



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **118251** (13) **C2**

(51) МПК (2018.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

C12N 5/071 (2010.01)

C07K 19/00

C07K 16/24 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

<p>(21) Номер заявки: а 2015 02387</p> <p>(22) Дата подання заявки: 23.08.2013</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 26.12.2018</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/692,448</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 23.08.2012</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 25.09.2015, Бюл.№ 18</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 26.12.2018, Бюл.№ 24</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2013/056504, 23.08.2013</p>	<p>(72) Винахідник(и): Моррісон Роберт Кендалл (GB/US), Ан Зілі (US), Моррісон Карен Джейн Мейрік (GB/US), Снайдер Джош (US), Джиа Сяо-чі (US)</p> <p>(73) Власник(и): ЕЙДЖЕНСІС, ІНК., 1800 Stewart Street, Santa Monica, CA 90404, United States of America (US), СІЕТЛ ДЖЕНЕТИКС, ІНК., 2182 30th Drive S. E., Bothell, WA 98021, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: Олішевич Людмила Анатоліївна, реєстр. №194</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: US 7973140 B2, 05.06.2011. US 20090252728 A1, 08.10.2009. US 20050238649 A1, 27.10.2005. JUNUTULA J.R. et al. Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index. Nature biotechnology, 2008, Vol. 26, №8, P. 925 - 932 AFAR D. et al. Preclinical validation of anti-TMEFF2-auristatin e-conjugated antibodies in the treatment of prostate cancer. Molecular cancer therapeutics, 2004, Vol. 3, №8, P. 921 - 932</p>
--	--

(54) КОН'ЮГАТ АНТИТІЛО-ЛІКАРСЬКИЙ ЗАСІБ (ADC), ЯКИЙ ЗВ'ЯЗУЄТЬСЯ З БІЛКОМ 158P1D7

(57) Реферат:

Винахід належить до кон'югата антитіло-лікарський засіб (ADC), який зв'язується з білком 158P1D7, анти-158P1D7 антитіла, вектора, що його кодує та клітини-хазяїна, а також до застосування ADC для лікування раку сечового міхура.

UA 118251 C2

ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

У цій заявці заявлено пріоритет попередньої заявки США №61/692,448, поданої 23 серпня 2012 р., зміст якої повністю включений до цієї заявки шляхом посилання.

ЗАЯВА ПРО ПРАВА НА ВИНАХОДИ, СТВОРЕНІ ВІДПОВІДНО ДО СПОНСОВАНОГО НА ФЕДЕРАЛЬНОМУ РІВНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Немає.

ПОДАННЯ ПЕРЕЛІКУ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ У ТЕКСТОВОМУ ФАЙЛІ у ФОРМАТІ ASCII

Зміст такого подання у текстовому файлі у форматі ASCII включений до цієї заявки повністю шляхом посилання: машино-зчитувана форма (CRF) переліку послідовностей (назва файлу: 511582005088SeqList.txt, дата запису: 21 серпня 2013 р., розмір: 40154 байтів).

ГАЛУЗЬ ВИНАХОДУ

Описаний тут винахід стосується антитіл, зв'язувальних фрагментів та кон'югатів антитіло-лікарський засіб (ADC), які зв'язують білки, що мають назву 158P1D7. Винахід також стосується прогностичних, профілактичних і терапевтичних методів і композицій, придатних для лікування раку, що експресує 158P1D7.

ОБҐРУНТУВАННЯ ВИНАХОДУ

Рак є другою основною причиною смерті людей поряд із коронарними хворобами. В усьому світі мільйони людей вмирають від раку щороку. Лише у Сполучених Штатах, за повідомленнями Американського співтовариства раку, рак спричиняє смерть значно більше за півмільйона людей щороку, причому щороку діагностують понад 1,2 мільйона нових випадків. У той час як смертність від захворювань серця значно знижується, смертність від раку звичайно зростає. Прогнозують, що на початку наступного століття рак стане основною причиною смертності.

В усьому світі виділяють декілька видів раку як основних вбивць. Зокрема, карциноми легенів, передміхурової залози, молочної залози, товстої кишки, підшлункової залози, яєчників та сечового міхура є основними причинами смертності від раку. Ці і майже всі інші види карциноми мають спільну летальну ознаку. За дуже незначними винятками, метастатична пухлина карциноми є невідворотною. Крім того, навіть для тих ракових пацієнтів, які спочатку долають первинний рак, звичайний досвід показує, що їхнє життя різко змінюється. Багато ракових пацієнтів переживають сильну тривогу, спричинену усвідомленням потенційного рецидиву або неефективності лікування. Багато ракових пацієнтів переживають фізичне виснаження після лікування. Крім того, у багатьох ракових пацієнтів відбуваються рецидиви.

У світі рак передміхурової залози є четвертим найпоширенішим видом раку серед чоловіків. У Північній Америці та Північній Європі він є безумовно найпоширенішим видом раку серед чоловіків і другою основною причиною смертності від раку серед чоловіків. Лише у США значно більше ніж 30 000 чоловіків щорічно вмирають від цієї хвороби – другої лише після раку легенів. Незважаючи на величину цих цифр, все ще не існує жодного ефективного лікування метастатичного раку передміхурової залози. Хірургічна простатектомія, променева терапія, гормон-пригнічувальна терапія, хірургічна кастрація та хіміотерапія продовжують бути основними способами лікування. На жаль, ці способи лікування є неефективними для багатьох і часто пов'язані з небажаними наслідками.

З точки зору діагностики, відсутність маркера пухлини передміхурової залози, який міг би чітко виявити початкові, локалізовані пухлини, залишається значним обмеженням при діагностиці та керуванні перебігом цього захворювання. Хоча аналіз специфічного антигену простати (PSA) в сироватці є дуже корисним інструментом, небезпідставно вважають, що його специфічності та універсальності бракує декількох важливих аспектів.

Прогрес у визначенні додаткових специфічних маркерів раку простати було покращено поколінням ксенотрансплантатів раку простати, які можуть відтворити різні стадії захворювання у мишей. Ксенотрансплантати LAPC (Лос-Анджелеського раку простати) є ксенотрансплантатами раку простати, які пережили перенесення мишам із тяжким комбінованим імунodefіцитом (TKID) та проявили здатність імітувати перехід від андрогенової залежності до андрогенової незалежності (Klein et al., 1997, Nat. Med. 3:402). Нещодавно виявленими маркерами раку простати є PCTA-1 (Su et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7252), специфічний до простати мембранний антиген (PSMA) (Pinto et al., Clin Cancer Res 1996 Sep 2 (9): 1445-51), STEAP (Hubert, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Dec 7; 96(25): 14523-8) та антиген стовбурових клітин простати (PSCA) (Reiter et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1735).

Хоча виявлені раніше маркери, такі як PSA, полегшували спроби діагностування та лікування раку простати, існує потреба у виявленні додаткових маркерів і терапевтичних мішеней для раку простати та споріднених видів раку для подальшого покращення

діагностування та лікування. У 2000 р. в США мали місце приблизно 130 200 випадків колоректального раку, у тому числі 93 800 випадків раку товстої кишки та 36 400 раку прямої кишки.

Колоректальний рак є третім найпоширенішим видом раку серед чоловіків та жінок. Коефіцієнт захворюваності значно знизився впродовж 1992-1996 років (-2,1 % на рік). Дослідження наводять на думку, що таке зниження було наслідком підвищеного скринінгу та видалення поліпів, запобігання перетворенню поліпів на інвазивний рак. У 2000 р. мало місце близько 56 300 смертей (47 700 від раку товстої кишки, 8600 від раку прямої кишки), що становило близько 11 % всіх смертей від раку в США.

Нині хірургічна операція є найпоширенішою формою лікування колоректального раку, а для раку, що не поширився, вона часто є радикальною. Хіміотерапію або хімію плюс опромінювання проводять перед або після хірургічної операції у більшості пацієнтів, у яких рак глибоко проник у стінки внутрішніх органів або поширився на лімфовузли. Іноді є потреба в перманентній колостомії (створенні черевного отвору для видалення виділень організму) при раку товстої кишки, а в поодиноких випадках вона є необхідною при раку прямої кишки. Продовжує існувати потреба в ефективних способах діагностування та лікування колоректального раку.

З усіх нових випадків раку в США рак сечового міхура становить приблизно 5 % серед чоловіків (п'яте найпоширеніше новоутворення) і 3 % серед жінок (восьме найпоширеніше новоутворення). Захворюваність збільшується повільно, паралельно до збільшення населення похилого віку. У 1998 р. було близько 54 500 випадків, у тому числі 39 500 серед чоловіків і 15 000 серед жінок. Стандартизований за віком коефіцієнт захворюваності у США становить 32 на 100 000 у чоловіків та вісім на 100 000 у жінок. Історичне співвідношення чоловіків до жінок 3:1 може знижуватись відносно курців-жінок. У 1998 р. мало місце приблизно 11 000 смертей від раку сечового міхура (7800 серед чоловіків і 3900 серед жінок). Захворюваність на рак сечового міхура та смертність від цієї хвороби сильно підвищуються з віком, а зі старінням населення це буде проблемою, що зростає.

Більшість випадків раку сечового міхура рецидивують у сечовому міхурі. Стимування розвитку раку сечового міхура здійснюють за допомогою комбінації трансуретальної резекції сечового міхура (TUR) та внутрішньопухирцевої хіміотерапії або імунотерапії. Множинний та рецидивний характер раку сечового міхура свідчить про обмеження застосування TUR. Більшість випадків раку з проростанням у м'язовий шар не піддаються лікуванню лише за допомогою TUR. Радикальна цистектомія та відведення сечі є найбільш ефективними способами знищення раку, але вони мають безперечний вплив на сечову та сексуальну функції. Продовжує існувати значна потреба у способах лікування, що є сприятливими для пацієнтів із раком сечового міхура.

У 2000 році було приблизно 164 100 нових випадків раку легенів та бронхіального раку, що становило 14 % від всіх діагнозів раку у США. Коефіцієнт захворюваності на рак легенів та бронхіальний рак значно знижується у чоловіків, з 86,5 на 100 000 у 1984 році до 70,0 у 1996 році. У 1990-х роках темпи зростання захворюваності серед жінок почали знижуватись. У 1996 році коефіцієнт захворюваності у жінок становив 42,3 на 100 000.

Рак легенів і бронхіальний рак спричинили приблизно 156 900 смертей у 2000 р., що становило 28 % від усіх смертей від раку. Впродовж 1992-1996 років смертність від раку легенів значно знизилась серед чоловіків (-1,7 % на рік), тоді як темпи захворюваності серед жінок все ще значно збільшувались (0,9 % на рік). З 1987 року більше жінок щороку вмирали від раку легенів, аніж від раку молочної залози, який, за понад 40 років, був основною причиною смертності від раку серед жінок. Зниження захворюваності на рак легенів та коефіцієнту смертності найімовірніше було наслідком зниження рівня тютюнопаління за попередні 30 років; однак, зниження кількості курців серед жінок є більшим, ніж у чоловіків. Викликає стурбованість той факт, що хоча зниження вживання тютюну дорослими уповільнилося, вживання тютюну серед молоді знову збільшується.

Варіанти лікування раку легенів та бронхіального раку визначаються типом і стадією раку та включають хірургічну операцію, променеву терапію та хіміотерапію. Для багатьох випадках локалізованого раку хірургічна операція звичайно є видом лікування, якому надають перевагу. Через те, що зазвичай хвороба вже розповсюдилася до моменту її виявлення, променева терапія та хіміотерапія часто є необхідними у поєднанні з хірургічною операцією. Хіміотерапія окремо або у поєднанні з опромінюванням є видом лікування, якому надають перевагу, проти дрібноклітинного раку легенів; за такої схеми великий відсоток пацієнтів переживають ремісію, яка у деяких випадках триває довго. Однак, існує постійна потреба в ефективному лікуванні та підходах до діагностування раку легенів і бронхіального раку.

Приблизно 182 800 нових випадків інвазивного раку молочної залози очікували серед жінок у США впродовж 2000 р. Крім того, близько 1400 нових випадків раку молочної залози очікували діагностувати у чоловіків у 2000 р. Після зростання близько на 4 % щороку у 1980-х, захворюваність на рак молочної залози у жінок вирівнялася у 1990-х до близько 110,6 випадків на 100 000.

Лише у США було приблизно 41200 смертей (40800 серед жінок, 400 серед чоловіків) у 2000 році від раку молочної залози. Рак молочної залози займає друге місце серед смертей від раку у жінок. За найостаннішими даними, рівень смертності значно знизився впродовж 1992-1996 років з найбільшим зниженням серед молодих жінок, світлошкірих і темношкірих. Це зниження, ймовірно, було наслідком більш раннього виявлення та покращеного лікування.

Враховуючи медичні обставини та преференції пацієнта, лікування раку молочної залози може включати лампектомію (місцеве видалення пухлини) та видалення лімфовузлів під пахвами; мастектомію (хірургічне видалення грудей) та видалення лімфовузлів під пахвами; променеву терапію; хіміотерапію; або гормональну терапію. Часто використовують два або більше методи у поєднанні. Численні дослідження показали, що для захворювання на ранній стадії показники тривалої виживаності після лампектомії плюс радіотерапії є подібними до показників виживаності після модифікованої радикальної мастектомії. Значний прогрес в технічних прийомах з відновлення забезпечують декілька варіантів відновлення грудей після мастектомії. Нещодавно таке відновлення було проведено одночасно з мастектомією.

Місцеве видалення протокової карциноми *in situ* (DCIS) з необхідними кількостями довколишньої здорової тканини грудей може запобігти місцевому рецидиву DCIS. Опромінювання молочної залози та/або тамоксифен можуть знизити ймовірність виникнення DCIS у решті тканини молочної залози. Це є важливим, оскільки DCIS, якщо її залишити без лікування, може перетворитися на інвазивний рак молочної залози. Між тим, існують серйозні побічні ефекти або ускладнення від такого лікування. У зв'язку з цим, існує потреба в ефективному лікуванні раку молочної залози.

У 2000 році було близько 23 100 нових випадків раку яєчників у США. Він є причиною 4 % всіх видів раку серед жінок і займає друге місце з-поміж видів гінекологічного раку. За період 1992-1996 років показники захворюваності на рак яєчників значно знизились. Внаслідок раку яєчників у 2000 році мало місце близько 14 000 смертей. Рак яєчників спричиняє більше смертей, ніж будь-який інший вид раку жіночої репродуктивної системи.

Хірургічна операція, радіотерапія і хіміотерапія є варіантами лікування раку яєчників. Хірургічна операція звичайно включає видалення одного або обох яєчників, фаллопіївих труб (сальпінгооварієктомію) та матки (гістеректомію). У деяких випадках дуже ранніх пухлин видаляють лише уражений яєчник, особливо у молодих жінок, які бажають мати дітей. При задовній хворобі намагаються видалити всю хворобу в черевній порожнині для покращення ефекту від хіміотерапії. Існує постійна важлива потреба у варіантах ефективного лікування раку яєчників.

У 2000 році було близько 28 300 нових випадків раку підшлункової залози в США. За останні 20 років показники раку підшлункової залози знизилися у чоловіків. Серед жінок показники залишалися приблизно постійними, але можуть починати знижуватись. Рак підшлункової залози був причиною близько 28 200 смертей у 2000 році в США. За останні 20 років було незначне, але важливе зниження показників смертності серед чоловіків (близько - 0,9 % щороку), тоді як у жінок ці показники трохи підвищилися.

Хірургічна операція, радіотерапія та хіміотерапія є варіантами лікування раку підшлункової залози. Ці варіанти лікування можуть подовжувати виживаність та/або полегшувати симптоми у багатьох пацієнтів, але навряд чи можуть вилікувати багатьох. Існує значна потреба у додаткових терапевтичних і діагностичних методах проти раку. До них відноситься застосування антитіл, вакцин і малих молекул як методів лікування. Крім того, існує також потреба у застосуванні цих методів як засобів для досліджень з метою діагностування, виявлення, контролю та розвитку рівня науки і техніки в усіх сферах лікування та дослідження раку.

Нині усвідомлюють терапевтичну корисність моноклональних антитіл (mAb) (G. Kohler and C. Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975)). Нещодавно моноклональні антитіла було схвалено як терапію при трансплантуванні, лікуванні раку, інфекційних захворювань, серцево-судинних захворювань та запалень. Різні ізотипи мають різні ефекторні функції. Такі відмінності у функціонуванні відображені у відмінних тривимірних структурах для різноманітних імуноглобулінових ізотипів (P.M. Alzari et al., *Annual Rev. Immunol.*, 6:555-580 (1988)).

Оскільки миші є зручними для імунізації та визнають більшість людських антигенів як чужорідні, моноклональні антитіла проти людських мішеней з терапевтичним потенціалом

звичайно мали мишаче походження. Однак, мишачі моноклональні антитіла мають властиві їм недоліки як терапевтичні засоби для людини. Вони потребують частішого дозування, оскільки моноклональні антитіла мають більш короткий період напіввиведення, що циркулює, у людей, аніж людські антитіла. Що є більш серйозним, повторне введення мишачих антитіл до людської імунної системи спричиняє реакцію людської імунної системи шляхом розпізнавання мишачого білка як чужорідного та створення відповіді людського протимишачого антитіла (НАМА). Така НАМА-відповідь може спричинити алергічну реакцію та швидке виведення мишачого антитіла із системи, зводячи лікування мишачим антитілом нанівець. Для уникнення таких ефектів були вчинені спроби створення людських імунних систем у мишей.

Під час перших спроб сподівалися створити трансгенних мишей, здатних реагувати на антигени за допомогою атитіл, що мають людські послідовності (див. Bruggemann et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86:6709-6713 (1989)), але вони були обмежені кількістю ДНК, яку можна було стійко підтримувати доступними носіями для клонування. Використання клонувальних векторів штучних хромосом дріжджів (YAC) проклало шлях введенню великих фрагментів зародкових шляхів локусу Ig людини трансгенним ссавцям. По суті, більшість людських генів ділянок V, D і J, розташованих на такій самій відстані, як у людському геномі, та людські константні ділянки було введено мишам із застосуванням YAC. Одна така лінія трансгенних мишей відома як миші XenoMouse® і є доступною в продажу у компанії Amgen Fremont, Inc. (Фремонт, штат Каліфорнія).

СУТЬ ВИНАХОДУ

Цей винахід забезпечує антитіла, зв'язувальні фрагменти та кон'югати антитіло-лікарський засіб (ADC), що зв'язуються з білками 158P1D7 та поліпептидними фрагментами білків 158P1D7. У деяких втіленнях винахід стосується повністю людських антитіл, кон'югованих з терапевтичним засобом. У деяких втіленнях є застереження, що вся нуклеотидна послідовність за Фігурою 3 не кодована та/або вся амінокислотна послідовність за Фігурою 2 є необробленою. У деяких втіленнях вся нуклеотидна послідовність за Фігурою 3 є кодовою та/або вся амінокислотна послідовність за Фігурою 2 є обробленою, кожна з яких перебуває у відповідній стандартній лікарській формі для людини.

Винахід також забезпечує різні імуногенні або терапевтичні композиції, такі як кон'югати антитіло-лікарський засіб, та стратегії лікування видів раку, що експресують 158P1D7, таких як види раку тканин, перелік яких наведено у Таблиці I, особливо раку сечового міхура.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

Фігура 1. кДНК та амінокислотна послідовність 158P1D7 показана на Фігурі 1. Ініціувальний метіонін підкреслений. Відкрита рамка читування проходить від нуклеїнової кислоти 23-2548, що включає термінувальний кодон.

Фігура 2. Послідовності нуклеїнової кислоти та амінокислотні послідовності антитіл до 158P1D7. На Фігурі 2(A) показана кДНК та амінокислотна послідовність важкого ланцюга Ha15-10ac12. Двома лініями підкреслена варіабельна ділянка важкого ланцюга, однією лінією підкреслена константна ділянка важкого ланцюга IgG2 людини. На Фігурі 2(B) показана кДНК та амінокислотна послідовність легкого ланцюга Ha15-10ac12. Двома лініями підкреслена варіабельна ділянка легкого ланцюга, однією лінією підкреслена константна каппа-ділянка людини.

Фігура 3. Амінокислотні послідовності антитіл до 158P1D7. На Фігурі 3(A) показана амінокислотна послідовність важкого ланцюга Ha15-10ac12. Двома лініями підкреслена варіабельна ділянка важкого ланцюга і однією лінією підкреслена константна ділянка IgG2 людини. На Фігурі 3(B) показана амінокислотна послідовність легкого ланцюга Ha15-10ac12. Двома лініями підкреслена варіабельна ділянка легкого ланцюга і однією лінією підкреслена константна каппа-ділянка людини.

Фігура 4. Вирівнювання антитіл Ha15-10ac12 до зародкової лінії Ig людини. На Фігурі 4(A) показане вирівнювання важкого ланцюга Ha15-10ac12 (SEQ ID NO:3, положення 1-360; SEQ ID NO:4, положення 1-120) до зародкової лінії Ig людини. На Фігурі 4(B) показане вирівнювання легкого ланцюга Ha15-10ac12 (SEQ ID NO:5, положення 1-240; SEQ ID NO:6, положення 1-80) до зародкової лінії Ig людини IGKV2D-28*01 (SEQ ID NO:10).

Фігура 5. Ефективність Ha15-10ac12vcMMAE на встановленій підшкірно моделі ксенотрансплантата раку сечового міхура людини AG-B7 у мишей із TKID.

Фігура 6. Ефективність Ha15-10ac12vcMMAE на встановленому підшкірно раку сечового міхура людини RT-4-XCL, імплантованому мишам із TKID.

Фігура 7. Ефективність Ha15-10ac12vcMMAE на встановленому підшкірно раку легенів людини NCI-H322M-XCL, імплантованому мишам із TKID.

Фігура 8. Ефективність Ha15-10ac12vcMMAE на встановленій підшкірно моделі ксенотрансплантата раку сечового міхура людини AG-B7 у мишей із ТКІД.

Фігура 9. Виявлення білка 158P1D7 у зразках ракового пацієнта за допомогою ІГХ (імуногістохімії). На Фігурах 9(A) та 9(B) показані зразки раку сечового міхура. На Фігурах 9(C) та 9(D) показані зразки раку молочної залози. На Фігурах 9(E) та 9(F) показані зразки раку легенів. На Фігурах 9(G) та 9(H) показані зразки гліобластоми.

Фігура 10. Ефективність Ha15-10ac12vcMMAE на встановленій підшкірно моделі ксенотрансплантата раку сечового міхура людини SW780 у мишей із ТКІД.

Фігура 11. Ефективність в умовах *in vitro* Ha15-10ac12vcMMAE в аналізі цитотоксичності CNP-212 порівняно з моноклональним антитілом M15-68(2)18 (які також називають 68(18)1.1).

Фігура 12. Ефективність Ha15-10ac12vcMMAE на введеній підшкірно моделі ксенотрансплантата одержаного від пацієнта раку сечового міхура людини AG-B8 у мишей із ТКІД.

Фігура 13. Крива насичення для Ha15-10ac12vcMMAE.

Фігура 14. Гістограма, на якій показана середня інтенсивність флуоресцентності (MFI) Ha15-10ac12vcMMAE.

Фігура 15. Оцінювання цитотоксичності в умовах *in vitro* Ha15-10ac12vcMMAE на Фігурі 15(A) на клітинах CNP-212 та на Фігурі 15(B) на клітинах IGROV-1.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Зміст розділів

I.) Визначення.

II.) Антитіла до 158P1D7.

III.) Кон'югати антитіло-лікарський засіб у загальних рисах.

III(A). Мейтанзиноїди.

III(B). Ауристатини і долостатини.

III(C). Каліхеаміцин.

III(D). Інші цитотоксичні засоби.

IV.) Кон'югати антитіло-лікарський засіб, які зв'язують 158P1D7.

V.) Лінкерні одиниці.

VI.) Розтягувальна одиниця.

VII.) Амінокислотна одиниця.

VIII.) Спейсерна одиниця.

IX.) Одиниця лікарського засобу.

X.) Завантаження лікарським засобом.

XI.) Способи визначення цитотоксичного ефекту кон'югатів антитіло-лікарський засіб.

XII.) Лікування раку, що експресує 158P1D7.

XIII.) 158P1D7 як мішень для терапії із застосуванням антитіл.

XIV.) Коктейлі кон'югату антитіло-лікарський засіб до 158P1D7.

XV.) Комбінована терапія.

XVI.) Набори/готові вироби.

I.) Визначення

Якщо не вказано інакше, передбачають, що всі технічні терміни, умовні позначення та інші наукові терміни або термінологія, використані у цьому описі, мають значення, які звичайно розуміють спеціалісти у галузі, до якої належить цей винахід. У деяких випадках терміни зі звичайно зрозумілими значеннями визначені у цьому описі для ясності та/або зручності, і включення таких визначень не обов'язково необхідно тлумачити як таке, що становить істотну відмінність від того, що звичайно розуміють у цій галузі. Багато методів і процедур, описаних у цьому описі або на які у ньому є посилання, є добре зрозумілими, і спеціалісти у цій галузі звичайно застосовують їх з використанням традиційної методології, як, наприклад, широко застосовані методології молекулярного клонування, описані Сембрук та ін. (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd. edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Якщо є доречним, процедури, пов'язані з використанням наявних у продажу наборів та реактивів, звичайно проводять відповідно до інструкцій та/або параметрів, визначених виробником, якщо не вказано інакше.

При використанні у цьому описі торгового найменування, посилання на таке торгове найменування також стосується композиції продукту, ліків-джереників та активного фармацевтичного інгредієнта або інгредієнтів продукту під торговим найменуванням, якщо в контексті не зазначено інакше.

Терміни "розповсюджений рак", "місцево розповсюджений рак", "розповсюджена хвороба" та "місцево розповсюджена хвороба" означають види раку, які розповсюдилися крізь капсулу

відповідної тканини, і розуміють, що вони включають хворобу на стадії C за системою Американської урологічної асоціації (AUA), хворобу на стадії C1-C2 за системою Вітмора-Джюета (Whitmore-Jewett) та хворобу на стадії T3-T4 і N+ за системою TNM (пухлина, вузол, метастаз). Загалом, хірургічне втручання не рекомендують пацієнтам з місцево розповсюдженою хворобою, і ці пацієнти мають істотно менш сприятливі наслідки порівняно з пацієнтами, які мають клінічно локалізований (обмежений органом) рак.

Скорочення "AFP" стосується диметилвалін-валін-долаізолеїн-долапроїн-фенілаланін-п-фенілендіаміну (див. Формулу XVI нижче).

Скорочення "MMAE" стосується монометилауристатину E (див. Формулу XI нижче).

Скорочення "АЕВ" стосується складного ефіру, одержаного шляхом введення у реакцію ауристатину E з параацетилбензойною кислотою (див. Формулу XX нижче).

Скорочення "АЕВВ" стосується складного ефіру, одержаного шляхом введення у реакцію ауристатину E з бензоїлвалеріяною кислотою (див. Формулу XXI нижче).

Скорочення "MMAF" стосується довалін-валін-долаізолеїн-долапроїн-фенілаланіну (див. Формулу XIV нижче).

Якщо не вказано інакше, термін "алкіл" стосується насиченого вуглеводню з прямим або розгалуженим ланцюгом, що має від близько 1 до близько 20 атомів вуглецю (та всіх комбінацій та субкомбінацій меж і конкретної кількості атомів вуглецю в них), причому перевагу надають наявності від близько 1 до близько 8 атомів вуглецю. Прикладами алкільних груп є метил, етил, н-пропіл, ізо-пропіл, н-бутил, ізо-бутил, сек-бутил, терт-бутил, н-пентил, 2-пентил, 3-пентил, 2-метил-2-бутил, н-гексил, н-гептил, н-октил, н-ноніл, н-децил, 3-метил-2-бутил, 3-метил-1-бутил, 2-метил-1-бутил, 1-гексил, 2-гексил, 3-гексил, 2-метил-2-пентил, 3-метил-2-пентил, 4-метил-2-пентил, 3-метил-3-пентил, 2-метил-3-пентил, 2,3-диметил-2-бутил і 3,3-диметил-2-бутил.

Алкільні групи, окремо або як частина іншої групи, можуть бути необов'язково заміщені однією або більше групами, переважно 1-3 групами (та будь-якими додатковими замісниками, вибраними з галогену), у тому числі, але це не є обмеженням, -O-(C₁-C₈ алкілом), -O-(C₂-C₈ алкенілом), -O-(C₂-C₈ алкінілом), -арилом, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ і -CN, де кожний R' незалежно вибирають з -H, -C₁-C₈ алкілу, -C₂-C₈ алкенілу, -C₂-C₈ алкінілу або -арилу і де згадані -O-(C₁-C₈ алкільна), -O-(C₂-C₈ алкенільна), -O-(C₂-C₈ алкінільна), -арильна, -C₁-C₈ алкільна, -C₂-C₈ алкенільна та -C₂-C₈ алкінільна групи можуть бути необов'язково додатково заміщені однією або більше групами, у тому числі, але це не є обмеженням, -C₁-C₈ алкілом, -C₂-C₈ алкенілом, -C₂-C₈ алкінілом, -галогеном, -O-(C₁-C₈ алкілом), -O-(C₂-C₈ алкенілом), -O-(C₂-C₈ алкінілом), -арилом, -C(O)R'', -OC(O)R'', -C(O)OR'', -C(O)NH₂, -C(O)NHR'', -C(O)N(R'')₂, -NHC(O)R'', -SR'', -SO₃R'', -S(O)₂R'', -S(O)R'', -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R''), -N(R'')₂ і -CN, де кожний R'' незалежно вибирають з -H, -C₁-C₈ алкілу, -C₂-C₈ алкенілу, -C₂-C₈ алкінілу або -арилу.

Якщо не вказано інакше, терміни "алкені" та "алкініл" стосуються прямих та розгалужених ланцюгів вуглецю, що мають від близько 2 до близько 20 атомів вуглецю (та всіх комбінацій і субкомбінацій меж та конкретної кількості атомів вуглецю в них), причому перевагу надають наявності від близько 2 до близько 8 атомів вуглецю. Алкенільний ланцюг має щонайменше один подвійний зв'язок в ланцюгу та алкінільний ланцюг має щонайменше один потрійний зв'язок в ланцюгу. Прикладами алкенільних груп є, але це не є обмеженням, етилен або вініл, алліл, -1-бутеніл, -2-бутеніл, -ізобутиленіл, -1-пентеніл, -2-пентеніл, -3-метил-1-бутеніл, -2-метил-2-бутеніл і -2,3-диметил-2-бутеніл. Прикладами алкінільних груп є, але це не є обмеженням, ацетиленова, пропаргілова, ацетиленілова, пропінілова, -1-бутинілова, -2-бутинілова, -1-пентинілова, -2-пентинілова і -3-метил-1-бутинілова групи.

Алкенільна та алкінільна групи, окремо або як частина іншої групи, можуть бути необов'язково заміщені однією або більше групами, переважно 1-3 групами (та будь-якими додатковими замісниками, вибраними із галогену), у тому числі, але це не є обмеженням, -галогеном, -O-(C₁-C₈ алкілом), -O-(C₂-C₈ алкенілом), -O-(C₂-C₈ алкінілом), -арилом, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R'', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ та -CN, де кожний R' незалежно вибирають з -H, -C₁-C₈ алкілу, -C₂-C₈ алкенілу, -C₂-C₈ алкінілу або -арилу і де згадані -O-(C₁-C₈ алкільна), -O-(C₂-C₈ алкенільна), -O-(C₂-C₈ алкінільна), -арильна, -C₁-C₈ алкільна, -C₂-C₈ алкенільна та -C₂-C₈ алкінільна групи можуть бути необов'язково додатково заміщені одним або більше замісниками, у тому числі, але це не є обмеженням, -C₁-C₈ алкілом, -C₂-C₈ алкенілом, -C₂-C₈ алкінілом, -галогеном, -O-(C₁-C₈ алкілом), -O-(C₂-C₈ алкенілом), -O-(C₂-C₈ алкінілом), -арилом, -C(O)R'', -OC(O)R'', -C(O)OR'', -C(O)NH₂, -C(O)NHR'', -C(O)N(R'')₂, -NHC(O)R'', -SR'', -SO₃R'', -S(O)₂R'',

$-S(O)R''$, $-OH$, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R'')$, $-N(R'')_2$ та $-CN$, де кожний R'' незалежно вибирають з $-H$, $-C_1-C_8$ алкілу, $-C_2-C_8$ алкенілу, $-C_2-C_8$ алкінілу або -арилу.

Якщо не вказано інакше, термін "алкілен" стосується радикалу вуглеводню з насиченим розгалуженим або прямим ланцюгом, що має від близько 1 до близько 20 атомів вуглецю (та всіх комбінацій і субкомбінацій меж та конкретної кількості атомів вуглецю в них), причому перевагу надають наявності від близько 1 до близько 8 атомів вуглецю, які мають два центри одновалентних радикалів, одержаних видаленням двох атомів водню з однакових або двох різних атомів вуглецю батьківського алкану. Типовими алкіленами є, але це не є обмеженням, метилен, етилен, пропілен, бутилен, пентилен, гексилен, гептилен, октитен, нонілен, декален, 1,4-циклогексилен та подібні. Алкіленові групи, окремо або як частина іншої групи, можуть бути необов'язково заміщені однією або більше групами, переважно 1-3 групами (та будь-якими додатковими замісниками, вибраними з галогену), у тому числі, але це не є обмеженням, -галогеном, $-O-(C_1-C_8 \text{ алкілом})$, $-O-(C_2-C_8 \text{ алкенілом})$, -арилом, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-SR'$, $-SO_3R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, $=O$, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ та $-CN$, де кожний R' незалежно вибирають з $-H$, $-C_1-C_8$ алкілу, $-C_2-C_8$ алкенілу, $-C_2-C_8$ алкінілу або -арилу і де згадані $-O-(C_1-C_8 \text{ алкільна})$, $-O-(C_2-C_8 \text{ алкенільна})$, $-O-(C_2-C_8 \text{ алкінільна})$, -арильна, $-C_1-C_8 \text{ алкільна}$, $-C_2-C_8 \text{ алкенільна}$ та $-C_2-C_8 \text{ алкінільна}$ група можуть бути додатково необов'язково заміщені одним або більше замісниками, у тому числі, але це не є обмеженням, $-C_1-C_8 \text{ алкілом}$, $-C_2-C_8 \text{ алкенілом}$, $-C_2-C_8 \text{ алкінілом}$, -галогеном, $-O-(C_1-C_8 \text{ алкілом})$, $-O-(C_2-C_8 \text{ алкенілом})$, $-O-(C_2-C_8 \text{ алкінілом})$, -арилом, $-C(O)R''$, $-OC(O)R''$, $-C(O)OR''$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR''$, $-C(O)N(R'')_2$, $-NHC(O)R''$, $-SR''$, $-SO_3R''$, $-S(O)_2R''$, $-S(O)R''$, $-OH$, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R'')$, $-N(R'')_2$ і $-CN$, де кожний R'' незалежно вибирають з $-H$, $-C_1-C_8$ алкілу, $-C_2-C_8$ алкенілу, $-C_2-C_8$ алкінілу та -арилу.

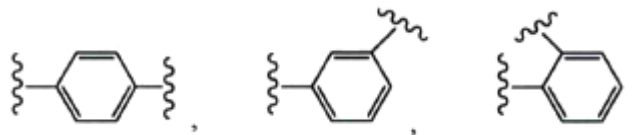
Якщо не вказано інакше, термін "алкенілен" стосується необов'язково заміщеної алкіленової групи, що містить щонайменше один подвійний зв'язок вуглець-вуглець. Приклади алкеніленових груп є, наприклад, етенілен ($-CH=CH-$) і пропенілен ($-CH=CHCH_2-$).

Якщо не вказано інакше, термін "алкінілен" стосується необов'язково заміщеної алкіленової групи, що містить щонайменше один потрійний зв'язок вуглець-вуглець. Прикладами алкініленових груп є, наприклад, ацетилен ($-C\equiv C-$), пропаргіл ($-CH_2C\equiv C-$) та 4-пентиніл ($-CH_2CH_2CH_2C\equiv CH-$).

Якщо не вказано інакше, термін "арил" стосується одновалентного ароматичного вуглеводневого радикалу із 6-20 атомами вуглецю (та всіх комбінацій і субкомбінацій меж та конкретної кількості атомів вуглецю в них), одержаного видаленням одного атому водню з єдиного атому вуглецю батьківської ароматичної кільцевої системи. Деякі арильні групи представлені в показових структурах як "Ar". Типові арильні групи є, але це не є обмеженням, радикалами, одержаними з бензолу, заміщеного бензолу, фенілу, нафталену, антрацену, біфенілу та подібного.

Арильна група, окремо або як частина іншої групи, може бути необов'язково заміщена однією або більше, переважно 1-5, або навіть 1-2 групами, у тому числі, але це не є обмеженням, -галогеном, $-C_1-C_8 \text{ алкілом}$, $-C_2-C_8 \text{ алкенілом}$, $-C_2-C_8 \text{ алкінілом}$, $-O-(C_1-C_8 \text{ алкілом})$, $-O-(C_2-C_8 \text{ алкенілом})$, $-O-(C_2-C_8 \text{ алкінілом})$, -арилом, $-C(O)R'$, $-OC(O)R'$, $-C(O)OR'$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR'$, $-C(O)N(R')_2$, $-NHC(O)R'$, $-SR'$, $-SO_3R'$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)R'$, $-OH$, $-NO_2$, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R')$, $-N(R')_2$ і $-CN$, де кожний R' незалежно вибирають з $-H$, $-C_1-C_8$ алкілу, $-C_2-C_8$ алкенілу, $-C_2-C_8$ алкінілу або -арилу і де згадані $-C_1-C_8 \text{ алкільна}$, $-C_2-C_8 \text{ алкенільна}$, $-C_2-C_8 \text{ алкінільна}$, $-O-(C_1-C_8 \text{ алкільна})$, $-O-(C_2-C_8 \text{ алкенільна})$, $-O-(C_2-C_8 \text{ алкінільна})$ та -арильна групи можуть бути додатково необов'язково заміщені одним або більше замісниками, у тому числі, але це не є обмеженням, $-C_1-C_8 \text{ алкілом}$, $-C_2-C_8 \text{ алкенілом}$, $-C_2-C_8 \text{ алкінілом}$, -галогеном, $-O-(C_1-C_8 \text{ алкілом})$, $-O-(C_2-C_8 \text{ алкенілом})$, $-O-(C_2-C_8 \text{ алкінілом})$, -арилом, $-C(O)R''$, $-OC(O)R''$, $-C(O)OR''$, $-C(O)NH_2$, $-C(O)NHR''$, $-C(O)N(R'')_2$, $-NHC(O)R''$, $-SR''$, $-SO_3R''$, $-S(O)_2R''$, $-S(O)R''$, $-OH$, $-N_3$, $-NH_2$, $-NH(R'')$, $-N(R'')_2$ та $-CN$, де кожний R'' незалежно вибирають з $-H$, $-C_1-C_8$ алкілу, $-C_2-C_8$ алкенілу, $-C_2-C_8$ алкінілу або -арилу.

Якщо не вказано інакше, термін "арилен" стосується необов'язково заміщеної арильної групи, яка є двовалентною (тобто одержаною видаленням двох атомів водню з однакових або двох різних атомів вуглецю батьківської ароматичної кільцевої системи) і може бути в орто, мета або пара конфігураціях, як показано в наведених далі структурах з фенілом як показовою арильною групою:



типовими "-(C₁-C₈ алкілен)арильними", "-(C₂-C₈ алкенілен)арильними" та "-(C₂-C₈ алкінілен)арильними" групами є, але це не є обмеженням, бензил, 2-фенілетан-1-іл, 2-фенілетен-1-іл, нафтилметил, 2-нафтилетан-1-іл, 2-нафтилетен-1-іл, нафтобензил, 2-нафтофенілетан-1-іл та подібне.

Якщо не вказано інакше, термін "гетероцикл" стосується моноциклічної, біциклічної або поліциклічної кільцевої системи, що має від 3 до 14 кільцевих атомів (які також називають членами кільця), де щонайменше один атом кільця у щонайменше одному кільці є гетероатомом, вибраним із N, O, P або S (та всіх комбінацій і субкомбінацій меж та конкретної кількості атомів вуглецю і гетероатомів в них). Гетероцикл може мати від 1 до 4 кільцевих гетероатомів, незалежно вибраних з N, O, P або S. Один або більше N, C або S атомів у гетероциклі можуть бути окислені. Моноциклічний гетероцикл переважно має 3-7 членів кільця (наприклад, 2-6 атомів вуглецю і 1-3 гетероатоми, незалежно вибрані з N, O, P або S), і біциклічний гетероцикл переважно має 5-10 членів кільця (наприклад, 4-9 атомів вуглецю та 1-3 гетероатоми, незалежно вибрані з N, O, P або S). Кільце, що містить гетероатом, може бути ароматичним або неароматичним. Якщо не вказано інакше, гетероцикл прикріплений до своєї додаткової групи на будь-якому гетероатомі або атомі вуглецю, що спричиняє утворення стійкої структури.

Гетероцикли описані Пакветте (Paquette) у виданнях "Принципи сучасної гетероциклічної хімії" ("Principles of Modern Heterocyclic Chemistry", W.A. Benjamin, New York, 1968), зокрема в Главах 1, 3, 4, 6, 7 і 9; "Хімія гетероциклічних сполук, серія монографій" ("The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs", John Wiley & Sons, New York, з 1950 дотепер), зокрема в Томі 13, 14, 16, 19 і 28; та у "Журналі американського хімічного співтовариства" (J. Am. Chem. Soc. 82:5566 (1960)).

Прикладами "гетероциклічних" груп є, як приклад, але не як обмеження, піридил, дигідропіридил, тетрагідропіридил (піперидил), тіазоліл, піримідиніл, фураніл, тієніл, піроліл, піразоліл, імідазоліл, тетразоліл, бензофураніл, тіанафталеніл, індоліл, індоленіл, хінолініл, ізохінолініл, бензимидазоліл, піперидиніл, 4-піперидоніл, піролідиніл, 2-піролідоніл, піролініл, тетрагідрофураніл, біс-тетрагідрофураніл, тетрагідропіраніл, біс-тетрагідропіраніл, тетрагідрохінолініл, тетрагідроізохінолініл, декагідрохінолініл, октагідроізохінолініл, азоциніл, тріазиніл, 6H-1,2,5-тіадіазиніл, 2H, 6H-1,5,2-дитіазиніл, тієніл, тіантреніл, піраніл, ізобензофураніл, хроменіл, ксантеніл, феноксатиніл, 2H-піроліл, ізотіазоліл, ізоксазоліл, піразиніл, піридазиніл, індолізиніл, ізоіндоліл, 3H-індоліл, 1H-індазоліл, пуриніл, 4H-хінолізиніл, фталазиніл, нафтиридиніл, хіноксалініл, хіназолініл, ціннолініл, птеридиніл, 4H-карбазоліл, карбазоліл, β-карболініл, фенантридиніл, акридиніл, піримідиніл, фенантролініл, феназиніл, фенотіазиніл, фуразаніл, феноксазиніл, ізохроманіл, хроманіл, імідазолідиніл, імідазолініл, піразолідиніл, піразолініл, піперазиніл, індолініл, ізоіндолініл, хінуклідиніл, морфолініл, оксазолідиніл, бензотріазоліл, бензизоксазоліл, оксиндоліл, бензоксазолініл та ізатіноіл. "Гетероциклічними" групами, яким надають перевагу, є, але це не є обмеженням, бензофураніл, бензотіофеніл, індоліл, бензопіразоліл, коумариніл, ізохінолініл, піроліл, тіофеніл, фураніл, тіазоліл, імідазоліл, піразоліл, тріазоліл, хінолініл, піримідиніл, піридиніл, піридоніл, піразиніл, піридазиніл, ізотіазоліл, ізоксазоліл і тетразоліл.

Гетероциклічна група, окремо або як частина іншої групи, може бути необов'язково заміщена однією або більше групами, переважно 1-2 групами, у тому числі, але це не є обмеженням, -C₁-C₈ алкілом, -C₂-C₈ алкенілом, -C₂-C₈ алкінілом, -галогеном, -O-(C₁-C₈ алкілом), -O-(C₂-C₈ алкенілом), -O-(C₂-C₈ алкінілом), -арилом, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ і -CN, де кожний R' незалежно вибирають з -H, -C₁-C₈ алкілу, -C₂-C₈ алкенілу, -C₂-C₈ алкінілу або -арилу, і де згадані -O-(C₁-C₈ алкільна), -O-(C₂-C₈ алкенільна), -O-(C₂-C₈ алкінільна), -C₁-C₈ алкільна, -C₂-C₈ алкенільна, -C₂-C₈ алкінільна та -арильна групи можуть бути додатково необов'язково заміщені одним або більше замісниками, у тому числі, але це не є обмеженням, -C₁-C₈ алкілом, -C₂-C₈ алкенілом, -C₂-C₈ алкінілом, -галогеном, -O-(C₁-C₈ алкілом), -O-(C₂-C₈ алкенілом), -O-(C₂-C₈ алкінілом), -арилом, -C(O)R'', -OC(O)R'', -C(O)OR'', -C(O)NH₂, -C(O)NHR'', -C(O)N(R'')₂, -NHC(O)R'', -SR'', -SO₃R'', -S(O)₂R'', -S(O)R'', -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R''), -N(R'')₂ та -CN, де кожний R'' незалежно вибирають з -H, -C₁-C₈ алкілу, -C₂-C₈ алкенілу, -C₂-C₈ алкінілу або арилу.

Як приклад і не як обмеження вуглець-сполучені гетероцикли можуть бути сполучені у таких положеннях: положенні 2, 3, 4, 5 або 6 піридину; положенні 3, 4, 5 або 6 піридазину; положенні 2, 4, 5 або 6 піримідину; положенні 2, 3, 5 або 6 піразину; положенні 2, 3, 4 або 5 фурану, тетрагідрофурану, тіофурану, тіофену, піролу або тетрагідропіролу; положенні 2, 4 або 5 оксазолу, імідазолу або тіазолу; положенні 3, 4 або 5 ізоксазолу, піразолу або ізотіазолу; положенні 2 або 3 азиридину; положенні 2, 3 або 4 азетидину; положенні 2, 3, 4, 5, 6, 7 або 8 хіноліну; або положенні 1, 3, 4, 5, 6, 7 або 8 ізохіноліну. Але більш типовим є коли вуглець-сполучені гетероцикли включають 2-піридил, 3-піридил, 4-піридил, 5-піридил, 6-піридил, 3-піридазиніл, 4-піридазиніл, 5-піридазиніл, 6-піридазиніл, 2-піримідиніл, 4-піримідиніл, 5-піримідиніл, 6-піримідиніл, 2-піразиніл, 3-піразиніл, 5-піразиніл, 6-піразиніл, 2-тіазоліл, 4-тіазоліл або 5-тіазоліл.

Як приклад і не як обмеження азот-сполучені гетероцикли можуть бути сполучені у положенні 1 азиридину, азетидину, піролу, піролідину, 2-піроліну, 3-піроліну, імідазолу, імідазолідину, 2-імідазоліну, 3-імідазоліну, піразолу, піразоліну, 2-піразоліну, 3-піразоліну, піперидин, піперазину, індол, індоліну або 1Н-індазолу; положенні 2 ізоіндолу або ізоіндолу; положенні 4 морфоліну; та положенні 9 карбазолу або β-карболіну. Але більш типовим є коли азот-сполучені гетероцикли включають 1-азиридил, 1-азетедил, 1-піроліл, 1-імідазоліл, 1-піразоліл і 1-піперидиніл.

Якщо не вказано інакше, термін "карбоцикл" стосується насиченої або ненасиченої неароматичної моноциклічної, біциклічної або поліциклічної кільцевої системи, що має 3-14 кільцевих атомів (та всіх комбінацій і субкомбінацій меж та конкретної кількості атомів вуглецю в них), де всі атоми кільця є атомами вуглецю. Моноциклічні карбоцикли переважно мають 3-6 кільцеві атоми, ще краще 5 або 6 кільцевих атомів. Біциклічні карбоцикли переважно мають 7-12 кільцевих атомів, наприклад, розташованих у вигляді біциклічної [4,5], [5,5], [5,6] або [6,6] системи, або 9 чи 10 кільцевих атомів, розташованих у вигляді біциклічної [5,6] або [6,6] системи. Термін "карбоцикл" включає, наприклад, моноциклічне карбоциклічне кільце, конденсоване з арильним кільцем (наприклад, моноциклічне карбоциклічне кільце, конденсоване з бензолним кільцем). Карбоцикли переважно мають 3-8 атомів вуглецю.

Карбоциклічні групи, окремо або як частина іншої групи, можуть бути необов'язково заміщені, наприклад, однією або більше групами, переважно 1 або 2 групами (та будь-якими додатковими замісниками, вибраними з галогену), у тому числі, але це не є обмеженням, -галогеном, -C₁-C₈ алкілом, -C₂-C₈ алкенілом, -C₂-C₈ алкінілом, -O-(C₁-C₈ алкілом), -O-(C₂-C₈ алкенілом), -O-(C₂-C₈ алкінілом), -арилом, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ і -CN, де кожний R' незалежно вибирають з -H, -C₁-C₈ алкілу, -C₂-C₈ алкенілу, -C₂-C₈ алкінілу або -арилу і де згадані -C₁-C₈ алкільна, -C₂-C₈ алкенільна, -C₂-C₈ алкінільна, -O-(C₁-C₈ алкільна), -O-(C₂-C₈ алкенільна), -O-(C₂-C₈ алкінільна) та -арильна групи можуть бути додатково необов'язково заміщені одним або більше замісниками, у тому числі, але це не є обмеженням, -C₁-C₈ алкілом, -C₂-C₈ алкенілом, -C₂-C₈ алкінілом, -галогеном, -O-(C₁-C₈ алкілом), -O-(C₂-C₈ алкенілом), -O-(C₂-C₈ алкінілом), -арилом, -C(O)R'', -OC(O)R'', -C(O)OR'', -C(O)NH₂, -C(O)NHR'', -C(O)N(R'')₂, -NHC(O)R'', -SR'', -SO₃R'', -S(O)₂R'', -S(O)R'', -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R''), -N(R'')₂ і -CN, де кожний R'' незалежно вибирають з -H, -C₁-C₈ алкілу, -C₂-C₈ алкенілу, -C₂-C₈ алкінілу або -арилу.

Прикладами моноциклічних карбоциклічних замісників є -циклопропіл, -циклобутил, -циклопентил, -1-циклопент-1-еніл, -1-циклопент-2-еніл, -1-циклопент-3-еніл, циклогексил, -1-циклогекс-1-еніл, -1-циклогекс-2-еніл, -1-циклогекс-3-еніл, -циклогептил, -циклооктил, -1,3-циклогексادیєніл, -1,4-циклогексادیєніл, -1,3-циклогептадієніл, -1,3,5-циклогептатрієніл і -циклооктадієніл.

