



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **94388** (13) **C2**

(51) МПК (2011.01)
C07K 16/28 (2011.01)
A61K 39/44 (2011.01)
A61P 35/00
A61P 29/00
A61P 9/10 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) АНТИІНТЕГРИНОВИЙ ІМУНОКОН'ЮГАТ ТА СПОСОБИ ЛІКУВАННЯ ЗА ЙОГО ДОПОМОГОЮ

1

2

(21) a200706239

(22) 30.11.2005

(24) 10.05.2011

(86) PCT/US2005/043250, 30.11.2005

(31) 60/634,445

(32) 09.12.2004

(33) US

(46) 10.05.2011, Бюл.№ 9, 2011 р.

(72) ЧЕН КІМІНГ, CN/US, ТРІХА МОХІТ, US, ЛЮТЦ
РОБЕРТ ДЖ., US, СТІВС РІТА М., US, АМФЛЕТТ
ГОДФРЕЙ, US

(73) ЦЕНТОКОР, ІНК., US

(56) WO 00/64480 A, 02.11.2000

EP 0 425 235 A, 02.05.1991

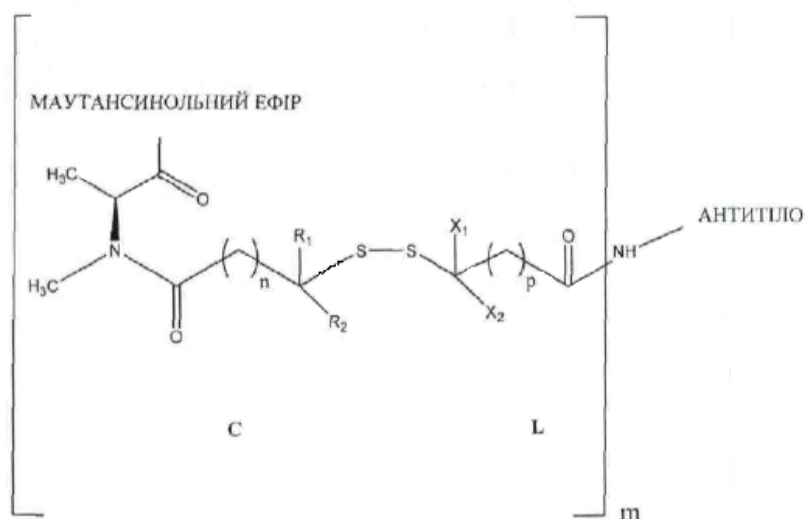
WO 02/12501 A2, 12.02.2002

US 2003/0103985 A1, 05.06.2003

MUELLER B M ET AL: "Antibody conjugates with
morpholinodoxorubicin and acid-cleavable linkers."
BIOCONJUGATE CHEMISTRY 1990 SEP-OCT, vol.
1, no. 5, September 1990 (1990-09), pages 325-330

TRIKHA M ET AL: "CNTO 95, a fully human
monoclonal antibody that inhibits [alpha]v integrins,
has antitumor and antiangiogenic activity in vivo"
INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER 20040620
US, vol. 110, no. 3, 20 June 2004 (2004-06-20) ,
pages 326-335

(57) 1. Кон'югат антитіло-ліки формули



де антитіло являє собою альфа V інтегринове су-
бодиничне специфічне антитіло людини, де зазна-
чене антитіло здатне інтералізуватись клітиною,
що експресує зазначену альфа V субодиницю, де
даний маутансинол підданий етерифікації по С-3:
R₁, R₂, X₁ та X₂ являють собою, незалежно, H, Me,

C₂H₅, лінійний алкіл або алкеніл, що має від 1 до
10 вуглецевих атомів, розгалужений або циклічний
алкіл або алкеніл, що має від 3 до 10 вуглецевих
атомів, феніл, заміщений феніл або гетероцикліч-
ну арильну складову, або гетероциклоалкільну
складову; n дорівнює 1-5; p дорівнює 1-5; i m дорі-

(13) **C2**

(11) **94388**

(19) **UA**

вною 1-10, та його фармацевтично прийнятні солі та ефіри.

2. Кон'югат антитіла за п. 1, який **відрізняється** тим, що в ньому дане антитіло конкурує за зв'язування з альфа V інтегрином людини з моноклональним антитілом CNTO 95 або його фрагментом, що має таку саму активність, як саме антитіло.

3. Кон'югат антитіла за п. 1, який **відрізняється** тим, що в ньому молекула антитіла являє собою моноклональне антитіло CNTO 95 або рекомбінантне антитіло, котре має принаймні одну із варіабельних ділянок (CDR) CNTO 95, як показано у SEQ ID NO: 1-6 або, як показано, консервативні заміщення принаймні однієї CDR.

4. Кон'югат антитіла за п. 2, який **відрізняється** тим, що в ньому дане моноклональне антитіло конкурує з Mab CNTO 95 зв'язуванням з живими клітинами, які експресують альфаVбета3 інтегрин людини.

5. Кон'югат антитіла за п. 1, який **відрізняється** тим, що в ньому молекула антитіла є специфічною щодо епітопу в амінокислотній послідовності SEQ ID NO: 9.

6. Кон'югат антитіла за п. 1, який **відрізняється** тим, що в ньому дане антитіло є людським, гуманізованим або химерним антитілом.

7. Кон'югат антитіла за п. 1, де m дорівнює 3 або 4.

8. Кон'югат антитіла за п. 1, де $n = 2$, R_1 і R_2 обидва являють собою метил, p дорівнює 2 та X_1 та X_2 являють собою H.

9. Спосіб одержання кон'югата за п. 1, що включає стадії: (а) введення однієї або кількох вільних або захищених тіольних груп в молекулу антитіла, котра є специфічною до людських альфа V субодиничних інтегринів; (б) реакції молекули антитіла зі стадії (а) зі сполукою, котра є токсичною до клітин з EC50 10-9 M або менше, зазначена сполука має одну або кілька дисульфідних або тіольних груп; і (с) відновлення результуючого кон'югата.

10. Спосіб за п. 9, який **відрізняється** тим, що в ньому дана токсична сполука являє собою маутансиноід.

11. Спосіб за п. 9 або 10, який **відрізняється** тим, що в ньому для введення вільної або захищеної тіольної групи в молекулу антитіла використовуються (2-піридил)-3-дитіопропанової кислоти N-гідроксисукцинімідний ефір (SPDP), (2-піридил)-4-дитіопентанової кислоти N-гідроксисукцинімідний ефір (SPP), або (2-піридил)-4-дитіобутанової кислоти N-гідроксисукцинімідний ефір (SPDB).

12. Фармацевтична композиція, що містить кон'югат за будь-яким з пп. 1-8 та фармацевтично прийнятний носій, розріджувач або наповнювач.

13. Спосіб застосування кон'югата за будь-яким з пп. 1-8 для одержання фармацевтичної композиції для лікування раку.

14. Спосіб лікування раку у пацієнта, котрий потребує цього, що включає призначення даному пацієнту терапевтично ефективною кількістю кон'югата згідно з будь-яким із пп. 1-8, де рак являє собою аденокарциному молочної залози, легеневої аденокарциному, аденокарциному підшлункової залози, аденокарциному товстої кишки,

карциному ренальних клітин або аденокарциному шлунка.

15. Спосіб лікування раку за п. 14, де рак являє собою епідермоїдний рак голови та шиї, епідермоїдний рак стравоходу, епідермоїдний рак легень, епідермоїдний рак шкіри або нервікальний епідермоїдний рак.

16. Спосіб застосування кон'югата за будь-яким з пп. 1-8 для лікування або запобігання метастатичному поширенню раку, що включає призначення даному пацієнту терапевтично ефективною кількістю кон'югата згідно з будь-яким із пп. 1-8.

17. Спосіб інгібування росту ракових клітин у ссавця, що потребує цього, який включає призначення даному ссавцю кон'югата моноклонального антитіла згідно з будь-яким з пп. 1-8, котрий запобігає зв'язуванню CNTO 95 з живими клітинами, що експресують людський альфаVбета3 інтегрин, у кількості, ефективній для інгібування росту зазначених ракових клітин у зазначеного ссавця.

18. Спосіб за п. 17, де кон'югат антитіла вводять внутрішньовенно.

19. Спосіб за п. 18, де кон'югат антитіла застосовують у кількості від 0,05 мг/кг до 12,0 мг/кг ваги тіла.

20. Спосіб за п. 17, де ссавець є людським пацієнтом.

21. Спосіб інгібування ангіогенезу у ссавця, що потребує цього, котрий включає призначення даному ссавцю з хворобою, яка залежить від ангіогенезу, кон'югата моноклонального антитіла згідно з будь-яким із пп. 1-8, котрий запобігає зв'язуванню CNTO 95 з живими клітинами, що експресують людський альфаVбета3 інтегрин, у кількості, ефективній для інгібування зазначеного ангіогенезу, де хвороби, які залежать від ангіогенезу вибираються із групи, яка складається із метастатичного раку, ангіоми, ангіофіброми, діабетичної ретинопатії, ретинопатії недоношених дітей, неоваскулярної глаукоми, корнеальної хвороби, індукованої ангіогенезом, інволюційних плям, дегенерації жовтої плями, птеригія, ретинальної дегенерації, ретролентальної фіброплазії, гранулярного кон'юктивіту, псоріазу, телеангіектазії, піогенної гранульоми, себореїної екземи, акне та артрити.

22. Спосіб послаблення запальної хвороби у ссавця, що потребує цього, який включає призначення ссавцю, що потребує цього, кон'югата моноклонального антитіла згідно з будь-яким із пп. 1-8, котрий запобігає зв'язуванню CNTO 95 з живими клітинами, які експресують людський альфаVбета3 інтегрин, у кількості, ефективній для послаблення одного або кількох симптомів зазначеної запальної хвороби, котра вибирається із групи, яка складається із ревматоїдного артрити, дегенерації жовтої плями, псоріазу, діабетичної ретинопатії.

23. Спосіб за п. 21, де моноклональне антитіло лікує ангіогенний розлад шкіри, що вибирають із групи, котра складається із псоріазу, венозних виразок, акне, рожевих вугрів, бородавок, екземи, гемангіом та лімфангіогенезу.

24. Спосіб за п. 21, де моноклональне антитіло лікує розлад, який включає корнеальну або ретинальну неоваскуляризацію.

25. Спосіб за будь-яким з пп. 14-24, де антитіло вводять у комбінації з другим терапевтичним або профілактичним агентом, або засобом.

26. Виріб, що включає кон'югатну композицію за будь-яким з пп. 1-8 та контейнер.

27. Кон'югат антитіла за п. 1, де $n = 2$, R_1 і R_2 обидва являють собою метил, r дорівнює 2.

28. Кон'югат антитіла за п. 1, де антитіло включає (i) всі амінокислотні послідовності важких варіабельних ділянок (CDR) CNTO 95, як показано у SEQ ID NO: 1, 2 та 3, та (ii) всі амінокислотні послідовності легких варіабельних ділянок (CDR) CNTO 95, як показано у SEQ ID NO: 4, 5 та 6.

29. Кон'югат антитіла за п. 28, де принаймні одна з послідовностей важкої варіабельної ділянки включає послідовність важкої варіабельної ділянки CNTO 95, як показано у SEQ ID NO: 7.

30. Кон'югат антитіла за п. 28, де принаймні одна з послідовностей легкої варіабельної ділянки включає послідовність легкої варіабельної ділянки CNTO 95, як показано у SEQ ID NO: 8.

31. Кон'югат антитіла за п. 1, де антитіло включає важку варіабельну ділянку CNTO 95, як показано у SEQ ID NO: 7, та легку варіабельну ділянку CNTO 95, як показано у SEQ ID NO: 8.

32. Кон'югат антитіла за п. 1, де антитіло являє собою моноклональне антитіло CNTO 95.

Галузь винаходу

Даний винахід стосується кон'югатів пухлиноспецифічних антитіл з цитотоксичними сполуками. Кон'югати, яким віддається перевага, містять маутансиноїдні сполуки, зчеплені з анти-інтегриновим антитілом через дисульфідний зв'язок.

Рівень техніки

Відома множина спроб поліпшити ефективність протипухлинних ліків шляхом кон'югації цих ліків з моноклональними антитілами (Mab) проти пухлиноспецифічних антигенів з метою підвищити локальну концентрацію даних ліків шляхом цілеспрямованої доставки до даної пухлини. Навпаки, потенціал антитіл щодо фактичного руйнування пухлинних клітин обмежений тими антитілами, що націлені на блокування проліферативних стимулів, таких як фактори росту EGF та Her-2, шляхом блокування зв'язування лігандів з рецепторами або блокування передачі сигналів до рецепторів (ErbB1 та ErbB2), або тими, що викликають ефекторні функції (ADCC або CDC). Таким чином, ведуться пошуки продукту, що об'єднує специфічність Mab з вбивчим потенціалом метаболічної отрути. Прикладами першого є Mab BR96, кон'югований з доксорубіцином (Braslawsky, et al. *Cancer Immunol Immunother* 33:367-374, 1991), та псевдомоновий екзотоксин, злитий з антитілами або фрагментами проти фактору росту (Kreiment, et al., *Intemat. J. Immunopharm.* 14(3):465-72, 1992).

Ці спроби наштовхнули на непередбачувані обмеження, такі як потреба у відносно високих внутрішньоклітинних концентраціях токсину у порівнянні з кількістю зовнішніх зв'язувальних сайтів на клітину. Якщо кількість пухлиноспецифічних антигенів на поверхні ракової клітини складає, за оцінками, 10^5 молекул/клітину, цитотоксичні агенти, що можуть ефективно використовуватись у цих кон'югатах, мають мати IC_{50} значення 10^{-10} - 10^{-11} M проти ракових клітин-мішеней (Chari, R.V.J. *Adv. Drug Delivery Rev.* 1998, 31, 89-104). По-друге, дані ліки мають або виділятися при зв'язуванні з мішенню та проникати у клітину, або вся конструкція має транспортуватись у дану клітину, де токсин розщеплюється або іншим чином активується.

Деякі із цих вад можуть бути розв'язані у більшій чи меншій мірі шляхом використання високоак-

тивних ліків, кон'югованих з інтерналізованим антитілом, та використання хімічного зв'язку, який має підвищену лабільність за внутріклітинних умов. Chari et al. (*Cancer Res.* 52:127-131, 1992; Lu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93:8618-8623, 1996; US Patent No. 5208020) розробили кон'югати антитіл, де дане антитіло зчеплене з маутансиноїдом через дисульфідний зв'язок.

Маутансиноїди являють собою отримані із рослин протигрибкові та протипухлинні агенти. Про виділення трьох петлеподібних мікролідів із етанольних екстрактів *Maytenus ovatus* та *Maytenus buchananii* вперше повідомив S.M. Kupchan et al., і це є предметом патенту США за номером 3896111 сумісно з демонстрацією їх протилейкозних ефектів у моделях на мишах при дозах у межах мікрограми/кг. Проте, маутансиноїди мають неприйнятну токсичність, спричиняючи як центральну, так і периферичну невропатію, і побічні ефекти, зокрема, нудоту, блювання, діарею, підсилення реакцій печінкової функції і, не так часто, слабкість та летаргію. Таким чином, протягом деякого часу дослідження фокусувались на пошуку коректної діючої складової сумісно з придатним хімічним процесом для створення кон'югату маутансин-антитіло з прийнятним періодом напіврозкладу.

На відміну від високої цитотоксичності вільного маутансиноїду, кон'югат антитіла має токсичність на кілька порядків величини нижчу щодо антиген-негативних клітин, у порівнянні з антиген-позитивними клітинами. Дисульфідний зв'язок має ту перевагу, що легко розщеплюється всередині клітин-мішеней внутрішньоклітинним глутатіоном, вивільнюючи високотоксичні вільні ліки. Цей підхід застосовується до антитіл проти пухлиноспецифічних антигенів, наприклад, кон'югат C242-DM1 (Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93:8618-8623, 1996), та HuN901-DM1 (Chari et al., 2000). Проте, застосування цих кон'югатів обмежене через обмежену експресію відповідних антигенів-мішеней.

Таким чином, ще існує потреба поліпшити цей підхід шляхом використання антитіл, націлених на більш вискоекспресовані пухлиноспецифічні антигени, та, при потребі, антигени, вискоекспресовані підчас проліферативної та метастатичної стадій злоякісної хвороби, передбачаючи у такий

спосіб природну концентрацію токсину у найбільш вірулентних клітинах.

Анти-інтегрин моноклональні антитіла

Численні факти свідчать, що прогресуючий ріст пухлин залежить від ангиогенезу, формування нових кров'яних судин, котрі забезпечують пухлини живильними речовинами та киснем, слугують для видалення відходів і діють як канали для метастазу пухлинних клітин у віддалені сайти (Gastl et al., *Oncol.* 54:177-184). Недавні дослідження визначили також роль інтегринів в ангиогенному процесі. Підчас ангиогенезу ряд інтегринів, що експресовані на поверхні активованих ендотеліальних клітин, регулює критичні адгезійні взаємодії з різновидом ECM протеїнів, контролюючи різні біологічні події, такі як міграція клітин, проліферація та диференціація. Конкретно, у значній мірі споріднені, але відмінні інтегрини $\alpha V\beta 3$ та $\alpha V\beta 5$, як було показано, опосередковують незалежні шляхи в ангиогенному процесі. Антитіло, генероване проти $\alpha V\beta 3$, блокувало ангиогенез, індукований базовим фактором росту фібробластів (bFGF), тоді як антитіло, специфічне до $\alpha V\beta 5$, інгібувало ангиогенез, індукований ендотеліальним фактором росту судин (VEGF) (Eliceiri, et al., *J. Clin. Invest.* 103:1227-1230 (1999); Friedlander et al., *Science* 270:1500-1502 (1995)). Таким чином, інтегрини і особливо інтегрини, що містять альфа V субодиницю, є придатними терапевтичними мішенями для хвороб, що включають ангиогенез, такий як очна хвороба та неопластична хвороба, ремоделювання тканин, таке як рестеноз, і проліферацію клітин деяких типів, зокрема, епітеліальноклітинного та плоскоклітинного раку.

Кон'югати антитіло-ліки

Кон'югати агентів, що зв'язують клітини, з високоцитотоксичним маутансином описані (патенти США за номерами 5208020 та 5416064; R.V.J. Chari et al., 1992 *Cancer Res.* 52:127-131). Були розроблені деякі реагенти або реактиви, такі як N-гідроксисукцинімідил ефіри (NHS), для реакції з білково-амінними групами для застосування у формуванні кон'югатів ліки-білок. Реагенти цього типу, загалом, описані Carlsson et al. (*Biochem J.* 173:723, 1978 та у патенті США за номером 4149003). Нітро-піридиллові лінкерні реагенти для кон'югації маутансину з Mab та іншими білками розкриті у WO 2004/016801.

У процесах, на які посилаються вище, агенти, що зв'язують клітини, модифіковані біфункціональним агентом, таким як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP), для введення активної дисульфідної складової. Реакція з цитотоксичними ліками, що містять тіол, запроваджує кон'югат, в якому агент, що зв'язує клітини, такий як моноклональне антитіло, та ліки зчіплюються через дисульфідні зв'язки. Було знайдено, що C-3 гідроксильне положення може бути модифікованим без втрати активності, фактично, деякі ефіри, як було знайдено, мають підсилену активність щодо знищення клітин (дивись огляд у роботі Cassady, et al. *Chem Pharm Bull* 52(1): 1-26, 2004). У патентах США за номерами 5208020 та 5416064 конкретно розглянуто застосування активованого маутансолного ефіру N-метил-N-(3-

метилдитіопропіоніл)-L-аланіну. Маутансоїдна складова із цієї реакції, і котра виділяється при відновлювальному розщепленні дисульфідного зв'язку, була позначена як DM1 [N^2 -деацетил- N^2 -(3-меркапто-1-оксопропіл)-маутансин, реєстр, номер CAS 139504-50-0]. Таким чином, усі кон'югати, одержані з використанням метилдитіольованої форми DM1, утримують незаміщений метиленовий вуглець, сусідній з дисульфідним зв'язком на лікарському боці даного кон'югату (Фіг.1).

Для *in vivo* підсилення стабільності цього дисульфідного зв'язку важливо запровадити стерично обмежені дисульфідні зв'язки, як зазначалось раніше (Thorpe, et al. *Cancer Research* 47:5924-31, 1987). Це може бути досягнуто шляхом використання зшивачів, що несуть один або два метилових замісники на вуглецевому атомі, сусідньому з дисульфідним зв'язком, або використання активованих ліків, що несуть принаймні один замісник на альфа-вуглецевому атомі, сусідньому із сульфгідрильним або дисульфідним замісником.

Хоча проблеми цілеспрямованої доставки тепер, без сумніву, визнані, пошук придатної комбінації специфічності та спорідненості антитіла, кон'югаційної хімії та токсину непередбачуваний. Предметом даного винаходу є запровадження нових кон'югатів антитіло-маутансин, де дане антитіло спрямоване на клітинні поверхневі антигени, при їх достатній кількості для доставки руйнуючої клітини дози маутансиноїду, і де зазначений кон'югат має відповідну хімічну та біологічну стабільність для запровадження терапевтично ефективною швидкості виділення при призначенні суб'єкту.

Стислий виклад винаходу

Предметом даного винаходу є запровадження нових кон'югатів антитіло-маутансин, де дане антитіло спрямоване на клітинні поверхневі антигени, при їх достатній кількості для доставки руйнуючої клітини дози маутансиноїду, і де, як відомо, зазначене антитіло інтерналізується даною клітиною після зв'язування антигену-мішені. У специфічному варіанті, дані кон'югати включають дисульфідний зв'язок, котрий був створений шляхом заміщення сусідніх метиленових вуглеців для запровадження терапевтично ефективною швидкості виділення при призначенні суб'єкту. У специфічному варіанті, даний винахід стосується кон'югату антитіло-ліки, що містить: антитіло, яке зв'язується з альфа V інтегриновою субодиницею людини, кон'югованою з цитотоксичним агентом з IC_{50} 10^{-9} М або менше, де кон'югат антитіло-ліки викликає цитотоксичний або цитостатичний ефект щодо альфа V інтегрину, котрий експресує ракову клітинну лінію. У цьому варіанті антитіла даного винаходу є специфічними щодо принаймні однієї альфа V субодиниці гетеродимерного інтегринового рецептора, такого як альфаVбета1, альфаVбета3, альфаVбета5, альфаVбета6 або альфаVбета8 гетеродимерного інтегринового білка або його фрагмента. Кон'югати, яким віддається перевага, містять маутансиноїдні сполуки, зчеплені з антитілом через дисульфідний зв'язок, і дане антитіло здатне зв'язувати вітронектин та фіброген.

В одному аспекті кон'югати антитіла даного винаходу представлені Формулою

$[C-L]_m-A$,

де А являє собою альфа V інтегринове субодиничне специфічне антитіло людини, де зазначене антитіло здатне інтерналізуватись клітиною, що експресує зазначену альфа V субодиницю; С являє собою цитотоксин з IC_{50} 10^{-9} М або менше; і L являє собою зчепну групу, котра зв'язує дане антитіло та цитотоксин, і також містить зв'язок, здатний розщеплюватись компонентами внутрішньоклітинного середовища; і m репрезентує середню кількість цитотоксичних молекул, зчеплених з даним антитілом, і є цілим числом від 1 до 10, конкретно, 3-4. Даний цитотоксин може вибиратись із групи, яка складається із маутансиноїдів, калікеаміцинів, епотилонів, дискодермоліду, елеутробінів, доласатинів, криптофіцинів, камптотецинів, ризоксину (регістрац. номер CAS 90996546), або таксанових похідних і таких інших сполук, що виявляють половинне від максимального інгібування (IC_{50} або GI_{50}) росту пухлинних клітин при 10^{-9} М або менше.

В одному аспекті першого предмету даного винаходу кон'югат антитіло проти альфа V інтегрину-маутансиноїд містить будь-яку молекулу, що включає білок або пептид, що включає антитіло, яке конкурує за зв'язування з альфа-V субодиницею гетеродимерного людського інтегринового рецептора з моноклональним антитілом CNTO 95. В одному варіанті дане антитіло включає принаймні частину гіперваріабельної ділянки (CDR) важкого або легкого ланцюга, або її частину, що зв'язує ліганд, отриману із антитіла, позначеного як CNTO 95, у комбінації з варіабельною ділянкою важкого ланцюга або легкого ланцюга, константною ділянкою важкого ланцюга або легкого ланцюга, каркасну ділянку або будь-яку її частину, котра може бути введена у дане антитіло з CDR. Описане тут антитіло CNTO 95 являє собою людське антитіло до альфа-V, отримане шляхом імунізації генів від трансгенної миші, для експресії імуноглобуліну людини. Таким чином, в одному варіанті, даний винахід спрямований на антитіла, що містять принаймні одну CDR ділянку або варіабельну ділянку, одержану із антитіла CNTO 95. У варіанті, якому віддається перевага, дане антитіло є CNTO 95.

В іншому аспекті даного винаходу кон'югат антитіло-маутансиноїд включає маутансинольний ефір, котрий виділяється при розщепленні зв'язку, що зчеплює цитотоксин, С, з лінкером, L, компонентами внутрішньоклітинного середовища. В одному варіанті маутансиноїд піддається етерифікації по С-3, С-14, С-15 або С-20 ацильованою амінокислотою, де ацильна група несе захищену сульфгідрильну групу, в якій вуглецевий атом даної ацильної групи, сусідній із захищеною сульфгідрильною групою, має одного або двох замісників, зазначені замісники являють собою CH_3 , C_2H_5 , лінійний алкіл або алкеніл, що має від 1 до 10 вуглецевих атомів, розгалужений або циклічний алкіл, або алкеніл, що має від 3 до 10 вугле-

цевих атомів, феніл, заміщений феніл, або гетероциклічний ароматичний, гетероциклоалкіл радикал, або Н; і де дана ацильна група має довжину лінійного ланцюга із принаймні двох вуглецевих атомів між карбонільною функціональною групою та атомом сірки. У варіанті, якому віддається перевага, етерифікований маутансинол вибирається із $N^{2'}$ -деацетил- $N^{2'}$ -(3-меркапто-1-оксопропіл)-маутансину (DM1, номер реєстрації CAS 139504-50-0), $N^{2'}$ -деацетил- $N^{2'}$ -(4-меркапто-1-оксопентил)-маутансину (DM3), та $N^{2'}$ -деацетил- $N^{2'}$ -(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)-маутансину (DM4).

