - 93,25% і некон'югований білок (LCF) - 1,07% (% УФ-площі ВЕРХ).

Було проведене тестування дії різних поверхнево-активних домішок та їх концентрацій на вихід і чистоту продукту з метою визначення їх впливу на рівень продукування кон'югованого мономеру (див. таблицю 2). Для цього проводили реакції, в яких всі параметри зберігалися постійними, за винятком конкретної домішки та її концентрації. Кон'югати, одержані у таких реакціях, аналізували на концентрацію білка, навантаження каліхеаміцином, вміст агрегатів і LCF. Хоча всі N-карбонові кислоти, що мають від 6 атомів С (гексаноат) до 12 атомів С (додеканоат), давали прийнятні результати, однак, найкращі результати (низький вміст LCF, низький вміст агрегатів і високий вихід мономерного кон'югату) були одержані з використанням деканоату у концентрації від 30мМ до 50мМ.

Таблиця 2

Вплив домішок конкретного типу та їх концентрацій на результати кон'югування

Домішка/концентрація	Вихід білка (% виходу)	Процент агрегатів	Процент LCF
Гексаноат - 500мМ	51,3	3,36	38,3
Гептаноат - 400мМ	49,9	4,7	20,6
Октаноат - 200мМ	57,3	3,27	10,6
Наноноат - 100мМ	54,7	1,41	0,3
Деканоат - 50мМ	56,7	1,35	0,2
Ундеканоат - 20мМ	46,9	2,95	0,6
Додеканоат - 50мМ	65,6	0,78	7,0

Приклад 4

Спосіб хроматографічного очищення

1. Способи хроматографічного розподілу

Хоча бутилсефароза 4 Fast Flow була ідентифікована як найкраще ГФХ-середовище, однак прийнятні результати могли бути одержані з невеликими змінами хроматографічних умов, які полягали у використанні інших смол, таких як октилсефароза Fast Flow, PPG-600C (Tosoh Biosep), Fractogel EMD Propyl (EM Processing) і Source 15ISO (Amersham Biosciences Piscataway, NJ).

Вихідним матеріалом для очищення була реакційна суміш для кон'югування, що містить 7,2мг/мл білка при навантаженні похідним каліхеаміцину 83мкг/мг; при цьому вміст агрегатів складав 10,1% (процент площі ВЕРХ), а вміст LCF складав 5,6% (процент площі ВЕРХ).

Після завершення реакції кон'югування, реакційну суміш чотириразово розводили шляхом додавання розчину фосфату калію до кінцевої концентрації фосфату 0,7М (pH8,2). Після змішування, розчин фільтрували через фільтри 0,45 мікрон. Розведений розчин завантажували на колонку з бутилсефарозою 4 Fast Flow. Загальна кількість білка, завантаженого на цю колонку, складала 29мг на один мл об'єму шару. Після промивання 0,7М фосфатом калію колонку елюювали ступінчастим градієнтом 0,7М - 4мМ фосфату калію, pH8,2. Фракції, елюювані у ступінчастому градієнті, об'єднували для подальшої обробки, при цьому одержаний пул складався з мономерного кон'югату, де вміст агрегату і LCF складав менше, ніж 1 процент за площею. Цей пул завантажували на колонку, що знесолює, з сефадексом G-25 (Amersham Biosciences) для заміни на буфер, що придатний для даного препарату і містить 20мМ Трис-HCl і 100мМ хлориду натрію при pH8,0. Очищений із заміною буфера препарат СМС-544 володів наступними властивостями: навантаження каліхеаміцином складало 81мкг/мг; вміст агрегату - 0,4% (процент площі ВЕРХ); а LCF - 0,8% (процент площі ВЕРХ).

Приклад 5

Аналіз на зв'язування імунокон'югату NAc-гамма-каліхеаміцин-DMH-AcBut-G5/44 (СМС-544)

Імунокон'югат гуманізованого анти-CD22 антитіла (G5/44) з каліхеаміцином (СМС-544), одержаний описаним вище способом кон'югування, аналізували у тесті на зв'язування, який проводили для того, щоб визначити, чи здійснює кон'югат, одержаний вдосконаленим способом, який-небудь негативний вплив на зв'язування з антигеном. У таблиці 3 показано, що вказана процедура кон'югування не впливає на афінність зв'язування вказаного антитіла з антигеном. Імунокон'югат СМС-544, одержаний або старим, або новим способом кон'югування, зв'язувався з антигеном-мішенню з аналогічними афінностями, які не відрізнялися від афінності некон'югованого антитіла G5/44.

Таблиця 3

Афінності зв'язування СМС-544, одержаного відповідно до технології кон'югування СМА-676 і СМС-544

анти-CD22 антитіло	K_D (М)	K_A (1/М)	k_d (1/с)	k_a (1/Мс)	Процент LCF
Гуманізоване антитіло G5/44	$1,30 \times 10^{-10}$	$7,90 \times 10^9$	$2,80 \times 10^5$	$2,20 \times 10^5$	100
СМС-544 (21мкг/мг) (процедура СМА-676)	$1,20 \times 10^{-10}$	$8,10 \times 10^9$	$6,10 \times 10^5$	$4,90 \times 10^5$	25
СМС-544 (87мкг/мг) (процедура СМС-544)	$1,50 \times 10^{-10}$	$6,60 \times 10^9$	$6,90 \times 10^5$	$4,60 \times 10^5$	3,3

Біосенсорні аналізи проводили з використанням BIAcore 200 (BIAcore AB, Uppsala, Sweden). CD22mFc піддавали ковалентній іммобілізації на біосенсорному чіпі, покритому карбоксиметильованим декстраном, активованим N-гідроксисукцинімідом, (СМ5), з використанням стандартного методу хімічного зв'язування з аміном при щільності білка приблизно 2000 резонансних одиниць. Зразки СМС-544 або G5/44 розводили у буфері HBS (10мМ HEPES, рН7,4, що містить 150мМ NaCl, 3мМ EDTA і 0,005% полісорбату 20 (об./об.)) і наносили у концентрації 1-100нМ на CD22mFc-сенсibilізовану поверхню біосенсорного чіпу при швидкості потоку 30мкл/хв. протягом 3 хвилин для здійснення зв'язування. Після закінченні стадії зв'язування проводили моніторинг дисоціації зв'язаного антитіла шляхом промивання чіпу буфером HBS протягом 15 хвилин. Антигенну поверхню регенерували шляхом промивання біосенсорного чіпу 15мкл регенерувального буфера (10мМ NaOH і 200мМ NaCl) протягом 30 секунд, з подальшою стабілізацією протягом 2 хвилин, а потім проводили наступний цикл. Кінетичні константи обчислювали за допомогою нелінійного регресійного аналізу методом найменших квадратів з використанням 1:1-моделі Langmuir для побудови кривої зв'язування з використанням програми BIAevaluation (version 3.0, BIAcore). Зв'язування СМС-544 з антигеном оцінювали за допомогою аналізу методом поверхневого плазмонного резонансу з використанням CD22mFc, ковалентно іммобілізованого на біосенсорному чіпі. Результати кінетичних аналізів на зв'язування СМС-544 і G5/44 з CD22mFc показали, що на основі даних, одержаних виходячи з 1:1-моделі зв'язування Langmuir з урахуванням перенесення маси, можна зробити висновок, що як СМС-544, так і некон'юговане антитіло G5/44 зв'язувалися з CD22 з аналогічною афінністю (СМС-544:CD22, $K_D=200$ нМ; G5/44:CD22, $K_D=235$ нМ). Кон'югування з каліхеаміцином не впливало на здатність G5/44 ефективно зв'язуватися з CD22mFc.

Зв'язування СМС-544 і G5/44 з CD22, що експресується на поверхні В-клітинних лімфом, також оцінювали за допомогою проточної цитометрії. У цьому способі оцінки були використані анти-CD3 mAb, антитіло гемтузумаб (hP67.6), і його кон'югат з каліхеаміцином СМА-676 (gemtuzumab ozogamicin) як контроль, що відповідає кожному ізотипу. Як позитивний контроль використовували ритуксимаб (Rituxan™), химерне антитіло "людський IgG1 - mAb проти людського CD20". Як негативний контроль також використовували очищене людське поліклональне IgG1 і IgG4. Зв'язування СМС-544 і G5/44 з CD22 на клітинах Ramos або RL-BCL було аналогічним і відрізнялося від зв'язування людського поліклонального IgG4. Клітини RL-BCL виявляли менший рівень експресії CD22 на своїй поверхні, ніж клітини BCL Ramos. На противагу цьому, зв'язування СМА-676 або gL1gH7 з будь-якими BCL було аналогічним зв'язуванню людського поліклонального IgG4, що відповідало відсутності у них експресії CD33 (дані не наводяться). Ті ж самі клітини продемонстрували високі рівні зв'язування з анти-CD20 ритуксимабом (Rituxan™). На-відміну від hP67.6 і СМА-676, ні СМС-544, ні G5/44 не виявляли якого-небудь зв'язування з CD22, CD33⁺-клітинами лейкозу HL-60 (дані не наводяться). Ці результати дають основу припустити, що кон'югування G5/44 з каліхеаміцином не впливає на його специфічність до антигену. СМС-544 специфічно розпізнає CD22 на В-клітинах людини, але не на В-клітинах мишей, щурів, собак, свиней або приматів (собакоподібних мавп і макак-резусів) (дані не наводяться).

Приклад 6

Аналіз in vitro та in vivo ефектів СМС-544

1. In vitro-цитотоксичність

Було проведено порівняння впливу СМС-544, одержаного з використанням способів СМА-676 і СМС-544, на in vitro ріст клітинних ліній CD22⁺-В-клітинної лімфони, RL, Daudi, Raji і Ramos. Для визначення неспецифічного зв'язування даного кон'югату з антигеном використовували кон'югат відповідного ізотипу, націленого на людський CD33 (СМА-676). Використання некон'югованого N-Ас-гамма-каліхеаміцин-DMH (лікарський засіб, що вивільняється з кон'югату після гідролізу кислотою) у даному аналізі показало, що кожна з цих клітинних ліній була чутлива до летальних ефектів каліхеаміцину. У таблиці 4 наведені результати даних аналізів, де одержані оцінки виражені виходячи з еквівалентності каліхеаміцину; а у таблиці 5 наводяться результати, виражені як концентрації кон'югованого білка антитіла. CD22-опосередкована доставка каліхеаміцину до CD22-клітин була, принаймні, у 10 разів більш ефективною відносно цитолізу клітин-мішеней, ніж сам некон'югований лікарський засіб. Контрольні кон'югати відповідного ізотипу (СМА-676) виявляли цитотоксичність, яка була меншою, ніж цитотоксичність некон'югованого похідного каліхеаміцину або аналогічна даній цитотоксичності. З таблиці 4 видно, що кон'югат, одержаний способом кон'югування СМС-544, може генерувати еквівалентний цитотоксичний ефект при менших концентраціях антитіла, ніж кон'югат, одержаний способом кон'югування СМА-676.

Таблиця 4

Інгібування росту кон'югованим каліхеаміцином (IC_{50} пМ каліхеаміцину)

Лінії В-клітинної лімфони	СМС-544-технологія одержання СМС-544 Навантаження: 65мкг/мг	СМА-676-технологія одержання СМС-544 Навантаження: 35мкг/мг	Негативний контроль СМА-676 Навантаження: 35мкг/мг	N-ацетил-гамма-каліхеаміцин-DMH
---------------------------	---	---	--	---------------------------------

RL #1	6	30	600	226
#2	12	40	400	270
Daudi #1	21	80	1886	260
Raji #1	500	ND*	2800	460
#2	560	520	4100	490
Ramos #1	200	130	ND	700
#2	260	ND	ND	1000

* ND - не визначали

Таблиця 5

Інгібування росту кон'югованим антитілом (IC ₅₀ мг/мл антитіла)				
Лінії В-клітинної лімфоми	СМС-544-технологія одержання СМС-544 Навантаження: 65мкг/мг	СМА-676-технологія одержання СМС-544 Навантаження: 35мкг/мг	Негативний контроль СМА-676 Навантаження: 35мкг/мг	Контрольне антитіло G5/44
RL #1	0,09	0,86	17,14	>100
#2	0,18	1,14	11,43	>100
Daudi #1	0,32	2,29	53,89	>100
Raji #1	7,69	ND*	80,00	>100
#2	8,62	14,86	117,14	>100
Ramos #1	3,08	3,71	ND	>100
#2	4,00	ND	ND	>100

* ND - не визначали

Цитотоксичність in vivo. Кон'югат СМС-544, одержаний способом СМС-544, був потім оцінений у ксенотрансплантатах В-клітинної лімфоми. У цих дослідженнях використовували дві пухлини В-клітинної лімфоми RAMOS і RL. RL-лімфома являла собою клітинну лінію, що походить від НХЛ і не відноситься до лімфоми Беркіта, а лімфома RAMOS походить від лімфоми Беркіта. У репрезентативному експерименті, проілюстрованому на Фіг.18, було показано, що СМС-544 і його мишаче антитіло-аналог є ефективними інгібіторами дозозалежного росту В-клітинної лімфоми RAMOS.

Було показано, що кон'югат гуманізованого антитіла є більш ефективним, ніж його мишачий аналог. У цьому дослідженні, найменша доза кон'югату каліхеаміцину, яка дає значне інгібування росту лімфоми, включала 10мкг/кг кон'югованого НАс-гамма-каліхеаміцин-DMH. На протипагу цьому, некон'юговане антитіло G5/44 при концентрації 10мг/кг, що вводиться внутрішньочеревинно за такою ж схемою, як і кон'югати, не здійснювало ніякого впливу на ріст пухлини.

Аналогічні дослідження проводили з використанням моделі RL-лімфоми. У таблиці 6 проілюстровані комбіновані аналізи трьох незалежних експериментів, в яких оцінювали протипухлинну дію СМС-544 на RL-пухлини НХЛ, що розвиваються у "голих" мишей і які досягають розміру 300-400мг. Введення СМС-544, в залежності від дози, приводило до зворотного розвитку пухлини протягом 3-тижневого періоду. Мінімально ефективна доза СМС-544 для моделі RL-лімфоми була встановлена виходячи зі статистичних аналізів у цих дослідженнях і складала 20мкг/кг з розрахунку на вміст каліхеаміцину. У будь-якому з цих трьох досліджень летального кінця не спостерігалось. Більш високі дози (60-320мкг/кг) СМС-544 приводили майже до повного зникнення RL-лімфоми. Загалом, результати одержані для цих двох моделей В-клітинних лімфом, чітко продемонстрували здатність СМС-544 викликати зворотний розвиток пухлини.

Таблиця 6

Протипухлинна дія СМС-544 на ксенотрансплантати RL-НХЛ у "голих" мишей

Доза каліхеаміцину, мг/кг	Середній відносний ріст пухлини ¹	% T/C ²	Р-величина у порівнянні з носієм ³
Носій	6,74	-	-
20	2,87	43	0,001
40	1,34	20	<0,001
60	0,58	9	<0,001
80	0,54	8	0,001
160	0,21	3	<0,001
320	0,10	1	<0,001

Відносний ріст пухлини (RTG) був обчислений для кожної тварини за формулою (маса пухлини через 3 тижні/маса пухлини на день 1)

² 100* (середній RTG для дози СМС-544/середній RTG для групи, якій вводили носій

³ р-величина, одержана із застосуванням одностороннього т-критерію для порівняння СМС-544 з носієм з використанням рангового перетворення TRG як "відгуку". Величина похибки для всіх т-критеріїв, одержана виходячи з об'єднаної оцінки дисперсії, s² для всіх тест-груп (s²=154,54)

Були також проведені дослідження здатності СМС-5,44, одержаного відповідно до нової процедури, до інгібування росту великих укорінених трансплантатів В-клітинної лімфоми, з використанням моделей лімфоми RAMOS і RL. Ці пухлини росли і розвивалися до пухлинної маси 1,5 або 2г, після чого СМС-544 або кон'югат негативного контролю, з антитілом відповідного ізо типу, (СМА-676) внутрішньочеревинно вводили при дозі кон'югованого каліхеаміцину 160мкг/кг відповідно до вихідної схеми введення доз у дні 1, 5 і 9. Раніше було показано, що та ж сама схема введення доз приводила до дуже тривалої ремісії пухлин невеликих розмірів (див. таблицю 6). Як показано на Фіг.19, введення СМС-544 мишам, що мають великі лімфоми RAMOS, приводило до поступового зменшення маси вже наявної лімфоми, а на день 20, у 3 з 4 мишей з пухлиною ці пухлини зникали. Моніторинг мишей, у яких були відсутні пухлини, аж до 50-го дня не виявляв якого-небудь рецидиву лімфоми RAMOS. На противагу цьому, контроль відповідного ізо типу, СМА-676, не здійснював якого-небудь впливу на ріст пухлини. Чотири з п'яти СМА-676-оброблених мишей з великими пухлинами умертвили на 15-й день, оскільки маса цих пухлин досягала майже 15% від їх маси тіла.

Аналогічний експеримент з використанням СМС-544 був проведений на моделі RL-лімфоми. Внутрішньочеревинне введення СМС-544 у дозі 160мкг/кг за схемою, аналогічною описаній вище, приводило до >90% зниження маси вже наявної RL-лімфоми через 30 днів. Однак на 45 день у 2 мишей цієї групи з лімфомами, що майже зникли, спостерігався рецидив пухлини. Ці результати показали, що СМС-544 може викликати зворотний розвиток невеликих, а також великих укорінених лімфом. У невеликому числі досліджень, не описаних у даній заявці, RL-лімфоми, які знову виявляли спорадичний ріст після початкової СМС-544-індукованої регресії, знову піддавали обробці СМС-544. Ці дослідження показали, що RL-пухлини залишалися ще сприйнятливими до другого курсу лікування, яке проводиться з використанням СМС-544, і знову виявляли зворотний розвиток. Таким чином, обробка кон'югатом СМС-544 може бути ефективною проти В-клітинних лімфом як невеликого, так і великого розміру, при цьому може бути проведена повторна терапія.