Термін "карбоцикло", при використанні окремо або як частини іншої групи, стосується необов'язково заміщеної карбоциклічної групи, як визначено вище, яка є двовалентною (тобто одержаною видаленням двох атомів водню з однакових або двох різних атомів вуглецю батьківської карбоциклічної кільцевої системи).

Якщо не вказано інакше за контекстом, дефіс (-) позначає точку прикріплення до підвішеної молекули. Відповідно, термін "-(C₁-C₈ алкілен)арил" або "-C₁-C₈ алкілен(арил)" стосується радикалу C₁-C₈ алкілену, як визначено тут, де алкіленовий радикал прикріплений до підвішеної молекули на будь-якому з атомів вуглецю алкіленового радикалу і один з атомів водню, прикріплений до атому вуглецю алкіленового радикалу, заміщений радикалом арилу, як визначено тут.

Якщо конкретна група є "заміщеною", ця група може мати один або більше замісників, переважно від одного до п'яти замісників, ще краще від одного до трьох замісників, найкраще

від одного до двох замісників, незалежно вибраних з переліку замісників. Група може, проте, загалом мати будь-яку кількість замісників, вибраних з галогену. Групи, які є заміщеними, позначені відповідним чином.

Треба розуміти, що визначення будь-якого замісника або змінної величини у певному місці розташування в молекулі не залежить від відповідного визначення в інших місцях у цій молекулі. Є зрозумілим, що замісники та моделі заміщення в сполуках за цим винаходом можуть бути обрані спеціалістом у цій галузі для одержання сполук, що є хімічно стабільними і які можна легко синтезувати за допомогою технічних прийомів, відомих у цій галузі, а також описаних тут способів.

Використаний тут термін "захисні групи" стосується груп, які вибірково блокують, тимчасово або постійно, один реакційноспроможний центр в багатофункціональній сполуці. Підходящі гідрокси-захисні групи для застосування у цьому винаході є фармацевтично прийнятними і можуть потребувати або не потребувати відщеплення від вихідної сполуки після введення суб'єктові для забезпечення активності сполуки. Розщеплення відбувається шляхом звичайних метаболічних процесів в організмі. Гідрокси-захисні групи є добре відомими у цій галузі, див. видання "Захисні групи в органічному синтезі" (Protective Groups in Organic Synthesis авторів T. W. Greene та P. G. M. Wuts (John Wiley & sons, 3-тє видання), включене тут у всій повноті шляхом посилання і в усіх відношеннях, і включають, наприклад, ефірні (наприклад, алкілефірні та силілефірні, у тому числі, наприклад, діалкілсилілефірні, тріалкілсилілефірні, діалкілалкоксилілефірні), складноефірні, карбонатні, карбаматні, сульфонатні та фосфатні захисні групи. Прикладами гідрокси-захисних груп є, але це не є обмеженням, метиловий ефір; метоксиметиловий ефір, метилтіометиловий ефір, (фенілдиметилсиліл) метоксиметиловий ефір, бензилоксиметиловий ефір, р-метоксибензилокси-метиловий ефір, р-нітробензилоксиметиловий ефір, о-нітробензилоксиметиловий ефір, (4-метоксифенокси)метил ефір, гваяколметиловий ефір, т-бутоксиметиловий ефір, 4-пентенілоксиметиловий ефір, силлоксиметиловий ефір, 2-метоксіетоксиметиловий ефір, 2,2,2-трихлоретоксиметиловий ефір, біс(2-хлоретокси)метиловий ефір, 2-(триметилсиліл)етоксиметиловий ефір, ментоксиметиловий ефір, тетрагідропіраніловий ефір, 1-метоксициклогексильовий ефір, 4-метокситетрагідротіопіраніловий ефір, 4-метокситетрагідротіопіраніловий ефір S, S-діоксид, 1-[(2-хлор-4-метил)феніл]-4-метоксипіперидин-4-іл ефір, 1-(2-фторфеніл)-4-метоксипіперидин-4-іловий ефір, 1,4-діоксан-2-іловий ефір, тетрагідрофураніловий ефір, тетрагідротіофураніловий ефір; заміщені етилові ефіри, такі як 1-етоксіетиловий ефір, 1-(2-хлоретоксі)етиловий ефір, 1-[2-(триметилсиліл)етоксі]етиловий ефір, 1-метил-1-метоксіетиловий ефір, 1-метил-1-бензилоксіетиловий ефір, 1-метил-1-бензилокси-2-фторетиловий ефір, 1-метил-1-феноксіетиловий ефір, 2-триметилсиліловий ефір, т-бутиловий ефір, алліловий ефір, пропаргілові ефіри, р-хлорфеніловий ефір, п-метоксифеніловий ефір, бензиловий ефір, п-метоксibenзиловий ефір, 3,4-диметоксибензиловий ефір, триметилсиліловий ефір, тріетилсиліловий ефір, трипропілсилілефіровий, диметилізопропілсиліловий ефір, діетилізопропілсиліловий ефір, диметилгексил-силіловий ефір, т-бутилдиметилсиліловий ефір, диіфенілметилсиліловий ефір, бензоїлформатний складний ефір, ацетатний складний ефір, хлорацетатний складний ефір, дихлорацетатний складний ефір, трихлорацетатний складний ефір, трифторацетатний складний ефір, метоксіяцетатний складний ефір, трифенілметоксіяцетатний складний ефір, фенілацетатний складний ефір, бензоатний складний ефір, алкіловий метил карбонат, алкіл 9-фторенілметил карбонат, алкіл етилкарбонат, алкіл 2,2,2-трихлоретил карбонат, 1,1-диметил-2,2,2-трихлоретил карбонат, алкілсульфонат, метансульфонат, бензилсульфонат, тозилат, метиленацеталь, етиліденацеталь і t-бутилметиліденкеталь. Захисні групи, яким надають перевагу, представлені формулами $-R^a$, $-\text{Si}(R^a)(R^a)(R^a)$, $-\text{C}(\text{O})R^a$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^a$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}(R^a)$, $-\text{S}(\text{O})_2R^a$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{OH}$, $\text{P}(\text{O})(\text{OH})_2$ і $-\text{P}(\text{O})(\text{OH})\text{OR}^a$, де R^a означає $\text{C}_1\text{-C}_{20}$ алкіл, $\text{C}_2\text{-C}_{20}$ алкеніл, $\text{C}_2\text{-C}_{20}$ алкініл, $-\text{C}_1\text{-C}_{20}$ алкілен(карбоцикл), $-\text{C}_2\text{-C}_{20}$ алкенілен(карбоцикл), $-\text{C}_2\text{-C}_{20}$ алкінілен(карбоцикл), $-\text{C}_6\text{-C}_{10}$ арил, $-\text{C}_1\text{-C}_{20}$ алкілен(арил), $-\text{C}_2\text{-C}_{20}$ алкенілен(арил), $-\text{C}_2\text{-C}_{20}$ алкінілен(арил), $-\text{C}_1\text{-C}_{20}$ алкілен(гетероцикл), $-\text{C}_2\text{-C}_{20}$ алкенілен(гетероцикл) або $-\text{C}_2\text{-C}_{20}$ алкінілен(гетероцикл), де радикали згаданих алкілу, алкенілу, алкінілу, алкілену, алкенілену, алкінілену, арилу, карбоциклу і гетероциклу, окремо або як частина іншої групи, є необов'язково заміщеними.

"Змінення нативного профілю глікозилювання" треба розуміти для цілей цього винаходу як таке, що означає видалення однієї або більше вуглеводневих часток, наявних у нативній послідовності 158P1D7 (видаленням основного сайту глікозилювання або усуненням глікозилювання хімічним та/або ферментативним способом), та/або додавання одного або більше сайтів глікозилювання, яких немає в нативній послідовності 158P1D7. Крім того, ця

фразу включає кількісні зміни у глікозилюванні нативних білків, пов'язані зі зміною в основних властивостях та пропорціях різних присутніх вуглеводневих часток.

Термін "аналог" стосується молекули, що є структурно подібною або має подібні чи відповідні характерні ознаки з іншою молекулою (наприклад, споріднений до 158P1D7 білок). Наприклад, аналог білка 158P1D7 може специфічним чином зв'язуватись антитілом або Т-лімфоцитом, що специфічним чином зв'язується з 158P1D7.

Термін "антитіло" використовують у найширшому сенсі, якщо чітко не вказано інакше. Відповідно, "антитіло" може бути природного походження або штучним, таким як моноклональні антитіла, одержані традиційною гібридомною технологією. Антитіла до 158P1D7 включають моноклональні та поліклональні антитіла, а також фрагменти, що містять антиген-зв'язувальний домен та/або одну або більше ділянки цих антитіл, що визначають компліментарність. Використаний тут термін "антитіло" стосується будь-якої форми антитіла або його фрагменту, що специфічним чином зв'язується з 158P1D7 та/або проявляє бажану біологічну активність і особливо охоплює моноклональні антитіла (у тому числі повнорозмірні моноклональні антитіла), поліклональні антитіла, мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла) та фрагменти антитіл до тих пір, поки вони специфічним чином зв'язуються з 158P1D7 та/або проявляють бажану біологічну активність. Будь-яке специфічне антитіло може бути використане у передбачених тут способах та композиціях. Так, в одному втіленні термін "антитіло" охоплює молекулу, що містить щонайменше одну варіабельну ділянку імуноглобулінової молекули легкого ланцюга та щонайменше одну варіабельну ділянку молекули важкого ланцюга, які у поєднанні утворюють специфічний сайт зв'язування для антигену-мішені. В одному втіленні антитілом є IgG антитіло. Наприклад, антитілом є IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4 антитіло. Антитіла, придатні для способів і композицій за винаходом, можуть бути утворені в культурі клітин, в бактеріофазі або в різних тваринах, включаючи, але це не є обмеженням, корів, кролей, кіз, мишей, пацюків, хом'яків, морських свинок, овець, собак, кішок, мавп, шимпанзе та людиноподібних мавп. Відповідно, в одному втіленні антитілом за цим винаходом є антитіло ссавця. Бактеріофагові технічні прийоми можуть бути використані для відокремлення первісного антитіла або одержання варіантів зі зміненими характеристиками специфічності чи авідності. Такі технічні прийоми є стандартними і добре відомими у цій галузі. В одному втіленні антитіло одержують рекомбінантними засобами, відомими у цій галузі. Наприклад, рекомбінантне антитіло може бути одержане шляхом трансфекції клітини-хазяїна вектором, який містить послідовність ДНК, що кодує антитіло. Можуть бути використані один або більше векторів для трансфектування послідовності ДНК, що експресує принаймні одну VL та одну VH ділянку в клітині-хазяїні. Типовими описами рекомбінантних засобів утворення та одержання антитіл є такі видання: Делвес "Вироблення антитіл: важливі технічні прийоми" (Delves, ANTIBODY PRODUCTION: ESSENTIAL TECHNIQUES (Wiley, 1997)); Шефард та ін. "Моноклональні антитіла" (Shephard, et al., MONOCLONAL ANTIBODIES (Oxford University Press, 2000)); Гоудинг "Моноклональні антитіла: принципи та практика" (Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (Academic Press, 1993)); та "Сучасні протоколи в імунології" (CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (John Wiley & Sons, останнє видання)). Антитіло за цим винаходом може бути модифіковане рекомбінантними засобами для підвищення ефективності антитіла в опосередковуванні бажаної функції. Отже, до обсягу винаходу входить те, що антитіла можуть бути модифіковані за допомогою заміщень із використанням рекомбінантних засобів. Звичайно заміщення є консервативними заміщеннями. Наприклад, принаймні одна амінокислота в константній ділянці антитіла може бути заміщена іншим залишком. Див., наприклад, патент США №5,624,821, патент США №6,194,551, міжнародну заявку WO 9958572; та Ангал та ін. "Молекулярна імунологія" (Angal, et al., Mol. Immunol. 30: 105-08 (1993)). Модифікація в амінокислотах включає видалення, додавання та заміщення амінокислот. У деяких випадках такі зміни здійснюють для зниження небажаної діяльності, наприклад, комплементзалежної цитотоксичності. Часто антитіла мітять шляхом приєднання, ковалентним або нековалентним чином, речовини, що забезпечує помітний сигнал. Відомий широкий спектр міток та способів здійснення кон'югації, і про них широко повідомляють як в технічній, так і в патентній літературі. Ці антитіла можуть бути перевірені на предмет зв'язування з нормальним або дефектним 158P1D7. Див., наприклад, "Конструювання антитіл: практичний підхід" (Antibody Engineering: A Practical Approach, Oxford University Press, 1996). Підходящі антитіла з бажаною біологічною активністю можуть бути ідентифіковані із використанням наведених далі аналізів в умовах *in vitro*, включаючи такі, але це не є обмеженням: проліферація, міграція, прилипання, ріст м'якого агару, ангиогенез (розвиток кровоносних судин), комунікація клітина-клітина, апоптоз, транспортування, сигнальна трансдукція, і таких аналізів *in vivo*, як інгібування росту пухлин. Передбачені тут антитіла також

можуть бути корисними для застосування в діагностиці. Як іммобілізовані або ненейтралізуючі антитіла їх можна перевірити на предмет їхньої здатності зв'язуватись зі специфічним антигеном без інгібування рецептор-зв'язувальної або біологічної активності антигену. Як нейтралізуючі антитіла вони можуть бути корисними в аналізах конкурентного зв'язування. Їх також можна використовувати для кількісного аналізу 158P1D7 або його рецептора.

Використаний тут термін "антиген-зв'язувальна частка" антитіла або "фрагмент антитіла" (або просто "частка антитіла") стосується одного або більше фрагментів антитіла до 158P1D7, що зберігають здатність специфічним чином зв'язуватись з антигеном (наприклад, 158P1D7 та варіанти; Фігура 1). Було показано, що антиген-зв'язувальну функцію антитіла можуть виконувати фрагменти повнорозмірного антитіла. Приклади зв'язувальних фрагментів, охоплених терміном "антиген-зв'язувальна частка" антитіла, включають: (i) Fab-фрагмент, одновалентний фрагмент, що складається з V_L , V_H , C_L і C_{H1} доменів; (ii) $F(ab')_2$ фрагмент, двовалентний фрагмент, що містить два Fab-фрагменти, сполучені дисульфідним містком в шарнірній ділянці; (iii) Fd-фрагмент, що складається з V_H і C_{H1} доменів; (iv) Fv-фрагмент, що складається з V_L і V_H доменів непорівнюваного антитіла; (v) dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), що складається з V_H домену; та (vi) ізольованої ділянки, що визначає компліментарність (CDR). Крім того, хоча два домени Fv-фрагменту, V_L і V_H , кодовані окремими генами, вони можуть бути поєднані, із застосуванням рекомбінантних методів, синтетичним лінкером, що дозволяє їм бути створені у вигляді єдиного білкового ланцюга, в якому V_L і V_H ділянки складають пари для утворення одновалентних молекул (відомого як єдиний ланцюг Fv (scFv); див., наприклад, Берд та ін. (Bird et al. (1988) Science 242:423-426); та Хьюстон та ін. (Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Такі одноланцюгові антитіла також розуміють як такі, що охоплені терміном "антиген-зв'язувальна частка" антитіла. Ці фрагменти антитіла одержують із застосуванням традиційних технічних прийомів, відомих спеціалістам у цій галузі, і ці фрагменти перевіряють на придатність таким самим чином, як і інтактні антитіла.

Як використано у цьому описі, будь-яка форма "антигену" може бути використана для одержання антитіла, що є специфічним до 158P1D7. Отже, виведений антиген може бути одиночним епітопом, множинними епітопами або повним білком окремо або у поєднанні з одним або більше засобами, що підвищують імуногенність, відомими у цій галузі. Виведений антиген може бути ізольованим повнорозмірним білком, білком клітинної поверхні (наприклад, який імунізує клітинами, трансфектованими щонайменше частиною антигену) або розчинним білком (наприклад, який імунізує лише позаклітинну частину домену білка). Антиген може бути одержаний у генетично модифікованій клітині. ДНК, що кодує антиген, може бути геномною або негеномною (наприклад, кДНК), і кодує щонайменше частину позаклітинного домену. Як використано у цьому описі, термін "частина" стосується мінімальної кількості амінокислот або нуклеїнових кислот, залежно від ситуації, для складання імуногенного епітопу антигену, що становить інтерес. Можуть бути використані будь-які генетичні вектори, придатні для трансформування клітин, що становлять інтерес, включаючи, але це не є обмеженням, аденовірусні вектори, плазмідні та невірусні вектори, такі як катіонні ліпіди. В одному втіленні антитіло у способах та композиціях за цим винаходом специфічним чином зв'язується щонайменше з частиною позаклітинного домену 158P1D7, що становить інтерес.

Антитіла або їхні антиген-зв'язувальні фрагменти, передбачені у цьому винаході, можуть бути кон'юговані з "біоактивним агентом". Як використано тут, термін "біоактивний агент" стосується будь-якої синтетичної або природної сполуки, яка зв'яже антиген та/або підвищує чи опосередковує бажаний біологічний ефект для посилення токсинів, що вбивають клітини. В одному втіленні зв'язувальні фрагменти, що є придатними для цього винаходу, є біологічно-активними фрагментами. Використаний тут термін "біологічно активний" стосується антитіла або фрагмента антитіла, здатного зв'язуватись із бажаним антигенним епітопом і прямо чи опосередковано чинити біологічний ефект. Прямі ефекти включають, але це не є обмеженням, модулювання, стимулювання та/або інгібування сигналу росту, модулювання, стимулювання та/або інгібування антиапоптичного сигналу, модулювання, стимулювання та/або інгібування апоптичного або некротичного сигналу, модулювання, стимулювання та/або інгібування каскаду ADCC (опосередкованої антитілами клітинної цитотоксичності) і модулювання, стимулювання та/або інгібування каскаду CDC (комплементзалежної цитотоксичності).

"Біспецифічні" антитіла є також придатними для використання у способах та композиціях за цим винаходом. Використаний тут термін "біспецифічне антитіло" стосується антитіла, звичайно моноклонального антитіла, що має специфічність зв'язування принаймні двох різних антигенних епітопів. В одному втіленні епітопи походять з одного антигену. В іншому втіленні епітопи походять від двох різних антигенів. Способи одержання біспецифічних антитіл відомі у цій галузі. Наприклад, біспецифічні антитіла можуть бути одержані рекомбінантним чином із

застосування ко-експресії двох пар важких ланцюгів/легких ланцюгів імуноглобуліну. Див., наприклад, Мільштейн та ін. (Milstein et al., *Nature* 305:537-39 (1983)). Як альтернатива, біспецифічні антитіла можуть бути одержані із застосуванням хімічного зв'язку. Див., наприклад, Бреннан та ін. (Brennan, et al., *Science* 229:81 (1985)). Біспецифічні антитіла включають

5 фрагменти біспецифічних антитіл. Див., наприклад, Холінгер та ін. (Hollinger, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-48 (1993)), Грубер та ін. (Gruber, et al., *J. Immunol.* 152:5368 (1994)).

Описані тут моноклональні антитіла більш конкретно включають "химерні" антитіла, в яких частина важкого та/або легкого ланцюга є ідентичною або гомологічною відповідним

10 послідовностям в антитілах, виведених з конкретного виду або які належать до певного класу чи підкласу антитіл, а решта ланцюга (ланцюгів) є ідентичною або гомологічною відповідним послідовностям в антитілах, виведених з іншого виду або які належать до іншого класу чи підкласу антитіл, а також фрагменти таких антитіл, якщо вони специфічним чином зв'язуються із антигеном-мішенню та/або проявляють бажану біологічну активність (патент США №4,816,567; та Морисон та ін. (Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855 (1984))).

15 Термін "хіміотерапевтичний засіб" стосується всіх хімічних сполук, що є ефективними в інгібуванні росту пухлин. Необмежувальними прикладами хіміотерапевтичних засобів є алкілувальні засоби; наприклад, азотисті іприти, етиленімінові сполуки та алкілсульфонати; антиметаболіти, наприклад, фолієва кислота, пуринові або піримідинові антагоністи; мітотичні інгібітори, наприклад, антитубулінові засоби, такі як алкалоїди вінка, ауристатини та похідні

20 подофілотоксину; цитотоксичні антибіотики; сполуки, що руйнують або втручаються в експресію чи реплікацію ДНК, наприклад, зв'язувачі малого рівчачка ДНК; та антагоністи рецепторів фактору росту. Крім того, хіміотерапевтичними засобами є цитотоксичні засоби (визначені тут), антитіла, біологічні молекули та малі молекули.

Термін "сполука" стосується та охоплює саму хімічну сполуку, а також наведене далі,

25 незалежно від того, чи вказано про це чітко, чи ні, і якщо з контексту чітко не випливає, що наведене далі має бути виключене: аморфні та кристалічні форми сполуки, у тому числі поліморфні форми, де ці форми можуть бути частиною суміші або існувати окремо; форми вільних кислот та вільних основ сполуки, якими звичайно є форми, показані у передбачених в цьому описі структурах; ізомери сполуки, а саме оптичні ізомери і таутомерні ізомери, де

30 оптичні ізомери включають енантіомери та діастереомери, хиральні ізомери та нехиральні ізомери, і оптичні ізомери включають ізольовані оптичні ізомери, а також суміші оптичних ізомерів, у тому числі рацемічні та нерацемічні суміші; де ізомер може бути в ізольованій формі або у суміші з одним або більше іншими ізомерами; ізотопи сполуки, у тому числі дейтерій-вмісні і тритій-вмісні сполуки, і у тому числі сполуки, що містять радіоізотопи, у тому числі

35 терапевтично і діагностично ефективні радіоізотопи; мультимерні форми сполуки, у тому числі димерні, тримерні та інші форми; солі сполуки, переважно фармацевтично прийнятні солі, у тому числі солі приєднання кислоти та солі приєднання основи, у тому числі солі, що мають органічні протиіони та неорганічні протиіони, і у тому числі цвіттер-іонні форми, де якщо сполука

40 сполучена з двома або більше протиіонами, два або більше протиіони можуть бути однаковими або різними; та сольвати сполуки, у тому числі гемісольвати, моносольвати, дисольвати тощо, у тому числі органічні сольвати та неорганічні сольвати, причому згадані неорганічні сольвати включають гідрати; де якщо сполука сполучена з двома або більше сольвентними молекулами, ці дві або більше сольвентні молекули можуть бути однаковими або різними. У деяких випадках

45 посилення у цьому описі на сполуку за винаходом включає чітке посилення на одну або більше із вказаних вище форм, наприклад, солі та/або сольвати; проте, це посилення вказують лише з метою акцентування, і воно не повинно тлумачитись як таке, що виключає іншу із вказаних вище форм.

Термін "ділянка, що визначає компліментарність", або "CDR", відомий у цій галузі при

50 посиленні на не-суміжні послідовності амінокислот у межах варіабельних ділянок антитіл, які забезпечують специфічність антигена та зв'язувальну афінність. Загалом, існують три (3) CDR в кожній варіабельній ділянці важкого ланцюга (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) і три (3) CDR в кожній варіабельній ділянці легкого ланцюга (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3).

Чіткі межі амінокислотних послідовностей певної CDR можна легко визначити при

55 використанні будь-якої із низки добре відомих схем, у тому числі тих, що описані Кабат та ін. у роботі "Послідовності білків, що становлять імунологічний інтерес" (Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5-те видання, Public Health Service, National Institutes of Health, Бетезда, штат Меріленд (схема нумерації Кабата), Ал-Лазікані та ін. (Al-Lazikani et al., (1997) *JMB* 273,927-948) (схема нумерації Хотія), Маккалум та ін. у роботі "Взаємодія антитіло-антиген: контактний аналіз і топографія зв'язувального сайту" (MacCallum

60 et al., *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding

site topography", J. Mol. Biol. 262, 732-745." (Контактна схема нумерації), Лефранк МП та ін. у роботі "Унікальна нумерація IMGT для варіабельних доменів рецептора імунoglobуліну і Т-клітин та V-подібних доменів суперсімейства Ig" (Lefranc MP et al., "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains", Dev Comp Immunol, 2003 Jan;27(1):55-77) (схема нумерації "IMGT") та Хонегер А. і Плюктун А. у роботі "Ще одна схема нумерації варіабельних доменів імунoglobуліну: інструмент для автоматичного моделювання та аналізу" (Honegger A and Plückthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool", J Mol Biol, 2001 Jun 8;309(3):657-70) (схема нумерації Ахо).

Межі певної CDR можуть варіюватися залежно від схеми, що її використовують для ідентифікації. Наприклад, схема Кабата ґрунтується на структурних групуваннях, тоді як схема Хотія ґрунтується на структурній інформації. Нумерація в схемах Кабата і Хотія ґрунтується на найпоширеніших довжинах послідовностей ділянки антитіла, де вставки позначені літерами вставки, наприклад, "30a", і в деяких антитілах є видалення. Обидві схеми розміщують певні вставки та видалення ("встав-вид") в різних положеннях, наслідком чого є диференційована нумерація. Контактна схема ґрунтується на аналізі комплексних кристалічних структур і є подібною у багатьох відношеннях до схеми нумерації Хотія. У наведеній нижче Таблиці V поданий перелік положень CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 і CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 відповідно до визначень за схемами Кабата, Хотія та контактної схеми. Для CDR-H1, нумерація залишків наведена із застосуванням схем нумерації Кабата і Хотія.

Отже, якщо не вказано інакше, терміни "CDR" і "ділянка, що визначає компліментарність" певного антитіла або його ділянки, такої як варіабельна ділянка, а також окремих CDR (наприклад, CDR-H1, CDR-H2) антитіла або його ділянки, треба розуміти як такі, що охоплюють ділянку, що визначає комплементарність, як визначено будь-якою із відомих схем, що описані вище. У деяких випадках, наведена схема визначення конкретної або конкретних CDR, таких як CDR, визначена методами Кабата, Хотія або контактним методом. В інших випадках наводять конкретну амінокислотну послідовність CDR.

Використаний тут термін "консервативне заміщення" стосується заміщень амінокислот, які відомі спеціалістам у цій галузі і можуть бути здійснені звичайно без зміни біологічної активності одержаної молекули. Спеціалісти у цій галузі розуміють, що, загалом, одиничні амінокислотні заміщення в ділянках поліпептиду, що не є незамінними, по суті не змінюють біологічної активності (див., наприклад, Watson, et al., MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE ("Молекулярна біологія гену"), The Benjamin/Cummings Pub. Co., стор. 224 (4-те видання 1987)). Такі показові заміщення переважно здійснюють відповідно до тих, що вказані у Таблицях II і III(a-b). Наприклад, такі зміни включають заміщення будь-якого з ізолейцину (I), валіну (V) та лейцину (L) будь-якою іншою з цих гідрофобних амінокислот; аспарагінової кислоти (D) глютаміновою кислотою (E) та навпаки; глютаміну (Q) аспарагіном (N) і навпаки; та серину (S) треоніном (T) і навпаки. Інші заміщення також можна вважати консервативними залежно від довколишнього середовища конкретної амінокислоти та його ролі у тривимірній структурі білка. Наприклад, гліцин (G) та аланін (A) часто можуть бути взаємозамінними, так само як і аланін (A) та валін (V). Метіонін (M), який є відносно гідрофобним, часто може чергуватися з лейцином та ізолейцином й іноді з валіном. Лізин (K) та аргінін (R) є часто взаємозамінними в місцях, де істотною ознакою амінокислотного залишку є його заряд і відмінні рК цих двох амінокислотних залишків не є значними. Інші зміни також можна вважати "консервативними" в особливих середовищах (див., наприклад, наведену тут Таблицю III(a) нижче; стор. 13-15 "Biochemistry" ("Біохімія"), 2-ге видання Люберта Страйера (Lubert Stryer) (Стенфордський університет); Henikoff et al., PNAS 1992 Том. 89 10915-10919; Lei et al., J Biol Chem 19 травня 1995 р.; 270(20):11882-11886). Інші заміщення також припустимі і можуть бути визначені емпіричним шляхом або відповідно до відомих консервативних заміщень.

Термін "цитотоксичний засіб" стосується речовини, яка інгібує або запобігає експресійній активності клітин, функціонуванню клітин та/або спричиняє руйнування клітин. Цей термін розуміють як такий, що включає радіоактивні ізотопи, хіміотерапевтичні засоби і токсини, такі як токсини малих молекул або токсини, активні під впливом ферментів, бактерійного, грибового, рослинного або тваринного походження, у тому числі їх фрагменти та/або варіанти. Прикладами цитотоксичних засобів є, але це не є обмеженням, ауристатини (наприклад, ауристатин Е, ауристатин F, MMAE та MMAF), ауроміцини, мейтанзиноїди, рицин, рициновий А-ланцюг, комбрестатин, дуокарміцини, доластатини, доксорубіцин, даунорубіцин, таксоли, цисплатин, сс1065, бромід етидію, мітоміцин, етопозид, тенопозид, вінкристин, вінбластин, колхіцин, дигідроксіантрацидін, актиноміцин, дифтерійний токсин, екзотоксин синегнійної палички (PE) А, PE40, абрин, абриновий А-ланцюг, модециновий А-ланцюг, альфа-сарцин,

гелонін, мітогелін, ретстриктоцин, феноміцин, еноміцин, курицин, кротин, каліхеаміцин, інгібітор мильнянки лікарської і глюкокортикоїдні та інші хіміотерапевтичні засоби, а також радіоізотопи, такі як At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} або 213 , P^{32} , та радіоактивні ізотопи Lu, у тому числі Lu^{177} . Антитіла також можуть бути кон'юговані з протираковим активувальним ферментом

5 проліків, здатним перетворювати проліки на їх активну форму.

Використаний тут термін "діатіла" стосується малих фрагментів антитіла з двома антиген-зв'язувальними сайтами, причому фрагменти містять варіабельний домен важкого ланцюга (V_H), сполучений з варіабельним доменом легкого ланцюга (V_L) в одному поліпептидному ланцюгу (V_H-V_L). При використанні лінкера, що є надто коротким для того, щоб дозволили

10 утворення пар між двома доменами в одному ланцюгу, домени змушені утворювати пари з комплементарними доменами іншого ланцюга та створювати два антиген-зв'язувальні сайти. Більш докладно діатіла описані, наприклад, у патенті EP 404,097; міжнародній заявці WO 93/11161; і Холінгером та ін. (Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48 (1993)).

Термін "виснажувати" в контексті дії зв'язувального агента 158P1D7 на клітини, що експресують 158P1D7, стосується зниження кількості або видалення клітин, що експресують 158P1D7.

Термін "генний продукт" використаний тут для позначення пептиду/білка або мРНК. Наприклад, "генний продукт за винаходом" іноді в цьому описі називають "раковою амінокислотою послідовністю", "раковим білком", "білком раку, вказаного у Таблиці I", "раковою мРНК", "мРНК раку, вказаного у Таблиці I", тощо. В одному втіленні раковий білок кодують нуклеїновою кислотою за Фігурою 1. Раковий білок може бути фрагментом або, як альтернатива, повнорозмірним білком, кодованим нуклеїновими кислотами за Фігурою 1. В одному втіленні ракову амінокислотну послідовність використовують для визначення ідентичності або подібності послідовності. В іншому втіленні послідовності є природними

25 алейними варіантами білка, кодованого нуклеїновою кислотою за Фігурою 1. В іншому втіленні послідовності є варіантами послідовності, як це буде описано далі.

"Гетерокон'югатні" антитіла є придатними для застосування у способах та композиціях за винаходом. Використаний тут термін "гетерокон'юговане антитіло" стосується двох ковалентно сполучених антитіл. Такі антитіла можуть бути одержані із використанням способів, відомих у

30 синтетичній хімії білків, у тому числі із застосуванням перехресно-зшивальних агентів. Див., наприклад, патент США №4,676,980.

Термін "гомолог" стосується молекули, яка проявляє гомологію до іншої молекули, наприклад, наявності послідовностей хімічних залишків, які є однаковими або подібними у відповідних положеннях.

В одному втіленні передбачене тут антитіло є "людським антитілом". Використаний тут термін "людське антитіло" стосується антитіла, в якому по суті всі послідовності легкого ланцюга і послідовності важкого ланцюга, у тому числі ділянки, що визначають компліментарність (CDR), походять з людських генів. В одному втіленні людські моноклональні антитіла одержують тріома-технологією, технологією людських В-клітин (див., наприклад, Kozbor, et al., Immunol. Today 4: 72 (1983)), технологією трансформації ЕВБ (див., наприклад, Cole et al. MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY ("Моноклональні антитіла і лікування раку") 77-96 (1985)) або шляхом застосування фагового дисплею (див., наприклад, Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581 (1991)). У конкретному втіленні людське антитіло одержують від трансгенної миші. Технології одержання таких від частково до повністю людських антитіл відомі

45 у цій галузі, і може бути застосована будь-яка з таких технологій. Відповідно до одного такого втілення, якому надають особливу перевагу, послідовності повністю людських антитіл одержують в трансгенній миші, створеній для експресії генів людських антитіл важкого та легкого ланцюгів. Приклад опису одержання трансгенних мишей, що виробляють людські антитіла, наведений у міжнародній заявці WO 02/43478 та патенті США №6,657,103 (Abgenix) та їх продовженнях. В-клітини трансгенних мишей, які виробляють бажане антитіло, потім можуть бути конденсовані для одержання лінії клітин гібридами для безперервного вироблення антитіла. Див., наприклад, патенти США №5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016; і 5,545,806; статтю Якововіца (Jakobovits, Adv. Drug Del. Rev. 31:33-42 (1998)) та Гріна (Green, et al., J. Exp. Med. 188:483-95 (1998)).

Використаний тут термін "гуманізоване антитіло" стосується форм антитіл, які містять послідовності нелюдських (наприклад, мишачих) антитіл, а також людські антитіла. Такі антитіла є химерними антитілами, що містять мінімальну послідовність, виведену з нелюдського імуноглобуліну. Загалом, гуманізоване антитіло міститиме по суті всі із принаймні одного, і звичайно двох, варіабельних доменів, в яких всі або по суті всі гіперваріабельні петлі

60 відповідають петлям нелюдського імуноглобуліну, і всі або по суті всі FR-ділянки є ділянками

людської імуноглобулінової послідовності. Гуманізоване антитіло необов'язково також міститиме принаймні частину імуноглобулінової константної ділянки (Fc), звичайно людського імуноглобуліну. Див., наприклад, патент США Кабіллі (Cabilly) №4,816,567; статтю Квіна та ін. (Queen et al. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033); і статтю "Конструювання антитіл: практичний підхід" (ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH (Oxford University Press 1996)). Використані тут терміни "інгібувати" або "інгібування" означають знижувати на вимірювану кількість або повністю запобігати.

Фрази "ізолюваний" або "біологічно чистий" стосуються матеріалу, який є значною мірою або по суті вільний від компонентів, що звичайно супроводжують матеріал, яким він є у природному стані. Відповідно, ізолювані пептиди за винаходом переважно не містять матеріалів, які звичайно пов'язані з пептидами у їх середовищі *in situ*. Наприклад, полінуклеотид називають "ізолюваним", коли він по суті відокремлений від забруднювальних полінуклеотидів, що відповідають або є комплементарними до генів, окрім генів 158P1D7, або які кодують поліпептиди, окрім генного продукту 158P1D7 чи його фрагментів. Досвідчений спеціаліст може легко застосувати процедури ізолювання нуклеїнової кислоти для одержання ізолюваного полінуклеотиду 158P1D7. Білок називають "ізолюваним", наприклад, при застосуванні фізичних, механічних або хімічних способів для видалення білків 158P1D7 із клітинних складників, які звичайно пов'язані з білком. Досвідчений спеціаліст може легко застосувати стандартні методи очищення для одержання ізолюваного білка 158P1D7. Як альтернатива, ізолюваний білок може бути одержаний хімічними засобами.

Підходящі "мітки" включають радіонукліди, ферменти, субстрати, кофактори, інгібітори, флуоресцентні речовини, хемілюмінісцентні речовини, магнітні частки та подібне. До патентів, в яких розкрито застосування таких міток, відносяться патенти США №№ 3,817,837, 3,850,752, 3,939,350, 3,996,345, 4,277,437, 4,275,149 і 4,366,241. Крім того, передбачені у цьому винаході антитіла можуть бути використані як антиген-зв'язувальний компонент фтортил. Див., наприклад, Зейтун та ін. (Zeytun et al., Nat. Biotechnol. 21:1473-79 (2003)).

Термін "ссавець" стосується будь-якого організму, що належить до класифікації ссавців, у тому числі мишей, пацюків, кролів, собак, кішок, корів, коней та людей. В одному втіленні винаходу ссавцем є миша. В іншому втіленні винаходу ссавцем є людина.

Терміни "метастатичний рак" і "метастатичне захворювання" означають види раку, що поширився на регіональні лімфатичні вузли або віддалені ділянки, і включають стадію D захворювання за системою Американської урологічної асоціації (AUA) та стадію T_xN_xM₊ за системою класифікації злоякісних пухлин (TNM).

Терміни "модулятор", "випробувана сполука" чи "потенційні ліки" або їх граматичні еквіваленти, використані у цьому описі, описують будь-яку молекулу, наприклад, білок, олігопептид, малу органічну молекулу, полісахарид, полінуклеотид тощо, що підлягають випробовуванню на визначення здатності прямо чи непрямо змінювати раковий фенотип або експресію ракової послідовності, наприклад, нуклеотидної або білкової послідовності, або дію ракових послідовностей (наприклад, сигналювання, експресію генів, взаємодію білків тощо). В одному аспекті модулятор нейтралізуватиме дію білка раку за винаходом. Під "нейтралізувати" мають на увазі, що активність білка інгібується або блокується поряд із відповідним впливом на клітину. В іншому аспекті модулятор нейтралізуватиме дію гену та його відповідного білка за винаходом шляхом нормалізування рівнів згаданого білка. У втіленнях, яким надають перевагу, модулятори змінюють профілі експресії або нуклеїнові кислоти профілю експресії чи білки, передбачені цим винаходом, або шляхи ефектора, що лежить нижче. В одному втіленні модулятор пригнічує фенотип раку, наприклад, до "відбитку пальця" здорової тканини. В іншому втіленні модулятор індукуює фенотип раку. Загалом, множину аналізованих сумішей досліджують паралельно з різними концентраціями засобу для одержання диференційованої реакції на різні концентрації. Звичайно одна з цих концентрацій слугує негативним контролем, тобто при нульовій концентрації або нижче рівня виявлення.

Модулятори, потенційні ліки або випробувані сполуки охоплюють численні хімічні класи, хоча звичайно вони є органічними молекулами, переважно малими органічними сполуками, що мають молекулярну вагу понад 100 і менш ніж близько 2500 Дальтонів. Крайні малі молекули важать менш ніж 2000, або менш ніж 1500, або менш ніж 1000, або менш ніж 500 Д. Потенційні засоби містять функціональні групи, необхідні для структурної взаємодії з білками, особливо для утворення водневого зв'язку, і звичайно включають принаймні амінову, карбонільну, гідроксильну або карбоксильну групу, краще принаймні дві з функціональних хімічних груп. Потенційні засоби часто містять циклічний вуглець або гетероциклічні структури та/або ароматичні чи поліароматичні структури, заміщені однією або більше функціональними групами із вказаних вище. Модулятори також містять біомолекули, такі як пептиди, сахариди, жирні

кислоти, стероїди, пурини, піримідини, похідні, структурні аналоги або їх поєднання. Особливу перевагу надають пептидам. Одним класом модуляторів є пептиди, наприклад, що містять від п'яти до близько 35 амінокислот, причому перевагу надають наявності від п'яти до близько 20 амінокислот, а особливу перевагу надають наявності від 7 до близько 15 амінокислот. Краще, якщо модуляторний білок раку є розчинним, містить не-трансмембранну ділянку та/або має N-термінальний Цис для сприяння розчинності. В одному втіленні С-кінець фрагмента тримають як вільну кислоту, а N-кінець є вільним аміном для сприяння зв'язуванню, тобто, з цистеїном. В одному втіленні білок раку за винаходом кон'югований з імуногенним засобом, що обговорюється в цьому описі. В одному втіленні білок раку кон'югований з БСА (бичачим сироватковим альбуміном). Пептиди за винаходом, наприклад, довжини, якій надають перевагу, можуть бути сполучені один з одним або з іншими амінокислотами для створення довшого пептиду/білка. Модуляторні пептиди можуть бути гідролізатами природних білків, як вказано вище, довільно вибраними пептидами або "зміщеними" довільно вибраними пептидами. У втіленні, якому надають перевагу, модуляторами на основі пептиду або білка є антитіла та їхні фрагменти, як визначено в цьому описі.

Використаний у цьому описі термін "моноклональне антитіло" стосується антитіла, одержаного з популяції по суті гомогенних антитіл, тобто окремі антитіла, що містять популяцію, є ідентичними, окрім можливих природних мутацій, які можуть бути наявними в незначній кількості. Моноклональні антитіла є високо специфічними, спрямованими проти одного антигенного епітопу. На відміну від цього, препарати звичайного (поліклонального) антитіла звичайно містять множину антитіл, спрямованих проти (або які є специфічними до) різних епітопів. В одному втіленні поліклональне антитіло містить множину моноклональних антитіл з різними епітопними специфічностями, афінностями або авідностями в одному антигені, що містить множину антигенних епітопів. Модифікатор "моноклональне" позначає ознаку антитіла як таке, що його одержують із по суті гомогенної популяції антитіл, і його не треба розуміти як такий, що передбачає одержання антитіла якимось конкретним способом. Наприклад, моноклональні антитіла, що підлягають використанню відповідно до цього винаходу, можуть бути одержані гібридомним способом, який було вперше описано Колером та ін. (Kohler et al., Nature 256: 495 (1975)), або можуть бути одержані методами рекомбінантної ДНК (див., наприклад, патент США №4,816,567). "Моноклональні антитіла" також можуть бути ізольовані з клонотек фагових антитіл із застосуванням технічних прийомів, описаних, наприклад, Клаксоном та ін. (Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991)) та Марксом та ін. (Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991)). Ці моноклональні антитіла звичайно зв'язуватимуться із Kd принаймні близько 1 кмоль, частіше принаймні близько 300 нмоль, типово принаймні близько 30 нмоль, краще принаймні близько 10 нмоль, ще краще принаймні близько 3 нмоль або краще, якщо її звичайно визначають за допомогою імуно-ферментного аналізу (ІФА).

"Фармацевтична допоміжна речовина" містить матеріал, такий як ад'ювант, носій, речовина для регулювання рівня рН та буферна речовина, речовини, що регулюють тонічність, зволожувальні засоби, консерванти та подібне.

"Фармацевтично прийнятний" стосується нетоксичної, інертної композиції та/або композиції, що є фізіологічно сумісною з людиною або іншими ссавцями.

Термін "полінуклеотид" означає полімерну форму нуклеотидів, що мають принаймні 10 основ або основних пар за довжиною, рибонуклеотидів або деоксинуклеотидів, або модифіковану форму будь-якого типу нуклеотиду, і включає одно- і дволанцюгові форми ДНК та/або РНК. У цій галузі техніки цей термін часто використовують як синонім до "олігонуклеотид". Полінуклеотид може містити нуклеотидну послідовність, що розкрита в цьому описі, в якій тимідином (Т), показаним, наприклад, на Фігурі 1, також може бути урацил (U); це визначення стосується відмінностей між хімічними структурами ДНК і РНК, зокрема, спостереження, що однією з чотирьох основних основ в РНК є урацил (U) замість тимідину (Т).

Термін "поліпептид" означає полімер із принаймні близько 4, 5, 6, 7 або 8 амінокислотами. В усьому описі використовують стандартні трибуквені (див. Таблицю III) або однобуквені позначення амінокислот. У цій галузі цей термін часто використовують як синонім до "пептид" або "білок".

"Рекомбінантною" молекулою ДНК або РНК є молекула ДНК або РНК, яка зазнала молекулярної маніпуляції *in vitro*.

Використаний тут термін "одноланцюгове Fv" або "scFv" або "одноланцюгове" антитіло стосується фрагментів антитіл, що містять V_H і V_L домени антитіла, де ці домени присутні в одному поліпептидному ланцюгу. Загалом, Fv поліпептид додатково містить поліпептидний лінкер між V_H і V_L доменами, який дозволяє sFv утворювати бажану структуру для зв'язування антигену. Для огляду sFv, див. Платтун "Фармакологія моноклональних антитіл" (Pluckthun, THE

PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, том. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, Нью-Йорк, стор. 269-315 (1994)).

Використані тут терміни "специфічний", "специфічним чином зв'язується" та "зв'язує специфічним чином" стосуються селективного зв'язування антитіла з епітопом антигену-мішені.

Антитіла можуть бути випробувані для визначення специфічності зв'язування шляхом порівняння зв'язування з належним антигеном із зв'язуванням з нерелевантним антигеном або сумішшю антигенів за даних умов. Якщо антитіло зв'язується з належним антигеном принаймні у 2, 5, 7, а краще у 10 разів частіше, ніж з нерелевантним антигеном або сумішшю антигенів, тоді його вважають специфічним. В одному втіленні специфічним антитілом є антитіло, яке зв'язується лише з антигеном 158P1D7, але не зв'язується з нерелевантним антигеном. В іншому втіленні специфічним антитілом є антитіло, яке зв'язується з людським антигеном 158P1D7, але не зв'язується з нелюдським антигеном 158P1D7 з 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або більшою амінокислотною гомологією з антигеном 158P1D7. В іншому втіленні специфічним антитілом є антитіло, яке зв'язується з антигеном 158P1D7 людини і зв'язується з антигеном 158P1D7 миші, але з більш високим ступенем зв'язування з антигеном людини. В іншому втіленні специфічним антитілом є антитіло, яке зв'язує антиген 158P1D7 людини і зв'язує антиген 158P1D7 примата, але з більш високим ступенем зв'язування антигену людини. В іншому втіленні специфічне антитіло зв'язується з антигеном 158P1D7 людини та будь-яким нелюдським антигеном 158P1D7, але із більш високим ступенем зв'язування антигену людини або будь-якої їх комбінації.

Використані тут терміни "лікувати" або "терапевтичний" та граматично споріднені до них терміни стосуються будь-якого покращення будь-якого наслідку хвороби, такого як подовжене виживання, зменшення смертності та/або полегшення побічних ефектів, які є побічними продуктами альтернативного терапевтичного впливу; у цій галузі є добре зрозумілим, що хоча перевагу надають повному усуненню хвороби, це не є вимогою для лікувальних дій.

Термін "варіант" стосується молекули, яка проявляє відхилення від описаного типу або норми, такої як білок, яка має один або більше різні амінокислотні залишки у відповідному положенні або положеннях конкретного описаного білка (наприклад, білка 158P1D7, показаного на Фігурі 1). Аналог є прикладом варіантного білка. Іншими прикладами варіантів є сплайсингові ізоформи та одонуклеотидні поліморфізми (SNP).

"Білки 158P1D7" та/або "споріднені до 158P1D7 білки" за винаходом включають білки, які конкретно описані в цьому описі (див. Фігуру 1), а також алельні варіанти, варіанти консервативного заміщення, аналоги та гомологи, які можуть бути ізольовані/одержані та охарактеризовані без проведення зайвих експериментів із дотриманням описаних тут способів або тих, що є легко доступними у цій галузі. До них також належать білки злиття, які поєднують частини різних білків 158P1D7 або їх фрагменти, а також білки злиття білка 158P1D7 та гетерологічного поліпептиду. Такі білки 158P1D7 разом називають спорідненими до 158P1D7 білками, білками за винаходом або 158P1D7. Термін "споріднений до 158P1D7 білок" стосується поліпептидного фрагменту або послідовності білка 158P1D7 із 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 або понад 25 амінокислотами; або щонайменше із 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 330, 335, 345, 355, 365, 375, 385, 395, 405, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575, 600, 625, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 830, 835, 840, 841 або більше амінокислотами.

II.) Антитіла до 158P1D7

Інший аспект винаходу забезпечує антитіла, які зв'язуються зі спорідненими до 158P1D7 білками (див. Фігуру 1). В одному втіленні антитілом, яке зв'язується зі спорідненими до 158P1D7 білками, є антитіло, яке специфічним чином зв'язується з білком 158P1D7, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO.:2. Антитіло, яке специфічним чином зв'язується з білком 158P1D7, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO.: 2, включає антитіла, які можуть зв'язуватись з іншими спорідненими до 158P1D7 білками. Наприклад, антитіла, які зв'язуються з білком 158P1D7, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO.:2, можуть зв'язуватись зі спорідненими до 158P1D7 білками, такими як варіанти 158P1D7 та його гомологи чи аналоги.

Антитіла до 158P1D7 за винаходом є особливо придатними для проведення прогностичного аналізу (див., наприклад, Таблицю I), візуалізації, діагностики і методології терапії раку. Подібно до цього, такі антитіла є придатними для лікування та/або прогнозування раку сечового міхура та інших видів раку, в межах того, наскільки 158P1D7 також експресується або надмірно експресується в цих інших видах раку. Крім того, антитіла до 158P1D7 за винаходом є терапевтично придатними при лікуванні раку, пов'язаного з експресією 158P1D7, особливо раку

сечового міхура, такого як розповсюджений або метастатичний рак сечового міхура, коли антитіла кон'юговані з описаним тут монометилауристатином Е (ММАЕ).

У цій галузі добре відомі різноманітні способи одержання антитіл, зокрема моноклональних антитіл. Наприклад, антитіл, які можуть бути одержані шляхом імунізації підходящого хазяїна-савця із застосуванням спорідненого до 158P1D7 білка, пептиду чи фрагменту, в ізолюваній або імунокон'югованій формі (Antibodies: A Laboratory Manual ("Антитіла: лабораторний посібник"), CSH Press, Eds., Harlow, and Lane (1988); Harlow, Antibodies ("Антитіла"), Cold Spring Harbor Press, Нью-Йорк (1989)). Крім того, також можуть бути використані білки злиття 158P1D7, такі як 158P1D7 GST-білок злиття. В окремому втіленні одержують GST- білок злиття, що містить всі або більшість амінокислотних послідовностей за Фігурою 1, і потім використовують як імуноген для одержання відповідних антитіл. В іншому втіленні синтезують споріднений до 158P1D7 білок та використовують як імуноген.

Крім того, використовують відомі у цій галузі технічні прийоми імунізації "оголеною" ДНК (з клітинами, що експресують очищений споріднений до 158P1D7 білок чи 158P1D7, або без них) для одержання імунної відповіді на кодований імуноген (для огляду див. Donnelly et al., 1997, Ann. Rev. Immunol. 15: 617-648).