Другим предметом даного винаходу є запровадження сполук кон'югатів антитіло проти інтегрину-маутансиноїд, що корисні для лікування проліферативних хвороб людини, які спричинені аномальною проліферацією і характеризуються неоваскуляризацією. У варіанті, якому віддається особлива перевага, сполуки даного винаходу використовуються у способі лікування раку, включаючи рак молочної залози, ободової кишки, прямої кишки, легень, простати, нирок, печінки, підшлункової залози, стравоходу, шлунка, матки, яєчника, цервікальний або кісток. Сполуки даного винаходу можуть використовуватись окремо або у комбінації з іншими агентами для запобігання або терапії первинного раку, або запобігання чи терапії метастатичної хвороби.

Інший спосіб другого предмета даного винаходу стосується комбінованого застосування сполук кон'югатів антитіло проти інтегрину-маутансиноїд з хіміотерапевтичними агентами у способах лікування раку. Кон'югати, яким віддається перевага, містять маутансиноїдні сполуки, з'єднані з антитілом через дисульфідний зв'язок, і хіміотерапевтичними агентами, яким віддається перевага, є доксорубіцин, таксан, камптотецин, подофілотоксин, нуклеозидний аналог, або піримідиновий аналог.

У третьому предметі даного винаходу кон'югат антитіло-маутансиноїд одержується за способом, де дане антитіло реагує з біспецифічним лінкерним реагентом, таким як N-сукцинімідил-(2-піридилтіо)алканоат, і потім реагує з попередньо активованим маутансиноїдом, в результаті чого відбувається дисульфідний обмін з утворенням загальмованого дисульфідного зв'язку між антитілом та маутансиноїдом.

В іншому аспекті даного винаходу кон'югат антитіло-маутансиноїд одержується з використанням маутансинольного ефіру, де ацильна складова несе захищену сульфгідрильну групу. В одному варіанті маутансиноїд піддається етерифікації по С-3, С-14, С-15 або С-20 ацильованою амінокислотою, де ацильна група несе захищену сульфгідрильну групу, в якій вуглецевий атом даної ацильної групи, сусідній із захищеною сульфгідрильною групою, має одного або двох замісників, зазначені замісники вибираються із CH_3 , C_2H_5 , лінійного алкілу або алкенілу, що має від 1 до 10 вуглецевих атомів, розгалуженого або циклічного алкілу, або алкенілу, що має від 3 до 10 вуглецевих атомів, фенілу, заміщеного фенілу, гетероциклічної арильної складової, гетероциклоалкільної складової, або Н; і де дана ацильна група має довжину лінійного ланцюга із принаймні двох вуглецевих атомів

між карбонільною функціональною групою та атомом сірки. У варіанті, якому віддається перевага, маутансиноїд являє собою 3-маутансинольний ефір, і зазначена ацильована амінокислотна група несе 0, 1 або 2 метильні групи на вуглецевому атомі, сусідньому із захищеним сульфгідрилом. У варіанті, якому віддається перевага, етерифікований маутансинол вибирається із N²-деацетил-N²-(3-меркапто-1-оксопропіл)-маутансину (DM1, номер реєстрації CAS 139504-50-0), N²-деацетил-N²-(4-меркапто-1-оксопентил)-маутансину (DM3), та N²-деацетил-N²-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)-маутансину (DM4).

В іншому аспекті даного винаходу кон'югат антитіло проти альфа V інтегрину-маутансиноїд одержується у значній мірі в одну стадію шляхом реакції реакційного ефіру, що несе маутансиноїд, з антитілом проти інтегрину, що попередньо хімічно не активувався. Реакційний ефір маутансиноїду може являти собою N-сукцинімідиловий, N-сульфосукцинімідиловий, N-фталімідиловий, N-сульфоталімідиловий, 2-нітрофенільний, 4-нітрофенільний, 2,4-динітрофенільний, 3-сульфоніл-4-нітрофенільний або 3-карбокси-4-нітрофенільний ефір.

Стислий опис фігури

Фігура 1 зображує хімічну структуру тіольованих маутансинових амідів з групами, яким віддається перевага; зазначені DM1, DM3 та DM4.

Фігура 2 зображує хімічні структури та їх хімічні акроніми біфункціональних лінкерних реагентів даного винаходу, яким віддається перевага.

Фігура 3 являє собою схему, що зображує синтетичний метод одержання кон'югатів антитіло-маутансиноїд даного винаходу.

Фігура 4 являє собою графік зміни у часі об'єму пухлини меланоми людини у "голих" мишей та ефект застосування CNTO 95. Мишей піддавали інюкації підшкірно клітинами A375.S2 (3×10^6), і за три дні розпочали дозування CNTO 95 або контрольними засобами. Мишей лікували CNTO 95 або наповнювачем три рази на тиждень при дозі 10 мг/кг інтраперитонеально. Кожна точка являє собою середній об'єм пухлини із 10 тварин з пухлиною (\pm SEM). CNTO 95, що застосовувалося три рази на тиждень, суттєво інгібувало ріст пухлин у порівнянні з контрольними тваринами на 26 добу ($P=0,0005$).

Фігура 5 являє собою графік зміни у часі об'єму пухлини меланоми людини у "голих" щурів та ефект застосування CNTO 95. Щурів піддавали інюкації підшкірно клітинами A375.S2 (3×10^6), і за три дні розпочали дозування CNTO 95 або контрольними засобами. Щурів лікували CNTO 95 або наповнювачем один раз на тиждень при дозі 10 мг/кг внутрішньовенно. Кожна точка являє собою середній об'єм пухлини із 9 тварин з пухлиною (\pm SEM).

Фігура 6 являє собою графік, що зображує ріст клітин меланоми людини A375.S2 у часі у "голих" мишей. Об'єми пухлин виражали як середнє \pm SEM ($n=9$ або 10). Стрілками позначені внутрішньовенні ін'єкції ліків. Зірочка вказує на те, що одна тварина, котра не реагувала на лікування, була умертв-

лена, оскільки об'єм пухлини у неї складав більше 1500 мм³.

Фігура 7 являє собою графік, що зображує ріст клітин меланоми людини A375.S2 у атомічних "голих" мишей. На 14 добу, коли середній об'єм пухлин сягав 250 мм³, тварин згрупували у довільний спосіб та застосували першу дозу. Усіх тварин умертвили на 35 добу. Об'єми пухлин виражали як середнє \pm SEM ($n=9$ або 10). Стрілками позначені внутрішньовенні ін'єкції ліків.

Фігура 8 являє собою графік, що зображує зміну загальної ваги у часі мишей з пухлинами, яким робились ін'єкції на 7 добу після імплантації пухлини і знову кожні 7 днів $\times 5$ 3, 6 або 10 мг/кг CNTO 364; на 7 та 14 добу 25 мг/кг CNTO 364 або F105-DM1, і на 7, 14 та 35 добу 15 мг/кг CNTO 364.

Фігура 9 являє собою графік зміни у часі об'єму пухлин для тих самих тварин, що й на Фіг.8.

Фігура 10 являє собою графік, що зображує об'єми окремих пухлин для всіх тварин у групах як описано на Фіг.8.

Фігура 11 являє собою графік середньої ваги тіла \pm SEM ($n=6$) у часі для "голих" щурів, що мали підшкірні пухлини легеневої карциноми людини A549 і лікувались CNTO 364 при 15 мг/кг або контрольними засобами. Стрілками позначений час внутрішньовенних ін'єкцій.

Фігура 12 являє собою графік, що зображує ріст пухлин легеневої карциноми людини A549 у самиць атимічних щурів. Лікування CNTO 364 (15 мг/кг) дало зворотній хід встановленим пухлинам легеневої карциноми людини A549 у самиць атимічних щурів.

Фігура 13 являє собою графік розсіяння, що зображує вагу окремих пухлин по завершенню дослідження росту пухлин легеневої карциноми людини A549 у самиць атимічних щурів, котрі піддавались лікуванню 15 мг/кг CNTO 364 або контрольними речовинами. Горизонтальними лініями позначені медіани для кожної досліджуваної групи.

Фігури 14A та B являють собою графіки, що зображують зміну середнього об'єму пухлини у часі у щурів з клітинами пухлини ободової кишки людини HT29, котрі піддавались лікуванню CNTO 364 (CNTO 95-SPP-DM1), CNTO 365 (CNTO 95-SSNPB-DM4) та CNTO 366 (CNTO 95-SSNPB-DM4). А. Фізіологічний розчин із фосфатним буфером (PBS) як контрольний розчин та невідповідне антитіло, F105, піддавались кон'югації з тіольованими маутансинами з використанням того самого процесу та реагентів і вводились як ін'єкція на 7 та 21 добу 10 мг/кг. В. Фізіологічний розчин із фосфатним буфером (PBS) як контрольний розчин та кон'юговані антитіла, як описано, вводились як ін'єкція при 20 мг/кг на 7 та 21 добу, за виключенням групи CNTO 365, котра отримала єдину ін'єкцію на 7 добу.

Фігури 15A та B являють собою графіки, що зображують середню зміну ваги тіла у щурів з пухлинами HT29 як описано на Фіг.14.

Детальний опис винаходу

1. Визначення

Для більш легкого розуміння даного винаходу спочатку визначаються деякі терміни. Додаткові

визначення подаються по тексту детального опису.

Терміни "альфа V інтегрин", "альфа V субодиночний інтегрин" та "інтегрин, що містить альфа V субодиночність", застосовуються в даному тексті у взаємозамінний спосіб і відповідають альфа V трансмембранним глікопротеїновим субодиночностям функціонального інтегринового гетеродимеру, і включають усі варіанти, ізоформи та видові гомологи альфа V. Відповідно, антитіла даного винаходу можуть, у деяких випадках, реагувати у перехресний спосіб з альфа V від видів, відмінних від людини, або іншими протеїнами, котрі структурно споріднені з альфа V людини (наприклад, людські альфа V гомологи). В інших випадках дані антитіла можуть бути цілком специфічними до людського альфа V і не виявляють видової або інших типів перехресної реактивності.

Як застосовується у даному тексті, "антитіло" включає повні антитіла та будь-який фрагмент, що зв'язує антиген, або його окремих ланцюг. Так, антитіло містить будь-яку молекулу, котра включає протеїн або пептид, що включає принаймні частину молекули імуноглобуліну, таку як, проте не обмежуючись цим, принаймні одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого або легкого ланцюга, або його частину, що зв'язує ліганд, варіабельну ділянку важкого ланцюга або легкого ланцюга, константну ділянку важкого ланцюга або легкого ланцюга, каркасну (FR) ділянку, або будь-яку її частину, або принаймні одну частину зв'язувального протеїну, що може бути уведена в антитіло даного винаходу. Антитіло може бути мишачим, людським, гуманізованим або химерним.

"Фрагмент, що зв'язує антиген", або його частина включає антитіло з одиничним ланцюгом або їх фрагменти. Функціональні фрагменти включають фрагменти, котрі зв'язують антиген, що зв'язується з альфа-V субодиночністю ссавця. Приклади зв'язувальних фрагментів, що охоплюються терміном "частина, що зв'язує антиген", антитіла включають (i) Fab фрагмент, моновалентний фрагмент, що складається із VL, VH, CL та CH доменів; (ii) F(ab')₂ фрагмент, бівалентний фрагмент, що включає два Fab фрагменти, з'єднані дисульфідним містком у шарнірній області; (iii) Fd фрагмент, що складається із VH та CH доменів; (iv) Fv фрагмент, що складається із VL та VH доменів одного плеча антитіла; (v) dAb фрагмент, в якому VH та VL домени експресовані на окремому поліпептидному ланцюгу, але який використовує лінкер, занадто короткий для реалізації спарювання зазначених двох доменів на тому самому ланцюгу, чим спонукає дані домени до спарювання з комплементарними домонами іншого ланцюга і утворює два сайти, що зв'язують антиген; та (vi) ізольовану гіперваріабельну ділянку (CDR). Крім того, хоча зазначені два домени Fv фрагмента, VL та VH, кодуються окремими генами, вони можуть бути з'єднані з використанням рекомбінантних методів за допомогою синтетичного лінкера, що дозволяє їм бути зробленими у вигляді окремого протеїнового ланцюга, в якому VL та VH ділянки спарюються з утворенням моновалентних молекул (що відомий як окремих ланцюг Fv (sc Fv)). Такі антиті-

ла з одиничним ланцюгом, як мається на думці, також охоплюються терміном "частина, що зв'язує антиген" антитіла. Ці фрагменти антитіл одержуються з використанням звичайних методів, відомих фахівцям у даній галузі, і дані фрагменти піддаються скринінгу на придатність у той самий спосіб, що й інтактні антитіла. Такі фрагменти можуть продукуватись шляхом ферментативного розщеплення, синтетичними або рекомбінантними способами, як відомо у цій галузі та/або як описано у даному тексті.

Термін "епітоп" означає протеїнову детермінанту, здатну до специфічного зв'язування з антитілом. Епітопи звичайно складаються із хімічно активних поверхневих угруповань молекул, таких як амінокислоти або бічні цукрові ланцюги, і звичайно мають специфічні тривимірні структурні характеристики, так само як і специфічні зарядові характеристики. Конформаційні та нонконформаційні епітопи відрізняються тим, що зв'язок з першим, але не з другим втрачається у присутності денатуруючих розчинників. Термін "природний конформаційний епітоп" або "природний протеїновий епітоп" застосовуються тут у взаємозамінний спосіб і включають протеїнові епітопи, що утворюються в результаті конформаційного складання інтегринової молекули, що відбувається, коли амінокислоти із різних частин лінійної послідовності інтегринової молекули близько підходять одна до одної у 3-вимірному просторі. Такі конформаційні епітопи розподілені на екстрацелюлярному боці плазмової мембрани.

Термін "людське антитіло", як застосовується у даному винаході, як мається на думці, включає антитіла, що мають варіабельні та константні ділянки, одержані із людських зародково-лінійних імуноглобулінових послідовностей або що добре їм відповідають. Людські антитіла даного винаходу можуть включати амінокислотні залишки, що не кодуються людськими зародково-лінійними імуноглобуліновими послідовностями (наприклад, мутації, що введені шляхом неспецифічного або сайт-специфічного мутагенезу *in vitro* або соматичної мутації *in vivo*). Таким чином, як застосовується у даному тексті, термін "людське антитіло" стосується антитіла, в якому у значній мірі кожна частина протеїну (наприклад, CDR, каркас, CL, CH домени (наприклад, C_H1, C_H2, C_H3), шарнір, (V_L, V_H) у значній мірі подібна до людського зародково-лінійного антитіла. Людські антитіла класифікують на групи, основані на їх подібностях амінокислотних послідовностей, дивись, наприклад, <http://people.crvsl.bbk.ac.uk/~ubcg07s/>. Таким чином, використовуючи пошук подібності послідовностей, можна вибрати антитіло з подібною лінійною послідовністю як шаблон для створення "гуманізованих антитіл".

"Гуманізація" (що також називається решейпінгом або CDR-щепленням) тепер є загальнови-знаним методом для зниження імуногенності моноклональних антитіл (mAb) від ксеногенних джерел (звичайно, гризунів) та для поліпшення ефекторних функцій (ADCC, активації комплементу, C1q зв'язування). Розроблене mAb продукується з використанням методів молекулярної біології,

проте, просте CDR-щеплення гіперваріабельних ділянок гризунів (CDR) до людських каркасів часто призводить до втрати зв'язувальної спорідненості та/або специфічності оригінального mAb. Для гуманізації антитіла конструювання гуманізованого антитіла включає варіації, такі як заміни консервативних амінокислот у залишках CDR, та зворотну заміну залишків від mAb гризунів у ділянках людського каркасу (зворотні мутації). Ці позиції можуть розрізнятися або ідентифікуватися шляхом порівняння послідовностей для структурного аналізу або аналізу гомологічної моделі 3D структури варіабельних ділянок. Процес афінного визрівання застосовує у самий останній час банки фатів для варіювання амінокислот у вибраних позиціях. Подібно до цього, багато підходів застосовуються для вибору найбільш придатних людських каркасів, до яких прищеплюються CDR гризунів. Оскільки набір даних по відомим параметрам для структур антитіл зростає, то відповідно зростає й вишуканість та удосконалення цих методів. Може бути використаний консенсус або зародково-лінійні послідовності від окремого антитіла або фрагментів каркасних послідовностей всередині кожної варіабельної ділянки легкого або важкого ланцюга від кількох різних людських mAb. Інший підхід до гуманізації полягає у модифікації лише поверхневих залишків послідовності гризунів найбільш загальними залишками, що знайдені у людських mAb, і він отримав назву "повторне покриття" або "облицювання". Відомі людські Ig послідовності розкриті, наприклад, у

www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi;
www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast;
www.atcc.org/phaae/hdb.html;
www.kabatdatabase.com/top.html;
www.antibodysource.com/onlinecomip.html;
www.appliedbiosystems.com;
www.biodesign.com; antibody.bath.ac.uk;
http://www.unih.ch/~antibody/;
www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s; Kabal et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983), на які у даному тексті зроблено повне посилання.

"Химерні антитіла" є такими антитілами, що зберігають окремі домени, звичайно, варіабельний домен, від одного виду і залишок від іншого виду; наприклад, химери миша-людина.

Термін "моноклональне антитіло" або "композиція моноклонального тіла", як застосовується у даному тексті, стосується одержання молекул антитіла окремої молекулярної композиції. В одному варіанті моноклональні антитіла людини продукуються гібридомою, що включає В клітину, одержану від трансгенної нелюдської тварини, наприклад, трансгенної миші, що має геном, який містить людський трансген важкого ланцюга та трансген легкого ланцюга, злитий з іморталізованою клітиною. Проте, загалом, послідовності, що кодують антитіло, клонуються та вводяться у клітину-хазяїна або продуктивну клітинну лінію.

Вираз "рекомбінантна клітина-хазяїн" (або просто "клітина-хазяїн"), як застосовується у даному тексті, як мається на думці, стосується клітини, в яку був уведений рекомбінантний вектор експресії.

Слід розуміти, що такі терміни, як мається на думці, стосуються не лише конкретної суб'єктної клітини, але й нащадка такої клітини. У зв'язку з деякими модифікаціями, що можуть мати місце у наступних генераціях через мутації або вплив навколишнього середовища, такий нащадок може не бути, фактично, ідентичним до материнської клітини, але все ж включений в обсяг терміну "клітина-хазяїн", як тут застосовується. Рекомбінантні клітини-хазяї включають, наприклад, CHO лінії або клітинну лінію, отриману із мишачої мієломи SP/0.

Термін "рекомбінантне людське антитіло", як застосовується у даному тексті, включає всі людські або гуманізовані антитіла, котрі одержані, експресовані, створені або виділені за допомогою рекомбінантних засобів, такі як (a) антитіла, виділені із тварини (наприклад, миші), що є трансгенною або трансхромосомною щодо імуноглобулінових генів людини або одержаної із них гібридою, (b) антитіла, виділені із клітини-хазяїна, трансформованої для експресії даного антитіла, наприклад, із трансфектоми, (c) антитіла, виділені із бібліотеки рекомбінантних, комбінаторних людських антитіл, і (d) антитіла, одержані, експресовані, створені або виділені за допомогою будь-яких інших засобів, що включають сплайсинг людських імуноглобулінових генних послідовностей з іншими ДНК послідовностями.

"Виділене антитіло", як застосовується у даному тексті, як мається на думці, стосується антитіла, котре у значній мірі вільне від інших антитіл, що мають різні антигенні специфічності (наприклад, виділене антитіло, що у специфічний спосіб зв'язується з альфа V, у значній мірі вільне від антитіл, що специфічним чином зв'язують антигени, інші, ніж альфа V). Проте, виділене антитіло, що у специфічний спосіб зв'язується з епітопом, ізоформою або варіантом людського альфа V, може мати перехресну реактивність щодо інших споріднених антигенів, наприклад, від інших видів (наприклад, видові гомологи альфа V). Крім того, виділене антитіло може бути у значній мірі вільним від іншого клітинного матеріалу та/або хімічних речовин.

Як застосовується у даному тексті, "специфічне зв'язування" стосується антитіла, що зв'язується з предетермінованим антигеном. Типово, дане антитіло зв'язується з константою дисоціації (K_D) 10^{-7} M або менше, і зв'язується з предетермінованим антигеном з K_D , що принаймні у два рази менша, ніж його K_D для зв'язування з неспецифічним антигеном (наприклад, BSA, казеїн), іншим, ніж предетермінований антиген або у значній мірі споріднений антиген.

Як застосовується у даному тексті, "ізотип" стосується класу антитіла (наприклад, IgM або IgG1), що кодується генами константної ділянки важкого ланцюга.

Скорочення

Abs антитіла, поліклональні або моноклональні

aV інтеїринова субодиниця альфа V

b3 інтеїринова субодиниця бета 3

bFGF базовий фактор росту фібробластів

HUVEC ендотелій пупкової вени людини

IFN інтерферон
 Ig імуноглобулін
 IgG імуноглобулін G
 Mab моноклональне антитіло
 NPB = N-сукцинімідил-5-нітро-(2-піридилдитіо)бутират
 SMCC = сукцинімідил 4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат
 SMNP = N-сукцинімідил 4-метил-4-(5-нітро-2-піридилдитіо)пентаноат
 SMPT = 4-сукцинімідил-оксикарбоніл-(2-піридилдитіо)толуол
 SPDB = N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)бутират
 SPDP = N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат
 SPP = N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)пентаноат
 SP = N-сукцинімідил 4-(2-піридил)
 SS = сульфосукцинімідил
 SSNPP = сульфосукцинімідил-N-сукцинімідил-4-(5-нітро-2-піридилдитіо)пентаноат
 VEGF ендотеліальний фактор росту судин
 2. Композиції
 А. Кон'югати антитіл даного винаходу Кон'югати антитіла даного винаходу представлені Формулою

$[C-L]_m-A$,

де А являє собою альфа V інтегринове субодичине специфічне антитіло людини, де зазначене антитіло здатне інтерналізуватись клітиною, що експресує зазначену альфа V субодичину; С являє собою цитотоксин з $IC_{50} 10^{-9}$ М або менше; і L являє собою зв'язувальну групу, котра зв'язує дане антитіло та цитотоксин, і також містить зв'язок, здатний розщеплюватись компонентами внутрішньоклітинного середовища; і m репрезентує середню кількість цитотоксичних молекул, зв'язаних з даним антитілом, і є цілим числом від 1 до 5, краще, 3-4. Даний цитотоксин може вибиратись із групи, яка складається із маутансиноїдів, калікеаміцинів, епотилонів, дискодермоліду, елеутробінів, доластатинів, криптофіцинів, камптотетинів, ризоксину (регістрац. номер CAS 90996546), або таксаних похідних і таких інших сполук, що виявляють половинне від максимального інгібування (IC_{50} або GI_{50}) росту пухлинних клітин при 10^{-9} М або менше.

Лінкери, що містять здатні до внутрішньоклітинного розщеплення зв'язки, включають кислотно-лабільні зв'язки, такі як цис-аконітилові зв'язки, ефіри, кислотн-чутливі гідразонні зв'язки, здатні до лізосомної деградації пептидні зв'язки, лінкери, що здатні до розщеплення гідролазою, специфічні до пептидази або протеази лінкери, та дисульфідні (сульфгідрильні) лінкери (дивись огляд у роботі Dyba, M., et al. 2004 Curr Pharm Design 10:2311-2334). Завдяки здатності до більш швидкого або селективного розщеплення за внутрішньоклітинних умов, у порівнянні з умовами, що переважають у, наприклад, кровотоці, лінкер надає додаткової специфічності та безпеки повній фармакодинаміці даного кон'югату. Особлива перевага віддається

дисульфідним зв'язкам через сприятливий відновлювальний потенціал усередині клітинних комірок, так само як і індуковану редокс ензимну активацію (Satio, G. et al. Adv. Drug Delivery Rev 2003 55:199-215). В одному варіанті даного винаходу зв'язок виникає між атомом сірки, присутнім в молекулі антитіла, наприклад, у бічному ланцюгу цистеїнового залишку, та іншим атомом сірки, присутнім у токсичній сполуці. В іншому варіанті зв'язувальна складова складається із одного або кількох атомів, або хімічних груп.

Інше основне міркування щодо хімічного зв'язування біологічної молекули, такої як рекомбінантний протеїн, з хімічною сполукою полягає у тому, що хімія дериватизації може, і у більшості випадків дасть, новий молекулярний об'єкт, котрий може мати невідомі до цього біологічні властивості. Таким чином, слід розуміти, що продукти фізіологічного розщеплення мають замислюватись у такий спосіб, щоб дати бажані біологічно активні похідні. Маутансиноїди даного винаходу, включаючи DM1, DM3, DM4 та інші, як показано та описано на Фіг. 1, зберігають біологічну активність.