II. Порівняння *in vivo* кон'югату, одержаного способами кон'югування СМА-676 і СМС-544

На Фіг.20 наведені результати репрезентативного експерименту, в якому мишам, що мають дисеміновану RL-лімфому, вводили дві різні дози (80 і 320мкг/кг кон'югованого каліхеаміцину) СМС-544, одержаного з використанням способу кон'югування СМА-676 і способу кон'югування СМС-544, відповідно до стандартної схеми введення доз. Як і очікувалося, протипухлинна ефективність, що спостерігається, була дозозалежною, і при цьому не спостерігалася ніякої відмінності в ефективностях двох вказаних препаратів СМС-544. На противагу цьому, некон'югований N-ацетил-гамма-каліхеаміцин-ОМН, що вводиться внутрішньочеревинно у концентрації 160мкг/кг, був неактивним. Однак необхідно підкреслити, що для кожної дози кон'югованого каліхеаміцину кількість білка антитіла, що вводиться у формі кон'югату СМС-544, одержаного способом СМА-676, у 4 рази перевищувала кількість СМС-544, одержаного способом СМС-544. Оскільки за продукування протипухлинного ефекту, в основному, відповідальний вміст каліхеаміцину у даному кон'югаті, то для доставки необхідної кількості каліхеаміцину за допомогою кон'югату, одержаного за новою технологією, може бути потрібна набагато менша кількість антитіла, що націлює. Фактично збільшення навантаження кон'югату, одержаного способом СМС-544, стало можливим завдяки відсутності значної кількості низькокон'югованої фракції (LCF).

III. Обробка пухлин, резистентних до ретуксимабу (Rituxan™)

Крім того, необхідно відповісти на наступне питання: чи залишаються зростаючі В-клітинні лімфоми, після припинення їх обробки комерційно доступним анти-CD22 антитілом ритуксимаб (Rituxan™), сприйнятливими до обробки СМС-544. З цієї метою RL-лімфоми, що розвиваються (недисеміновані), обробляли ритуксимабом (Rituxan™) протягом трьох тижнів. При продовженні терапії ритуксимабом (Rituxan™) ріст RL-лімфоми інгібувався. Після припинення терапії ритуксимабом (Rituxan™) спостерігався швидкий ріст RL-лімфом до досягнення ними маси ~1г, і на цій стадії дані лімфоми внутрішньочеревинно обробляли дозою СМС-544, що складає 160мкг/кг. Як показано на Фіг.21 і 22, дані RL-лімфоми залишалися ще сприйнятливими до СМС-544, при цьому 80% мишей не мали пухлин на 60-й день. Таким чином, СМС-544, при його введенні у трьох дозах, міг приводити до зникнення В-клітинних лімфом, які лише придушувалися і-при безперервному введенні доз ритуксимабу (Rituxan™).

Приклад 8

In vitro та *in vivo* ефект СМС-544

I. Дослідження на зв'язування і токсичність

СМС-544 оцінювали на його зв'язування з CD22, а також на його активність в *in vitro* та *in vivo*-моделях. СМС-544 також порівнювали з СМА-676, з контрольним кон'югатом hP67.6 для відповідного ізо типу (IgG4), в якому каліхеаміцин був зв'язаний з AcBut, і з ритуксимабом (Rituxan™), тобто химерним антитілом IgG1-анти-CD20 mAb (IDEC Pharmaceuticals. San Diego, CA), яке є комерційно доступним і було придбане у Medworld Pharmacy (Chestnut Ridge, NY). У дослідженнях на зв'язування домену G5/44 були використані наступні антитіла: BU12 (Celltech, Slough, UK); BLCAM, HD239 (Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA); RFB-4 (Ansell Corp, Bayport, MM); SHCL-1, Leu 14 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ); 4KB128 і To15 (Dako Corp, Carpinteria, CA); M6/13 і M5/44 (Celltech, Slough, UK). Іншими антитілами, що використовуються у дослідженнях з блокування, є SJ10 (Immunotech, Fullerton, CA) і M17.1.1, M19.1.1, M38.1.1 (Celltech, Slough, UK). Клітинні лінії, що використовуються для досліджень, включаючи клітинну лінію (CRL-1923) лімфоми Беркіта Ramos і клітинну лінію неходжкінської лімфоми (НХЛ) RL (CRL-2261), були взяті з Американської колекції типових культур. Ці клітинні лінії не містили мікоплазми, як було визначено за допомогою аналізу на детекцію мікоплазми шляхом проведення полімеразної ланцюгової реакції (ATCC, Manassas, VA). Клітинні лінії підтримували у вигляді суспензійних культур у середовищі RPMI, що містить 10% PBS, 10мМ HEPES, 1мМ пірувату натрію, 0,2% глюкози, 100од/мл пеніциліну G, що містить натрій, і 100мкг/мл сульфату стрептоміцину.

Для того щоб визначити, чи може антитіло G5/44 інгібувати зв'язування мишачих mAb, що володіють відомою специфічністю, з CD22, проводили BIAcore-аналіз з використанням Fc-CD22, іммобілізованого на чіпі

CM5 BIAcore. Було проведено порівняння одиниць поверхневого плазмонного резонансу (RU), одержаних без попереднього насичення іммобілізованим Fc-CD22 антитілом G5/44. Аналіз на біомолекулярну взаємодію проводили з використанням BIAcore 2000. Антитіла пропускали над поверхнею "сліпого" контролю (проточна кювета 1, що служить як контроль, незв'язаний білок) і над тест-поверхнею Fc-CD22 (проточна кювета 2), іммобілізованого на сенсорному чіпі CM5 за допомогою хімічного зв'язування з аміном до рівня 9,042 RU. Одержана у результаті сенсорограма являє собою відповідь (RU) на проточний кюветі 2 мінус відповідь (RU) на проточний кюветі 1. Другу сенсорограму одержували шляхом попереднього насичення проточної кювети антитілом G5/44 (100мкг/мл) перед введенням мишачих mAb проти CD22, які були заздалегідь охарактеризовані на їх зв'язування. Відразу після вимірювання G5/44-відповіді, мишачі анти-CD22 mAb були окремо введені шляхом перфузії без видалення G5/44. Також реєстрували другу комбіновану відповідь, що продукується зв'язуванням мишачого анти-CD22 антитіла з G5/44-сенсифілізованим CD22. Якщо мишаче антитіло зв'язується з CD22 у сайтах, що не відносяться до сайтів, зайнятих G5/44, то такі комбіновані відповіді повинні бути адитивними. Якщо зв'язування G5/44 з CD22 перешкоджає зв'язуванню або запобігає зв'язуванню з "другим" антитілом, то такі комбіновані відповіді не повинні бути адитивні. Кожне з вимірювань другої комбінованої відповіді було скориговане на "дисоціацію" взаємодії G5/44:CD22.

G5/44 блокувало зв'язування тільки тих антитіл, які зв'язувалися з епітопом A/Ig-подібним доменом 1 CD22 (SHCL1 Leu 14 і HD239), що вказувало на те, що антитіло G5/44 також зв'язувалося у даному домені з CD22. Антитіла, які зв'язувалися з епітопом B/Ig- подібним доменом 3 CD22 (RFB-4), з епітопом C/Ig-подібним доменом 4 CD22 (To 15) і з Ig-подібним доменом 2 CD22 (4KB 128), не блокувалися антитілом G5/44. Ці результати показали, що G5/44-зв'язувальний сайт на CD22 розташований у першому Ig-подібному домені, оскільки він запобігав зв'язуванню тих анти-CD22 mAb, які розпізнавали перший Ig-подібний домен CD22 (епітоп A). Інше анти-CD22 антитіло, M6/13 (Celltech, Slough, UK), з невідомою субспецифічністю, також блокувалося антитілом G5/44 (Celltech, Slough, UK), на що вказувало картування сайту зв'язування M6/13 з епітопом A/Ig-подібним доменом 1 CD22. Антитіло M5/44, мишаче батьківське антитіло G5/44, яке володіло такою ж специфічністю, як і G5/44, інгібувало зв'язування з G5/44 і служило як позитивний контроль. У цих дослідженнях, анти-CD19 антитіло BU12 служило як негативний контроль. Результати систематизовані у Таблиці 7.

Таблиця 7

Зв'язування мишачого анти-CD22 mAb,
що володіє визначеною специфічністю, з Fc-CD22, заздалегідь обробленим G5/44
Відповідь на зв'язування, виражена в одиницях поверхневого плазмонного резонансу (RU)

Антитіло	Епітоп CD22 для Ig-домену	Відповідь 1 у присутності G5/44	Відповідь 2 після зв'язування 2-го анти-CD22 mAb	Відповідь 3 (від повідь 2-1)	Відповідь 3, скоригована "дисоціацію" G5/44	Зв'язування 2-го mAb без G5/44, скориговане на фон	Інгібування антитілом G5/44 (%)
Анти-CD22, SHCL-1 Leu 14	A 1,2	654,3	579,8	-74,5	9	29,3	69
Анти-CD22 HD239	A 1	710,5	628,7	-81,8	1,7	19,3	91
Анти-CD22 M 6/13	? ?	710,0	652,7	-57,3	26,2	152,4	83
Анти-CD22 RFB-4	B 3	703,5	1108,5	405	488,5	534	9
Анти-CD22 4KB 128	? 2	691,0	1343,5	652,5	736,0	738,8	0
Анти-CD22 To 15	C 4	676,9	1163,6	486,7	570,2	614,6	7
Анти-CD22 M 5/44	Позитивний контроль	725,1	679,3	-45,8	37,7	613,9	94
Анти-CD19 BU12	Негативний контроль	686,2	602,7	-83,5	0	0	0

З використанням мишачих mAb, що мають окремі домени з відомою специфічністю до CD22, були проведені дослідження на здатність G5/44 блокувати зв'язування цих антитіл з В-клітинами. Крім того були також проведені дослідження на здатність mAb блокувати зв'язування G5/44 з В-клітинами. У цих дослідженнях 1×10^5 клітин RAMOS були спочатку оброблені мишачим анти-CD22 антитілом (10мкг/мл гуманізованого G5/44 або мишачого моноклонального антитіла проти CD22) протягом 1 години при 4°C, а потім ці клітини обробляли антитілом G5/44 (10мкг/мл). Клітини інкубували ще 1 годину при 4°C. Після обробки антитілом, В-клітини осаджували і промивали PBS-1% BSA, після чого додавали відповідне "друге" антитіло (або ФІТЦ-мічене козяче антилюдське антитіло (важкий і легкий ланцюг), або ФІТЦ-мічене козяче антимишаче антитіло (важкий і легкий ланцюг)) при концентрації 100мкл, розведене 1:100 у PBS-1% BSA, протягом 30 хвилин при 4°C. Клітини знову осаджували, промивали, ресуспендували у PBS-1% BSA і додавали у пробірку, що містить 250мкл PBS-1% формальдегіду. Інтенсивність флуоресценції, асоційовану з клітинами, вимірювали за допомогою проточної цитометрії на проточному цитометрі BD FACSort.

Результати показали, що попередня обробка CD22⁺-В-клітин антитілом G5/44 приводила до значного інгібування подальшого зв'язування анти-CD22 mAb M5/44 і M6/13. На противагу цьому, зв'язування анти-CD22 mAb RFB4, To15, HD239 і 4KB з В-клітинами не інгібувалося антитілом G5/44. За допомогою проточної цитометрії була встановлена відсутність значимого інгібування антитілом G5/44 зв'язування HD239 з В-клітинами, що виявилось досить несподіваним, особливо тому, що аналіз BIAcore вказував на здатність G5/44 блокувати зв'язування HD239 і CD22. Відсутність сильного інгібування зв'язування HD239 антитілом G5/44 можна пояснити відмінностями їх відносних афінностей по відношенню до CD22. Дослідження на здатність згаданих вище анти-CD22 mAb інгібувати зв'язування G5/44 з CD22⁺-В-клітинами, показало, що SHCL1 і M6/13, але не інші анти-CD22 mAb, інгібували зв'язування G5/44. Епітопи зв'язування HD239 і SHCL1 були картовані по першому Ig-подібному домену CD22. Однак епітопи, розпізнавані M6/13 або M5/44, не були картовані. Дослідження щодо блокування, детально описані вище, показали, що згадані вище антитіла розпізнають епітопи, локалізовані на першому Ig-подібному домені CD22, які відомі під загальною назвою епітоп А.

Двадцять тисяч клітин Ramos інкубували з різними дозами СМС-544 у присутності та за відсутності ритуксимабу (RituxanTM) протягом 96 годин. Через 96 годин життєздатність клітин визначали за витісненням йодиду пропідію в аналізі, що проводиться за допомогою проточної цитометрії. Потім обчислювали середню життєздатність клітин у 3-6 ямках, і для кожної обробки обчислювали дозозалежне інгібування життєздатності клітин. Фонове інгібування життєздатності клітин обчислювали виходячи з нульової концентрації СМС-544. Для того щоб визначити, чи здійснює СМС-544 статистично значимий дозозалежний інгібуючий вплив на ріст клітин Ramos при дозі близько від 0,01 до 3 нг каліхеаміцин-ОМН/мл, проводили логістичний регресійний аналіз. Логістичну регресію також використовували для того, щоб визначити, чи є взаємодія СМС-544 з ритуксимабом (RituxanTM) статистично значимою. Були також обчислені середні інгібуючі концентрації (IC₅₀) і були зареєстровані ефективності кожної обробки у порівнянні з обробкою одним антитілом СМС-544. Статистичний аналіз проводили з використанням програми PROBIT у статистичній аналітичній системі (SAS, version 8.2).

Результати досліджень показали, що СМС-544 здійснює дозозалежний інгібуючий вплив на ріст клітин Ramos при дозі близько від 0,01 до 3 нг каліхеаміцин-ДМН/мл. Середні інгібуючі концентрації (IC₅₀) одного СМС-544 складають 0,029 нг/мл. Для того, щоб визначити, чи є взаємодія ритуксимабу (RituxanTM) з цитотоксично активним СМС-544 статистично значимою, до СМС-544-оброблених клітин додавали ритуксимаб (RituxanTM) у концентраціях 2, 20 і 200 мкг/мл. Ритуксимаб (RituxanTM), доданий окремо без СМС-544 у концентрації 20 і 200 мкг/мл, не здійснював значимого впливу на ріст клітин (111,7% і 94,0%, ріст клітин і носій, відповідно). У комбінації з СМС-544, всі три концентрації ритуксимабу (RituxanTM) продукували статистично значимі (p<0,05) зсуви ліворуч нахилу кривої і відрізка, що відсікається, дозозалежної кривої для СМС-544. Комбінація з концентраціями 2 і 200 мкг/мл ритуксимабу продукувала найбільші зсуви на дозозалежній кривій. Ці 2 криві статистично не відрізнялися одна від одної, але мали значимі відмінності (p<0,05) у порівнянні з кривою, побудованою для комбінації з дозою 20 мкг/мл. Друге дослідження (дані не наводяться) підтвердило результати, одержані у першому дослідженні. Середні інгібуючі концентрації для комбінацій 2, 20 і 200 мкг/мл ритуксимабу (RituxanTM) плюс СМС-544 складали 0,0072, 0,0081 і 0,0072 нг/мл, відповідно. Середні інгібуючі концентрації СМС-544 плюс ритуксимаб (RituxanTM) були приблизно у чотири рази більш ефективними, ніж IC₅₀ для одного СМС-544.

II. Протипухлинна активність in vivo проти підшкірних ксенотрансплантатів і системно дисемінованої В-клітинної лімфому у мишей SCID

Самки безтимусних "голих" мишей вагою 18-22 г одержували загальну дозу опромінення 400 рад. Це опромінення придушувало імунну систему мишей і посилювало розвиток пухлини. Через три дні після опромінення мишам у правий задній бік підшкірно ін'єктували 10⁷ RL-клітин у матригелі (Matrigel) (Collaborative Biomedical Products, Belford, MA, розведеному 1:1 у середовищі RPMI). Коли пухлини досягали відповідного розміру (0,3 г, звичайно через 21 день), мишам, в/ч, вводили СМС-544, ритуксимаб (RituxanTM) або комбінацію СНОР (див. нижче) у стерильному фізіологічному розчині, 0,2 мл/миша. Перший день введення лікарського засобу вважався днем 1. Дві додаткові дози вводили на 5-й і 9-й день (обробка = q4D×3). Потім проводили терапію комбінацією СНОР, що включає циклофосфамід (С) (CytoxanTM, Bristol-Meyers Squibb Co., Princeton, NJ) - 40 мг/кг, в/ч; доксорубіцин-НCl (Н) (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO) 3,3 мг/кг, і.п.; вінкрестин (О) (GensiaSicor Pharmaceuticals, Irvine, CA) - 0,5 мг/кг, і.п.; і преднізон (Р) (Roxane Labs., Columbia, OH), 0,2 мг/кг, п/о СНО вводили за такою ж схемою, як СМС-544 і ритуксимаб (RituxanTM) (q4D×3), а преднізон вводили перорально через день, всього 5 доз (q2D×5). Принаймні, через тиждень пухлини вимірювали і розмір пухлини виражали як масу пухлини (г)=0,5 (товщина пухлини/2) (довжина пухлини). Потім обчислювали сер.кв.відх. для тест-групи і порівнювали зі значеннями, одержаними для обробленої носієм групи, після чого визначали статистичну значимість з використанням Т-критеріїв множинного порівняння. Середнє значення для групи реєстрували протягом 50 днів включно або доти, доки миша не гинула (що не дозволяло визначити середнє для даної групи), або доки її пухлина не ставала дуже великою (>3,5 г), і у цьому випадку мишу піддавали евтаназії. Після закінчення цього часу реєстрували масу пухлини тільки для кожної окремої миші у всіх групах обробки. У кінці кожного дослідження для кожної групи обробки реєстрували також число мишей, які не мають пухлин.

Для визначення дії СМС-544, взятого окремо або у комбінації з іншими біологічно активними агентами, на дисеміновані лімфоми використовували мишачу модель SCID. Самкам мишей SCID (CB17 SCID), 20-25 г, у хвостову вену ін'єктували 10⁶ клітин Ramos (0,2 мл). Через 3 або 9 днів після ін'єкції клітин мишам вводили, в/ч, носій, кон'югати (СМС-544 або СМА-676) або ритуксимаб (RituxanTM), всього 3 дози. Для схеми обробки з введенням дози на 3-й день, мишам вводили дози на дні 3, 7 і 11. Для схеми обробки з введенням дози на 9-й день, мишам вводили дози на дні 9, 13 і 17. При схемі обробки на 9-й день, також вводили комбінації СМС-544 і ритуксимабу (RituxanTM), як описано нижче. При цьому проводили щоденний моніторинг мишей на наявність паралічу задніх лап, і якщо він виявлявся, то мишей умертвляли. Для групи обробки використовували від 7 до

10 мишей. Для цієї групи обчислювали середній час виживання (\pm сер.кв.відх.), а також медіану, мінімум і максимум виживаності. Відмінність у розподілі виживаності між групами визначали з використанням непараметричного логрангового критерію, при цьому значимість реєстрували на рівні 0,05. Криві виживаності будували з використанням методу Каплана-Майєра.