Амінокислотна послідовність білка 158P1D7, показана на Фігурі 1, може бути проаналізована для обрання специфічних ділянок білка 158P1D7 для вироблення антитіл. Наприклад, аналізи гідрофобності та гідрофільності амінокислотної послідовності 158P1D7 використовують для визначення гідрофільних ділянок у структурі 158P1D7. Ділянки білка 158P1D7, що проявляють імуногенну структуру, а також інші ділянки і домени можуть бути легко ідентифіковані із застосуванням різноманітних інших методів, відомих у цій галузі, таких як аналізи Чоу-Фасмана (Chou-Fasman), Гарнье-Робсона (Garnier-Robson), Кайт-Дулітла (Kyte-Doolittle), Айзенберга (Eisenberg), Карплуса-Шульца (Karplus-Schultz) або Джеймса-Вольфа (Jameson-Wolf). Профілі гідрофільності можуть бути одержані із застосуванням методу Хоппа та Вудса (Hopp, T.P. and Woods, K.R., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3824-3828). Профілі гідропатності можуть бути одержані із застосуванням методу Кайта і Дулітла (Kyte, J. and Doolittle, R.F., 1982, J. Mol. Biol. 157:105-132). Профілі доступних осадів у процентному (%) відношенні можуть бути одержані із застосуванням методу Яніна (Janin J., 1979, Nature 277:491-492). Профілі середньої гнучкості можуть бути одержані із застосуванням методу Баскарана та Понусвами (Bhaskaran R., Ponnuswamy P.K., 1988, Int. J. Pept. Protein Res. 32:242-255). Профілі бета-згину можуть бути одержані із застосуванням методу Деліджа та Роукса (Deleage, G., Roux B., 1987, Protein Engineering 1:289-294). Таким чином, кожна ділянка, визначена будь-якою із цих програм або методів, входить до обсягу цього винаходу. Методи одержання антитіл до 158P1D7, яким надають перевагу, додатково проілюстровані за допомогою наведених далі прикладів. Способи одержання білка або поліпептиду для застосування як імуногенів є добре відомими у цій галузі. Також добре відомі у цій галузі способи одержання імуногенних кон'югатів білка з носієм, таких як БСА, KLH або інших білків-носіїв. У деяких випадках застосовують пряму кон'югацію із використанням, наприклад, карбодіімідних реактивів; у інших випадках ефективними є зв'язувальні реактиви, такі як ті, що їх постачає компанія Pierce Chemical Co., Рокфорд, штат Іллінойс. Введення імуногену 158P1D7 часто здійснюють шляхом ін'єкції впродовж підходящого періоду часу та із застосуванням підходящого ад'юванта, що є зрозумілим у цій галузі. Під час схеми імунізації можуть бути взяті титри антитіл для визначення адекватності утворення антитіл.

Моноклональні антитіла до 158P1D7 можуть бути одержані різними засобами, добре відомими у цій галузі. Наприклад, іморталізовані лінії клітин, які секретують бажане моноклональне антитіло, одержують із використанням стандартної гібридомної технології Келера (Kohler) та Мільштейна (Milstein) або модифікацій, що роблять безсмертними В-клітини, які виробляють антитіла, що є загально відомим. Іморталізовані лінії клітин, що секретують бажані антитіла, сортують за допомогою імуноаналізу, в якому антигеном є споріднений до 158P1D7 білок. Після визначення відповідної іморталізованої культури клітин клітини можуть бути розширені і одержані антитіла або з *in vitro* культур, або з асцитичної рідини.

Антитіла або фрагменти за винаходом також можуть бути одержані рекомбінантними засобами. Ділянки, які специфічним чином зв'язуються з бажаними ділянками білка 158P1D7, також можуть бути одержані в контексті прищеплених антитіл химерної ділянки або ділянки, що визначає компліментарність (CDR), що походять з множинних видів. Також можуть бути одержані гуманізовані або людські антитіла до 158P1D7, і їм надають перевагу при застосуванні у терапевтичному контексті. Добре відомими є способи гуманізації мишачих та інших нелюдських антитіл шляхом заміщення однієї або більше із CDR нелюдських антитіл відповідними послідовностями антитіл людини (див., наприклад, Jones et al., 1986, Nature 321:

522-525; Riechmann et al., 1988, Nature 332: 323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science 239: 1534-1536). Також див. Carter et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 та Sims et al., 1993, J. Immunol. 151: 2296.

У втіленні, якому надають перевагу, антитіла за цим винаходом містять повністю людські антитіла до 158P1D7 (моноклональні антитіла до 158P1D7). Різні методи у цій галузі забезпечують засоби одержання повністю людських моноклональних антитіл до 158P1D7. Наприклад, втілення, якому надають перевагу, забезпечує технічні прийоми із застосуванням трансгенних мишей, інактивованих для вироблення антитіл, сконструйованих з локусами людських важких та легких ланцюгів, що їх називають ксеномишами (Xenomouse) (Amgen Fremont, Inc.). Показовий опис одержання трансгенних мишей, що виробляють людські антитіла, можна знайти у патенті США №6,657,103. Також див. патенти США №№5,569,825, 5,625,126, 5,633,425, 5,661,016 та 5,545,806; і Мендес та ін. (Mendez, et. al. Nature Genetics, 15: 146-156 (1998)); Келерман та Грін (Kellerman, S.A. & Green, L.L., Curr. Opin. Biotechnol 13, 593-597 (2002)).

Крім того, людські антитіла за винаходом можуть бути одержані із застосуванням миші HuMAb (Medarex, Inc.), яка містить мінілокуси людського гену імуноглобуліну, що кодують неперебудовані імуноглобулінові послідовності людини важкого (мю та гамма) та легкого каппа ланцюгів, разом із цільовими мутаціями, що інактивують ендегенні локуси мю та каппа ланцюгів (див., наприклад, Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859).

В іншому втіленні повністю людські антитіла за винаходом можуть бути одержані із використанням миші, що несе людські імуноглобулінові послідовності на трансгенах і трансхромосомах, такої як миша, що несе людський трансген важкого ланцюга та людську трансхромосому легкого ланцюга. Такі миші, які в цьому описі називають "КМ миші", описані Томізука та ін. (Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727) та в публікації РСТ WO 02/43478 на ім'я Томізука та ін. (Tomizuka, et al.).

Людські моноклональні антитіла за винаходом також можуть бути одержані із застосуванням методів фагового відображення для сортування клонотек генів людських імуноглобулінів. Такі методи фагового відображення для ізолювання людських антитіл є прийнятими у цій галузі. Див., наприклад: патенти США №№ 5,223,409, 5,403,484 і 5,571,698 на ім'я Ладнер та ін. (Ladner et al.); патенти США №№ 5,427,908 і 5,580,717 на ім'я Дойер та ін. (Dower et al.); патенти США №№ 5,969,108 і 6,172,197 на ім'я МакКаферті та ін. (McCafferty et al.); та патенти США №№ 5,885,793, 6,521,404, 6,544,731, 6,555,313, 6,582,915 і 6,593,081 на ім'я Гріфітс та ін. (Griffiths et al.).

Людські моноклональні антитіла за винаходом також можуть бути одержані із використанням мишей із ТКІД, у яких були відновлені людські імунні клітини, так що може бути одержана відповідь людського антитіла після імунізації. Такі миші описані, наприклад, у патентах США №№ 5,476,996 і 5,698,767 на ім'я Вільсон та ін. (Wilson et al.).

Людські моноклональні антитіла за винаходом також можуть бути одержані із застосуванням мишей, у яких геномні послідовності, що несуть ендегенні мишачі варіабельні сегменти важкого ланцюга імуноглобуліну (сегменти VH, DH та JH) та/або локуси легкого ланцюга каппа (VK та JK), були заміщені, повністю або частково, людськими геномними послідовностями, що несуть варіабельні сегменти нетрансформованих зародкових ліній важкого ланцюга людського імуноглобуліну (VH, DH і JH) та/або локуси легкого ланцюга каппа (VK та JK) (Regenron, Терітаун, штат Нью-Йорк). Див., наприклад, патенти США №№ 6,586,251, 6,596,541, 7,105,348, 6,528,313, 6,638,768 і 6,528,314.

В одному втіленні моноклональні антитіла до 158P1D7 за винаходом містять варіабельні ділянки важкого та легкого ланцюгів антитіла, позначеного Ha15-10ac12, виробленого клітиною яєчника китайського хом'яка (CHO), депонованою в Американській колекції типових культур (ATCC) за інвентарним номером PTA-13102 (див. Фігуру 3), або важкі та легкі варіабельні ділянки, що містять амінокислотні послідовності, що є гомологічними до амінокислотних послідовностей варіабельних ділянок важкого та легкого ланцюгів Ha15-10ac12, такі як їх функціональні фрагменти, причому антитіла зберігають бажані функціональні властивості моноклональних антитіл до 158P1D7 за винаходом. Варіабельна ділянка важкого ланцюга Ha15-10ac12 має амінокислотну послідовність, що простягається з 1-го Q залишку до 120-го S залишку SEQ ID NO:7, а варіабельна ділянка легкого ланцюга Ha15-10ac12 має амінокислотну послідовність, що простягається з 1-го D залишку до 113-го R залишку SEQ ID NO:8.

В одному втіленні, антитіло до 158P1D7 містить CDR важкого ланцюга варіабельної ділянки важкого ланцюга Ha15-10ac12, таку як CDR важкого ланцюга 1, 2 та/або 3 варіабельної ділянки важкого ланцюга Ha15-10ac12, наприклад, CDR1, CDR2 та/або CDR3 амінокислотної послідовності, вказану як SEQ ID NO: 7, визначену будь-якою відомою схемою нумерації для

визначення CDR, такою як будь-яка з тих, що описані в цьому описі. В одному втіленні антитіло до 158P1D7 містить CDR легкого ланцюга варіабельної ділянки легкого ланцюга HA15-10ac12, таку як CDR 1, 2 та/або 3 легкого ланцюга варіабельної ділянки легкого ланцюга HA15-10ac12, наприклад, CDR1, CDR2 та/або CDR3 амінокислотної послідовності, вказаної як SEQ ID NO: 8, визначену будь-якою відомою схемою нумерації для визначення CDR, такою як будь-яка з тих, що описані в цьому описі. В одному аспекті, CDR 1-3 варіабельної ділянки важкого ланцюга Ha15-10ac12 містять амінокислотні послідовності, що простягаються відповідно від залишків 31-35, від залишків 50-66 та від залишків 99-108 SEQ ID NO: 7. В одному аспекті, CDR 1-3 варіабельної ділянки легкого ланцюга Ha15-10ac12 містять амінокислотні послідовності, що простягаються відповідно від залишків 24-39, від залишків 55-61 та від залишків 94-102 SEQ ID NO: 8. Отже, у деяких аспектах, антитіло до 158P1D7 містить CDR1 важкого ланцюга, що має залишки 31-35 SEQ ID NO: 7, CDR2 важкого ланцюга, що має залишки 50-66 SEQ ID NO: 7, та/або CDR3 важкого ланцюга, що має залишки 99-108 SEQ ID NO: 7 та/або CDR1 легкого ланцюга, що має залишки 24-39 SEQ ID NO: 8, CDR2, що має залишки 55-61 SEQ ID NO: 8, та/або CDR3, що має залишки 94-102 SEQ ID NO: 8. Також серед запропонованих втілень є антитіла, що конкурують за зв'язування з антигеном з антитілами, що мають такі послідовності варіабельної ділянки та/або CDR. У деяких втіленнях, запропоноване антитіло містить константну ділянку. Константна ділянка може належати до будь-якого підкласу константних ділянок. В одному втіленні, можуть бути використані константна ділянка людського IgG2 як константна ділянка важкого ланцюга і константна ділянка людського Ig каппа як константна ділянка легкого ланцюга.

Наприклад, винахід забезпечує ізольоване моноклональне антитіло або його частину, що зв'язує антиген, яке містить варіабельну ділянку важкого ланцюга та варіабельну ділянку легкого ланцюга, де:

(а) варіабельна ділянка важкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, що є принаймні на 80 % гомологічною до амінокислотної послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга, показаної на Фігурі 3; та

(b) варіабельна ділянка легкого ланцюга містить амінокислотну послідовність, що є принаймні на 80 % гомологічною до амінокислотної послідовності варіабельної ділянки легкого ланцюга, показаної на Фігурі 3.

В інших втіленнях V_H та/або V_L амінокислотні послідовності можуть бути на 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % гомологічними до послідовностей V_H і V_L , показаних на Фігурі 3.

В іншому втіленні винахід забезпечує ізольоване моноклональне антитіло або його частину, що зв'язує антиген, яке містить гуманізовану варіабельну ділянку важкого ланцюга та гуманізовану варіабельну ділянку легкого ланцюга, де:

(а) варіабельна ділянка важкого ланцюга містить одну, дві або три ділянки, що визначають компліментарність (CDR), які мають амінокислотну послідовність або послідовності CDR варіабельної ділянки 1, 2 та/або 3 важкого ланцюга варіабельної ділянки важкого ланцюга, показаної на Фігурі 3, визначеної будь-якою відомою схемою нумерації, такою як будь-яка з тих, що описані в цьому описі;

(b) варіабельна ділянка легкого ланцюга містить одну, дві або три ділянки, що визначають компліментарність (CDR), які мають амінокислотну послідовність або послідовності CDR варіабельної ділянки 1, 2 та/або 3 легкого ланцюга варіабельної ділянки важкого ланцюга, показаної на Фігурі 3, визначеної будь-якою відомою схемою нумерації, такою як будь-яка з тих, що описані в цьому описі.

В іншому втіленні, антитіло або його частина, що зв'язує антиген, конкурує за зв'язування з антитілом, що має таку або такі CDR важкого та/або легкого ланцюга CDR.

Сконструйовані антитіла за винаходом включають антитіла, в яких були здійснені модифікації в каркасних залишках всередині V_H та/або V_L (наприклад, для покращення властивостей антитіла). Звичайно такі каркасні модифікації роблять для зниження імуногенності антитіла. Наприклад, одним підходом є "зворотна мутація" одного або більше каркасних залишків до відповідної зародкової послідовності. Більш конкретно, антитіло, що зазнало соматичної мутації, може містити каркасні залишки, які відрізняються від зародкової послідовності, з якої було виведено антитіло. Такі залишки можуть бути встановлені шляхом порівняння каркасних послідовностей антитіла із зародковими послідовностями, з яких було виведено антитіло. Для повернення послідовностей каркасних ділянок до їх зародкової конфігурації соматичні мутації можуть зазнати "зворотної мутації" до зародкової послідовності, наприклад, за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу або ПЦР-опосередкованого

мутагенезу (наприклад, "мутовані назад" з лейцину до метіоніну). Такі антитіла "зворотної мутації" також входять до обсягу цього винаходу.

Інший вид каркасної модифікації стосується мутації одного або більше залишків у каркасній ділянці або навіть в одній або більше ділянках CDR для видалення епітопів Т-лімфоцитів для зниження у такий спосіб потенційної імуногенності антитіла. Цей підхід також називають "деімунізацією" і він докладно описаний у патентній публікації США №2003/0153043 авторів Кар та ін. (Carr et al.).

На додаток або як альтернатива до модифікацій, що їх здійснюють у межах каркасу або ділянки CDR, антитіла за винаходом можуть бути сконструйовані для включення модифікацій у межах Fc ділянки, звичайно для зміни однієї або більше функціональних властивостей антитіла, таких як період напіввиведення сірки, фіксація комплементу, зв'язування Fc-рецептора та/або антиген-залежна клітинна цитотоксичність. Крім того, моноклональне антитіло до 158P1D7 за винаходом може бути модифіковане хімічним чином (наприклад, одна або більше хімічні частки можуть бути прикріплені до антитіла) або модифіковане для зміни його глікозилювання, також для зміни однієї або більше функціональних властивостей моноклонального антитіла. Кожне з цих втілень більш докладно описане нижче.

В одному втіленні шарнірну ділянку CH1 модифікують таким чином, що змінюється кількість цистеїнових залишків у шарнірі, наприклад, підвищується або знижується. Цей підхід більш докладно описаний у патенті США №5,677,425 авторами Бодмер та ін. (Bodmer et al.). Кількість цистеїнових залишків у шарнірі CH1 змінюють, наприклад, для полегшення складання легких та важких ланцюгів або для підвищення чи зниження стійкості моноклонального антитіла до 158P1D7.

В іншому втіленні Fc-шарнір антитіла мутують для зниження біологічного періоду напіврозпаду моноклонального антитіла до 158P1D7. Більш конкретно, одну або більше амінокислотні мутації вводять у межу ділянку доменів CH2-CH3 фрагменту Fc-шарніра, так що антитіло має погіршене зв'язування зі стафілококовим білком А (SpA) відносно зв'язування із SpA нативного домену Fc-шарніра. Цей підхід описаний більш докладно у патенті США № 6,165,745 авторами Вард та ін. (Ward et al.).

В іншому втіленні моноклональне антитіло до 158P1D7 модифікують для підвищення його біологічного періоду напіввиведення. Можливі різноманітні підходи. Наприклад, можуть бути введені мутації, як описано у патенті США №6,277,375 на ім'я Вард (Ward). Як альтернатива, для підвищення біологічного періоду напіввиведення антитіло може бути змінено в межах ділянки CH1 або CL для уміщення реутилізаційної рецепторзв'язувальної антигенної детермінанти, взятої з двох петель домену CH2 Fc-ділянки IgG, як це описано у патентах США №№ 5,869,046 і 6,121,022 авторами Преста та ін. (Presta et al.).

У ще інших втіленнях Fc ділянку змінюють шляхом заміни принаймні одного амінокислотного залишку іншим амінокислотним залишком для зміни ефекторної функції або функцій моноклонального антитіла до 158P1D7. Наприклад, одна або більше амінокислоти, вибрані зі специфічних залишків амінокислот, можуть бути замінені іншим амінокислотним залишком, так щоб антитіло мало змінену афінність до ефекторного ліганда, але зберігало антиген-зв'язувальну здатність материнського антитіла. Ефекторним лігандом, афінність до якого змінюють, може бути, наприклад, Fc-рецептор або C1-компонент комплементу. Цей підхід описаний більш докладно у патентах США №№ 5,624,821 і 5,648,260, обидва авторами Вінтер та ін. (Winter et al.).

Реакційна здатність антитіл до 158P1D7 зі спорідненим до 158P1D7 білком може бути визначена за допомогою низки добре відомих методів, у тому числі вестерн-блотингом, імунопреципітацією, імуно-ферментним аналізом (ІФА) та FACS-аналізом із застосуванням, за потреби, споріднених до 158P1D7 білків, клітин, що експресують 158P1D7, або їх екстрактів. Антитіло до 158P1D7 або його фрагмент можуть бути мічені детектованим маркером або кон'юговані з другою молекулою. Підходящими детектованими маркерами є, але це не є обмеженням, радіоізотоп, флуоресцентна сполука, біolumінісцентна сполука, хемілюмінесцентна сполука, хелатор металу або фермент. Крім того, бі-специфічні антитіла, що є специфічними для двох або більше епітопів 158P1D7, одержують із використанням методів, що є загальновідомими у цій галузі. Гомодимерні антитіла також можуть бути одержані за допомогою технологій перехресного зшивання, відомих у цій галузі (наприклад, Wolff et al., Cancer Res. 53: 2560-2565).

У ще іншому втіленні, якому надають перевагу, моноклональним антитілом до 158P1D7 за винаходом є антитіло, що містить важкий і легкий ланцюги антитіла, позначеного Ha15-10ac12. Важкий ланцюг Ha15-10ac12 складається з амінокислотної послідовності, що простягається від 1-го Q залишку до 446-го K залишку SEQ ID NO:7, а легкий ланцюг Ha15-10ac12 складається з

амінокислотної послідовності, що простягається від 1-го D залишку до 219-го C залишку SEQ ID NO:8. Його послідовність показана на Фігурах 2 і 3. У кращому втіленні Ha15-10ac12 кон'юговане з цитотоксичним засобом.

Клітину яєчника китайського хом'яка (CHO), що виробляла антитіло, позначену Ha15-10ac12, було надіслано (поштою Federal Express) до Американської колекції типових культур (ATCC), п/с 1549, Манассас, штат Вірджинія 20108, 25 липня 2012 р., і їй було надано інвентарний номер PTA-13102.

III.) Кон'югати антитіло-лікарський засіб у загальних рисах

В іншому аспекті винахід забезпечує кон'югати антитіло-лікарський засіб (ADC), які містять антитіло, кон'юговане з цитотоксичним засобом, таким як хіміотерапевтичний засіб, лікарський засіб, інгібітор росту, токсин (наприклад, ферментативно-активний токсин бактерійного, грибового, рослинного або тваринного походження чи його фрагменти) або радіоактивний ізотоп (тобто радіокон'югат). В іншому аспекті винахід також забезпечує способи застосування кон'югатів антитіло-лікарський засіб. В одному аспекті кон'югат антитіло-лікарський засіб містить будь-яке з описаних тут моноклональних антитіл до 158P1D7, які ковалентно прикріплені до цитотоксичного засобу або детектованого засобу.

Застосування кон'югатів антитіло-лікарський засіб для місцевого доставляння цитотоксичних або цитостатичних засобів, тобто ліків для знищення або інгібування росту клітин пухлини при лікуванні раку (Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drg. Del. Rev.* 26:151-172; патент США №4,975,278), забезпечує цілеспрямоване доставляння лікарської речовини до пухлин та внутрішньоклітинне накопичення в них, коли системне введення цих некон'югованих лікарських засобів може спричинити незадовільні рівні токсичності для здорових клітин, а також для клітин пухлини, які необхідно знищити (Baldwin et al., (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review" ("Носії цитотоксичних засобів в антитілах у терапії раку: Огляд") у виданні *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* ("Моноклональні антитіла '84: Біологічне та клінічне застосування"), A. Pinchera et al. (ed.s), стор. 475-506). У такий спосіб намагаються досягати максимальної ефективності з мінімальною токсичністю. Повідомляли, що і поліклональні, і моноклональні антитіла є придатними до застосування у таких стратегіях (Rowland et al., (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87). Ліками, що їх використовують у цих методах, є дауноміцин, доксорубіцин, метотрексат і віндезин (Rowland et al., (1986) вище). Токсини, що їх використовують у кон'югатах антитіло-токсин, включають бактерійні токсини, такі як дифтерійний токсин, рослинні токсини, такі як рицин, токсини малих молекул, такі як геліданаміцин (Mandler et al (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler et al (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler et al (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), мейтанзиноїди (EP 1391213; Liu et al., (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623) та каліхеаміцин (Lode et al (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman et al (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342). Токсини можуть чинити цитотоксичну і цитостатичну дію за допомогою таких механізмів, як зв'язування тубулінів, зв'язування ДНК або інгібування топоізомерази. Деякі цитотоксичні ліки мають схильність бути неактивними або менш активними при кон'югуванні з великими антитілами або лігандами білкових рецепторів.

Прикладами кон'югатів антитіло-лікарський засіб є ZEVALIN® (ібтритумомаб тіуксетан, Biogen/Idec), що є кон'югатом антитіло-радіоізотоп, складеним з мишачого IgG1 каппа моноклонального антитіла, спрямованого проти антигену CD20, що його виявляють на поверхні нормальних та злоякісних В лімфоцитів, та ¹¹¹In або ⁹⁰Y радіоізоотопу, зв'язаного лінкером-хелатором тіосечовини (Wiseman et al (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman et al (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig et al (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69).

Крім того, MYLOTARG™ (гемтузумаб озогаміцин, Wyeth Pharmaceuticals), кон'югат антитіло-лікарський засіб, складений із людського CD33-антитіла, сполученого з каліхеаміцином, було схвалено у 2000 р. для лікування гострої мієлоїдної лейкемії шляхом ін'єкцій (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; патенти США №№ 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001).

Крім того, кантузумаб мертанзин (Immunogen, Inc.), кон'югат антитіло-лікарський засіб, складений із людського C242-антитіла, сполученого дисульфідним лінкером SPP з лікарською частиною мейтанзиноїду, DM1, переходить на II стадію випробувань для лікування видів раку, що експресують CanAg, таких як рак товстої кишки, підшлункової залози, шлунка та інші види раку.

Крім того, MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen, Inc.), кон'югат антитіло-лікарський засіб, складений з моноклонального антитіла до протипростатного специфічного

мембранного антигену (PSMA), сполученого з лікарською часткою мейтанзиноїду, DM1, перебуває у стадії розробки для потенційного лікування пухлин передміхурової залози.

Зрештою, ауристатинові пептиди, такі як монометилауристатин Е (ММАЕ), синтетичні аналоги доластатину, були кон'юговані з химерними моноклональними антитілами сBR96 (специфічними до Lewis Y на карциномах) і сAC10 (специфічними до CD30 на гематологічних злоякісних пухлинах) (Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784). сAC10 перебувають на стадії терапевтичної розробки.

Крім того, тут описані хіміотерапевтичні засоби, придатні для одержання кон'югату антитіло-лікарський засіб. Ферментативно активні токсини та їхні фрагменти, які можуть бути використані, включають ланцюг дифтерії А, незв'язувальні активні фрагменти дифтерійного токсину, ланцюг екзотоксину А (із синьогнійної палички *Pseudomonas aeruginosa*), ланцюг рицину А, ланцюг абрину А, ланцюг модецину А, альфа-сарцин, білки тунгу молукського (*Aleurites fordii*), білки діантину, білки лаконосу американського (*Phytolaca Americana*) (РАPI, РАPII і РАР-S), інгібітор китайського гіркокого гарбуза (*momordica charantia*), курцин, кротин, інгібітор мильнянки лікарської (*saponaia officinalis*), гелонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин і трикотецени. Див., наприклад, міжнародну заявку WO 93/21232, опубліковану 28 жовтня 1993 р. Низка радіонуклеотидів є доступними для одержання радіокон'югованих антитіл. Прикладами є ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y і ^{186}Re . Кон'югати антитіла і цитотоксичного засобу одержують із використанням низки біфункціональних білок-зв'язувальних речовин, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіол) пропіонат (SPDP), імінотіолан (IT), біфункціональних похідних імідоефірів (таких як диметил адипімідат HCl), активних складних ефірів (таких як дисукцинімідил суберат), альдегідів (таких як глютаральдегід), біс-азидо сполук (таких як біс(п-азидобензоїл) гександіамін), біс-діазонійних похідних (таких як біс(п-діазонійбензоїл)-етилендіамін), діізоціанатів (таких як толуол 2,6-діізоціанат) та біс-активних сполук фтору (таких як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Наприклад, рициновий імунотоксин може бути одержаний, як описано Вітетта та ін. (Vitetta et al., (1987) Science, 238:1098). Вуглець-14-мічена 1-ізоціанатобензил-3-метилдіетилєн тріамінпентаоцтова кислота (MX-DTPA) є прикладом хелатного агента для кон'югування радіонуклеотиду з антитілом (WO94/11026).

Кон'югати антитіла та одного або більше токсинів малих молекул, таких як каліхеаміцин, мейтанзиноїди, доластатини, ауристатини, трихотецен і CC1065, та похідних цих токсинів, що мають токсичну активність, також входять до обсягу цього винаходу.

III(A). Мейтанзиноїди

Мейтанзинові сполуки, придатні для використання як мейтанзиноїдні лікарські речовини, є добре відомими у цій галузі, і їх можна ізолювати з природних джерел відповідно до відомих способів, одержати із застосуванням технічних прийомів генної інженерії (див. Yu et al (2002) PNAS 99:7968-7973), або мейтанзинолу та мейтанзинолових аналогів, одержаних синтетичним шляхом за допомогою відомих способів.

Прикладами мейтанзиноїдних лікарських речовин є ті, що мають змінене ароматичне кільце, такі як: С-19-дехлор (США 4256746) (одержана відновленням алюмогідриду літію з анзамітоцину Р2); С-20-гідрокси (або С-20-деметил) +/-С-19-дехлор (патенти США №№4,361,650 і 4,307,016) (одержана деметилюванням із застосуванням стрептоміцет або актиномицет або дехлоруванням із застосуванням алюмогідриду літію); і С-20-деметокси, С-20-ацилокси (-OCOR), +/-дехлор (патент США №4,294,757) (одержана ацилюванням із застосуванням ацилхлоридів), і ті, що мають модифікації в інших положеннях.

Прикладами мейтанзиноїдних лікарських речовин також є речовини, що мають такі модифікації, як: С-9-SH (патент США №4,424,219) (одержана введенням у реакцію мейтанзинолу з H_2S або P_2S_5); С-14-алкоксиметил (деметокси/ CH_2OR) (патент США №4331598); С-14-гідроксиметил або ацилоксиметил (CH_2OH або CH_2OAc) (патент США №4450254) (одержані з бактерій роду нокардіоподібних (*Nocardia*)); С-15-гідрокси/ацилокси (патент США №4,364,866) (одержана перетворенням мейтанзинолу стрептоміцетами); С-15-метокси (патенти США №№ 4,313,946 і 4,315,929) (ізолювана з *Trewia nudiflora*); С-18-N-деметил (патенти США №№ 4,362,663 і 4,322,348) (одержана деметилюванням мейтанзинолу стрептоміцетами); і 4,5-деокси (патент США №4,371,533) (одержана відновленням трихлориду титану/літію алюмогідриду мейтанзинолу).

Кон'югати антитіло-лікарський засіб, що містять мейтанзиноїди, способи їх одержання та їх терапевтичне застосування розкриті, наприклад, у патентах США №№ 5,208,020, 5,416,064, 6,441,163 та європейському патенті EP 0 425 235 B1, розкриття яких чітко включено до цього опису шляхом посилання. Ліу та ін. (Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)) описували кон'югати антитіло-лікарський засіб, що містять мейтанзиноїд, позначений DM1, сполучений з моноклональним антитілом C242, спрямованим проти колоректального раку

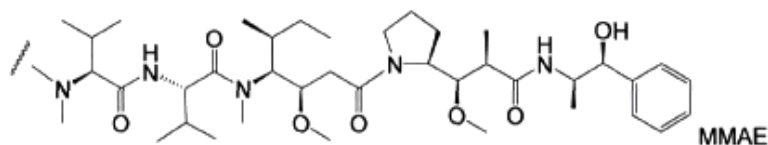
людини. Було виявлено, що цей кон'югат є високоцитотоксичним відносно культивованих клітин раку товстої кишки, і він проявив протипухлинну активність в аналізі росту пухлини *in vivo*. Чарі та ін. (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)) описують кон'югати антитіло-лікарський засіб, в яких мейтанзиноїд кон'югує через дисульфідний лінкер з мишачим антитілом A7, що зв'язується з антигеном на лініях клітин раку товстої кишки людини або з іншим мишачим моноклональним антитілом TA.1, яке зв'язується з онкогеном HER-2/neu. Цитотоксичність TA.1-мейтанзиноїдного кон'югату випробовували *in vitro* на лінії клітин раку молочної залози людини SK-BR-3, що експресує 3×10^5 HER-2 поверхневих антигенів на клітину. Лікарський кон'югат досяг ступеню цитотоксичності, подібного до вільних мейтанзиноїдних ліків, який можна було підвищити шляхом збільшення числа молекул мейтанзиноїду на молекулу антитіла. A7-мейтанзиноїдний кон'югат показав низьку системну цитотоксичність у мишей.

III(B). Ауристатини і доластатини

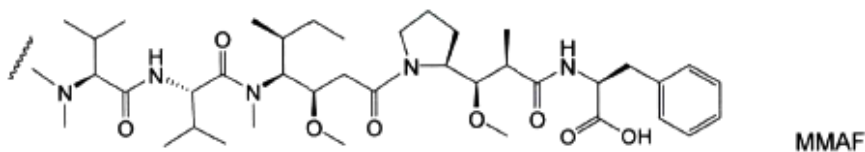
У деяких втіленнях кон'югат антитіло-лікарський засіб містить антитіло за винаходом, кон'юговане з доластатинами або пептидними аналогами та похідними доластатину, ауристатинами (патенти США №№ 5,635,483, 5,780,588). Виявили, що доластатини і ауристатини втручаються у динаміку мікротрубочок, гідроліз ГТФ і ядерний та клітинний поділ (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) і мають протиракову (патент США №5,663,149) та протигрибкову дію (Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). Доластатинові або ауристатинові лікарські складові можуть бути прикріплені до антитіла через N (аміно) кінець або C (карбоксильний) кінець пептидної лікарської складової (WO 02/088172).

Прикладами втілень ауристатину є сполучені на N-кінці монометилауристатинові лікарські складові DE і DF, розкриті Сентер та ін. (Senter et al) у "Proceedings of the American Association for Cancer Research" ("Протоколи Американської асоціації з дослідження раку"), Том 45, номер реферату 623, представлених 28 березня 2004 р. та описаних у патентній публікації США №2005/0238649, розкриття якого чітко включено у всій повноті до цього опису шляхом посилання.

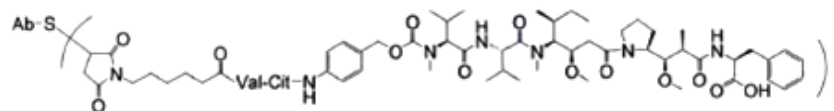
Прикладом втілення ауристатину є MMAE (де хвиляста лінія позначає ковалентне прикріплення до лінкера (L) лікарського кон'югату антитіла).



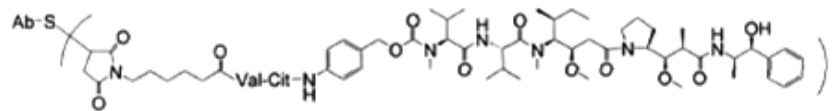
Іншим прикладом втілення ауристатину є MMAF, де хвиляста лінія позначає ковалентне прикріплення до лінкера (L) лікарського кон'югата антитіла (US 2005/0238649):



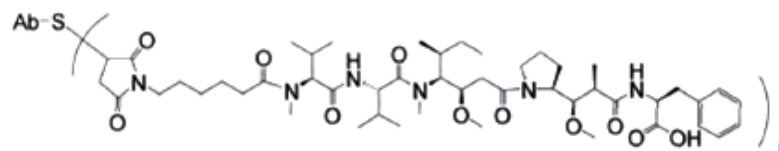
Додаткові приклади втілення, що містять MMAE або MMAF та різні лінкерні компоненти (описані тут більш докладно), мають такі структури і скорочення (де Ab означає антитіло і р означає від 1 до близько 8):



Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAF

Звичайно основані на пептиді лікарські складові можуть бути одержані шляхом утворення пептидного зв'язку між двома або більше амінокислотами та/або пептидними фрагментами. Такі пептидні зв'язки можуть бути одержані, наприклад, методом рідиннофазного синтезу (див. E. Schröder and K. Lübke, "The Peptides" ("Пептиди"), том 1, стор. 76-136, 1965, Academic Press), який є добре відомим в галузі пептидної хімії. Лікарські одиниці ауристатину/доластатину можуть бути одержані відповідно до способів, розкритих у патентах США №№ US 5635483, US 5780588, Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Петтітом та ін. (Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design ("Створення протираккових ліків") 13:243-277); Петтітом Г.Р. та ін. (Pettit, G.R., et al. Synthesis ("Синтез"), 1996, 719-725; Петтітом та ін. (Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863) та Дороніною (Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784).

III(C). Каліхеаміцин

В інших втіленнях кон'югат антитіло-лікарський засіб містить антитіло за винаходом, кон'юговане з однією або більше молекулами каліхеаміцину. Сімейство антитіл каліхеаміцину здатні виробляти розриви у дволанцюговій ДНК при під-пікомольних концентраціях. Для одержання кон'югатів сімейства каліхеаміцину див. патенти США №№5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296 (всі на ім'я American Cyanamid Company). Структурними аналогами каліхеаміцину, які можуть бути використані, є, але це не є обмеженням, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-ацетил- γ_1^1 , PSAG і θ_1^1 (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) та вказані вище патенти США на ім'я American Cyanamid). Іншими протипухлинними ліками, з якими може бути кон'юговане антитіло, є QFA, що є антифолатом. Як каліхеаміцин, так і QFA мають внутрішньоклітинні сайти дії і не перетинають плазмову мембрану з легкістю. Через це клітинне поглинання цих засобів шляхом опосередкованої антитілом інтерналізації значно посилює їхню цитотоксичну дію.

III(D). Інші цитотоксичні засоби

Іншими протипухлинними засобами, які можуть бути кон'юговані з антитілами за винаходом, є бісхлоретилнітрозосечовина (BCNU), стрептозоїн, вінкрисин і 5-фторурацил – сімейство засобів, відомих під загальною назвою LL-E33288 комплекс, який описаний у патентах США №№5,053,394, 5,770,710, а також еспераміцини (патент США №5,877,296).

До ферментативно-активних токсинів та їх фрагментів, які можуть бути використані, відносяться А-ланцюг дифтерії, незв'язувальні активні фрагменти дифтерійного токсину, А-ланцюг екзотоксину (із синьогнійної палички), А-ланцюг рицину, А-ланцюг абрину, А-ланцюг модецину, альфа-саркін, білки тунгового дерева (Aleurites fordii), білки діантину, білки лаконосу американського (Phytolacca Americana) (PAPI, PAPII і PAP-S), інгібітор китайського гіркового гарбуза (momordica charantia), курцин, кротин, інгібітор мильнянки лікарської (saponaria officinalis), гелонін, мітогелін, рестриктоїн, феноміцин, еноміцин і трикотецени. Див., наприклад, міжнародну заявку WO 93/21232, опубліковану 28 жовтня 1993 р.

Цей винахід також передбачає кон'югат антитіло-лікарський засіб, утворений між антитілом та сполукою з нуклеолітичною активністю (наприклад, рибонуклеазою або ДНК-ендонуклеазою, такою як деоксирибонуклеаза; ДНаза).

Для селективного руйнування пухлини антитіло може містити високорадіоактивний атом. Існує широкий вибір радіоактивних ізотопів для одержання радіокон'югованих антитіл. Прикладами є At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} та радіоактивні ізотопи Lu. При використанні кон'югата для виявлення він може містити радіоактивний атом для

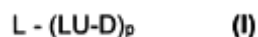
5 сцинтиграфічних досліджень, наприклад, tc^{99m} або I^{123} , або спинову мітку для ядерної магнітно-резонансної (ЯМР) томографії (також відомої як магнітно-резонансна томографія, мрт), таку як йод-123, йод-131, індій-111, фтор-19, вуглець-13, азот-15, кисень-17, гадоліній, марганець або залізо.

Радіо- або інші мітки можуть бути введені у кон'югат відомими способами. Наприклад, пептид може бути біосинтезований або синтезований хімічним амінокислотним синтезом із використанням підходящих амінокислотних прекурсорів із залученням, наприклад, фтору-19 замість водню. Мітки, такі як tc^{99m} або I^{123} , Re^{186} , Re^{188} і In^{111} , можуть бути прикріплені через цистейновий залишок в пептиді. Ітрій-90 може бути прикріплений через лізиновий залишок. Метод йодування (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) може бути використаний для введення йоду-123. У виданні "Моноклональні антитіла в імуносцинтиграфії" ("Monoclonal Antibodies in Immunosciintigraphy", Chatal, CRC Press 1989) докладно описані інші методи.

IV.) Сполуки кон'югатів антитіло-лікарський засіб, які зв'язують 158P1D7

Цей винахід забезпечує, з-поміж іншого, сполуки кон'югатів антитіло-лікарський засіб для цілеспрямованого доставляння ліків. Винахідники зробили відкриття, що сполуки кон'югатів антитіло-лікарський засіб мають потужну цитотоксичну та/або цитостатичну активність проти клітин, що експресують 158P1D7. Сполуки кон'югатів антитіло-лікарський засіб містять одиницю антитіла, ковалентно сполучену із принаймні однією одиницею ліків. Одиниці ліків можуть бути ковалентним чином сполучені безпосередньо або через лінкерну одиницю (-LU-).

У деяких втіленнях сполука кон'югату антитіло-лікарський засіб має таку формулу:



або її фармацевтично прийнятну сіль чи сольват, де:

30 L означає одиницю антитіла, наприклад, моноклональне антитіло до 158P1D7 за цим винаходом, і

(LU-D) означає компонент лінкерна одиниця-одиниця ліків, де:

LU- є лінкерною одиницею, а

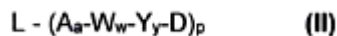
-D є одиницею ліків, що має цитостатичну або цитотоксичну активність проти клітини-мішені;

i р означає ціле число від 1 до 20.

У деяких втіленнях р коливається від 1 до 10, від 1 до 9, від 1 до 8, від 1 до 7, від 1 до 6, від 1 до 5, від 1 до 4, від 1 до 3 або від 1 до 2. У деяких втіленнях р коливається від 2 до 10, від 2 до 9, від 2 до 8, від 2 до 7, від 2 до 6, від 2 до 5, від 2 до 4 або від 2 до 3. В інших втіленнях р

40 означає 1, 2, 3, 4, 5 або 6. У деяких втіленнях р означає 2 або 4.

У деяких втіленнях сполука кон'югату антитіло-лікарський засіб має таку формулу:



або її фармацевтично прийнятну сіль чи сольват, де:

L означає частку антитіла, наприклад, моноклональне антитіло до 158P1D7; і

-A_a-W_w-Y_y- означає лінкерну одиницю (LU), де:

-A- означає розтягуювальну частку,

а означає 0 або 1,

50 кожний -W- незалежно означає амінокислотну одиницю,

w означає ціле число від 0 до 12,

-Y- означає самоспалювальну спейсерну одиницю,

y означає 0, 1 або 2;

-D означає одиницю ліків, що має цитостатичну або цитотоксичну активність проти клітини-мішені; і

p означає ціле число від 1 до 20.

У деяких втіленнях а означає 0 або 1, w означає 0 або 1 і y означає 0, 1 або 2. У деяких втіленнях а означає 0 або 1, w означає 0 або 1 і y означає 0 або 1. У деяких втіленнях р коливається від 1 до 10, 1 до 9, 1 до 8, 1 до 7, 1 до 6, 1 до 5, 1 до 4, 1 до 3 або 1 до 2. У деяких втіленнях р коливається від 2 до 8, 2 до 7, 2 до 6, 2 до 5, 2 до 4 або 2 до 3. В інших втіленнях р

означає 1, 2, 3, 4, 5 або 6. У деяких втіленнях r означає 2 або 4. У деяких втіленнях, коли w не є нуль, w означає 1 або 2. У деяких втіленнях, коли w означає від 1 до 12, w означає 1 або 2. У деяких втіленнях w означає від 2 до 12 і y означає 1 або 2. У деяких втіленнях a означає 1 і w та y означають 0.

5 Для композицій, що містять множину антитіл, введення ліків позначають p , що є середньою кількістю молекул ліків на антитіло. Введення ліків може коливатися від 1 до 20 ліків (D) на антитіло. Середня кількість ліків на антитіло при приготуванні реакцій кон'югації може характеризуватися традиційними засобами, такими як мас-спектроскопія, імунно-ферментний аналіз (ІФА) та ВЕРХ. Також може бути визначений кількісний розподіл кон'югатів антитіло-лікарський засіб з точки зору p . У деяких випадках відокремлення, очищення та визначення параметрів гомогенних кон'югатів антитіло-лікарський засіб, де p означає певну величину в кон'югатах антитіло-лікарський засіб із введенням інших ліків, можуть бути досягнені такими способами, як зворотнофазна ВЕРХ або електрофорез. У показових втіленнях p становить від 2 до 8.

15 Одержання сполук кон'югатів антитіло-лікарський засіб може бути здійснене за допомогою будь-яких технічних прийомів, відомих спеціалістові у цій галузі. Коротко кажучи, сполуки кон'югатів антитіло-лікарський засіб містять моноклональне антитіло до 158P1D7 як одиницю антитіла, лікарський засіб та необов'язково лінкер, що зв'язує лікарський засіб і зв'язувальний засіб. У втіленні, якому надають перевагу, антитілом є моноклональне антитіло до 158P1D7, що містить варіабельні ділянки важкого та легкого ланцюгів антитіла, позначеного Ha15-10ac12, яке описане вище. У втіленні, якому надають більшу перевагу, антитілом є моноклональне антитіло до 158P1D7, що містить важкий і легкий ланцюг антитіла, позначеного Ha15-10ac12, яке описане вище. Можлива низка різних реакцій для ковалентного прикріплення ліків та/або лінкерів зі зв'язувальними засобами. Цього часто досягають реакцією амінокислотних залишків зв'язувального засобу, наприклад, молекули антитіла, включаючи амінові групи лізину, вільні групи карбонової кислоти глютамінової та аспарагінової кислот, сульфгідрильні групи цистеїну та різні частки ароматичних амінокислот. Одним із найпоширеніших неспецифічних способів ковалентного прикріплення є карбодімідна реакція для прикріплення карбокси (або аміно) групи сполуки до аміно (або карбокси) груп антитіла. Крім того, використовують біфункціональні засоби, такі як діальдегіди або іміноєфіри, для сполучення аміногрупи сполуки з аміногрупами молекули антитіла. Також для прикріплення лікарських засобів до зв'язувальних засобів існує реакція основи Шиффа. Цей спосіб включає окислення періодатом лікарського засобу, що містить гліколеві або гідрокси групи, з утворенням таким чином альдегіду, який потім вступає у реакцію зі зв'язувальним агентом. Прикріплення відбувається шляхом утворення основи Шиффа з аміногрупами зв'язувального агента. Ізотіоціанати також можуть бути використані як сполучні агенти для ковалентного прикріплення ліків до зв'язувальних агентів. Інші технічні прийоми відомі спеціалістові у цій галузі і входять до обсягу цього винаходу.

У деяких втіленнях проміжна речовина, що є прекурсором лінкера, вступає у реакцію з лікарським засобом за підходящих умов. У деяких втіленнях використовують реактивні групи на лікарському засобі та/або проміжній сполуці. Продукт реакції між лікарським засобом та проміжною сполукою або дериватизованим лікарським засобом згодом вступає у реакцію з моноклональним антитілом до 158P1D7 за підходящих умов.

Далі більш докладно описана кожна з конкретних одиниць сполуки кон'югатів антитіло-лікарський засіб. Синтез і структура показових лінкерних одиниць, розтягувальних одиниць, амінокислотних одиниць, самоспалювальної спейсерної одиниці та одиниці лікарського засобу також описані у публікаціях патентних заявок США №№ 2003-0083263, 2005-0238649 та 2005-0009751, кожна з яких повністю включена до цього опису шляхом посилання у всіх відношеннях.

V.) Лінкерні одиниці

Звичайно сполуки кон'югатів антитіло-лікарський засіб містять лінкерну одиницю між 50 одиницею лікарського засобу та одиницею антитіла. У деяких втіленнях лінкер може бути розщеплений за внутрішньоклітинних умов, так що розщеплення лінкера вивільнює частину лікарського засобу з антитіла у внутрішньоклітинному середовищі. Ще в інших втіленнях лінкерна одиниця не придатна до розщеплення, і лікарський засіб вивільнюється, наприклад, шляхом руйнування антитіла.

55 У деяких втіленнях лінкер здатний до розщеплення за допомогою розщеплювального засобу, присутнього у внутрішньоклітинному середовищі (наприклад, всередині лізосоми, ендосоми або ямки на поверхні клітини). Лінкером може бути, наприклад, пептидильний лінкер, що його розщеплюють внутрішньоклітинним пептидазним або протеазним ферментом, включаючи, але це не є обмеженням, лізосомну або ендосомну протеазу. У деяких втіленнях 60 пептидильний лінкер має довжину принаймні двох амінокислот або принаймні трьох

амінокислот. Розщеплювальні засоби можуть включати катепсини В і D та плазмін, всі з яких відомі як такі, що гідролізують дипептидні похідні лікарських засобів, спричиняючи вивільнення активного лікарського засобу всередині клітин-мішеней (див., наприклад, Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123). Найтипівішими є пептидні лінкери, здатні до розщеплення за допомогою ферментів, які присутні в клітинах, що експресують 158P1D7. Наприклад, може бути використаний пептидильний лінкер, здатний до розщеплення тіол-залежною протеазою катепсин-В, що сильно експресується в раковій тканині (наприклад, лінкер Phe-Leu або Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:9)). Інші приклади таких лінкерів описані, наприклад, у патенті США №6,214,345, включеному до цього опису шляхом посилання в усій повноті і для всіх цілей. В окремому втіленні пептидильним лінкером, здатним до розщеплення внутрішньоклітинною протеазою, є лінкер Val-Cit або Phe-Lys (див., наприклад, патент США №6,214,345, в якому описаний синтез доксорубіцину за допомогою лінкера val-cit). Одна перевага використання внутрішньоклітинного протеолітичного вивільнення терапевтичного засобу полягає в тому, що засіб звичайно є виснаженим при кон'югуванні, тоді як стійкість сироватки кон'югатів звичайно є високою.

В інших втіленнях здатний до розщеплення лінкер є рН-чутливим, тобто чутливим до гідролізу за певних значень рН. Звичайно рН-чутливий лінкер є придатним до гідролізу за кислих умов. Наприклад, можуть бути використані кислотолабільний лінкер, придатний до гідролізу в лізосомі (наприклад, гідразон, семікарбазон, тіосемікарбазон, цис-аконітовий амід, ортоєфір, ацеталь, кеталь або подібне). (Див., наприклад, патенти США №№ 5,122,368, 5,824,805, 5,622,929, Dubowchik and Walker, 1999, Pharm. Therapeutics 83:67-123; Neville et al., 1989, Biol. Chem. 264:14653-14661). Такі лінкери є відносно стабільними за нейтральних умов рН, таких як існують у крові, але є нестабільними при рівні рН нижче 5,5 або 5,0, приблизному рівні рН лізосоми. У деяких втіленнях придатним до гідролізу лінкером є тіоефірний лінкер (наприклад, тіоефір, прикріплений до терапевтичного засобу через ацилгідразоновий зв'язок (див., наприклад, патент США №5,622,929).

Ще в інших втіленнях лінкер є придатним до розщеплення за умов відновлення (наприклад, дисульфідний лінкер). У цій галузі відома низка дисульфідних лінкерів, у тому числі, наприклад, ті, що можуть бути утворені із використанням SATA (N-сукцинімідил-S-ацетилтіоацетату), SPDP (N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонату), SPDB (N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)бутирату) і SMPT (N-сукцинімідил-оксикарбоніл-альфа-метил-альфа-(2-піридилдитіо) толуолу), SPDB і SMPT (див., наприклад, Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., в Immunokonjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer ("Імунокон'югати: кон'югати антитілу у радіотерапії") (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987). Див. також патент США № 4,880,935.

Ще в інших конкретних втіленнях лінкером є малонатний лінкер (Johnson et al., 1995, Anticancer Res. 15:1387-93), maleimido бензоільний лінкер (Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1299-1304) або 3'-N-амідний аналог (Lau et al., 1995, Bioorg-Med-Chem. 3(10):1305-12).

Ще в інших втіленнях лінкерна одиниця не придатна до розщеплення, і лікарський засіб вивільнюється шляхом руйнування антитіла (див. публікацію США №2005/0238649, включену до цього опису шляхом посилання повністю і для всіх цілей).