Кон'югати антитіла проти альфа V інтегрину-маутансиноїд даного винаходу одержуються шляхом хімічного зв'язування антитіла проти альфа V інтегрину з маутансиноїдною молекулою без значного зниження біологічної активності даного антитіла та запровадження маутансиноїду, котрий при виділенні за певних фізіологічних умов зберігає свій цитотоксичний потенціал. Прикладами придатних маутансиноїдів є ефіри маутансинолу та маутансинольних аналогів, включаючи, проте не обмежуючись цим, такі, що мають модифіковане ароматичне кільце і такі, що мають модифікації по C-19, C-20 або C-14, або C-15, або C-4,5 деокси. Перевага віддається маутансинольним C-3 ефірам. Маутансиноїди, яким віддається особлива перевага, являють собою похідні (N²-деацетил-маутансин). Кон'югати, яким віддається особлива перевага, містять дисульфідний зв'язок, котрий при розщепленні шляхом відновлення виділяє відповідний маутансиноїд, що несе вільний тіол. Маутансиноїди, що містять тіол, яким віддається перевага, показані на Фіг. 1: N²-деацетил-N²-(3-меркапто-1-оксопропіл)-маутансин (DM1, регістр. номер CAS 139504-50-0), N²-деацетил-N²-(4-меркапто-1-оксопентил)-маутансин (DM3) та N²-деацетил-N²-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)-маутансин (DM4).

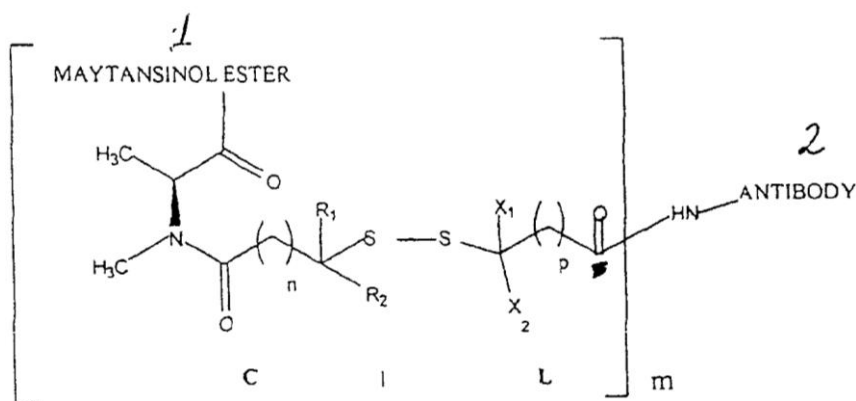
Кон'югати молекул антитіла даного винаходу та токсичної сполуки можуть бути утворені з використанням будь-яких методів, відомих тепер або розроблених пізніше. Наприклад, цитотоксична сполука може бути модифікована з утворенням вільної аміногрупи і потім зчеплена з молекулою антитіла через кислотн-лабільний лінкер або фотоллабільний лінкер. Дана токсична сполука може бути конденсована з пептидом і потім зчеплена з молекулою антитіла з утворенням пептидазалабільного лінкера. Токсична сполука може бути оброблена з одержанням первинної гідроксильної групи, котра може бути сукцинільована та зчеплена з молекулою антитіла, утворюючи кон'югат, що

може бути розщеплений внутрішньоклітинними естеразами з вивільненням вільних ліків.

Для утворення дисульфідного зв'язку між антитілом А та цитотоксином С, краще, коли дану токсичну сполуку обробляють для утворення вільної або захищеної тіолової групи, і потім одну або багато токсичних сполук, що містять дисульфід або тіол, зчіплюють у ковалентний спосіб з молекулою антитіла через дисульфідний зв'язок(ки). Немає потреби у тому, щоб дисульфідний зв'язок формувався безпосередньо вільним тіолом антитіла, він може утворюватись шляхом дериватизації будь-якої реактивної групи всередині антитіла з уведенням сайту для дисульфідного обміну, наприклад, шляхом сполучення біфункціонального лінкера з вільними аміногрупами у даному антитілі. Наприклад, молекули антитіла можуть бути модифіковані структуруючими реагентами, такими як N-сукцинімідил 3-(2-піридилдитіо)пропіонат

(SPDP), 4-сукцинімідил-оксикарбоніл-а-метил а-(2-піридилдитіо)-толуол (SMPT), N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)-бутират (SDPB), N-сукцинімідил-4-(2-піридилдитіо)пентаноат (SPP), N-сукцинімідил-5-(2-піридилдитіо)пентаноат, 2-імінотіолан (IT) або ацетилсукциновий ангідрид, з використанням відомих методів.

Кон'югати даного винаходу антитіло проти альфа V інтегрину-цитотоксин представлені формулою II, де маутансинол підданий етерифікації по C-3, і дане антитіло є антитілом проти альфа V інтегрінової субодиниці; R_1 , R_2 , X_1 та X_2 являють собою, незалежно, H, Me, C_2H_5 , лінійний алкіл або алкеніл, що має від 1 до 10 вуглецевих атомів, розгалужений або циклічний алкіл або алкеніл, що має від 3 до 10 вуглецевих атомів, феніл, заміщений феніл або гетероциклічну арильну складову, або гетероциклоалкільну складову; n дорівнює 1-5; p дорівнює 1-5; і m дорівнює 1-10.



II

1 - маутансинольний ефір, 2 - антитіло

У варіанті, якому віддається перевага, лінкер-на складова являє собою 4-тіопентаноат, одержаний із SPP, або 4-тіопентаноат. Молекула антитіла, що містить вільну або захищену тіолову групу, отримана у такий спосіб, потім піддається реакції з токсичною сполукою, що містить дисульфід або тіол, з одержанням кон'югатів. Дані кон'югати можуть піддаватись очищенню методами високоефективної рідинної хроматографії або гел'єфільтрації.

В. Антитіла проти альфа V субодиниці даного винаходу

Окрім зв'язування альфа V, антитіла людини або фрагменти, що зв'язують антигени, або їх частини, як ті, що описані вище, можуть вибиратись для збереження інших функціональних властивостей антитіл даного винаходу, таких як:

1) зв'язування з живими клітинами, що експресують альфа V людини;

2) запобігання зв'язуванню живих клітин з матричними протеїнами;

3) зв'язування з альфа V людини з $KD 10^{-8}$ М або менше (наприклад, 10^{-9} М або 10^{-10} М або менше);

4) виявлення незалежного від кальцію зв'язування з альфа V;

5) зв'язування з унікальним епітопом на альфа V або тим, що належить унікальній комплементарній групі антитіл, що зв'язуються з альфа V;

6) інгібування ангиогенезу in vitro або in vivo; або

7) зниження маси пухлини або запобігання росту пухлини in vivo.

В іншому аспекті даного винаходу структурні особливості антитіл людини проти альфа V даного винаходу, CNTO 95, використовуються для створення структурно споріднених людських антитіл проти альфа V, що зберігають принаймні одну функціональну властивість антитіл даного винаходу, таку як зв'язування з альфа V. Більш конкретно, одна або кілька CDR ділянок CNTO 95 може бути скомбінована у рекомбінантний спосіб з відомими людськими каркасними областями та CDR з утворенням додаткових, рекомбінантно-сконструйованих людських антитіл проти альфа V даного винаходу.

У варіанті, якому віддається перевага, антитіло для використання в описаних тут кон'югатах антитіл проти альфа V являє собою антитіло лю-

дини проти альфа V, одержане від імунізації генів трансгенної миші для експресії імуноглобулінів людини. Одержання такого антитіла детально описано у РСТ публікації за номером WO 02/12501 та у публікації США за номером 2003/040044, на які у даному тексті зроблено посилання. Дане антитіло включає будь-яку молекулу, що містить протеїн або пептид, котра включає принаймні частину гіперваріабельної ділянки (CDR) важкого або легкого ланцюга, або її частину, що зв'язує ліганд, одержану із антитіла, позначеного як "CNTO 95" (дивись РСТ публікацію за номером WO 02/12501 та публікацію США за номером 2003/040044), у комбінації з варіабельною ділянкою важкого ланцюга або легкого ланцюга, константною ділянкою важкого ланцюга або легкого ланцюга, каркасною ділянкою, або будь-якою її частиною, що може бути уведена в антитіло.

Краще, коли CDR 1, 2 та/або 3 описаних вище отриманих методами інженерії антитіл включають визначену амінокислотну послідовність(ті) як такі у цілком людського Mab, позначеного як CNTO 95, Gen0101, CNTO 95, C371A, генерованого шляхом імунізації трансгенної миші як розкрито у даному тексті. Проте, звичайному фахівцеві у даній галузі зрозуміло, що можливе деяке відхилення від точних CDR послідовностей CNTO 95, хоча й при збереженні здатності даного антитіла ефективно зв'язувати альфа V (наприклад, консервативні заміщення). В особливому варіанті дане антитіло або фрагмент, що зв'язує антиген, можуть мати ділянку, котра зв'язує антиген, яка включає принаймні частину принаймні одного важкого ланцюга CDR (тобто CDR1, CDR2 та/або CDR3), що має амінокислотну послідовність відповідної CDR 1, 2 та/або 3 (наприклад, SEQ ID NOS: 1, 2 та/або 3). В іншому особливому варіанті дане антитіло або частина, що зв'язує антиген, або варіант можуть мати ділянку, котра зв'язує антиген, яка включає принаймні частину принаймні одного легкого ланцюга CDR (тобто CDR1, CDR2 та/або CDR3), що має амінокислотну послідовність відповідної CDR 1, 2 та/або 3 (наприклад, SEQ ID NOS: 4, 5 та/або 6) легкого ланцюга CNTO 95. У варіанті, якому віддається перевага, три важколанцюгових CDR та три легколанцюгових CDR даного антитіла або фрагмента, що зв'язує антиген, мають амінокислотну послідовність відповідної CDR mAb CNTO 95. Відповідно, в іншому варіанті створене антитіло може складатись із однієї або кількох CDR, котрі, наприклад, на 90%, 95%, 98% або 99,5% ідентичні до однієї або кількох CDR CNTO 95. Антитіла проти альфа V субдиниці даного винаходу можуть включати, проте не обмежуючись цим, принаймні одну частину, послідовність або комбінацію, що вибирається із від 5 до всіх суміжних амінокислот принаймні однієї із SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6. Антитіло проти альфа V субдиниці може також включати, при потребі, поліпептид із принаймні однієї із 70-100% суміжних амінокислот принаймні однієї із SEQ ID NOS: 7, 8. Наприклад, амінокислотна послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга може бути порівняна з послідовністю SEQ ID NO: 8, або амінокислотна послідовність CDR3

важкого ланцюга може порівнюватись з SEQ ID NO: 7.

Як тут розкрито та заявлено, послідовності, викладені у SEQ ID NOS 1-8, включають "модифікації консервативних послідовностей", тобто модифікації амінокислотних послідовностей, котрі суттєво не впливають або змінюють зв'язувальні характеристики антитіла, кодованого нуклеотидною послідовністю або що містить дану амінокислотну послідовність. Такі модифікації консервативних послідовностей включають амінокислотні заміщення, приєднання та делеції. Модифікації можуть бути внесені у SEQ ID NOS: 1-8 або до нуклеїнових кислот, що кодують їх, за допомогою стандартних методів, відомих у даній галузі, таких як сайт-специфічний мутагенез та PCR-опосередкований мутагенез. Заміщення консервативних амінокислот включають такі, в яких амінокислотний залишок замінюється амінокислотним залишком, що має схожий бічний ланцюг. Сімейства амінокислотних залишків, що мають схожі бічні ланцюги, визначені у даній галузі. Ці сімейства включають амінокислоти з основними бічними ланцюгами (наприклад, лізин, аргінін, гістидин), кислотними бічними ланцюгами (наприклад, аспарагінова кислота, глутамінова кислота), незарядженими полярними бічними ланцюгами (наприклад, гліцин, аспарагін, глутамін, серин, треонін, тирозин, цистеїн, триптофан), неполярними бічними ланцюгами (наприклад, аланін, валін, лейцин, ізолейцин, пролін, фенілаланін, метіонін), бета-розгалуженими бічними ланцюгами (наприклад, треонін, валін, ізолейцин) та ароматичними бічними ланцюгами (наприклад, тирозин, фенілаланін, триптофан, гістидин). Так, передбачуваний несуттєвий амінокислотний залишок в людському антитілі проти альфа V заміщується, краще, іншим амінокислотним залишком із того самого сімейства бічних ланцюгів.

Принаймні одне антитіло даного винаходу зв'язує принаймні один визначений епітоп, специфічний до принаймні одного альфа V субодиничного протеїну, субодиниці, фрагмента, частини або будь-якої їх комбінації. Зазначений принаймні один епітоп може включати принаймні одну ділянку, що зв'язує антитіло, яке містить принаймні одну частину зазначеного протеїну, де даний епітоп, краще, складається із принаймні однієї екстрацелюлярної, розчинної, гідрофільної, зовнішньої або цитоплазматичної частини зазначеного протеїну. Зазначений принаймні один визначений епітоп може включати будь-яку комбінацію принаймні однієї амінокислотної послідовності принаймні 1-3 амінокислот до всієї визначеної частини суміжних амінокислот SEQ ID NO: 9.

Як зазначалось попередньо, даний винахід також стосується антитіл, фрагментів, що зв'язують антиген, імуноглобулінових ланцюгів та CDR, які включають амінокислоти у послідовності, котра є у значній мірі такою самою як описана тут амінокислотна послідовність. Краще, коли антитіла або фрагменти, що зв'язують антиген, та антитіла, що містять такі ланцюги або CDR, можуть зв'язувати альфа-V субодиницю людини з високою спорідненістю (наприклад, K_D менше або дорівнює прибли-

зно 10^{-9} M). Амінокислотні послідовності, котрі є у значній мірі такими самими як описані у даному тексті, включають послідовності, що містять заміщення консервативних амінокислот, так само як і амінокислотні делеції та/або інсерції.

Амінокислоти в антитілі проти альфа-V субодиниці даного винаходу, котрі є важливими для функціонування, можуть бути ідентифіковані з використанням методів, відомих у даній галузі, таких як сайт-специфічний мутагенез або аланін-скануючий мутагенез (наприклад, Ausubel, вище, Chapters 8, 15; Cunningham and Wells. Science 244:1081-1085 (1989)). Остання процедура вводить одиничні аланінові мутації у кожний залишок у даній молекулі. Результуючі молекули мутанта потім випробують на біологічну активність, таку як, проте не обмежуючись цим, нейтралізуючу активність принаймні до однієї альфа-V субодиниці. Сайти, які є критичними щодо зв'язування антитіла, можуть також ідентифікуватись шляхом структурного аналізу, такого як кристалізація, ЯМР або фотоафінне мічення (Smith, et al., J. Mol. Biol. 224:899-904 (1992) та de Vos, et al., Science 255:306-312 (1992)).

3. Способи одержання кон'югатів

Вихідна сполука, маутансинол, як застосовується у виробництві сполук DM1, DM3 та DM4 і споріднених активованих маутансиноїдів (Fig.1) згідно з даним винаходом, може бути одержана із маутансинового природного C-3 ефіру, виділеного із природних джерел (Kurchan et al., J. Amer. Chem. Soc. 97, 5294 (1975)) шляхом відновлювального розщеплення. Для цієї стадії особливо корисним є реагент літійтриметоксисилану гідрид у тетрагідрофурані при -40°C . Інші природні маутансиноїдні ефіри можуть також бути з вигодою одержані шляхом культивування мікроорганізмів, котрі належать до роду *Nocardia* (U.S. Pat. No. 4151042) або видів *Actinosynnema*, що були використані для одержання маутансинолу, маутансину або C-3 маутансинольних ефірів, таких як маутансинол пропіонат, у культуральній рідині та екстрагування сполук із культуральної рідини для додаткового очищення. Існує множина зв'язувальних груп, відомих у даній галузі, для приготування антитіло-маутансиноїдних кон'югатів, включаючи, наприклад, дисульфідні групи, тіоефірні групи, кислотні лабільні групи, фотолабільні групи, пептидазалабільні пептидні лінкери або ефіри, котрі можуть бути кислотнo-лабільними або розщеплюватись естеразою.

Як зазначається у патенті США за номером 5208020, етерифікація маутансинолу або аналогу карбоновими кислотами, що містять метилдитіогрупу або іншу захищену тіогрупу, включаючи, наприклад, N-метил-N-[3-(метилдитіо)-1-оксопропіл]-L-аланін, дає відповідні маутансиноїди, що містять дисульфід. У випадку, коли утворюються два діастереомерних продукти, що містять D- та L-ацильні бічні ланцюги, дані діастереомерні маутансиноїдні ефіри легко розділяються з використанням способів, що відомі у даній галузі, і менш бажаний D-аланіловий аналоговий ізомерний продукт відновлюється з утворенням маутансинолу, як показано у WO 03096782. Відновлювальне розщеплення

дисульфідної групи дитіотреїтолом дає відповідний маутансиноїд, що містить тіол, котрий легко зчіплюється через дисульфідний або тіоефірний зв'язок з агентами, котрі зв'язують клітину. Тіол-маутансиноїди можуть піддаватись очищенню методом високоефективної рідинної хроматографії з використанням C 18 колонки з оберненою фазою при градієнтному елююванні сумішшю вода-ацетонітрил.

Біфункціональні сполучні реагенти

Відомо, що при приготуванні кон'югатів двох речовин, принаймні одна із яких включає протеїн або поліпептид, використовуються біфункціональні агенти з метою ковалентного сполучення компонентів даного кон'югата; звичайно, для реакції кон'югації застосовуються аміногрупи в молекулах, що піддаються кон'югації. Біфункціональні протеїнові сполучні агенти включають N-сукцинімідил-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP), сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат, імінотіолан (IT), біфункціональні похідні імідоефірів, такі як диметил адипімідат-HCl, активні ефіри, такі як дисукцинімідил суберат, альдегіди, такі як глутаральдегід, біс-азидо сполуки, такі як біс(р-аксидобензоїл)гександіамін, біс-діазонієві похідні, такі як біс(р-діазонійбензоїл)-етилендіамін, діізоціанати (такі як толуол-2,6-діізоціанат), та біс активні фторидні сполуки, такі як 1,5-дифторо-2,4-динітробензол. SPDP є серед найбільш часто уживаних для цього реагентів, і також корисними виявились багато інших N-сукцинімідил-(2-піридилдитіо)-, N-сукцинімідил-(5-нітро-2-піридилдитіо)- або N-сукцинімідил-(4-піридилдитіо)-алканових кислот з короткими ланцюгами. На Fig.2 зображені структури найбільш поширених біфункціональних лінкерів та їх акроніми.

Кон'югація активованого антитіла з тіольованим маутансиноїдом.

Одержання кон'югатів CNTO 95-маутансиноїд здійснюється згідно зі способом, що описаний раніше (Chari et al., Cancer Res. 52: 127-131, 1992 та патент США 5208020), і як це окреслено на Fig.3. У цій процедурі антитіло модифікується біфункціональним лінкером при відношенні лінкер-антитіло у межах 5-10:1 з уведенням дитіопіридилних груп в амінокислотні бічні ланцюги даного антитіла. Активоване антитіло відокремлюється від залишкового лінкера за методом G25 гель-фільтраційної хроматографії. Відношення лінкер-антитіло після очистки складає менше 5-10:1, і, типово, лежить у межах 3-5:1, з визначенням за оптичною густиною при 252 та 280 нм. Активовані тіол-маутансиноїд додається при молярному надлишку до відміряного лінкера. Відповідно до кон'югації, дану суміш знов піддають очищенню за методом G25 витіснювальної хроматографії з одержанням об'ємного продукту.

Як альтернатива, кон'югат антитіла проти інтегрину - маутансиноїд одержується у значній мірі в одну стадію шляхом реакції маутансиноїду, що несе реакційний ефір, з антитілом проти інтегрину, котре попередньо хімічно не активувалось. Реакційний ефір маутансиноїду може бути N-сукцинімідилловим, N-сульфосукцинімідилловим, N-

фталіміділовим, N-сульфоталіміділовим, 2-нітрофеніловим, 4-нітрофеніловим, 2,4-динітрофеніловим, 3-сульфоніл-4-нітрофеніловим або 3-карбоксі-4-нітрофеніловим ефіром. Даний спосіб описаний у публікації WO 2002 098883, на яку у даному тексті зроблено посилання.

4. Способи використання кон'югатів даного винаходу

Антитіла даного винаходу можуть призначатись суб'єкту, котрий потребує цього, для запобігання, лікування, контролю або послаблення раку, або одного чи кількох його симптомів. Антитіла даного винаходу можуть також призначатись у комбінації з однією або кількома іншими терапіями, краще, терапіями, що корисні для запобігання, контролю або лікування раку (включаючи, проте не обмежуючись цим, профілактичні або терапевтичні агенти, що перелічені нижче), суб'єкту, котрий потребує цього, для запобігання, лікування, контролю або послаблення раку, або одного чи кількох його симптомів. В особливому варіанті даний винахід запроваджує спосіб запобігання, лікування, контролю або послаблення раку, або одного чи кількох його симптомів, зазначений спосіб включає призначення суб'єкту, котрий потребує цього, дози профілактично або терапевтично ефективної кількості препарату, що містить кон'югати антитіла проти альфа V даного винаходу. В іншому варіанті даний винахід запроваджує спосіб запобігання, лікування або послаблення раку, або одного чи кількох його симптомів, зазначений спосіб включає призначення суб'єкту, котрий потребує цього, дози профілактично або терапевтично ефективної кількості кон'югатів антитіла проти альфа V даного винаходу у сполученні з профілактично або терапевтично ефективною однією чи кількома терапіями (наприклад, хірургією, променевою терапією, або застосуванням терапевтичних агентів, інших, ніж кон'югати антитіла проти альфа V). Кон'югати антитіла даного винаходу можуть бути використані як перша, друга, третя або четверта лінії лікування раку. Даний винахід запроваджує способи для лікування або послаблення одного або кількох симптомів раку у суб'єкта. Крім того, даний винахід запроваджує способи для запобігання рецидивам раку у пацієнтів, що піддавались лікуванню і не виявляли активності хвороби, шляхом застосування кон'югату антитіла проти альфа V даного винаходу.

Рак, що може лікуватись з використанням способів, які охоплюються даним винаходом, включає, проте не обмежуючись цим, новоутворення, пухлини, метастази або будь-яку хворобу чи розлад, які характеризуються неконтрольованим ростом клітин. Рак може бути первинним або метастатичним. Клітини раку можуть або не можуть експресувати альфа V субодиничні інтегрини. У варіанті, якому віддається перевага, рак, що контролюється, лікується або послаблюється згідно зі способами даного винаходу, являє собою рак, котрий експресує інтегрин альфа V субодиницю і метастазується в інший сайт або орган у тілі пацієнта, або має потенціал метастазувати туди. Специфічні приклади раку, що може лікуватись з використанням способів, які охоплюються даним

винаходом, включають, проте не обмежуючись цим, рак голови, шиї, очей, рота, горла, стравоходу, грудної клітки, кісток, легень, товстої кишки, прямої кишки, шлунка, простати, молочної залози, яєчника, нирок, печінки, підшлункової залози та мозку. Додаткові види раку включають, проте не обмежуючись цим, наступні: лейкози, такі як, проте не обмежуючись цим, гострий лейкоз, гострий лімфоцитарний лейкоз, гострі мієлоцитарні лейкози, такі як мієлобластний, промієлоцитарний, мієломоноцитарний, моноцитарний, еритролейкозні лейкози та мієлодиспластичний синдром, хронічні лейкози, такі як, проте не обмежуючись цим, хронічний мієлоцитарний (гранулоцитарний) лейкоз, хронічний лімфоцитарний лейкоз, злоякісний ретикулоендотеліоз; еритремія; лімфоми, такі як, проте не обмежуючись цим, хвороба Ходжкіна, неходжкінська лімфома; мієломи, такі як множинна мієлома, несекреторна мієлома, остеосклеротична мієлома, плазмоцитарний лейкоз, окрема плазмоцитома та екстрамедулярна плазмоцитома; макроглобулінемія Вальденстрема; рак кісток та саркоми з'єднувальної тканини, такі як саркома кісток, мієломна хвороба кісток, остеосаркома, хондросаркома, саркома Юїнга, хвороба кісток Пагета, злоякісна гігантоклітинна пухлина, фібросаркома кісток, хордома, періостальна саркома, саркоми м'яких тканин, ангіосаркома (гемангіосаркома), фібросаркома, саркома Капоші, лейоміосаркома, ліпосаркома, лімфангіосаркома, невринома, рабдоміосаркома, синовіальна саркома; пухлини мозку, такі як, проте не обмежуючись цим, гліома, астроцитома, негіліальна пухлина, слухова невринома, краніофарингіома, медулобластома, менингіома, пінеоцитома, пінеобластома, первинна мозкова лімфома; рак молочної залози, включаючи аденокарциному та індуковані карциноми, та папілярний рак молочної залози; адренальний рак, включаючи феохромоцитому та адренортикальну карциному; рак щитоподібної залози; рак підшлункової залози; рак гіпофізної залози; рак очей, не обмежуючись очною меланомою, хороїдальною меланомою, меланомою ціліарного тіла та ретинобластою; вагінальний рак; вульварний рак; цервікальний рак; рак матки, не обмежуючись ендометричною карциномою та саркомою матки; рак яєчника; рак стравоходу та інші види раку голови та шиї, такі як, проте не обмежуючись цим, сквамозний рак, аденокарцинома, мукоепідермоїдна карцинома, аденосквамозна карцинома, саркома, меланома, плазмацитома, верукозна карцинома, та вівсяноклітинна (малоклітинна) карцинома; рак шлунку: рак товстої кишки; ректальний рак; рак печінки, такий як гепатоцелюлярна карцинома та гепатобластома, рак жовчного міхура; холангіокарциноми; рак легень, такий як недрібноклітинний рак легень, сквамозноклітинна карцинома (епідермоїдна карцинома), аденокарцинома, гігантоклітинна карцинома та дрібноклітинний рак легень; тестикулярний рак, хоріокарцинома (пухлина жовткового мішка), рак простати; пенільний рак; ротовий рак, не обмежуючись сквамозноклітинною карциномою; базальноклітинний рак; рак слинної залози; рак клітин ниркового епітелію та інші види раку нирок; та рак сечового міхура, не обмежую-

чись карциномою перехідних клітин (огляд таких розладів дивись у роботі DeVita, V.T., Hellman, S., & Rosenberg, S.A. Cancer: Principles and practice of oncology. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 6th Edition, 2001). Передракові стани можуть також лікуватись з використанням способів та композицій даного винаходу. Такі види раку можуть включати, проте не обмежуючись цим, фолікулярні лімфоми, карциноми з p53 мутаціями, пухлини молочної залози, що залежать від гормонів, порушення простати та яєчника, і передракові ушкодження, такі як сімейний аденоматозний поліпоз, і мієлодиспластичні синдроми.