У попередньому дослідженні оцінювали вплив двох різних схем введення доз на виживаність мишей SCID з дисемінованою лімфомаю. У першому дослідженні відстежували початок дії дози лікарського засобу, введеної через 3 дні після внутрішньовенної ін'єкції пухлинних клітин (модель пухлини, що розвивається), а у другому дослідженні введення дози лікарського засобу починали тільки з 9-го дня після ін'єкції пухлинних клітин (модель укоріненої пухлини). У кожному дослідженні вводили, в/ч, 3 дози СМС-544 (160мкг/кг), СМА-676 (160мкг/кг), або ритуксимабу (Rituxan™) (20мг/кг), через 4 дні (Q4D×3). Для моделі пухлини, що розвивається, середній час виживання мишей, оброблених носієм, складав 27 днів (Фіг.23, таблиця 8). СМА-676, тобто контроль, що відповідає ізотипу СМС-544, не давав значимого збільшення часу виживання ($p>0,05$). СМС-544 давав значиме збільшення часу виживання до 41 дня, а ритуксимаб давав чудовий ефект, тобто збільшення часу виживання до >125 днів (що значно перевищувало дію СМС-544, $p<0,05$). Затримка введення дози доти, доки пухлинні клітини не будуть мати можливість проникати у кровотік (ефект "хомінгу") і накопичуватися у тканині-мішені (укорінена модель), приводила до зміни результатів для СМС-544 і ритуксимабу (Rituxan™). І знову, СМА-676 не здійснював значимого впливу на виживаність (Фіг.24, таблиця 8). Введення ритуксимабу (Rituxan™) приводило до збільшення середньої виживаності до 62,6 днів, а введення СМС-544 приводило до збільшення середньої виживаності до 83,5 днів. У даній моделі укоріненої пухлини така відмінність між дією СМС-544 і ритуксимабом (Rituxan™) не була значимою.

Таблиця 8

Опис вимірювань часу виживання

Дослідження	Сполука	Середня виживаність	Медіана виживаності	Стандартне відхилення	Мінімальна виживаність	Максимальна виживаність	Число тварин
Модель, що розвивається	СМА-676	32,9	34,0	3,9	28,0	36,0	7
	СМС-544	41,0	38,0	10,1	32,0	60,0	6
	Ритуксимаб	128,4	$>130,0$	4,7	119,0	$>130,0$	7
	Носій	27,2	28,0	1,4	25,0	28,0	8
Укорінена модель	СМА-676	33,7	31,0	4,6	30,0	42,0	7
	СМС-544	83,5	76,5	41,6	34,0	$>130,0$	8
	Ритуксимаб	62,6	37,0	46,2	31,0	$>130,0$	7
	Носій	30,5	29,0	3,6	27,0	36,0	8

Були проведені попередні дослідження для визначення впливу ритуксимабу (Rituxan™), позитивного або негативного, на виживаність при введенні СМС-544. СМС-544 (160мкг/кг) вводили за відсутності або у присутності ритуксимабу (Rituxan™) (комбінація 20мг/кг ритуксимабу з високою дозою лікарського засобу була відмічена як HD). Крім того, більш низькі дози СМС-544 (80мкг/кг) вводили разом з більш низькими дозами ритуксимабу (Rituxan™) (10мг/кг). Ці сполуки не вводили окремо у відповідних дозах 80мкг/кг або 10мг/кг через обмежене число досліджуваних мишей. Комбінація СМС-544 (80мкг/кг) з ритуксимабом (Rituxan™) (10мг/кг) була відмічена як комбінація із середньою дозою (MD) і дана комбінація була використана у дослідженні для оцінки впливу комбінацій з більш низькими дозами лікарських засобів на виживаність мишей SCID. Окреме введення СМС-544 (160мкг/кг) і ритуксимабу (Rituxan™) (20мг/кг) здійснювали як описано вище для моделі укоріненої пухлини. При цьому середній час виживання збільшувався до 58,5 і 50,5 днів, відповідно (Фіг.25, таблиця 9). При введенні їх комбінації з високими дозами, середній час виживання трохи збільшувався (хоча і не був статистично значимим, $p>0,05$) до 64,4 дня. Комбінація із середніми дозами 80мкг/кг СМС-544 і 10мг/кг ритуксимабу (Rituxan™) давала значиме збільшення ($p<0,05$, у порівнянні з групою, обробленою носієм) виживаності у середньому до 92,4 дня. Ці результати дають основу припустити, що можуть бути також використані комбінації СМС-544 і ритуксимабу (Rituxan™) і у більш низьких дозах.

Таблиця 9

Опис вимірювань часу виживання у попередньому дослідженні з використанням комбінацій

Сполука	Середня виживаність	Медіана виживаності	Стандартне відхилення	Мінімальна виживаність	Максимальна виживаність	Число тварин
СМС MD+ритукс. MD	92,4	$>100,0$	16,0	62,0	$>100,0$	10
СМС HD+ритукс. HD	64,4	58,5	26,7	29,0	$>100,0$	10
СМС-544	58,5	34,5	35,8	27,0	$>100,0$	10
Ритуксимаб	50,5	41,0	26,4	30,0	$>100,0$	10
Носій	31,0	27,0	9,7	27,0	56,0	9

СМС MD= середня доза СМС-544, 80мкг/кг
СМС HD= висока доза СМС-544, 160мкг/кг
Ritux MD= середня доза ритуксимабу, 10мг/кг
Ritux HD= висока доза ритуксимабу, 20мг/кг

Були проведені додаткові дослідження з використанням комбінації СМС-544 з ритуксимабом (Rituxan™). Використовували наведені нижче групи обробки: СМС-544 у концентрації 40, 80 і 160мкг/кг; ритуксимаб

(Rituxan™) у концентрації 5, 10 і 20мг/кг; і СМС-544 у концентрації 40мг/кг плюс ритуксимаб (Rituxan™) у концентрації 5мг/кг; СМС-544 у концентрації 80мг/кг плюс ритуксимаб (Rituxan™) у концентрації 10мг/кг, і СМС-544 у концентрації 160мг/кг плюс ритуксимаб (Rituxan™) у концентрації 20мг/кг. Всі дози ритуксимабу (Rituxan™) давали невелике збільшення середнього часу виживання до 33-40 днів (всі дози давали значиме збільшення виживаності, $p < 0,05$, у порівнянні із середньою виживаністю для контрольної групи (носії), яка складала 25,8, Фіг.26, таблиця 10). Висока доза СМС-544, 160мг/кг, давала збільшення середньої виживаності до 85 днів, що відповідало результатам, одержаним у двох більш ранніх дослідженнях. Комбінація СМС-544 з ритуксимабом (Rituxan™) не давала значимого збільшення часу виживання (Фіг.27, таблиця 10). Кожна з двох більш низьких доз СМС-544 (80 і 40мг/кг) давала значиме збільшення ($p < 0,05$) середньої виживаності у порівнянні з високою дозою СМС-544. Для доз СМС-544 40 і 80мг/кг, у 90% і 80% мишей, відповідно, час виживання все ще складав 125 днів. Для груп, яким вводили обидві комбінації лікарського засобу, 100% мишей залишалися живими на 125-й день. Більш низькі дози СМС-544 були більш ефективними, ніж висока доза 160мг/кг.

Ритуксимаб (Rituxan™), у комбінації з СМС-544, не здійснював якого-небудь видимого впливу на активність СМС-544 у мишей SCID з моделлю дисемінованої В-клітинної лімфоми у дозах, що тестуються (див. вище). Для того щоб визначити, чи приводить введення СМС-544 разом з ритуксимабом (Rituxan™) до посилення або інгібування протипухлинної активності, було також проведено дослідження з використанням моделі ксенотрансплантату В-клітинної RL-лімфоми, підшкірно ін'єктованого "голим" мишем Balb/c. У підшкірній моделі В-клітинної лімфоми пухлини досягали середньої маси 300мг, і на цьому етапі були введені, в/ч, два терапевтичних препарати, що тестуються. СМС-544 вводили у дозах 20 або 80мг/кг, Q4D×3, за відсутності або у присутності ритуксимабу (Rituxan™) (20мг/кг, Q4D×3). Спільне введення з ритуксимабом (Rituxan™) не приводило до якого-небудь значимого збільшення або інгібування ($p > 0,05$) терапевтичної ефективності СМС-544 (Фіг.28). У цьому дослідженні ритуксимаб (Rituxan™), що вводиться окремо, інгібував ріст RL-В-лімфоми (57%-не інгібування росту пухлини на 20-й день, $p < 0,05$, у порівнянні з групою, обробленою носієм), і аналогічні результати були одержані при більш низькій дозі СМС-544.

Схема комбінованої хіміотерапії CHOP (циклофосфамід, доксорубіцин, вінкристин і преднізон) є найбільш поширеним методом лікування пацієнтів з неходжкінською лімфомою. Протипухлинну дію CHOP порівнювали з дією СМС-544 в укорінених ксенотрансплантатах В-клітинної RL-лімфоми. Окремі компоненти схеми CHOP були використані в їх відповідних максимально припустимих дозах, оцінених на "голих" мишах (дані не наводяться), а саме: циклофосфамід (С) - 40мг/кг, в/ч; доксорубіцин (Н) - 3,3мг/кг, в/ч; вінкристин (О) - 0,5мг/кг, в/ч; і преднізон (Р) - 0,2мг/кг, п/о. СМС-544 вводили Q4D×3, а Р вводили п/о, Q2D×5. СМС-544 вводили в/ч, Q4D×3, у дозі 160мг/кг еквівалентів каліхеаміцину. Схема лікування CHOP спочатку приводила до значимого інгібування росту В-клітинної RL-лімфоми (Фіг.29). Однак через 3 тижні пухлина знову починала рости з такою ж швидкістю, як і пухлина у групи, обробленої носієм. На противагу цьому, протипухлинний ефект СМС-544 був повним і не змінювався протягом всього експерименту. Ці результати дозволяють припустити, що СМС-544, який вводиться у дозі значно більш низькій, ніж максимально припустима (не летальна) доза для "голих" мишей, був більш ефективним, ніж схема хіміотерапії CHOP.

Ці дослідження показали, що ритуксимаб (Rituxan™), доданий до СМС-544, давав значиме збільшення цитотоксичної активності СМС-544, що спостерігається відносно клітин В-лімфоми Ramos. Нещодавно також повідомлялося про синергічну дію ритуксимабу (Rituxan™) і глюкокортикоїдів у клітинах Ramos. Крім того, синергічне інгібування росту 4 з 8 додаткових клітинних ліній спостерігалось у випадку введення ритуксимабу (Rituxan™) у комбінації з 10мкМ дексаметазону.

Повідомлялося, що сам ритуксимаб (Rituxan™) у концентрації 0,4-10мг/мл дає значиме, хоча і невелике (максимум 18%) інгібування росту клітин Ramos. Крім того, при інкубуванні у концентрації 10мг/мл (48 годин інкубування) він володів активністю по відношенню до 6 з 8 В-клітинних ліній неходжкінської лімфоми. Ghetie et al. показали, що ритуксимаб (Rituxan™), 10мг/мл, давав 6,2%-не збільшення рівня апоптозу (на відміну від 3,5% для клітин, оброблених носієм) після 24-годинного інкубування з клітинами Ramos. У дослідженнях, які нещодавно проводяться, ритуксимаб (Rituxan™), що вводиться окремо у дозах 20 і 200мг/мл, не здійснював якого-небудь впливу на ріст клітин Ramos. У мишей з моделлю дисемінованої пухлини або з підшкірним ксенотрансплантатом не спостерігалось якої-небудь взаємодії між СМС-544 і ритуксимабом (Rituxan™). Комбінації, що тестуються, лікарських засобів не впливали одна на одну і не давали посиленого ефекту. При цьому необхідно було визначити, яким чином зниження доз кожного лікарського засобу, що вводяться у дисеміновану модель, може змінювати одержаний результат.

Модель дисемінованої В-клітинної лімфоми Ramos була описана Flavell та ін. Повідомлялося, що медіана виживаності мишей, оброблених носієм, складала 34-36 днів. У мишей розвивався параліч задніх кінцівок, який прогресував і невдовзі приводив до агонії. Гістологічний аналіз органів виявив, що, у цьому випадку, органами, які найчастіше уражаються, є надниркова залоза, селезінка і підпавутинний простір. Інфільтрат у підпавутинному просторі, у більшості випадків, поширюється на головний мозок. Ритуксимаб (Rituxan™) здійснював хороший вплив при його введенні у ранній фазі патологічного процесу у мишей SCID з дисемінованою пухлиною (Фіг.23), але його дія ставала менш виразною при введенні на 9-й день у пухлинну модель на стадії укорінення (Фіг.24). Ймовірно, ритуксимаб (Rituxan™), що відноситься до ізотипу IgG1, діє за ефекторним механізмом у мишей-хазяїв. Такими механізмами є опосередкована комплексом цитотоксичність і/або антитіло-залежна клітинна цитотоксичність, що реалізовується за допомогою "рекрутингу" природних клітин-кілерів, присутніх у мишей SCID. Ін'єктовані пухлинні клітини Ramos, ймовірно, є більш сприйнятливими до більш ранніх імунних механізмів хазяїна, які активуються ритуксимабом (Rituxan™), до того, як клітини можуть набувати здатності до інфільтрації в уражені органи. Некон'юговане антитіло G5/44 (молекула, що націлює, у СМС-544) поки що не було проаналізоване у мишей SCID з моделлю дисемінованої пухлини, але при введенні у підшкірні ксенотрансплантати воно не давало якого-небудь ефекту. При цьому не треба чекати, що G5/44, що відноситься до ізотипу IgG4, буде активувати ефекторні механізми хазяїна, а тому воно необов'язково буде володіти протипухлинною активністю.

G5/44, кон'юговане з каліхеаміцином (СМС-544), здійснює вплив, протилежний дії ритуксимабу (Rituxan™), і дає кращі результати при введенні у стабільній фазі захворювання. Причина такої поліпшеної дії СМС-544 у стабільній фазі не зовсім зрозуміла, але, ймовірно, ця стала фаза являє собою клінічну ситуацію. СМА-676 відповідного ізотипу, тобто контрольний кон'югат, що не зв'язується, не виявляв значимого впливу на середню виживаність. Результати, одержані для мишей SCID з моделлю дисемінованої пухлини, дозволяють припустити, що для визначення максимально ефективної дози (MED) необхідно зменшити дози СМС-544. Доза 160мкг/кг була менш ефективною, ніж більш низькі дози у 80 і 40мкг/кг. Причина, з якої це відбувається, не зрозуміла, але доза 160мкг/кг значно більше, ніж MED. Для вивчення цього результату плануються додаткові дослідження.

Мохаммед та ін. використовували схему терапії CHOP (циклофосфамід (С) - 40мг/кг, в/в; доксорубіцин (Н) 3,3мг/кг, в/в; вінкристин (О) - 0,5мг/кг, в/в; преднізон (Р) 0,2мг/кг, п/о) у моделі підшкірних ксенотрансплантатів клітинної лінії дифузної великоклітинної лімфоми, DLCL. Для доз, що використовуються у CHOP-терапії, визначали максимально припустиму дозу. Схему CHO-терапії проводили шляхом внутрішньовенного і перорального щоденного введення протягом 6 днів, де оцінку "активна" доза давали при продукуванні Т/С 25,8%. При цьому якого-небудь зменшення пухлин не спостерігалось. Результати з використанням моделі, описаної Мохаммедом та ін., були, очевидно, аналогічні результатам, одержаним при терапії з використанням комбінації CHOP (що вводиться в/ч, Q4D×3) на RL-моделі, описаній у даній заявці. На відміну від СМС-544, у жодному дослідженні CHOP-терапія не давала довготривалого ефекту.

Таблиця 10

Опис вимірювань виживаності у дослідженні з використанням комбінацій

Обробка	Середня виживаність	Медіана виживаності	Стандартне відхилення	Мінімальна виживаність	Максимальна виживаність	Число тварин
СМС-544, 40мкг/кг	118,90	125,00	19,29	64,00	125,00	10
СМС LD+ритукс. LD	125,00	125,00	0,00	125,00	125,00	10
СМС-544, 80мкг/кг	118,22	125,00	17,86	71,00	125,00	9
СМС MD+ритукс. MD	125,00	125,00	0,00	125,00	125,00	10
СМС-544, 160мкг/кг	85,22	82,00	40,37	35,00	125,00	9
СМС HD+ритукс. HD	91,30	100,00	36,31	44,00	125,00	10
Ритуксимаб 5мг/кг	40,70	36,50	9,57	34,00	64,00	10
Ритуксимаб 10мг/кг	33,80	34,00	3,26	29,00	41,00	10
Ритуксимаб 20мг/кг	40,50	34,00	15,45	31,00	82,00	10
Носій	25,80	25,00	3,12	22,00	34,00	10

СМС LD= низька доза СМС-544, 40мкг/кг
СМС MD= середня доза СМС-544, 80мкг/кг
СМС HD= висока доза СМС-544, 160мкг/кг
Ritux LD= низька доза ритуксимабу, 5мг/кг
Ritux MD= середня доза ритуксимабу, 10мг/кг
Ritux HD= висока доза ритуксимабу, 20мг/кг

Приклад 9

Стабільні композиції СМС-544

Стабільні композиції СМС-544 для введення in vivo одержували шляхом додавання розріджувачів, наповнювачів, носіїв і стабілізаторів. Після ГФХ-хроматографії, хроматографічні фракції аналізували за допомогою ЕХ-ВЕРХ та УФ-аналізу у довгому УФ-діапазоні. Виходячи зі згаданих вище аналізів, в яких стабілізатор даного кон'югату. Сахарозу звичайно використовують у концентраціях 1,5-5,0% мас/об. Крім того, для поліпшення зовнішнього вигляду і фізичної міцності ліофілізованих залишків, у них може бути включений полімерний наповнювач, такий як декстран 40 або гідроксіетильований крохмаль у концентрації 0,5-1,5мас.%. Ці матеріали, при відносно низьких концентраціях, утворюють ліофілізовані залишки і можуть бути використані для мінімізації вмісту твердих речовин у ліофілізованому препараті, що дозволяє здійснювати більш швидке сушіння. У досліджуваних препаратах використовували декстран 40 у концентрації 0,9% мас.