Звичайно лінкер по суті не є чутливим до позаклітинного середовища. Використаний тут вираз "по суті нечутливий до позаклітинного середовища", у контексті стосовно лінкера, означає, що не більш ніж близько 20 %, звичайно не більше ніж близько 15 %, більш типово не більше ніж близько 10 %, і навіть ще типовіше не більше ніж близько 5 %, не більше ніж близько 3 % або не більше ніж близько 1 % лінкерів, у зразку сполуки кон'югату антитіло-лікарський засіб, розщеплюються, коли сполука кон'югату антитіло-лікарський засіб присутня у позаклітинному середовищі (наприклад, у плазмі). Чи є лінкер по суті нечутливим до позаклітинного середовища може бути визначено, наприклад, шляхом інкубування з плазмою сполуки кон'югату антитіло-лікарський засіб впродовж заданого періоду часу (наприклад, 2, 4, 8, 16 або 24 годин) і подальшого кількісного аналізу кількості вільного лікарського засобу, присутнього в плазмі.

В інших втіленнях, що не є взаємовиключними втіленнями, лінкер сприяє клітинній інтерналізації. У деяких втіленнях лінкер сприяє клітинній інтерналізації, коли він кон'югований з терапевтичним засобом (тобто у середовищі одиниці лінкер-терапевтичний засіб сполуки кон'югату антитіло-лікарський засіб, як це описано тут). У ще інших втіленнях лінкер сприяє клітинній інтерналізації, коли він кон'югований як із ауристатиною сполукою, так і з моноклональним антитілом до 158P1D7 MAб.

Низка показових лінкерів, які можуть бути використані з цими композиціями та способами, описані у міжнародній публікації WO 2004-010957, публікаціях США №№ 2006/0074008,

20050238649 та 2006/0024317 (кожна з яких включена до цього опису шляхом посилання в усій повноті і для всіх цілей).

"Лінкерна одиниця" (LU) є біфункціональною сполукою, яка може бути використана для сполучання одиниці лікарського засобу та одиниці антитіла для утворення сполуки кон'югату антитіло-лікарський засіб. У деяких втіленнях лінкерна одиниця має формулу:



де: -A- означає розтягувальну одиницю,

а означає 0 або 1,

кожне -W- незалежно означає амінокислотну одиницю,

w є ціле число від 0 до 12,

-Y- є самоспалювальною спейсерною одиницею і

у означає 0, 1 або 2.

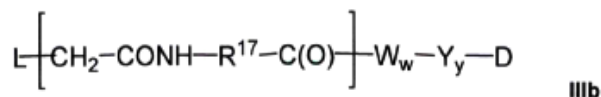
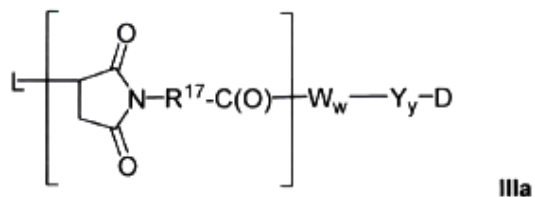
У деяких втіленнях а означає 0 або 1, w означає 0 або 1 і у означає 0, 1 або 2. У деяких втіленнях а означає 0 або 1, w означає 0 або 1 і у означає 0 або 1. У деяких втіленнях, коли w означає від 1 до 12, у означає 1 або 2. У деяких втіленнях w означає від 2 до 12 і у означає 1 або 2. У деяких втіленнях а означає 1 і w та у означають 0.

VI.) Розтягувальна одиниця

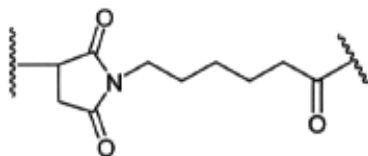
Розтягувальна одиниця (A), якщо присутня, здатна сполучати одиницю-антитіло з амінокислотною одиницею (-W-), якщо вона є, із спейсерною одиницею (-Y-), якщо вона є; або з одиницею лікарського засобу (-D). До придатних функціональних груп, які можуть бути присутніми на моноклональному антитілі до 158P1D7 (наприклад, Ha15-10ac12), природним чином або за допомогою хімічних маніпуляцій, відносяться, але це не є обмеженням, сульфгідрильна група, аміногрупа, гідроксильна група, аномерна гідроксильна група вуглеводню та карбоксильна група. Підходящими функціональними групами є сульфгідрильна та аміногрупа. В одному прикладі сульфгідрильні групи можуть бути одержані відновленням внутрішньомолекулярних дисульфідних зв'язків моноклонального антитіла до 158P1D7. В іншому втіленні сульфгідрильні групи можуть бути одержані введенням у реакцію аміногрупи лізинової частки моноклонального антитіла до 158P1D7 з 2-імінотіолоном (реагент Трота) або іншими реагентами, що виробляють сульфгідрил. У деяких втіленнях моноклональним антитілом до 158P1D7 є рекомбінантне антитіло, і його конструюють для перенесення одного або більше лізинів. У деяких інших втіленнях рекомбінантне моноклональне антитіло до 158P1D7 конструюють для перенесення додаткових сульфгідрильних груп, наприклад, додаткових цистеїнів.

В одному втіленні розтягувальна одиниця утворює зв'язок з атомом сірки одиниці антитіла. Атом сірки може бути виведений із сульфгідрильної групи антитіла. Представники розтягувальних одиниць цього втілення показані в квадратних дужках Формул IIIa і IIIb, де L-, -W-, -Y-, -D, w і у мають визначені вище значення, а R¹⁷ вибирають з -C₁-C₁₀ алкілену-, -C₁-C₁₀ алкінілену-, карбоцикло-, -O-(C₁-C₈ алкілену)-, O-(C₁-C₈ алкенілену)-, -O-(C₁-C₈ алкінілену)-, -арилену-, -C₁-C₁₀ алкілен-арилену-, -C₂-C₁₀ алкенілен-арилену-, -C₂-C₁₀ алкінілен-арилену-, -арилен-C₁-C₁₀ алкілену-, -арилен-C₂-C₁₀ алкенілену-, -арилен-C₂-C₁₀ алкінілену-, -C₁-C₁₀ алкілен-(карбоцикло)-, -C₂-C₁₀ алкенілен-(карбоцикло)-, -C₂-C₁₀ алкінілен-(карбоцикло)-, -(карбоцикло)-C₁-C₁₀ алкілену-, -(карбоцикло)-C₂-C₁₀ алкенілену-, -(карбоцикло)-C₂-C₁₀ алкінілену-, -гетероцикло-, -C₁-C₁₀ алкілен-(гетероцикло)-, -C₂-C₁₀ алкенілен-(гетероцикло)-, -C₂-C₁₀ алкінілен-(гетероцикло)-, -(гетероцикло)-C₁-C₁₀ алкілену-, - (гетероцикло)-C₂-C₁₀ алкенілену-, -(гетероцикло)-C₁-C₁₀ алкінілену-, -(CH₂CH₂O)_r- або -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, та r означає ціле число від 1 до 10, де згадані радикали алкілу, алкенілу, алкінілу, алкілену, алкенілену, алкінілену, арилу, карбоциклу, карбоцикло, гетероцикло та арилону, окремо або як частина іншої групи, є необов'язково заміщеними. У деяких втіленнях згадані радикали алкілу, алкенілу, алкінілу, алкілену, алкенілену, алкінілену, арилу, карбоциклу, карбоцикло, гетероцикло та арилону, окремо або як частина іншої групи, є незаміщеними. У деяких втіленнях R¹⁷ вибирають з -C₁-C₁₀ алкілену-, -карбоцикло-, -O-(C₁-C₈ алкілену)-, -арилену-, -C₁-C₁₀ алкілен-арилену-, -арилен-C₁-C₁₀ алкілену-, -C₁-C₁₀ алкілен-(карбоцикло)-, -(карбоцикло)-C₁-C₁₀ алкілену-, -C₃-C₈ гетероцикло-, -C₁-C₁₀ алкілен-(гетероцикло)-, -(гетероцикло)-C₁-C₁₀ алкілену-, -(CH₂CH₂O)_r- та -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-, і r є ціле число від 1 до 10, де згадані алкіленові групи є незаміщеними і решта груп є необов'язково заміщеними.

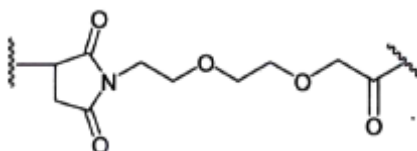
Треба розуміти із всіх ілюстративних втілень, що навіть якщо про це явно не сказано, від 1 до 20 часток ліків можуть бути сполучені з антитілом (p=1-20).



- 5 Ілюстративною розтягувальною одиницею є відповідна одиниця у Формулі IIIa, в якій R^{17} означає $-(\text{CH}_2)_5-$:



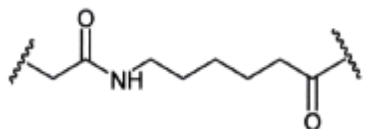
- 10 Іншою ілюстративною розтягувальною одиницею є відповідна одиниця у Формулі IIIa, в якій R^{17} означає $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2-$ і r означає 2:



- 15 Ілюстративною розтягувальною одиницею є відповідна одиниця у Формулі IIIa, в якій R^{17} означає арилен- або арилен- C_1-C_{10} алкілен-. У деяких втіленнях арильною групою є незаміщена фенільна група.

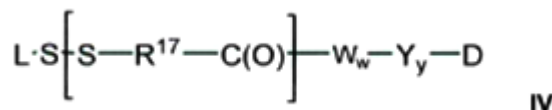
Ще іншою ілюстративною розтягувальною одиницею є відповідна одиниця у Формулі IIIb, в якій R^{17} означає $-(\text{CH}_2)_5-$:

20

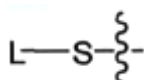


- У деяких втіленнях розтягувальна одиниця сполучена з одиницею антитіла через дисульфідний зв'язок між атомом сірки одиниці антитіла та атомом сірки розтягувальної одиниці. Показова розтягувальна одиниця за цим втіленням показана у квадратних дужках Формули IV, в якій R^{17} , L-, -W-, -Y-, -D, w і y мають визначені вище значення.

25

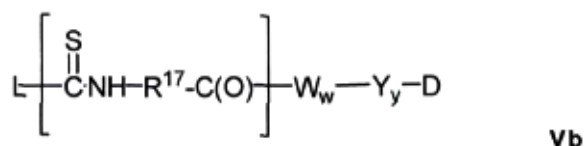
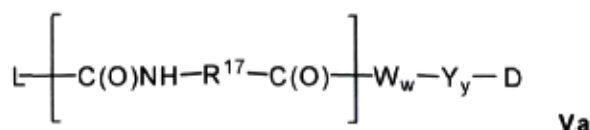


- 30 Треба відзначити, що по всьому тексту цієї заявки частка S в наведеній нижче формулі стосується атому сірки одиниці антитіла, якщо інше не визначено контекстом.

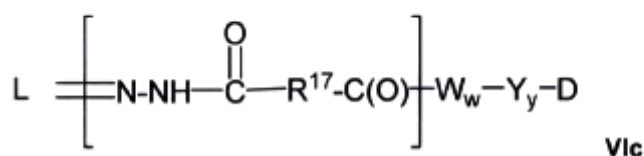
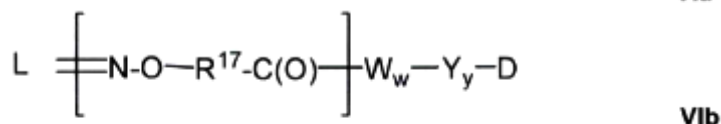
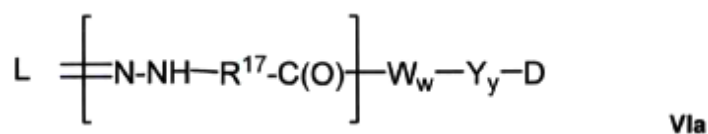


- 35 Ще в інших втіленнях розтягувальна одиниця містить реакційноздатний центр, що може утворювати зв'язок з первинною або вторинною аміногрупою антитіла. Прикладами таких

- реакційноздатних центрів є, але це не є обмеженням, активовані складні ефіри, такі як складні ефіри сукцинімідів, складні 4-нітрофенілові ефіри, складні пентафторфенільні ефіри, складні тетрафторфенільні ефіри, ангідриди, хлорангідриди, сульфонілхлориди, ізоціанати та ізотіоціанати. Показові розтягувальні одиниці цього втілення показані у квадратних дужках
- 5 Формул Va і Vb, в яких -R¹⁷-, L-, -W-, -Y-, -D, w і y мають вказані вище значення;



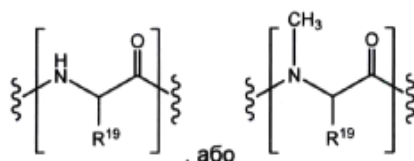
- У деяких втіленнях розтягувальна одиниця містить реакційноздатний центр, що реагує на групу (-CHO) модифікованого вуглеводню, яка може бути присутньою на антитілі. Наприклад, вуглеводень може бути помірно окислений із застосуванням реактиву, такого як періодат натрію, а одержана частка (-CHO) окисленого вуглеводню може бути конденсована розтягувальною одиницею, що містить функціональність, таку як гідразид, оксим, первинний або вторинний амін, гідразин, тіосемікарбазон, гідразинкарбоксилат та арилгідразид, як ті, що описані Канеко та ін. (Kaneko et al., 1991, Bioconjugate Chem. 2:133-41). Типові розтягувальні
- 10 одиниці цього втілення показані в квадратних дужках Формул VIa, VIb та VIc, в яких -R¹⁷-, L-, -W-, -Y-, -D, w і y мають визначені вище значення.



VII.) Амінокислотна одиниця

- Амінокислотна одиниця (-W-), якщо вона є, сполучає розтягувальну одиницю із спейсерною одиницею, якщо остання є, сполучає розтягувальну одиницю з одиницею лікарського засобу, якщо спейсерної частини немає, та сполучає одиницю антитіла з одиницею лікарського засобу, якщо розтягувальної та спейсерної частин немає.
- 25

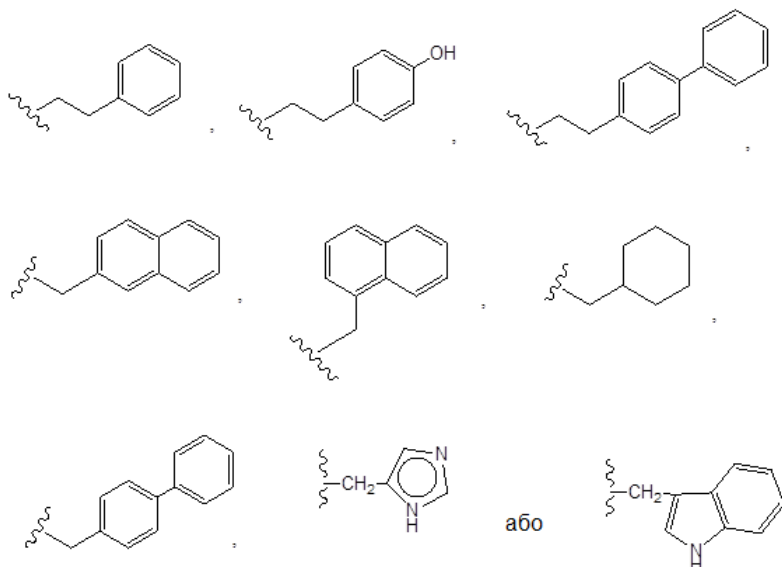
- W_w- може означати, наприклад, одиницю монопептиду, дипептиду, трипептиду, тетрапептиду, пентапептиду, гексапептиду, гептапептиду, октапептиду, нонапептиду, декапептиду, ундекапептиду або додекапептиду. Кожна -W- одиниця незалежно має формулу,
- 30 вказану нижче у квадратних дужках, а w означає ціле число від 0 до 12:



- де R¹⁹ означає водень, метил, ізопропіл, ізобутил, сек-бутил, бензил, п-гідроксибензил, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH,
- 35

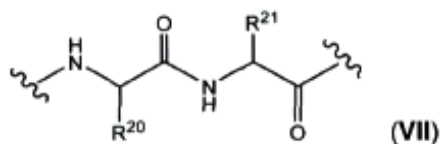
$-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$,
 $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$, $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$, $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$,
 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$, 2-піридилметил-, 3-піридилметил-, 4-піридилметил-, феніл,
 циклогексил,

5



У деяких втіленнях амінокислотна одиниця може бути розщеплена ферментативним шляхом одним або більше ферментами, у тому числі пов'язаною з раком або пухлиною протеазою, для вивільнення одиниці лікарського засобу (-D), до якої в одному втіленні приєднують протон *in vivo* після вивільнення для одержання лікарського засобу (D).

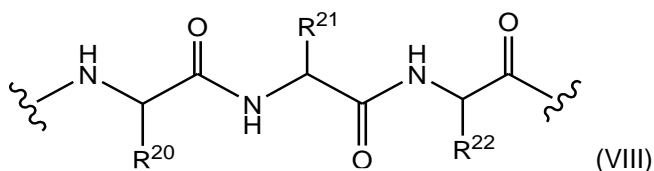
У деяких втіленнях амінокислотна одиниця може містити природні амінокислоти. В інших втіленнях амінокислотна одиниця може містити неприродні амінокислоти. Ілюстративні W_w одиниці представлені формулами (VII)-(IX):



де R^{20} і R^{21} мають такі значення:

R^{20}	R^{21}
бензил	$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$;
метил	$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$;
ізопропіл	$(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$;
ізопропіл	$(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$;
бензил	$(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$;
ізобутил	$(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$;
сек-бутил	$(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$;
	$(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$;
бензил	метил;
бензил	$(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$;

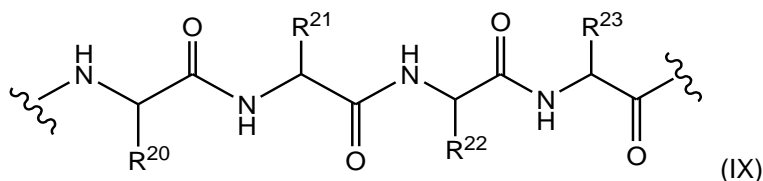
20



де R^{20} , R^{21} і R^{22} мають такі значення:

R^{20}	R^{21}	R^{22}
бензил	бензил	$(CH_2)_4NH_2$;
ізопропіл	бензил	$(CH_2)_4NH_2$; та
H	бензил	$(CH_2)_4NH_2$;

5



де R^{20} , R^{21} , R^{22} і R^{23} мають такі значення:

R^{20}	R^{21}	R^{22}	R^{23}
H	бензил	ізобутил	H; та
метил	ізобутил	метил	ізобутил.

10

Прикладами амінокислотних одиниць є, але це не є обмеженням, одиниці формули VII, де: R^{20} означає бензил і R^{21} означає $-(CH_2)_4NH_2$; R^{20} означає ізопропіл і R^{21} означає $-(CH_2)_4NH_2$; або R^{20} означає ізопропіл і R^{21} означає $-(CH_2)_3NHCONH_2$. Іншою типовою амінокислотою одиницею є одиниця формули VIII, в якій R^{20} означає бензил, R^{21} означає бензил і R^{22} означає $-(CH_2)_4NH_2$.

15

Придатні $-W_w-$ одиниці можуть бути створені та оптимізовані у своїй селективності для ферментативного розщеплення конкретним ферментом, наприклад, пов'язаною з пухлиною протеазою. В одному втіленні $-W_w-$ одиницею є одиниця, розщеплення якої каталізує катепсин B, C і D або плазмінпротеаза.

20

В одному втіленні $-W_w-$ означає дипептид, трипептид, тетрапептид або пентапептид. Коли R^{19} , R^{20} , R^{21} , R^{22} або R^{23} не означають водень, атом вуглецю, до якого прикріплені R^{19} , R^{20} , R^{21} , R^{22} або R^{23} , є хіральним.

Кожний атом вуглецю, до якого прикріплені R^{19} , R^{20} , R^{21} , R^{22} або R^{23} , незалежно перебуває у (S) або (R) конфігурації.

25

В одному аспекті амінокислотної одиниці вона є валін-цитруліновою (vc або val-cit). В іншому аспекті амінокислотною одиницею є фенілаланін-лізин (тобто fk). У ще іншому аспекті амінокислотної одиниці нею є N-метилвалін-цитрулін. У ще іншому аспекті амінокислотною одиницею є 5-аміновалер'янова кислота, гомофенілаланінлізин, тетраізохінолінкарбоксилатлізин, циклогексилаланінлізин, лізин ізонепекотинової кислоти, бета-аланіновий лізин, гліцин, серин, валін, глютамін та ізонепекотинова кислота.

30

VIII.) Спейсерна одиниця

Спейсерна одиниця ($-Y-$), коли вона є, сполучає амінокислотну одиницю з одиницею лікарського засобу, якщо є амінокислотна одиниця. Альтернативно, спейсерна одиниця сполучає розтягуювальну одиницю з одиницею лікарського засобу за відсутності амінокислотної одиниці. Спейсерна одиниця також сполучає одиницю лікарського засобу з одиницею антитіла за відсутності як амінокислотної одиниці, так і розтягуювальної одиниці.

35

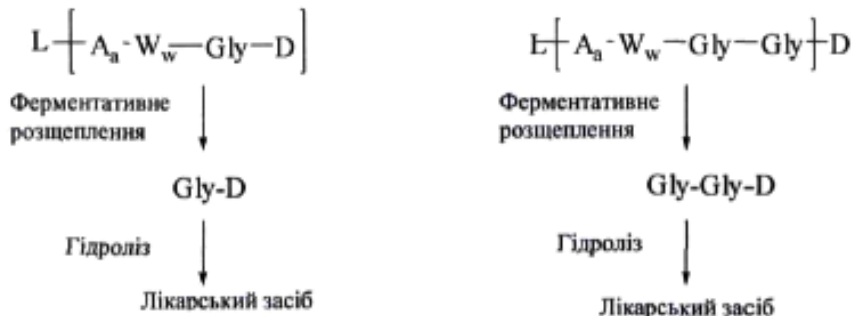
Існують два загальні види спейсерних одиниць: не самоспалювальні та самоспалювальні. Не самоспалювальною спейсерною одиницею є одиниця, в якій частина або вся спейсерна одиниця залишається прив'язаною до одиниці лікарського засобу після розщеплення, особливо ферментативного, амінокислотної одиниці з кон'югату антитіло-лікарський засіб. Прикладами не самоспалювальних спейсерних одиниць є, але це не є обмеженням, спейсерна одиниця (гліцин-гліцин) та гліцинова спейсерна одиниця (обидві показані на Схемі 1 нижче). Коли кон'югат, що містить спейсерну одиницю гліцин-гліцин або гліцинову спейсерну одиницю, зазнає ферментативного розщеплення за допомогою ферменту (наприклад, протеази, пов'язаної з пухлинною клітиною, протеази, пов'язаної з раковою клітиною, або протеази, пов'язаної з

40

лімфоцитом), одиниця лікарського засобу гліцин-гліцин або гліцинова одиниця лікарського засобу розщеплюється з L-Aa-Ww-. В одному втіленні відбувається незалежна реакція гідролізу в клітині-мішені з розщепленням зв'язку гліцин-одиниця лікарського засобу та вивільненням лікарського засобу.

5

Схема 1



У деяких втіленнях не самоспалювальною спейсерною одиницею (-Y-) є -Gly-. У деяких втіленнях не самоспалювальною спейсерною одиницею (-Y-) є -Gly-Gly-.

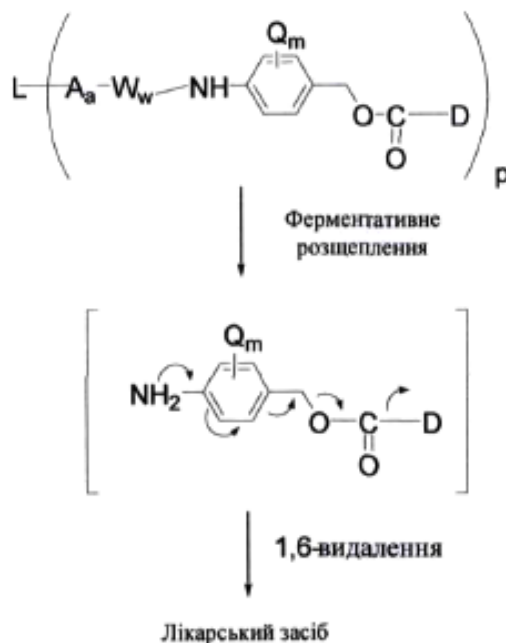
10 В одному втіленні забезпечений кон'югат лікарський засіб-лінкер, в якому відсутня спейсерна одиниця (де $y=0$), або її фармацевтично прийнятна сіль чи сольват.

Як альтернатива, кон'югат, що містить самоспалювальну спейсерну одиницю, може вивільнювати -D. Використаний тут термін "самоспалювальний спейсер" стосується біфункціональної хімічної частки, здатної ковалентно зв'язувати дві розташовані на відстані
15 одна від одної хімічні частки у стійку трикомпонентну молекулу. Вона самовільно вивільнюється з другої хімічної частки у разі розщеплення її зв'язку з першою часткою.

У деяких втіленнях -Y- означає частину p-амінобензилового спирту (РАВ) (див. Схеми 2 і 3), феніленова частка якої заміщена Q_m , де Q означає -C₁-C₈ алкіл, -C₁-C₈ алкеніл, -C₁-C₈ алкініл, -O-(C₁-C₈ алкіл), -O-(C₁-C₈ алкеніл), -O-(C₁-C₈ алкініл), -галоген, -нітро або -ціано; і m означає
20 ціле число від 0 до 4. Алкільна, алкенільна та алкінільна групи, окремо або як частина іншої групи, можуть бути необов'язково заміщені.

У деяких втіленнях -Y- означає РАВ групу, сполучену з -W_w- за допомогою атому аміноазоту РАВ групи і зв'язану безпосередньо з -D через карбонатну, карбаматну або ефірну групу. Без обмеження будь-якою конкретною теорією або механізмом, Схема 2 зображує можливий
25 механізм вивільнення лікарського засобу з РАВ групи, яка прикріплена безпосередньо до -D через карбаматну або карбонатну групу, як це описано Токі та ін. (Toki et al., 2002, J. Org. Chem. 67:1866-1872).

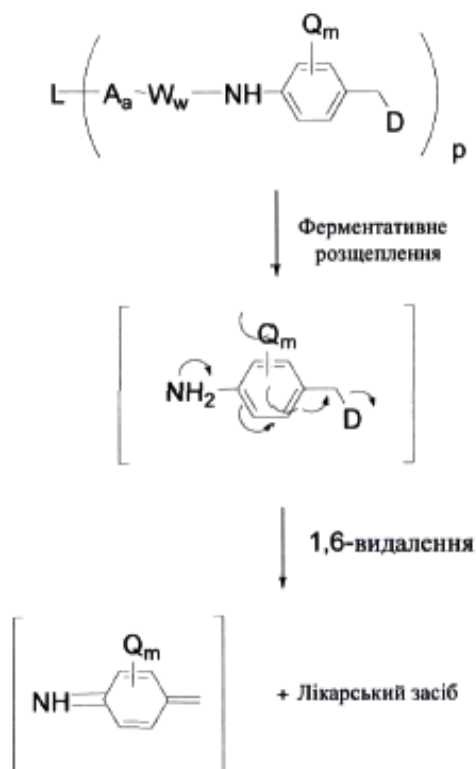
Схема 2



У схемі 2 Q означає -C₁-C₈ алкіл, -C₁-C₈ алкеніл, -C₁-C₈ алкініл, -O-(C₁-C₈ алкіл), -O-(C₁-C₈ алкеніл), -O-(C₁-C₈ алкініл), -галоген, -нітро або -ціано; m означає ціле число від 0 до 4; і р означає від 1 до близько 20. Алкільна, алкенільна та алкінільна групи, окремо або як частина іншої групи, можуть бути необов'язково заміщені.

Без обмеження будь-якою конкретною теорією або механізмом, Схема 3 зображує можливий механізм вивільнення ліків з PAB групи, яка прикріплена безпосередньо до -D через ефірний або аміновий зв'язок, де D містить кисневу або азотну групу, що є частиною одиниці лікарського засобу.

Схема 3

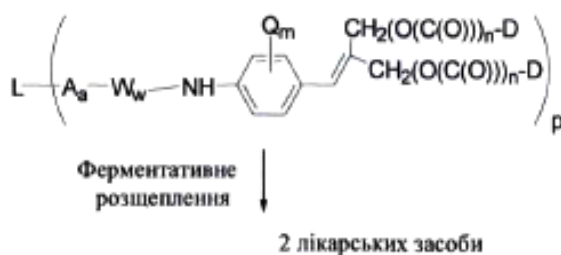


У Схемі 3 Q означає -C₁-C₈ алкіл, -C₁-C₈ алкеніл, -C₁-C₈ алкініл, -O-(C₁-C₈ алкіл), -O-(C₁-C₈ алкеніл), -O-(C₁-C₈ алкініл), -галоген, -нітро або -ціано; m означає ціле число від 0 до 4; i p означає від 1 до близько 20. Алкільна, алкенільна та алкінільна групи, окремо або як частина іншої групи, можуть бути необов'язково заміщені.

Іншими прикладами самоспалювальних спейсерів є, але це не є обмеженням, ароматичні сполуки, які є електронно-подібними до PAB групи, такі як похідні 2-аміноімідазол-5-метанолу (Hay et al., 1999, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) та орто- або пара-амінобензилацеталі. Можуть бути використані спейсери, що зазнають циклізації після гідролізу амідного зв'язку, такі як заміщені та незаміщені аміди 4-аміномасляної кислоти (Rodrigues et al., 1995, Chemistry Biology 2:223), належним чином заміщені біцикло[2.2.1] та біцикло[2.2.2] кільцеві системи (Storm et al., 1972, J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) та аміди 2-амінофенілпропіонової кислоти (Amsberry et al., 1990, J. Org. Chem. 55:5867). Видалення амін-вмісних лікарських засобів, заміщених в α-положенні гліцину (Kingsbury et al., 1984, J. Med. Chem. 27:1447), також є прикладами самоспалювальних спейсерів.

В одному втіленні сейсерна одиниця є частиною розгалуженого біс(гідроксиметил)-стиролу (BHMS), як показано на Схемі 4, яка може бути використана для введення та вивільнення множинних лікарських засобів.

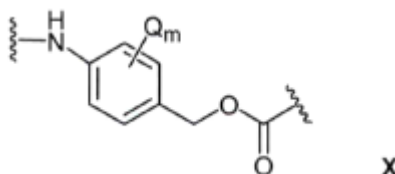
Схема 4



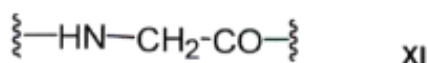
У Схемі 4 Q означає -C₁-C₈ алкіл, -C₁-C₈ алкеніл, -C₁-C₈ алкініл, -O-(C₁-C₈ алкіл), -O-(C₁-C₈ алкеніл), -O-(C₁-C₈ алкініл), -галоген, -нітро або -ціано; m означає ціле число від 0 до 4; n означає 0 або 1; i p означає від 1 до близько 20. Алкільна, алкенільна та алкінільна групи, окремо або як частина іншої групи, можуть бути необов'язково заміщені.

У деяких втіленнях -D одиниці є однаковими. У ще одному іншому втіленні -D одиниці є різними.

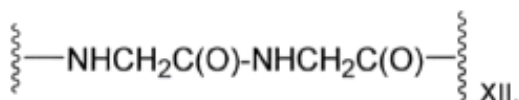
В одному аспекті спейсерні одиниці (-Y_y-) представлені Формулами (X)-(XII):



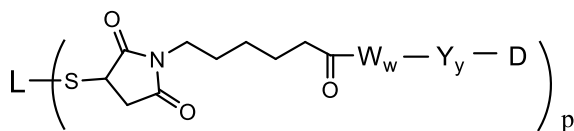
де Q означає -C₁-C₈ алкіл, -C₁-C₈ алкеніл, -C₁-C₈ алкініл, -O-(C₁-C₈ алкіл), -O-(C₁-C₈ алкеніл), -O-(C₁-C₈ алкініл), -галоген, -нітро або -ціано; та m означає ціле число від 0 до 4. Алкільна, алкенільна та алкінільна групи, окремо або як частина іншої групи, можуть бути необов'язково заміщені.



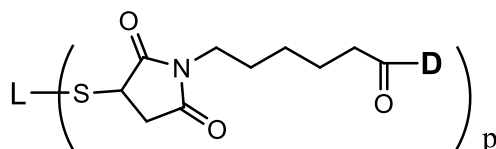
та



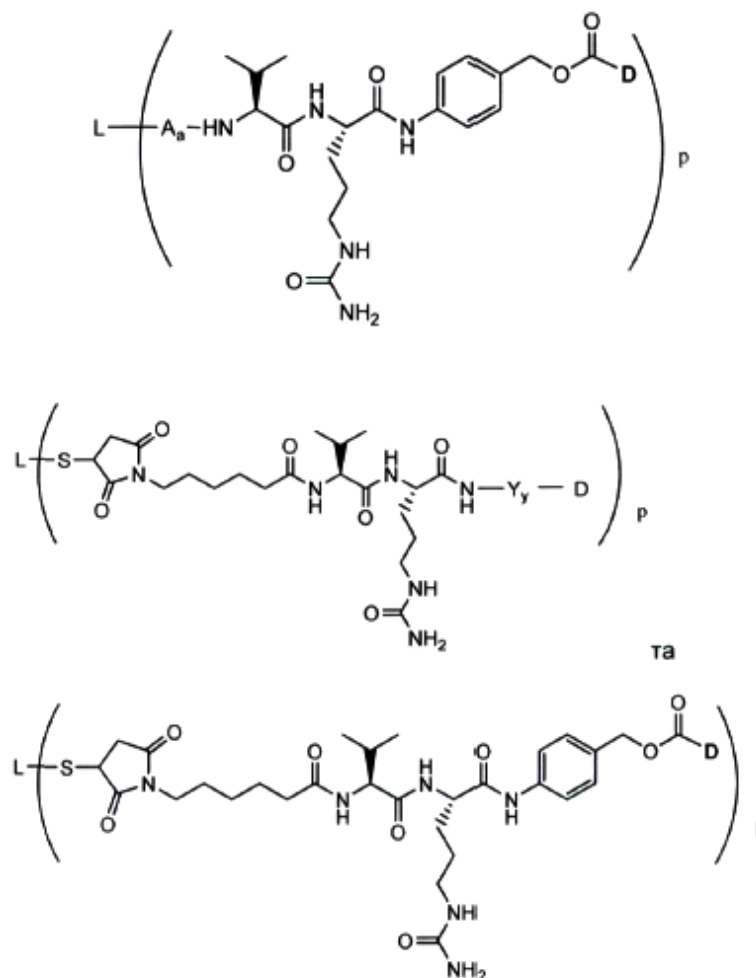
До втілень Формул I і II, що містять сполуки кон'югату антитіло-лікарський засіб, можуть відноситись:



де w і y кожний означає 0, 1 або 2 і



де w і y кожний означає 0,



IX.) Одиниця лікарського засобу

Одиниця лікарського засобу (D) може бути будь-яким цитотоксичним, цитостатичним або імуномодуляторним (наприклад, імуносупресорним) або лікарським засобом. D означає 5
 одиницю (частку) лікарського засобу, що має атом, який може утворювати зв'язок зі спейсерною одиницею, з амінокислотною одиницею, із стретчерною одиницею або з одиницею антитіла. У деяких втіленнях одиниця лікарського засобу D має атом азоту, що може утворювати зв'язок із спейсерною одиницею. Використані тут терміни "одиниця лікарського засобу" та "частка 10
 лікарського засобу" є синонімічними і їх використовують поперемінно.

До придатних класів цитотоксичних або імуномодуляторних засобів відносяться, наприклад, антитубулінові засоби, зв'язувачі малих рівчаків ДНК, інгібітори реплікації ДНК та алкілувальні засоби.

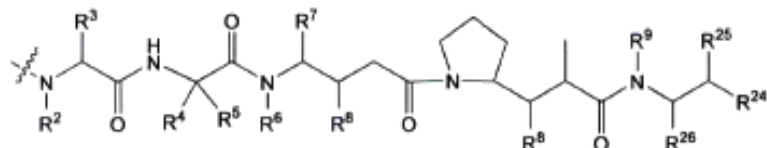
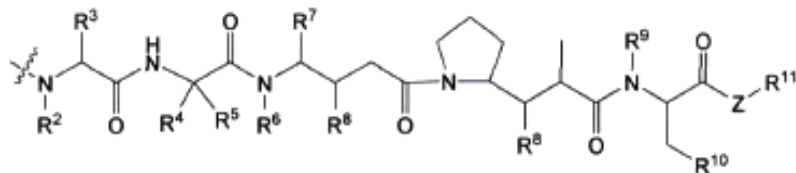
У деяких втіленнях лікарським засобом є ауристатин, такий як ауристатин Е (також відомий 15
 у цій галузі як похідна доластатину-10), або її похідна. Ауристатином може бути, наприклад, складний ефір, утворений між ауристатином Е та кетокислотою. Наприклад, ауристатин Е може вступати у реакцію з параацетилбензойною кислотою або бензоїлвалер'яною кислотою для вироблення відповідно АЕВ та АЕВВ. Іншими типовими ауристатинами є АФР, ММАФ та ММАЕ. Синтез і структура типових ауристатинів описані в публікації патентних заявок США №№ 2003- 20
 0083263, 2005-0238649 та 2005-0009751; в міжнародній патентній публікації № WO 04/010957, міжнародній патентній публікації № WO 02/088172 та патентах США №№ 6,323,315; 6,239,104; 6,034,065; 5,780,588; 5,665,860; 5,663,149; 5,635,483; 5,599,902; 5,554,725; 5,530,097; 5,521,284; 5,504,191; 5,410,024; 5,138,036; 5,076,973; 4,986,988; 4,978,744; 4,879,278; 4,816,444; та 4,486,414, кожний з яких включений до цього опису шляхом посилання в усій повноті та в усіх відношеннях. 25

Було виявлено, що ауристатини перешкоджають динаміці мікротрубочок та ядерному й клітинному поділу і мають протиракову активність. Ауристатини зв'язують тубулін і можуть чинити цитотоксичний або цитостатичний ефект на клітину, що експресує 158P1D7. Існує низка різних аналізів, відомих у цій галузі, які можуть бути використані для визначення, чи чинить

ауристатин або одержаний в результаті кон'югат антитіло-лікарський засіб цитостатичний або цитотоксичний ефект на бажану лінію клітин.

Способи визначення зв'язування сполукою тубуліну є відомими у цій галузі. Див., наприклад, Muller et al., Anal. Chem 2006, 78, 4390-4397; Hamel et al., Molecular Pharmacology, 1995 47: 965-976; та Hamel et al., The Journal of Biological Chemistry, 1990 265:28, 17141-17149. Для цілей цього винаходу може бути визначена відносна афінність сполуки до тубуліну. Деякі ауристатини за цим винаходом, яким надають перевагу, зв'язують тубулін з афінністю, що коливається від у 10 разів нижчої (більш слабка афінність), ніж афінність зв'язування MMAE з тубуліном, до у 10 разів, 20 разів або навіть у 100 разів більш високої (більш висока афінність), ніж зв'язувальна афінність MMAE з тубуліном.

У деяких втіленнях -D означає ауристатин формули D_E або D_F:

D_ED_F

або його фармацевтично прийнятну сіль чи сольватну форму;

де незалежно у кожному положенні:

хвиляста лінія позначає зв'язок;

R² означає -C₁-C₂₀ алкіл, -C₂-C₂₀ алкеніл або -C₂-C₂₀ алкініл;

R³ означає -H, -C₁-C₂₀ алкіл, -C₂-C₂₀ алкеніл, -C₂-C₂₀ алкініл, -карбоцикл, -C₁-C₂₀ алкілен (карбоцикл), -C₂-C₂₀ алкенілен(карбоцикл), -C₂-C₂₀ алкінілен (карбоцикл), -арил, -C₁-C₂₀ алкілен(арил), -C₂-C₂₀ алкенілен(арил), -C₂-C₂₀ алкінілен(арил), гетероцикл, -C₁-C₂₀ алкілен(гетероцикл), -C₂-C₂₀ алкенілен(гетероцикл) або -C₂-C₂₀ алкінілен(гетероцикл);

R⁴ означає -H, -C₁-C₂₀ алкіл, -C₂-C₂₀ алкеніл, -C₂-C₂₀ алкініл, карбоцикл, -C₁-C₂₀ алкілен (карбоцикл), -C₂-C₂₀ алкенілен(карбоцикл), -C₂-C₂₀ алкінілен (карбоцикл), арил, -C₁-C₂₀ алкілен(арил), -C₂-C₂₀ алкенілен(арил), -C₂-C₂₀ алкінілен (арил), -гетероцикл, -C₁-C₂₀ алкілен(гетероцикл), -C₂-C₂₀ алкенілен(гетероцикл) або -C₂-C₂₀ алкінілен(гетероцикл);

R⁵ означає -H або -C₁-C₈ алкіл;

або R⁴ і R⁵ разом утворюють карбоциклічне кільце і мають формулу -(C^aR^b)_s-, де R^a і R^b незалежно означають -H, -C₁-C₂₀ алкіл, -C₂-C₂₀ алкеніл, -C₂-C₂₀ алкініл або -карбоцикл і s означає 2, 3, 4, 5 або 6,

R⁶ означає -H, -C₁-C₂₀ алкіл, -C₂-C₂₀ алкеніл або -C₂-C₂₀ алкініл;

R⁷ означає -H, -C₁-C₂₀ алкіл, -C₂-C₂₀ алкеніл, -C₂-C₂₀ алкініл, карбоцикл, -C₁-C₂₀ алкілен (карбоцикл), -C₂-C₂₀ алкенілен(карбоцикл), -C₂-C₂₀ алкінілен (карбоцикл), -арил, -C₁-C₂₀ алкілен(арил), -C₂-C₂₀ алкенілен(арил), -C₂-C₂₀ алкінілен(арил), гетероцикл, -C₁-C₂₀ алкілен(гетероцикл), -C₂-C₂₀ алкенілен(гетероцикл) або -C₂-C₂₀ алкінілен(гетероцикл);

кожний R⁸ незалежно означає -H, -ОН, -C₁-C₂₀ алкіл, -C₂-C₂₀ алкеніл, -C₂-C₂₀ алкініл, -O-(C₁-C₂₀ алкіл), -O-(C₂-C₂₀ алкеніл), -O-(C₁-C₂₀ алкініл) або -карбоцикл;

R⁹ означає -H, -C₁-C₂₀ алкіл, -C₂-C₂₀ алкеніл або -C₂-C₂₀ алкініл;

R²⁴ означає -арил, -гетероцикл або -карбоцикл;

R²⁵ означає -H, C₁-C₂₀ алкіл, -C₂-C₂₀ алкеніл, -C₂-C₂₀ алкініл, -карбоцикл, -O-(C₁-C₂₀ алкіл), -O-(C₂-C₂₀ алкеніл), -O-(C₂-C₂₀ алкініл) або OR¹⁸, де R¹⁸ означає -H, гідроксильну захисну групу або прямий зв'язок, де OR¹⁸ означає =O;

R²⁶ означає -H, -C₁-C₂₀ алкіл, -C₂-C₂₀ алкеніл або -C₂-C₂₀ алкініл, -арил, -гетероцикл або -карбоцикл;

- R^{10} означає -арил або -гетероцикл;
 Z означає -O-, -S-, -NH або -NR¹², де R^{12} означає -C₁-C₂₀ алкіл, -C₂-C₂₀ алкеніл або -C₂-C₂₀ алкініл;
 R^{11} означає -H-, -C₁-C₂₀ алкіл, -C₂-C₂₀ алкеніл, -C₂-C₂₀ алкініл, -арил, -гетероцикл, -(R¹³O)_m-R¹⁴ або -(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂;
 m означає ціле число від 1 до 1000;
 R^{13} означає -C₂-C₂₀ алкілен, -C₂-C₂₀ алкенілен або -C₂-C₂₀ алкінілен;
 R^{14} означає -H-, -C₁-C₂₀ алкіл, -C₂-C₂₀ алкеніл або -C₂-C₂₀ алкініл;
у кожному випадку R^{15} незалежно означає -H-, -COOH-, -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂-, -(CH₂)_n-SO₃H-, -(CH₂)_n-SO₃-C₁-C₂₀ алкіл, -(CH₂)_n-SO₃-C₂-C₂₀ алкеніл або -(CH₂)_n-SO₃-C₂-C₂₀ алкініл;
у кожному випадку R^{16} незалежно означає -H-, -C₁-C₂₀ алкіл, -C₂-C₂₀ алкеніл, -C₂-C₂₀ алкініл або -(CH₂)_n-COOH; та
 n означає ціле число від 0 до 6;
де згадані радикали алкілу, алкенілу, алкінілу, алкілену, алкенілену, алкінілену, арилу, карбоциклу і гетероциклу, окремо або як частина іншої групи, є необов'язково заміщеними.
Ауристатини формули D_E включають ті, в яких згадані радикали алкілу, алкенілу, алкінілу, алкілену, алкенілену, алкінілену, арилу, карбоциклу та гетероциклу є незаміщеними.
Ауристатини формули D_E включають ті, в яких групи R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ і R⁹ є незаміщеними, а групи R¹⁹, R²⁰ і R²¹ є необов'язково заміщеними, як описано в цьому описі.
Ауристатини формули D_E включають ті, в яких:
 R^2 означає C₁-C₈ алкіл;
 R^3 , R^4 і R^7 незалежно вибирають з -H-, -C₁-C₂₀ алкілу, -C₂-C₂₀ алкенілу, -C₂-C₂₀ алкінілу, моноциклічного C₃-C₆ карбоциклу, -C₁-C₂₀ алкілен(моноциклічного C₃-C₆ карбоциклу), -C₂-C₂₀ алкенілен(моноциклічного C₃-C₆ карбоциклу), -C₂-C₂₀ алкінілен(моноциклічного C₃-C₆ карбоциклу), C₆-C₁₀ арилу, -C₁-C₂₀ алкілен(C₆-C₁₀ арил), -C₂-C₂₀ алкенілен(C₆-C₁₀ арил), -C₂-C₂₀ алкінілен(C₆-C₁₀ арил), гетероциклу, -C₁-C₂₀ алкілен(гетероциклу), -C₂-C₂₀ алкенілен(гетероциклу) або -C₂-C₂₀ алкінілен(гетероциклу); де згадані радикали алкілу, алкенілу, алкінілу, алкілену, алкенілену, алкінілену, карбоциклу, арилу та гетероциклу є необов'язково заміщеними;
 R^5 означає -H-;
 R^6 означає -C₁-C₈ алкіл;
кожний R^8 незалежно вибирають з -OH-, -O-(C₁-C₂₀ алкілу), -O-(C₂-C₂₀ алкенілу) або -O-(C₂-C₂₀ алкінілу), де згадані радикали алкілу, алкенілу та алкінілу є необов'язково заміщеними;
 R^9 означає -H або -C₁-C₈ алкіл;
 R^{24} означає необов'язково заміщений -феніл;
 R^{25} означає -OR¹⁸; де R^{18} означає H, гідроксильну захисну групу або прямий зв'язок, де OR¹⁸ означає =O;
 R^{26} вибирають з -H-, -C₁-C₂₀ алкілу, -C₂-C₂₀ алкенілу, -C₂-C₂₀ алкінілу або -карбоциклу; де згадані радикали алкілу, алкенілу, алкінілу та карбоциклу є необов'язково заміщеними; або їх фармацевтично прийнятну сіль чи сольватну форму.
Ауристатини формули D_E включають ті, де:
 R^2 означає метил;
 R^3 означає -H-, -C₁-C₈ алкіл, -C₂-C₈ алкеніл або C₂-C₈ алкініл, де згадані радикали алкілу, алкенілу та алкінілу є необов'язково заміщеними;
 R^4 означає -H-, -C₁-C₈ алкіл, -C₂-C₈ алкеніл, -C₂-C₈ алкініл, моноциклічний C₃-C₆ карбоцикл, -C₆-C₁₀ арил, -C₁-C₈ алкілен(C₆-C₁₀ арил), -C₂-C₈ алкенілен(C₆-C₁₀ арил), -C₂-C₈ алкінілен(C₆-C₁₀ арил), -C₁-C₈ алкілен (моноциклічний C₃-C₆ карбоцикл), -C₂-C₈ алкенілен (моноциклічний C₃-C₆ карбоцикл), -C₂-C₈ алкінілен(моноциклічний C₃-C₆ карбоцикл); де згадані радикали алкілу, алкенілу, алкінілу, алкілену, алкенілену, алкінілену, арилу і карбоциклу окремо або як частина іншої групи є необов'язково заміщеними;
 R^5 означає -H-;
 R^6 означає метил;
 R^7 означає -C₁-C₈ алкіл, -C₂-C₈ алкеніл або -C₂-C₈ алкініл;
кожний R^8 означає метокси;
 R^9 означає -H або -C₁-C₈ алкіл;
 R^{24} означає -феніл;
 R^{25} означає -OR¹⁸; де R^{18} означає H, гідроксильну захисну групу або прямий зв'язок, де OR¹⁸ означає =O;
 R^{26} означає метил;
або їх фармацевтично прийнятну сіль.

Ауристатини формули D_E включають ті, де:

R² означає метил; R³ означає -H або -C₁-C₃ алкіл; R⁴ означає -C₁-C₅ алкіл; R⁵ означає -H; R⁶ означає метил; R⁷ означає ізопропіл або сек-бутил; R⁸ означає метокси; R⁹ означає -H або -C₁-C₈ алкіл; R²⁴ означає феніл; R²⁵ означає -OR¹⁸; де R¹⁸ означає -H, гідроксильну захисну групу або прями́й зв'язок, де OR¹⁸ означає =O; і R²⁶ означає метил; або їх фармацевтично прийнятну сіль чи сольватну форму.

Ауристатини формули D_E включають ті, де:

R² означає метил або C₁-C₃ алкіл,

R³ означає -H або -C₁-C₃ алкіл;

R⁴ означає -C₁-C₅ алкіл;

R⁵ означає H;

R⁶ означає C₁-C₃ алкіл;

R⁷ означає -C₁-C₅ алкіл;

R⁸ означає -C₁-C₃ алкокси;

R⁹ означає -H або -C₁-C₈ алкіл;

R²⁴ означає феніл;

R²⁵ означає -OR¹⁸; де R¹⁸ означає -H, гідроксильну захисну групу або прями́й зв'язок, де OR¹⁸ означає =O; та

R²⁶ означає -C₁-C₃ алкіл;

або форму їх фармацевтично прийнятної солі.