У варіанті, якому віддається перевага, рак, котрому запобігають, який контролюють, лікують або полегшують згідно зі способом даного винаходу, вибирається із раку простати, раку молочної залози, раку кісток, меланоми, раку легень та раку яєчника. В іншому варіанті рак, котрому запобігають, який контролюють, лікують або полегшують згідно зі способами даного винаходу, вибирається із метастатичних пухлин, включаючи, проте не обмежуючись цим, пухлини, які метастазували або можуть метастазувати у кістки (не обмежуючими прикладами є рак простати, молочної залози та легень, що метастазував або має можливість метастазувати у кістки), пухлини, що метастазували або можуть метастазувати в легені, пухлини, що метастазували або можуть метастазувати у мозок, і пухлини, що метастазували або можуть метастазувати в інші органи чи тканини суб'єкта.

Протиракова терапія

Будь-який агент або терапія (наприклад, хіміотерапія, променева терапія, гормональна терапія та/або біологічна терапія або імунотерапія), що, як відомо, корисні, або котрі застосовувались або застосовуються у теперішній час для запобігання, лікування, контролю або послаблення раку або одного чи кількох його симптомів, можуть використовуватись у комбінації з кон'югатом антитіла проти альфа V даного винаходу згідно з описаним тут винаходом. Терапевтичні або профілактичні агенти включають, проте не обмежуючись цим, пептиди, поліпептиди, протеїни, злиті протеїни, молекули нуклеїнових кислот, невеликі молекули, міметичні агенти, синтетичні ліки, неорганічні молекули та органічні молекули. Приклади класів таких агентів (тобто протиракових агентів) включають, проте не обмежуючись цим, цитотоксини, інгібітори ангіогенезу та імунomodulatory агенти, і агенти, що застосовуються для зняття болю або компенсації шкідливих ефектів одного або кількох терапевтичних агентів (наприклад, бісфосфонат використовується для зниження гіперкальцемічних ефектів глюкокортикоїдів).

Біологічні імунomodulatory агенти включають: антитіла проти Т-клітинних рецепторів, такі як антитіла проти CD3 (наприклад, Нувіон (лабораторії Protein Design), OKT3 (Johnson & Johnson), або антитіла проти CD20 Ритуксан (IDEC), антитіла проти CD52 (наприклад, CAMPATH 1H (Ілекс)), антитіла проти CD11a (наприклад, Ксанелім (Genentech)); атитіла проти цитокіну або цитокінових рецепторів, та антагоністи, такі як антитіла проти IL-2 рецепторів (Зенапакс (лабораторії

Protein Design)), антитіла проти IL-6 рецепторів (наприклад, MRA (Chugai)), та антитіла проти IL-12 (CNTO 1275 (Centocor)), антитіла проти TNF альфа (Ремікад (Centocor)) або TNF рецепторний антагоніст (Енбрел (Immunex)), антитіла проти IL-6 (BE8 (Diacclone) і CNTO328 (Centocor)), та антитіла, що в імуноспецифічний спосіб зв'язуються з антигенами, які асоціюються з пухлиною (наприклад, трастузумаб (Genentech)).

Інгібітори ангіогенезу (тобто антиангіогенні агенти) включають, проте не обмежуючись цим, ангіостатин (плазміногенний фрагмент); антиангіогенний протитромбін III; ангіозим. Бісфосфонати включають, проте не обмежуючись цим, алендронат, клодронат, етидронат, ібандронат, памідронат, ризедронат, тилудронат та золедронат.

Специфічні приклади протиракових агентів, котрі можуть бути використані згідно зі способами даного винаходу, включають, проте не обмежуючись цим: 5-флуорурацил; акивіцин; алдеслейкін; альтретамін; аміноглутетимід; амсакрин; анастрозол; антраміцин; аспарагіназа, азацитидин; азетеп; азотоміцин; батимастат; бікалутамід; блеоміцину сульфат; брекінар натрій; брופіримін; бусульфан; карбоплатин; кармустин; карубіцину гідрохлорид; карцелезин; цедефінгол; хлорамбуцил; циролеміцин; цисплатин; кладрибін; кризна-толу мезилат; циклофосфамід; цитарабін; дакарбазин; дактиноміцин; даунорубіцину гідрохлорид; децитабін; дексормаплатин; дезагуанін; дезагуаніну мезилат; діазикон; доцетаксел; доксорубіцину мезилат; доксорубіцину гідрохлорид; дролоксифену цитрат; дромостанолону пропіонат; дуазоміцин; едатрексат; ефломітину гідрохлорид; енлоплатин; енпромат; епіпропідин; епірубіцину гідрохлорид; ербулозол; езорубіцину гідрохлорид; естрамустин; естрамустину фосфат натрію; етанідазол; етопозид; етопозиду фосфат; фазарабін; фенретинід; флоксуридин; флударабін фосфат; флуороурацил; флуороцитабін; фоскідон; фостриєцин натрію; гемцитабін; гемцитабіну гідрохлорид; гідроксисечовина; ідарубіцину гідрохлорид; іфосфамід; ілмофозин; інтерлейкін II (включаючи рекомбінатний інтерлейкін II або rIL2), інтерферон альфа-2a; інтерферон альфа-2b; інтерферон альфа-m; інтерферон альфа-n3; інтерферон бета-1a; інтерферон гамма-1b; іпроплатин; іринотекану гідрохлорид; ланреотиду ацетат; летрозол; лепролід ацетат; ліарозолу гідрохлорид; лометрексол натрій; ломустин; лозоксантрон гідрохлорид; мазопрокол; мехлоретаміну гідрохлорид; мегестролу ацетат; меленгестролу ацетат; мелфалан; меногарил; меркаптопурин; метотрексат; метотрексат натрій; метоприн; метуредеп; мітоміцин; мітоспер; мітотан; мітоксантрон гідрохлорид; мікофенолова кислота; нокодазол; ормаплатин; паклітаксел; пегаспаргаз; порфроміцин; преднімустин; прокарбазину гідрохлорид; пуроміцин; роглетимід; сафінголу гідрохлорид; семустин; симтразен; спарфозат натрій; спарсоміцин; спіромустин; спіроплатин; стрептонігрин; стрептозоцин; сулофенур; талізоміцин; тегафур; телоксантрон гідрохлорид; темопорфін; теніпозид; тероксирон; тестолактон; тіаміприн; тіогуанін; тіотепа; тіазофуридин; тірапазамін; топотекан; триметрексамін; триметрексату глю-

коронат; трипторелин; урацил мустард; уредепа; вапреотид; вертепорфін; вінбластину сульфат; вінкристину сульфат; віндезин; віндезину сульфат; вінепіліну сульфат; вінгліцинату сульфат; вінлеу-розину сульфат; вінорелбіну тартрат; вінрозидину сульфат; вінзолідину сульфат; ворозол; зеніплатин; зиностатин; зорубіцину гідрохлорид.

Даний винахід також охоплює застосування антитіла даного винаходу у комбінації з променевою терапією, що включає використання рентгєнівських променів, гамма променів та інших джерел опромінення для руйнування ракових клітин. У варіантах, яким віддається перевага, променева терапія застосовується як зовнішня променева опромінення або телетерапія, де випромінювання спрямовується від віддаленого джерела. В інших варіантах, яким віддається перевага, променева лікування застосовується як внутрішня терапія або брахітерапія, де радіоактивне джерело розмішується всередині тіла поблизу ракових клітин або маси пухлини.

У специфічних варіантах пацієнтам з раком молочної залози призначають профілактично або терапевтично ефективну кількість кон'югату антитіла проти альфа V даного винаходу у комбінації з призначенням профілактично або терапевтично ефективної кількості одного або кількох інших агентів, корисних для терапії раку молочної залози, включаючи, проте не обмежуючись цим, доксорубіцин, епірубіцин, комбінацію доксорубіцину та циклофосфаміду (AC), комбінацію циклофосфаміду, доксорубіцину та 5-флуороурацилу (CAP), комбінацію циклофосфаміду, епірубіцину та 5-флуороурацилу (CEF), або інші агенти, такі як герцептин, тамоксифен, паклітаксел або таксотер.

У специфічних варіантах пацієнтам з раком простати призначають профілактично або терапевтично ефективну кількість кон'югату антитіла проти альфа V даного винаходу у комбінації з призначенням профілактично або терапевтично ефективної кількості одного або кількох інших агентів, корисних для лікування раку простати, включаючи, проте не обмежуючись цим, зовнішню променеву терапію; внутрішньотканинну імплантацію радіоізотопів, наприклад, ренію, паладію або іридію; лепролід або інші LHRH агоністи; нестероїдні антиандрогени (флутамід, нилутамід, бікалутамід), стероїдні анти андрогени (ципротерону ацетат), комбінацію лепроліду та флутаміду, естрогени, такі як DES, етиніл естрадіол; низькодозовий преднізон, або інші-хіміотерапевтичні схеми, про які доповідалось, що вони дають суб'єктивне поліпшення симптомів та зниження PSA рівнів.

У специфічних варіантах пацієнтам з раком яєчника призначають профілактично або терапевтично ефективну кількість кон'югату антитіла проти альфа V даного винаходу у комбінації з призначенням профілактично або терапевтично ефективної кількості одного або кількох інших агентів, корисних для лікування раку яєчника, включаючи, проте не обмежуючись цим, інтраперитонеальну променеву терапію, таку як ^{32}P терапію; повну черевну та тазову променеву терапію, цисплатин, комбінацію паклітаксела (Таксол) або доцетаксела (Таксотер) та цисплатин, або карбоплатин, комбі-

націю циклофосфаміду та цисплатину, комбінацію циклофосфаміду та карбоплатину, комбінацію 5-FU та леуковорину, етопозид, ліпосомний доксорубіцин, гемцитабін, іфосфамід, гексаметилмеламін (HMM), або топотекан.

У специфічних варіантах пацієнтам з пухлинними метастазами у кістки призначають профілактично або терапевтично ефективну кількість кон'югату антитіла проти альфа V даного винаходу у комбінації з призначенням профілактично або терапевтично ефективної кількості одного або кількох, інших агентів, корисних для лікування кісткових пухлинних метастазів, включаючи, проте не обмежуючись цим, агенти або терапії, що використовуються у лікуванні основної злоякісності, такі як гормональні інгібітори для раку простати або раку молочної залози, що метастазував у кістки, променеву терапію або хіміотерапію остеотропними ізотопами металів (стронцій-89 та самарій-153) та біофосфонати (наприклад, палмідронат або алендронат).

Терапія раку та дози, схеми застосування та рекомендації щодо застосування відомі у даній галузі і описані у такій літературі як Physician's Desk Reference (57th ed., 2003), котра тепер доступна через Інтернет шляхом передплати у PDR® Electronic Library, Thompson Micromedex, Greenwood Village, Colorado (Edition 2004).

Лікування запальних розладів

Кон'югати антитіла проти альфа V даного винаходу можуть призначатись суб'єкту, що потребує цього, для запобігання, лікування, контролю або послаблення запального розладу, або одного чи кількох його симптомів. Антитіла даного винаходу можуть також призначатись у комбінації з однією або кількома іншими терапіями, краще, терапіями, що корисні для запобігання, контролю, лікування або полегшення запального розладу (включаючи, проте не обмежуючись цим, профілактичні або терапевтичні агенти, що перелічені нижче), суб'єкту, котрий потребує цього, для запобігання, лікування, контролю або послаблення запального захворювання, або одного чи кількох його симптомів.

Запальні розлади, котрі можуть піддаватись лікуванню за допомогою способів, що охоплюються даним винаходом, включають, проте не обмежуючись цим, астму, енцефаліт, запальну хворобу кишечника, хронічну обструктивну легеневу хворобу (COPD), алергічні розлади, септичний шок, фіброз легень, недиференційовану спондилоартропатію, недиференційовану артропатію, артрити, остеоартрити, спондилоартропатії (наприклад, псоріатичний артрит, анкілозуючий спондиліт, синдром Рейтера (реактивний артрит), запальний остеоліз, хворобу Вільсона та хронічне запалення, спричинене хронічними вірусними чи бактеріальними інфекціями. Крім того, автоімунні розлади асоціюються із запальною патологією.

Протизапальні терапії

Даний винахід запроваджує способи запобігання, контролю, лікування або послаблення запального розладу, або одного чи кількох його симптомів, зазначені способи включають призначення суб'єкту, котрий погребує цього, кон'югату антитіла

проти альфа V та однієї або кількох терапій (наприклад, профілактичних або терапевтичних агентів, інших, ніж антитіла або фрагменти антитіл, що в імуноспецифічний спосіб зв'язуються з альфа V інтегринами). Будь-який агент або терапія, котрі, як відомо, корисні, або які використовувались, або використовуються у теперішній час для запобігання, контролю, лікування або послаблення запального розладу або одного чи кількох його симптомів, можуть використовуватись у комбінації з кон'югатом антитіла проти альфа V даного винаходу згідно з описаним тут винаходом. Приклади таких агентів включають, проте не обмежуючись цим, імуномодуляторні агенти, антиангіогенні агенти, протизапальні агенти та TNFальфа антагоністи.

Специфічні приклади імуномодуляторних агентів, котрі можуть призначатись у комбінації з кон'югатом антитіла проти альфа V даного винаходу суб'єкту із запальним розладом, включають метотрексат, лефлуномід, циклофосфамід, цитоксан, нуран, циклоспорин А, міноциклін, азатиоприн, антибіотики (наприклад, FK506 (такролімус)), метил преднізолон (MP), кортикостероїди, стероїди, мікофеноляту мофетил, рапаміцин (сиролімус), лефлунамід, антитіла проти Т-клітинних рецепторів (наприклад, ортоклон OKT3 (Johnson & Johnson), нувіон (лабораторії Protein Design), або антитіла проти IL-2 рецепторів (наприклад, зенапакс (лабораторії Protein Design) та антитіла проти IL6 (CNTO 328, Centocor) або IL-6 рецепторів (MRA, Chugai), та антитіла проти IL-12 (CNTO 1275, Centocor), антитіла проти IFN, антитіла проти TNF, антитіла проти IL-1 та IL-альфа/бета антагоністи.

Приклади TNF альфа антагоністів, котрі можуть призначатись у комбінації з кон'югатами антитіла проти альфа V даного винаходу суб'єкту із запальним розладом включають протеїни, поліпептиди, пептиди, злиті протеїни, антитіла (та їх фрагменти, що зв'язують антигени), такі як антитіла, що в імуноспецифічний спосіб зв'язуються з TNFальфа, молекули нуклеїнової кислоти (наприклад, антисенсові молекули або потрійні спіралі), органічні молекули, неорганічні молекули, та невеликі молекули, що блокують, знижують, інгібують або нейтралізують функцію, активність та/або експресію TNFальфа. Приклади TNFальфа антагоністів включають: інфліксимаб (ремікад; Centocor), D2E7 (гумара; Abbot Laboratories/Knoll Pharmaceuticals Co., Mt. Olive, N.J.), CDP571, який відомий також як хумікад та CDP-870 (обидва від Celltech/Pharmacia, Slough, U.K.), TNF-R1 (Amgen), етанерцепт (енбрел; Immunex), та інгібітори інших членів надсімейства TNFR рецепторів. Інші TNF антагоністи, що охоплені даним винаходом, включають, проте не обмежуючись цим, IL-10, котрий, як відомо, блокує продукування TNFальфа, та агенти проти р38 MARK.

Необмежувальні приклади протизапальних агентів, котрі можуть призначатись у комбінації з кон'югатом антитіла проти альфа V даного винаходу суб'єкту із запальним розладом, включають нестероїдні протизапальні ліки (NSAID), стероїдні протизапальні ліки, бета-агоністи, антихолінергічні

агенти та метилксантини. Приклади NSAID включають, проте не обмежуючись цим, аспірин, ібупрофен, целекоксиб (целебрекс), диклофенак (вольтарен), етодолак (іудин), фенпрофен (налфон), індометацин (індоцин), кеторалак (торадол), оксaproзин (дейпро), набуметон (релафен), суліндак (клінорил), толментин (толектин), рофекоксиб (віокс), напроксен (алев, напрозин), кетопрофен (актрон) та набуметон (релафен). Такі NSAID діють шляхом інгібування циклооксигеназного ензиму (наприклад, COX-1 та/або COX-2). Приклади стероїдних протизапальних ліків включають, проте не обмежуючись цим, глюкокортикоїди, дексаметазон (декатрон), кортизон, гідрокортизон, преднізон (делтазон), преднізолон та триамциналон.

У специфічних варіантах пацієнтам з остеоартритом призначають профілактично або терапевтично ефективну кількість кон'югату антитіла проти альфа V даного винаходу у комбінації з іншими агентами або терапіями, корисними для запобігання, лікування, контролю або полегшення остеоартриту, включаючи, проте не обмежуючись цим, анальгетики, такі як ацетаминофен, фенацетин; та трамадол, NSAID, такі як аспірин, дифлунізал, диклофенак, етодолак, фенамати, фенпрофен, флубіпрофен, ібупрофен, індометацин, кетопрофен, метилсаліцилат, набуметон, напроксин, оксaproзин, фенілбутозон, піроксикам, суліндак, та толментин; специфічні інгібітори (CSI) циклооксигенази (Cox)-2, такі як целекоксиб та рофекоксиб; інтра- або периартикулярну ін'єкцію депо препаратів, наприклад, глюкокортикоїдів або біофармацевтичних препаратів, та інтра-артикулярну ін'єкцію гіалуронової кислоти. Кон'югат антитіла проти альфа V даного винаходу може також застосовуватись у комбінації з іншими нефармакологічними засобами запобігання, лікування, контролю та полегшення остеоартриту, включаючи, проте не обмежуючись цим, іригацію остеоартритного суглобу, зниження навантаження на суглоб, аплікацію тепла або холоду до ураженого суглобу; перцевий крем; вправи та іншу фізичну терапію, та хірургію по заміні суглобу.

У специфічних варіантах пацієнтам з ревматоїдним артритом призначають профілактично або терапевтично ефективну кількість кон'югату антитіла проти альфа V даного винаходу у комбінації з іншими агентами або терапіями, корисними для запобігання, лікування, контролю або полегшення ревматоїдного артрити, включаючи NSAID, анальгетики, та CSI, як розглядалось для остеоартриту. Крім того, у конкурентний спосіб можуть застосовуватись й інші терапії, до або після застосування антитіла проти альфа V даного винаходу, такі як щомісячні імпульси високих доз глюкокортикоїдів, або внутрішньосуглобові введення глюкокортикоїдів; модифікуючі хворобу протиревматичні ліки (DMARD), включаючи метотрексат, сполуки золота (наприклад, ауранофін), D-пеніциламін, протималарійні препарати (наприклад, хлорокін) та сульфасалазин; агенти, що нейтралізують TNFальфа, такі як етанерцепт та інфліксимаб; імуносупресори та цитотоксичні агенти, що не обмежуються азатиоприном, лефлуномідом, циклоспорином і циклофосфамідом; та хірургічні інтервенції, такі як арт-

ропластика, повна заміна суглобу, реконструктивна ручна хірургія, відкрита або артроскопічна синовектомія та рання тендосиновектомія зап'ястка; зовнішні інтервенції, такі як різновид ортопедичних та допоміжних пристроїв, та інші фізичні терапії; та дієтичні доповнення, такі як підсилення уживання омега-3 жирних кислот (таких як ейкозапентенова кислота).

У специфічних варіантах пацієнтам з хронічною обструктивною легеневою хворобою (COPD) призначають профілактично або терапевтично ефективну кількість кон'югату антитіла проти альфа V даного винаходу у комбінації з іншими агентами або терапіями, корисними для запобігання, лікування, контролю або полегшення COPD, включаючи, проте не обмежуючись цим, бронходилататори, включаючи, проте не обмежуючись цим, бета-адренергічні агоністи короткої та тривалої дії, такі як альбутерол, пірбутерол, тербуталін, та метапроterenол, пероральний альбутерол затриманого виділення та салметерол, що застосовується шляхом інгаляції; антихолінергетики, такі як іпратропію бромід, та теофілін і його похідні; глюкокортикоїди; кисень; легеневу трансплантацію; хірургію, пов'язану зі зниженням об'єму легень; ендотрахеальну інтубацію, вентиляційну підтримку; щорічну вакцинацію проти грипу та пневмококову вакцинацію; вправи; та припинення паління.

У специфічних варіантах пацієнтам з фіброзом легень призначають профілактично або терапевтично ефективну кількість кон'югату антитіла проти альфа V даного винаходу у комбінації з ефективною кількістю одного або кількох інших агентів, корисних для терапії фіброзу легень, включаючи, проте не обмежуючись цим, кисень, кортикостероїди; цитотоксичні ліки (циклофосфамід або азатіоприн); бронходилататори, такі як бета-адренергічні агоністи короткої та тривалої дії, антихолінергетики, та теофілін і його похідні; та антигістамінні препарати (дифенгідрамін та доксиламін).

У специфічних варіантах пацієнтам з астмою призначають профілактично або терапевтично ефективну кількість кон'югату антитіла проти альфа V даного винаходу у комбінації з ефективною кількістю одного або кількох інших агентів, корисних для лікування астми, включаючи, проте не обмежуючись цим, адренергічні стимулятори (приклади включають, але не обмежуються цим, катехоламіни, наприклад, епінефрин, ізоперотеренол, та ізоетарин; резорциноли, наприклад, метапроterenол, тербуталін, та фенотерол; та салігеніни, наприклад, салбутамол; метилксантини, включаючи теофілін та його різні солі; антихолінергетики, включаючи атропіну сульфат, акомпіну метил нітрат, та іпратропію бромід; глюкокортикоїди; агенти, що стабілізують мастоцити, такі як кромолін натрій та недокроміл натрій; лейкотрієнові модифікатори, такі як злеутон, зафірлукаст та монтелукаст; імуносупресанти, включаючи метотрексат; та ацетилцистеїн.

У специфічних варіантах пацієнтам з алергією призначають профілактично або терапевтично ефективну кількість кон'югату антитіла проти альфа V даного винаходу у комбінації з ефективною кількістю одного або кількох інших агентів, корис-

них для лікування алергії, включаючи, проте не обмежуючись цим, кромолін; антигістамінні препарати; симпатоміметичні ліки (як альфа-адренергічні, так і бета-адренергічні ліки); теофілін та його похідні; глюкокортикоїди; та імуно-десенсибілізуючу терапію за допомогою ін'єкцій алергенів.

Лікування автоімунних розладів

Кон'югат антитіла проти альфа V даного винаходу може призначатись суб'єкту, який потребує цього, для запобігання, контролю, лікування або послаблення автоімунного розладу або одного чи кількох його симптомів. Кон'югат антитіла проти альфа V даного винаходу може також призначатись у комбінації з однією або кількома іншими терапіями, краще, терапіями, що корисні для запобігання, контролю або лікування автоімунного розладу (включаючи, проте не обмежуючись цим, профілактичні або терапевтичні агенти, перелічені нижче), суб'єкту, котрий потребує цього, для запобігання, контролю, лікування або послаблення автоімунного розладу або одного чи кількох його симптомів. У специфічному варіанті даний винахід запроваджує спосіб запобігання, контролю, лікування або послаблення автоімунного розладу або одного чи кількох його симптомів, зазначений спосіб включає призначення суб'єкту, котрий потребує цього, дози профілактично або терапевтично ефективної кількості рідкого препарату даного винаходу. В іншому варіанті даний винахід запроваджує спосіб запобігання, контролю, лікування або послаблення автоімунного розладу або одного чи кількох його симптомів, зазначений спосіб включає призначення суб'єкту, котрий потребує цього, дози профілактично або терапевтично ефективної кількості рідкого препарату даного винаходу та дози профілактично або терапевтично ефективної кількості одного або кількох терапевтичних препаратів (наприклад, профілактичних або терапевтичних агентів), відмінних від антитіл або фрагментів антитіл, що в імуноспецифічний спосіб зв'язуються з альфа V інтегрином.

Даний винахід запроваджує способи контролю, лікування або послаблення автоімунного розладу або одного чи кількох його симптомів у суб'єкта, резистентного до звичайних терапій для такого автоімунного розладу, зазначені способи включають призначення зазначеному суб'єкту дози профілактично або терапевтично ефективної кількості антитіл даного винаходу. Даний винахід також запроваджує способи контролю, лікування або послаблення автоімунного розладу або одного чи кількох його симптомів у суб'єкта, резистентного до існуючих моноагентних терапій для такого автоімунного розладу, зазначені способи включають призначення зазначеному суб'єкту дози профілактично або терапевтично ефективної кількості кон'югату антитіла проти альфа V даного винаходу та дозу профілактично або терапевтично ефективної кількості одного або кількох терапевтичних препаратів (наприклад, профілактичних або терапевтичних агентів), інших, ніж антитіла або фрагменти антитіл, що в імунологічний спосіб зв'язується з альфа V інтегрином. Даний винахід також запроваджує способи контролю, лікування або

послаблення автоімунного розладу або одного чи кількох його симптомів шляхом призначення кон'югату антитіла проти альфа V даного винаходу у комбінації з будь-яким іншим лікуванням пацієнтам, котрі виявили резистентність до іншого лікування, але більше не застосовують це лікування. Даний винахід також запроваджує альтернативні способи контролю або лікування автоімунного розладу, де інша терапія виявилась або може виявитись занадто токсичною, тобто призводить до неприємних або непереносних побічних ефектів для пацієнта, котрий піддається лікуванню.