Для підвищення розчинності кон'югату використовують полісорбат 80. Звичайно полісорбат 80 використовується у кількості 0,005-0,05%, а його переважна концентрація складає 0,01%. У вказаному препараті також використовується твін у концентрації 0,01-0,05% об.

У даному препараті для поліпшення ефективності кінцевого процесу очищення може бути також використаний електроліт. Як електроліт звичайно використовується хлорид натрію у концентрації від 0,01М до 0,1М. Замість хлориду натрію можуть бути також використані додаткові електроліти, такі як сульфат натрію, оскільки він легше ліофілізується. Оптимально, кінцевий розчин СМС-544 містить 1,5% сахарози (за масою), 0,9% декстрану 40 (за масою), 0,01% твіну 80, 50мМ хлориду натрію, 0,01% полісорбату 80 (за масою) і 20мМ трометаміну.

Переважаюча формула для розчину до його ліофілізації є наступною: 0,5мг/мл СМС-544, 1,5мас.% сахарози, 0,9мас.% декстрану 40, 0,05М хлориду натрію, 0,01-0,05об.% твіну, 0,01мас.% полісорбату 80, 0,02М трометаміну, рН 8,0 і вода. Розчин розливали по посудинах з бурштинового скла при температурі від +5°C до 10°C (оптимальна температура +5°C); потім розчин заморожували при температурі заморожування від -35°C до -50°C (оптимально при -45°C); заморожений розчин піддавали попередній стадії ліофілізації для первинного сушіння розчину під тиском 20-80 мікропаскаль (оптимально 60 мікропаскаль); ліофілізований продукт витримували при температурі зберігання від -10°C до -40°C (оптимально -30°C), протягом 24-72 годин (оптимально протягом 60 годин); і нарешті, ліофілізований продукт піддавали другій стадії сушіння під тиском

20-80 мікропаскаль була одержана інформація про вміст агрегатів, концентрації білка і навантаження каліхеаміцином, відбирали відповідні фракції для одержання пулу. Для стабілізації розчину додавали ексципієнти, стабілізатори, наповнювачі та агенти, що забуферюють. Оскільки СМС-544 може піддаватися деградації під дією ряду різних механізмів розкладання, то фізичну нестабільність даного кон'югату необхідно враховувати у стадії розробки технології його приготування. Одним з можливих заходів, яких необхідно вжити у даному випадку, є мінімізація швидкості гідролітичного відділення каліхеаміцину від антитіла при збереженні фізичної і хімічної цілісності анти-CD22 антитіла. Крім того, повинне бути мінімізоване осадження кон'югату "каліхеаміцин-антитіло", яке може відбуватися при деяких значеннях рН і умовах концентрування.

При розробці технології приготування кон'югату "похідне мономерного каліхеаміцину-антитіло", рН даного препарату має важливе значення, оскільки зміна рН дозволяє мінімізувати деградацію і фізичну нестабільність даного кон'югату. Для мінімізації гідролізу каліхеаміцину і підтримки адекватної розчинності кон'югату, рН повинен складати 8,0. Додаткові дані, одержані з використанням електрофорезу у ДСН-ПААГ і аналізу ELISA на зв'язування з антигеном, показали, що значна структурна цілісність і специфічність антитіла підтримується при рН=8,0. Тому, для підтримання рН при 8,0, як агент, що забуферює, повинен бути вибраний трометамін. Альтернативний буфер може включати двоосновний натрій або фосфат калію. Концентрація буфера може складати від 5 до 50мМ. При цьому припускається, що для оптимальної стабільності/розчинності рН повинен складати, переважно, від 7,5 до 8,5. Відповідно до сучасних технічних вимог рН кінцевого продукту повинен складати 7,0-9,0.

Хоча стабільність забуферених розчинів кон'югату є адекватною протягом короткого проміжку часу, однак, вони не володіють довготривалою стабільністю. Для збільшення терміну дії кон'югатів використовують ліофілізацію. Проблеми, пов'язані з ліофілізацією білкового розчину, добре відомі і полягають у тому, що у процесі заморожування і сушіння відбувається руйнування вторинної, третинної і четвертинної структури. Для підтримки структурної цілісності антитіла у процесі заморожування і сушіння, у препарат включають сахарозу, яка діє як аморфний (оптимально 60 мікропаскаль) при температурі зберігання від +10°C до +35°C (оптимально +25°C) протягом 15-30 годин (оптимально протягом 24 годин). Для визначення часу завершення первинного сушіння проводили тест з підвищенням тиску. Після завершення циклу ліофілізації посудини знову наповнювали азотом і закривали пробкою.

У таблиці 11 показані відмінності у технології приготування, що застосовується для одержання препарату СМС-544 і препарату СМА-676. Основними відмінностями між препаратом СМА-676 і препаратом СМС-544 є знижена концентрація білка у новому препараті (0,5мг/мл), використання трометаміну як буфера і присутність 0,01% твіну 80. Внаслідок цього препарат СМС-544, одержаний за новою технологією, був прозорим, тоді як препарат, одержаний за технологією СМА-676, був каламутним (див. таблиці 12 і 13).

Таблиця 11

Порівняння препаратів для СМС-544, одержаних за технологією СМА-676 і за технологією СМС-544

	Технологія СМА-676	Технологія СМС-544
Концентрація білка	1,0мг/мл	0,5мг/мл
Склад	1,5% сахарози, 0,9% декстрану 40, 100мМ хлориду натрію, 5мМ фосфатного буфера	1,5% сахарози, 0,9% декстрану 40, 0,01% твіну 80, 0,1% полісорбату 80, 50мМ хлориду натрію, 20мМ трометаміну

Таблиця 12

Стабільність і фізико-хімічні властивості препаратів для СМС-544, одержаних за технологією СМА-676 і за технологією СМС-544 при 5°C

Час	Препарат СМА-676		Препарат СМС-544	
	Спочатку	Через 2 тижні	Спочатку	Через 2 тижні
Зовнішній вигляд	Злегка каламутний	Злегка каламутний	Прозорий	Прозорий
РН	7,5	7,5	7,8	7,8
Загальна кількість білка (мг/мл)	1,07	1,07	0,52	0,52
Загальна кількість каліхеаміцину (мкг/мг білка)	67	67	57	57
Некон'югований каліхеаміцин (мкг/мг білка)	1,21	2,82	0,97	1,13
% Агрегатів	3,03	2,81	1,59	1,70

Таблиця 13

Стабільність і фізико-хімічні властивості ліофілізованих препаратів для СМС-544, одержаних методом СМА-676 і методом СМС-544 при температурі зберігання 25°C

Час	Препарат СМА-676		Препарат СМС-544	
	Спочатку	Через 4 тижні	Спочатку	Через 4 тижні
Зовнішній вигляд	Злегка каламутний	Злегка каламутний	Прозорий	Прозорий
РН	7,5	7,5	7,8	7,8

Загальна кількість білка (мг/мл)	1,03	1,03	0,51	0,51
Загальна кількість каліхеаміцину (мкг/мг білка)	67	67	57	57
Некон'югований каліхеаміцин (мкг/мг білка)	1,13	1,03	1,03	0,94
% Агрегатів	2,63	2,96	1,49	2,09

Всі роботи і патенти, що цитуються вище, вводяться у даний опис за допомогою посилання. У даний винахід можуть бути внесені різні модифікації і зміни, які є очевидними для кожного фахівця. Такі модифікації і зміни, що вносяться у вказаний спосіб кон'югування, у кон'югати, одержані таким способом, та у композиції/препарати, що містять такі кон'югати, входять в об'єм формули винаходу.

Бібліографія

1. G. Kohler and Milstein, C, Nature, 256: 495 (1975).
2. T.G. Hose and Blair, A.H. CRC Critical Rev. Drug Carrier Systems 3:263 (1987).
3. U.S. Patent No.5,877,296.
4. U.S. Patent No.5,773,001.
5. U.S. Patent No.5,714,586.
6. U.S. Patent No.5,712,374.
7. U.S. Patent. No.5,053,394.
8. J. Tramontano; et al., J. Mol. Recognit. 7: 9 (1994).
9. H. McConnell and Hoess, J., J. Mol. Biol. 250: 460 (1995).
10. Nord et al., Nat Biotechnol. 15: 772 (1997).
11. Nord et al., Protein Eng. 8: 601 (1995).
12. Ku and Schultz, Proc. Natl. Acad. Sci, USA 92: 6552 (1995).
13. Markand et al., Biochemistry 35: 8045 (1996).
14. Markand et al., Biochemistry 35: 8098 (1996).
15. Rottgen and Collins, Gene 164: 243 (1995).
16. Wang et al., J. Biol. Chem., 270: 12250 (1995).
17. I.D. Bernstein et al., J. Clin. Invest. 79: 1153 (1987).
18. I.D. Bernstein et al., J. Immunol. 128: 867-881 (1992).
19. Kabat et al. Sequencing. of Proteins of Immunological. Interest, 1: 310-334 (1994).
20. PCT publication No.WO 91/09967.
21. Yang et al., J. Mol. Biol, 254, 392-403 (1995).
22. Low et al., J. Mol. Biol, 250, 359-368 (1996).
23. Patten et al., Curr. Opin. Biotechnol, 8, 724-733, (1997).
24. Thompson et al., J. Mol. Biol, 216, 77-88, (1996).
25. Cramer et al. Nature, 391, 288-291, (1998).
26. U.S. Patent No.4,671,958.
27. U.S. Patent No.4,970,198.
28. U.S. Patent No.5,037,651.
29. U.S. Patent No.5,079,233.
30. U.S. Patent No.5,877,296.
31. PCT publication No.WO 98/20734.
32. Trail P and Bianchi A., Current Opin. Immunol, 11: 584-588, (1999).
33. Dubowchik G. and Walker M., Pharmacol. & Therapeutics, 83: 67-123 (1999).
34. Bross P.F., Beitz J., Chen G., Chen X.H., Duffy E., Keiffer-Bross P., Beitz J., Chen G., Chen X., Duffy E., Kieffer L, Roy S., Sridhara R., Rahman A., Williams G., Pazdur R., Clin. Cancer Res., 7: 1490-1496 (2001).
35. Berger M., Leopold L., Dowell J., Korth-Bradley J., Sherman M., Invest. New Drugs; 20: 395-406 (2002).
36. Sievers E., Larson R., Stadmauer E., Estey E., Lowenberg B., Dombret H., Karanes C., Theobald M., Bennet J., Sherman M., et al., J. Clin. Oncol.; 19: 3244-3254 (2001).
37. Larson R., Boogaerts M., Estey E., Karanes C., Stadmauer E., Sievers E., Mineur P., Bennett J., Berger M., Eten C. et al. Leukemia; 16: 1627-1636 (2002).
38. Hamann P., Hinman L., Beyer C., Kindh D., Upeslakis J., Flowers D., Bernstein I., Choice of Linker. Bioconj. Chem.; 13: 40-46 (2002).
39. Hamann P., Hinman L., Hollander I., Beyer C., Lindh D., Holcomb R., Hallet W., Tsou H., Upeslakis J., Shochat D., et al., Bioconj. Chem.; 13: 47-58 (2002).
40. Lee M., Dunne T., Chang C., Siegal M., Morton G., Ellestad G., McGahren W., Borders D., J. Am. Chem. Soc. 1992; 114: 985-987 (1992).
41. Zein N., Sinha A., McGahren W., Ellestad G., Science; 240: 1198-1201 (1988).
42. Thorson J., Sievers E., Ahlert J., Shepard E., Whitwam R., Onwueme K., Ruppen M., Current Pharmaceut. Design; 6: 1841-1879 (2000).
43. Andrews R., Singer J., Bernstein I., J. Exp. Med.; 169: 1721-1731 (1989).
44. Kreitman R.J., Current Pharmaceut. Biotech.; 2: 313-325 (2001).
45. Pastan I., Kreitman R.J., Current Opin. Investig. Drugs, 3(7): 1089-1091 (2002).
46. Kreitman R.J., Curr. Opin. Mol. Ther.; 5:44-551 (2003).
47. Crocker P.R. and Varki A. Siglecs, Trends in Immunol.; 22: 337-342 (2001).
48. Hursey M., Newton D.L., Hansen H.J., Ruby D., Goldenberg D.M., Rybak S.M., Leukemia and Lymphoma; 43: 953-959 (2002).
49. Nitschke L., Floyd H., and Crocker P.R., Scand. J. Immunol.; 53: 227-234 (2001).
50. Moyron-Quiroz J.E., Partida-Sanchez S., Donis-Hernandez R., Sandoval-Montes C and Santos-Argumedo L., Scand. J. Immunol.; 55: 343-351 (2002).
51. Tedder T.F., Tuscano J., Sato S., Kehrl J.H., Ann. Rev. Immunol.; 15: 481-504 (1997).

52. Hanna R., Ong G.L., Mattes M.J., Cancer Res.; 56: 3062-3068 (1996).
53. Shan D. and Press O.W., J. Immunol. 1995; 154: 4466-4475 (1995).
54. Dowell J.A., Korth-Bradley J., Liu H., King S.P., Berger M.S., J. Clin. Pharmacol.; 41: 1206-1214 (2001).
55. Gibaldi M., Perrier D., Pharmacokinetics, 2nd ed., Marcel-Dekker Inc., NY (1982).
56. Van Horssen P.J., Preijers, F.W., Van Oosterhout, Y.V., Eling W.M. and De Witte, T., Leukemia & Lymphoma; 39(5-6): 591-599 (2000).
57. Hinman L.M., Hamann P.R., Wallace R., Menendez A.T., Durr F.E., Upeslakis J., Cancer Res. 53: 3336-3342 (1993).
58. Kreitman R.J., Wilson W.H., Bergeron K., Raggio M., Stetler-Stevenson M., Fitzgerald D.J., Pastan I., N. Engl. J. Med.; 345: 241-247 (2001).
59. Leonard J.P. and Link B.K., Sem. Oncol. 29: 81-86 (2002).
60. Schindler J., Sausville E., Messmann R., Uhr J.W. & Vitetta, E.S., Clin. Cancer Res., 7,255-258 (2001).
61. Vincent T. DeVita, Samuella Hellman, Steven A. Rosenberg, Eds., Cancer Principles and Practice of Oncology, 6th Edition, Publishers: Lippincott, Williams and Wilkins (2001).
62. Edward Chu and Vincent T, DeVita, Physician's Cancer Chemotherapy Drug Manual, Publishers: Jones and Bartlett (2002).

Послідовність CDR мишачого моноклонального
антитіла 5/44

H1	NYWIH	(SEQ ID NO:1)
H2	GINPGNNYTTYKRNLKG	(SEQ ID NO:2)
H3	EGYGNYGAWFAY	(SEQ ID NO:3)
L1	RSSQSLANSYGNTFLS	(SEQ ID NO:4)
L2	GISNRFS	(SEQ ID NO:5)
L3	LQGTHQPYT	(SEQ ID NO:6)

Fig. 1

Послідовність ДНК/білка для VL антитіла 5/44

```

      10      20      30      40      50
GAT GTT GTG GTG ACT CAA ACT CCA CTC TCC CTG CCT GTC AGC TTT GGA GAT CAA GTT
CTA CAA CAC CAC TGA GTT TGA GGT GAG AGG GAC GGA CAG TCG AAA CCT CTA GTT CAA
D V V V T Q T P L S L P V S F G D Q V>

      60      70      80      90     100     110
TCT ATC TCT TGC AGG TCT AGT CAG AGT CTT GCA AAC AGT TAT GGG AAC ACC TTT TTG
AGA TAG AGA ACG TCC AGA TCA GTC TCA GAA CGT TTG TCA ATA CCC TTG TGG AAA AAC
S I S C R S S Q S L A N S Y G N T F L>

     120     130     140     150     160     170
TCT TGG TAC CTG CAC AAG CCT GGC CAG TCT CCA CAG CTC CTC ATC TAT GGG ATT TCC
AGA ACC ATG GAC GTG TTC GGA CCG GTC AGA GGT GTC GAG GAG TAG ATA CCC TAA AGG
S W Y L H K P G Q S P Q L L I Y G I S>

     180     190     200     210     220
AAC AGA TTT TCT GGG GTG CCA GAC AGG TTC ACT GGC AGT GGT TCA GGG ACA GAT TTC
TTG TCT AAA AGA CCC CAC GGT CTG TCC AAG TGA CCG TCA CCA AGT CCC TGT CTA AAG
N R F S G V P D R F T G S G S G T D F>

    230     240     250     260     270     280
ACA CTC AAG ATC AGC ACA ATA AAG CCT GAG GAC TTG GGA ATG TAT TAC TGC TTA CAA
TGT GAG TTC TAG TCG TGT TAT TTC GGA CTC CTG AAC CCT TAC ATA ATG ACG AAT GTT
T L K I S T I K P E D L G M Y Y C L Q>

     290     300     310     320     330
GGT ACA CAT CAG CCG TAC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGT
CCA TGT GTA GTC GGC ATG TGC AAG CCT CCC CCC TGG TTC GAC CTT TAT TTT GCA
G T H Q P Y T P G G G T K L N I K R>