Ауристатини формули D_F включають ті, де:

R² означає метил;

R³, R⁴ та R⁷ незалежно вибирають з -H, -C₁-C₂₀ алкілу, -C₂-C₂₀ алкенілу, -C₂-C₂₀ алкінілу, моноциклічного C₃-C₆ карбоциклу, -C₁-C₂₀ алкілен(моноциклічного C₃-C₆ карбоциклу), -C₂-C₂₀ алкенілен(моноциклічного C₃-C₆ карбоциклу), -C₂-C₂₀ алкінілен(моноциклічного C₃-C₆ карбоциклу), -C₆-C₁₀ арилу, -C₁-C₂₀ алкілен(C₆-C₁₀ арилу), -C₂-C₂₀ алкенілен(C₆-C₁₀ арилу), -C₂-C₂₀ алкінілен(C₆-C₁₀ арилу), гетероциклу, -C₁-C₂₀ алкілен(гетероциклу), -C₂-C₂₀ алкенілен(гетероциклу) або -C₂-C₂₀ алкінілен(гетероциклу); де згадані радикали алкілу, алкенілу, алкінілу, алкілену, алкенілену, алкінілену, карбоциклу, арилу та гетероциклу окремо або як частина іншої групи є необов'язково заміщеними;

R⁵ означає -H;

R⁶ означає метил;

кожний R⁸ означає метокси;

R⁹ означає -H, -C₁-C₂₀ алкіл, -C₂-C₂₀ алкеніл або -C₂-C₂₀ алкініл; де згадані радикали алкілу, алкенілу та алкінілу є необов'язково заміщеними;

R¹⁰ означає необов'язково заміщений арил або необов'язково заміщений гетероцикл;

Z означає -O-, -S-, -NH- або -NR¹², де R¹² означає -C₁-C₂₀ алкіл, -C₂-C₂₀ алкеніл або -C₂-C₂₀ алкініл, кожний з яких є необов'язково заміщеним;

R¹¹ означає -H, -C₁-C₂₀ алкіл, -C₂-C₂₀ алкеніл, -C₂-C₂₀ алкініл, -арил, -гетероцикл, -(R¹³O)_m-R¹⁴ або -(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂, де згадані радикали алкілу, алкенілу, алкінілу, арилу та гетероциклу є необов'язково заміщеними;

m означає ціле число від 1 до 1000 або m=0;

R¹³ означає -C₂-C₂₀ алкілен, -C₂-C₂₀ алкенілен або -C₂-C₂₀ алкінілен, кожний з яких є необов'язково заміщеними;

R¹⁴ означає -H, -C₁-C₂₀ алкіл, -C₂-C₂₀ алкеніл або -C₂-C₂₀ алкініл, де згадані радикали алкілу, алкенілу та алкінілу є необов'язково заміщеними;

у кожному разі R¹⁵ незалежно означає -H, -COOH, -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂, -(CH₂)_n-SO₃H, -(CH₂)_n-SO₃-C₁-C₂₀ алкіл, -(CH₂)_n-SO₃-C₂-C₂₀ алкеніл, або -(CH₂)_n-SO₃-C₂-C₂₀ алкініл, де згадані радикали алкілу, алкенілу та алкінілу є необов'язково заміщеними;

у кожному разі R¹⁶ незалежно означає -H, -C₁-C₂₀ алкіл, -C₂-C₂₀ алкеніл, -C₂-C₂₀ алкініл або -(CH₂)_n-COOH, де згадані радикали алкілу, алкенілу та алкінілу є необов'язково заміщеними;

n означає ціле число від 0 до 6;

або їх фармацевтично прийнятну сіль

У деяких із цих втілень R¹⁰ означає необов'язково заміщений феніл.

Ауристатини формули D_F включають ті, де групи R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, та R⁹ є незаміщеними і групи R¹⁰ та R¹¹ є такими, як описано тут.

Ауристатини формули D_F включають ті, де згадані радикали алкілу, алкенілу, алкінілу, алкілену, алкенілену, алкінілену, арилу, карбоциклу та гетероциклу є незаміщеними.

Ауристатини формули D_F включають ті, де:

R^2 означає $-C_1-C_3$ алкіл; R^3 означає $-H$ або $-C_1-C_3$ алкіл; R^4 означає $-C_1-C_5$ алкіл; R^5 означає $-H$; R^6 означає $-C_1-C_3$ алкіл; R^7 означає $-C_1-C_5$ алкіл; R^8 означає $-C_1-C_3$ алкокси; R^9 означає $-H$ або $-C_1-C_8$ алкіл; R^{10} означає необов'язково заміщений феніл; Z означає $-O-$, $-S-$ або $-NH-$; R^{11} має визначене тут значення; або їх фармацевтично прийнятну сіль.

5 Ауристатини формули D_F включають ті, де:

R^2 означає метил; R^3 означає $-H$ або $-C_1-C_3$ алкіл; R^4 означає $-C_1-C_5$ алкіл; R^5 означає $-H$; R^6 означає метил; R^7 означає ізопропіл або сек-бутил; R^8 означає метокси; R^9 означає $-H$ або $-C_1-C_8$ алкіл; R^{10} означає необов'язково заміщений феніл; Z означає $-O-$, $-S-$ або $-NH-$; і R^{11} має визначене тут значення; або їх фармацевтично прийнятну сіль.

10 Ауристатини формули D_F включають ті, де:

R^2 означає метил; R^3 означає $-H$ або $-C_1-C_3$ алкіл; R^4 означає $-C_1-C_5$ алкіл; R^5 означає $-H$; R^6 означає метил; R^7 означає ізопропіл або сек-бутил; R^8 означає метокси; R^9 означає $-H$ або $-C_1-C_8$ алкіл; R^{10} означає феніл; і Z означає $-O-$ або $-NH-$ і R^{11} має визначене тут значення, переважно водень; або їх фармацевтично прийнятну сіль.

15 Ауристатини формули D_F включають ті, де:

R^2 означає $-C_1-C_3$ алкіл; R^3 означає $-H$ або $-C_1-C_3$ алкіл; R^4 означає $-C_1-C_5$ алкіл; R^5 означає $-H$; R^6 означає $-C_1-C_3$ алкіл; R^7 означає $-C_1-C_5$ алкіл; R^8 означає $-C_1-C_3$ алкокси; R^9 означає $-H$ або $-C_1-C_8$ алкіл; R^{10} означає феніл; і Z означає $-O-$ або $-NH-$ та R^{11} має визначене тут значення, переважно водень; або форму їх фармацевтично прийнятної солі.

20 Ауристатини формули D_E або D_F включають ті, де R^3 , R^4 і R^7 незалежно означають ізопропіл або сек-бутил і R^5 означає $-H$. У показовому втіленні R^3 і R^4 кожний означають ізопропіл, R^5 означає H і R^7 означає сек-бутил. Решта замісників мають визначені тут значення.

Ауристатини формули D_E або D_F включають ті, де R^2 і R^6 кожний означають метил і R^9 означає H . Решта замісників мають визначені тут значення.

25 Ауристатини формули D_E або D_F включають ті, де у кожному разі R^8 означає $-OCH_3$. Решта замісників мають визначені тут значення.

Ауристатини формули D_E або D_F включають ті, де R^3 і R^4 кожний означають ізопропіл, R^2 і R^6 кожний означають метил, R^5 означає H , R^7 означає сек-бутил, у кожному разі R^8 означає $-OCH_3$ і R^9 означає H . Решта замісників мають визначені тут значення.

30 Ауристатини формули D_F включають ті, де Z означає $-O-$ або $-NH-$. Решта замісників мають визначені тут значення.

Ауристатини формули D_F включають ті, де R^{10} означає арил. Решта замісників мають визначені тут значення.

35 Ауристатини формули D_F включають ті, де R^{10} означає $-феніл$. Решта замісників мають визначені тут значення.

Ауристатини формули D_F включають ті, де Z означає $-O-$ і R^{11} означає H , метил або t -бутил. Решта замісників мають визначені тут значення.

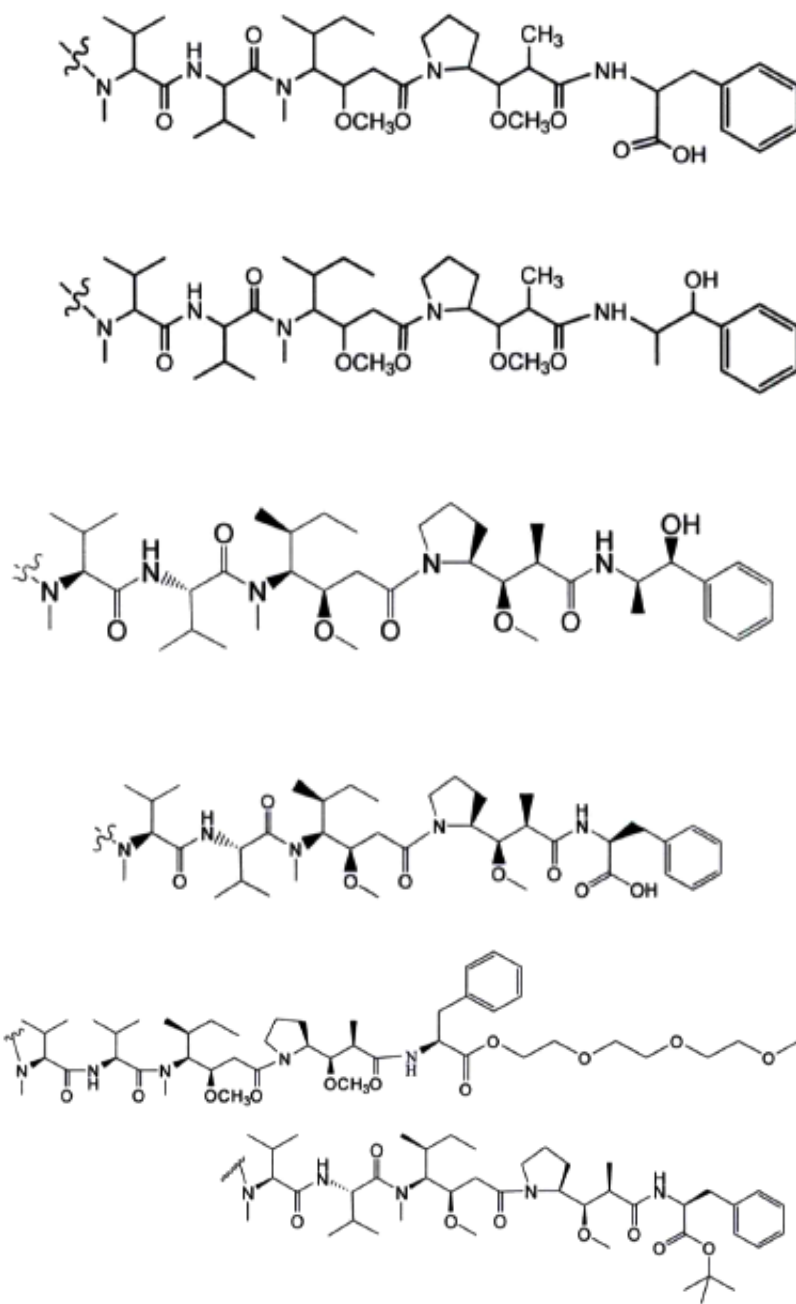
40 Ауристатини формули D_F включають ті, де коли Z означає $-NH-$, R^{11} означає $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$, де R^{15} означає $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ і R^{16} означає $-C_1-C_8$ алкіл або $-(CH_2)_n-COOH$. Решта замісників мають визначені тут значення.

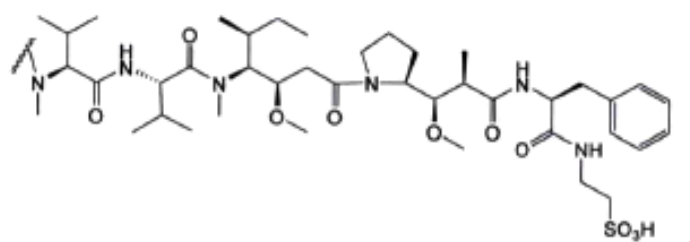
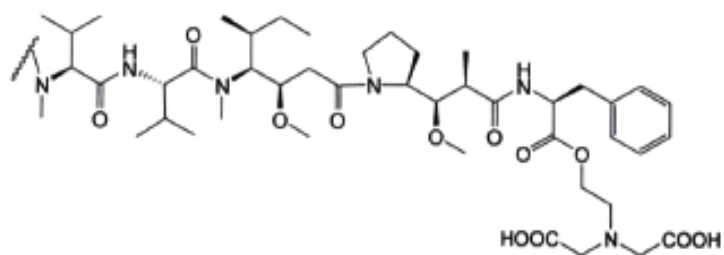
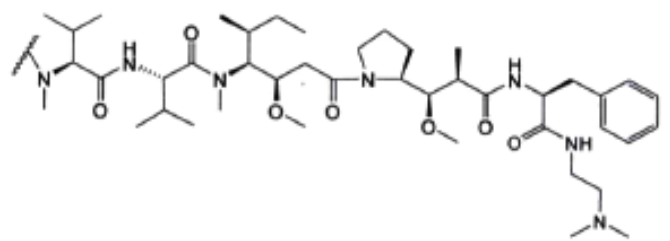
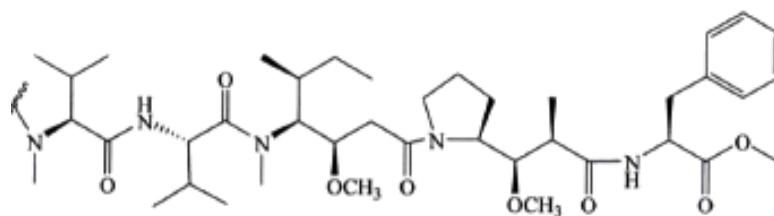
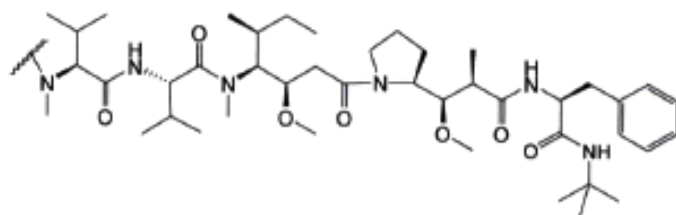
Ауристатини формули D_F включають ті, де коли Z означає $-NH-$, R^{11} означає $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$, де R^{15} означає $-(CH_2)_n-SO_3H$. Решта замісників мають визначені тут значення.

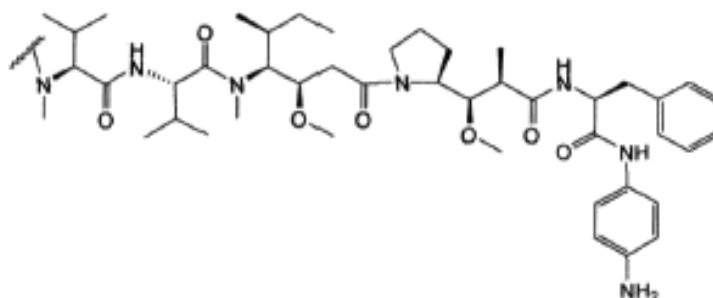
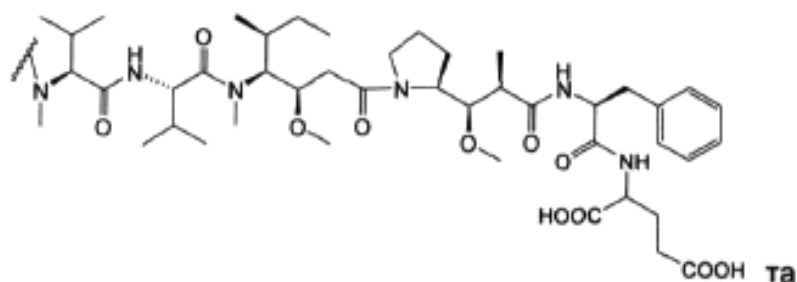
У втіленнях, яким надають перевагу, коли D означає ауристатин формули D_E , w означає ціле число від 1 до 12, краще від 2 до 12, u означає 1 або 2 і a краще означає 1.

45 У деяких втіленнях, де D означає ауристатин формули D_F , a означає 1 і w та u означають 0.

Ілюстративні одиниці лікарського засобу ($-D$) включають одиниці лікарського засобу з такими структурами:







або їх фармацевтично прийнятні солі чи сольвати.

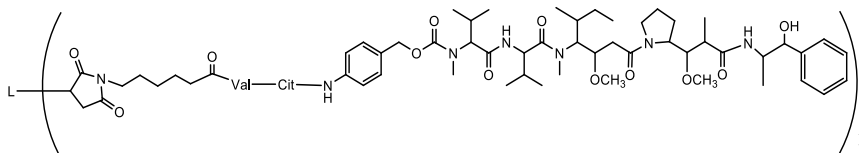
В одному аспекті гідрофільні групи, такі як, але це не є обмеженням, складні
 5 тріетилєнєлієолєві єфіри (TEG), можуть бути приєрієлені до єдиниєи лієарського засобу у R¹¹.
 Без обмеження теорієи, гідрофільні групи допомагають в ієтернєлієаєії та неаєломераєії
 єдиниєи лієарського засобу.

У деяких втієнєнєх єдиниєа лієарського засобу не є T2T-1027. У деяких втієнєнєх єдиниєа
 лієарського засобу не є ауристатиєом Е, доластатиєом 10 або ауристатиєом РЕ.

Поєазові сполуєи єон'єєату антитіло-лієарський засіб мають наведєні далі структури, в яких
 10 "L" або "mAb-s-" означає моєклональєне антитіло до 158P1D7, позначєне Ha15-10ac12, яке
 визначєне в єьому оєієі:

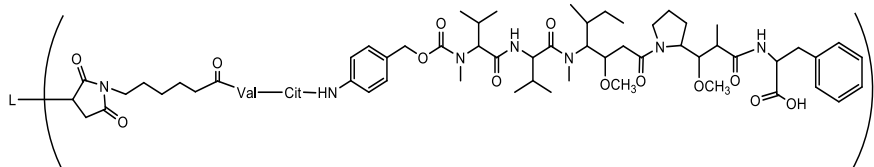
L-MC-vc-PAB-MMAE

15



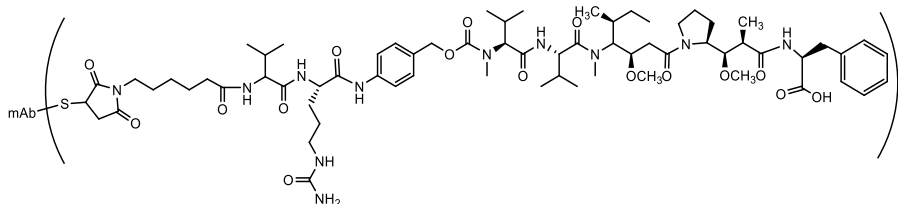
або

L-MC-vc-PAB-MMAF



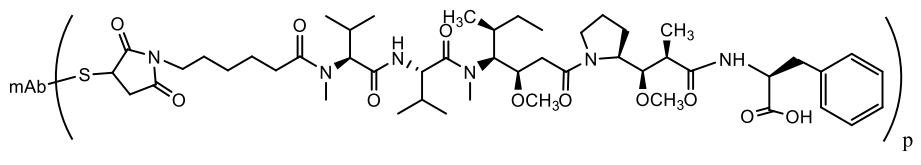
20

або



або

L-MC-MMAF



або його фармацевтично прийнятну сіль.

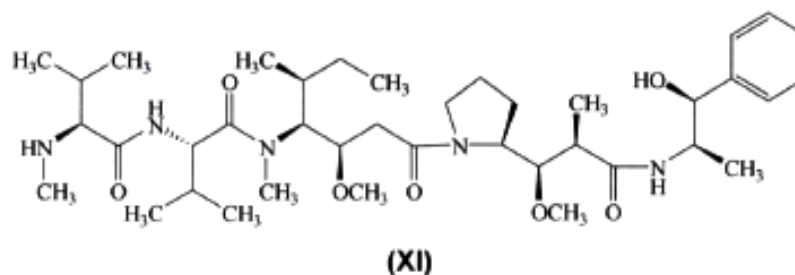
У деяких втіленнях одиницею лікарського засобу є каліхеаміцин, камптотецин, мейтанзиноїд або антрациклін. У деяких втіленнях лікарським засобом є таксан, топоізомеразний інгібітор, алкалоїд вінка або подібне.

У деяких типових втіленнях до підходящих цитотоксичних засобів відносяться, наприклад, зв'язувачі малих рівчаків ДНК (наприклад, ендіїни та лекситропсини, сполука CBI; див. також патент США №6,130,237), дуокарміцини, таксани (наприклад, паклітаксел і доцетаксел), пуроміцини та алкалоїди вінка. Іншими цитотоксичними засобами є, наприклад, CC-1065, SN-38, топотекан, морфоліно-доксорубіцин, ризоксин, ціаноморфоліно-доксорубіцин, ехіноміцин, комбретастатин, нетропсин, епотилон А і В, естрамустин, криптофізини, кематодин, мейтанзиноїди, дискодермолід, елейтеробін та мітоксантрон.

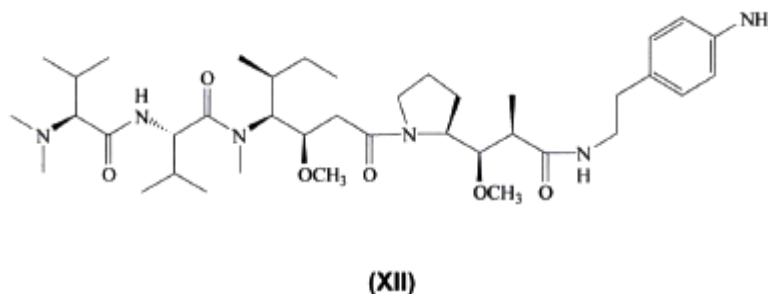
У деяких втіленнях лікарським засобом є антитубуліновий засіб. Прикладами антитубулінового засобу є ауристатини, таксани (наприклад, Taxol® (паклітаксел), Taxotere® (доцетаксел)), T67 (Туларик) та алкалоїди вінка (наприклад, вінкрестин, вінбластин, віндезин та вінорелбін). Іншими антитубуліновими засобами є, наприклад, похідні бакатину, аналоги таксану (наприклад, епотилон А і В), нокодазол, колхіцин і колцимід, естрамустин, криптофізини, кематодин, мейтанзиноїди, комбретастатини, дискодермолід і елейтеробін.

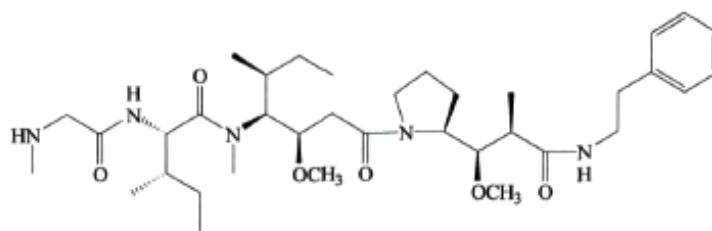
У деяких втіленнях цитотоксичним засобом є мейтанзиноїд, інша група антитубулінових засобів. Наприклад, у конкретних втіленнях мейтанзиноїдом є мейтанзин або DM-1 (ImmunoGen, Inc.; див. також Chari et al., 1992, Cancer Res. 52:127-131).

У деяких втіленнях цитотоксичним або цитостатичним засобом є доластатин. У деяких втіленнях цитотоксичний або цитостатичний засіб належить до класу ауристатинів. Отже, у конкретному втіленні цитотоксичним або цитостатичним засобом є MMAE (Формула XI). В іншому конкретному втіленні цитотоксичним або цитостатичним засобом є AFP (Формула XVI).

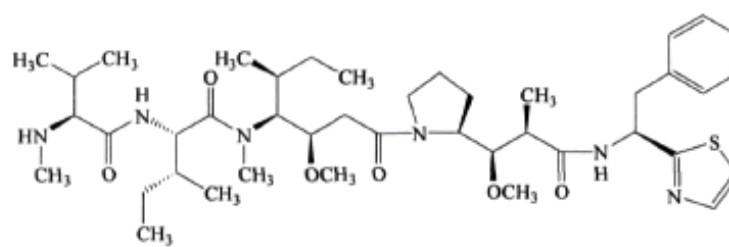


У деяких втіленнях цитотоксичним або цитостатичним засобом є сполука формул XII-XXI або її фармацевтично прийнятна сіль:

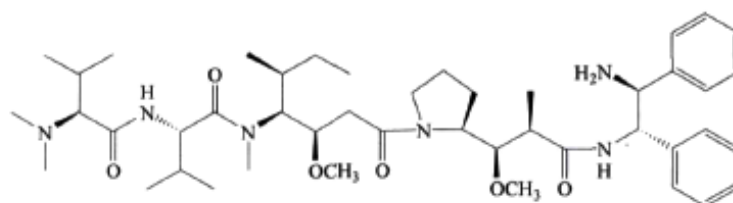




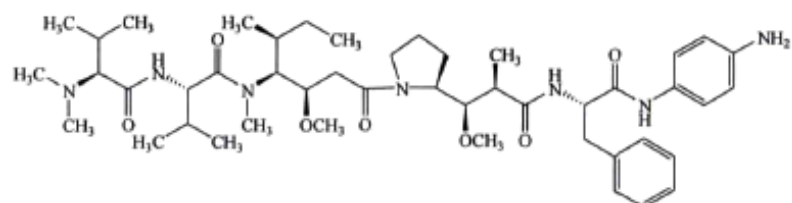
(XIII)



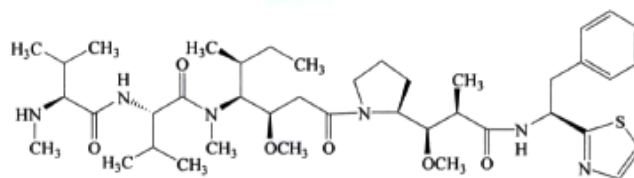
(XIV)



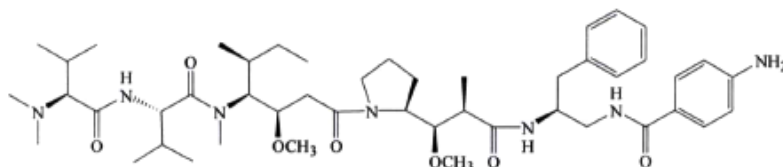
(XV)



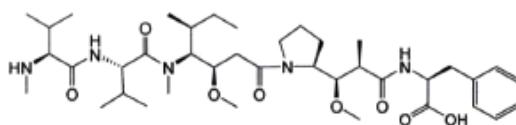
(XVI)



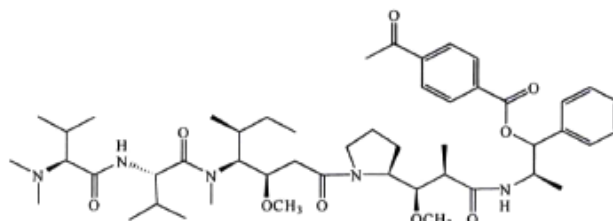
(XVII)



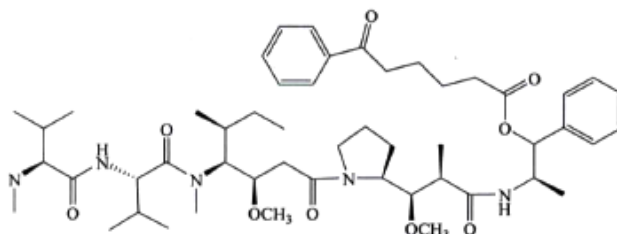
(XVIII)



(XIV)



(XX)



(XXI)

X.) Завантаження лікарського засобу

Завантаження лікарського засобу представлено r і являє собою середню кількість часток лікарського засобу на антитіло в молекулі. Кількість завантаження лікарського засобу може коливатися від 1 до 20 частин лікарського засобу (D) на антитіло. Кон'югати антитіло-лікарський засіб за винаходом включають колекції антитіл, кон'югованих з низкою частин лікарських засобів, від 1 до 20. Середня кількість частин лікарського засобу на антитіло у препаратах кон'югату антитіло-лікарський засіб з реакцій кон'югації може бути визначена традиційними засобами, такими як масова спектроскопія та імуно-ферментний аналіз (ІФА). Також можна визначити кількісне розповсюдження кон'югату антитіло-лікарський засіб в перерахунку на r . У деяких випадках відокремлення, очищення та визначення характеристики гомогенного кон'югату антитіло-лікарський засіб, де r є певна величина з кон'югату антитіло-лікарський засіб з іншими завантаженнями ліків, можна досягти за допомогою такого засобу, як електрофорез.

Для деяких кон'югатів антитіло-лікарський засіб r може бути обмежено кількістю сайтів прикріплення на антитілі. Наприклад, якщо прикріпленням є цистеїнтіол, як у вказаних вище

ілюстративних втіленнях, антитіло може мати лише одну або декілька цистеїнтіолові групи або може мати лише одну або декілька достатньо реакційноздатні тіолові групи, через які може бути прикріплений лінкер. У деяких втіленнях більш високе завантаження лікарського засобу, наприклад $p > 5$, може спричинити агрегацію, нерозчинність, токсичність або втрату клітинної проникності деяких кон'югатів антитіло-лікарський засіб. У деяких втіленнях завантаження лікарського засобу для кон'югату антитіло-лікарський засіб за винаходом коливається від 1 до близько 8; від близько 2 до близько 6; від близько 3 до близько 5; від близько 3 до близько 4; від близько 3,1 до близько 3,9; від близько 3,2 до близько 3,8; від близько 3,2 до близько 3,7; від близько 3,2 до близько 3,6; від близько 3,3 до близько 3,8; або від близько 3,3 до близько 3,7. Насправді, було виявлено, що для деяких кон'югатів антитіло-лікарський засіб оптимальним співвідношенням одиниці лікарського засобу на антитіло може становити менш ніж 8 і може становити від близько 2 до близько 5. Див. патент США № 2005-0238649 A1 (включений тут як посилання в усій повноті).

У деяких втіленнях менше, ніж теоретичний максимум, одиниць лікарського засобу кон'югують з антитілом під час реакції кон'югації. Антитіло може містити, наприклад, лізинові залишки, які не реагують з проміжною сполукою лікарський засіб-лінкер або з лінкерним реактивом, як вказано нижче. Загалом, антитіла не містять багато вільних і реакційноздатних цистеїнтіолових груп, які можуть бути прикріплені до частки лікарського засобу; насправді, більшість цистеїнтіолових залишків в антитілах існують як дисульфідні містки. У деяких втіленнях антитіло може бути відновлене за допомогою відновлювального засобу, такого як дитіотрейтол (DTT) або трикарбонілетилфосфін (TCEP), за умов часткового або повного відновлення, для утворення реакційноздатних цистеїнтіолових груп. У деяких втіленнях антитіло піддають умовам денатурації для виявлення реакційноздатних нуклеофільних груп, таких як лізин або цистеїн.

Завантаження (співвідношення лікарський засіб/антитіло) кон'югату антитіло-лікарський засіб можна контролювати різними шляхами, наприклад: (i) обмеженням молярного надлишку проміжної сполуки лікарський засіб-лінкер або лінкертного реактиву відносно антитіла, (ii) обмеженням часу або температури реакції кон'югації, (iii) частковими або обмежувальними умовами відновлення для модифікації цистеїнтіолу, (iv) конструюванням за допомогою рекомбінантної технології амінокислотної послідовності антитіла, щоб модифікувати кількість та положення цистеїнових залишків для контролювання кількості та/або положення прикріплень лінкер-лікарський засіб (як thioMab або thioFab, одержані, як розкрито в цьому описі та в міжнародній заявці WO2006/034488 (включений тут шляхом посилання в усій повноті).

Має бути зрозумілим, що якщо більш ніж одна нуклеофільна група вступає у реакцію з проміжною сполукою лікарський засіб-лінкер або лінкерним реактивом з наступним реактивом частки лікарського засобу, тоді одержаний продукт є сумішшю сполук кон'югату антитіло-лікарський засіб із розповсюдженням однієї або більше одиниць лікарського засобу, прикріплених до антитіла. Середня кількість лікарських засобів на антитіло може бути обчислена із суміші за допомогою подвійного імунно-ферментного аналізу (ІФА) антитіл, що є специфічним для антитіла та специфічним для лікарського засобу. Окремі молекули кон'югату антитіло-лікарський засіб можуть бути встановлені у суміші за допомогою мас-спектроскопії та відокремлені за допомогою ВЕРХ, наприклад, хроматографії гідрофобної взаємодії (див., наприклад, Гемблет К.Дж. та ін. "Дія введення лікарського засобу на фармакологію, фармакокінетику і токсичність анти-CD30 кон'югату антитіло-лікарський засіб" (Hamblett, K.J., et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate" Реферат № 624, American Association for Cancer Research (Американська асоціація дослідження раку), 2004 Щорічна конференція, 27-31 березня 2004 р., Proceedings of the AACR ("Відомості ААДР"), Том 45, березень 2004 р.); Еллей С.К. та ін... "Контролювання розташування прикріплення лікарського засобу в кон'югатах антитіло-лікарський засіб" (Alley, S.C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates" Реферат №627, American Association for Cancer Research (Американська асоціація дослідження раку), 2004 Щорічна конференція, 27-31 березня 2004 р., Proceedings of the AACR ("Відомості ААДР"), Том 45, березень 2004 р.). У деяких втіленнях гомогенний кон'югат антитіло-лікарський засіб з одним значенням завантаження може бути ізольований із суміші кон'югату за допомогою електрофорезу або хроматографії.

XI.) Способи визначення цитотоксичного ефекту кон'югатів антитіло-лікарський засіб

Способи встановлення, чи чинить лікарський засіб або кон'югат антитіло-лікарський засіб цитостатичний та/або цитотоксичний ефект на клітину, є відомими. Загалом, цитотоксичну або цитостатичну активність кон'югату антитіло-лікарський засіб можна виміряти у такий спосіб: витримування клітин ссавця, що експресують білок-мішень кон'югату антитіло-лікарський засіб,

у середовищі культур клітин; вирощування клітин впродовж періоду часу від близько 6 годин до близько 5 днів; та вимірювання життєздатності клітин. Основані на клітинах аналізи в умовах *in vitro* можуть бути використані для вимірювання життєздатності (проліферації), цитотоксичності та індукування апоптозу (активування каспази) кон'югату антитіло-лікарський засіб.

Для встановлення, чи чинить кон'югат антитіло-лікарський засіб цитостатичний ефект, може бути використаний аналіз введення тимідину. Наприклад, ракові клітини, що експресують антиген-мішень, при щільності 5000 клітин на лунку 96-лункового планшета можуть бути вирощені впродовж 72-годинного періоду та витримані у 0,5 мкCi ³H-тимідину впродовж останніх 8 годин 72-годинного періоду. Введення ³H-тимідину у клітини культури вимірюють у присутності та за відсутності кон'югату антитіло-лікарський засіб.

Для визначення цитотоксичності може бути виміряний некроз або апоптоз (програмоване відмирання клітин). Некроз звичайно супроводжується підвищеною проникністю плазмової мембрани, набуханням клітини та розриванням плазмової мембрани. Апоптоз звичайно характеризується утворенням пухирців на мембрані, ущільненням цитоплазми та активуванням ендогенних ендонуклеаз. Встановлення будь-якого з цих ефектів на ракових клітинах свідчить, що кон'югат антитіло-лікарський засіб є придатним для лікування раку.

Життєздатність клітин може бути виміряна шляхом визначення вбирання клітиною барвника, такого як нейтральний червоний, трипановий синій або ALAMAR™ синій (див., наприклад, Page et al., 1993, *Intl. J. Oncology* 3:473-476). У такому аналізі клітини інкубують у середовищі, що містить барвник, клітини промивають, і решту барвника, що відображає вбирання клітиною барвника, вимірюють спектрофотометричним шляхом. Білок-зв'язувальний барвник сульфородамін В (SRB) також може бути використаний для вимірювання цитотоксичності (Skehan et al., 1990, *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1107-12).

Як альтернативу використовують тетразоліну сіль, таку як МТТ, у кількісному колориметричному аналізі для визначення виживання клітин ссавця та проліферації шляхом виявлення живих, а не мертвих, клітин (див., наприклад, Mosmann, 1983, *J. Immunol. Methods* 65:55-63).

Кількісний аналіз апоптозу може бути визначений шляхом вимірювання, наприклад, фрагментації ДНК. Доступними є комерційні фотометричні методи кількісного визначення в умовах *in vitro* фрагментації ДНК. Приклади таких аналізів, у тому числі TUNEL (який визначає введення мічених нуклеотидів у фрагментовану ДНК) та аналізи на основі імуно-ферментного аналізу (ІФА), описані у Biochemica, 1999, №2, стор. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

Апоптоз також може бути встановлений шляхом вимірювання морфологічних змін у клітині. Наприклад, як із некрозом, втрату цілності плазмової мембрани можна визначити шляхом вимірювання вбирання певних барвників (наприклад, флуоресцентного барвника, такого, як, наприклад, акридиновий оранжевий або бромід етидію). Спосіб вимірювання кількості апоптичних клітин було описано Дьюком та Кохеном у "Сучасних протоколах в імунології" (Duke and Cohen, *Current Protocols in Immunology* (Coligan et al. eds., 1992, стор. 3.17.1-3.17.16)). Клітини також можуть бути мічені барвником ДНК (наприклад, акридиновим оранжевим, бромідом етидію або пропідіумом йодиду), і за клітинами спостерігають відносно конденсації хроматину та скупчення вздовж внутрішньої ядерної мембрани. Іншими морфологічними змінами, які можуть бути виміряні для визначення апоптозу, є, наприклад, цитоплазмична конденсація, підвищене утворення пухирців на мембрані та зморщування клітин.

Присутність апоптичних клітин може бути виміряна як у прикріпленому, так і у "плавучому" компартментах культур. Наприклад, обидва компартменти можуть бути зібрані шляхом видалення супернатанту, трипсинування прикріплених клітин, поєднання препаратів з подальшою стадією промивання під центрифугою (наприклад, 10 хвилин при 2000 об./хв.) та виявлення апоптозу (наприклад, вимірюванням фрагментації ДНК) (див., наприклад, Piazza et al., 1995, *Cancer Research* 55:3110-16).

В умовах *in vivo* ефект терапевтичної композиції 158P1D7 може бути оцінений на підходящій тваринній моделі. Наприклад, можуть бути використані ксеногенні ракові моделі, в яких ракові експлантати або ксенотрансплантатні тканини, що перещеплюються, вводять тваринам з послабленим імунітетом, таким як безтимусні миші або миші із ТКІД (Klein et al., 1997, *Nature Medicine* 3: 402-408). Наприклад, у міжнародній патентній заявці РСТ WO98/16628 та патенті США №6,107,540 описані різні ксенотрансплантатні моделі раку передміхурової залози людини, здатні відтворювати розвиток первинних пухлин, мікрометастазування та утворення остеобластних метастазів, що є характерними для хвороби на пізній стадії. Можна передбачити ефективність із застосуванням аналізів, в яких вимірюють інгібування утворення пухлин, регресії пухлин або метастазування та подібне.

Аналізи в умовах *in vivo*, які оцінюють сприяння апоптозу, є придатними для оцінювання терапевтичних композицій. В одному втіленні ксенотрансплантати від мишей, що мають пухлини, оброблені терапевтичною композицією, можуть бути досліджені на предмет присутності вогнищ апоптозу та порівняні з необробленими контрольними мишами, що мають ксенотрансплантат. Ступінь виявлення вогнищ апоптозу в пухлинах оброблених мишей свідчить про терапевтичну ефективність композиції.

Терапевтичні композиції, що їх використовують при практичному застосуванні наведених вище способів, можуть бути складені у фармацевтичні композиції, що містять носій, придатний для бажаного способу доставляння. До придатних носіїв відноситься будь-який матеріал, який при поєднанні з терапевтичною композицією зберігає протипухлинну функцію терапевтичної композиції і загалом не є реакційноздатним з імунною системою пацієнта. Прикладами є, але це не є обмеженням, будь-які з низки стандартних фармацевтичних носіїв, таких як стерильні фосфатні забуференні сольові розчини, бактеріостатична вода та подібне (див. загалом Remington's Pharmaceutical Sciences 16th Edition, A. Osal., Ed., 1980).

Терапевтичні композиції можуть бути розчинені та введені будь-яким шляхом, здатним доставити терапевтичну композицію до центру пухлини. До потенційно ефективних шляхів введення відносять, але це не є обмеженням, внутрішньовенний, парентеральний, внутрішньочеревний, внутрішньом'язовий, внутрішньопухлинний, внутрішньошкірний, внутрішньоорганний, ортотопічний та подібні. Кращий склад для внутрішньовенної ін'єкції містить терапевтичну композицію у розчині стабілізованої бактеріостатичної води, стерильної нестабілізованої води та/або є розбавленим у полівінілхлоридних або поліетиленових пакетах із вмістом 0,9 % стерильного хлориду натрію для ін'єкцій, USP. Терапевтичні білкові препарати можуть бути ліофілізовані і зберігатися у вигляді стерильних порошків, краще у вакуумі, а потім відновлені у бактеріостатичній воді (із вмістом, наприклад, бензилового спирту як консерванту) або у стерильній воді перед ін'єкцією.

Протоколи дозування та введення ліків при лікуванні раку із застосуванням наведених вище способів варіюються залежно від способу та раку-мішені і загалом залежать від низки інших факторів, що є відомими у цій галузі.

XII.) Лікування раку, що експресує 158P1D7

Ідентифікація 158P1D7 як білка, що звичайно експресується в обмеженій низці тканин, але який також експресується при видах раку, таких як ті, перелік яких наведено в Таблиці I, відкриває низку терапевтичних підходів до лікування таких видів раку.

Що є важливим, спрямована протиракова терапія є корисною навіть тоді, коли цільовий білок експресується в здорових тканинах, навіть в здорових тканинах життєво важливих органів. Життєво важливим органом є орган, що є необхідним для підтримання життя, такий як серце або товста кишка. Не є життєво важливим орган, який може бути видалений, після чого особа все ще може вижити. Прикладами не життєво важливих органів є яєчники, молочна залоза та передміхурова залоза.

Експресія цільового білка у здоровій клітині, навіть у здоровій життєво важливій тканині, не усуває придатності засобу, націленого на цей білок, як терапевтичного проти певних видів пухлин, в яких цей білок також надмірно експресується. Наприклад, експресія в життєво важливих органах не є сама по собі згубною. Крім того, органи, що їх вважають мало важливими, такі як передміхурова залоза та яєчники, можуть бути видалені без спричинення смерті. Зрештою, на деякі життєво важливі органи не впливає експресія в здоровому органі внаслідок імунних привілеїв. Імунопривілейованими органами є органи, захищені від крові за допомогою бар'єру кров-орган, і тому є недоступними для імунотерапії. Прикладами імунопривілейованих органів є мозок та яєчки.

Відповідно, терапевтичні підходи, пов'язані з інгібуванням активності білка 158P1D7, є корисними для пацієнтів, які страждають на рак, що експресує 158P1D7. Ці терапевтичні підходи загалом поділяють на три класи. Перший клас модулює функцію 158P1D7, оскільки вона стосується росту клітин пухлини, спричиняючи інгібування або затримання росту пухлини чи індукування її знищення. Другий клас включає різні способи інгібування зв'язування або об'єднання білка 158P1D7 з його партнером зі зв'язування або з іншими білками. Третій клас включає низку способів інгібування транскрибування гену 158P1D7 або транслювання мРНК 158P1D7.

Відповідно, може бути проведене обстеження ракових пацієнтів на предмет присутності та рівня експресії 158P1D7, переважно із застосуванням імуногістохімічних оцінювань тканини пухлини, кількісної візуалізації 158P1D7 або інших технічних прийомів, які надійним чином вказують на присутність та ступінь експресії 158P1D7. Для цих цілей перевагу надають

імуногістохімічному аналізу біопсії пухлини або хірургічних зразків. Способи імуногістохімічного аналізу тканин пухлини є добре відомими у цій галузі.

XIII.) 158P1D7 як мішень для терапії із застосуванням антитіл

158P1D7 є привабливою мішенню для пов'язаних з антитілами стратегій лікування. У цій галузі відома низка основаних на антитілах стратегій, мішенями для яких є як позаклітинні, так і внутрішньоклітинні молекули (див., наприклад, комплементне знищення та знищення, опосередковане опосередкованою антитілами клітинною цитотоксичністю, а також застосування інтраантитіл). Оскільки 158P1D7 експресується раковими клітинами різних клітинних ліній відносно відповідних здорових клітин, забезпечують системне введення 158P1D7-імунореакційноздатних композицій, які проявляють відмінну чутливість без токсичних, неспецифічних та/або нецільових ефектів, спричинених зв'язуванням імунореакційноздатної композиції з нецільовими органами і тканинами. Антитіла, що мають специфічну реакційну здатність з доменами 158P1D7, є придатними для лікування видів раку, що експресують 158P1D7 систематично, переважно у вигляді кон'югатів антитіло-лікарський засіб (ADC), де кон'югат сполучений з токсином або терапевтичним засобом.

Спеціаліст у цій галузі розуміє, що антитіла можуть бути використані для специфічного спрямовування та зв'язування імуногенних молекул, таких як імуногенна ділянка послідовності 158P1D7, показаної на Фігурі 1. Крім того, досвідчений спеціаліст розуміє, що існує загальноприйнята практика кон'югування антитіл з цитотоксичними засобами (див., наприклад, Slevers et al. Blood 93:11 3678-3684 (1 червня 1999 р.)). При доставлянні цитотоксичних та/або терапевтичних засобів безпосередньо в клітини, наприклад, шляхом їх кон'югування з антитілами, специфічними для молекули, що її експресує згадана клітина (наприклад, 158P1D7), цитотоксичний засіб чинитиме свою відому біологічну дію (тобто цитотоксичність) на ці клітини.

У цій галузі відомий широкий вибір композицій і способів застосування кон'югатів антитіло-цитотоксичний засіб для знищення клітин. У контексті раку, типові способи включають введення ссавцеві, що має пухлину, біологічно ефективною кількості кон'югату, що містить вибраний цитотоксичний та/або терапевтичний засіб, сполучений із засобом проти клітини-мішені (наприклад, моноклональним антитілом до 158P1D7, краще Ha15-10ac12), який зв'язується з антигеном (наприклад, 158P1D7), що експресується, є доступним для зв'язування або локалізованим на поверхні клітин. Типовим втіленням є спосіб доставляння цитотоксичного та/або терапевтичного засобу в клітину, яка експресує 158P1D7, що полягає в кон'югуванні цитотоксичного засобу з антитілом, яке імуноспецифічним чином зв'язується з епітопом 158P1D7, та піддавання клітини впливу кон'югату антитіло-лікарський засіб (ADC). Іншим ілюстративним втіленням є спосіб лікування особи, щодо якої є підозри, що вона страждає на метастатичний рак, який включає стадію парентерального введення згаданий особі фармацевтичної композиції, що містить терапевтично ефективну кількість антитіла, кон'югованого з цитотоксичним та/або терапевтичним засобом.

Протиракова імунотерапія із застосуванням антитіл до 158P1D7 може бути проведена відповідно до різних підходів, що їх застосовують з успіхом при лікуванні інших видів раку, включаючи, але це не є обмеженням, раку товстої кишки (Arlen et al., 1998, Crit. Rev. Immunol. 18:133-138), множинної мієломи (Ozaki et al., 1997, Blood 90:3179-3186, Tsunenari et al., 1997, Blood 90:2437-2444), раку шлунка (Kasprzyk et al., 1992, Cancer Res. 52:2771-2776), В-клітинної лімфоми (Funakoshi et al., 1996, J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 19:93-101), лейкемії (Zhong et al., 1996, Leuk. Res. 20:581-589), колоректального раку (Moun et al., 1994, Cancer Res. 54:6160-6166; Velders et al., 1995, Cancer Res. 55:4398-4403) та раку молочної залози (Shepard et al., 1991, J. Clin. Immunol. 11:117-127). Деякі терапевтичні підходи пов'язані з кон'югуванням антитіла, позбавленого оболонки, з токсином або радіоізотопом, наприклад, кон'югуванням Y⁹¹ або I¹³¹ з анти-CD20 антитілами (наприклад, ZevalinTM, IDEC Pharmaceuticals Corp., або BexxarTM, Coulter Pharmaceuticals) відповідно, тоді як інші пов'язані з одночасним введенням антитіл та інших терапевтичних засобів, наприклад, HerceptinTM (моноклонального антитіла трастузу) з паклітакселом (Genentech, Inc.). У втіленні, якому надають перевагу, антитіла кон'югують із цитотоксичним засобом, згаданим вище, переважно похідною аурастатину, яку позначають як MMAE (Seattle Genetics).

Хоча терапія антитілами до 158P1D7 є придатною для всіх стадій раку, лікування антитілами може бути особливо доречним при розповсюдженному або метастатичному раку. Лікування за допомогою терапії антитілами за винаходом є показанням для пацієнтів, які пройшли один або більше курсів хіміотерапії. Як альтернатива, терапію антитілами за винаходом поєднують з хіміотерапевтичною або радіаційною схемами лікування для пацієнтів, які не одержували хіміотерапевтичного лікування. Крім того, терапія антитілами може

уможливити використання знижених доз супутньої хіміотерапії, особливо для пацієнтів, які пагано переносять токсичність хіміотерапевтичного засобу. Фен та ін. (Fan et al., Cancer Res. 53:4637-4642, 1993), Прюет та ін. (Prewett et al., International J. of Onco. 9:217-224, 1996) та Хенкок та ін. (Hancock et al., Cancer Res. 51:4575-4580, 1991) описують використання різних антитіл разом із хіміотерапевтичними засобами.

Відповідно, кращими моноклональними антитілами, що їх використовують у терапевтичних методах за винаходом, є ті, що є однаковою мірою повністю людськими і специфічним чином зв'язуються з антигеном-мішенню 158P1D7 з високою афінністю. Хоча кон'югат антитіло-лікарський засіб за винаходом є придатним для лікування раку, при якому експресується 158P1D7, кон'югат антитіло-лікарський засіб за винаходом може бути особливо терапевтично придатним при лікуванні раку сечового міхура.