Зокрема, даний винахід запроваджує альтернативні способи контролю або лікування автоімунного розладу, де даний пацієнт є резистентним до інших терапій. Крім того, даний винахід запроваджує способи запобігання рецидивам автоімунного розладу у пацієнтів, що піддавались лікуванню і не мають виявів активності хвороби, шляхом застосування кон'югату антитіла проти альфа V даного винаходу.

При автоімунних розладах імунна система запускає імунну реакцію, коли сторонні речовини, проти яких має проводитись боротьба, відсутні, і нормальна захисна імунна система організму спричиняє шкоду своїм власним тканинам, помилково атакуючи сама себе. Є багато різних автоімунних розладів, котрі діють на організм у різні способи. Наприклад, мозок уражується в осіб з розсіяним склерозом, кишки уражуються в осіб з хворобою Крона, і синовіальна капсула, кістка та хрящ різних суглобів уражуються в осіб з ревматоїдним артритом. У міру, як автоімунні розлади прогресують, може виникати деструкція одного або кількох типів тканин тіла, аномальний ріст органу, що може супроводжуватись неоваскуляризацією зазначеного органу або тканини, або зміни у функції органу. Автоімунний розлад може спричинювати шкоду лише одному типу органу або тканини, або множині органів та тканин. Органи та тканини, що звичайно вражаються автоімунними розладами, включають червоні кров'яні тільця, кровоносні судини, з'єднувальні тканини, ендокринні залози (наприклад, щитоподібну або підшлункову), м'язи, суглоби та шкіру. Приклади автоімунних розладів, що можуть лікуватись за допомогою способів даного винаходу, включають, проте не обмежуючись цим, алопецію вогнищеву, анкілозивний спондиліт, антифосфоліпідний синдром, автоімунну хворобу Едісона, автоімунні хвороби надниркової залози, автоімунну гемолітичну анемію, автоімунний гепатит, автоімунний оофорит та орхіт, автоімунну тромбоцитопенію, хворобу Берета, бульозний пемфігоїд, кардіоміопатію, черевний спру-дерматит, синдром хронічної втоми імунної дисфункції (CFIDS), хронічну запальну демієлінізуючу поліневропатію, синдром Черджа-Строса, рубцевий пемфігоїд, синдром CRST, хворобу холодних аглютинінів, хворобу Крона, дискоїдний вовчак, есенціальну змішану криоглобулінемію, фіброміалгію-фіброміозит, гломерулонефрит, хворобу Граве, Гієна-Барє, тіреоїдит Хашімото, ідіопатичний фіброз легень, ідіопатичну тромбоцитопенічну пурпуру (ITP), IgA невропатію, ювенільний артрит, червоний плеский лишай, червоний вовчак, хворо-

бу Мен'єра, змішану хворобу з'єднувальної тканини, розсіяний склероз, типу 1 або імуноопосередкований цукровий діабет, важку міастенію, пемфігус вульгаріс, перніціозну анемію, нодозний поліартрит, поліхондрит, полігландулярні синдроми, поліміалгію ревматика, поліміозит та дерматоміозит, первинну агамаглобулінемію, первинний міліарний цироз, псоріаз, псоріатичний артрит, феномен Рейнольда, синдром Рейтера, ревматоїдний артрит, саркоїдоз, склеродерма, синдром Шегрена, синдром ригідної людини, системний еритематозний вовчак, еритематозний вовчак, синдром Такаюсу, скроневий артрит/гігантськоквітінний артрит, виразковий коліт, увеїт, васкуліти, такі як герпетичформний васкулітний дерматит, вітіліго, та грануломатоз Вегенера.

Види автоімунної терапії, дози, схеми застосування та рекомендації щодо застосування відомі у даній галузі і описані у літературі, такий як Physician's Desk Reference (56th ed., 2002, та 57th ed., 2003).

Даний винахід запроваджує способи запобігання, контролю, лікування або послаблення автоімунного розладу або одного чи кількох його симптомів, зазначені способи включають призначення суб'єкту, котрий потребує цього, кон'югату антитіла проти альфаV даного винаходу та одного або кількох терапевтичних засобів (наприклад, профілактичних або терапевтичних агентів), відмінних від антитіла або фрагментів антитіла, котрі в імуноспецифічний спосіб зв'язуються з альфа V інтегринами. Будь-який агент або терапія, котрі, як відомо, корисні, або які використовувались, або використовуються у теперішній час для запобігання, контролю, лікування або послаблення автоімунного розладу або одного чи кількох їх симптомів, можуть застосовуватись у комбінації з кон'югатом антитіла проти альфа V даного винаходу згідно з даним винаходом, що тут описаний. Приклади таких агентів включають, проте не обмежуючись цим, імуномодуляторні агенти, протизапальні агенти та TNFальфа антагоністи. Специфічні приклади імуномодуляторних агентів, протизапальних агентів та TNFальфа антагоністів, котрі можуть використовуватись у комбінації з кон'югатом антитіла проти альфа V даного винаходу для запобігання, контролю, лікування або послаблення автоімунного розладу, розкриті вище.

У специфічних варіантах пацієнтам з множинним склерозом (MS) призначають профілактично або терапевтично ефективну кількість кон'югату антитіла проти альфа V даного винаходу у комбінації з іншими агентами або терапіями, що корисні для запобігання, лікування, контролю та послаблення MS, включаючи, проте не обмежуючись цим, IFN-бета 1b (бетасерон) та IFN-альфа2a (авонекс); глатирамеру ацетат (копаксон); мітоксантрон; метотрексат; циклофосфамід; внутрішньовенний імуноглобулін, глюкокортикоїди; метилпреднізолон; 2-хлородеоксиаденозин (кладрибін), баклофен (перорально або інтратекально через вбудований катетер), циклоензаприну гідрохлорид; клоназепам; клонідину гідрохлорид; карбамазепін; габапентин; амітриптилін; примідон; ондансетрон; ізоніазид; оксibuтинін; толтеродин;

пропантелін; бетанекол; теразозину гідрохлорид; силденафілу цитрат; амантадин; пемолін; вітаміни у великих дозах; оротат кальцію; гансикловір; антибіотики та плазмовий обмін.

У специфічних варіантах пацієнтам з псоріазом призначають профілактично або терапевтично ефективну кількість кон'югату антитіла проти альфа V даного винаходу у комбінації з іншими агентами або терапіями, що корисні для запобігання, лікування, контролю та послаблення псоріазу, включаючи місцеві препарати, що містять стероїди; дьоготь (естаровий, псоригелевий, фототаровий крем); місцево аналоги вітаміну D, такі як кальціпотрієнова мазь; ультрафіолетове світло з або без псоралену; та синтетичні ретиноїди.

У специфічних варіантах пацієнтам з хворобою Крона призначають профілактично або терапевтично ефективну кількість кон'югату антитіла проти альфа V даного винаходу у комбінації з іншими агентами або терапіями, що корисні для запобігання, лікування, контролю та послаблення хвороби Крона, включаючи, проте не обмежуючись цим, антидіарейні засоби (лоперамід, дифеноксилат з атропіном, холестирамін або коlestипол); протиспазматичні засоби (пропанхелін, дицткломін, або гіосціамін); агенти 5-аміносаліцилової кислоти (сульфасалазин, мезаламін (азакол) та його форма повільного виділення (пентаза); кортикостероїди; імуномодуляторні ліки, корисні при ревматичних хворобах - азатіоприн, меркаптопурин, циклоспорин, та метоірексат: антибіотики; TNF інгібітори, включаючи ентєрасепт та інфліксимаб; імуносупресивні агенти, включаючи такролімус, мікофеноляту мофетил, та талідомід; дієтотерапії; ентєральну терапію з елементами дієтами (наприклад, вівонекс протягом 4 тижнів); та повне парентеральне харчування.

У специфічних варіантах пацієнтам з еритематозним вовчаком призначають профілактично або терапевтично ефективну кількість кон'югату антитіла проти альфа V даного винаходу у комбінації з іншими агентами або терапіями, що корисні для запобігання, лікування, контролю та послаблення еритематозного вовчака, включаючи, проте не обмежуючись цим, протималарійні засоби (включаючи, але не обмежуючись цим, гідроксихлорокін); глюкокортикоїди (наприклад, може застосовуватись низькодозова, високкодозова або високкодозова внутрішньовенна пульс-терапія); імуносупресивні та імуномодуляторні агенти, включаючи циклофосфамід, хлорамбуцил та азатіоприн, метотрексат та мікофеноляту мофетил; андрогенні стероїди (включаючи, проте не обмежуючись даназолом); та антикоагулянти (включаючи, проте не обмежуючись варфарином).

Незлєзакісні або імунологічно-зв'язані клітинно-проліферативні хвороби

Кон'югати даного винаходу також корисні для лікування незлєзакісних проліферативних хвороб і, особливо, таких хвороб, що включають ангіогенез. Ангіогенез, як відомо, є чинником, що вносить свій вклад у ряд патологічних станів на додаток до здатності пухлин до росту та метастазування, очних розладів, включаючи ретинопатії, та розлади шкіри, включаючи псоріаз та саркому Капоші. Репре-

зентативні приклади таких неонкогенних залежних від ангіогенезу хвороб включають рогівкову неоваскулярізацію, гіпертрофічні рубці та келоїди, проліферативну діабетичну ретинопатію, ревматоїдний артрит, артеріовенозні мальформації (розглянуті вище), атеросклеротичні бляшки та ішемічну хворобу серця, затримане загоювання ран, гемофільні суглоби, незрошувані переломи, синдром Ослєра-Вебера, псоріаз, пемфігус вульгаріс, синдром Бєкета, гострий респіраторний дистрес-синдром (ARDS), піогенна гранулома, склеродерма, трахома, менорагія (розглянута вище) та васкулярні спайки.

4. Фармацевтичні препарати

Даний винахід запроваджує стабільні препарати кон'югатів антитіла проти альфа V-маутансінїї, котрі, краще, являють собою водний фосфатний буферний сольовий або змішаний сольовий розчин, так само як і законсервовані розчини та препарати, що містять консервант, так само як і законсервовані препарати багаторазового застосування, що придатні для фармацевтичного або ветеринарного використання, котрі включають принаймні один кон'югат антитіла проти альфа V - маутансінїї у фармацевтично прийнятному препараті.

Консерванти, яким віддається перевага, включають ті, що, вибираються із групи, яка складається із фенолу, m-крезолу, p-крезолу, o-крезолу, хлоркрезолу, бензилового спирту, алкілпарабену (метил, етил, пропіл, бутіл і таке подібне), бензалконій хлориду, бензтоній хлориду, дегідроацетату натрію та тимєрозалу, або їх сумішей.

Принаймні один кон'югат антитіла проти альфа V - маутансінїї у вигляді стабільних або законсервованих розчинів, що тут описані, може призначатись пацієнту згідно з даним винаходом шляхом доставки з використанням різновиду способів, включаючи підшкірні або внутрішньом'язові ін'єкції; трансдермальний, пульмонарний, трансмукозальний, імплантацию, осмотичну помпу, картридж, мікропомпу, або інші засоби, з якими знайомі фахівці, як це добре відомо у даній галузі.

5. Фармацевтичні препарати

У способі застосування CNTO 95 - маутансінїї, якому віддається перевага, дана лікарська речовина вводиться внутрішньовенно із попередньо встановленого катетєру, обладнаного інфузійною системою. CNTO 95 - мєртансін постачається у 20 мл одноразових ампулах компанією ImmunoGen, Inc. (Cambridge, MA). Кожна ампула містить протеїн у концентрації від 0,05 до приблизно 2,0 мг/мл у буферному розчині (pH 6,5±0,5), що складається у значній мірі із первинного кислото фосфату калію (0,57 мг/мл), первинного кислото фосфату натрію моногідрату (0,20 мг/мл), вторинного кислото фосфату натрію (0,555 мг/мл), та хлориду натрію (8,16 мг/мл) в очищеній воді, Фармакопєя США. Даний лікарський продукт попередньо фільтрується двічі шляхом інстиляції дозового об'єму в інфузійну систему шляхом його перепускання через 5 мкм фільтр з низьким зв'язуванням протеїну і уводиться пацієнтам через прохідний 0,22 мкм фільтр у межах 8 годин приготування. Після інфузії внутрішньовенна лінія має бути про-

мита рідиною для забезпечення доставки повної дози ліків.

Виходячи із попереднього досвіду застосування на людських пацієнтах кон'югатів Mab-маутансоїд шляхом внутрішньовенного введення, можливо застосовувати кожні три тижні дози у межах від 22 до 295 мг/мл (J Clin Oncol. 21:211-222, 2003).

6. Виріб

Даний винахід включає виріб, що містить матеріали, корисні для лікування розладів, котрі описані вище, який включає кон'югат антитіло проти альфа V - маутансиноїд, контейнер та етикетку або пакувальний вкладиш на ньому або з'єднаний з ним. Даний виріб містить, краще, принаймні одну ампулу, яка включає розчин принаймні одного кон'югату антитіло проти альфа V - маутансиноїд з приписаними буферами та/або консервантами, при потребі, у водному розчиннику, де зазначений пакувальний матеріал включає етикетку із зазначенням терміну зберігання такого розчину. Даний винахід може включати виріб, що містить пакувальний матеріал, першу ампулу, що містить ліофілізований принаймні один кон'югат антитіло проти альфа V - маутансиноїд, та другу ампулу, яка містить водний розріджувач приписаного буферу або консервант, де зазначений пакувальний матеріал включає етикетку з інструкцією практикуючому лікарю або пацієнту, яким чином відновити принаймні один кон'югат антитіло проти альфа V - маутансиноїд у водному розріджувачі для утворення розчину.

Придатні контейнери включають, наприклад, пляшки, ампули, шприці і т.д. Контейнери можуть бути зроблені із різновиду матеріалів, таких як скло або пластик. Даний контейнер може мати стерильний вхідний порт (наприклад, контейнер може являти собою пакет з внутрішньовенним розчином або ампулу з пробкою, котра може проколуватись гіподермічною ін'єкційною голкою).

Принаймні одним активним агентом у даній композиції є кон'югат антитіло проти альфа V - маутансиноїд. Етикетка або пакувальний вкладиш зазначають, що дана композиція застосовується для лікування вибраного стану, такого як рак. Пакувальний вкладиш може вказувати на те, що дане антитіло або композиція використовується для лікування раку, котрий не реагує або реагує слабо на лікування за допомогою стандартних засобів, як тут окреслено для специфічних захворювань та діагнозів. В інших варіантах пакувальний вкладиш може вказувати на те, що даний кон'югат антитіло-маутансиноїд або композиція може також використовуватись для лікування метастатичного раку, раку простати, раку молочної залози або колоректального раку.

Хоча даний винахід був описаний у загальних термінах, варіанти даного винаходу будуть додатково розкриті у наступних прикладах.

Приклад 1

Одержання та опис моноклонального антитіла CNTO95

Одержання антитіла CNTO95 проти альфа V інтегрину детально описано у PCT публікації за номером WO 02/12501 та у патентній публікації

США за номером 2003/040044, на які у даному тексті зроблено посилання. Конкретно, людське Mab Cnto 95 було генероване шляхом імунізації (CBA/J x C57/BL6/J, GenPharm International) F2 гібридних мишей $\alpha\beta_3$ інтегрином, очищеним із плаценти людини. Дане антитіло складається із людської варіабельної та IgG1 каппа константної ділянок. Спосіб одержання та бажані характеристики Cnto 95 описані раніше у WO0212501 та роботі Trikha et al. 2004, Int. J. Cancer 110 (3):326-335.

Були використані трансгенні миші від GenPharm International, що експресують людські імунoglobуліни, але не миші IgM або IgG. Ці миші містять трансгени людської послідовності, що піддаються V(D)J з'єднанню, важколанцюгово-класному перемиканню та соматичній мутації з генерацією репертуару імунoglobулінів людської послідовності (Taylor et al., International Immunology 6:579-591 (1993)). Легколанцюговий трансген отримується, частково, із дріжджового штучного хромосомного клону, що включає приблизно половину зародковолінійної людської ділянки V_κ. Окрім кількох VH генів, важколанцюговий (HC) трансген кодує як людську μ , так і людську $\gamma 1$ (Lonberg et al., Nature 368:856-859 (1994), та/або $\gamma 3$ константні ділянки. Миша, отримана від HC012 генотипного родоходу, застосовувалась в імунізації та процесі злиття для генерації моноклонального антитіла проти альфа V, котре використовувалось в одержанні кон'югату даного винаходу.

Людську плаценту (зруйновану за допомогою м'ясорубки) або клітини меланоми людини M21, що експресують $\alpha\beta_3$ інтегрин, екстрагували ОТГ (октилглюкозидний укол) у буферному сольовому розчині як описано (WO0212501). Ці препарати піддавали емульсифікації рівним об'ємом повного ад'юванта Фрейнда (Freund) та використовували для імунізації 15-17 тижневого кастрованого у хірургічний спосіб самця миші (GenPharm, Foster City, CA) на 0 та 14 добу, і в неповному ад'юванті Фрейнда на 28, 48 та 56 добу. За три доби спленоцити збирали від миші з титром 1:1280 щодо альфаVбета3 з використанням формату твердої фази EIA. Злиття проводилось при відношенні клітин мишачої мієломи (SP2/0) до живих клітин селезінки 1:1. Гібридомні супернатанти піддавались скринінгу з використанням EIA (імуноферментний аналіз) методу мікроплат АБО EIA проби із захопленням, і вибрані лінії продукування антитіл розширювались та повторно випробувались на бажані властивості.

Аналіз ELISA підтвердив, що очищене антитіло від двох гібридом, C372A (що також називається Mab Cnto 95) та C372A, зв'язує альфаVбета3 у спосіб, залежний від концентрації. П'ятдесят відсотків зв'язування досягається при 0,07 та 0,7 мкг/мл для C372A та Cnto 95 відповідно. У тій самій пробі антитіло проти альфаVбета3, c7E3 IgG, демонструвало 50% максимальне зв'язування при 0,07 мкг/мл.

Для визначення унікальної специфічності Cnto 95 проводились проби на конкурентне зв'язування (або комплементацию) з використанням наступних мишачих антитіл: m7E3 IgG, проти аль-

фаVбета3 (клон LM609, Chemicon), проти альфаVбета5 (клон P12F6, Gibco), проти бета3 (Chemicon, AMAC), або проти альфаV (клон VNR139, Gibco). Ці результати продемонстрували, що CNTO 95 зв'язує епітоп, який не розділяється іншими випробуваними антитілами.

Дані по спорідненості до зв'язування для очищених інтегринів порівнювались зі зв'язуванням з рецепторами, експресованими на різних клітинних лініях з використанням 125-1 CNTO 95. A375S2 та M21 клітини експресують як $\alpha_V\beta_3$, так і $\alpha_V\beta_5$, HT-29 клітини експресують $\alpha_V\beta_5$. Для порівняння застосовувались й інші Mab, здатні до зв'язування інтегринів. K_D визначали із кривої насичення зв'язування у кожному випадку з використанням множинних реплік множини лотів антитіл. На пластинках, покритих $\alpha_V\beta_3$, середня K_D складала $2,1 \pm 1,33 \times 10^{-10}$ М; і середня абсцимаб K_D дорівнювала $2,5 \pm 1,46 \times 10^{-10}$ М. Середня K_D CNTO 95 на $\alpha_V\beta_5$ складала $2,5 \pm 1,04 \times 10^{-11}$ М. Absciximab не виявляло ані зв'язування ані залежності від дози на пластинках, покритих $\alpha_V\beta_5$.

Як показано на Фіг.4 дозування CNTO 95 інгібувало ріст пухлин меланоми людини у безтимусних мишей. На 26 добу CNTO 95 інгібувало ріст пухлини приблизно на 80%, у порівнянні з пухлинами від тварин, що лікувались контрольними засобами. У цій моделі CNTO 95 не взаємодіє з ангіогенними судинами хазяїна, оскільки не зв'язує інтегрини миші, і можна припустити, що сама блокада людських експресованих пухлинами інтегринів може інгібувати ріст пухлин у мишей, незалежно від ангіогенних ефектів.

Для досліджень на щурах у фірми Harlan були придбані самиці безтимусних щурів віком 6-7 тижнів. Двадцять щурів були піддані інюкації підшкірно клітинами A372.S2 (3×10^6) в області боку (доба 1). На 4 добу щури були довільно розділені на 2 групи. Одній групі вводили внутрішньовенну ін'єкцію CNTO 95 (10 мг/кг у PBS), тоді як друга група одержала погоджену за ізотипом контрольним IgG (10 мг/кг). Після цього дозування було продовжено потижнево до 46 доби (загалом, 6 доз). Вимірювання пухлин проводилось за допомогою кронциркуля два рази на тиждень, і об'єми пухлин обчислювались за формулою (довжина \times ширина²)/2. Вагу тіла також записували кожен тиждень.

У щурів, CNTO 95 здатне блокувати як ангіогенні інтегрини щурів, так і людські експресовані пухлинними клітинами інтегрини. Потижневе лікування безтимусних щурів з пухлинами CNTO 95 при 10 мг/кг знижувало ріст пухлин у порівнянні з погодженим за ізотипом людським IgG контрольним Mab (Фіг.5). На 46 добу лікування CNTO 95 дало значне зниження кінцевого розміру пухлини у порівнянні з контрольними безтимусними щурами ($p=0,0007$).

Як резюме, CNTO 95 є цілком людським Mab, котре зв'язує члени альфа V сімейства інтегринів з унікальною специфічністю, авідитетом та активністю, як продемонстровано за допомогою множинних функціональних аналізів, котрі показали, що воно нейтралізує біологічні ефекти інтегринових рецепторів альфа Vбета3 та альфа Vбета5 *in vitro* та *in vivo*. CNTO 95 інгібувало злипання, міграцію,

проліферацію та інвазію як пухлинних, так і ендотеліальних клітин *in vitro* і продемонструвало, що зв'язування та блокування множинних альфа V інтегринових рецепторів було більш ефективним, ніж блокування одного окремого інтегрину. Крім того, CNTO 95 інгібувало ангіогенез та ріст пухлин *in vivo*. Ріст пухлин меланоми людини був суттєво знижений шляхом блокади інтегринів пухлинних клітин у мишачій моделі або комбінованої блокади пухлинних клітин та ангіогенних інтегринів хазяїна у моделі на щурах, що висвітлює потенційну важливість кон'югування множинних клітинних мішеней для забезпечення протипухлинної ефективності.

Результати *in vitro* моделей демонструють, що CNTO 95 має значні антиангіогенні властивості, інгібуючи злипання ендотеліальних клітин, проліферацію, міграцію та капілярне проростання. Крім того, CNTO 95 блокувало ангіогенез, стимульований як bFGF, так і M21 клітинами меланоми у моделі Matngel на щурах і bFGF у моделі ангіогенезу на приматах. CNTO 95 виявило значні антиангіогенні ефекти як у моделі на гризунах, так і новій моделі на нелюдських приматах у мавп *cytomolgus*.

На додаток до блокування інтегринів на ангіогенному ендотелії здатність інгібувати інтегринову функцію на самих пухлинних клітинах знижувала ріст пухлин. Кількість альфа V інтегринів, як можна припустити, відіграє критичну роль у біології пухлинних клітин. У мишачій моделі ксенотрансплантата, де CNTO 95 не піддається перехресній реакції з інтегринами хазяїна, обробка CNTO 95 суттєво інгібувала ріст v3/5-позитивних пухлин меланоми.

Однією із найбільш важливих особливостей CNTO 95 є його повна людська природа. Оскільки воно є цілком людським, CNTO 95 з меншою вірогідністю може спричинювати імунні реакції у пацієнтів. Крім того, оскільки CNTO 95 здатне зв'язувати не лише альфа Vбета3 та альфа Vбета5, але й також інші альфа V інтегрини, такі як альфа Vбета6 та альфа Vбета1, воно має потенціал інгібувати множинну опосередкованих інтегрином подій.

Приклад 2

Одержання кон'югатів CNTO 95 - маутансин

Кон'югати антитіла тіольованих маутансинів одержували для подальшого біологічного випробування, починаючи з використання біфункціональних лінкерів, як описано.

Антитіло CNTO 95 постачалось фірмою Centocor для кон'югації. CNTO 95 постачалось при приблизно 20 мг/мл (загалом 260 мг). Дане антитіло піддавали діалізу у Буфері А (50 mM KCl, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 6,5), потім доводили до 8 мг/мл у 95% Буфері А, 5% ЕТОН. Антитіло модифікували 6,5 кратним мольним надлишком SPP для введення лінкеру з метою кон'югації ліків, з утворенням CNTO 95-SS-Пу, де S-пу є 2-меркаптопіридином. Залишковий SPP вилучали шляхом G25 гель-фільтруючої хроматографії. Відношення лінкеру до Ab складало 4,7. Ab-SS-Пу кон'югат модифікували 1,7 кратним мольним надлишком DM1 (Мол. вага (MW)=737,5 г/моль) до лінкеру, використовуючи концентрацію антитіла

3,2 мл у 97% Буфері А, 3% диметилацетамід. Потім кон'югат піддавали повторному хроматографуванню на G25, використовуючи PBS, pH 6,5, як буфер. Результуючий кон'югат містив 3,2 моля DM1 на моль CNTO-95: $[Ab]=2,59$ мг/мл, $[DM1]=38,3$ мкг/мл. Обчислення базувались на даних оптичної густини при 252 та 280 нм фільтрованого матеріалу та з використанням коефіцієнтів згасання: $Ab=224,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ при 280 нм, $DM1=5700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ при 280 нм, $Ab=82,880 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ при 252 нм і $DM1=26,790 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ при 252 нм.