```

Фір. 2

Послідовність ДНК/білка для VN антитіла 5/44

```

      10      20      30      40      50
GAG GTC CAA CTG CAG CAG TCT GGG ACT GTA CTG GCA AGG CCT GGG GCT TCC GTG AAG
CTC CAG GTT GAC GTC GTC AGA CCC TGA CAT GAC CGT TCC GGA CCC CGA AGG CAC TTC
E V Q L Q Q S G T V L A R P G A S V K>

      60      70      80      90      100      110
ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC AGG TTT ACC AAC TAC TGG ATT CAC TGG GTA AAA
TAC AGG ACG TTC CGA AGA CCG ATG TCC AAA TGG TTG ATG ACC TAA GTG ACC CAT TTT
M S C K A S G Y R F T N Y W I H W V K>

      120      130      140      150      160      170
CAG AGG CCT GGG CAG GGT CTA GAA TGG ATT GGT GGT ATT AAT CCT GGA AAT AAT TAT
GTC TCC GGA CCC GTC CCA GAT CTT ACC TAA CCA CCA TAA TTA GGA CCT TTA TTA ATA
Q R P G Q G L E W I G G I N P G N N Y>

      180      190      200      210      220
ACT ACG TAT AAG AGG AAC TTG AAG GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GTC ACA TCC GCC
TGA TGC ATA TTC TCC TTG AAC TTC CCG TTC CCG TGT GAC TGA CGT CAG TGT AGG CCG
T T Y K E N L K G K A T L T A V T S A>

      230      240      250      260      270      280
AGC ACT GCC TAC ATG GAC CTC AGC AGC CTG ACA AGT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC
TCG TGA CCG ATG TAC CTG GAG TCG TCG GAC TGT TCA CTC CTG AGA CCG CAG ATA ATG
S T A Y M D L S S L T S E D S A V Y Y>

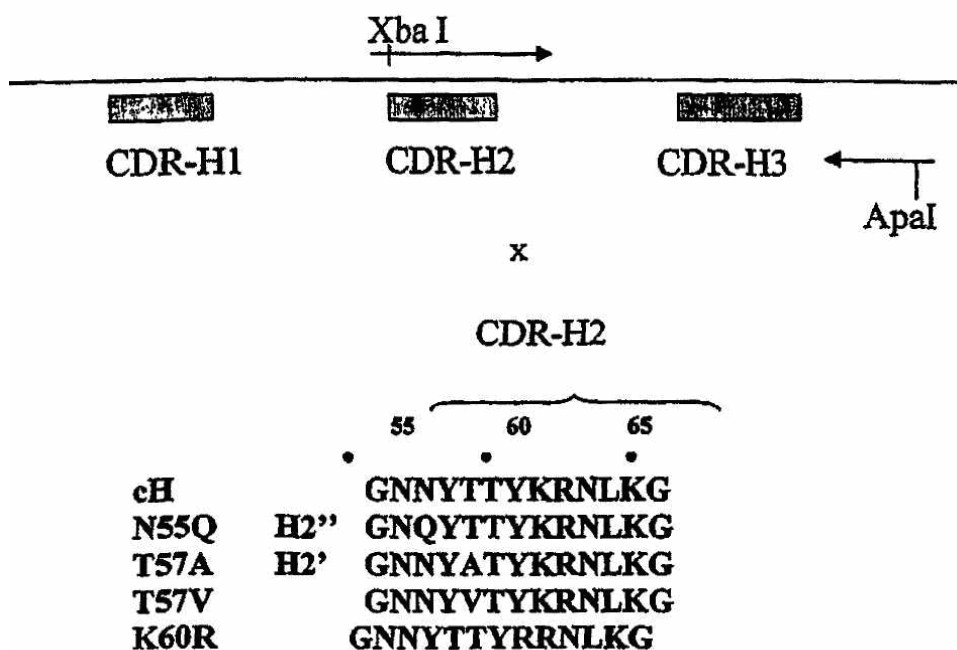
      290      300      310      320      330      340
TGT ACA AGA GAG GGC TAT GGT AAC TAC GGG GCC TGG TTT GGT TAC TGG GGC CAG GGG
ACA TGT TCT CTC CCG ATA CCA TTG ATG CCC CCG ACC AAA CGA ATG ACC CCG GTC CCC
C T R N G Y G N Y G A W F A Y W G Q G>

      350      360
ACT CTG GTC ACC GTC TCC TCA
TGA GAC CAG TGG CAG AGG AGT
T L V T V S S>

```

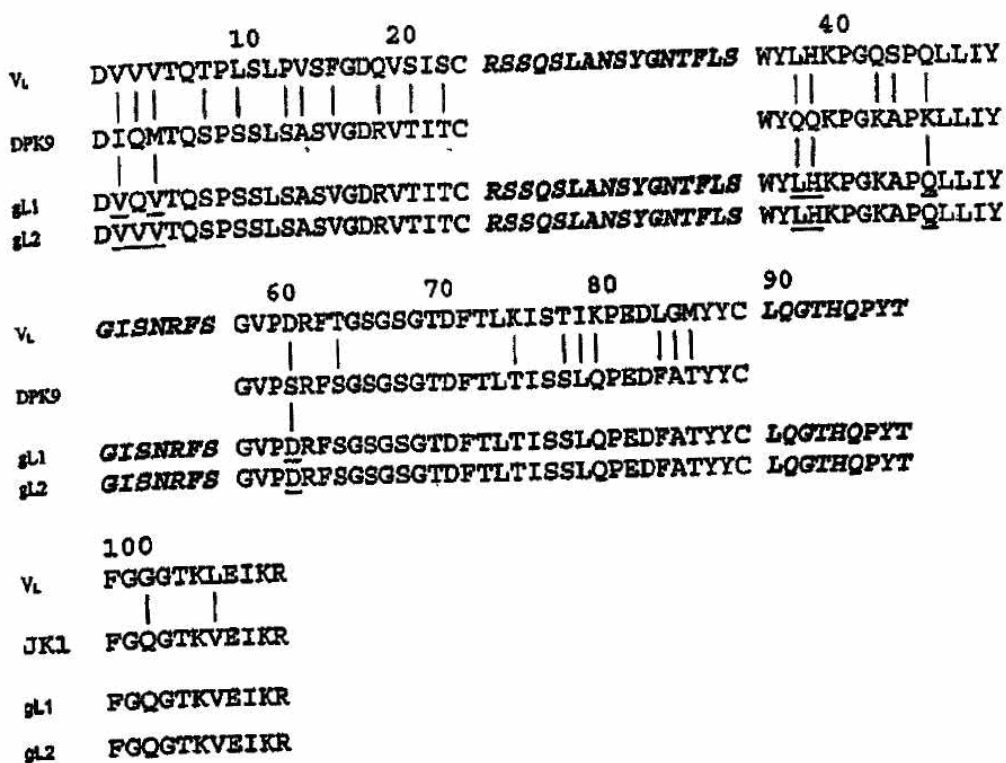
Фиг. 3

Видалення сайту глікозилювання і реакційноздатного лізину: ПЛР-стратегія для введення мутації CDR-H2 в CH-вектор



Фіг. 4

Прищеплена конструкція для послідовності легкого ланцюга 5/44

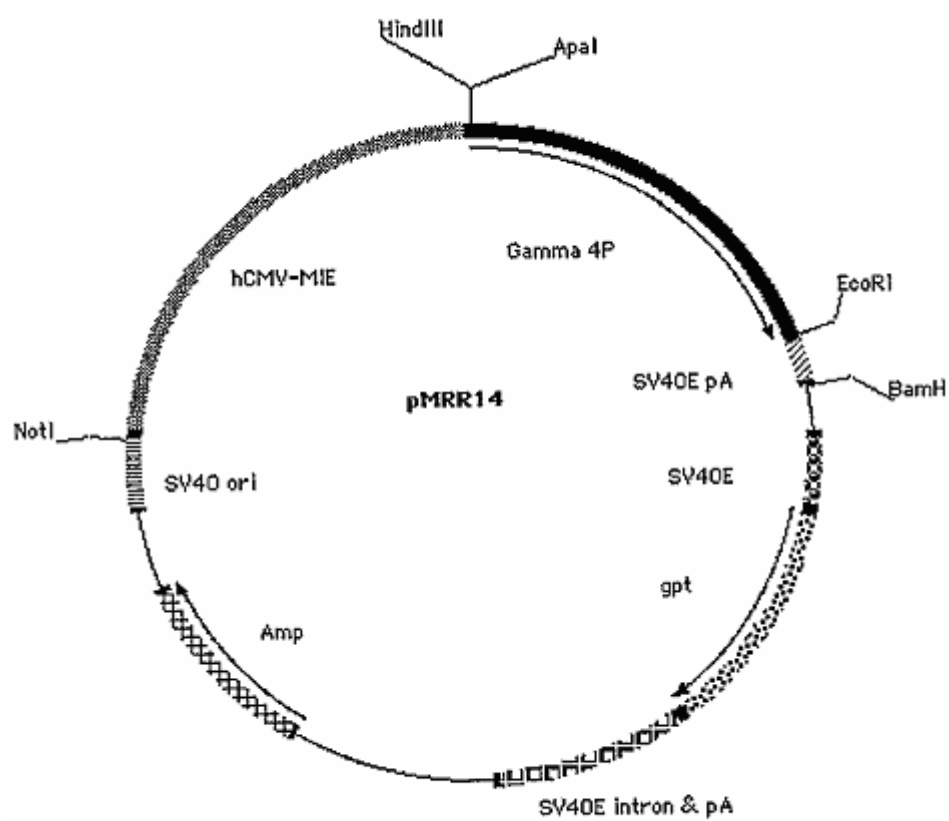


Фіг. 5

	10	20	30	40	50
V _H	EVQLQQSGT	VLARPGASVK	MSCKASGYRFT	NYWIF	WVKQRPGQGLEWIG GINP
DP7	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT			WVRQAPGQGLEWMG	
gH1	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYRFT	NYWIF	WVRQAPGQGLEWIG	GINP	
gH4,5,6,7	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYRFT	NYWIF	WVRQAPGQGLEWIG	GINP	
	60	70	80	90	100
V _H	GNNYTTYKRNLKG	KATLTAVTSASTAYMDLSSLTSEDSAVYYCTR	EGYGNYG		
DP7	KFQG	RVTMT	RDSTSTVYME	LSLRSEDTAVYYCAR	
gH1	GNNYTTYKRNLKG	RATLTADTSTSTVYME	LSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG	
gH4	GNNYATYRRNLKG	RATLTADTSTSTVYME	LSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG	
gH5	GNNYATYRRNLKG	RVTMTADTSTSTVYME	LSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG	
gH6	GNNYATYREKFKQ	RATLTADTSTSTVYME	LSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG	
gH7	GNNYATYREKFKQ	RVTMTADTSTSTVYME	LSLRSEDTAVYYCTR	EGYGNYG	
	110				
JH4	WGQGT	LVTVSS			
V _H	ANFAY	WGQGT	LVTVSS		
gH1	ANFAY	WGQGT	LVTVSS		
gH4,5,6,7	ANFAY	WGQGT	LVTVSS		

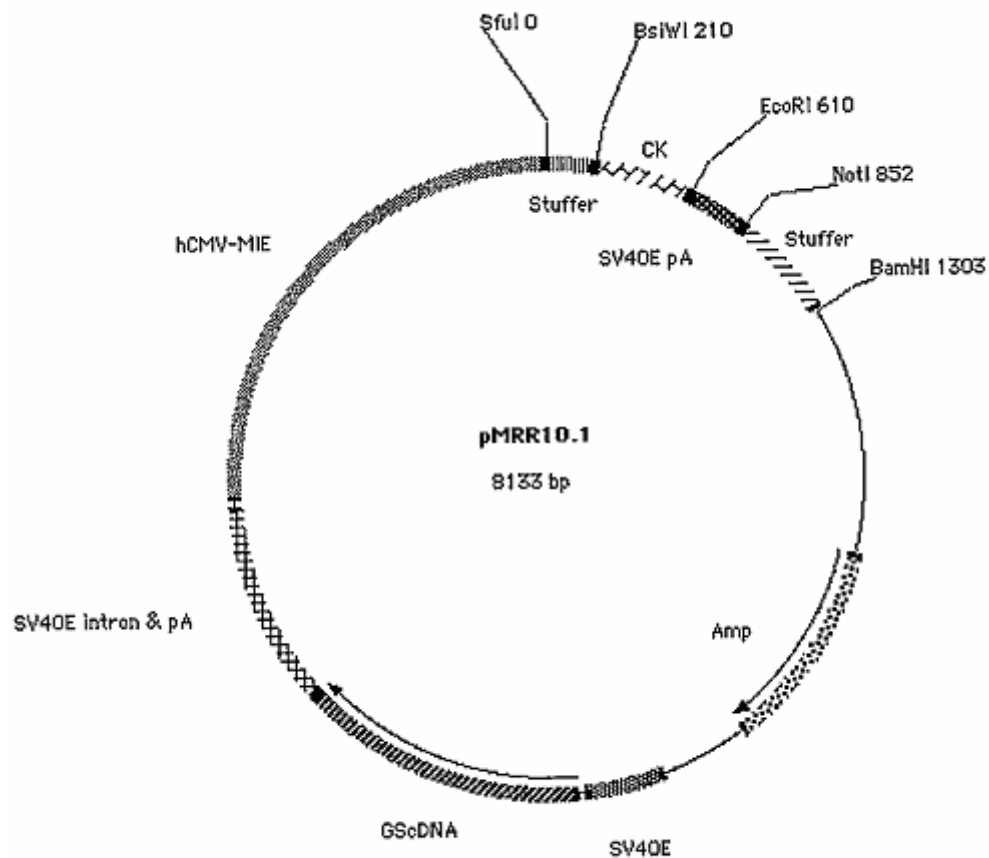
Fig. 6

Карта вектора pMRR 14.



Фиг. 7

Карта вектора pMRR 10.1.



Фіг. 8

Віасcore-аналіз химерного антитіла 5/44 і мутантів

5/44	$K_a \cdot e^5$	$K_d \cdot e^{-4}$	$KD \cdot e^{-10}$	$\sim KD \text{ nM}$
<u>cLcH</u>	2.9	1.14	3.93	0.4
N55Q	5.81	1.9	3.27	0.3
T57A	7.8	0.51	0.66	0.07
K60R	4.95	1.01	2.04	0.2

Фіг. 9

Важкий ланцюг

544gH1 T1
AGTGTGAGGTGCAATTGGTCCAGTCAGGAGCAGAGGTTAAGAAGCCTGGTGCTTCCGTC
AAAGTTTCGTGTAAGGCTAGCGGCTACAGGTTAC

544gH1 T2
GTGGCATTAAATCCCGGAATCAGTACACTACATATAAAAGAAATCTAAAGGGCAGAGCA
ACGCTGACCGCGACACCTCCACAAGCACTGTCTACA

544gH1 T3
AGAGAAGGCTACGGTAATTACGGAGCCTGGTTCGCTACTGGGGCCAGGGTACCCTAGT
CACAGTCTCCTCAGCTTCTACAAAGGGCCCAAGAAA

544 gH1 B1
GGACCAATTGCACCTCACACTGCACTCCCTTGAGAATGAGTGCCAGGAACACGAGAGAG
AATCCGAAGTCCATGGTGGCGGCAAGCTTTTATTC

544 gH1 B2
GATFCCCGGGATTAATGCCACCGATCCATTCCAGGCCTTGTCCTCGGAGCCTGCCTGACCC
AATGAATCCAATAATTTGTGAACCTGTAGCCGCTAGC

544gH1 B3
CGTAATTACCGTAGCCTTCTCTAGTACAATAGTACACTGCGGTGTCTCGGATCTCAGAG
ATGACAGCTCCATGTAGACAGTGCTTGTGGAGG

544gH1 F1
GAATAAAAGCTTGCCGCCACC

544gH1 R1
TTTCTTGGGCCCTTTGTAGAAG

544 gL1 T1
GCTTCCCGGGGTGACGTTCAAGTGACCCAGAGCCCATCCAGCCTGAGCGCATCTGTAGG
AGACCGGGTCACCATCACTTGTAGATCC

544 gL1 T2
TATCTGCACAAACCAGGTAAAGCCCCACAATTGCTCATCTACGGAATCTCTAACAGATT
AGTGGTGTACCAGACAGGTTTCAGCGGTTCC

544gL1 T3
AGATTTCGCCACTTATTACTGTTTACAAGGTACACATCAGCCGTACACATTCCGGTCAGGG
TACTAAAGTAGAAATCAAACGTACGGCGTGC

544gL1 B1
GAACGTCACCCCGGGAAGCAGGAATCCAGAACAACAGAAGCACCAACAGCCTAACAGG
CAACTTCATGGTGGCGGCTTGAATCATCC

544gL1 B2
CTTTACCTGGTTTGTGCAGATACCAAGACAAAAAGGTGTTCCCATAACTGTTTGCAAGAC
TCTGACTGGATCTACAAGTGATGGTGAC

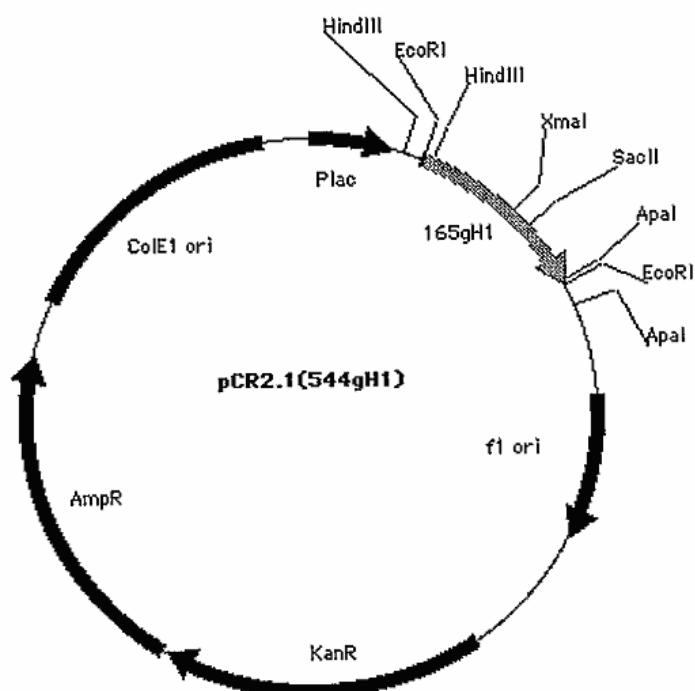
544gL1 B3
AACAGTAATAAGTGGCGAAATCTTCTGGCTGGAGAGACGAGATCGTGAAGGTGAAATCA
GTACCACTCCGGAACCGCTGAACCTGTCTG

544gL1 F1
GGATGATTCTGAAGCCGCCAC

544gL1 R1
GCACGCCGTACGTTTGATTTC

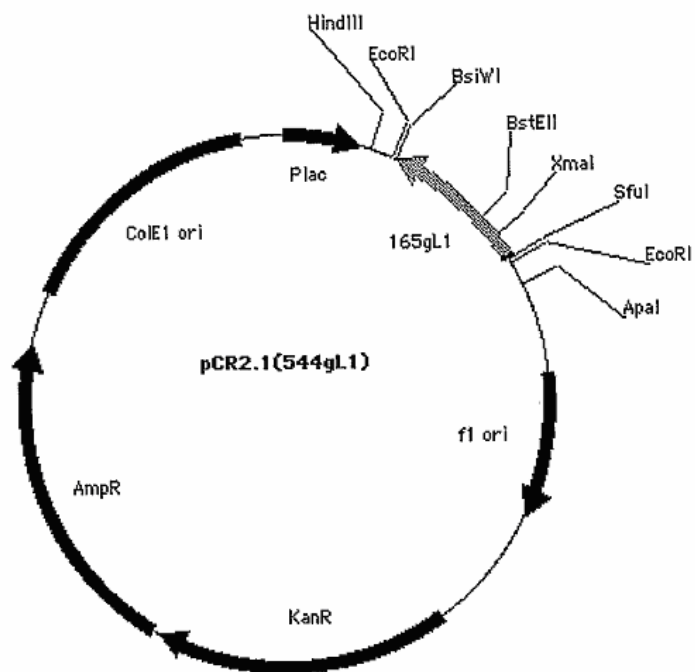
Фіг. 10 (продовження)