XIV.) Коктейлі кон'югатів антитіло-лікарський засіб до 158P1D7

Терапевтичні методи за винаходом передбачають введення кон'югатів антитіло-лікарський засіб до 158P1D7 окремо, а також комбінацій або коктейлів різних моноклональних антитіл (тобто моноклональних антитіл до 158P1D7 або моноклональних антитіл, які зв'язують інший білок). Такі коктейлі моноклональних антитіл можуть мати певні переваги, оскільки вони містять моноклональні антитіла, спрямовані проти різних епітопів, задіюють різні ефекторні механізми або поєднують безпосередньо цитотоксичні моноклональні антитіла з моноклональними антитілами, що ґрунтуються на імуноефекторній функціональності. Такі моноклональні антитіла у поєднанні можуть проявляти синергійні терапевтичні ефекти. Крім того, моноклональні антитіла до 158P1D7 можуть бути введені паралельно з іншими видами терапевтичного впливу, включаючи, але це не є обмеженням, різні хіміотерапевтичні та біологічні засоби, андрогенові блокатори, імуномодулятори (наприклад, IL-2, GM-CSF), хірургічне втручання або опромінювання. У втіленні, якому надають перевагу, моноклональні антитіла до 158P1D7 вводять у кон'югованій формі.

Склади кон'югату антитіло-лікарський засіб до 158P1D7 вводять будь-яким шляхом, здатним доставити антитіла в клітину пухлини. До шляхів введення належать, але це не є обмеженням, внутрішньовенний, внутрішньочеревний, внутрішньом'язовий, внутрішньопухлинний, внутрішньошкірний та подібні шляхи. Лікування звичайно включає неодноразове введення препарату кон'югату антитіло-лікарський засіб до 158P1D7 прийнятним шляхом введення, таким як внутрішньовенна ін'єкція (IV), звичайно у дозі в межах, включаючи, але це не є обмеженням, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 або 25 мг/кг ваги тіла. Загалом, дози в межах від 10 до 1000 мг моноклонального антитіла на тиждень є ефективними і їх добре переносять.

На підставі клінічного досвіду з Herceptin® (трастузумаб) у лікуванні метастатичного раку молочної залози, початкова ударна доза приблизно 4 мг/кг ваги тіла пацієнта з наступними щотижневими дозами близько 2 мг/кг ваги тіла пацієнта IV препарату моноклонального антитіла є прийнятною схемою дозування. Краще, якщо початкову ударну дозу вводять у вигляді 90-хвилинної або більш тривалої інфузії. Періодичну підтримувальну дозу вводять у вигляді 30-хвилинної або більш тривалої інфузії, за умови, що початкову дозу пацієнт переніс добре. Як це розуміють спеціалісти у цій галузі, різні фактори можуть впливати на ідеальну схему дозування у конкретному випадку. До таких факторів належать, наприклад, афінність зв'язування та період напіввиведення використовуваних моноклональних антитіл, ступінь експресії 158P1D7 у пацієнта, ступінь циркулювання антигену культурального середовища 158P1D7, бажаний рівень концентрації антитіла у стабільному стані, частота лікування та вплив хіміотерапевтичних або інших засобів, що їх використовують у поєднанні зі способом лікування за винаходом, а також стан здоров'я конкретного пацієнта.

Необов'язково має бути проведене обстеження пацієнтів відносно рівнів 158P1D7 у конкретному зразку (наприклад, рівні циркулювання антигену до 158P1D7 та/або клітин, що експресують 158P1D7) для допомоги у визначенні найбільш ефективної схеми дозування тощо. Такі обстеження також використовують з метою контролю впродовж усього лікування і є придатними для вимірювання терапевтичного успіху у поєднанні з оцінюванням інших параметрів (наприклад, цитології сечі та/або рівнів імуноцитології при лікуванні раку сечового міхура або, за аналогією, рівнів PSA у сироватці при лікуванні раку передміхурової залози).

Однією з цілей цього винаходу є забезпечення кон'югатів антитіло-лікарський засіб до 158P1D7, які інгібують або уповільнюють ріст клітин пухлини, що експресують 158P1D7. Іншою метою цього винаходу є забезпечення способів інгібування ангиогенезу та інших біологічних функцій і відповідне зниження росту пухлин у ссавців, переважно людей, із застосуванням таких кон'югатів антитіло-лікарський засіб до 158P1D7 і, зокрема, із застосуванням таких кон'югатів

антитіло-лікарський засіб до 158P1D7, поєднаних з іншими лікарськими засобами або імунологічно-активними видами лікування.

XV.) Комбінована терапія

В одному втіленні відбувається синергія, коли пухлини, у тому числі пухлини людини, обробляють кон'югатами антитіло-лікарський засіб до 158P1D7 у поєднанні з хіміотерапевтичними засобами чи опромінюванням або їх поєднанням. Іншими словами, інгібування росту пухлини за допомогою кон'югату антитіло-лікарський засіб до 158P1D7 посилюється більше, ніж на це очікували, коли його поєднують з хіміотерапевтичними засобами чи опромінюванням або їх поєднанням. Синергія може проявлятися, наприклад, підвищеним інгібуванням росту пухлини при комбінованому лікуванні, ніж очікували від лікування лише кон'югатом антитіло-лікарський засіб до 158P1D7, або адитивним ефектом від лікування кон'югатом антитіло-лікарський засіб до 158P1D7 та хіміотерапевтичним засобом чи опромінюванням. Краще, якщо синергія проявляється у вигляді ремісії раку, коли на неї не очікують при лікуванні кон'югатом антитіло-лікарський засіб до 158P1D7 або при лікуванні із застосуванням додаткової адитивної комбінації кон'югату антитіло-лікарський засіб до 158P1D7 та хіміотерапевтичного засобу чи опромінювання.

Спосіб інгібування росту клітин пухлини із застосуванням кон'югату антитіло-лікарський засіб до 158P1D7 та комбінації хіміотерапії або променевої терапії чи обох має у своєму складі введення кон'югату антитіло-лікарський засіб до 158P1D7 перед, під час або після початку хіміотерапії чи променевої терапії, а також будь-якої їх комбінації (тобто перед і під час, перед і після, під час і після або перед, під час та після початку хіміотерапії та/або променевої терапії). Наприклад, кон'югат антитіло-лікарський засіб до 158P1D7 звичайно вводять між 1-м і 60-м днями, краще між 3-м і 40-м днями, ще краще між 5-м і 12-м днями перед початком променевої терапії та/або хіміотерапії. Проте, залежно від протоколу лікування та особливих потреб пацієнта спосіб здійснюють таким чином, щоб забезпечити найбільш ефективне лікування і зрештою продовження життя пацієнта.

Введення хіміотерапевтичних засобів може бути здійснене різними шляхами, у тому числі системно парентеральним та ентеральним шляхами. В одному втіленні кон'югати антитіло-лікарський засіб до 158P1D7 та хіміотерапевтичний засіб вводять у вигляді окремих молекул. Окремими прикладами хіміотерапевтичних засобів або хіміотерапії є цисплатин, дакарбазин (DTIC), дактиноміцин, мехлоретамін (азотистий іприт), стрептозоцин, циклофосфамід, кармустин (BCNU), ломустин (CCNU), доксорубіцин (адриаміцин), даунорубіцин, прокарбазин, мітоміцин, цитарабін, етопозид, метотрексат, 5-фторурацил, вінбластин, вінкрестин, блеоміцин, паклітаксел (таксол), доцетаксел (таксотер), альдеслейкін, аспарагіназа, бусульфан, карбоплатин, кладрибін, дакарбазин, флоксуридин, флударабін, гідроксисечовина, іфосфамід, інтерферон альфа, лейпролід, мегестрол, мельфалан, меркаптопурин, плікаміцин, мітотан, пегаспаргаза, пентостатин, піпоброман, плікаміцин, стрептозоцин, тамоксифен, теніпозид, тестолактон, тіогуанін, тіотепа, урамустин, вінорелбін, гемцитабін, хлорамбуцил, таксол та їх комбінації.

Джерело опромінювання, що його використовують у поєднанні з кон'югатом антитіло-лікарський засіб до 158P1D7, може бути або зовнішнім, або внутрішнім для пацієнта, який одержує лікування. Якщо джерело є зовнішнім для пацієнта, така терапія відома як зовнішня дистанційна променева терапія (EBRT). Коли джерело опромінювання є внутрішнім для пацієнта, таке лікування називають брахітерапією (близькофокусною променевою терапією) (BT).

Описані вище схеми лікування можуть бути додатково поєднані з додатковими засобами та/або схемами лікування раку, наприклад, додатковою хіміотерапією, протираковими вакцинами, інгібіторами сигнальної трансдукції, засобами, придатним для лікування росту аномальних клітин або раку, антитілами (наприклад, антитілами анти-CTLA-4, описаними в міжнародній заявці WO/2005/092380 (Pfizer)), або іншими лігандами, що інгібують ріст пухлин шляхом зв'язування з IGF-1R, і цитокінами.

Якщо ссавця піддають додатковій хіміотерапії, можуть бути використані хіміотерапевтичні засоби, описані вище. Крім того, можуть бути використані інгібітори фактору росту, модифікатори біологічної відповіді, антигормональна терапія, селективні модулятори естрогенового рецептору (SERM), інгібітори ангиогенезу та антиандрогени. Наприклад, можуть бути використані антигормони, наприклад, антиестрогени, такі як нолвадекс (тамоксифен), або антиандрогени, такі як казодекс (4'-ціано-3-(4-фторфенілсульфоніл)-2-гідрокси-2-метил-3'-і-(трифторметил)пропіонанілід).

Наведені вище терапевтичні підходи можуть бути поєднані з будь-якою схемою із широкого вибору схем хірургічного, хіміотерапевтичного або променевого лікування. Терапевтичні

підходи за винаходом можуть забезпечити застосування зниженого дозування хіміотерапії (або інших видів лікування) та/або менш частого введення, що є перевагою для всіх пацієнтів і особливо для тих, які не добре переносять токсичності хіміотерапевтичного засобу.

XVI.) Набори/готові вироби

Для описаного тут лабораторного, прогностичного, профілактичного, діагностичного і терапевтичного застосування винахід також охоплює набори. Такі набори можуть містити носій, упаковку або контейнер, що має відсіки для вміщування однієї або більше ємностей, таких як пробірки, трубки та подібне, причому кожний контейнер містить один з окремих елементів для використання у способі разом з етикеткою або вкладишем, що містять інструкції щодо використання, на зразок того, що описане в цьому описі. Наприклад, контейнери можуть містити антитіло, яке є або може бути міченим з можливістю виявлення. Набори можуть містити контейнер, що містить одиницю лікарського засобу. Набір може містити всі або частину амінокислотних послідовностей, показаних на Фігурі 2 або 3, або їхні аналоги чи молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує такі амінокислотні послідовності.

Набір за винаходом звичайно містить описаний вище контейнер та один або більше інші сполучені з ним контейнери, які містять матеріали, що є бажаними з комерційної точки зору і точки зору користувача, у тому числі буфери, розріджувачі, фільтри, голки, шприци; етикетки на носій, упаковку, контейнер, пробірку та/або трубки з переліком вмісту та/або інструкцій щодо використання, і вкладиші в упаковку з інструкціями щодо використання.

Етикетка може бути на контейнері або разом з ним для позначення, що композицію використовують для специфічного лікування або нетерапевтичного застосування, такого як застосування у прогнозуванні, профілактиці, діагностиці або лабораторних цілях, а також може мати вказівки щодо застосування в умовах *in vivo* або *in vitro*, як ті, що тут описані. Вказівки та/або інша інформація також може бути вміщена на вкладиші (або вкладишах) або етикетці (етикетках), які містяться разом з набором або на ньому. Етикетка може бути на контейнері або сполучена з ним. Етикетка може бути на контейнері, коли літери, цифри або інші знаки, що формують етикетку, є вилитими або вигравіюваними на самому контейнері; етикетка може бути сполучена з контейнером, коли вона присутня всередині ємності або носія, що також тримає контейнер, наприклад, як вкладиш до упаковки. На етикетці може бути зазначено, що композицію використовують для діагностування, лікування, профілактики або прогнозування стану, такого як рак тканини, вказаної в Таблиці I.

Терміни "набір" та "готовий виріб" можуть бути використані як синоніми.

В іншому втіленні винаходу забезпечений готовий виріб (вироби), що містить (містять) композиції, такі як антитіло (антитіла) або кон'югати антитіло-лікарський засіб (ADC), наприклад, матеріали, придатні для діагностування, прогнозування, профілактики та/або лікування раку тканин, таких як ті, що вказані в Таблиці I. Готовий виріб звичайно містить принаймні один контейнер і принаймні одну етикетку. До підходящих контейнерів відносяться, наприклад, пляшки, флакони, ампули, шприци та пробірки. Контейнери можуть бути виготовлені з різних матеріалів, таких як скло, метал або пластмаса. Контейнер може уміщувати амінокислотну послідовність (послідовності), малу молекулу (молекули), нуклеотидну послідовність (послідовності), популяцію (популяції) клітин та/або антитіло (антитіла). В іншому втіленні контейнер містить антитіло, його зв'язувальний фрагмент або специфічний зв'язувальний білок для застосування в оцінюванні експресії білка 158P1D7 в клітинах і тканинах або для відповідних лабораторних, прогностичних, діагностичних, профілактичних і терапевтичних цілей; вказівки та/або інструкції для такого використання можуть бути розміщені на такому контейнері або разом з ним, так само можуть бути вміщені реактиви та інші композиції або інструменти, що їх використовують для цих цілей.

Як альтернатива, контейнер може уміщувати композицію, що є ефективною для лікування, діагностування, прогнозування або профілактики стану, і може мати стерильний вхідний отвір (наприклад, контейнер може бути мішком для внутрішньовенного розчину або ампулою, що має пробку, проколювану за допомогою підшкірної голки для ін'єкцій). Активною речовиною в композиції може бути антитіло, здатне специфічним чином зв'язуватися з 158P1D7, або кон'югат антитіло-лікарський засіб, який специфічним чином зв'язується з 158P1D7.

Готовий виріб може додатково містити другий контейнер, що містить фармацевтично прийнятний буфер, такий як фосфат-забуферений сольовий розчин, розчин Рінгера та/або розчин декстрази. Він може додатково містити інші матеріали, бажані з комерційної точки зору і з точки зору користувача, у тому числі інші буфери, розчинники, фільтри, мішалки, голки, шприци та/або вкладиші до упаковки із вказівками та/або інструкціями щодо застосування.

ПРИКЛАДИ

Різні аспекти винаходу додатково описані та проілюстровані за допомогою декількох наведених далі прикладів, жодний з яких не має на меті обмежити обсяг винаходу.

Приклад 1 Антиген до 158P1D7

Виявили послідовність генів 158P1D7 із використанням методів супресійної віднімальної гібридизації (SSH), відомих у цій галузі. Визначили SSH- послідовність 158P1D7 з 223 п.о. з пулу раку сечового міхура мінус нормальні кДНК сечового міхура. Клон кДНК повної довжини для 158P1D7 ізолювали з пулу тканин раку сечового міхура. кДНК має довжину 2555 п.о. та кодує ORF з 841 амінокислотою (див. Фігуру 1). Ген 158P1D7 проявляє гомогенність до гену SLITRK6. Для більш докладної довідки див. патенти США US 6,863,892 (Agensys, Inc., Санта-Моніка, штат Каліфорнія), US 7,358,353 (Agensys, Inc., Санта-Моніка, штат Каліфорнія) та EP 1,311,675 (Agensys, Inc., Санта-Моніка, штат Каліфорнія). Для ілюстративних втілень антигену до 158P1D7 див. Фігуру 1.

Приклад 2 Утворення моноклональних антитіл до 158P1D7 (MAb)

В одному втіленні до терапевтичних моноклональних антитіл ("MAb") до 158P1D7 і варіантів 158P1D7 відносяться моноклональні антитіла, що вступають у реакцію з епітопами, специфічними для кожного білка або специфічними до послідовностей, що є спільними для варіантів, які зв'язуватимуть, розриватимуть або модулюватимуть біологічну функцію 158P1D7 або варіантів 158P1D7, наприклад такі, що розриватимуть взаємодію з лігандами, субстратами та партнерами зі зв'язування. До імуногенів для утворення таких моноклональних антитіл відносяться імуногени, створені для кодування або утримання позаклітинних доменів або усієї послідовності білка 158P1D7, ділянок, в яких передбачають уміщення функціональних мотивів, і ділянок варіантів білка 158P1D7, щодо яких передбачають, що вони є антигенними відповідно до комп'ютерного аналізу амінокислотної послідовності. До імуногенів відносяться пептиди та рекомбінантні білки, такі як tag5-158P1D7, гістедин-мічений білок, виведений з очищеної клітини ссавця. Крім того, клітини, сконструйовані для експресії високих рівнів 158P1D7, такі як UMUC-158P1D7 або 3T3-158P1D7, використовують для імунізації мишей.

Моноклональні антитіла до 158P1D7 одержали із застосуванням технології КсеноМиша (XenoMouse technology®) (Amgen Fremont), в якій інактивували локуси важкого і легкого каппа ланцюгів миші і ввели більшість локусів імуноглобуліну важкого і легкого каппа ланцюгів людини. Моноклональне антитіло, позначене Ha15-10ac12, одержали імунізацією ксеномишей, що продукують людський $\gamma 2$, причому рекомбінантні 3T3 клітини експресували 158P1D7.

Моноклональне антитіло до 158P1D7 Ha15-10ac12 специфічним чином зв'язується з клітинами, що експресують 158P1D7 (рекомбінантними та ендогенними), а також з рекомбінантним білком 158P1D7 за допомогою імунно-ферментного аналізу (ІФА).

Кодувальні послідовності ДНК для моноклонального антитіла 158P1D7 Ha15-10ac12 визначали після ізолювання мРНК з відповідних клітин гібридами за допомогою тризольного реактиву (Life Technologies, Gibco BRL).

Анти-158P1D7 Ha15-10ac12 варіабельні нуклеотидні послідовності важкого і легкого ланцюгів складали у послідовність з клітин гібридами із використанням наведеного далі протоколу. Клітини гібридами, що секретували Ha15-10ac12, лізували тризольним реактивом (Life Technologies, Gibco BRL). Очистили та обчислили загальну кількість РНА. кДНК першої ниті одержали із загальної РНК з оліго-праймінгом (dT)12-18 із використанням передампліфікаційної системи Gibco-BRL Superscript. кДНК першої ниті ампліфікували із використанням варіабельних праймерів важкого ланцюга імуноглобуліну людини та варіабельних праймерів легкого ланцюга імуноглобуліну людини. З продуктів ПЛР склали послідовність і визначили варіабельні ділянки важкого та легкого ланцюгів.

Перелік нуклеотидних та амінокислотних послідовностей варіабельних ділянок важкого та легкого ланцюгів поданий на Фігурах 2 і 3. Вирівнювання моноклональних антитіл Ha15-10ac12 до зародкової лінії людського Ig показане на Фігурах 4A-4B.

Приклад 3 Експресія Ha15-10ac12 із використанням методів рекомбінантної ДНК

Для експресії моноклонального антитіла Ha15-10ac12 рекомбінантним чином у трансфектованих клітинах варіабельні послідовності важкого і легкого ланцюгів моноклонального антитіла Ha15-10ac12 клонували відповідно у висхідному напрямку від константних ділянок IgG2 важкого ланцюга людини та Igk легкого ланцюга людини. Повні касети важкого ланцюга і легкого ланцюга моноклонального антитіла Ha15-10ac12 людини клонували у низхідному напрямку від промотора/підсилювача ЦМВ у клонуальному векторі. Сайт поліаденілування ввели у низхідному напрямку від кодувальної послідовності моноклонального антитіла. Рекомбінантні конструкції, що експресували моноклональне антитіло Ha15-10ac12, трансфектували в клітини CHO-K1SV. Моноклональне антитіло, споріднене з Ha15-10ac12, секретоване рекомбінантними клітинами CHO, оцінювали відносно зв'язування з клітинною

поверхнею 158P1D7 за допомогою потокової цитометрії. Клітини UMUC-контроль та UMUC-158P1D7 забарвили моноклональним антитілом Ha15-10ac12 або з клітини гібридами чи клітин CHO, трансфектованих векторними конструкціями важкого і легкого ланцюгів Ha15-10ac12. Зв'язування виявляли потоковою цитометрією.

Результати показують, що рекомбінантно-експресоване Ha15-10ac12, експресоване в клітинах CHO, зв'язується з 158P1D7 подібно до Ha15-10ac12, очищеного з гібридами. Моноклональне антитіло Ha15-10ac12, секретоване рекомбінантними клітинами, також оцінювали відносно зв'язування з рекомбінантним білком 158P1D7 за допомогою ІФА. Зв'язування Ha15-10ac12 з білком 158P1D7 було тотожним у матеріалі моноклонального антитіла, виведеного із CHO, та у матеріалі з гібридомних клітин.

Клітину яєчника китайського хом'яка (CHO), що виробляла антитіло, позначене Ha15-10ac12, було надіслано (поштою Federal Express) до Американської колекції типових культур (ATCC), п/с 1549, Манассас, штат Вірджинія, 20108 25 липня 2012 р., і їй було надано інвентарний номер РТА-13102.

Приклад 4 Кон'югування антитіла з лікарським засобом моноклонального антитіла Ha15-10ac12 MAb

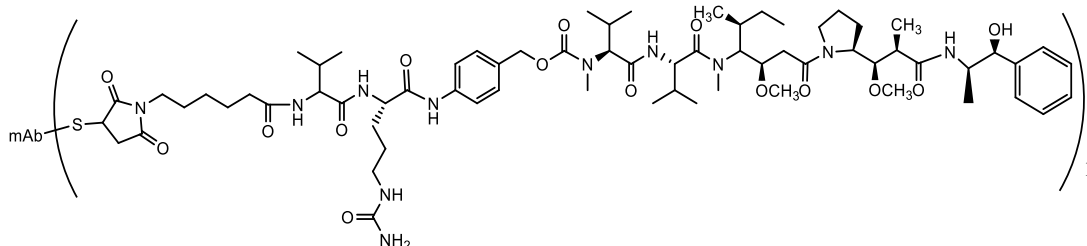
Моноклональне антитіло Ha15-10ac12 (Фігура 2) кон'югували з похідною ауристатину, позначеною MMAE (Формула XI), із застосуванням описаного тут лінкера vc (Val-Cit) для створення кон'югату антитіло-лікарський засіб (ADC) за винаходом, позначеного Ha15-10ac12vcMMAE, із застосуванням таких протоколів. Кон'югування лінкера vc (Val-Cit) з MMAE (Seattle Genetics, Inc., Сіетл, штат Вашингтон) провели із застосуванням загального способу, наведеного в Таблиці IV, для створення цитотоксичного vcMMAE (див. заявку US/2006/0074008).

Потім одержали кон'югат антитіло-лікарський засіб (ADC) за винаходом, позначений Ha15-10ac12vcMMAE, із використанням наведених далі протоколів.

Коротко, до розчину об'ємом 15 мг/мл моноклонального антитіла Ha22-2(2,4)6.1 у 10 ммоль ацетату при рівні pH 5,0, 1 % сорбіту, 3 % L-аргініну додали 20 %-й об'єм 0,1 М ТрисCl при рівні pH 8,4, 25 ммоль EDTA і 750 ммоль NaCl для приведення рівня pH розчину до 7,5, 5 ммоль EDTA і 150 ммоль хлориду натрію.

Буфер композиції (10 ммоль ацетату pH 5,0 з 5 % сорбіту) для моноклонального антитіла Ha15-10ac12 замінили відновлювальним буфером (25 ммоль борату натрію, 300 ммоль хлориду натрію, pH 9,0±0,1). Потім моноклональне антитіло Ha15-10ac12 частково відновили додаванням 5 ммоль EDTA та 2,65 молярних еквівалентів ТХЕФ (відносно молей моноклонального антитіла Ha15-10ac12). Потім цю суміш збовтували при температурі 37°C впродовж трьох (3) годин. Після дисульфідного відновлення суміш охолодили до цільової температури 15-17 °C і додали п'ять (5) еквівалентів лікарського засобу vcMMAE на моль у вигляді 4 %-ного розчину (об./об.) ДМСО. Через 60-75 хвилин надлишок vc, що не вступив у реакцію, погасили додаванням Н-ацетил-L-цистеїну у кількості 1 моль на моль vcMMAE, доданого на початку кон'югування. Через 15 хвилин рівень pH Ha15-10ac12vcMMAE довели до цільового рівня 6,0 – 6,4 із використанням концентрованого гістидинового буферного запасу з pH 5,2 та відфільтрували крізь 0,5/0,2 мкм PES-мембрану для видалення агрегованого кон'югату антитіло-лікарський засіб. Негайно після фільтрування здійснили тангенційне потокове фільтрування для видалення ДМСО та погашеного лінкера лікарського засобу і для обміну кон'югату антитіло-лікарський засіб з буфером, 20 ммоль гістидину (pH 6,0±0,1) із вмістом 5,5 % дегідрату трегалози. Після тангенційного потокового фільтрування Ha15-10ac12vcMMAE розбавили до кінцевої концентрації 6±1 мг/мл і додали полісорбат 20 до кінцевої концентрації 0,01 %.

Одержаний кон'югат антитіло-лікарський засіб позначили Ha15-10ac12vcMMAE, і він мав таку формулу:



де моноклональним антитілом є Ha15-10ac12 (Фігури 2 і 3), а p становить від 1 до 12. Краще значення p кон'югату антитіло-лікарський засіб, зазначеного в цьому прикладі, становило між 3,5 та 3,7.

Приклад 5 Характеристика Ha15-10ac12vcMMAE

Одержали кон'югати антитіло-лікарський засіб, які зв'язуються з 158P1D7, із використанням процедур, викладених у прикладі під назвою "Кон'югування антитіла з лікарським засобом моноклонального антитіла Ha15-10ac12", і їх відсортували, ідентифікували та охарактеризували із використанням комбінації аналізів, відомих у цій галузі.

А. Визначення афінності за допомогою флуоресцентного сортування клітин (FACS)

Ha15-10ac12vcMMAE аналізували відносно його здатності зв'язуватися з 158P1D7, що експресується на поверхні клітин SW780. Коротко, одинадцять (11) розчинів Ha15-10ac12vcMMAE інкубували з клітинами SW780 (50000 клітин на лунку) впродовж ночі при температурі 4 °C у кінцевій концентрації від 6,67 нмоль до 0,0001 нмоль. Наприкінці інкубування клітини промили та інкубували з анти-hlgG-PE детекторним антитілом впродовж 45 хв. при температурі 4 °C. Після промивання незв'язаних детекторних антитіл клітини аналізували за допомогою аналізу FACS. Одержали значення середньої інтенсивності флуоресценції (MFI), які показані в Таблиці VI. Значення MFI ввели у програмне забезпечення Graphpad Prism та аналізували із використанням рівняння зв'язування на одному сайті (гіпербола) $Y = B_{max} * X / (K_d + X)$ для утворення кривої насичення Ha15-10ac12vcMMAE, показаної на Фігурі 13. B_{max} означає значення MFI при максимальному зв'язуванні Ha15-10ac12vcMMAE з 158P1D7; K_d означає афінність зв'язування Ha15-10ac12vcMMAE, якою є концентрація Ha15-10ac12vcMMAE, необхідна для досягнення напівмаксимального зв'язування.

Обчислена афінність (K_d) Ha15-10ac12vcMMAE з 158P1D7, експресованим на поверхні клітини SW780, становила 0,005 нмоль.

В. Зв'язування FACS

Ha15-10ac12vcMMAE досліджували за допомогою FACS відносно його зв'язування з 158P1D7, експресованим на поверхні клітин UMUC, SW780 та CHP-212. Коротко, клітини зібрали та розмістили в планшети в концентрації 50000 клітин на лунку. Ha15-10ac12vcMMAE розбавили до 3 мкг/мл (для клітин UMUC та SW780) або 10 мкг/мл (для клітин CHP-212) та інкубували з клітинами (1 годину при температурі 4 °C). Наприкінці інкубування клітини промили та інкубували за допомогою антитіла, що виявляє анти-hlgG-PE, впродовж 1 години при температурі 4 °C. Після промивання незв'язаних детекторних антитіл клітини аналізували за допомогою аналізу FACS. Одержали значення середньої інтенсивності флуоресценції (MFI), які показані в Таблиці VII, гістограми показані на Фігурі 14.

Приклад 6 Клітинна цитотоксичність в умовах *in vitro*, опосередкована Ha15-10ac12vcMMAE

Здатність Ha15-10ac12vcMMAE опосередковувати SLITRK-6-залежну цитотоксичність оцінювали із використанням лінії клітин нейробластоми людини CHP-212, які ендегенно експресують SLITRK-6, та лінії клітин раку яєчників людини, IGROV-1, які не експресують SLITRK-6.

Коротко, клітини CHP-212 та IGROV-1 висіли у 50 мкл повного середовища при щільності 1000 клітин/лунка у 96-лункові планшети та помістили в інкубатор культур тканин при температурі 37°C; 5 % CO₂. Наступного дня 2х вихідний розчин Ha15-10ac12vcMMAE та ізотопне контрольне антитіло, кон'юговане з vcMMAE, одержали у повному середовищі і додали 50 мкл послідовних розчинів ADC у відповідні лунки. Клітини обробляли Ha15-10ac12vcMMAE та ізотипним контрольним антитілом, кон'югованим з vcMMAE, впродовж шести (6) днів в інкубаторі для культур тканин при температурі 37°C; 5 % CO₂. Наприкінці періоду інкубації додали 12 мкл аламарового синього або PrestoBlue в кожен лунку та інкубували чотири (4) години. Планшети зчитали із застосуванням зчитувача планшетів BioTek Synergy H4 з довжиною хвиль збудження 540 і довжиною хвиль емісії 590.

Ці дані показують, що ADC під назвою Ha15-10ac12vcMMAE може селективно індукувати цитотоксичність лінії клітин CHP-212, що експресують SLITRK-6, тоді як він не здатен індукувати цитотоксичність лінії клітин IGROV-1, які не експресують SLITRK-6. Отже, ці результати свідчать, що Ha15-10ac12vcMMAE може селективно доставляти цитотоксичний лікарський засіб в клітини, що експресують 158P1D7, що спричиняє їх загибель (Фігура 15).

В іншому експерименті клітини нейробластоми людини, CHP-212, що експресують SLITRK6 (мішень для моноклональних антитіл Ha15-10ac12 та M15-68(2)18) (порівн. моноклональне антитіло 68(18)1.1, див. WO 2004/072263) інкубували з досліджуваними речовинами, Ha15-10ac12vcMMAE та M15-68(2)18, для демонстрування будь-якої активності зі знищення клітин в умовах *in vitro* (цитотоксичності) цих речовин. Коротко, у 96-лункові планшети для дослідження висіли 4000 CHP-212 клітин/мл, і досліджувані антитіла добавили низкою розведень від 10000

нг/мл до 0,006 нг/мл із використанням шестикратного (6) розведення за дев'ять (9) разів плюс 0,0 нг/мл у кінцевій лунці для дослідження. Лунки розмістили по три. Крім того, контрольні антитіла та контрольні клітини (IGROV-1) розмістили подібним чином для порівняння з досліджуваними речовинами. Проведення аналізу залишили на чотири (4) дні перед додаванням PrestoBlue (пірменту, що забарвлює живі клітини) в лунки для одержання колориметричного зчитування даних виживаності клітин. Потім обчислили процентне співвідношення виживаності клітин в кожній лунці і дані аналізували із використанням нелінійного підбору сигмоїдної кривої доза-відповідь. Значення IC50 обчислювали із використанням програмного забезпечення для побудови графіків Prism, і цитотоксичні ефекти Ha15-10ac12vcMMAE порівняли з M15-68(2)18 та іншими контролями, що їх використовували в експерименті.

Результати показують, що Ha15-10ac12vcMMAE має кращу цитотоксичність в умовах *in vitro* при порівнянні з антитілом M15-68(2)18 та іншими контролями (Фігура 11). IC50 для Ha15-10ac12vcMMAE становило 0,9076, а IC50 для M15-68(2)18 обчислити було не можна.

Приклад 7 Інгібування росту пухлин за допомогою Ha15-10ac12vcMMAE в умовах *in vivo*

Значна експресія 158P1D7 на клітинних поверхнях тканин пухлини, разом з обмеженою експресією в здорових клітинах, робить 158P1D7 гарною мішенню для терапії антитілами і, подібно до цього, для терапії за допомогою кон'югату антитіло-лікарський засіб. Отже, оцінювали терапевтичну ефективність Ha15-10ac12vcMMAE на ксенотрансплантатних мишачих моделях раку сечового міхура, легенів, молочної залози та гліобластоми людини.

Ефективність кон'югату антитіло-лікарський засіб відносно росту пухлин та утворення метастазів досліджували на ксенотрансплантатних мишачих моделях раку (наприклад, підшкірно та ортотопічно).

Підшкірні (п.ш.) пухлини утворили ін'єкцією 5×10^4 - 10^6 ракових клітин, змішаних у розчині 1:1 з матригелем (Matrigel) (Collaborative Research), у правий бік самця миші із ТКІД. Для дослідження ефективності кон'югату антитіло-лікарський засіб відносно утворення пухлин розпочали введення ін'єкцій кон'югату антитіло-лікарський засіб в один день з ін'єкціями клітин пухлини. Як контроль мишам ввели ін'єкцію очищеного IgG людини чи забуференого фосфатами сольового розчину (PBS), або очищеного моноклонального антитіла, яке розпізнає нерелевантний антиген, що не експресується в клітинах людини. У попередніх дослідженнях жодної відмінності між впливом контрольного IgG або PBS на ріст пухлин виявлено не було. Розмір пухлин визначили за допомогою вимірювання каверноміром, і об'єм пухлини обчислили як $\text{ширина}^2 \times \text{довжину} / 2$, де шириною є найменше вимірювання, а довжиною є найбільше вимірювання. Мишей з підшкірними пухлинами понад 1,5 см у діаметрі забили.

Перевагою ксенотрансплантатних моделей раку є можливість дослідження неоваскуляризації та ангиогенезу. Ріст пухлин частково залежить від розвитку нових кровоносних судин. Хоча капілярна система і кровоносна система, що розвивається, походять від хазяїна, ініціацію та архітектуру новоутворених судин регулює ксенотрансплантатна пухлина (Davidoff et al., Clin Cancer Res. (2001) 7:2870; Solesvik et al., Eur J Cancer Clin Oncol. (1984) 20:1295). Вплив антитіла та малої молекули на утворення нових судин досліджують відповідно до відомих у цій галузі процедур, таких як імуногістохімічний аналіз (IHC) тканин пухлини та їх довколишнього мікросередовища.

Кон'югат антитіло-лікарський засіб до 158P1D7:

Виростили моноклональні антитіла до 158P1D7, як описано у прикладі під заголовком "Утворення моноклональних антитіл до 158P1D7 (MAb)". Потім моноклональні антитіла кон'югують з токсином, як це описано у прикладі під заголовком "Кон'югування антитіла з лікарським засобом моноклонального антитіла Ha15-10ac12" для утворення Ha15-10ac12vcMMAE. Ha15-10ac12vcMMAE охарактеризували за допомогою сортування флуоресцентно-активованих клітин (FACS) та інших методів, відомих у цій галузі, для визначення його здатності зв'язуватись з 158P1D7.

Лінії клітин і ксенотрансплантати

Клітини утримували у середовищі Ігла, модифікованому способом Дульбеко (DMEM), із додаванням L-глутаміну і 10 %-ної ембріональної бичачої сироватки (FBS), як це відомо у цій галузі. Ксенотрансплантати AG-B7, RT-4-XCL та NCI-H322M-XCL підтримували серійним розмноженням у мишей із ТКІД. SW780 і RT-4-XCL є виведеними з клітин лініями раку сечового міхура, одержаними у А.Т.С.С. (Манасас, штат Вірджинія). AG-B7 і AG-B8 є одержаними від пацієнта ксенотрансплантатами, виведеними зі зразків раку сечового міхура людини. Для спеціаліста у цій галузі є зрозумілим, що множини експериментів проводять в умовах *in vivo* на кон'югатах антитіло-лікарський засіб за винаходом. Це частково пов'язано з тим, що кожна модель *in vivo*, навіть при однакових симптомах хвороби, проявляє рівень непередбачуваності

для спеціаліста. Відповідно, для спеціаліста є зрозумілим, що застосування декількох видів моделей *in vivo* дозволить йому краще оцінити кон'югати антитіло-лікарський засіб за винаходом.

5 Оцінювання Ha15-10ac12vcMMAE на встановленій підшкірній ксенотрансплантатній моделі раку сечового міхура людини AG-B7 у мишей із ТКІД

У цьому експерименті клітини раку сечового міхура людини AG-B7 (5×10^6 клітин на мишу) ввели у бік кожної миші із ТКІД, і пухлини залишили розростатись без лікування, поки вони не досягли приблизного об'єму 250 мм^3 . У цей момент тварин розподілили за групами залежно від об'єму пухлини на початок лікування для забезпечення подібного середнього розміру пухлини та відхилення в кожній групі із застосуванням програмного забезпечення Study Director (версія 1.7; Studylog Systems, Inc., Південний Сан-Франциско, штат Каліфорнія). Всі групи, оброблені кон'югатом антитіло-лікарський засіб, отримали одиничну дозу 10 мг/кг внутрішньовенною болюсною ін'єкцією. За ростом пухлин в кожній групі спостерігали двічі на тиждень із використанням вимірювання за допомогою штангенциркуля до завершення дослідження. 10
15 Статистичний аналіз об'ємів пухлин проводили в останній момент часу, коли були одержані дані з усіх груп, із застосуванням непараметричного аналізу невідповідностей (ANOVA) впорядкованих даних.

Ці результати свідчать, що Ha15-10ac12vcMMAE показав потужний інгібіторний ефект при порівнянні з необробленим контролем ($p < 0,0001$) (Фігура 5).

20 Оцінювання Ha15-10ac12vcMMAE на встановленому підшкірному раку сечового міхура людини RT-4-XCL, імплантованому мишам із ТКІД

В іншому експерименті ксенотрансплантатні вихідні пухлини AG-B7 раку сечового міхура людини зібрали в стерильних умовах та подріbili на маленькі шматки (приблизно 1 мм^3). Шість шматків імплантували підшкірно у бік кожної миші із ТКІД. Коли середній об'єм пухлини досяг наперед визначеного розміру 100 мм^3 , тварин довільним чином розподілили на групи оброблених кон'югатом антитіло-лікарський засіб та контрольну групу необроблених (див. графік об'єму пухлин) з подібним середнім розміром пухлин та відхиленням в кожній групі, із застосуванням програмного забезпечення Study Director Software (версія 1.7; Studylog Systems, Inc., Південний Сан-Франциско, штат Каліфорнія). Всі групи, оброблені кон'югатами антитіло-лікарський засіб, у тому числі двома контрольними ADC, одержали одиничну дозу 5 мг/кг внутрішньовенною болюсною ін'єкцією. За ростом пухлин в кожній групі спостерігали двічі на тиждень із використанням вимірювання за допомогою штангенциркуля до завершення дослідження. Статистичний аналіз об'ємів пухлин проводили в останній момент часу, коли були одержані дані з усіх груп, із застосуванням непараметричного аналізу невідповідностей (ANOVA) впорядкованих даних. 25
30
35

Результати свідчать, що Ha15-10ac12vcMMAE показав потужний інгібіторний ефект відносно пухлини при порівнянні з необробленим контролем або з відповідним контролем ADC H3-1.4.1.2vcMMAE (обидва з $p < 0,0001$) (Фігура 6).

40 Оцінювання Ha15-10ac12vcMMAE на встановленому підшкірному раку легенів людини NCI-H322M-XCL, імплантованому мишам із ТКІД

В іншому експерименті клітини раку легенів людини NCI-H322M-XCL ($2,5 \times 10^6$ клітин на мишу) ввели ін'єкцією у бік кожної миші із ТКІД, і пухлини залишили розростатись без лікування, поки вони не досягли приблизного об'єму 200 мм^3 . У цей момент тварин розподілили за групами залежно від об'єму пухлини на початок лікування для забезпечення подібного середнього розміру пухлини та відхилення в кожній групі із застосуванням програмного забезпечення Study Director (версія 1.7; Studylog Systems, Inc., Південний Сан-Франциско, штат Каліфорнія). Всі групи, оброблені кон'югатом антитіло-лікарський засіб, у тому числі двома контрольними ADC, отримали дозу 3 мг/кг двічі на тиждень загальною кількістю п'ять доз внутрішньовенною болюсною ін'єкцією. За ростом пухлин в кожній групі спостерігали двічі на тиждень із використанням вимірювання за допомогою штангенциркуля до завершення дослідження. Статистичний аналіз об'ємів пухлин проводили в останній момент часу, коли були одержані дані з усіх груп, із застосуванням непараметричного аналізу невідповідностей (ANOVA) впорядкованих даних. 45
50

Результати свідчать, що Ha15-10ac12vcMMAE показав потужний інгібіторний ефект при порівнянні з контролем носієм ($p < 0,0001$) або з відповідним контролем, обробленим ADC Ha3-12bc1.1vcMMAE ($p = 0,0041$) (Фігура 7). 55

Ефективність Ha15-10ac12vcMMAE на встановленій підшкірній ксенотрансплантатній моделі раку сечового міхура людини AG-B7 у мишей із ТКІД

В іншому експерименті ксенотрансплантатні вихідні пухлини AG-B7 раку сечового міхура людини зібрали в стерильних умовах та подріbili на маленькі шматки (приблизно 1 мм^3). 60

П'ять шматків імплантували підшкірно у бік кожної миші із ТКІД. Пухлини залишили розростатись без лікування, поки вони не досягли приблизного об'єму 200 мм³. У цей момент тварин розподілили на групи за розміром пухлин на початок лікування для забезпечення подібного розміру пухлин та відхилення в кожній групі, із застосуванням програмного забезпечення Study Director Software (версія 1.7; Studylog Systems, Inc., Південний Сан-Франциско, штат Каліфорнія). Всі групи, оброблені кон'югатами антитіло-лікарський засіб, у тому числі дві контрольні групи ADC, одержували дозу 0,5 мг/кг двічі на тиждень загальною кількістю сім доз внутрішньовенною болюсною ін'єкцією. За ростом пухлин в кожній групі спостерігали двічі на тиждень із використанням вимірювання за допомогою штангенциркуля до завершення дослідження. Статистичний аналіз об'ємів пухлин проводили в останній момент часу, коли були одержані дані з усіх груп, із застосуванням непараметричного аналізу невідповідностей (ANOVA) впорядкованих даних.

Результати свідчать, що Ha15-10ac12vcMMAE, одержані з клітин гібридами (Ha15-10ac12.1vcMMAE) і CHO (Ha15-10ac12vcMMAE), обидва показали потужний інгібіторний ефект відносно пухлини при порівнянні з контролем з носієм ($p < 0,0001$) або відповідним контролем з ADC Ha3-12abc1vcMMAE ($p < 0,0001$) (Фігура 8).

Ефективність Ha15-10ac12vcMMAE на встановленій підшкірній ксенотрансплантатній моделі раку сечового міхура людини SW780 у мишей із ТКІД

В іншому експерименті клітини ксенотрансплантатного раку сечового міхура людини SW780 імплантували у бік мишей з ТКІД, і пухлини залишили розростатись, поки вони не досягли приблизного об'єму 200 мм³. У цей момент тварин розподілили на групи лікування за розміром пухлин на початок лікування для забезпечення подібного середнього розміру пухлин та відхилення в кожній групі. Розподіл мишей на групи лікування здійснювали за допомогою програмного забезпечення Study Director (версія 1.7; Studylog Systems, Inc., Південний Сан-Франциско, штат Каліфорнія) для підбору мишей. Всі групи ADC, у тому числі дві контрольні ADC, отримали дозу внутрішньовенною болюсною ін'єкцією 1 мг/кг на початку дослідження. За ростом пухлин в кожній групі спостерігали двічі на тиждень із використанням вимірювання за допомогою штангенциркуля до завершення дослідження. Статистичний аналіз об'ємів пухлин проводили в останній момент часу, коли були одержані дані з усіх груп, із застосуванням непараметричного аналізу невідповідностей (ANOVA) впорядкованих даних.

Результати свідчать, що Ha15-10ac12vcMMAE має кращу інгібіторну активність відносно пухлин, ніж моноклональне антитіло Ha15-10ac12. Крім того, можна зробити висновок, що моноклональне антитіло Ha15-10ac12 не має інгібіторного ефекту відносно пухлини, оскільки динаміка росту пухлини в цій групі лікування відповідає динаміці антитіл ізотипного контролю. Крім того, після одиничної дози 1 мг/кг Ha15-10ac12vcMMAE показав статистично значне інгібування росту порівняно з ізотипним контрольним ADC ($p < 0,001$) (Фігура 10).

Ефективність Ha15-10ac12vcMMAE на встановленій підшкірній ксенотрансплантатній моделі раку сечового міхура людини AG-B8, одержаній від пацієнта, у мишей із ТКІД

В іншому експерименті одержані від пацієнта шматки пухлини раку сечового міхура людини AG-B8 імплантували у бік мишей із ТКІД, і пухлини залишили розростатись, поки вони не досягли приблизного об'єму 200 мм³. У цей момент тварин розподілили на групи лікування за об'ємом пухлини на момент початку лікування для забезпечення подібного середнього розміру пухлини та відхилення в кожній групі. Розподіл мишей на групи лікування здійснювали за допомогою програмного забезпечення Study Director (версія 1.7; Studylog Systems, Inc., Південний Сан-Франциско, штат Каліфорнія) для підбору мишей. Всім групам ADC, у тому числі двом контрольним групам ADC, ввели дозу внутрішньовенною болюсною ін'єкцією 5 мг/кг на початку дослідження (нульовий день (0)). За ростом пухлин в кожній групі спостерігали двічі на тиждень із використанням вимірювання за допомогою штангенциркуля до завершення дослідження. Статистичний аналіз об'ємів пухлин проводили в останній момент часу, коли були одержані дані з усіх груп, із застосуванням непараметричного аналізу невідповідностей (ANOVA) впорядкованих даних.

Результати свідчать, що Ha15-10ac12vcMMAE має кращу інгібіторну активність відносно пухлин, ніж необроблені контролю ($p < 0,0001$) або інші відповідні ADC гамма-2 контролю ($p < 0,0001$). Крім того, Ha15ac12vcMMAE також показав кращий статистично значимий ефект порівняно з Ha15-10ac12mcMMAF ($p < 0,0458$) (Фігура 12).

Підсумок

Таким чином, на Фігурах 5-8, 10 і 12 показано, що кон'югат антитіло-лікарський засіб до 158P1D7 під назвою Ha15-10ac12vcMMAE значно інгібував ріст клітин пухлини, що експресує 158P1D7, порівняно з контрольними кон'югатами антитіло-лікарський засіб. Отже, Ha15-10ac12vcMMAE може бути використаний з терапевтичною метою для лікування та керування

видами раку, зазначеними у Таблиці І. Зокрема, ці результати свідчать, що Ha15-10ac12vcMMAE має інгібіторний ефект на різні види моделей раку сечового міхура, що показує, що він може бути особливо терапевтично придатним при лікуванні раку сечового міхура.

Приклад 8 Клінічні випробування на людях для лікування і діагностування людської карциноми шляхом застосування кон'югатів антитіло-лікарський засіб до 158P1D7

Використовували кон'югати антитіло-лікарський засіб до 158P1D7 за цим винаходом, які специфічним чином зв'язуються з 158P1D7 і які застосовують у лікуванні певних видів пухлин, переважно тих, перелік яких наведено у Таблиці І. У зв'язку з кожним із цих показань було успішно досліджено два клінічних підходи.

І.) Допоміжна терапія: Під час допоміжної терапії пацієнтів лікували кон'югатами антитіло-лікарський засіб до 158P1D7 у поєднанні з хіміотерапевтичним або антинеопластичним засобом та/або променевою терапією або їх комбінацією. Первинні ракові мішені, такі як ті, перелік яких наведено в Таблиці І, обробили відповідно до стандартних протоколів шляхом додавання кон'югатів антитіло-лікарський засіб до 158P1D7 до стандартної терапії першої і другої ліній. Плани протоколів стосуються ефективності, яку було оцінено у наведених далі прикладах, включаючи, але це не є обмеженням, зниження маси пухлини первинного або метастатичного ураження, виживання без підвищеного прогресування, загальне виживання, покращення здоров'я пацієнтів, стабілізація захворювання, а також можливість зниження звичайних доз стандартної хіміотерапії та інших біологічних засобів. Таке зниження дозування забезпечує можливість проведення додаткової та/або подовженої терапії шляхом зниження залежної від дози токсичності хіміотерапевтичного або біологічного засобу. Кон'югати антитіло-лікарський засіб до 158P1D7 застосовують у декількох додаткових клінічних випробуваннях у поєднанні з хіміотерапевтичними або антинеопластичними засобами.

ІІ.) Монотерапія: у зв'язку із застосуванням кон'югатів антитіло-лікарський засіб до 158P1D7 у монотерапії пухлин кон'югати антитіло-лікарський засіб до 158P1D7 вводять пацієнтам без хіміотерапевтичного або антинеопластичного засобу. В одному втіленні монотерапію проводять клінічно у пацієнтів на останній стадії раку з обширним метастазуванням. Плани протоколів стосуються ефективності, як її було оцінено у наведених далі прикладах, включаючи, але це не є обмеженням, зниження маси пухлини первинного або метастатичного ураження, виживання без підвищеного прогресування, загальне виживання, покращення здоров'я пацієнтів, стабілізація захворювання, а також здатність зниження звичайних доз стандартної хіміотерапії та інших біологічних засобів.

Дозування

Схеми дозування можна регулювати для забезпечення оптимальної бажаної реакції. Наприклад, може бути введений один болюс, декілька поділених доз можуть бути введені впродовж тривалого періоду часу або доза може бути пропорційно зменшена чи збільшена відповідно до потреб терапевтичної ситуації. Є особливо зручним складати парентеральні композиції у стандартній лікарській формі для полегшення введення та рівномірності дозування. Стандартна лікарська форма, використана у цьому описі, стосується фізично дискретних одиниць, придатних як одинична доза для суб'єктів-ссавців, які підлягають лікуванню, причому кожна одиниця містить наперед визначену кількість активної сполуки, обчислену для спричинення бажаного терапевтичного ефекту у поєднанні з потрібним фармацевтичним носієм. Специфікація стандартних лікарських форм за винаходом складається на основі та безпосередньо залежить від (а) унікальних характеристик антитіла та/або кон'югату антитіло-лікарський засіб та конкретного терапевтичного або профілактичного ефекту, що його треба досягти, та (б) обмежень, що є притаманними у царині створення такої активної сполуки для лікування чутливості окремих пацієнтів.