Даний продукт аналізували з використанням SDS-PAGE (додецилсульфат натрію-електрофорез у поліакриламідному гелі), SEC-високопродуктивної рідинної хроматографії та за спорідненістю до зв'язування до альфа Vбета3 та альфа Vбета5 протеїну з використанням методу ELISA (твердофазовий імуноферментний аналіз). За методом PAGE даний продукт являв собою, головним чином, смугу близько 160 кД з також видимою більш слабкою низькомолекулярною вагою смугою. За даними аналізу методом SEC-високопродуктивної рідинної хроматографії, фракція кон'югату, що елюював мономер (18,8'), складала 96%, і приблизно 4% кон'югату елювалось як речовина з більшою молекулярною вагою (16,2'). Спорідненість до зв'язування визначалась із графіка залежності оптичної густини від концентрації, що дало позірну K_d $3,0 \text{ e-}11 \text{ M}$ для CNTO 95 і K_d $3,5 \text{ e-}11 \text{ M}$ для кон'югату на альфа Vбета5. Обидві речовини дали позірну K_d приблизно $3,0 \text{ e-}9$ на альфа Vбета3.

Інші партії CNTO 95-SPP-DM1 та CNTO 95, що піддавались кон'югації з DM4 та стороннім антигеном, котре націлене на нелюдський антиген, F105, одержували в аналогічний спосіб з використанням біфункціональних лінкерів, як показано на Фіг.2 і як окреслено на Фіг.3. Характеристики цих препаратів подані нижче:

Одержання CNTO95-SPP-DM1 (CNTO 364)

Моноклональне антитіло CNTO 95 піддавалось кон'югації з маутансиноїдом DM1 з SPP лінкером у наступний спосіб: 270,6 мг CNTO 95 піддавалось кон'югації з 3,7 мг DM1, результуючі 98 мл кон'югату зберігались при температурі від 2°C до 8°C при 2,74 мг/мл у PBS при pH 6,5. Концентрація DM1, визначена за оптичною густиною, складала 37,6 мкг/мл. Таким чином, співвідношення DM1 на моль CNTO 95 складало 2,98 (1 мкг DM1 еквівалентний 68,9 мкг кон'югованого CNTO 95 антитіла). За даними, отриманими методом високопродуктивної рідинної хроматографії, даний препарат був на 96,3% мономером з 0,59% вільних ліків.

Одержання CNTO95-SPP-DM1 (CNTO 364)

Моноклональне антитіло CNTO 95 піддавалось кон'югації з маутансиноїдом DM1 з SPP лінкером у наступний спосіб: 104 мг CNTO 95 піддавалось кон'югації з 1,82 мг DM1, результуючі 26 мл кон'югату зберігались при температурі від 2°C до 8°C при 3,65 мг/мл кон'югованого антитіла CNTO95-SPP-DM1 у PBS при pH 6,5. Концентрація DM1, визначена за оптичною густиною, складала 70,07 мкг/мл. Таким чином, даний препарат містив співвідношення 3,80 моль DM1 на моль CNTO 95

(1 мкг DM1 еквівалентний 57,2 мкг кон'югованого CNTO 95 антитіла). За даними, отриманими методом високопродуктивної рідинної хроматографії, даний препарат був на 93,4% мономером з 1,61% вільних ліків.

Одержання CNTO95-SPP-DM1 (CNTO 364)

Моноклональне антитіло CNTO 95 піддавалось кон'югації з маутансиноїдом DM1 з SPP лінкером у наступний спосіб: 228 мг CNTO 95 піддавалось кон'югації з 4,13 мг DM1, результуючі 102 мл кон'югату зберігались при температурі від 2°C до 8°C при 2,24 мг/мл кон'югованого CNTO95-SPP-DM1 антитіла у PBS при pH 6,5. Концентрація DM1, визначена за оптичною густиною, складала 40,53 мкг/мл. Таким чином, даний препарат містить співвідношення 3,93 моль DM1 на моль CNTO 95 (1 мкг DM1 еквівалентний 55,3 мкг кон'югованого CNTO 95 антитіла). За даними, отриманими методом високопродуктивної рідинної хроматографії, даний препарат був на 94,7% мономером з 1,00% вільних ліків.

Одержання CNTO95-SSNPB-DM4 (CNTO 365)

Моноклональне антитіло CNTO 95 піддавалось кон'югації з маутансиноїдом DM4 з SSNPB лінкером у наступний спосіб: 121 мг CNTO 95 піддавалось кон'югації з 2,18 мг DM4, результуючі 34 мл кон'югату зберігались при температурі від 2°C до 8°C при 3,25 мг/мл у PBS при pH 6,5. Концентрація DM4, визначена за оптичною густиною, складала 64,11 мкг/мл. Таким чином, співвідношення DM4 на моль антитіла складає 3,57 (1 мкг DM4 еквівалентний 55,6 мкг кон'югованого CNTO 95 антитіла). За даними, отриманими методом високопродуктивної рідинної хроматографії, даний препарат був на 95,4% мономером з 3,23% вільних ліків.

Одержання CNTO95-SSNPP-DM4 (CNTO 366)

Моноклональне антитіло CNTO 95 піддавалось кон'югації з маутансиноїдом DM4 з SSNPP лінкером у наступний спосіб: 101 мг CNTO 95 піддавалось кон'югації з 1,45 мг DM4, результуючі 30 мл кон'югату зберігались при температурі від 2°C до 8°C при 3,07 мг/мл антитіла у PBS при pH 6,5. Концентрація DM4, визначена за оптичною густиною, складала 48,39 мкг/мл. Таким чином, даний препарат мав 2,95 моля DM4 на моль CNTO 95 (1 мкг DM4 еквівалентний 69,5 мкг кон'югованого CNTO 95 антитіла). За даними, отриманими методом високопродуктивної рідинної хроматографії, даний препарат був на 85,9% мономером з 1,18% вільних ліків.

Одержання CNTQ95-SPDB-DM4 (CNTO 365)

Моноклональне антитіло CNTO 95 піддавалось кон'югації з маутансиноїдом DM4 з SPDB лінкером у наступний спосіб: 228,5 мг CNTO 95 піддавалось кон'югації з 4,37 мг DM4, результуючі 104,5 мл кон'югату зберігались при температурі від 2°C до 8°C при 2,19 мг/мл кон'югованого антитіла CNTO-SPDB-DM4 у PBS при pH 6,5. Концентрація DM4, визначена за оптичною густиною, складала 41,84 мкг/мл. Таким чином, даний препарат мав 3,92 моля DM4 на моль CNTO 95 (1 мкг DM4 еквівалентний 52,3 мкг кон'югованого CNTO 95 антитіла). За даними, отриманими методом високопро-

дуктивної рідинної хроматографії, даний препарат був на 93,6% мономером з 0,55% вільних ліків.

Одержання CNT095-SPDB-DM4 (CNT0 365)

Моноклональне антитіло CNT0 95 піддавалось кон'югації з маутансиноїдом DM4 з SPDB лінкером у наступний спосіб: 309 мг CNT0 95 піддавалось кон'югації з 5,4 мг DM4, результуючі 130,7 мл кон'югату зберігались при температурі від 2°C до 8°C при 2,36 мг/мл кон'югованого антитіла CNT0-SPDB-DM4 у PBS при pH 6,5. Концентрація DM4, визначена за оптичною густиною, складала 41,2 мкг/мл. Таким чином, даний препарат мав 3,57 моля DM4 на моль CNT0 95 (1 мкг DM4 еквівалентний 57,5 мкг кон'югованого CNT0 95 антитіла). За даними, отриманими методом високопродуктивної рідинної хроматографії, даний препарат був на 93,8% мономером з 0,40% вільних ліків.

Одержання CNT095-SPP-DM1 (CNT0 364)

Моноклональне антитіло CNT0 95 піддавалось кон'югації з маутансиноїдом DM1 з SPP лінкером у наступний спосіб: 270,6 мг CNT0 95 піддавалось кон'югації з 3,7 мг DM1, результуючий кон'югат зберігався при температурі від 2°C до 8°C при 2,74 мг/мл у PBS при pH 6,5. Концентрація DM1, визначена за оптичною густиною, складала 37,6 мкг/мл. Таким чином, даний препарат містить співвідношення 2,98 моль DM1 на моль CNT0 95 (1 мкг DM1 еквівалентний 68,9 мкг кон'югованого CNT0 95 антитіла). За даними, отриманими методом високопродуктивної рідинної хроматографії, даний препарат був на 96,3% мономером з 0,59% вільних ліків.

Одержання CNT095-SPP-DM1 (CNT0 364)

Моноклональне антитіло CNT0 95 піддавалось кон'югації з маутансиноїдом DM1 з SPP лінкером у наступний спосіб: 245 мг F105 піддавалось кон'югації з 4,28 мг DM1, результуючий кон'югат у кількості 91,5 мл зберігався при температурі від 2°C до 8°C при 2,68 мг/мл кон'югованого F105-SPP-DM1 антитіла у PBS при pH 6,5. Концентрація DM1, визначена за оптичною густиною, складала 46,76 мкг/мл. Таким чином, даний препарат містить співвідношення 3,79 моль DM1 на моль F105 (1 мкг DM1 еквівалентний 57,3 мкг кон'югованого F105 антитіла). За даними, отриманими методом високопродуктивної рідинної хроматографії, даний препарат був на 90,3% мономером з 2,44% вільних ліків.

Одержання CNT095-SPP-DM4 (CNT0 366)

Моноклональне антитіло CNT0 95 піддавалось кон'югації з маутансиноїдом DM4 з SPP лінкером у наступний спосіб: 76,7 мг CNT0 95 піддавалось кон'югації з 1,10 мг DM4, результуючі 35 мл кон'югату зберігались при температурі від 2°C до 8°C при 2,19 мг/мл кон'югованого CNT095-SPP-DM4 антитіла у PBS при pH 6,5. Концентрація DM1, визначена за оптичною густиною, складала 31,5 мкг/мл. Таким чином, даний препарат містить співвідношення 2,96 моль DM4 на моль CNT0 95 (1 мкг DM4 еквівалентний 69,4 мкг кон'югованого CNT0 95 антитіла). За даними, отриманими мето-

дом високопродуктивної рідинної хроматографії, даний препарат був на 97,3% мономером з 1,14% вільних ліків.

Одержання F105-SSNPB-DM4

Моноклональне антитіло F105 піддавалось кон'югації з маутансиноїдом DM4 з SSNPB лінкером у наступний спосіб: 106 мг F105 піддавалось кон'югації з 1,84 мг DM4, результуючі 25 мл кон'югату зберігались при температурі від 2°C до 8°C при 3,85 мг/мл у PBS при pH 6,5. Концентрація DM1, визначена за оптичною густиною, складала 73,45 мкг/мл. Таким чином, співвідношення DM4 на моль антитіла складала 3,57 (1 мкг DM4 еквівалентний 57,5 мкг кон'югованого F105 антитіла). За даними, отриманими методом високопродуктивної рідинної хроматографії, даний препарат був на 85,1% мономером з 1,92% вільних ліків.

Одержання F105-SSNPB-DM4

Моноклональне антитіло F105 піддавалось кон'югації з маутансиноїдом DM4 з SSNPB лінкером у наступний спосіб: 106 мг F105 піддавалось кон'югації з 1,84 мг DM4, результуючі 30 мл кон'югату зберігались при температурі від 2°C до 8°C при 3,46 мг/мл у PBS при pH 6,5. Концентрація DM4, визначена за оптичною густиною, складала 57,93 мкг/мл. Таким чином, співвідношення DM4 на моль антитіла складає 3,32 (1 мкг DM4 еквівалентний 65,4 мкг кон'югованого F105 антитіла). За даними, отриманими методом високопродуктивної рідинної хроматографії, даний препарат був на 88,8% мономером з 1,85% вільних ліків.

Одержання F105-SSNPP-DM4

Моноклональне антитіло F105 піддавалось кон'югації з маутансиноїдом DM4 з SSNPP лінкером у наступний спосіб: 105 мг F105 піддавалось кон'югації з 1,76 мг DM4, результуючі 28 мл кон'югату зберігались при температурі від 2°C до 8°C при 3,41 мг/мл у PBS при pH 6,5. Концентрація DM4, визначена за оптичною густиною, складала 62,87 мкг/мл. Таким чином, даний препарат містить 3,45 моль DM4 на моль F105 (1 мкг DM4 еквівалентний 59,4 мкг кон'югованого F105 антитіла). За даними, отриманими методом високопродуктивної рідинної хроматографії, даний препарат був на 85,9% мономером з 3,75% вільних ліків.

Одержання F105-SPDB-DM4

Моноклональне антитіло F105 піддавалось кон'югації з маутансиноїдом DM4 з SPDB лінкером у наступний спосіб: 230,5 мг F105 піддавалось кон'югації з 4,12 мг DM4, результуючі 104,5 мл кон'югату зберігались при температурі від 2°C до 8°C при 2,21 мг/мл у PBS при pH 6,5. Концентрація DM4, визначена за оптичною густиною, складала 39,41 мкг/мл. Таким чином, даний препарат містив 3,66 моля DM4 на моль F105 (1 мкг DM4 еквівалентний 56,0 мкг кон'югованого F105 антитіла). За даними, отриманими методом високопродуктивної рідинної хроматографії, даний препарат був на 89,2% мономером з 0,65% вільних ліків.

Загалом, для подальшого аналізу були синтезовані наступні речовини (Таблиця 6).

Таблиця 6

Сполука	Ліки	Реагент, що активує маутансинол	Реагент, що активує Mab	Метильні групи, сусідні з дисульфідом у продукті (бік Mab:бік ліків)
CNTO364	DM1	N-метил, N-(1-дитіометил-3-карбоксіпропіл)аланін	SPP або SSNPP	1:0
CNTO365	DM4	N-метил, N-(1-дитіометил-2-метил-4-карбоксі-n-бутил)аланін	SPDB або SSNPB	0:2
CNTO366	DM4	N-метил, N-(1-дитіометил-2-метил-4-карбоксі-n-бутил)аланін	SPP або SSNPP	1:2
F105-DM1	DM1	N-метил, N-(1-дитіометил-3-карбоксіпропіл)аланін	SPP або SSNPP	1:0
F105-DM4	DM4	N-метил, N-(1-дитіометил-2-метил-4-карбоксі-n-бутил)аланін	SPDB або SSNPB	0:2
F105-DM4	DM4	N-метил, N-(1-дитіометил-2-метил-4-карбоксі-n-бутил)аланін	SPP або SSNPP	1:2

Приклад 3

Зв'язування кон'югату CNTO 95-маутанзин з пухлинними клітинами

Випробувалась здатність та спорідненість кон'югату CNTO95-маутансиноїд до зв'язування з живими клітинами.

Матеріали та способи. CNTO 95, Centocor, лот №95-VF30A03-1, 20 мг/мл у PBS; CNTO 364 (CNTO 95-SPP-DM1), Immunogen, лот №1806-164, 37,6 мг/мл DM1, 2,74 мг/мл кон'югованого антитіла, рівень ендотоксину <0,1 EU/мг; CNTO 365 (CNTO 95-SPDB-DM4), Immunogen, лот №2020-78, 41,2 мг/мл DM4, 2,36 мг/мл кон'югованого антитіла, рівень ендотоксину <0,1 EU/мг; CNTO 366 (CNTO 95-SPP-DM4), Immunogen, лот №2020-48, 31,5 мг/мл DM4, 2,19 мг/мл кон'югованого антитіла, рівень ендотоксину <0,1 EU/мг.

Клітини: Клітини HT29 карциноми товстої кишки людини та A549 карциноми легень людини були від фірми ATCC і підтримувались в альфа MEM з додатком 10% сироватки плоду корови (FBS). A2780 клітини карциноми яєчника людини отримували від фірми National Cancer Institute. A2789 клітини культивувались у RPMI 1640 середовищі, що містило 10% FBS. Клітини збирали, споліскували, суспендували у MEM без сироватки і послідовно інкубували протягом 60 хвилин на льоду з послідовними розведеннями CNTO 95, CNTO 364, CNTO 365 та CNTO 366, і міченого FITC антитіла проти людини (10 мг/мл). Відсутність первинного антитіла або заміна первинного антитіла на ізотипічно схоже антитіло слугувала негативним контролем. Клітини зразу ж аналізувались за допомогою протокового цитомера FACS Scan II (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Дані аналізувались за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism з використанням нелінійного регресійного аналізу для визначення концентрації при 50% максимальному зв'язуванні (Таблиця 7). У більшості випадків константа ефективного зв'язування змінювалась менше, ніж у два рази.

Таблиця 7

EC50 (мг/мл)			
Сполука	HT29	A549	A2780
CNTO 95	0,14	0,18	0,17
CNTO 364	0,19	0,27	0,27
CNTO 365	0,21	0,34	0,27
CNTO 366	0,29	0,42	0,30

Приклад 4

Цитотоксичність кон'югатів CNTO 95-маутансин щодо пухлинних клітин

Здатність кон'югатів CNTO95-маутансиноїд вбивати клітини пухлин протягом деякого часу випробувалась in vitro.

CNTO 364 (CNTO 95-SPP-DM1), Immunogen, лот №1806-164, 37,6 мг/мл DM1, 2,74 мг/мл кон'югованого антитіла, рівень ендотоксину <0,1 EU/мг; CNTO 365 (CNTO 95-SPDB-DM4), Immunogen, лот №2020-78, 41,2 мг/мл DM4, 2,36 мг/мл кон'югованого антитіла, рівень ендотоксину <0,1 EU/мг; CNTO 366 (CNTO 95-SPP-DM4), Immunogen, лот №2020-48, 31,5 мг/мл DM4, 2,19 мг/мл кон'югованого антитіла, рівень ендотоксину <0,1 EU/мг.

Клітини HT29 карциноми товстої кишки людини та клітини A549 (ATC) недрібноклітинної карциноми легень людини культивували в αMEM з додатком 10% FBS при 37°C у присутності 5% CO₂. Клітини засівали у білі 96-коміркові тканинні культуральні планшети (5000 клітин/комірку) у культуральне середовище та інкубували протягом 16 годин. До кожної відповідної комірки додавали послідовні розведення імунокон'югатів (0-20мкг/мл). Тканинні культуральні планшети інкубували при 37°C протягом 96 годин. Згідно з інструкціями виробника проводили ATPlite пробу. Дані аналізували за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism з використанням нелінійної регресії (Таблиця 8) для визначення концентрації при половинній максимальній кількості клітин, як виміряно за світністю.

Таблиця 8

	EC50 (мкг/мл)	
	HT29	A549
Імунокон'югат		
CNTO 364	1,0	1,2
CNTO 365	0,24	0,3
CNTO 366	1,0	1,5

Приклад 5

Лікування за допомогою CNTO 95-DM1 щурів з пухлинами меланоми людини

Досліджувалась ефективність CNTO 364 у порівнянні з CNTO 95 проти розвинутих клітин меланоми людини A375.S2, уведених підшкірно.

CNTO 95 -DM1 були одержані від ImmunoGen, Inc. лот № 1716-74B, вихідна концентрація: 2,59мг/мл, 5 мг/кг CNTO 95-DM1 еквівалентно 74 мкг/кг DM1. CNTO 95 було від Centocor, лот № 5380-027, вихідна концентрація = 20 мг/мл. IgG-DM1 людини: ChromPure IgG людини був одержаний від Jackson ImmunoResearch Laboratories. IgG-DM1 людини готувався ImmunoGen, лот № 1762-50, вихідна концентрація 2,8 мг/мл. 5 мг/кг цього кон'югату еквівалентно 76 мкг/кг DM1. Маутансин: ImmunoGen, лот № 1710-121, вихідна концентрація = 16,38 мкг/мл у PBS, pH 6,5. Вихідний розчин маутансину був розведений PBS до 15 та 7,5мг/мл. PBS: ImmunoGen, pH 6,5. Клітини A375.S2 людської меланоми були придбані у ATCC, і були передані та зберігались у вигляді заморожених аліквотних кількостей у Centocor Cell Biology Services.

Дев'ятихвигових безтимусних "голих" щурів піддавали підшкірній інюкації A375.S2 клітинами меланоми людини. На 14 добу, коли середні об'єми пухлин сягали 250-300 мм³, тварин довільно розподіляли на групи 9/10, і лікування розпочиналось. CNTO 95-DM1 та відповідні контрольні сполуки вводились шляхом внутрішньовенної ін'єкції (по три ін'єкції за добу протягом першого тижня з наступною однією ін'єкцією на тиждень протягом двох тижнів на 11, 14, 16, 21 та 28 добу). Фіксувались розміри пухлин та вага тіла. Фіг.6 показує зміну об'єму пухлин у часі для меланоми людини у "голих" мишей. Об'єми пухлин виражені як середнє ±SEM (n=9 або 10). Стрілками позначені внутрішньовенні ін'єкції ліків. Зірочка вказує на те, що одна тварина, яка не виявила реакції, була омертвлена, коли об'єм пухлини у неї став більше 1500мм³. Усі тварини були омертвлені на 35 добу. Об'єми пухлин були виражені як середнє ±SEM (n=9 або 10). Стрілками позначені внутрішньовенні ін'єкції ліків. CNTO 95-DM1 при 5 мг/кг блокував ріст пухлин і знижував середній об'єм пухлин, тоді як CNTO 95 при 10 мг/кг не давало ефекту у цьому експерименті.

У другому експерименті на щурах середні об'єми пухлин сягали 250 мм³ на 14 добу. Тварин довільно розподіляли на групи, і перше внутрішньовенне дозування застосовувалось на 14 добу. Наступні ін'єкції вводились на 16 та 18 добу того самого тижня, і потім один раз на тиждень на 23 та 31 добу. Усіх тварин умертвляли на 35 добу. CNTO 95-DM1 при 5 мг/кг спричинював повну ре-

гресію A375.S2 ксенотрансплантата меланоми людини у самиць безтимусних щурів (Фіг.7). Контрольні сполуки, включаючи PBS, вільне CNTO 95, кон'югат стороннє антитіло-DM1, вільний маутансин та вільне CNTO 95 плюс вільний маутансин, не виявили будь-яких значних ефектів.

Приклад 6

Лікування за допомогою CNTO 95-DM1 щурів з пухлинами карциноми товстої кишки людини

Досліджувалась ефективність CNTO 364 у порівнянні з CNTO 95 проти розвинутих клітин HT29 карциноми товстої кишки людини, уведених підшкірно.

CNTO 364, ImmunoGen, лот № 1806-50, концентрація протеїну 2,53 мг/мл, концентрація DM1 41,8 мг/мл, відношення DM1 до CNTO 95 3,6 моля DM1 на моль CNTO 95. PBS або антитіло F105-DM1 використовувались як контрольні сполуки; ImmunoGen, лот № 1806-44, концентрація протеїну 2,2 мг/мл, концентрація DM1 38,3 мг/мл, відношення DM1 до F105 3,8 моля DM1 на моль F105. Усі предмети тестування випробувались на зараження ендотоксином, і LAL значення були нижче 1,0 EU/мг. HT29 клітинна лінія карциноми товстої кишки людини, котра експресує avb3, avb5 та avb6 інтегрини, була одержана із банку клітин Centocor. Ця клітинна лінія, як було визначено, була вільна від мікоплазми та бактеріальних агентів. Клітини культивували в αMEM з додатком 10% FBS, 1% пірувату та 1% MEM несуттєвої амінокислоти у присутності 5% CO₂ при 37°C.

У цьому дослідженні застосовувались сімдесят самиць безтимусних щурів від Harlan Laboratories (Indianapolis, IN). Щурів піддавали ін'єкції 5x10⁶ HT29 клітин підшкірно (0,2 мл 25x10⁶ клітин/мл) в задню бокову область (дорсальний бік, приблизно 0,5 дюйм нижче останнього ребра та 0,5 дюйм від хребта). Усі щури спостерігались щоденно (робочі дні) щодо промацуваної пухлини. Тварин розподіляли за об'ємом індивідуальних пухлин на сім груп, кожна із яких включала 9 тварин (Таблиця 9). Середній вихідний об'єм пухлин для всіх груп лежав у межах 250-260 мм³.

Таблиця 9

Група	N	CNTO 364 (мг/кг)	Дні дозування
1) PBS	9	0	7, 14, 21, 28 та 35
2) F105-DM1	9	25	7 та 14
3) CNTO 364	9	3	7, 14, 21, 28 та 35
4) CNTO 364	9	6	7, 14, 21, 28 та 35
5) CNTO 364	9	10	7, 14, 21, 28 та 35
6) CNTO 364	9	15	7, 14 та 35
7) CNTO 364	9	25	7 та 14

На день утворення груп (день 0) тварин зважували та вводили їм внутрішньовенно ін'єкції контрольного антитіла F105-DM1 при 25-мг/кг або CNTO 364 при 3, 6, 10, 15 або 25 мг/кг. Усі тестові таісонрольні речовини вводили в об'ємі 1мл/100 г ваги тіла. CNTO 364 при 3, 6 та 10 мг/кг групах застосовувалось внутрішньовенно за схемою q7dx5. CNTO 364 при 15 мг/кг дозували на 7, 14 та

35 добу. CNTO 364 при 25 мг/кг та F105-DM1 при 25 мг/кг дозували на 7 та 14 добу. Останні дві групи були умертвлені через значну втрату ваги тіла (більше 10% від 0 дня) згідно з нормами IACUC (Фіг.8).

Вимірювання об'єму пухлин проводили два рази на тиждень. Пухлини вимірювали за допомогою кронциркуля у двох напрямках (довжина та ширина) у міліметрах (мм). Об'єм пухлин обчислювали за формулою $V=(\text{довжина} \times \text{ширину} \times \text{ширину})/2$. Статистику обчислювали за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism з використанням непарного t-тесту.