Плазмідні карти проміжних векторів pCR2.1 (544GH1)



Фіг. 11

Плазмідні карти проміжних векторів pCR2.1 (544GL1)



Фиг. 12

Олігонуклеотидні кластери, що використовуються для створення додаткових трансплантатів

gH4

XmaI 10 20 30 40 50 SacII
 CC GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAT CTA AAG GGC AGA GCA ACG CTG ACC GC
 C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTA GAT TTC CCG TCT CGT TGC GAC TGG
 P G N N Y A T Y R R N L K G R A T L T A

gH5

XmaI 10 20 30 40 50 SacII
 CC GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAT CTA AAG GGC AGA GTT ACG ATG ACC GC
 C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTA GAT TTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG
 P G N N Y A T Y R R K F Q G R V T M T A

gH6

XmaI 10 20 30 40 50 SacII
 CC GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAA TTC CAG GGC AGA GCA ACG CTG ACC GC
 C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTT AAG GTC CCG TCT CGT TGC GAC TGG
 P G N N Y A T Y R R K F Q G R A T L T A

gH7

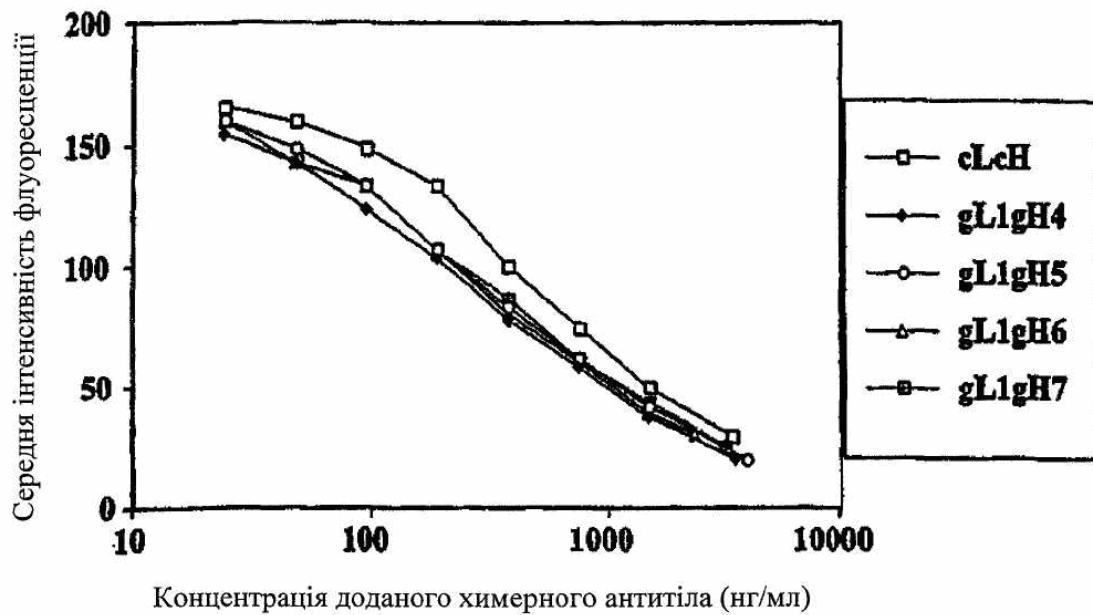
XmaI 10 20 30 40 50 SacII
 CC GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAA TTC CAG GGC AGA GTT ACG ATG ACC GC
 C TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTT AAG GTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG
 P G N N Y A T Y R R K F Q G R V T M T A

gI2

XmaI 10 20 30 40 50 60
BstEII C CCG GGT GAC GTT GTC GTG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT GTA GGA GAC CCG
 CCA CTG CAA CAG CAC TGG GTC TCG GGT AGG TCG GAC TCG CGT AGA CAT CCT CTG GCC CAG TG
 S R G D V V V T Q S P S S L S A S V G D R V T

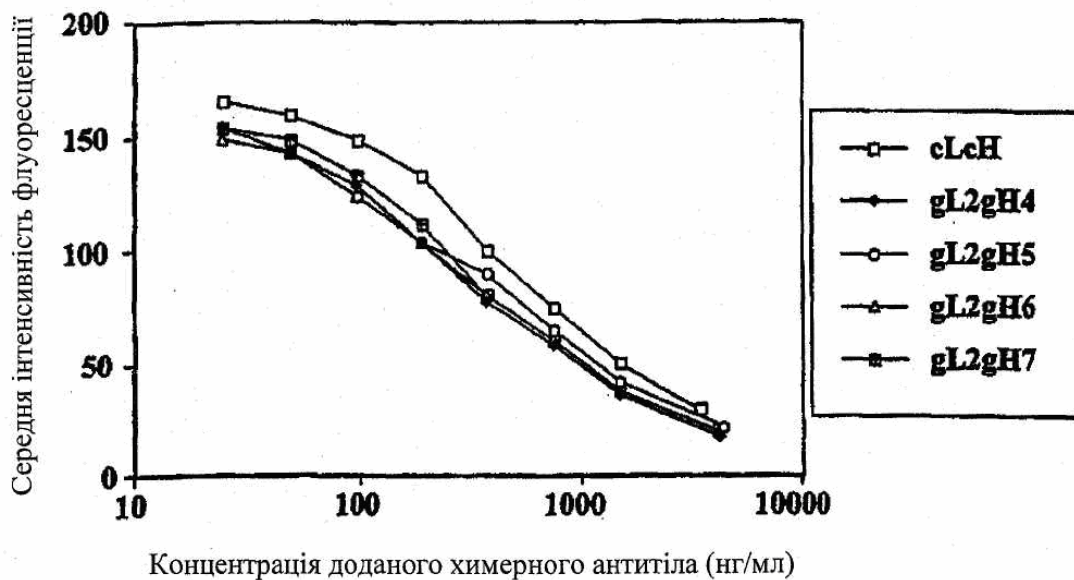
Фиг. 13

Аналіз на конкурентне зв'язування між флуоресцентно міченим мишачим антитілом 5/44 і прищепленими варіантами



Фіг. 14

Аналіз на конкурентне зв'язування між флуоресцентно міченим мишачим антитілом 5/44 і прищепленими варіантами



Фіг. 15

Повнорозмірна ДНК-послідовність прищеплених важкого і легкого ланцюгів

а) Важкий ланцюг

```

      10      20      30      40      50      60
AAGCTTGCCG CCACC ATG GAC TTC GGA TTC TCT CTC GTG TTC CTG GCA CTC ATT CTC AAG
TTCGAAACGGC GGTGG TAC CTG AAG CCT AAG AGA GAG CAC AAG GAC CGT GAG TAA GAG TTC
      M D F G F S L V F L A L I L K>

      70      80      90      100      110
GGA GTG CAG TGT GAG GTG CAA TTG GTC CAG TCA GGA GCA GAG GTT AAG AAG CCT GGT
CCT CAC GTC ACA CTC CAC GTT AAC CAG GTC AGT CCT CGT CTC CAA TTC TTC GGA CCA
G V Q C E V Q L V Q S G A E V K K P G>

      120      130      140      150      160      170
GCT TCC GTC AAA GTT TCG TGT AAG GCT AGC GGC TAC AGG TTC ACA AAT TAT TGG ATT
CGA AGG CAG TTT CAA AGC ACA TTC CGA TCG CCG ATG TCC AAG TGT TTA ATA ACC TAA
A S V K V S C K A S G Y R F T N Y W I>

      180      190      200      210      220      230
CAT TGG GTC AGG CAG GCT CCG GGA CAA GGC CTG GAA TGG ATC GGT GGC ATT AAT CCC
GTA ACC CAG TCC GTC CGA GGC CCT GTT CCG GAC CTT ACC TAG CCA CCG TAA TTA GGG
H W V R Q A P G Q G L E W I G G I N P>

      240      250      260      270      280
GGG AAT AAC TAC GCT ACA TAT AGG AGA AAA TTC CAG GGC AGA GTT ACG ATG ACC GCG
CCC TTA TTG ATG CGA TGT ATA TCC TCT TTT AAG GTC CCG TCT CAA TGC TAC TGG CCG
G N N Y A T Y R R K F Q G R V T M T A>

      290      300      310      320      330      340
GAC ACC TCC ACA AGC ACT GTC TAC ATG GAG CTG TCA TCT CTG AGA TCC GAG GAC ACC
CTG TGG AGG TGT TCG TGA CAG ATG TAC CTC GAC AGT AGA GAC TCT AGG CTC CTG TGG
D T S T S T V Y M E L S S L R S E D T>

      350      360      370      380      390      400
GCA GTG TAC TAT TGT ACT AGA GAA GGC TAC GGT AAT TAC GGA GCC TGG TTC GCC TAC
CGT CAC ATG ATA ACA TGA TCT CTT CCG ATG CCA TTA ATG CCT CCG ACC AAG CCG ATG
A V Y Y C T R E G Y G N Y G A W F A Y>

      410      420      430      440      450
TGG GGC CAG GGT ACC CTA GTC ACA GTC TCC TCA GCT TCT ACA AAG GGC CCA TCC GTC
ACC CCG GTC CCA TGG GAT CAG TGT CAG AGG AGT CGA AGA TGT TTC CCG GGT AGG CAG
W G Q G T L V T V S S A E T K G P S V>

      460      470      480      490      500      510
TTC CCC CTG GCG CCC TGC TCC AGG AGC ACC TCC GAG AGC ACA GCC GCC CTG GGC TGC
AAG GGG GAC CGC GGG ACG AGG TCC TCG TGG AAG CTC TCG TGT CCG CCG GAC CCG ACG
F F L A P C S R S T S E S T A A L G C>

      520      530      540      550      560      570
CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG
GAC CAG TTC CTG ATG AAG GGG CTT GGC CAC TGC CAC AGC ACC TTG AGT CCG CCG GAC
L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L>

      580      590      600      610      620      630
ACC AGC GGC GTG CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC
TGG TCG CCG CAC GTG TGG AAG GGC CGA CAG GAT GTC AAG AGT CCT GAG ATG AAG GAG
T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L>

```

Фиг. 16

b) Легкий ланцюг

```

        640          650          660          670          680
AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACG AAG ACC TAC ACC TGC AAC
TCG TCG CAC CAC TGG CAC GGG AGG TCG TCG AAC CCG TGC TTC TGG ATG TGG ACG TTG
S S V V T V P S S S L G T K T Y T C N>

690          700          710          720          730          740
GTA GAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AGA GTT G GTGAGAGGCC
CAT CTA GTG TTC GGG TCG TTG TGG TTC CAC CTG TTC TCT CAA C CACTCTCOGG
V D H K P S N T K V D K R V>

        750          760          770          780          790          800          810
AGCACAGGGA GGGAGGCTGT CTGCTGGAAG CCAGGCTCAG CCTCTCTGCC TGGACGCACC COGGCTGTGC
TCGTGTCCCT CCCTCCACAC GACGACCTTC GGTCCAGTTC GGGAGGACCG ACCTGCCTGG GGCCGACACG

        820          830          840          850          860          870          880
AGCCCCAGCC CAGGGCAGCA AGGCATGCCC CATCTGTCTC CTCACCCGGA GGCTCTGAC CACCCACTC
TCGGGGTCGG GTCCCGTCGT TCCGTACGGG GTAGACAGAG GAGTGGGCCT CCGGAGACTG GTGGGGTGAG

        890          900          910          920          930          940          950
ATGCCCCAGG AGAGGGTCTT CTGGATTTTT CCACCAGGCT CCGGGCAGCC ACAGGGCTGA TGCCCTTACC
TACGGGTCCC TCTCCAGAA GACCTAAAAA GGTGTCCGA GGCCTCTCG TGTCCGACCT ACGGGGATGG

        960          970          980          990          1000          1010          1020
CCAGGCCCTG CGCATACAGG GGCAGGTGCT GGCCTCAGAC CTGCCAAGAG CCATATCCGG GAGGACCTG
GGTCCGGGAC GGTATGTCC CCGTCCACGA CGGAGTCTG GACGGTTCTC GGTATAGGCC CTCTGGGAC

        1030          1040          1050          1060          1070          1080          1090
CCCCGACCT AAGCCACCC CAAAGGCCAA ACTCTCACT CCTCAGCTC AGACACCTC TCTCTCCA
GGGACTGGA TTCGGGTGG GTTCCGGTT TGAGAGGTGA GGGAGTCAG TCTGTGAAG AGAGGAGGT

        1100          1110          1120          1130          1140          1150
GATCTGAGTA ACTCCCAATC TTCTCTCTGC A GAG TCC AAA TAT GGT CCC CCA TGC CCA CCA
CTAGACTCAT TGAGGGTTAG AAGAGAGACG T CTC AGG TTT ATA CCA GGG GGT ACG GGT GGT
E S K Y G P P C P P>

1160          1170          1180          1190          1200          1210          1220
TGC CCA GGT AAGCCAACCC AGGCCTGCC CTCCAGCTCA AGGCGGACCA GGTGCCCTAG AGTAGCCTGC
ACG GGT CCA TTCGGTTGG TCCGGAGCGG GAGGTGAGT TCCGCCCTGT CCAAGGATC TCATGGAGG
C P>

        1230          1240          1250          1260          1270          1280
ATCCAGGGAC AGGCCCCAGC CGGGTGCTGA CGCATCCACC TCCATCTCTT CCTCA GCA CCT GAG TTC
TAGGTCCCTG TCCGGGTGCG GCCACGACT GGTAGGTGG AGGTAGAGAA GGAGT CGT GGA CTC AAG
A P E F>

1290          1300          1310          1320          1330          1340
CTG GGG GGA CCA TCA GTC TTC CTG TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC ATG ATC
GAC CCC CCT GGT AGT CAG AAG GAC AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGA GAG TAC TAG
L G G P S V F L F P P K P K D T L M I>

        1350          1360          1370          1380          1390          1400
TCC CCG ACC CCT GAG GTC ACG TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAG GAA GAC CCC GAG
AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGC ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTC CTT CTG GGG CTC
S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E>

```

Фіг. 16 (продовження)

1410 1420 1430 1440 1450
 GTC CAG TTC AAC TGG TAC GTG GAT GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG
 CAG GTC AAG TTG ACC ATG CAC CTA CCG CAC CTC CAC GTA TTA GGG TTC TGT TTC GCG
 V Q F N W Y V D G V E V H N A K T K P>

1460 1470 1480 1490 1500 1510
 CCG GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACG TAC CCG GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC
 GCC CTC CTC GTC AAG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG
 R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H>

1520 1530 1540 1550 1560 1570
 CAG GAC TGG CTG AAC GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG
 GTC CTG ACC GAC TTG CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AAG TTG TTT CCG GAG GGC
 Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P>

1580 1590 1600 1610 1620 1630
 TCC TCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGTGG GACCCACGGG GTGGGAGGGC
 AGG AGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CCG TTT CCACC CTGGGTGCCC CACGCTCCCG
 S S I E K T I S K A K>

1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700
 CACATGGACA GAGGTGAGCT CGGCCACCC TCTGCCCTGG GAGTGACCGC TGTGCCAAC TCTGTCCCTA
 GTGTACCTGT CTCAGTCCA GCGGGGTGGG AGACGGGACC CTCACTGGCG ACACGGTTGG AGACAGGGAT

1710 1720 1730 1740 1750
 CA GGG CAG CCC CGA GAG CCA CAG GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CAG GAG GAG ATG
 GT CCC GTC GGG GCT CTC GGT GTC CAC ATG TGG GAC GGG GGT AGG GTC CTC CTC TAC
 G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E N>

1760 1770 1780 1790 1800 1810
 ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAC CCC AGC GAC ATC
 TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG TTT CCG AAG ATG GGG TCG CTG TAG
 T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I>

1820 1830 1840 1850 1860 1870
 GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC
 CCG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG
 A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P>

1880 1890 1900 1910 1920
 GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC AGC AGG CTA ACC GTG GAC AAG AGC
 CAC GAC CTG AAG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG TCG TCC GAT TGG CAC CTG TTC TCG
 V L D S D G S F P L Y S R L T V D K S>

1930 1940 1950 1960 1970 1980
 AGG TGG CAG GAG GGG AAT GTC TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC
 TCC ACC GTC CTC CCC TTA CAG AAG AGT ACG AGG CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG
 R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N>

1990 2000 2010 2020 2030 2040
 CAC TAC ACA CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CTG GGT AAA TGA GTGC CAGGGCCGGC
 GTG ATG TGT GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GAC CCA TTT ACT CACG GTCCCGGCCG
 H Y T Q K S L S L S L G K *>

2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110
 AAGCCCCCGC TCCCCGGGCT CTCGGGGTGG CGCGAGGATG CTGGGCACT ACCCGTCTA CATACTTCCC
 TTGGGGGGCG AGGGGCCCCA GAGCCCCAGC GCGCTCCTAC GAACCGTGCA TGGGGCAGAT GTATGAGGGG

2120 2130 2140 2150 2160
 AGGCACCCAG CATGGAATA AAGCACCCAC CACTGCCCTG GCTCGAATTC
 TCCGTGGGTC GTACCTTAT TTCGTGGGTG GTGACGGGAC CGAGCTTAAG