Показовий, необмежувальний діапазон терапевтично ефективної кількості кон'югату антитіло-лікарський засіб до 158P1D7, що його вводять у комбінації за винаходом, становить від близько 0,5 до близько 10 мг/кг, від близько 1 до близько 5 мг/кг, щонайменше 1 мг/кг, щонайменше 2 мг/кг, щонайменше 3 мг/кг або щонайменше 4 мг/кг. Іншими показовими необмежувальними діапазонами є, наприклад, від близько 0,5 до близько 5 мг/кг або, наприклад, від близько 0,8 до близько 5 мг/кг, або, наприклад, від близько 1 до близько 7,5 мг/кг. Втілення високої дози за винаходом стосується дозування понад 10 мг/кг. Необхідно відзначити, що значення дозування можуть коливатися залежно від виду та серйозності стану, що має бути полегшений, і можуть включати одиничні або множинні дози. Крім того, необхідно розуміти, що для будь-якого конкретного суб'єкта специфічні схеми дозування необхідно регулювати з часом відповідно до індивідуальних потреб та професійної думки особи, що вводить або контролює введення композицій, і що вказані тут діапазони дозування є лише ілюстративними і не мають на меті обмежити обсягу або застосування заявленої композиції.

План клінічного розвитку (CDP)

CDP дотримується та розвиває лікування кон'югатами антитіло-лікарський засіб до 158P1D7 у зв'язку з допоміжною терапією або монотерапією. Випробування спочатку демонструють безпечність, а після цього підтверджують ефективність у повторних дозах. Випробування є відкритими, в яких порівнюють стандартну хіміотерапію зі стандартною терапією плюс кон'югатами антитіло-лікарський засіб до 158P1D7. Як це буде зрозуміло, одним необмежувальним критерієм, який може бути застосований у зв'язку з набором пацієнтів, є рівні експресії 158P1D7 у їхніх пухлинах, визначені шляхом біопсії.

Як із будь-яким лікувальним засобом, оснований на білках або інфузії антитіл, питання безпечності здебільшого стосуються (i) синдрому вивільнення цитокінів, тобто гіпотензії, лихоманки, тремтіння, ознобу; (ii) розвитку імунотоксичної реакції на матеріал (тобто утворення людських антитіл у пацієнта на основі антитіл лікарський засіб або НАМА-відповідь); та (iii) токсичності для здорових клітин, що експресують 158P1D7. Стандартні та додаткові аналізи використовують для спостереження за кожним із цих параметрів безпечності. Було виявлено, що кон'югати антитіло-лікарський засіб до 158P1D7 є безпечними після введення людині.

Приклад 9 Виявлення білка 158P1D7 у зразках раку пацієнтів за допомогою IGH

Експресію білка 158P1D7 за допомогою імуногістохімії аналізували у зразках пухлини ракових пацієнтів із (i) сечового міхура, (ii) молочної залози, (iii) легенів та (iv) гліобластоми. Коротко, зафіксовані у формаліні, введені в твердий парафін тканини розрізали на чотири (4) мікронові сегменти та поклали на предметне скло. Із сегментів видалили парафін, регідрували та обробляли розчином Citra для демаскування антигену (Biogenex, Сан-Рамон, штат Каліфорнія) у мікрохвильовій печі EZ-Retriever (Biogenex, Сан-Рамон, штат Каліфорнія) впродовж 15 хвилин при температурі 95°C. Потім сегменти обробили 3 %-ним розчином перексиду водню для інактивування ендогенної активності пероксидази. Безсироватковий білковий блок (Dako, Карпентерія, штат Каліфорнія) використовували для інгібування неспецифічного зв'язування перед інкубуванням моноклональним мишачим анти-158P1D7 антитілом або ізотиповим контролем. Після цього сегменти обробили системою виявлення Super Sensitive™ (надчутливої) полімерної пероксидази хрину (HRP), яка складається з інкубування в реактиві Super Enhancer™ (суперпідсилювач) з подальшим інкубуванням вторинним кон'югатом антитіла полімерної-HRP (BioGenex, Сан-Рамон, штат Каліфорнія). Потім сегменти укріпили із застосуванням набору DAB (BioGenex, Сан-Рамон, штат Каліфорнія). Ядра забарвили із застосуванням гематоксиліну та аналізували за допомогою мікроскопії методом світлого поля. Специфічне забарвлення виявили у зразках пацієнтів із застосуванням імунореактивного антитіла до 158P1D7, позначеного коричневим забарвленням (див. Фігури 9(A), 9(C), 9(E) і 9(G)). На відміну від цього, контрольне антитіло не забарвило жодного зразка пацієнтів (див. Фігури 9(B), 9(D), 9(F) і 9(H)).

Результати показують експресію 158P1D7 в клітинах пухлини ракових тканин сечового міхура, молочної залози, легенів та гліобластоми. Ці результати свідчать, що 158P1D7 експресується при раку людини і що антитіла, спрямовані проти цього антигену, та кон'югат антитіло-лікарський засіб, позначений Ha15-10ac12vcMMAE, є придатними для діагностичних і терапевтичних цілей (Фігура 9).

В усьому тексті цієї заявки є посилання на дані вмісту різних вебсайтів, публікації, патентні заявки та патенти. (Посилання на вебсайти надані за їхнім уніфікованим локатором джерела, або URL, адреси в світовій павутині). Розкриття кожного з цих посилань включені тут як посилання у всій своїй повноті.

Цей винахід не повинен бути обмежений обсягом розкритих у ньому втілень, які признаєні лише для ілюстрування окремих аспектів винаходу, і будь-які втілення, що є функціонально еквівалентними, входять до обсягу цього винаходу. Різноманітні модифікації моделей та способів за винаходом, на додаток до описаних в ньому, будуть очевидними спеціалістові у цій галузі з наведеного вище опису та ідей і, відповідно, входять до обсягу цього винаходу. Такі модифікації або інші втілення можуть бути виконані на практиці без відхилення від справжнього обсягу і духу винаходу.

Таблиці I: Тканини, що експресують 158P1D7, якщо вони є злоякісними

Гліобластома
легені
сечовий міхур
молочна залоза

Таблиця II

Скорочення амінокислот

Однобуквенне	Трибуквенне	Повна назва
F	Phe	фенілаланін
L	Leu	лейцин
S	Ser	серин
Y	Tyr	тирозин
C	Cys	цистеїн
W	Trp	триптофан
P	Pro	пролін
H	His	гістидин
Q	Gln	глутамін
R	Arg	аргінін
I	Ile	ізолейцин
M	Met	метіонін
T	Thr	треонін
N	Asn	аспарагін
K	Lys	лізин
V	Val	валін
A	Ala	аланін
D	Asp	аспарагінова кислота
E	Glu	глутамінова кислота
G	Gly	гліцин

ТАБЛИЦЯ III: Матриця амінокислотного заміщення

Адаптована з програмного забезпечення GCG Software 9.0 BLOSUM62 матриця амінокислотного заміщення (матриця блок-заміщення). Чим вищим є значення, тим більша ймовірність знаходження заміщення у споріднених, природних білках.

A C D E F G H I K L M N P Q R S T V W Y.

4 0 -2 -1 -2 0 -2 -1 -1 -1 -1 -2 -1 -1 -1 1 0 0 -3 -2 A

9 -3 -4 -2 -3 -3 -1 -3 -1 -1 -3 -3 -3 -3 -1 -1 -1 -2 -2 C

6 2 -3 -1 -1 -3 -1 -4 -3 1 -1 0 -2 0 -1 -3 -4 -3 D

5 -3 -2 0 -3 1 -3 -2 0 -1 2 0 0 -1 -2 -3 -2 E

6 -3 -1 0 -3 0 0 -3 -4 -3 -3 -2 -2 -1 1 3 F

6 -2 -4 -2 -4 -3 0 -2 -2 -2 0 -2 -3 -2 -3 G

8 -3 -1 -3 -2 1 -2 0 0 -1 -2 -3 -2 2 H

4 -3 2 1 -3 -3 -3 -3 -2 -1 3 -3 -1 I

5 -2 -1 0 -1 1 2 0 -1 -2 -3 -2 K

4 2 -3 -3 -2 -2 -2 -1 1 -2 -1 L

5 -2 -2 0 -1 -1 -1 1 -1 -1 M

6 -2 0 0 1 0 -3 -4 -2 N

7 -1 -2 -1 -1 -2 -4 -3 P

5 1 0 -1 -2 -2 -1 Q

5 -1 -1 -3 -3 -2 R

4 1 -2 -3 -2 S

5 0 -2 -2 T

4 -3 -1 V

11 2 W

7 Y

Таблиця IV. Загальний спосіб синтезу vsMMAE

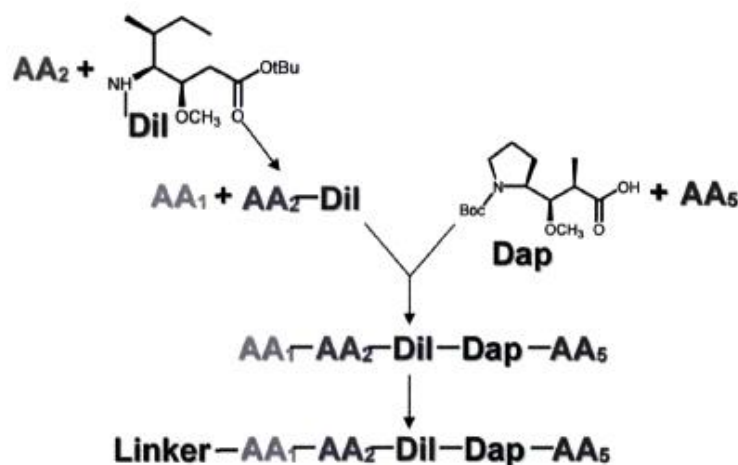
Де: AA1 = амінокислота 1

AA2 = амінокислота 2

AA5 = амінокислота 5

DIL = Долаізолейїн

DAP = Долапроїн
Лінкер = Val-Cit (vc)



5

Таблиця V. Положення CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 та CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, визначені відповідно до схем Кабата, Хотія та контактної схеми. Для CDR-H1, нумерація залишків наведена із застосуванням схем нумерації як Кабата, так і Хотія.

CDR	Кабат	Хотія	Контактна
CDR-L1	L24--L34	L24--L34	L30--L36
CDR-L2	L50--L56	L50--L56	L46--L55
CDR-L3	L89--L97	L89--L97	L89--L96
CDR-H1		H26--	
(нумерація Кабата ¹)	H31--H35B	H32..34	H30--H35B
CDR-H1			
(нумерація Хотія ²)	H31--H35	H26--H32	H30--H35
CDR-H2	H50--H65	H52--H56	H47--H58
CDR-H3	H95--H102	H95--H102	H93--H101

10

Таблиця VI. Значення середньої інтенсивності флуоресцентності (MFI) в аналізі FACS.

нмоль	Ha15-10ac12vcMMAE
6,667	155,0
2,222	149,6
0,741	140,9
0,247	133,8
0,082	124,0
0,027	107,6
0,0091	87,0
0,0030	60,8
0,0010	25,7
0,0003	14,9
0,0001	4,3

Таблиця VII. Значення FACS MFA Ha15-10ac12vcMMAE для аналізу зв'язування

15

	UMUC-AGS15	SW780	CHP-212
MFI	115	159	142

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

```

<110> ЕЙДЖЕНСІС, ІНК.
СІЕТЛ ДЖЕНЕТИКС, ІНК.
МОРРИСОН, Роберт, Кендалл
АН, Зілі
МОРРИСОН, Карен Джейн, Мейрік
СНАЙДЕР, Джош
ДЖИА, Сяо-Чі

<120> КОН'ЮГАТИ АНТИТІЛО-ЛІКАРСЬКИЙ ЗАСІБ (ADC),
ЯКІ ЗВ'ЯЗУЮТЬСЯ З ВІЛКАМИ 158P1D7

<130> 511582005088

<140> Ще не надано
<141> Одночасно тут

<150> US 61/692,448
<151> 2012-08-23

<160> 10

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 2555
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (23)...(2548)

<220>
<221> різні ознаки
<222> (1)...(2555)
<223> 158P1D7

<400> 1
tcggatttca tcacatgaca ac atg aag ctg tgg att cat ctc ttt tat tca 52
                        Met Lys Leu Trp Ile His Leu Phe Tyr Ser
                        1                      5                      10

tct ctc ctt gcc tgt ata tct tta cac tcc caa act cca gtg ctc tca 100
Ser Leu Leu Ala Cys Ile Ser Leu His Ser Gln Thr Pro Val Leu Ser
                        15                      20                      25

tcc aga ggc tct tgt gat tct ctt tgc aat tgt gag gaa aaa gat ggc 148
Ser Arg Gly Ser Cys Asp Ser Leu Cys Asn Cys Glu Glu Lys Asp Gly
                        30                      35                      40

aca atg cta ata aat tgt gaa gca aaa ggt atc aag atg gta tct gaa 196
Thr Met Leu Ile Asn Cys Glu Ala Lys Gly Ile Lys Met Val Ser Glu
                        45                      50                      55

ata agt gtg cca cca tca cga cct ttc caa cta agc tta tta aat aac 244
Ile Ser Val Pro Pro Ser Arg Pro Phe Gln Leu Ser Leu Leu Asn Asn
                        60                      65                      70

ggc ttg acg atg ctt cac aca aat gac ttt tct ggg ctt acc aat gct 292
Gly Leu Thr Met Leu His Thr Asn Asp Phe Ser Gly Leu Thr Asn Ala
                        75                      80                      85                      90

```

att tca ata cac ctt gga ttt aac aat att gca gat att gag ata ggt	340
Ile Ser Ile His Leu Gly Phe Asn Asn Ile Ala Asp Ile Glu Ile Gly	
95 100 105	
gca ttt aat ggc ctt ggc ctc ctg aaa caa ctt cat atc aat cac aat	388
Ala Phe Asn Gly Leu Gly Leu Lys Gln Leu His Ile Asn His Asn	
110 115 120	
tct tta gaa att ctt aaa gag gat act ttc cat gga ctg gaa aac ctg	436
Ser Leu Glu Ile Leu Lys Glu Asp Thr Phe His Gly Leu Glu Asn Leu	
125 130 135	
gaa ttc ctg caa gca gat aac aat ttt atc aca gtg att gaa cca agt	484
Glu Phe Leu Gln Ala Asp Asn Asn Phe Ile Thr Val Ile Glu Pro Ser	
140 145 150	
gcc ttt agc aag ctc aac aga ctc aaa gtg tta att tta aat gac aat	532
Ala Phe Ser Lys Leu Asn Arg Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Asp Asn	
155 160 165 170	
gct att gag agt ctt cct cca aac atc ttc cga ttt gtt cct tta acc	580
Ala Ile Glu Ser Leu Pro Pro Asn Ile Phe Arg Phe Val Pro Leu Thr	
175 180 185	
cat cta gat ctt cgt gga aat caa tta caa aca ttg cct tat gtt ggt	628
His Leu Asp Leu Arg Gly Asn Gln Leu Gln Thr Leu Pro Tyr Val Gly	
190 195 200	
ttt ctc gaa cac att ggc cga ata ttg gat ctt cag ttg gag gac aac	676
Phe Leu Glu His Ile Gly Arg Ile Leu Asp Leu Gln Leu Glu Asp Asn	
205 210 215	
aaa tgg gcc tgc aat tgt gac tta ttg cag tta aaa act tgg ttg gag	724
Lys Trp Ala Cys Asn Cys Asp Leu Leu Gln Leu Lys Thr Trp Leu Glu	
220 225 230	
aac atg cct cca cag tct ata att ggt gat gtt gtc tgc aac agc cct	772
Asn Met Pro Pro Gln Ser Ile Ile Gly Asp Val Val Cys Asn Ser Pro	
235 240 245 250	
cca ttt ttt aaa gga agt ata ctc agt aga cta aag aag gaa tct att	820
Pro Phe Phe Lys Gly Ser Ile Leu Ser Arg Leu Lys Lys Glu Ser Ile	
255 260 265	
tgc cct act cca cca gtg tat gaa gaa cat gag gat cct tca gga tca	868
Cys Pro Thr Pro Pro Val Tyr Glu Glu His Glu Asp Pro Ser Gly Ser	
270 275 280	
tta cat ctg gca gca aca tct tca ata aat gat agt cgc atg tca act	916
Leu His Leu Ala Ala Thr Ser Ser Ile Asn Asp Ser Arg Met Ser Thr	
285 290 295	
aag acc acg tcc att cta aaa cta ccc acc aaa gca cca ggt ttg ata	964
Lys Thr Thr Ser Ile Leu Lys Leu Pro Thr Lys Ala Pro Gly Leu Ile	
300 305 310	
cct tat att aca aag cca tcc act caa ctt cca gga cct tac tgc cct	1012
Pro Tyr Ile Thr Lys Pro Ser Thr Gln Leu Pro Gly Pro Tyr Cys Pro	
315 320 325 330	

att cct tgt aac tgc aaa gtc cta tcc cca tca gga ctt cta ata cat	1060
Ile Pro Cys Asn Cys Lys Val Leu Ser Pro Ser Gly Leu Leu Ile His	
335 340 345	
tgt cag gag cgc aac att gaa agc tta tca gat ctg aga cct cct ccg	1108
Cys Gln Glu Arg Asn Ile Glu Ser Leu Ser Asp Leu Arg Pro Pro Pro	
350 355 360	
caa aat cct aga aag ctc att cta gcg gga aat att att cac agt tta	1156
Gln Asn Pro Arg Lys Leu Ile Leu Ala Gly Asn Ile Ile His Ser Leu	
365 370 375	
atg aag tct gat cta gtg gaa tat ttc act ttg gaa atg ctt cac ttg	1204
Met Lys Ser Asp Leu Val Glu Tyr Phe Thr Leu Glu Met Leu His Leu	
380 385 390	
gga aac aat cgt att gaa gtt ctt gaa gaa gga tcg ttt atg aac cta	1252
Gly Asn Asn Arg Ile Glu Val Leu Glu Glu Gly Ser Phe Met Asn Leu	
395 400 405 410	
acg aga tta caa aaa ctc tat cta aat ggt aac cac ctg acc aaa tta	1300
Thr Arg Leu Gln Lys Leu Tyr Leu Asn Gly Asn His Leu Thr Lys Leu	
415 420 425	
agt aaa ggc atg ttc ctt ggt ctc cat aat ctt gaa tac tta tat ctt	1348
Ser Lys Gly Met Phe Leu Gly Leu His Asn Leu Glu Tyr Leu Tyr Leu	
430 435 440	
gaa tac aat gcc att aag gaa ata ctg cca gga acc ttt aat cca atg	1396
Glu Tyr Asn Ala Ile Lys Glu Ile Leu Pro Gly Thr Phe Asn Pro Met	
445 450 455	
cct aaa ctt aaa gtc ctg tat tta aat aac aac ctc ctc caa gtt tta	1444
Pro Lys Leu Lys Val Leu Tyr Leu Asn Asn Asn Leu Leu Gln Val Leu	
460 465 470	
cca cca cat att ttt tca ggg gtt cct cta act aag gta aat ctt aaa	1492
Pro Pro His Ile Phe Ser Gly Val Pro Leu Thr Lys Val Asn Leu Lys	
475 480 485 490	
aca aac cag ttt acc cat cta cct gta agt aat att ttg gat gat ctt	1540
Thr Asn Gln Phe Thr His Leu Pro Val Ser Asn Ile Leu Asp Asp Leu	
495 500 505	
gat tta cta acc cag att gac ctt gag gat aac ccc tgg gac tgc tcc	1588
Asp Leu Leu Thr Gln Ile Asp Leu Glu Asp Asn Pro Trp Asp Cys Ser	
510 515 520	
tgt gac ctg gtt gga ctg cag caa tgg ata caa aag tta agc aag aac	1636
Cys Asp Leu Val Gly Leu Gln Gln Trp Ile Gln Lys Leu Ser Lys Asn	
525 530 535	
aca gtg aca gat gac atc ctc tgc act tcc ccc ggg cat ctc gac aaa	1684
Thr Val Thr Asp Asp Ile Leu Cys Thr Ser Pro Gly His Leu Asp Lys	
540 545 550	
aag gaa ttg aaa gcc cta aat agt gaa att ctc tgt cca ggt tta gta	1732
Lys Glu Leu Lys Ala Leu Asn Ser Glu Ile Leu Cys Pro Gly Leu Val	
555 560 565 570	

aat aac cca tcc atg cca aca cag act agt tac ctt atg gtc acc act	1780
Asn Asn Pro Ser Met Pro Thr Gln Thr Ser Tyr Leu Met Val Thr Thr	
575 580 585	
cct gca aca aca aca aat acg gct gat act att tta cga tct ctt acg	1828
Pro Ala Thr Thr Thr Asn Thr Ala Asp Thr Ile Leu Arg Ser Leu Thr	
590 595 600	
gac gct gtg cca ctg tct gtt cta ata ttg gga ctt ctg att atg ttc	1876
Asp Ala Val Pro Leu Ser Val Leu Ile Leu Gly Leu Leu Ile Met Phe	
605 610 615	
atc act att gtt ttc tgt gct gca ggg ata gtg gtt ctt gtt ctt cac	1924
Ile Thr Ile Val Phe Cys Ala Ala Gly Ile Val Val Leu Val Leu His	
620 625 630	
cgc agg aga aga tac aaa aag aaa caa gta gat gag caa atg aga gac	1972
Arg Arg Arg Arg Tyr Lys Lys Lys Gln Val Asp Glu Gln Met Arg Asp	
635 640 645 650	
aac agt cct gtg cat ctt cag tac agc atg tat ggc cat aaa acc act	2020
Asn Ser Pro Val His Leu Gln Tyr Ser Met Tyr Gly His Lys Thr Thr	
655 660 665	
cat cac act act gaa aga ccc tct gcc tca ctc tat gaa cag cac atg	2068
His His Thr Thr Glu Arg Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Glu Gln His Met	
670 675 680	
gtg agc ccc atg gtt cat gtc tat aga agt cca tcc ttt ggt cca aag	2116
Val Ser Pro Met Val His Val Tyr Arg Ser Pro Ser Phe Gly Pro Lys	
685 690 695	
cat ctg gaa gag gaa gaa gag agg aat gag aaa gaa gga agt gat gca	2164
His Leu Glu Glu Glu Glu Glu Arg Asn Glu Lys Glu Gly Ser Asp Ala	
700 705 710	
aaa cat ctc caa aga agt ctt ttg gaa cag gaa aat cat tca cca ctc	2212
Lys His Leu Gln Arg Ser Leu Leu Glu Gln Glu Asn His Ser Pro Leu	
715 720 725 730	
aca ggg tca aat atg aaa tac aaa acc acg aac caa tca aca gaa ttt	2260
Thr Gly Ser Asn Met Lys Tyr Lys Thr Thr Asn Gln Ser Thr Glu Phe	
735 740 745	
tta tcc ttc caa gat gcc agc tca ttg tac aga aac att tta gaa aaa	2308
Leu Ser Phe Gln Asp Ala Ser Ser Leu Tyr Arg Asn Ile Leu Glu Lys	
750 755 760	
gaa agg gaa ctt cag caa ctg gga atc aca gaa tac cta agg aaa aac	2356
Glu Arg Glu Leu Gln Gln Leu Gly Ile Thr Glu Tyr Leu Arg Lys Asn	
765 770 775	
att gct cag ctc cag cct gat atg gag gca cat tat cct gga gcc cac	2404
Ile Ala Gln Leu Gln Pro Asp Met Glu Ala His Tyr Pro Gly Ala His	
780 785 790	
gaa gag ctg aag tta atg gaa aca tta atg tac tca cgt cca agg aag	2452
Glu Glu Leu Lys Leu Met Glu Thr Leu Met Tyr Ser Arg Pro Arg Lys	
795 800 805 810	


```

gta tta gtg gaa cag aca aaa aat gag tat ttt gaa ctt aaa gct aat
Val Leu Val Glu Gln Thr Lys Asn Glu Tyr Phe Glu Leu Lys Ala Asn
      815                      820                      825

```

```

tta cat gct gaa cct gac tat tta gaa gtc ctg gag cag caa aca tag
Leu His Ala Glu Pro Asp Tyr Leu Glu Val Leu Glu Gln Gln Thr *
      830                      835                      840

```

atggaga

<210> 2

<211> 841

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> різні ознаки

<222> (1)...(842)

<223> 158P1D7

<400> 2

```

Met Lys Leu Trp Ile His Leu Phe Tyr Ser Ser Leu Leu Ala Cys Ile
 1          5          10          15
Ser Leu His Ser Gln Thr Pro Val Leu Ser Ser Arg Gly Ser Cys Asp
      20          25          30
Ser Leu Cys Asn Cys Glu Glu Lys Asp Gly Thr Met Leu Ile Asn Cys
      35          40          45
Glu Ala Lys Gly Ile Lys Met Val Ser Glu Ile Ser Val Pro Pro Ser
      50          55          60
Arg Pro Phe Gln Leu Ser Leu Leu Asn Asn Gly Leu Thr Met Leu His
      65          70          75          80
Thr Asn Asp Phe Ser Gly Leu Thr Asn Ala Ile Ser Ile His Leu Gly
      85          90          95
Phe Asn Asn Ile Ala Asp Ile Glu Ile Gly Ala Phe Asn Gly Leu Gly
      100         105         110
Leu Leu Lys Gln Leu His Ile Asn His Asn Ser Leu Glu Ile Leu Lys
      115         120         125
Glu Asp Thr Phe His Gly Leu Glu Asn Leu Glu Phe Leu Gln Ala Asp
      130         135         140
Asn Asn Phe Ile Thr Val Ile Glu Pro Ser Ala Phe Ser Lys Leu Asn
      145         150         155         160
Arg Leu Lys Val Leu Ile Leu Asn Asp Asn Ala Ile Glu Ser Leu Pro
      165         170         175
Pro Asn Ile Phe Arg Phe Val Pro Leu Thr His Leu Asp Leu Arg Gly
      180         185         190
Asn Gln Leu Gln Thr Leu Pro Tyr Val Gly Phe Leu Glu His Ile Gly
      195         200         205
Arg Ile Leu Asp Leu Gln Leu Glu Asp Asn Lys Trp Ala Cys Asn Cys
      210         215         220
Asp Leu Leu Gln Leu Lys Thr Trp Leu Glu Asn Met Pro Pro Gln Ser
      225         230         235         240
Ile Ile Gly Asp Val Val Cys Asn Ser Pro Pro Phe Phe Lys Gly Ser
      245         250         255
Ile Leu Ser Arg Leu Lys Lys Glu Ser Ile Cys Pro Thr Pro Pro Val
      260         265         270
Tyr Glu Glu His Glu Asp Pro Ser Gly Ser Leu His Leu Ala Ala Thr
      275         280         285
Ser Ser Ile Asn Asp Ser Arg Met Ser Thr Lys Thr Thr Ser Ile Leu
      290         295         300
Lys Leu Pro Thr Lys Ala Pro Gly Leu Ile Pro Tyr Ile Thr Lys Pro
      305         310         315         320

```

```

Ser Thr Gln Leu Pro Gly Pro Tyr Cys Pro Ile Pro Cys Asn Cys Lys
      325      330      335
Val Leu Ser Pro Ser Gly Leu Leu Ile His Cys Gln Glu Arg Asn Ile
      340      345      350
Glu Ser Leu Ser Asp Leu Arg Pro Pro Gln Asn Pro Arg Lys Leu
      355      360      365
Ile Leu Ala Gly Asn Ile Ile His Ser Leu Met Lys Ser Asp Leu Val
      370      375      380
Glu Tyr Phe Thr Leu Glu Met Leu His Leu Gly Asn Asn Arg Ile Glu
385      390      395      400
Val Leu Glu Glu Gly Ser Phe Met Asn Leu Thr Arg Leu Gln Lys Leu
      405      410      415
Tyr Leu Asn Gly Asn His Leu Thr Lys Leu Ser Lys Gly Met Phe Leu
      420      425      430
Gly Leu His Asn Leu Glu Tyr Leu Tyr Leu Glu Tyr Asn Ala Ile Lys
      435      440      445
Glu Ile Leu Pro Gly Thr Phe Asn Pro Met Pro Lys Leu Lys Val Leu
450      455      460
Tyr Leu Asn Asn Asn Leu Leu Gln Val Leu Pro Pro His Ile Phe Ser
465      470      475      480
Gly Val Pro Leu Thr Lys Val Asn Leu Lys Thr Asn Gln Phe Thr His
      485      490      495
Leu Pro Val Ser Asn Ile Leu Asp Asp Leu Asp Leu Leu Thr Gln Ile
      500      505      510
Asp Leu Glu Asp Asn Pro Trp Asp Cys Ser Cys Asp Leu Val Gly Leu
515      520      525
Gln Gln Trp Ile Gln Lys Leu Ser Lys Asn Thr Val Thr Asp Asp Ile
530      535      540
Leu Cys Thr Ser Pro Gly His Leu Asp Lys Lys Glu Leu Lys Ala Leu
545      550      555      560
Asn Ser Glu Ile Leu Cys Pro Gly Leu Val Asn Asn Pro Ser Met Pro
      565      570      575
Thr Gln Thr Ser Tyr Leu Met Val Thr Thr Pro Ala Thr Thr Thr Asn
      580      585      590
Thr Ala Asp Thr Ile Leu Arg Ser Leu Thr Asp Ala Val Pro Leu Ser
595      600      605
Val Leu Ile Leu Gly Leu Leu Ile Met Phe Ile Thr Ile Val Phe Cys
610      615      620
Ala Ala Gly Ile Val Val Leu Val Leu His Arg Arg Arg Arg Tyr Lys
625      630      635      640
Lys Lys Gln Val Asp Glu Gln Met Arg Asp Asn Ser Pro Val His Leu
      645      650      655
Gln Tyr Ser Met Tyr Gly His Lys Thr Thr His His Thr Thr Glu Arg
660      665      670
Pro Ser Ala Ser Leu Tyr Glu Gln His Met Val Ser Pro Met Val His
675      680      685
Val Tyr Arg Ser Pro Ser Phe Gly Pro Lys His Leu Glu Glu Glu Glu
690      695      700
Glu Arg Asn Glu Lys Glu Gly Ser Asp Ala Lys His Leu Gln Arg Ser
705      710      715      720
Leu Leu Glu Gln Glu Asn His Ser Pro Leu Thr Gly Ser Asn Met Lys
      725      730      735
Tyr Lys Thr Thr Asn Gln Ser Thr Glu Phe Leu Ser Phe Gln Asp Ala
740      745      750
Ser Ser Leu Tyr Arg Asn Ile Leu Glu Lys Glu Arg Glu Leu Gln Gln
755      760      765
Leu Gly Ile Thr Glu Tyr Leu Arg Lys Asn Ile Ala Gln Leu Gln Pro
770      775      780
Asp Met Glu Ala His Tyr Pro Gly Ala His Glu Glu Leu Lys Leu Met
785      790      795      800
Glu Thr Leu Met Tyr Ser Arg Pro Arg Lys Val Leu Val Glu Gln Thr

```

```

      805      810      815
Lys Asn Glu Tyr Phe Glu Leu Lys Ala Asn Leu His Ala Glu Pro Asp
      820      825      830
Tyr Leu Glu Val Leu Glu Gln Gln Thr
      835      840

```

```

<210> 3
<211> 1341
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(1341)

```

```

<220>
<221> різні ознаки
<222> (1)...(1341)
<223> Важкий ланцюг Ha15-10ac12

```

```

<220>
<221> різні ознаки
<222> (1)...(360)
<223> варіабельна ділянка важкого ланцюга

```

```

<220>
<221> різні ознаки
<222> (361)...(1341)
<223> константна ділянка важкого ланцюга IgG2 людини

```

```

<400> 3
cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1          5          10          15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc agt agc tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30

ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gaa tgg gtg 144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

gca gtt ata tgg tat gat gga agt aat caa tat tat gca gac tcc gtg 192
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg ttt 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
          65          70          75          80

ctg caa atg cac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met His Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95

gcg aga ggt ctg act tct gga cgg tac ggt atg gac gtc tgg ggc caa 336
Ala Arg Gly Leu Thr Ser Gly Arg Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
          100          105          110

```

ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc aag ggc cca tcg gtc Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val 115 120 125	384
ttc ccc ctg gcg ccc tgc tcc agg agc acc tcc gag agc aca gcg gcc Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala 130 135 140	432
ctg ggc tgc ctg gtc aag gac tac ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser 145 150 155 160	480
tgg aac tca ggc gct ctg acc agc ggc gtg cac acc ttc cca gct gtc Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val 165 170 175	528
cta cag tcc tca gga ctc tac tcc ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Ser Ser Val Val Thr Val Pro 180 185 190	576
tcc agc aac ttc ggc acc cag acc tac acc tgc aac gta gat cac aag Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys 195 200 205	624
ccc agc aac acc aag gtg gac aag aca gtt gag cgc aaa tgt tgt gtc Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val 210 215 220	672
gag tgc cca ccg tgc cca gca cca cct gtg gca gga ccg tca gtc ttc Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe 225 230 235 240	720
ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro 245 250 255	768
gag gtc acg tgc gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac ccc gag gtc Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val 260 265 270	816
cag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr 275 280 285	864
aag cca cgg gag gag cag ttc aac agc acg ttc cgt gtg gtc agc gtc Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val 290 295 300	912
ctc acc gtt gtg cac cag gac tgg ctg aac ggc aag gag tac aag tgc Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys 305 310 315 320	960
aag gtc tcc aac aaa ggc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser 325 330 335	1008
aaa acc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro 340 345 350	1056

```

tcc cgg gag gag atg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc 1104
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
      355                      360                      365

aaa ggc ttc tac ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg 1152
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
      370                      375                      380

cag ccg gag aac aac tac aag acc aca cct ccc atg ctg gac tcc gac 1200
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
      385                      390                      395                      400

ggc tcc ttc ttc ctt tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg 1248
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
      405                      410                      415

cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac 1296
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
      420                      425                      430

aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa 1341
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys *
      435                      440                      445

```

```

<210> 4
<211> 446
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ЛАНЦЮГ
<222> (1)...(446)
<223> Важкий ланцюг Ha15-10ac12

```

```

<400> 4
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20      25      30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35      40      45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65      70      75      80
Leu Gln Met His Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85      90      95
Ala Arg Gly Leu Thr Ser Gly Arg Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100     105     110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115     120     125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130     135     140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145     150     155     160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165     170     175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180     185     190

```



```

Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
    195                200                205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
    210                215                220
Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
225                230                235                240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
    245                250                255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
    260                265                270
Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
    275                280                285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
    290                295                300
Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305                310                315                320
Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
    325                330                335
Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
    340                345                350
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
    355                360                365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
    370                375                380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
385                390                395                400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
    405                410                415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
    420                425                430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    435                440                445

```

```

<210> 5
<211> 660
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(660)

```

```

<220>
<221> різні ознаки
<222> (1)...(660)
<223> легкий ланцюг Ha15-10ac12

```

```

<220>
<221> різні ознаки
<222> (1)...(339)
<223> варіабельна ділянка легкого ланцюга

```

```

<220>
<221> різні ознаки
<222> (340)...(660)
<223> константна каппа-ділянка людини

```

```

<400> 5
gat att gtg atg act cag tct cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga 48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

gag ccg gcc tcc atc tcc tgc agg tct agt cag agc ctc ctg ctt agt 96
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Ser
20 25 30

cat gga ttc aac tat ttg gat tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct 144
His Gly Phe Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

cca caa ctc ctg atc tat ttg ggt tct agt cgg gcc tcc ggg gtc cct 192
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca gat ttt aca ctg aaa atc 240
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat gtt ggg ctt tat tac tgc atg caa ccc 288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Met Gln Pro
85 90 95

cta caa att ccg tgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 336
Leu Gln Ile Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

cga act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag 384
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

cag ttg aaa tct gga act gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc 432
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

tat ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc caa 480
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

tcg ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc 528
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

acc tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag 576
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

aaa cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg 624
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

ccc gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag 660
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys *
210 215

```

<210> 6
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ЛАНЦЮГ
 <222> (1)...(219)
 <223> легкий ланцюг Ha15-10ac12

<400> 6
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Leu Ser
 20 25 30
 His Gly Phe Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Met Gln Pro
 85 90 95
 Leu Gln Ile Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 7
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ЛАНЦЮГ
 <222> (1)...(446)
 <223> важкий ланцюг Ha15-10ac12

<220>
 <221> САЙТ
 <222> (1)...(120)
 <223> варіабельна ділянка важкого ланцюга

<220>
 <221> САЙТ
 <222> (121)...(446)
 <223> константна ділянка IgG2 людини


```

<400> 7
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
          65          70          75          80
Leu Gln Met His Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Arg Gly Leu Thr Ser Gly Arg Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
          100          105          110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
          115          120          125
Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
          130          135          140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
          145          150          155          160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
          165          170          175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
          180          185          190
Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
          195          200          205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val
          210          215          220
Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe
          225          230          235          240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
          245          250          255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
          260          265          270
Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
          275          280          285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
          290          295          300
Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
          305          310          315          320
Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
          325          330          335
Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
          340          345          350
Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
          355          360          365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
          370          375          380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp
          385          390          395          400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
          405          410          415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
          420          425          430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          435          440          445

```

<210> 8
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> ЛАНЦЮГ
 <222> (1)...(219)
 <223> легкий ланцюг Ha15-10ac12

<220>
 <221> САЙТ
 <222> (1)...(113)
 <223> варіабельна ділянка легкого ланцюга

<220>
 <221> САЙТ
 <222> (114)...(219)
 <223> константна каппа-ділянка людини

<400> 8
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Leu Ser
 20 25 30
 His Gly Phe Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Ser Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Met Gln Pro
 85 90 95
 Leu Gln Ile Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 9
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> синтетична конструкція

<220>
 <221> пізні ознаки

```

<222> (1)...(4)
<223> пептидильний лінкер

<400> 9
Gly Phe Leu Gly
1

<210> 10
<211> 100
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> ДОМЕН
<222> (1)...(100)
<223> IGKV2D-28*01

<400> 10
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
85 90 95
Leu Gln Thr Pro
100

```

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Кон'югат антитіло-лікарський засіб, що містить:

антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент, який зв'язується з білком 158P1D7, де антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент кон'югований з монометилауристатином Е (ММАН) за допомогою лінкера, та де антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR-H1, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 31 до 35 SEQ ID NO: 7, CDR-H2, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 50 до 66 SEQ ID NO: 7, та CDR-H3, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 99 до 109 SEQ ID NO: 7, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR-L1, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 24 до 39 SEQ ID NO: 8, CDR-L2, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 55 до 61 SEQ ID NO: 8, та CDR-L3, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 94 до 102 SEQ ID NO: 8.
- 10 2. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 1, де антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 1 положення до 120 положення SEQ ID NO: 7 і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 1 положення до 113 положення SEQ ID NO: 8.
- 15 3. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 1 або п. 2, де антитіло містить важкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 1 положення до 446 положення SEQ ID NO: 7, та легкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 1 положення до 219 положення SEQ ID NO: 8.
- 20 4. Кон'югат антитіло-лікарський засіб, що містить антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент, який зв'язується з білком 158P1D7, де антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент кон'югований з монометилауристатином Е (ММАН) за допомогою лінкера, де антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що
- 30

містить ділянки, що визначають компліментарність (CDR), які складаються з амінокислотних послідовностей CDR у варіабельній ділянці важкого ланцюга антитіла, виробленого клітиною яєчників китайського хом'яка (CHO), депонованою до Американської колекції типових культур (ATCC) за інвентарним номером РТА-13102, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, що

5 містить CDR, які складаються з амінокислотних послідовностей CDR у варіабельній ділянці легкого ланцюга антитіла, виробленого клітиною яєчників китайського хом'яка (CHO), депонованою за інвентарним номером ATCC РТА-13102.

5. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 4, де антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга антитіла, виробленого клітиною яєчників китайського хом'яка (CHO), депонованою до Американської колекції типових культур (ATCC) за інвентарним номером РТА-13102, і варіабельну ділянку легкого ланцюга, що складається з

10 амінокислотної послідовності варіабельної ділянки легкого ланцюга антитіла, виробленого клітиною яєчників китайського хом'яка (CHO), депонованою за інвентарним номером ATCC РТА-13102.

6. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 4, де антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент містить важкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності важкого ланцюга антитіла, виробленого клітиною яєчників китайського хом'яка (CHO), депонованою за інвентарним номером ATCC РТА-13102, та легкого ланцюга, що складається з амінокислотної

20 послідовності легкого ланцюга антитіла, виробленого клітиною яєчників китайського хом'яка (CHO), депонованою за інвентарним номером ATCC РТА-13102.

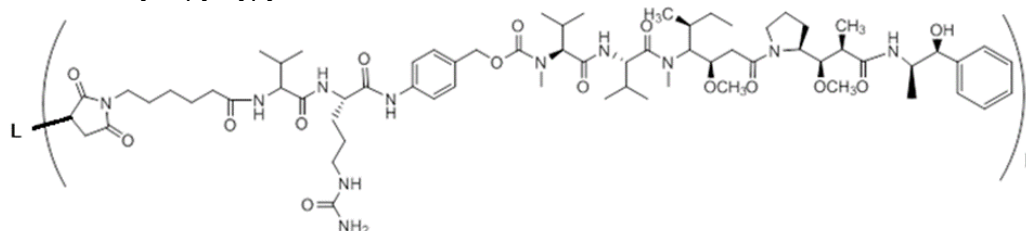
7. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким із пп. 1-6, де антиген-зв'язувальним фрагментом є фрагмент Fab, F(ab')₂, Fv або scFv.

8. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким із пп. 1-7, де антитіло є повністю людським антитілом.

9. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким із пп. 1-8, в якому антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент одержують рекомбінантним способом.

10. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким із пп. 1-9, де лінкер містить валін-цитрулін.

11. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким із пп. 1-10, де кон'югат антитіло-лікарський засіб має таку структуру:

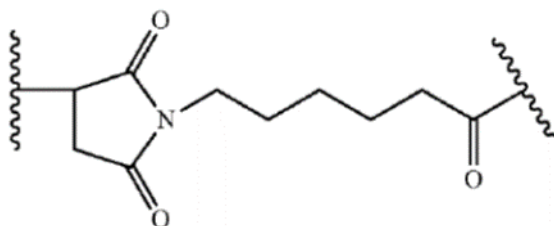


де L- означає анти-158P1D7 антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент і р становить від 1 до близько 10.

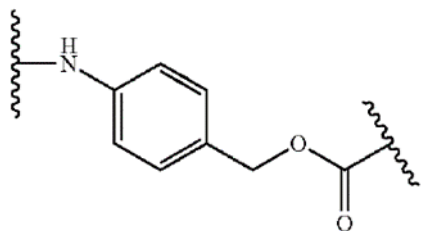
12. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 11, де р знаходиться в межах від 2 до 5.

13. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким із пп. 1-10, антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент зв'язують з монометилауристатином Е (ММАЕ) за допомогою лінкерної одиниці, що має формулу: -Aa-Ww-Yy; де -A- означає розтягувальну одиницю, а означає 0 або 1; -W- означає амінокислотну одиницю, w є ціле число від 0 до 12; та -Y- є спейсерною одиницею, у означає 0, 1 або 2.

14. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 13, де розтягувальна одиниця має структуру Формули I нижче; амінокислотна одиниця означає Val-Cit; і спейсерна одиниця означає PAB групу, що має структуру Формули II нижче:



, Формула I



. Формула II

15. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 14, де розтягувальна одиниця утворює зв'язок з атомом сірки антитіла або його антиген-зв'язувальний фрагмент; і де спейсерна одиниця зв'язується з монометилаурисатином Е (ММАЕ) за допомогою карбаматної групи.

5 16. Фармацевтична композиція, що містить фармацевтично ефективну кількість кон'югату антитіло-лікарський засіб за будь-яким із пп. 1-15 і фармацевтично прийнятний носій у стандартній лікарській формі для людини.

17. Фармацевтична композиція за п. 16, де фармацевтична композиція призначена для лікування гліобластоми, раку легенів, раку сечового міхура або раку молочної залози.

10 18. Фармацевтична композиція за п. 16 або 17, де фармацевтичну композицію вводять у поєднанні з опромінюванням або хіміотерапевтичним засобом.

19. Фармацевтична композиція за будь-яким із пп. 16-18, яка надалі містить хіміотерапевтичний засіб у стандартній лікарській формі для людини.

15 20. Спосіб лікування раку у суб'єкта, який полягає у введенні згаданому суб'єктові терапевтично ефективної кількості кон'югату антитіло-лікарський засіб за будь-яким із пп. 1-15, де рак вибирають із групи, яка складається з гліобластоми, раку легенів, раку сечового міхура і раку молочної залози.

20 21. Спосіб лікування раку у суб'єкта, який полягає у введенні згаданому суб'єктові терапевтично ефективної кількості комбінації кон'югату антитіло-лікарський засіб за будь-яким із пп. 1-15 та опромінюванні, де рак вибирають із групи, яка складається з гліобластоми, раку легенів, раку сечового міхура і раку молочної залози.

25 22. Спосіб лікування раку у суб'єкта, який полягає у введенні згаданому суб'єктові терапевтично ефективної кількості комбінації кон'югату антитіло-лікарський засіб за будь-яким із пп. 1-15 та хіміотерапевтичного засобу, де рак вибирають із групи, яка складається з гліобластоми, раку легенів, раку сечового міхура і раку молочної залози.

23. Застосування кон'югату антитіло-лікарський засіб за будь-яким із пп. 1-15 у виготовленні ліків для лікування раку у суб'єкта, де рак вибирають із групи, яка складається з гліобластоми, раку легенів, раку сечового міхура і раку молочної залози.

30 24. Застосування комбінації кон'югату антитіло-лікарський засіб за будь-яким із пп. 1-15 та хіміотерапевтичного засобу у виготовленні ліків для лікування раку у суб'єкта, де рак вибирають із групи, яка складається з гліобластоми, раку легенів, раку сечового міхура і раку молочної залози.

25. Застосування за п. 24 або 25, де раком є рак сечового міхура.

35 26. Антитіло до анти-158P1D7 або його антиген-зв'язувальний фрагмент, де антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR-H1, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 31 до 35 SEQ ID NO: 7, CDR-H2, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 50 до 66 SEQ ID NO: 7, та CDR-H3, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 99 до 109 SEQ ID NO: 7, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR-L1, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 24 до 39 SEQ ID NO: 8, CDR-L2, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 55 до 61 SEQ ID NO: 8, та CDR-L3, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 94 до 102 SEQ ID NO: 8.

45 27. Антитіло або антиген-зв'язувальний фрагмент за п. 26, де антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 1 положення до 120 положення SEQ ID NO: 7 і варіабельної ділянки легкого ланцюга, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 1 положення до 113 положення SEQ ID NO: 8.

50 28. Антитіло або антиген-зв'язувальний фрагмент за п. 26 або 27, де антитіло містить важкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 1 положення до 446 положення SEQ ID NO: 7, та легкий ланцюг, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 1 положення до 219 положення SEQ ID NO: 8.

29. Антиген-зв'язувальний фрагмент за будь-яким із пп. 26-28, де антиген-зв'язувальним фрагментом є фрагмент Fab, F(ab')₂, Fv або scFv.

30. Антитіло або антиген-зв'язувальний фрагмент за будь-яким із пп. 26-28, який додатково містить константну ділянку IgG людини та константну ділянку легкого ланцюга людини.

5 31. Антитіло або антиген-зв'язувальний фрагмент за п. 30, де константною ділянкою IgG є IgG2 і константною ділянкою легкого ланцюга є каппа.

32. Антитіло або антиген-зв'язувальний фрагмент за будь-яким із пп. 26-31, де антитіло є повністю людським антитілом.

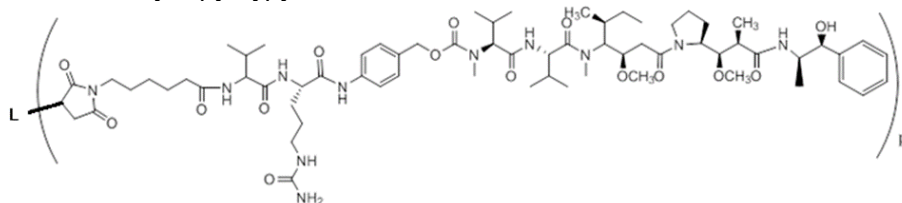
10 33. Антитіло або антиген-зв'язувальний фрагмент за будь-яким із пп. 26-32, де антитіло або антиген-зв'язувальний фрагмент одержують рекомбінантним способом.

34. Кон'югат антитіло-лікарський засіб, що містить антитіло або зв'язувальний фрагмент антитіла за будь-яким із пп. 26-33, кон'юговані з цитотоксичним засобом за допомогою лінкера.

35. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 34, де цитотоксичним засобом є монометилауристатин E (MMAE).

15 36. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 34 або 35, де лінкер містить валін-цитрулін.

37. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким із пп. 34-36, де кон'югат антитіло-лікарський засіб має таку структуру:



20 де L - означає анти-158P1D7 антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент і p становить від 1 до близько 10.

38. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 37, де p становить від 2 до 5.

39. Фармацевтична композиція, що містить терапевтично ефективну кількість кон'югату антитіло-лікарський засіб за будь-яким із пп. 34-38 і фармацевтично прийнятний носій у стандартній лікарській формі для людини.

25 40. Фармацевтична композиція за п. 39, де фармацевтична композиція призначена для лікування раку, де рак вибирають із групи, яка складається з гліобластоми, раку легенів, раку сечового міхура і раку молочної залози.

41. Фармацевтична композиція за п. 39 або 40, де фармацевтичну композицію вводять у поєднанні з опромінюванням або хіміотерапевтичним засобом.

30 42. Фармацевтична композиція за будь-яким із пп. 39-41, яка надалі містить хіміотерапевтичний засіб.

43. Фармацевтична композиція за будь-яким із пп. 17-19 та 40-42, де раком є рак сечового міхура.

35 44. Спосіб лікування раку у суб'єкта, який полягає у введенні згаданому суб'єктові терапевтично ефективної кількості кон'югату антитіло-лікарський засіб за будь-яким із пп. 34-38, де рак вибирають із групи, яка складається з гліобластоми, раку легенів, раку сечового міхура і раку молочної залози.

40 45. Спосіб лікування раку у суб'єкта, який полягає у введенні згаданому суб'єктові терапевтично ефективної кількості комбінації кон'югату антитіло-лікарський засіб за будь-яким із пп. 34-38 та опромінюванні, де рак вибирають із групи, яка складається з гліобластоми, раку легенів, раку сечового міхура і раку молочної залози.

45 46. Спосіб лікування раку у суб'єкта, який полягає у введенні згаданому суб'єктові терапевтично ефективної кількості комбінації кон'югату антитіло-лікарський засіб за будь-яким із пп. 34-38 та хіміотерапевтичного засобу, де рак вибирають із групи, яка складається з гліобластоми, раку легенів, раку сечового міхура і раку молочної залози.

47. Спосіб за будь-яким із пп. 20-22 та 44-46, де раком є рак сечового міхура.

48. Застосування кон'югату антитіло-лікарський засіб за будь-яким із пп. 34-38 у виготовленні ліків для лікування раку у суб'єкта, де рак вибирають із групи, яка складається з гліобластоми, раку легенів, раку сечового міхура і раку молочної залози.