CNTO 364 інгібувало ріст розвинутих пухлин товстої кишки у залежності від дози (Фіг.9). CNTO 364 при 10 мг/кг за схемою дозування q7dx5 давало 3 повних регресії пухлин і 2 часткові регресії із 9 тварин (Фіг.10). Лікування CNTO 364 при 15 мг/кг на 7, 14 та 35 добу дало 4 повних регресії та 4 часткових регресії у 9 тварин з пухлинами. PBS контрольна група була завершена на 35 добу після імплантації пухлинних клітин (середній об'єм пухлин більше 5000 мм³). На цей момент різниця в об'ємах пухлин між групами, що піддавались лікуванню CNTO 364 при 10 мг/кг та 15 мг/кг, відносно PBS контрольних груп, мала значення $P<0,0001$ з використанням двохшлейфного непарного t-тесту.

Дві послідовні ін'єкції як для CNTO 365 при 25 мг/кг, так і для F105-DM1 при 25 мг/кг були токсичними і спричиняли неприйнятні втрати ваги (Фіг.8). Проте, одна ін'єкція CNTO 364 при 25 мг/кг викликала повну регресію розвинутих HT29 пухлин карциноми товстої кишки людини при середньому об'єму пухлин більше 4000 мм³ (не показано).

Приклад 7

Лікування за допомогою CNTO 95-DM1 щурів з пухлинами карциноми легень людини

Це дослідження проводилось для оцінки in vitro ефективності CNTO 95-DM1 кон'югату у самиць безтимусних щурів з A549 карциномою легень людини. CNTO 95 готувалось на фірмі Centocor, (Malvern, PA), і кон'югація DM1 проводилась ImmunoGen (Cambridge, MA). CNTO 364 (CNTO95-SPP-DM1) відповідало описаному у Прикладі 1.

Клітинну лінію легеневої карциноми людини A549 (ATC) культивували у MEMальфа, що містив 10% FBS, і клітини готували у безсироватковому α MEM для підшкірної імплантації безтимусним щурам. У задню бічну область самиць безтимусних щурів (віком 6 тижнів, Harlan Laboratory, Indianapolis, IN) імплантували 5×10^6 клітин підшкірно (0,2 мл 25×10^6 клітин/мл) (дорсальний бік, приблизно 0,5 дюйм нижче останнього ребра та 0,5 дюйм від хребта). Коли середні об'єми пухлин досягли 250 мм³, тварин розподілили на групи дозування зі схожими середніми об'ємами пухлин (Таблиця 10), і дозування проводили внутрішньовенно на 17 та 29 добу після ін'єкції пухлинних клітин.

Таблиця 10

	Ліки	Доза на 17 та 29 добу
1	PBS	Не застосовувалось
2	F105-DM1	15 мг/кг
3	CNTO 364	15 мг/кг
4	одне CNTO 95	15 мг/кг
5	CNTO 95+маутансин	15 мг/кг+260 мкг/кг
6	один маутансин	260 мкг/кг

Вимірювання об'єму пухлин проводили два рази на тиждень. Пухлини вимірювали за допомогою електронного кронциркуля Vernier у двох напрямках (довжина та ширина) у міліметрах (мм). Об'єм пухлин обчислювали за формулою $V=(\text{довжина} \times \text{ширину} \times \text{ширину})/2$. Об'єми пухлин виражали як середнє \pm SEM (n=6). Будували графік залежності об'ємів від часу, Фіг.12, де стрілками позначені моменти внутрішньовенних ін'єкцій ліків. Використання ваги тіла як показника толерантності (Фіг.11) також вказує, що вибрана у цьому дослідженні схема дозування CNTO 364 добре переносилась тваринами, спричиняючи лише 3% тимчасову втрату первинної ваги тіла після першого дозування.

Однобічний дисперсійний аналіз (ANOVA) з тестом Bonferroni проводився за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, Inc., San-Diego, CA) з використанням 95% довірчого інтервалу. З посиланням на Фіг.12: Група 1, PBS; група 2, F105-DM1 при 15 мг/кг; група 3, CNTO 364 при 15 мг/кг; група 4, одне CNTO 95 при 15 мг/кг; група 5, CNTO 95 при 15 мг/кг плюс маутансин при 260 мг/кг; група 6, один маутансин при 260 мг/кг. Значення P визначалось за допомогою однобічного дисперсійного аналізу (ANOVA) з тестом Bonferroni для множинних порівнянь. * $P<0,05$, CNTO 364 відносно F105-DM1, CNTO 95 плюс маутансин або один маутансин; ** $P<0,01$, CNTO 364 відносно одного CNTO 95; *** $P<0,001$, CNTO 364 відносно PBS.

Кон'югація DM1 з CNTO 95, великою молекулою, може змінити фармакокінетичні властивості DM1 шляхом пролонгації періоду напіврозпаду DM1 in vivo. Для виключення цієї можливості імункон'югат стороннього антитіла F105-DM1 був включений у дане дослідження для визначення того, чи залежить активність кон'югату CNTO 95-DM1 від CNTO 95. Оскільки CNTO 95 є антиангіогенною та протипухлинною сполукою, і DM1 являє собою цитотоксичний агент, можливо, що зазначена протипухлинна активність була зумовлена простими адитивними ефектами вільного CNTO 95 та вільного DM1. Тому групи дозування вільного CNTO 95, вільного CNTO 95 плюс вільний маутансин та вільного маутансину були включені як контрольні групи. Як показано на Фіг.13, CNTO 364 при 15 мг/кг видаляв шість із шести пухлин A549 ксеноімплантату легеневої пухлини за схемою дозування qx12dx2. Спостерігалась одна повна пухлинна регресія у групі F105-DM1 та дві у групі CNTO 95 плюс маутансин. Ці результати демонструють перевагу імункон'югату CNTO 95-DM1. CNTO 364 у

регресії легеневої пухлини. Тварини, що лікувались CNTO 364 згідно з цією схемою дозування, виявляли тимчасову токсичність шкіри та втрату ваги тіла, і не виявляли явних ознак тяжкої токсичності.

Приклад 8

Порівняння кон'югатних структур у пухлинних моделях карциноми товстої кишки людини

Для визначення толерантності та потенції різних зчеплень, застосованих для одержання імуні-кон'югатів CNTO 95, була вибрана розвинута пухлинна модель з використанням імплантованих підшкірно HT29 клітин, отриманих із пухлини товстої кишки людини, у імуніконфліктних щурів.

CNTO 95-SPP-DM1 (CNTO 364), CNTO 95-SSNPB-DM4 (CNTO 365), CNTO 95-SSNPP-DM4 (CNTO 366) і Mab F105 еквіваленти готувались фірмою ImmunoGen (Cambridge, MA). Сто самиць безтимусних щурів (віком 4-6 тижні) були одержані від Harlan Laboratories.

Людські HT29 (ATCC) культивувались у α MEM з добавкою 10% FBS при 37°C у присутності 5% CO₂. Клітини готували при концентрації двадцять п'ять мільйонів клітин на мл у безсироватковому α MEM для інокуляції. Самиць безтимусних щурів піддавали інокуляції 5x10⁶ HT29 клітин підшкірно (0,2 мл 25x10⁶ клітин/мл) в задню бокову область (дорсальний бік, приблизно 0,5 дюйм нижче останнього ребра та 0,5 дюйм від хребта). Усі щури спостерігались два рази на тиждень щодо виникнення пухлин. Тварин розподіляли на 13 груп, 6 тварин на групу, виходячи із середнього об'єму пухлини для кожної групи, що складав приблизно 250 мм³. На день створення груп (день 7) кожна група отримала своє перше дозування, як перелічено у Таблиці 11. Дози імунікон'югатів обчислювались, виходячи із вмісту DM1 або DM4, відповідно, у кожному кон'югаті. L та H відповідають 175 та 350 мкг/кг DM1 або DM4, відповідно. Усі випробувані речовини подавались в об'ємі 1 мл/100 г ваги тіла. За виключенням групи 11, котра отримала лише одну дозу на 7 добу, всі інші групи отримували ліки на 7 добу та 21 добу. Зміни об'ємів пухлин використовувались як показники потенції (Фіг.14А та В), а зміни ваги тіла (Фіг.15А та В) застосовувались для моніторингу толерантності. Усі результати виражені як групове середнє \pm SEM (n=6).

Таблиця 11

Група No	Призначений Ab кон'югат (мг/кг)	Доза DMx мкг/кг
1. PBS	0	0
2. F105-SPP-DM1	11,5	DM1:175
3. F105-SPP-DM1	23	DM1:350
4. F105-SSNPB-DM4	10	DM4:175
5. F105-SSNPB-DM4	20	DM4:350
6. F105-SSNPP-DM4	10,5	DM4:175
7. F105-SSNPP-DM4	21	DM4:350
8. CNTO 364	10	DM1:175
9. CNTO 364	20	DM1:350
10. CNTO 365	10	DM4:175
11. CNTO 365	20	DM4:350
12. CNTO 366	12	DM4:175
13. CNTO 366	24	DM4:350

Тварини, котрим вводились ін'єкції CNTO 365 та F105-SSNPB-DM4 при 350 мкг/кг DM4, втратили більше 10% первинної ваги тіла після першого дозування, як показано на Фіг.14В. Тому після однієї ін'єкції дозування у цих двох групах було перервано. Втрата ваги тіла >10% була тимчасовою, і тварини відновлювались протягом 10 діб після припинення лікування. Групи, що залишились, отримували дозування як на 7 добу, так і 21 добу, і значних втрат ваги тіла не спостерігалось, за виключенням групи з високою дозою CNTO 364, в якій тварини втратили більше 10% ваги тіла. Значних втрат ваги в інших експериментах з використанням CNTO 364 за даною схемою дозування не спостерігалось. Як показано на Фіг.14В, одна ін'єкція CNTO 365 при високій дозі викликала повну регресію розвинutoї підшкірної карциноми товстої кишки людини HT29 у 4 із 6 тварин. CNTO 364 при високій дозі (350 мкг/кг DM1) та CNTO 365 при низькій дозі (175 мкг/кг DM4) також викликали регресію попередніх пухлин товстої кишки (2 із 6 тварин у кожній групі відповідно) або у значній мірі інгібували ріст пухлин товстої кишки HT29. Проте, CNTO 364 при низькій дозі (175 мкг/кг DM1) та CNTO 366 при обох дозах не впливали суттєво на розмір пухлин. На основі цих результатів можна припустити, що CNTO 365 має кращу потенцію та ефективність, ніж CNTO 364 та CNTO 366, при внутрішньовенному застосуванні за схемою q14dx2 у цій пухлинній ксеноімплантатній моделі.

Зрозуміло, що даний винахід може застосовуватись на практиці в інший спосіб, ніж це було конкретно показано у попередньому описі та прикладах.

У світлі вищенаведеного викладу можливі множинні модифікації та варіації даного винаходу і тому вони підпадають під обсяг формули винаходу, що додається.

НУКЛЕОТИДНА ПОСЛІДОВНІСТЬ

<110> Centocor, Inc.

<120> ANTI-INTEGRIN IMMUNOCONJUGATES, METHODS AND USES

<130> P047350EP

<140> 05852484.4

<141> 2005-11-30

<150> 60/634,445

<151> 2004-12-09

<160> 9

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Arg Tyr Thr Met His
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Glu Ala Arg Gly Ser Tyr Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
 1 5

<210> 7
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val
 1 5 10

Ser Arg Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
 20 25

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
 35 40

Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Tyr
 50 55

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
 65 70 75

59

94388

60

Leu Gln Val Asn Ile Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ala Arg Gly Ser Tyr Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

```
<210> 8
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<40-0> 8

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

```
<210> 9
<211> 1048
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 9

Met Ala Phe Pro Pro Arg Arg Arg Leu Arg Leu Gly Pro Arg Gly Leu
1 5 10 15

Pro Leu Leu Leu Ser Gly Leu Leu Leu Pro Leu Cys Arg Ala Phe Asn
 20 25 30

Leu Asp Val Asp Ser Pro Ala Glu Tyr Ser Gly Pro Glu Gly Ser Tyr
 35 40 45

Phe Gly Phe Ala Val Asp Phe Phe Val Pro Ser Ala Ser Ser Arg Met
 50 55 60

Phe Leu Leu Val Gly Ala Pro Lys Ala Asn Thr Thr Gln Pro Gly Ile
 65 70 75 80

Val Glu Gly Gly Gln Val Leu Lys Cys Asp Trp Ser Ser Thr Arg Arg
 85 90 95

Cys Gln Pro Ile Glu Phe Asp Ala Thr Gly Asn Arg Asp Tyr Ala Lys
 100 105 110

Asp Asp Pro Leu Glu Phe Lys Ser His Gln Trp Phe Gly Ala Ser Val
 115 120 125

Arg Ser Lys Gln Asp Lys Ile Leu Ala Cys Ala Pro Leu Tyr His Trp
 130 135 140

Arg Thr Glu Met Lys Gln Glu Arg Glu Pro Val Gly Thr Cys Phe Leu
 145 150 155 160

Gln Asp Gly Thr Lys Thr Val Glu Tyr Ala Pro Cys Arg Ser Gln Asp
 165 170 175

Ile Asp Ala Asp Gly Gln Gly Phe Cys Gln Gly Gly Phe Ser Ile Asp
 180 185 190

Phe Thr Lys Ala Asp Arg Val Leu Leu Gly Gly Pro Gly Ser Phe Tyr
 195 200 205

Trp Gln Gly Gln Leu Ile Ser Asp Gln Val Ala Glu Ile Val Ser Lys
 210 215 220

Tyr Asp Pro Asn Val Tyr Ser Ile Lys Tyr Asn Asn Gln Leu Ala Thr
 225 230 235 240

Arg Thr Ala Gln Ala Ile Phe Asp Asp Ser Tyr Leu Gly Tyr Ser Va
245 250 255

Ala Val Gly Asp Phe Asn Gly Asp Gly Ile Asp Asp Phe Val Ser G
260 265 270

Val Pro Arg Ala Ala Arg Thr Leu Gly Met Val Tyr Ile Tyr Asp G
275 280 285

Lys Asn Met Ser Ser Leu Tyr Asn Phe Thr Gly Glu Gln Met Ala Al
290 295 300

Tyr Phe Gly Phe Ser Val Ala Ala Thr Asp Ile Asn Gly Asp Asp Ty
305 310 315 32

Ala Asp Val Phe Ile Gly Ala Pro Leu Phe Met Asp Arg Gly Ser As
325 330 335

Gly Lys Leu Gln Glu Val Gly Gln Val Ser Val Ser Leu Gln Arg Al
340 345 350

Ser Gly Asp Phe Gln Thr Thr Lys Leu Asn Gly Phe Glu Val Phe Al
355 360 365

Arg Phe Gly Ser Ala Ile Ala Pro Leu Gly Asp Leu Asp Gln Asp Gl
370 375 380

Phe Asn Asp Ile Ala Ile Ala Ala Pro Tyr Gly Gly Glu Asp Lys Ly
385 390 395 40

Gly Ile Val Tyr Ile Phe Asn Gly Arg Ser Thr Gly Leu Asn Ala Va
405 410 415

Pro Ser Gln Ile Leu Glu Gly Gln Trp Ala Ala Arg Ser Met Pro Pr
420 425 430

Ser Phe Gly Tyr Ser Met Lys Gly Ala Thr Asp Ile Asp Lys Asn Gl
435 440 445

Tyr Pro Asp Leu Ile Val Gly Ala Phe Gly Val Asp Arg Ala Ile Le
450 455 460

Tyr Arg Ala Arg Pro Val Ile Thr Val Asn Ala Gly Leu Glu Val Tyr
465 470 475 480

Pro Ser Ile Leu Asn Gln Asp Asn Lys Thr Cys Ser Leu Pro Gly Thr
485 490 495

Ala Leu Lys Val Ser Cys Phe Asn Val Arg Phe Cys Leu Lys Ala Asp
500 505 510

Gly Lys Gly Val Leu Pro Arg Lys Leu Asn Phe Gln Val Glu Leu Leu
515 520 525

Leu Asp Lys Leu Lys Gln Lys Gly Ala Ile Arg Arg Ala Leu Phe Leu
530 535 540

Tyr Ser Arg Ser Pro Ser His Ser Lys Asn Met Thr Ile Ser Arg Gly
545 550 555 560

Gly Leu Met Gln Cys Glu Glu Leu Ile Ala Tyr Leu Arg Asp Glu Ser
565 570 575

Glu Phe Arg Asp Lys Leu Thr Pro Ile Thr Ile Phe Met Glu Tyr Arg
580 585 590

Leu Asp Tyr Arg Thr Ala Ala Asp Thr Thr Gly Leu Gln Pro Ile Leu
595 600 605

Asn Gln Phe Thr Pro Ala Asn Ile Ser Arg Gln Ala His Ile Leu Leu
610 615 620

Asp Cys Gly Glu Asp Asn Val Cys Lys Pro Lys Leu Glu Val Ser Val
625 630 635 640

Asp Ser Asp Gln Lys Lys Ile Tyr Ile Gly Asp Asp Asn Pro Leu Thr
645 650 655

Leu Ile Val Lys Ala Gln Asn Gln Gly Glu Gly Ala Tyr Glu Ala Glu
660 665 670

Leu Ile Val Ser Ile Pro Leu Gln Ala Asp Phe Ile Gly Val Val Arg
675 680 685

Asn Asn Glu Ala Leu Ala Arg Leu Ser Cys Ala Phe Lys Thr Glu Asn

67

94388

68

690

695

700

Gln Thr Arg Gln Val Val Cys Asp Leu Gly Asn Pro Met Lys Ala Gly
705 710 715 720

Thr Gln Leu Leu Ala Gly Leu Arg Phe Ser Val His Gln Gln Ser Glu
725 730 735

Met Asp Thr Ser Val Lys Phe Asp Leu Gln Ile Gln Ser Ser Asn Leu
740 745 750

Phe Asp Lys Val Ser Pro Val Val Ser His Lys Val Asp Leu Ala Val
755 760 765

Leu Ala Ala Val Glu Ile Arg Gly Val Ser Ser Pro Asp His Ile Phe
770 775 780

Leu Pro Ile Pro Asn Trp Glu His Lys Glu Asn Pro Glu Thr Glu Glu
785 790 795 800

Asp Val Gly Pro Val Val Gln His Ile Tyr Glu Leu Arg Asn Asn Gly
805 810 815

Pro Ser Ser Phe Ser Lys Ala Met Leu His Leu Gln Trp Pro Tyr Lys
820 825 830

Tyr Asn Asn Asn Thr Leu Leu Tyr Ile Leu His Tyr Asp Ile Asp Gly
835 840 845

Pro Met Asn Cys Thr Ser Asp Met Glu Ile Asn Pro Leu Arg Ile Lys
850 855 860

Ile Ser Ser Leu Gln Thr Thr Glu Lys Asn Asp Thr Val Ala Gly Gln
865 870 875 880

Gly Glu Arg Asp His Leu Ile Thr Lys Arg Asp Leu Ala Leu Ser Glu
885 890 895

Gly Asp Ile His Thr Leu Gly Cys Gly Val Ala Gln Cys Leu Lys Ile
900 905 910

Val Cys Gln Val Gly Arg Leu Asp Arg Gly Lys Ser Ala Ile Leu Tyr
915 920 925

Val Lys Ser Leu Leu Trp Thr Glu Thr Phe Met Asn Lys Glu Asn Gln
 930 935 940

Asn His Ser Tyr Ser Leu Lys Ser Ser Ala Ser Phe Asn Val Ile Glu
 945 950 955 960

Phe Pro Tyr Lys Asn Leu Pro Ile Glu Asp Ile Thr Asn Ser Thr Leu
 965 970 975

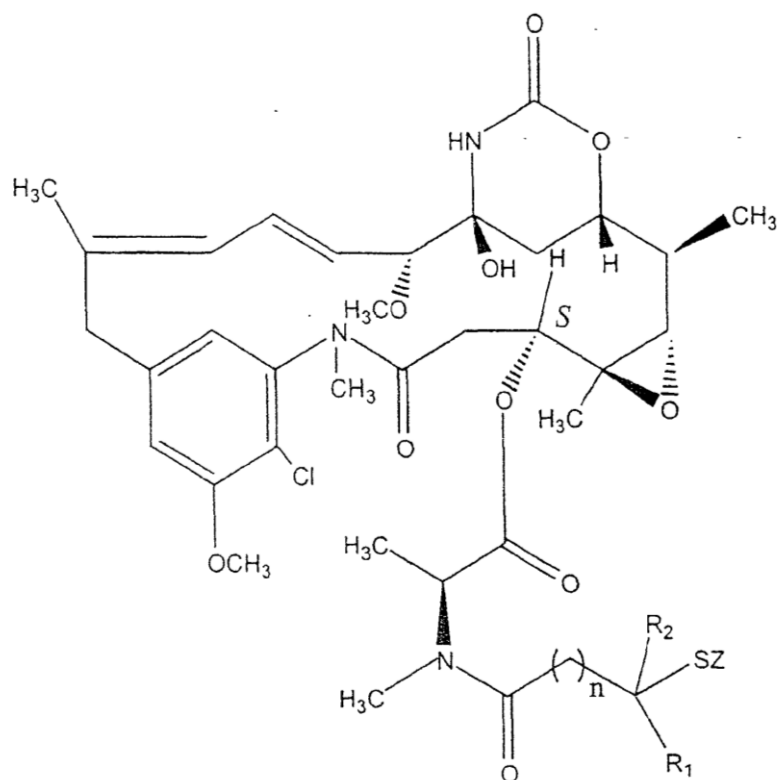
Val Thr Thr Asn Val Thr Trp Gly Ile Gln Pro Ala Pro Met Pro Val
 980 985 990

Pro Val Trp Val Ile Ile Leu Ala Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Le
 995 1000 1005

Ala Val Leu Val Phe Val Met Tyr Arg Met Gly Phe Phe Lys Arg
 1010 1015 1020

Val Arg Pro Pro Gln Glu Glu Gln Glu Arg Glu Gln Leu Gln Pro
 1025 1030 1035

His Glu Asn Gly Glu Gly Asn Ser Glu Thr
 1040 1045



$n \geq 1$

$R_1, R_2, R_3 = H, Me, C_2H_5$, лінійний алкіл або алкеніл, що має від 1 до 10 вуглецевих атомів, розгалужений або циклічний алкіл чи алкеніл, що має від 3 до 10 вуглецевих атомів, феніл, заміщений феніл, гетероциклічний ароматичний, гетероциклоалкільний радикал

$Z = H, SR_3$

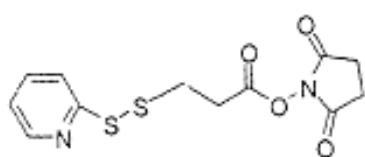
DM1 $n = 1, R_1, R_2 = H, Z = H$

DM3 $n = 2, R_1 = H, R_2 = Me, Z = H$

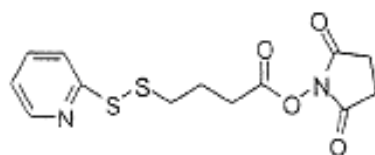
DM4 $n = 2, R_1, R_2 = Me, Z = H$

Фіг.1

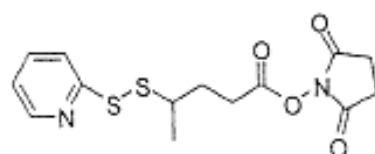
S P D P



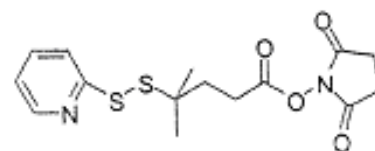
S P D B



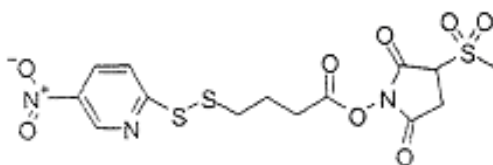
S P P



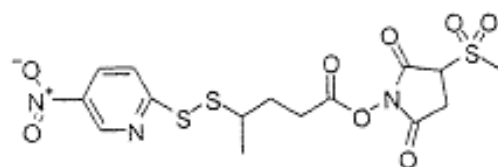
S M N P



S S N P B



S S N P P



S M C C

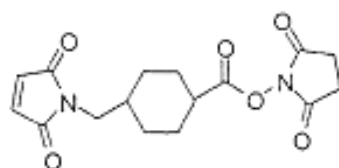
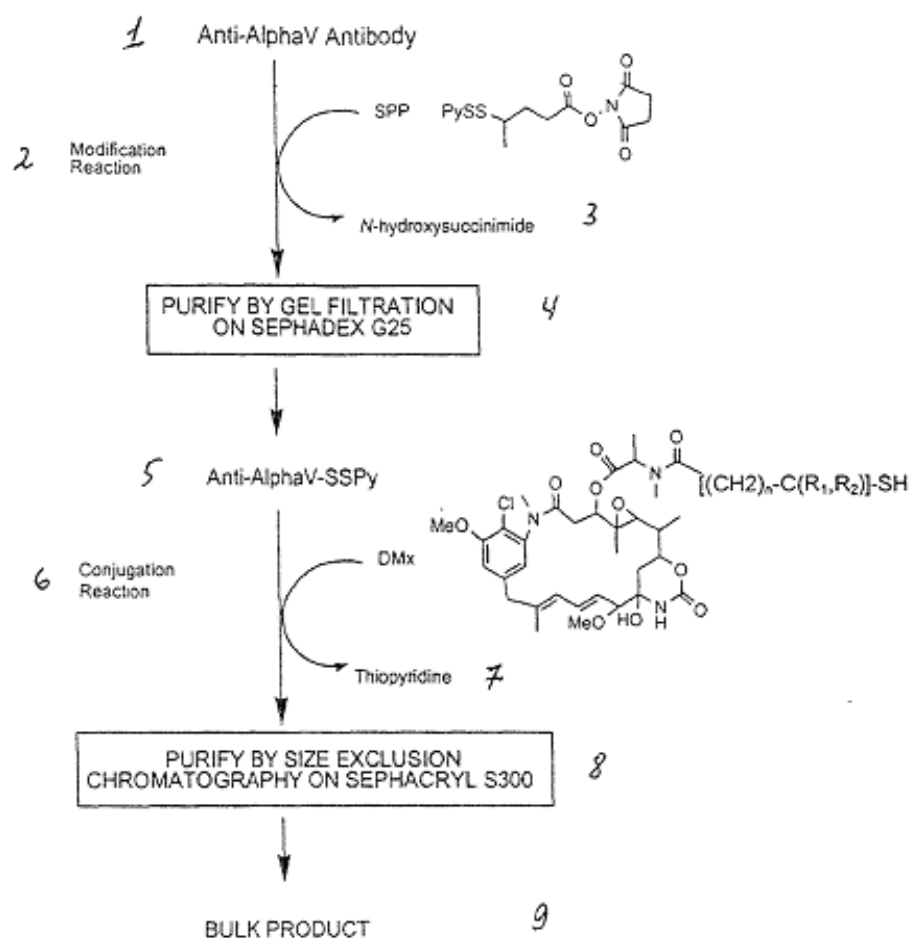
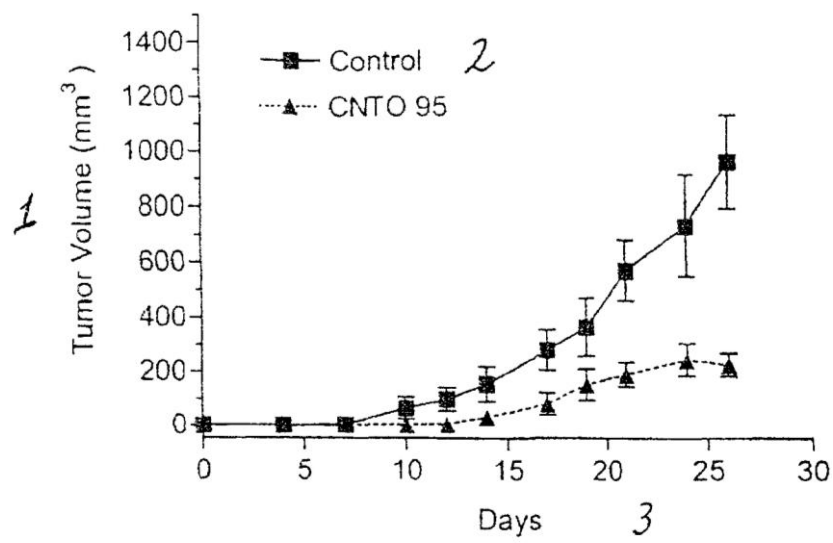