Фіг. 16 (продовження)

b) Легкий ланцюг

10	20	30	40	50	60
TTGGAAGCCG	CCACC ATG AAG TTG CCT GTT AGG CTG TTG GTG CTT CTG TTG TTC TGG ATT				
AAGCTTCGGC	GCTGG TAC TTC AAC GGA CAA TCC GAC AAC CAC GAA GAC AAC AAG ACC TAA				
	N K L P V R L L V L L L F W I>				
70	80	90	100	110	
CCT GCT TCC CGG GGT GAC GTT CAA GTG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC GCA TCT					
GGA CGA AGG GCC CCA CTG CAA GTT CAC TGG GTC TCG GGT AGG TCG GAC TCG CGT AGA					
P A S R G D V Q V T Q S P S S L S A S>					
120	130	140	150	160	170
GTA GGA GAC CGG GTC ACC ATC ACT TGT AGA TCC AGT CAG AGT CTT GCA AAC AGT TAT					
CAT CCT CTG GCC CAG TGG TAG TGA ACA TCT AGG TCA GTC TCA GAA CGT TTG TCA ATA					
V G D R V T I T C R S S Q S L A N S Y>					
180	190	200	210	220	230
GGG AAC ACC TTT TTG TCT TGG TAT CTG CAC AAA CCA GGT AAA GCC CCA CAA TTG CTC					
CCC TTG TGG AAA AAC AGA ACC ATA GAC GTG TTT GGT CCA TTT CGG GGT GTT AAC GAG					
G N T F L S W Y L H K P G K A P Q L L>					
240	250	260	270	280	
ATC TAC GGA ATC TCT AAC AGA TTT AGT GGT GTA CCA GAC AGG TTC AGC GGT TCC GGA					
TAG ATG CCT TAG AGA TTG TCT AAA TCA CCA CAT GGT CTG TCC AAG TCG CCA AGG CCT					
I Y G I S N R F S G V P D R F S G S G>					
290	300	310	320	330	340
AGT GGT ACT GAT TTC ACC CTC ACG ATC TCG TCT CTC CAG CCA GAA GAT TTC GCC ACT					
TCA CCA TGA CTA AAG TGG GAG TGC TAG AGC AGA GAG GTC GGT CTT CTA AAG CGG TGA					
S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T>					
350	360	370	380	390	400
TAT TAC TGT TTA CAA GGT ACA CAT CAG CCG TAC ACA TTC GGT CAG GGT ACT AAA GTA					
ATA ATG ACA AAT GTT CCA TGT GTA GTC GGC ATG TGT AAG CCA GTC CCA TGA TTT CAT					
Y Y C L Q G T H Q P Y T F G Q G T K V>					
410	420	430	440	450	
GAA ATC AAA GGT ACG GTA GCG GCC CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG					
CTT TAG TTT GCA TGC CAT CCG CGG GGT AGA CAG AAG TAG AAG GGC GGT AGA CTA CTC					
E I K R T V A A P S V F I F P P S D E>					
460	470	480	490	500	510
CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA					
GTC AAC TTT AGA CCT TGA CGG AGA CAA CAC ACG GAC GAC TTA TTG AAG ATA GGG TCT					
Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R>					
520	530	540	550	560	570
GAG GCC AAA GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG					
CTC CGG TTT CAT GTC ACC TTC CAC CTA TTG CGG GAG GTT AGC CCA TTG AAG GTC CTC					
E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E>					
580	590	600	610	620	630
AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG					
TCA CAG TGT CTC GTC CTG TCG TTC CTG TCG TGG ATG TCG GAG TCG TCG TGG GAC TGC					
S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T>					
640	650	660	670	680	

Фіг. 16 (продовження)

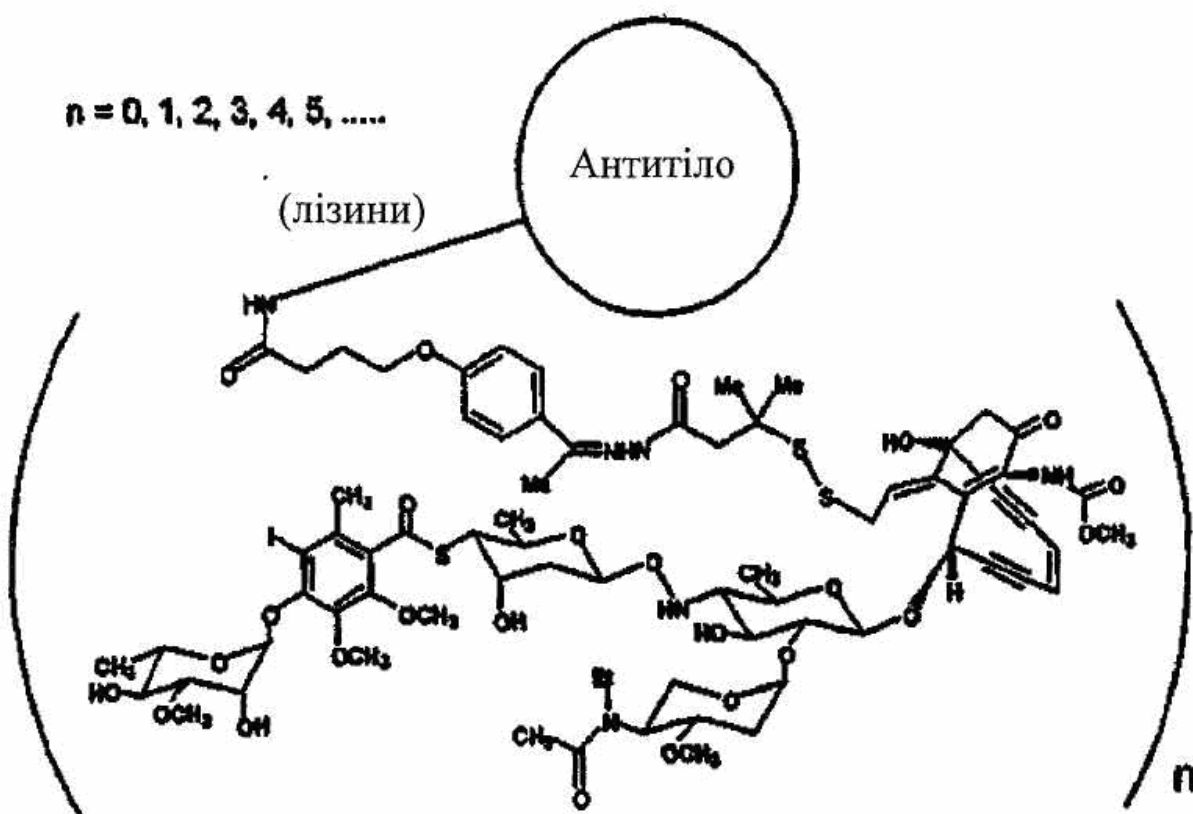
CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG
 GAC TCG TTT CGT CTG ATG CTC TTT GTG TTT CAG ATG GGG ACG CTT CAG TGG GTA GTC
 L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q>

 690 700 710 720 730 740
 GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAG ACGGA
 CCG GAC TCG AGC GGG CAG TGT TTC TCG AAG TTG TCC CCT CTC ACA ATC TCCCT
 G L S S P V T K S F N R G E C *>

 750 760 770 780
 GAAGTGCCCC CACCTGCTCC TCA GTTCCAG CCTGGGAATT C
 CTTCACTGGG GTGGACGAGG AGTCAAGGTC GGACCCCTAA G

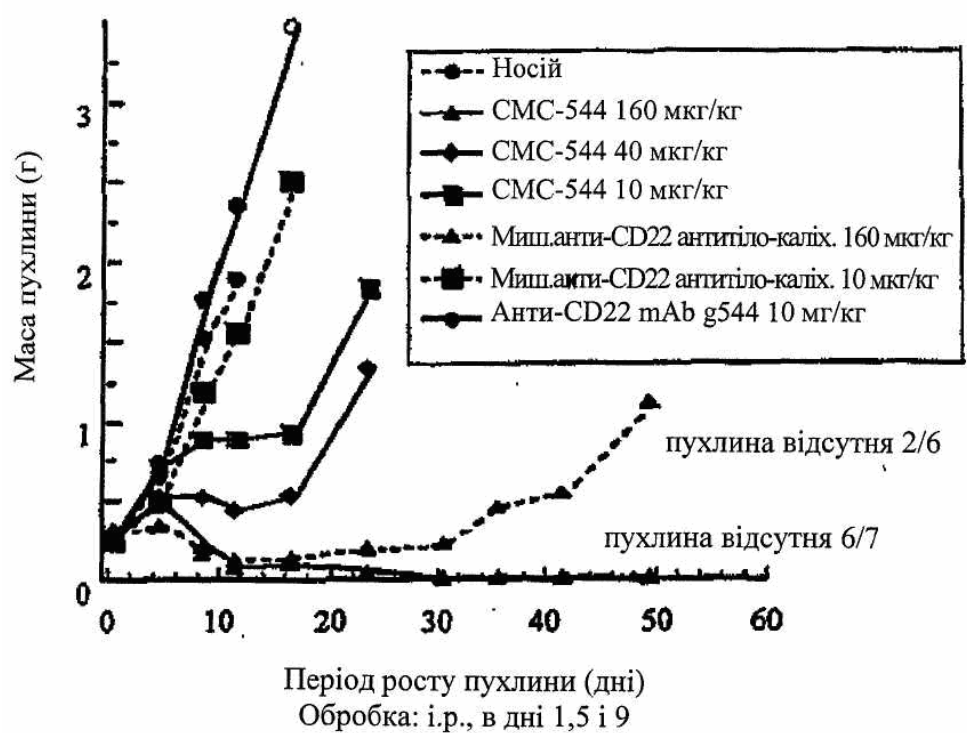
Фіг. 16 (продовження)

Структура кон'югату "антитіло-NAc-гамма-каліхеаміцин-DMH"



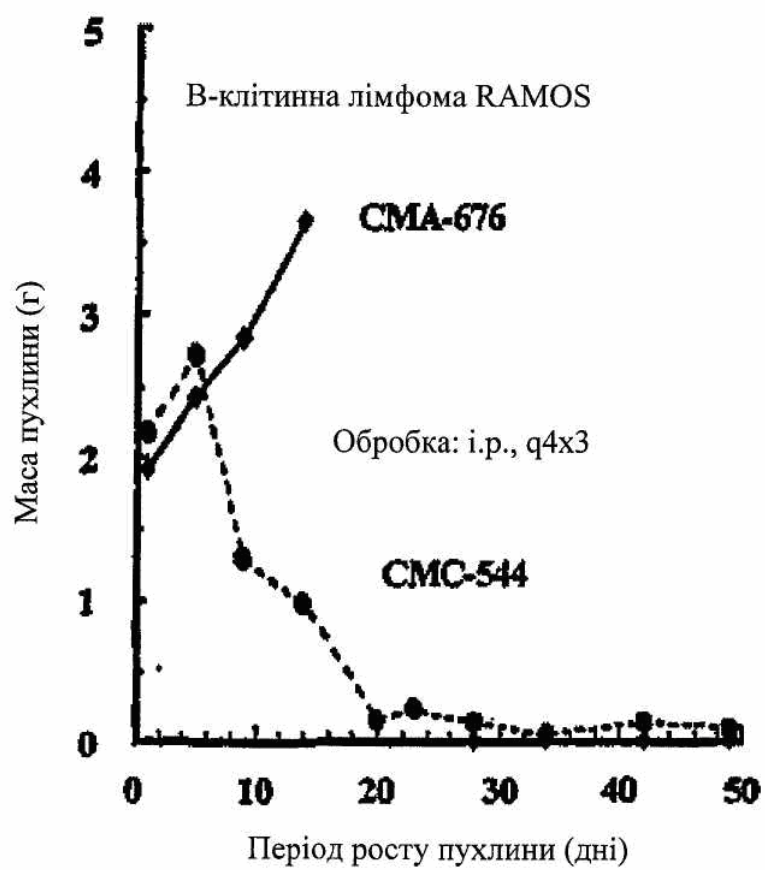
Фіг. 17

Вплив СМС-544 на ріст В-клітинної лімфоми RAMOS



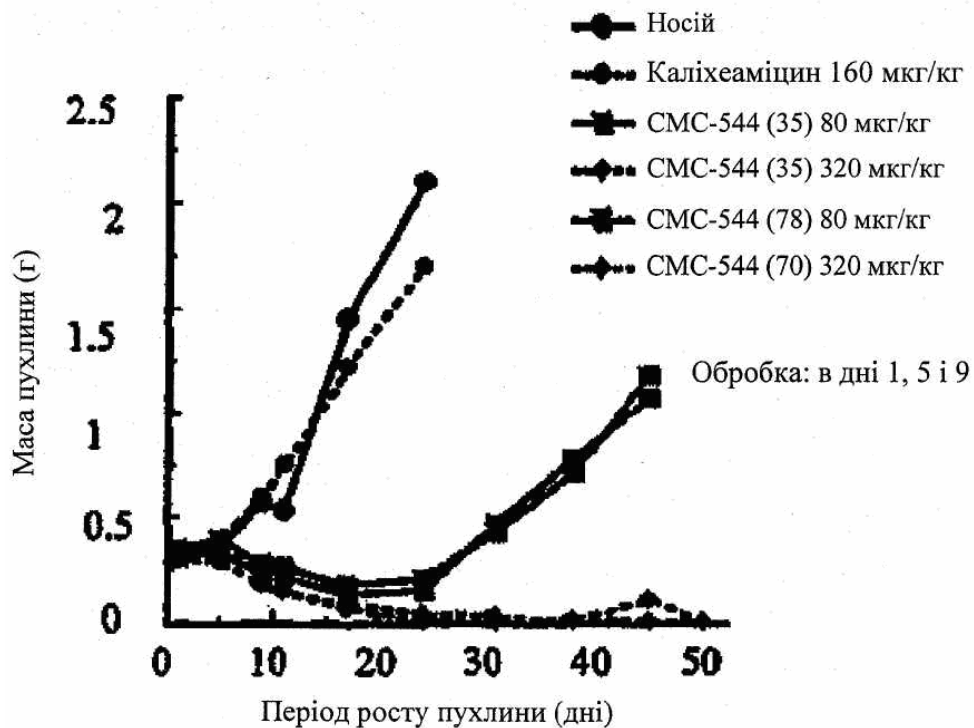
Фіг. 18

Вплив СМС-544 на ріст великоклітинної В-лімфоми



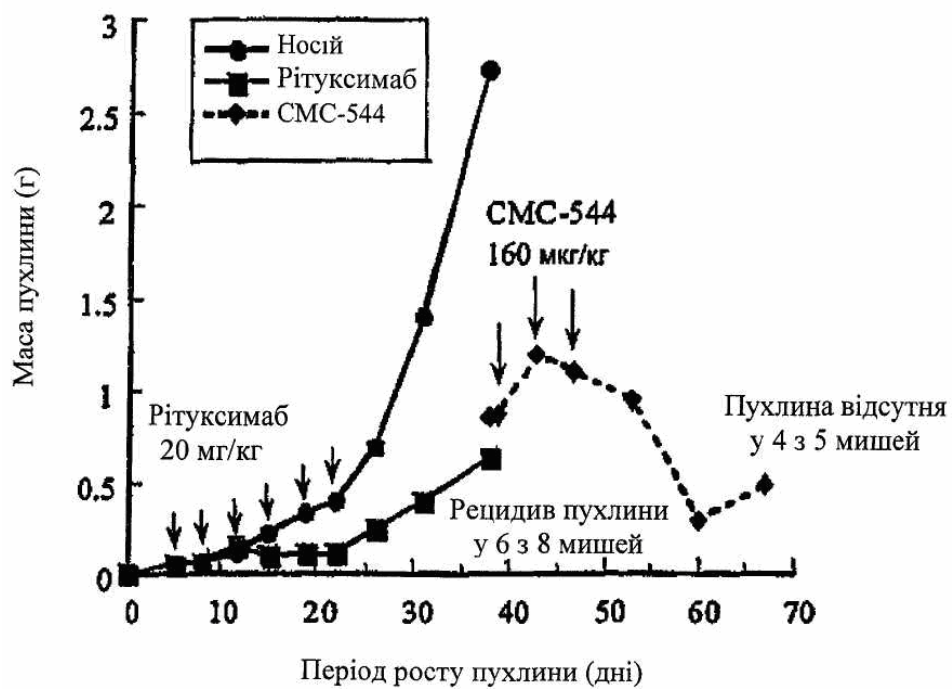
Фіг. 19

Вплив СМС-544, одержаного методом кон'югування СМА-676 і методом кон'югування СМС-544, на ріст RL-лімфоми



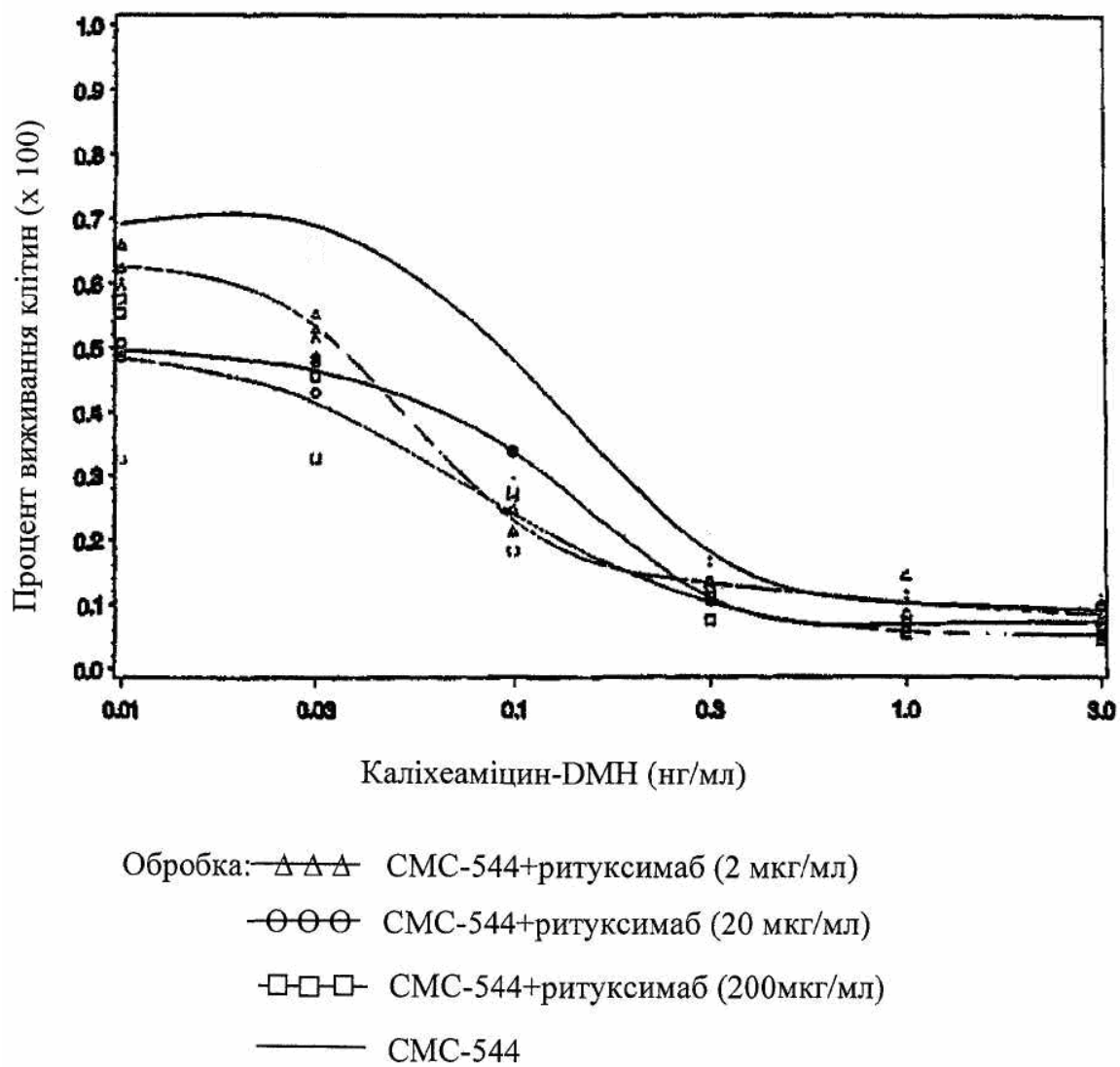
Фіг. 20

Оброблена ритуксимабом (RITUXAN™) великоклітинна RL-лімфома є чутливою до СМС-544-обробки