50 49. Застосування комбінації кон'югату антитіло-лікарський засіб за будь-яким із пп. 34-38 та хіміотерапевтичного засобу у виготовленні ліків для лікування раку у суб'єкта, де рак вибирають із групи, яка складається з гліобластоми, раку легенів, раку сечового міхура і раку молочної залози.

50. Застосування за п. 48 або 49, де раком є рак сечового міхура.

51. Ізольований полінуклеотид, що кодує антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент, що зв'язується з 158P1D7 білком, де антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR-H1, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 31 до 35 SEQ ID NO: 7, CDR-H2, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 50 до 66 SEQ ID NO: 7, та CDR-H3, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 99 до 109 SEQ ID NO: 7, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR-L1, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 24 до 39 SEQ ID NO: 8, CDR-L2, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 55 до 61 SEQ ID NO: 8, та CDR-L3, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 94 до 102 SEQ ID NO: 8.

52. Полінуклеотид за п. 51, де антиген-зв'язувальний фрагмент є фрагментом антитіла, який вибирають із фрагмента Fab, Fab', Fv, scFv або F(ab')₂.

53. Ізольований вектор, що містить полінуклеотид за п. 51 або п. 52.

54. Ізольована клітина-хазяїн, що містить вектор за п. 53.

55. Клітина-хазяїн за п. 54, де клітиною-хазяїном є CHO клітина.

56. Спосіб одержання анти-158P1D7 антитіла або його антиген-зв'язувального фрагмента, де спосіб включає:

а) культивування клітини-хазяїна за п. 54 або 55 в умовах, що забезпечують експресію полінуклеотиду, який кодує антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент; і

б) ізолювання антитіла або його антиген-зв'язувального фрагмента.

57. Спосіб за п. 56, де антиген-зв'язувальний фрагмент є Fab, Fab', Fv, scFv або F(ab')₂ фрагментом.

58. Анти-158P1D7 антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент, який отримують у спосіб за п. 56 або 57.

59. Спосіб одержання анти-158P1D7 кон'югату антитіло-лікарський засіб, де спосіб включає:

а) культивування клітини-хазяїна за п. 54 або 55 в умовах, що забезпечують експресію полінуклеотиду, який кодує антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент;

б) ізолювання антитіла або його антиген-зв'язувального фрагмента; і

с) кон'югування лікарського засобу до антитіла або його антиген-зв'язувального фрагмента за допомогою лінкера.

60. Спосіб за п. 59, де антиген-зв'язувальний фрагмент є Fab, Fab', Fv, scFv або F(ab')₂ фрагментом.

61. Спосіб за п. 59 або 60, де лікарський засіб є цитотоксином, цитостатичним засобом або імуномодулюючим засобом.

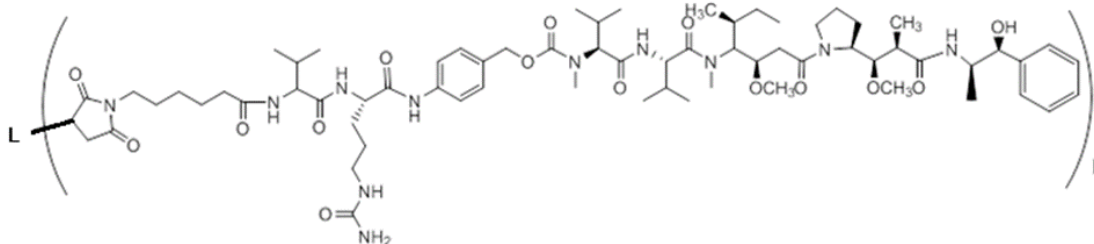
62. Спосіб за п. 61, де цитотоксин є антитубуліновим засобом.

63. Спосіб за п. 62, де антитубуліновий засіб вибирають із групи, яка складається з ауристинфенілаланінфеніллендіаміну (AFP), монометилауристинфенілаланіну (MMAF) та монометилауристину Е (MMAE).

64. Спосіб за п. 63, де антитубуліновим засобом є монометилауристин Е (MMAE).

65. Спосіб за будь-яким із пп. 59-64, де лінкер містить валін-цитрулін.

66. Спосіб за п. 65, де кон'югат антитіло-лікарський засіб має таку структуру:



де L - означає анти-158P1D7 антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент і p становить від 1 до близько 10.

67. Анти-158P1D7 кон'югат антитіло-лікарський засіб, який отримують у спосіб за будь-яким із пп. 59-66.

68. Клітина-хазяїн, яку вибирають із групи, що складається з наведеного далі:

(а) клітини-хазяїна, трансформованої за допомогою вектора експресії, що містить полінуклеотид, який містить послідовність, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла або його антиген-зв'язувального фрагмента, та полінуклеотид, який містить послідовність, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла або його антиген-зв'язувального фрагмента; та

(b) клітини-хазяїна, трансформованої за допомогою вектора експресії, що містить полінуклеотид, який містить послідовність, що кодує варіабельну ділянку важкого ланцюга антитіла або його антиген-зв'язувального фрагмента, та вектора експресії, що містить полінуклеотид, який містить послідовність, що кодує варіабельну ділянку легкого ланцюга антитіла або його антиген-зв'язувального фрагмента,

де антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, що містить CDR-H1, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 31 до 35 SEQ ID NO: 7, CDR-H2, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 50 до 66 SEQ ID NO: 7, та CDR-H3, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 99 до 109 SEQ ID NO: 7, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, що містить CDR-L1, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 24 до 39 SEQ ID NO: 8, CDR-L2, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 55 до 61 SEQ ID NO: 8, та CDR-L3, що складається з амінокислотної послідовності, що знаходиться в межах від 94 до 102 SEQ ID NO: 8.

69. Спосіб одержання антитіла до 158P1D7 або його антиген-зв'язувального фрагмента, який полягає у культивуванні клітини-хазяїна за п. 68 для забезпечення експресії антитіла до 158P1D7 або його антиген-зв'язувального фрагмента.

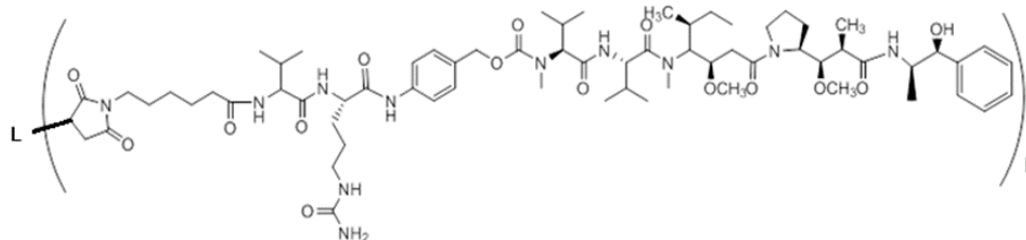
70. Антитіло до 158P1D7 або його антиген-зв'язувальний фрагмент, що одержують способом за п. 69.

71. Кон'югат антитіло-лікарський засіб, що містить антитіло або антитіло-зв'язувальний фрагмент за п. 70, кон'юговане з цитотоксином, цитостатичним засобом або імуномодулюючим засобом за допомогою лінкера.

72. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 71, де цитотоксин є монометилауристатин Е (MMAE).

73. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 71 або 72, де лінкер містить валін-цитрулін.

74. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким із пп. 71-73, де кон'югат антитіло-лікарський засіб має таку структуру:



де L - означає анти-158P1D7 антитіло або його антиген-зв'язувальний фрагмент і р становить від 1 до близько 10.


```

1          M K L W I H L P Y S S L L
1  tcggatttcatcacatgacaacATGAAGCTGTGGATTCTCTTTTATTCATCTCTCCT
14  A C I S L H S Q T F V L S S R G S C D S
61  TGCCTGTATATCTTTACACTCCCAACTCCAGTGCTCTCATCCAGAGGCTCTTGTGATTG
34  L C N C E E K D G T M L I N C E A K G I
121 TCTTTGCAATTGTGAGGAAAAAGATGGCACAATGCTAATAAATTGTGAAGCAAAAGGTAT
54  K M V S E I S V P P S R P F Q L S L L N
181 CAAGATGGTATCTGAAATAAGTGTGCCACCATCACGACCTTTCCAACTAAGCTTATTA
74  N G L T M L H T N D F S G L T N A I S I
241 TAACGGCTTGACGATGCTTCACACAAATGACTTTTCTGGGCTTACCAATGCTATTTCAAT
94  H L G F N N I A D I E I G A F N G L G L
301 ACACCTTGGATTAAACAATATTGCAGATATTGAGATAGGTGCATTTAATGGCCTTGGCCT
114 L K Q L H I N H N S L E I L K E D T F H
361 CCTGAAACAACCTTCATATCAATCACAATTCTTTAGAAATTCTTAAAGAGGATACTTTCCA
134 G L E N L E F L Q A D N N F I T V I E P
421 TGGACTGGAACCTGGAATTCCTGCAAGCAGATAACAATTTATCACAGTGATTGAACC
154 S A F S K L N R L K V L I L N D N A I E
481 AAGTGCCTTTAGCAAGCTCAACAGACTCAAAGTGTTAATTTTAAATGACAATGCTATTGA
174 S L P P N I F R F V P L T R L D L R G N
541 GAGTCTTCCTCCAAACATCTTCGATTGTTCCTTTAACCCATCTAGATCTTCGTGGAA
194 Q L Q T L P Y V G F L E H I G R I L D L
601 TCAATTACAAACATTGCCTTATGTTGGTTTCTCGAACACATTGGCCGAATATTGGATCT
214 Q L E D N K W A C N C D L L Q L K T W L
661 TCAGTTGGAGGACAACAAATGGGCCTGCAATTGTGACTTATTGCAGTTAAAAACTTGGTT
234 E N M P P Q S I I G D V V C N S P P F F
721 GGAGAACATGCCTCCACAGTCTATAATTGGTGATGTTGTCTGCAACAGCCCTCCATTTT
284 K G S I L S R L K K E S I C P T P P V Y
781 TAAAGGAAGTATACTCAGTAGACTAAAGAAGGAATCTATTTGCCCTACTCCACCAGTGA
274 E E H E D P S S S L H L A A T S S I N D
841 TGAAGAACATGAGGATCCTTCAGGATCATTACATCTGGCAGCAACATCTTCAATAAATGA
294 S R M S T K T T S I L K L P T K A P G L
901 TAGTCGCATGTCAACTAAGACCACGTCCATTCTAAACTACCCACCAAGCACCAGGTTT

```

ФІГ. 1. кДНК (SEQ ID NO:1) та амінокислотна послідовність (SEQ ID NO:2) 158P1D7. Ініціювальний метіонін підкреслений. Відкрита рамка зчитування проходить від нуклеїнової кислоти 23-2548, що включає термінувальний кодон

314 I P Y I T K P S T Q L P G P Y C P I P C
 961 GATACCTTATATTACAAAGCCATCCACTCAACTTCCAGGACCTTACTGCCCTATTCTTG
 334 N C K V L S P S G L L I H C Q E R N I E
 1021 TAACTGCAAAGTCCTATCCCCATCAGGACTTCTAATACATTGTCAGGAGCGCAACATTGA
 354 S L S D L R P P P Q N P R K L I L A G N
 1081 AAGCTTATCAGATCTGAGACCTCCTCCGCAAAATCCTAGAAAGCTCATTTCTAGCGGGAAA
 374 I I H S L M K S D L V E Y F T L E M L H
 1141 TATTATTCACAGTTTAATGAAGTCTGATCTAGTGGAAATATTTCACTTTGGAATGCTTCA
 394 L G N N R I E V L E E G S F M N L T R L
 1201 CTTGGGAAACAATCGTATTGAAGTTCTTGAAGAAGGATCGTTTATGAACCTAACGAGATT
 414 Q R L Y L N G N H L T K L S K G M F L G
 1261 ACAAAAACCTCTATCTAAATGGTAACCACTGACCAAAATTAAGTAAAGGCATGTTCTTGG
 434 L H N L E Y L Y L E Y N A I K E I L P G
 1321 TCTCCATAATCTTGAATACTTATATCTTGAATACAATGCCATTAAAGGAAATACTGCCAGG
 454 T F N P M P K L K V L Y L N N N L L Q V
 1381 AACCTTTAATCCAATGCCTAAACTTAAAGTCCTGTATTTAAATAACAACCTCCTCCAAGT
 474 L P P H I F S G V P L T K V N L K T N Q
 1441 TTTACCACCACATATTTTTTTCAGGGGTTCTCTAACTAAGGTAAATCTTAAACAAACCA
 494 F T H L P V S N I L D D L D L L T Q I D
 1501 GTTTACCCATCTACCTGTAAGTAATATTTTGGATGATCTTGATTACTAACCACGATTGA
 514 L E D N P W D C S C D L V G L Q Q W I Q
 1561 CCTTGAGGATACCCCTGGGACTGCTCCTGTGACCTGGTTGGACTGCAGCAATGGATACA
 534 K L S K N T V T D D I L C T S P G H L D
 1621 AAAGTTAAGCAAGAACACAGTGACAGATGACATCCTCTGCACTTCCCCCGGGCATCTCGA
 554 K K E L K A L N S E I L C P G L V N N P
 1681 CAAAAAGGAATTGAAAGCCCTAAATAGTGAAATTCCTCTGTCCAGGTTTAGTAAATAACCC
 574 S M P T Q T S Y L M V T T P A T T T N T
 1741 ATCCATGCCAACACAGACTAGTTACCTTATGGTCACCACTCCTGCAACAACAACAAATAC
 594 A D T I L R S L T D A V P L S V L I L G
 1801 GGCTGATACTATTTTACGATCTCTTACGGACGCTGTGCCACTGTCTGTTCTAATATTGGG
 614 L L I M F I T I V F C A A G I V V L V L
 1861 ACTTCTGATTATGTTTCATCACTATTGTTTTCTGTGCTGCAGGGATAGTGGTTCTTGTCT
 634 H R R R R Y K K K Q V D E Q M R D N S P
 1921 TCACCGCAGGAGAAGATACAAAAGAAACAAGTAGATGAGCAATGAGAGACAACAGTCC
 654 V H L Q Y S M Y G H K T T H H T T E R P
 1981 TGTGCATCTTCAGTACAGCATGTATGGCCATAAAACCACTCATCACTACTGAAAGACC
 674 S A S L Y E Q H M V S P M V H V Y R S P

Фиг. 1-2

2041 CTCTGCCTCACTCTATGAACAGCACATGGTGAGCCCCATGGTTCATGTCTATAGAAGTCC
 694 S F G P K H L E E E E E R N E K E G S D
 2101 ATCCCTTGGTCCAAAGCATCTGGAAGAGGAAGAGAGGAATGAGAAAGAAGGAAGTGA
 714 A K H L Q R S L L E Q E N H S P L T G S
 2161 TGCAAAACATCTCCAAAGAAGTCTTTTGGAAACAGGAAAATCATTCACTCACTCACAGGGTC
 734 N M K Y K T T N Q S T E F L S F Q D R S
 2221 AAATATGAAATACAAAACCACGAACCAATCAACAGAATTTTTATCCTTCCAAGATGCCAG
 754 S L Y R N I L E K E R E L Q Q L G I T E
 2281 CTCATTGTACAGAAACATTTTAGAAAAAGAAAGGGAACCTTCAGCAACTGGGAATCACAGA
 774 Y L R K N I A Q L Q P D M E A H Y P G A
 2341 ATACCTAAGGAAAAACATTGCTCAGCTCCAGCCTGATATGGAGGCACATTATCCTGGAGC
 794 H E E L K L M E T L M Y S R P R N V L V
 2401 CCACGAAGAGCTGAAGTTAATGGAACATTAATGTACTCAGTCCAAGGAAGGTATTAGT
 814 E Q T K N E Y F E L K A N L H A E P D Y
 2461 GGAACAGACAAAAAATGAGTATTTTGAACCTTAAAGCTAATTTACATGCTGAACCTGACTA
 834 L E V L E Q Q T *
 2521 TTTAGAACTCCTGGAGCAGCAAACATAGatggaga

Фиг. 1-3

Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L
 1 CAGGTCCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGTCCCTGAGACTC
S C A A S G F T F S S Y G M H W V R Q A
 61 TCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCAGTGGTCCGCCAGGCT
P G R G L E W V A V I W Y D G S N Q Y Y
 121 CCAGGCAAGGGGCTGGAATGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATCAATATTAT
A D S V K G R F T I S R D N S K N T L F
 181 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTTT
L Q M H S L R A E D T A V Y Y C A R G L
 241 CTGCAATGCCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATTACTGTGCGAGAGGTCTG
T S G R Y G M D V W G Q G T T V T V S S
 301 ACTTCTGGACGGTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAGGGACACGGTCCAGCTCTCCCTCA
A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E
 361 GCCTCCCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTGGGCGCCCTGCTCCAGGAGACCTCCCGAG
S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
 421 AGCACAGCGGCCCTGGGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGG
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
 481 TGGAACCTCAGGCGCTGACAGCGCGTGCACACCTTCCAGCTGTCTTACAGTCTCTA
G L Y S L S S V V T V P S S N F G T Q T
 541 GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGAGC
Y T C N V D H K P S N T K V D K T V E R
 601 TACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACACAGACTTGAGCGC
K C C V E C P P C P A P P V A G P S V F
 661 AAATGTTGTGTCGAGTGGCCACCGTGGCCAGCACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCTTC
L F P P K P K D T L M I S R T P E V T G
 721 CTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGCTGC
V V V D V S H E D P E V Q F N W Y D G
 781 GTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCACCTGGTACGTGGACGGC
V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R
 841 GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTTCCGT
V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K C
 901 GTGGTCAGCTCCTCACCCTGTGTCACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAAGTGC
K V S N K G L P A P I E K T I S K T K G
 961 AAGGTCTCCAACAAAGGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGG
Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N
 1021 CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC
Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W
 1081 CAGGTACGCTGACCTGGCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D
 1141 GAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACACTACAGACACACCTCCCATGCTGGACTCCGAC
G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N
 1201 GGCTCTTCTTCTTTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L
 1261 GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAGAGCCTC
S L S P G K *
 1321 TCCCTGTCTCCGGGTAATAA

ФІГ. 2. Послідовності нуклеїнової кислоти та амінокислотні послідовності антитіл до 158P1D7

ФІГ. 2А. кДНК (SEQ ID NO:3) та амінокислотна послідовність (SEQ ID NO:4) важкого ланцюга Ha15-10ac12. Двома лініями підкреслена варіабельна ділянка важкого ланцюга, однією лінією підкреслена константна ділянка важкого ланцюга IgG2 людини

D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S
 1 GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCGGGCTCC
 I S C R S S Q S L L L S H G F N Y L D W
 61 ATCTCTCTGAGGTCTAGTCAGAGCCCTCCTGCTTAGTCATGGATTCAACTATTGCTTGG
 Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L G S S R A
 121 TACCTGCAGAGCCAGGGCAGTCTCCACAACCTCCTGATCTATTGGGTTCTAGTCTGGGCC
 S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I
 181 TCCGGGGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAATC
 S R V E A E D V G L Y Y C M Q P L Q I P
 241 AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGCTTTATTACTGCATGCAACCCCTACAAATTCGG
 W T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V
 301 TGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTG
 F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L
 361 TTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTGTGTGTGCTG
 L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q
 421 CTGAATACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAA
 S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L
 481 TCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTC
 S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E
 541 AGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCCAA
 V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C *
 601 GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG

ФІГ. 2В. кДНК (SEQ ID NO:5) та амінокислотна послідовність (SEQ ID NO:6)
 легкого ланцюга Ha15-10ac12. Двома лініями підкреслена варіабельна ділянка
 легкого ланцюга, однією лінією підкреслена константна каппа-ділянка людини

1 QVOLVESEGGGVVOPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVROAPGKGLEWVAV
 51 IWYDGSNOYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMHS LRAEDTAVYYCARGL
 101 TSGRYGMDVWGOGTTVTVSSASTKGPSVFPLAFCRSTSESTAALGCLVK
 151 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQT
 201 YTCNVDHKPSNTKVDKTVKRCCKVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTL
 251 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFR
 301 VVSVLTVVHQDWLNGKEYRCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTL
 351 PPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSD
 401 GSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ФІГ. 3. Амінокислотні послідовності антитіл до 158P1D7

ФІГ. 3А. Амінокислотна послідовність (SEQ ID NO:7) важкого ланцюга
 Ha15-10ac12. Двома лініями підкреслена варіабельна ділянка важкого ланцюга
 і однією лінією підкреслена константна ділянка IgG2 людини

1 DIVMTOSPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLLLSHGFFNYLDWYLOKPGQSPQ
 51 LLIYLGSSSRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGLYYCMOPLQIP
 101 WTEGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYFREAK
 151 VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
 201 VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ФІГ. 3В. Амінокислотна послідовність (SEQ ID NO:8) легкого ланцюга Ha15-
 10ac12. Двома лініями підкреслена варіабельна ділянка легкого ланцюга і
 однією лінією підкреслена константна каппа-ділянка людини

<u>ID#</u>			<-----FWR1----->	
	Ha15-10ac12VH	1	Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A	70
			CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAG	
98.3(290/295)	IGHV3-33*01	1	Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A	70
100(5/5)	IGHD4-17*01		-----	
100(48/48)	IGHJ6*02		-----	
<u>ID#</u>			><-----CDR1-----><-----FWR2----->	
	Ha15-10ac12VH	71	A S G F T F S S Y G M H W V R Q A P G K G L E W	140
			CGTCT GGATTCACCTTCAGTAGCTATGGC ATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGCTGGAATG	
98.3(290/295)	IGHV3-33*01	71	A S G F T F S S Y G M H W V R Q A P G K G L E W	140
100(5/5)	IGHD4-17*01		
100(48/48)	IGHJ6*02		-----	
<u>ID#</u>			><-----CDR2-----><-----	
	Ha15-10ac12VH	141	V A V I W Y D G S N Q Y Y A D S V K G R F T I	210
			GGTGGCAGTT ATATGGTATGATGGAAGTAATCAA TATTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATC	
98.3(290/295)	IGHV3-33*01	141	V A V I W Y D G S N Q Y Y A D S V K G R F T I	210
100(5/5)	IGHD4-17*01	A.....C.....	
100(48/48)	IGHJ6*02		-----	
<u>ID#</u>			-----FWR3----->	
	Ha15-10ac12VH	211	S R D N S K N T L F L Q M H S L R A E D T A V	280
			TCCAGAGACAATCCAAAGAACACGCTGTTCTGCAAAATGCACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGT	
98.3(290/295)	IGHV3-33*01	211	S R D N S K N T L F L Q M H S L R A E D T A V	280
100(5/5)	IGHD4-17*01	A.....A.....	
100(48/48)	IGHJ6*02		-----	

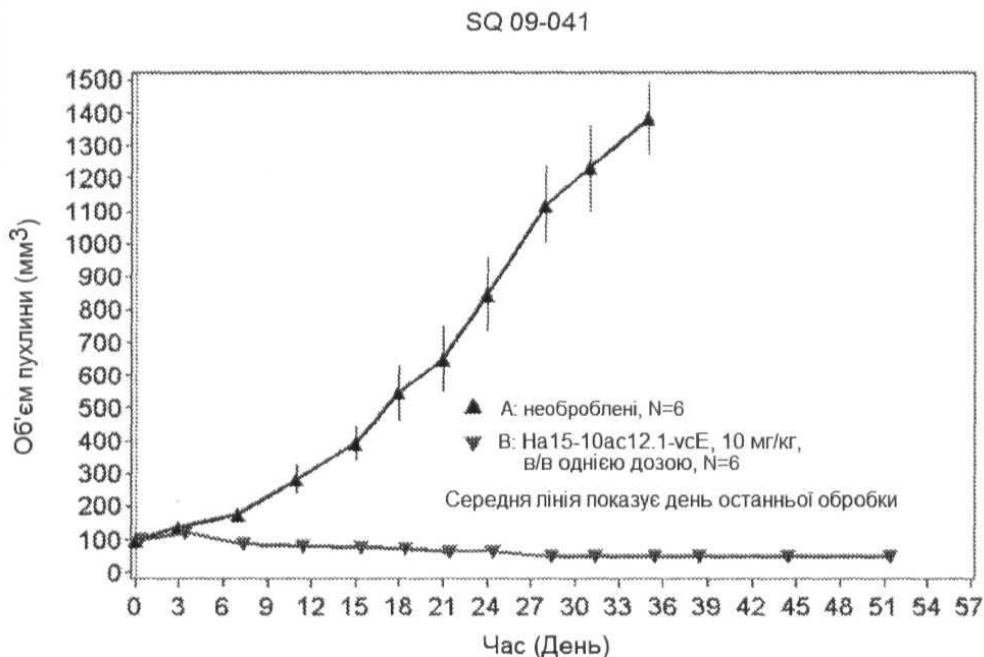
ФІГ. 4. Вирівнювання антитіл Ha15-10ac12 до зародкової лінії Іg людини
 ФІГ. 4А. Вирівнювання важкого ланцюга Ha15-10ac12 до зародкової лінії Іg людини

			><-----CDR3----->	
	Ha15-10ac12VH	281	Y Y C A R G L T S G R Y G M D V W G Q G T T V T	350
			ATTACTGT GCGAGAGGTCTGACTTCTGGACGGTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACACGGTCAC	
98.3(290/295)	IGHV3-33*01	281	Y Y C A R G L T S G R Y G M D V W G Q G T T V T	295
100(5/5)	IGHD4-17*01	1	5
100(48/48)	IGHJ6*02	15	-----	52
<u>ID#</u>				
	Ha15-10ac12VH	351	V S S	360
			CGTCTCTCA	
98.3(290/295)	IGHV3-33*01		V S S	
100(5/5)	IGHD4-17*01		-----	
100(48/48)	IGHJ6*02	53	62

ФІГ. 4А-2

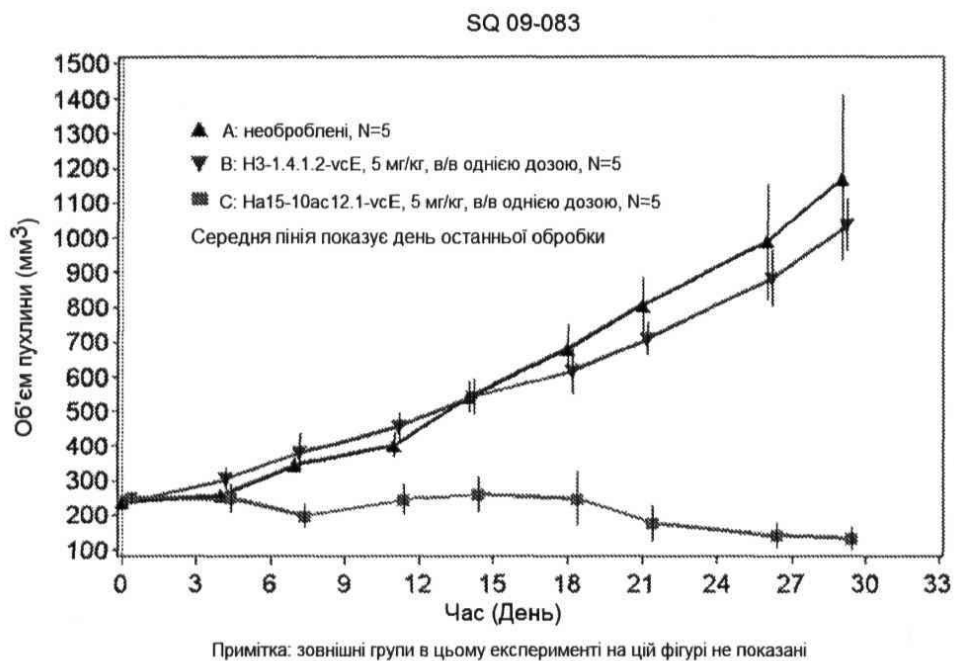
<u>ID#</u>		<-----FWR1----->	
	Ha15-10ac12V1	1	D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C 70
	IGKV2D-28*01	1	GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCCTCCATCTCCTGCA 70
97.0(290/299)	IGKV2D-28*01	1	D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C 70
100(38/38)	IGKJ1*01	1A.....
<u>ID#</u>		<-----CDR1-----> <-----FWR2----->	
	Ha15-10ac12V1	71	R S S Q S L L L S H G F N Y L D W Y L Q K P G 137
	IGKV2D-28*01	71	GGTCTAGT CAGAGCCCTCCTGCTTAGTCAAG--GATTCAACTAT TTGGATTGGTACCTGCAGAGCCAGG 137
97.0(290/299)	IGKV2D-28*01	71	R S S Q S L L L S H G Y N Y L D W Y L Q K P G 137
100(38/38)	IGKJ1*01	71A.....
<u>ID#</u>		<-----CDR2----->	
	Ha15-10ac12V1	138	Q S P Q L L I Y L G S S R A S G V P D R F S G 207
	IGKV2D-28*01	138	GCAGTCTCCACAACCTCCTGATCTAT TTGGGTTC AGTCGGGCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGC 207
97.0(290/299)	IGKV2D-28*01	138	Q S P Q L L I Y L G S N R A S G V P D R F S G 207
100(38/38)	IGKJ1*01	138G.....
<u>ID#</u>		<-----FWR3----->	
	Ha15-10ac12V1	208	S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G L Y Y 277
	IGKV2D-28*01	208	AGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGCTTTATTACT 277
97.0(290/299)	IGKV2D-28*01	208	S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y 277
100(38/38)	IGKJ1*01	208G.....
<u>ID#</u>		-> <-----CDR3----->	
	Ha15-10ac12V1	278	C M Q P L Q I P W T F G Q G T K V E I K 337
	IGKV2D-28*01	278	GC ATGCAACCCCTACAAATTCGTTGGACGTTCCGCCAAGGACCAAGGTGGAAATCAAAC 337
97.0(290/299)	IGKV2D-28*01	278	C M Q A L Q T P 299
100(38/38)	IGKJ1*01	1G.T.....C..... 38

ФІГ. 4В. Вирівнювання легкого ланцюга Ha15-10ac12 до зародкової лінії Ig людини

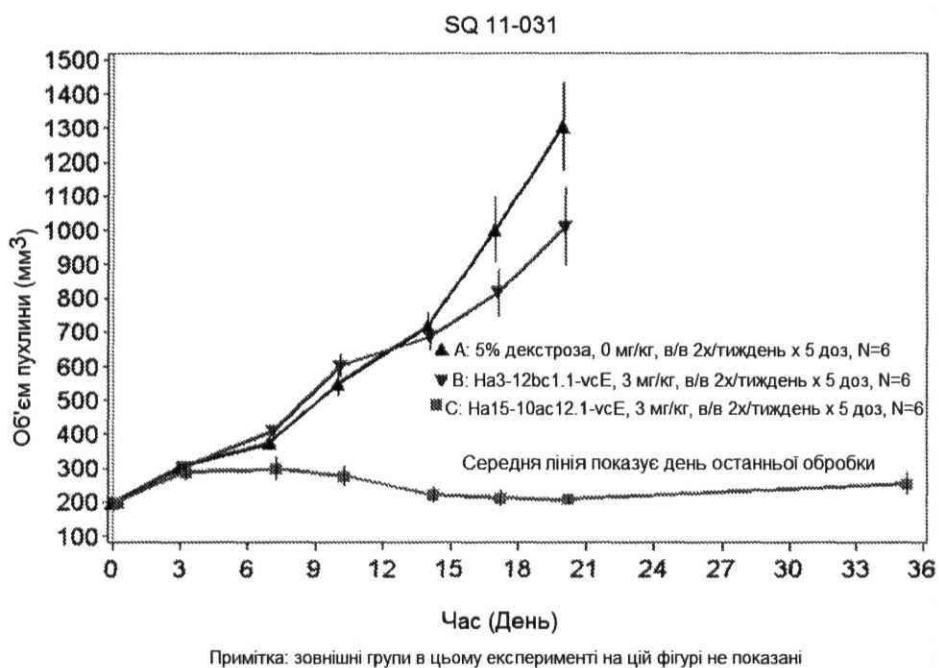


Примітка: зовнішні групи в цьому експерименті на цій фігурі не показані

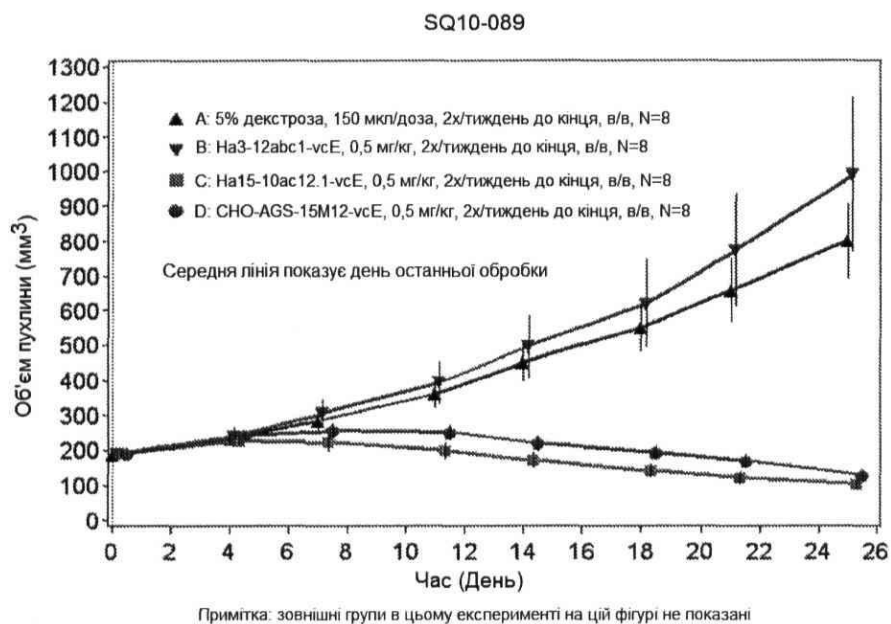
ФІГ. 5. Ефективність Ha15-10ac12vcMMAE на встановленій підшкірно моделі ксенотрансплантата раку сечового міхура людини AG-B7 у мишей із ТКІД



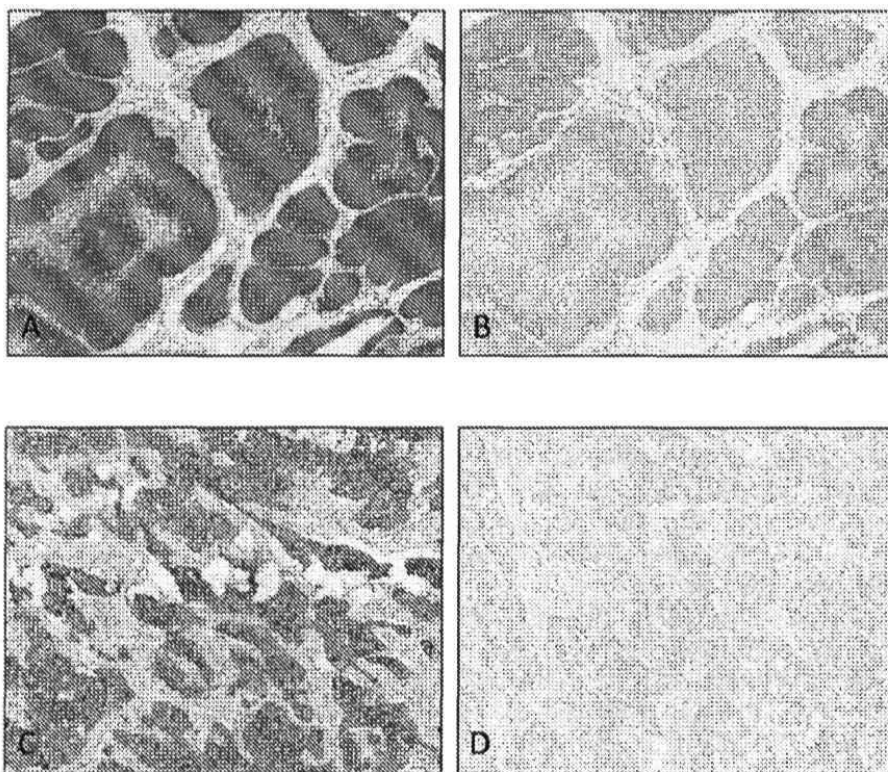
ФІГ. 6. Ефективність Na15-10ac12vcMMAE на встановленому підшкірно раку сечового міхура людини RT-4-XCL, імплантованому мишам із ТКІД



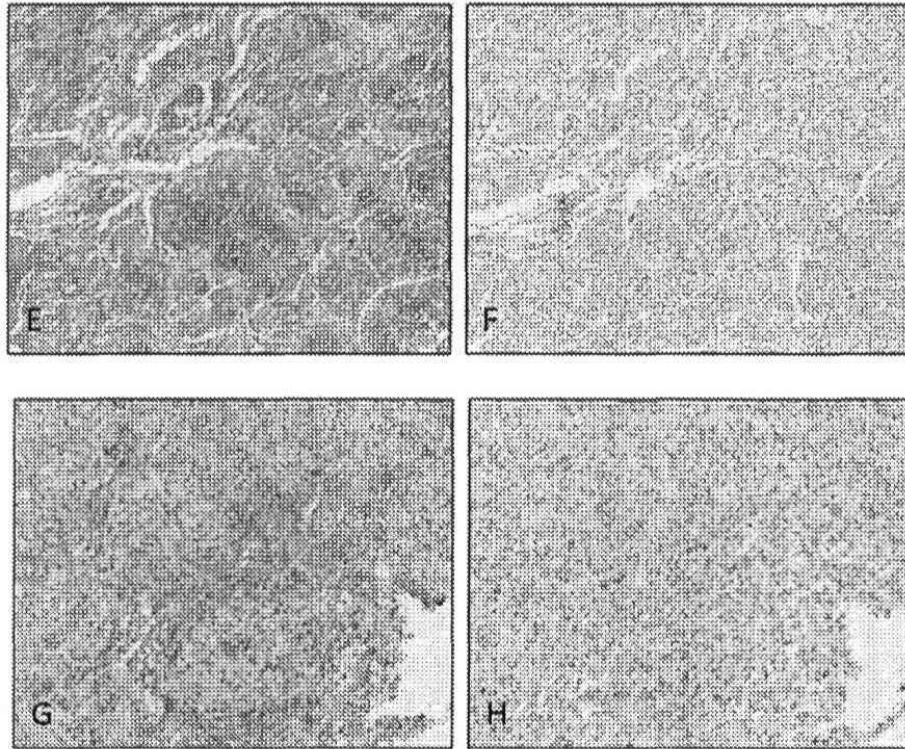
ФІГ. 7. Ефективність Na15-10ac12vcMMAE на встановленому підшкірно раку легенів людини NCI-H322M-XCL, імплантованому мишам із ТКІД



ФІГ. 8. Ефективність Na15-10ac12vcMMAE на встановленій підшкірно моделі ксенотрансплантата раку сечового міхура людини AG-B7 у мишей із ТКІД

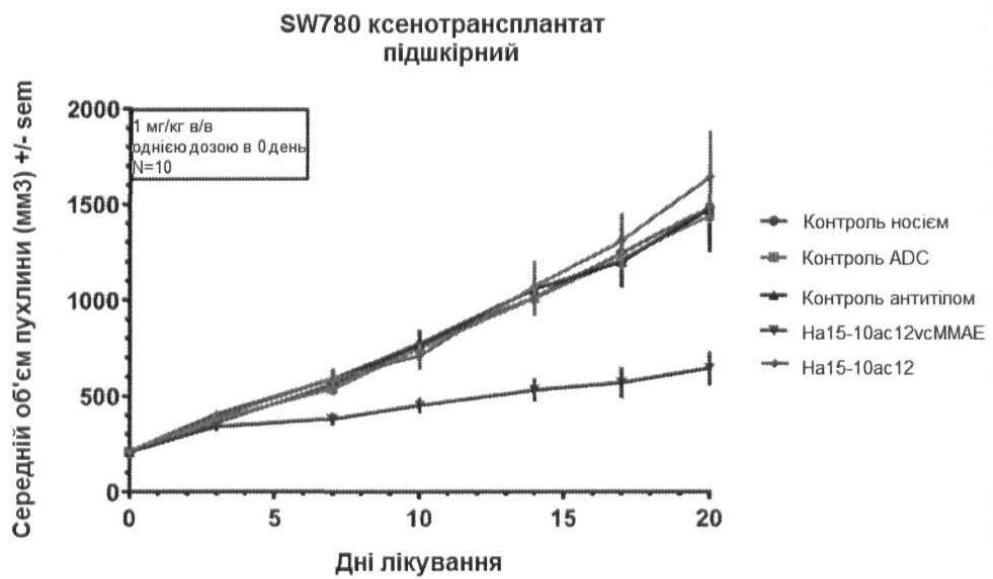


ФІГ. 9. Виявлення білка 158P1D7 за допомогою імуногістохімії
ФІГ. 9А-9В. Виявлення білка 158P1D7 при раку сечового міхура
ФІГ. 9С-9D. Виявлення білка 158P1D7 при раку молочної залози

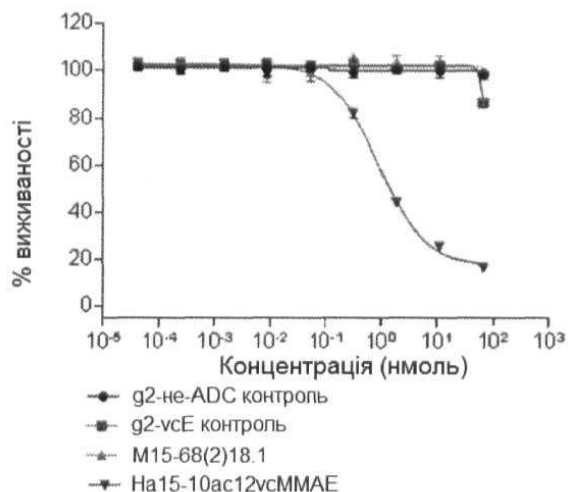


ФІГ. 9Е-9F. Виявлення білка 158P1D7 при раку легенів

ФІГ. 9G-9H. Виявлення білка 158P1D7 при гліобластомі

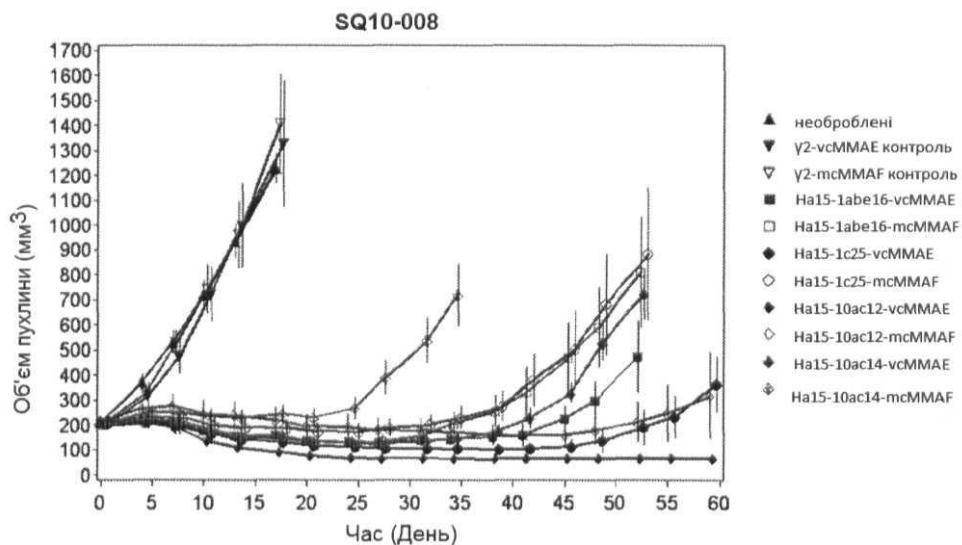


ФІГ. 10. Ефективність Ha15-10ac12vcMMAE на встановленій підшкірно моделі ксенотрансплантата раку сечового міхура людини SW780 у мишей із ТКІД

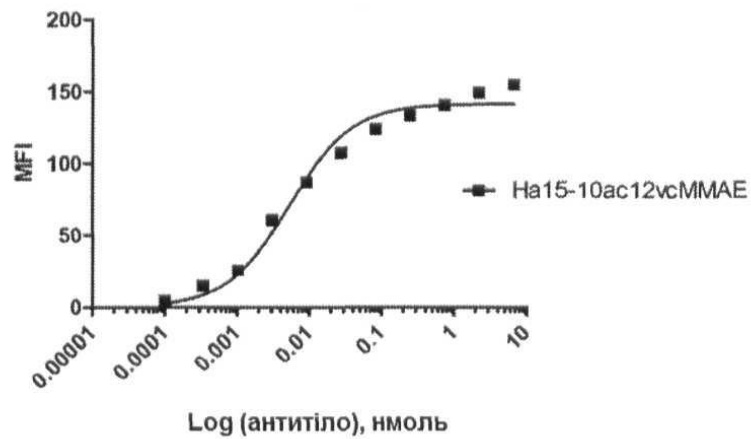


	g2-не-ADC контроль	g2-vcE контроль	M15-68(2)18.1.1	Ha15-10ac12vcMMAE
IC50 (нМ)				
CHP212	низька достовірність	65.64	низька достовірність	0.9076
IGROV1	не зійшлися	низька достовірність	низька достовірність	не зійшлися

ФІГ. 11. Ефективність в умовах *in vitro* Ha15-10ac12vcMMAE в аналізі цитотоксичності CHP-212 порівняно з M15-68(2)18 (що також називають 68(18)1.1)

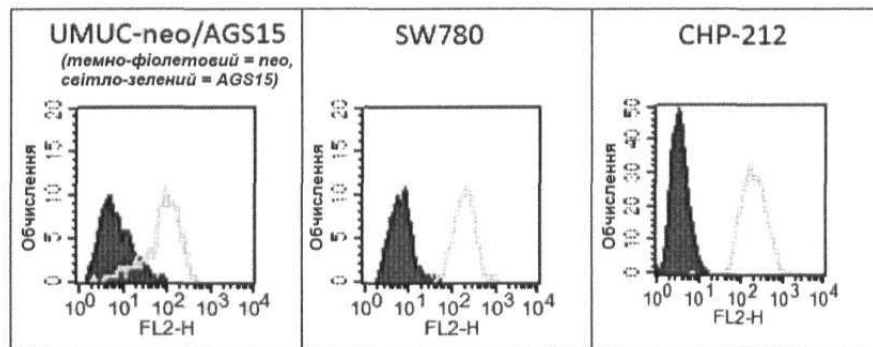


ФІГ. 12. Ефективність Ha15-10ac12vcMMAE на введеній підшкірно моделі ксенотрансплантата одержаного від пацієнта раку сечового міхура людини AG-B8 у мишей із ТКІД

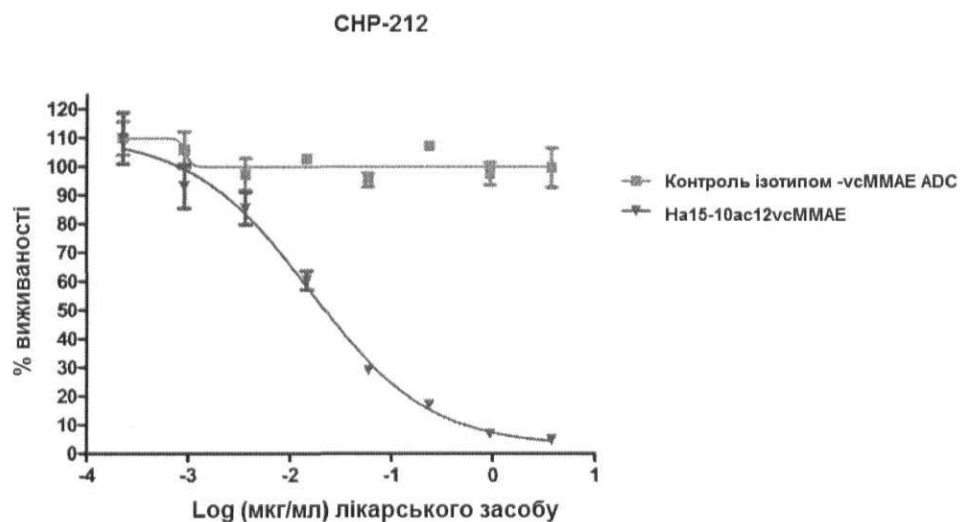


	Ha15-10ac12vcMMAE
Bmax	141,9
Kd	0,005286

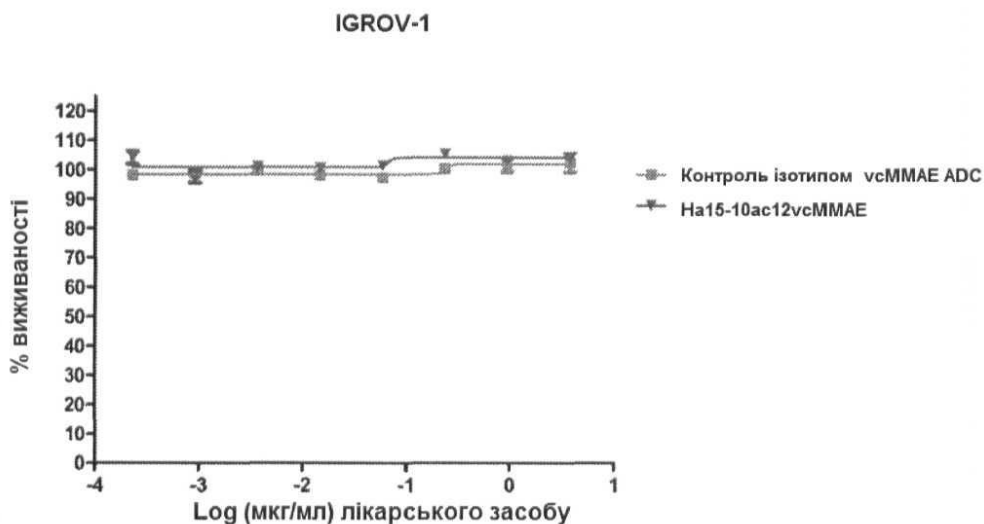
ФІГ. 13. Крива насичення для Ha15-10ac12vcMMAE із використанням клітин SW780



ФІГ. 14. Зв'язування Ha15-10ac12vcMMAE з клітинами UMUC-AGS15, SW780 та CHP-212 за допомогою FACS



ФІГ. 15А. Оцінювання цитотоксичності в умовах *in vitro* Ha15-10ac12vcMMAE на клітинах CHP-212 та IGROV-1



ФІГ. 15В. Оцінювання цитотоксичності в умовах *in vitro* Ha15-10ac12vcMMAE на клітинах CHP-212 та IGROV-1

Комп'ютерна верстка С. Чулій

Міністерство економічного розвитку і торгівлі України, вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601