Fig.2



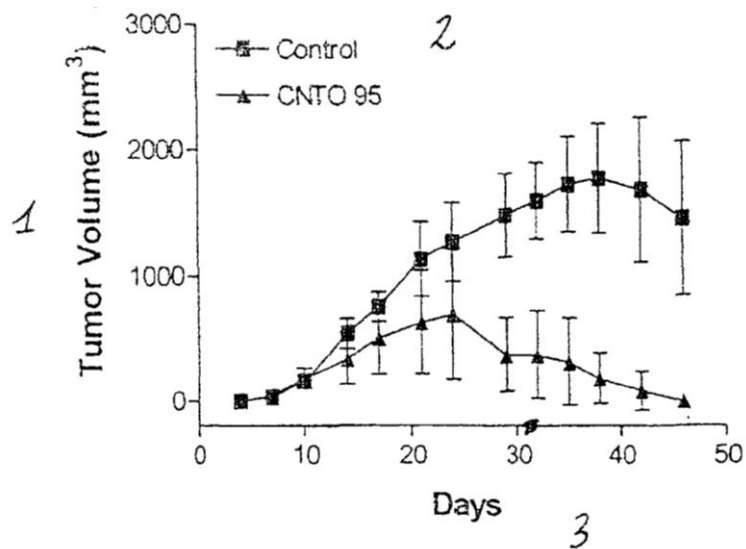
1 – антитіло проти альфа V; 2 – реакція модифікації; 3 – N-гідроксисукцинімід; 4 – очищення за методом гель-фільтраційної хроматографії на Сефадексі G25; 5 – анти-альфаV-SSPy; 6 – реакція кон'югації; 7 – тіопіридин; 8 – очищення за методом витиснювальної хроматографії на Сефакрилі S300; 9 – об'ємний продукт

Фіг.3



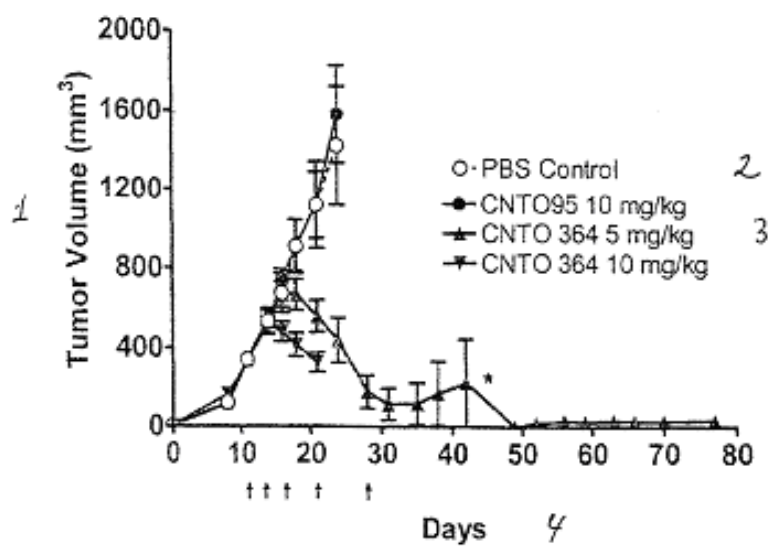
1 – об'єм пухлини (mm^3), 2 – контрольний. 3 – діб

Фіг.4



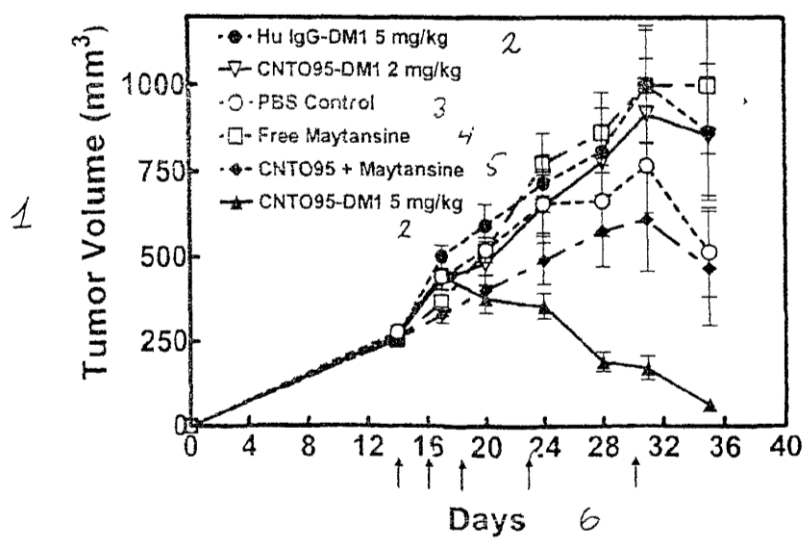
1 – об'єм пухлини (mm^3), 2 – контрольний. 3 –діб

Фіг.5



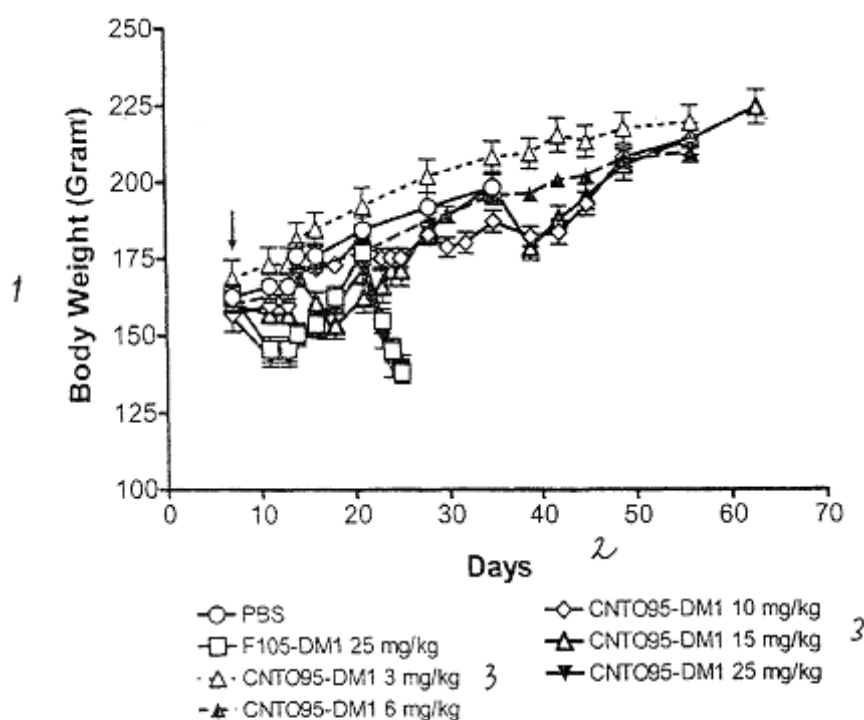
1 – об'єм пухлини (мм³), 2 – контрольний, 3 – мг/кг, 4 – діб

Fig.6

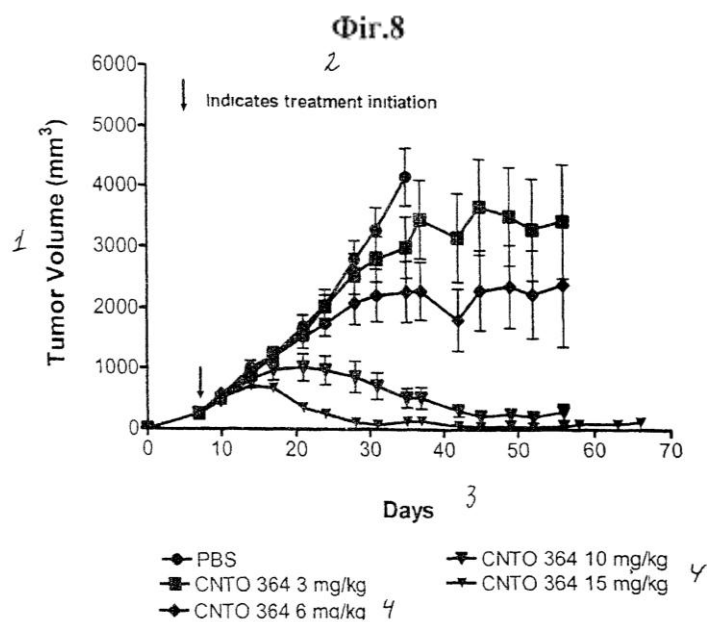


1 – об'єм пухлини (мм³), 2 – мг/кг, 3 – контрольний, 4 – вільний маутансин, 5 – маутансин, 6 – діб

Fig.7

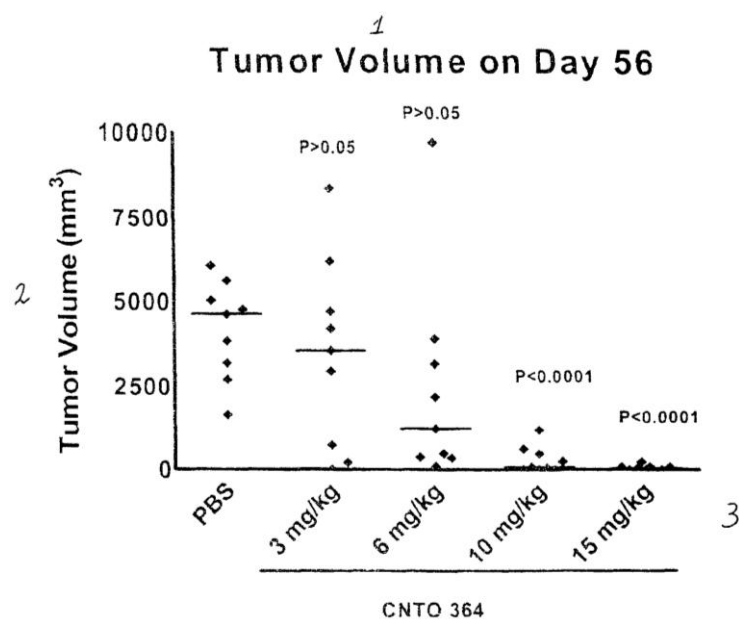


1 – вага тіла (г), 2 – діб; 3 – мг/кг



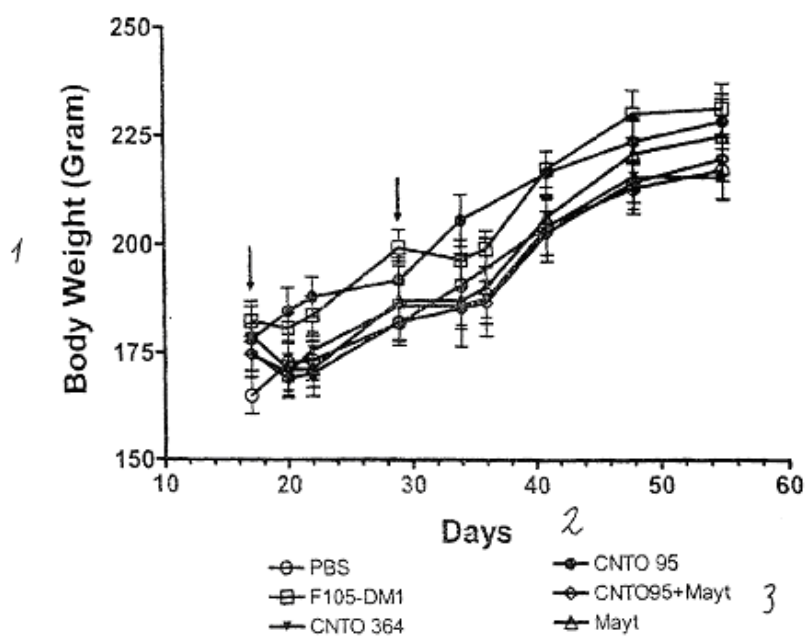
1 – об'єм пухлини (мм³), 2 - вказує на початок лікування, 3 – діб, 4 – мг/кг

Фиг.9



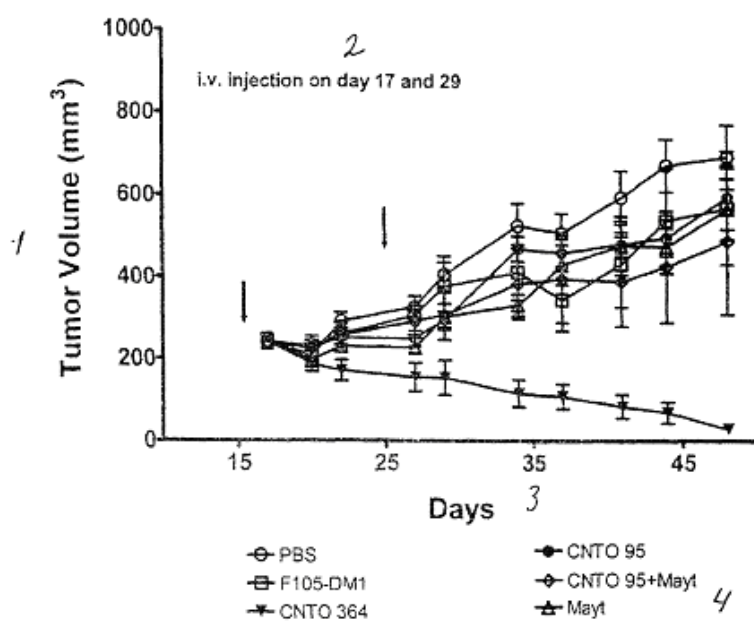
1 – об'єм пухлини на 56 добу, 2 – об'єм пухлини (мм³), 3 – мг/кг

Fig.10

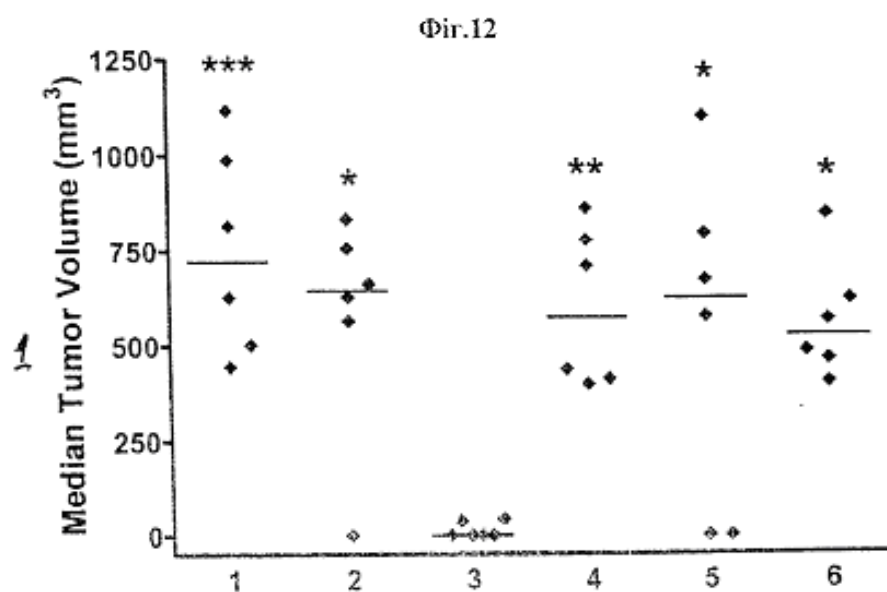


1 – вага тіла (г), 2 – діб, 3 – маутансин

Fig.11

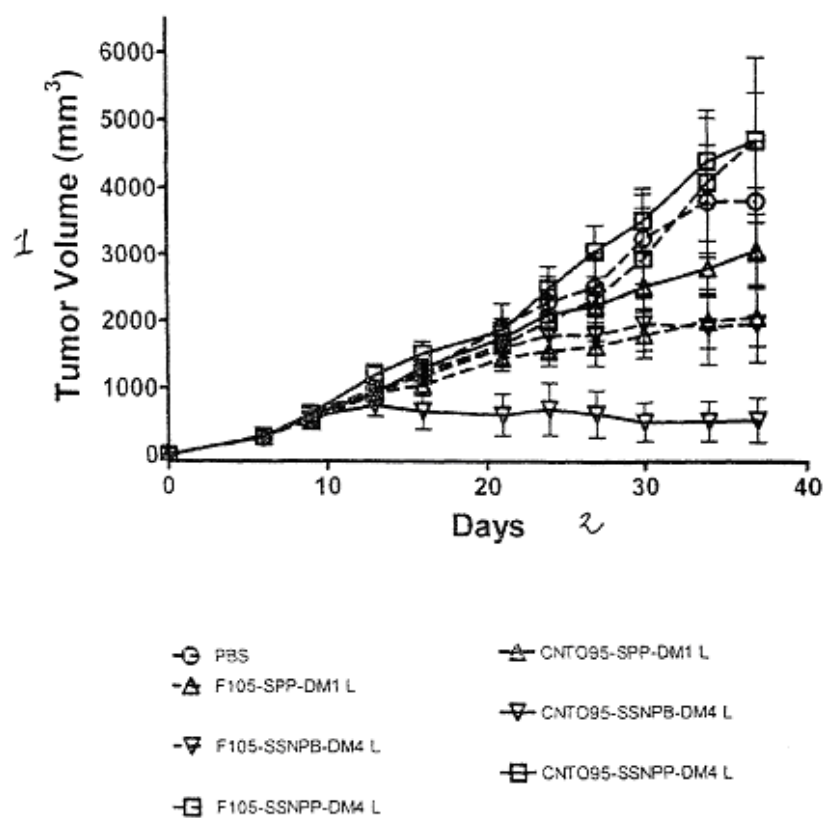


1 – об'єм пухлини (мм³), 2 – внутрішньовенна ін'єкція на 17 та 29 добу, 3 – діб, 4 – маутансин



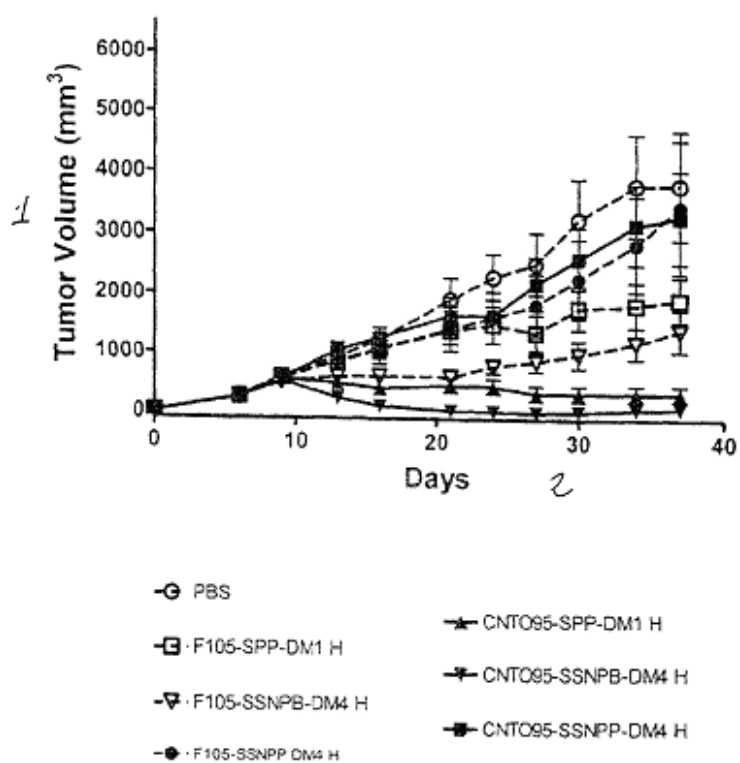
1 – медіанний об'єм пухлини (мм³)

Fig.13



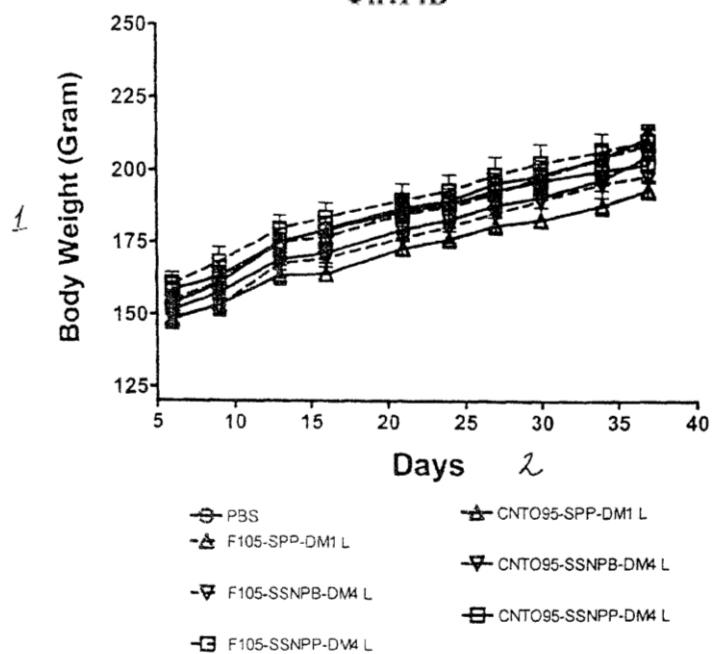
1 – об'єм пухлини (мм³), 2 – дні

Fig.14A



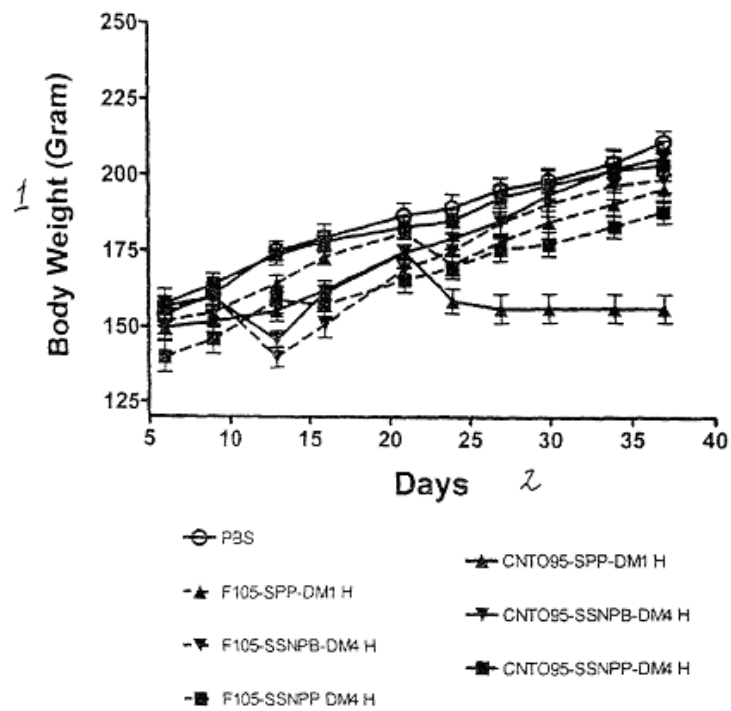
1 – об'єм пухлини (мм³), 2 – діб

Fig.14B



1 – вага тіла (г), 2 – діб

Fig.15A



1 – вага тіла (г), 2 – діб

Fig.15B