Фіг. 21

Вплив ритуксимабу (RITUXAN™) на цитотоксичну дію СМС-544

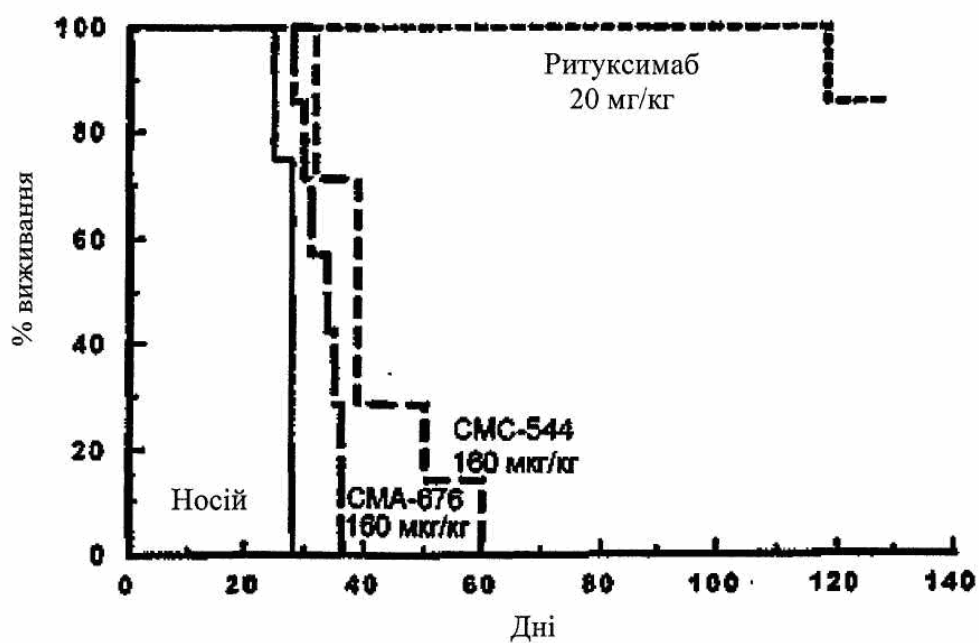


Фіг. 22

Вплив СМС-544, ритуксимабу (RITUXAN™) і СМА-67 6 на виживання мишей SCID з дисемінованою ранньою В-клітинною лімфомою RAMOS

Клітини В-клітинної лімфони Ramos ін'єктували i.v. мишам SCID на день 0

Обробка, і.р. в дні 3, 7, 11 Q4Dx3

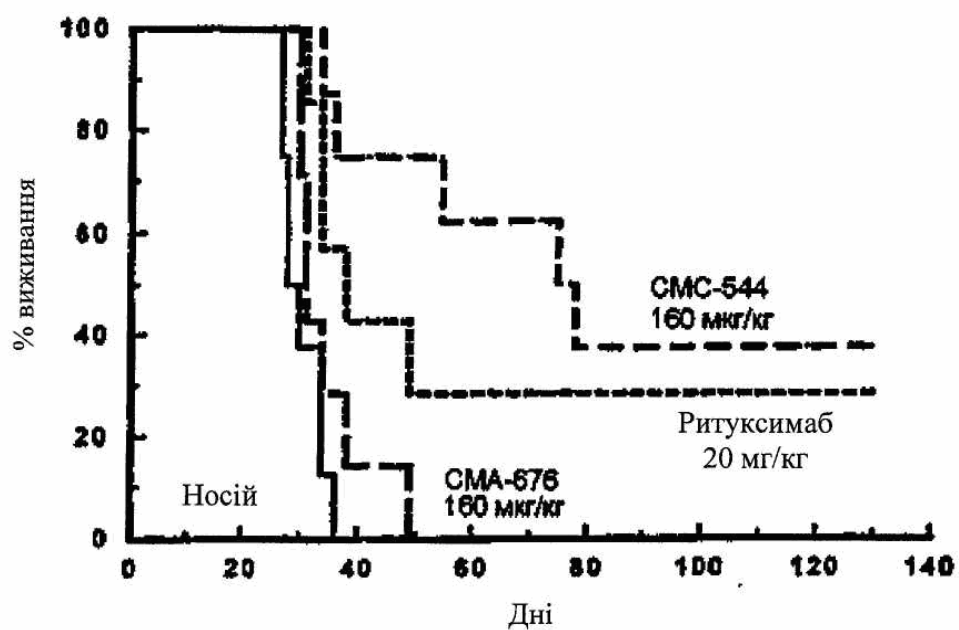


Фіг. 23

Вплив СМС-544, ритуксимабу (RITUXAN™) і СМА-676 на виживання мишей
SCID з дисемінованою пізньою В-клітинною лімфомою RAMOS

Клітини В-клітинної лімфони
Ramos ін'єктували i.v.
мишам SCID на день 0

Обробка, i.p. в дні 9, 13, 17 Q4Dx3

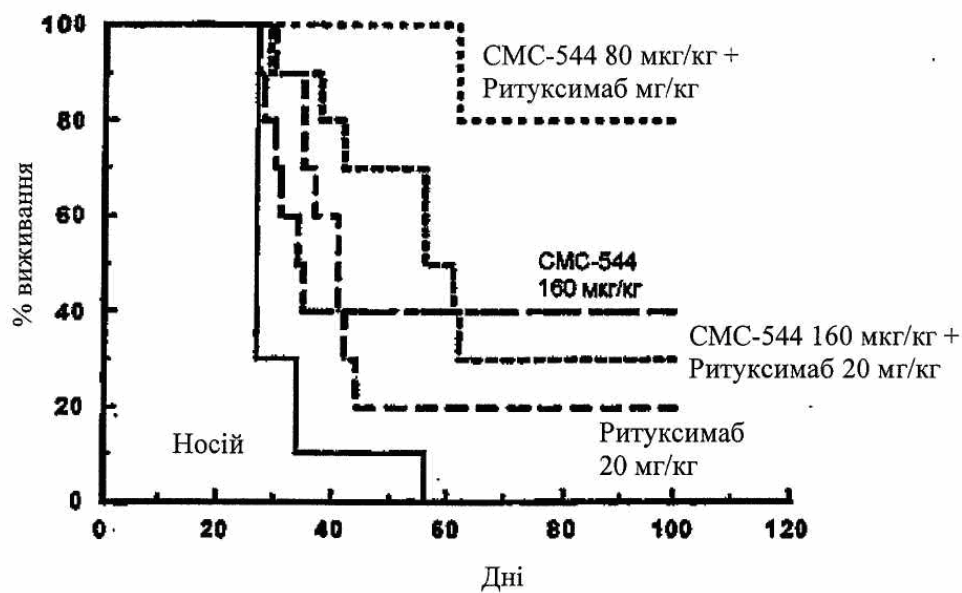


Фіг. 24

Вплив СМС-544, ритуксимабу (RITUXANTM) і СМА-676 на виживання мишей
SCID з дисемінованою пізньою В-клітинною лімфомою RAMOS

Клітини В-клітинної лімфоми
Ramos ін'єктували і.v.
мишам SCID на день 0

Обробка, і.р. в дні 9, 13, 17 Q4Dx3

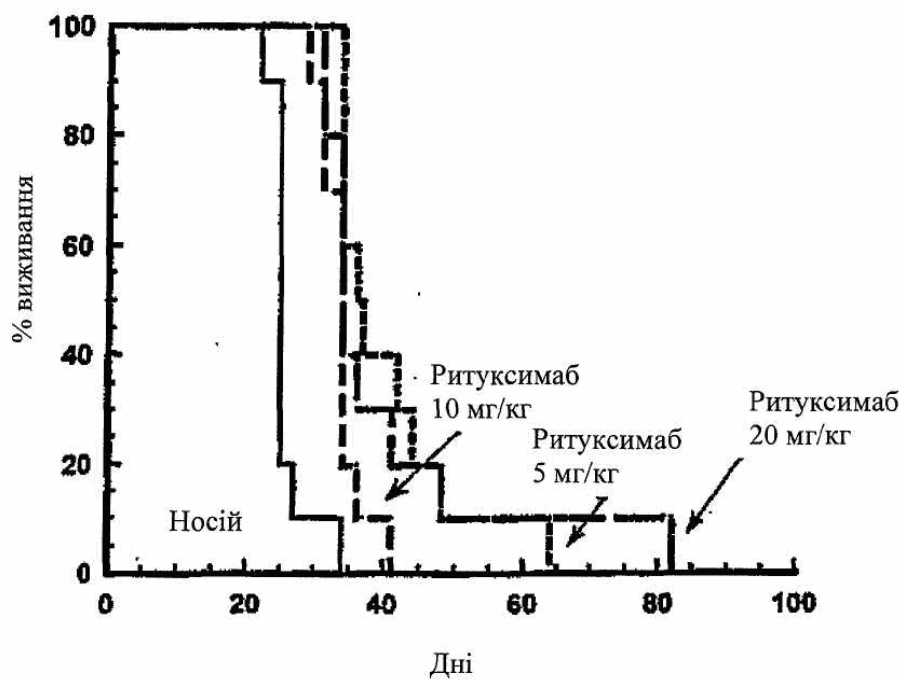


Фіг. 25

Вплив СМС-544, ритуксимабу (RITUXAN™) і СМА-676 на виживання мишей
SCID з дисемінованою пізньою В-клітинної лімфомою RAMOS

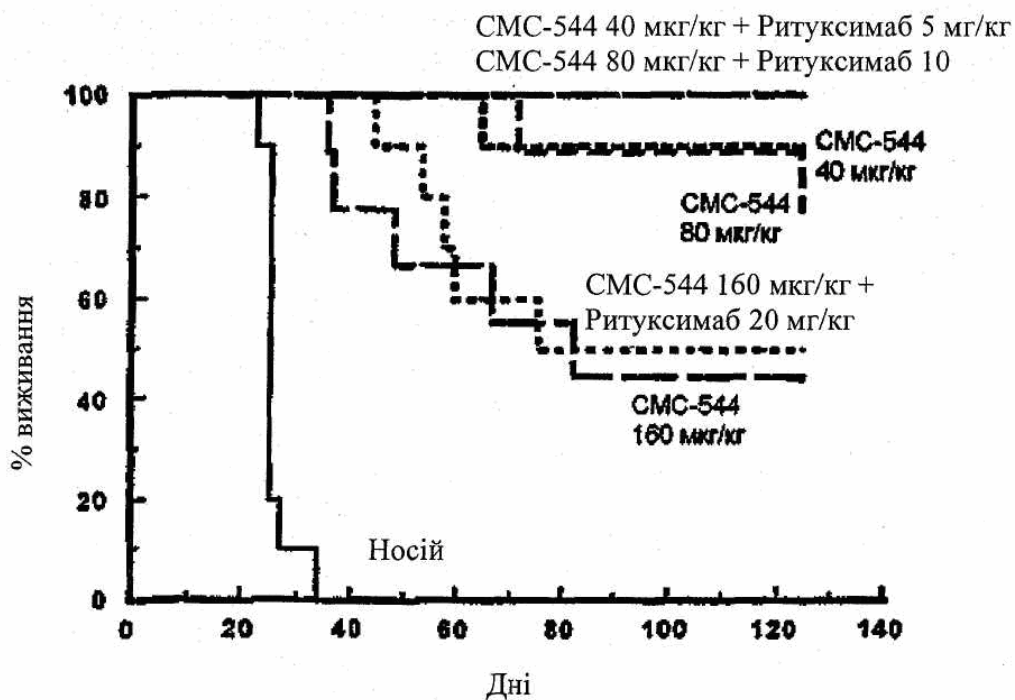
Клітини В-клітинної лімфоми
Ramos ін'єктували і.v.
мишам SCID на день 0

Обробка, і.р. в дні 9, 13, 17 Q4Dx3



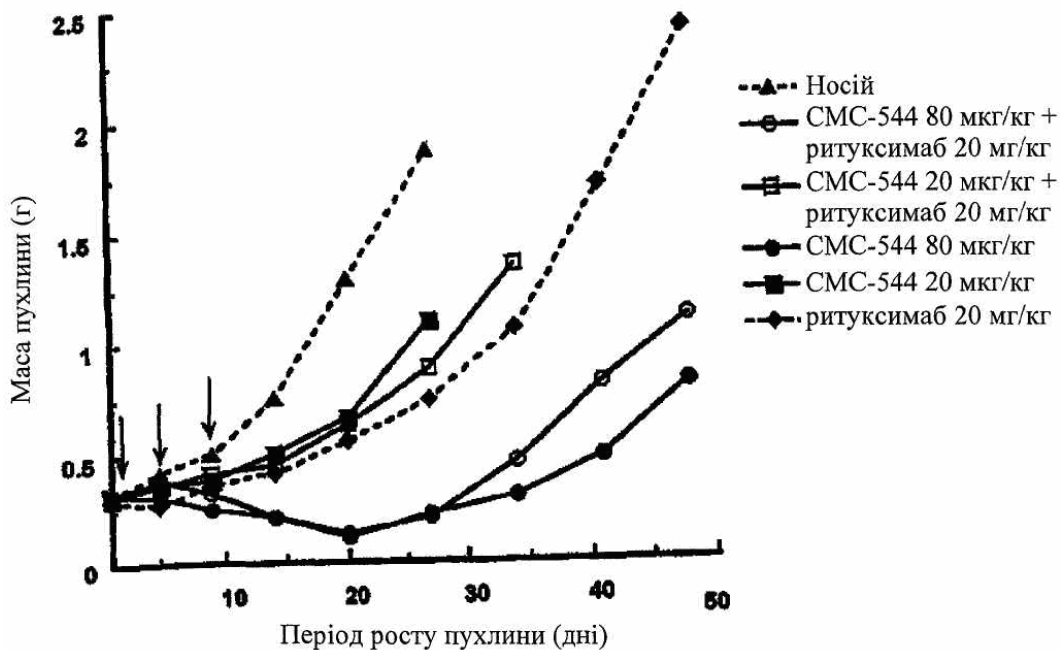
Фіг. 26

Вплив СМС-544, ритуксимабу (RITUXAN™) і СМА-676 на виживання мишей SCID з дисемінованою пізньою В-клітинною лімфомою RAMOS



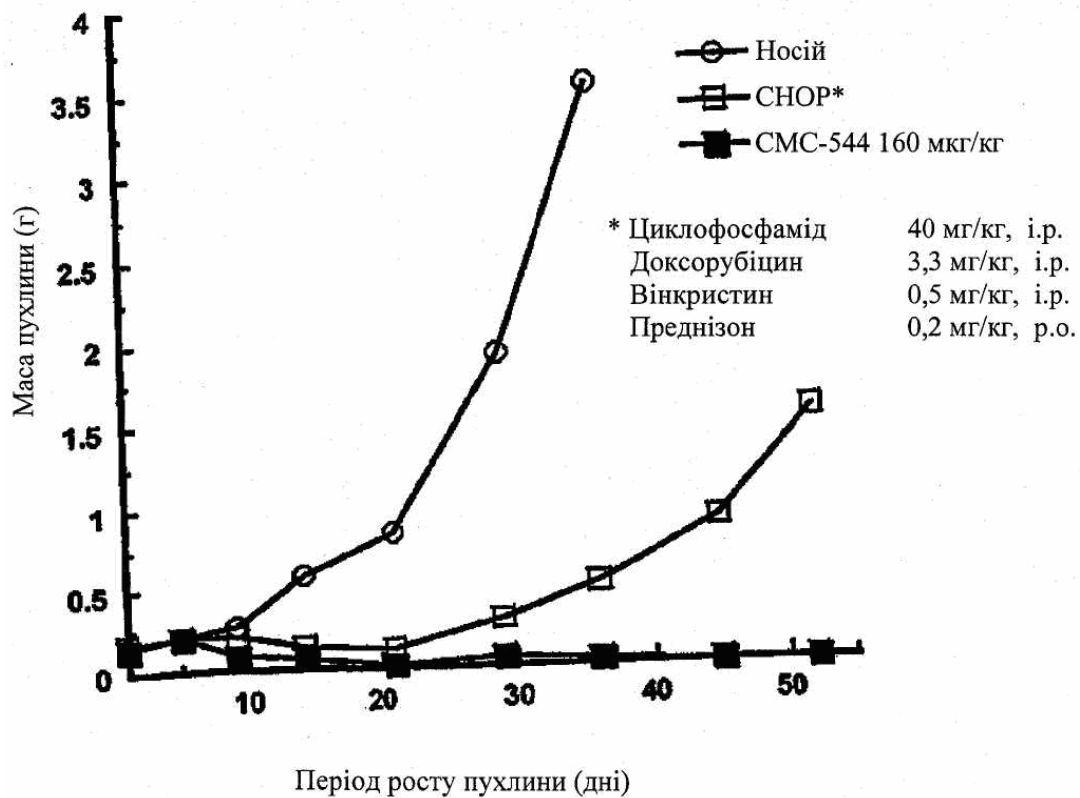
Фіг. 27

Протипухлинна активність СМС-544 з ритуксимабом (RITUXAN™) або без нього, направлена проти неходжкінської RL-лімфоми



Фіг. 28

Протипухлинна активність СМС-544 з ритуксимабом (RITUXAN™)
або без нього, направлена проти неходжкінської RL-лімфоми



Фіг. 29