



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120364** (13) **C2**
(51) МПК (2019.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/07 (2006.01)

A61P 35/00

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2016 11833**

(22) Дата подання заявки: **27.04.2015**

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: **25.11.2019**

(31) Номер попередньої
заявки відповідно до
Паризької конвенції: **14305620.8**

(32) Дата подання
попередньої заявки
відповідно до
Паризької конвенції: **25.04.2014**

(33) Код держави-учасниці
Паризької конвенції,
до якої подано
попередню заявку: **EP**

(41) Публікація відомостей
про заявку: **10.08.2017, Бюл.№ 15**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **25.11.2019, Бюл.№ 22**

(86) Номер та дата
подання міжнародної
заявки, поданої
відповідно до
Договору РСТ **PCT/EP2015/059045,
27.04.2015**

(72) Винахідник(и):

**Рілатт Айан (FR),
Перес Мішель (FR),
Гьотш Ліліан (FR),
Брусса Маттьйо (FR),
Бо-Ларвор Шарлотт (FR),
Хьов Жан-Франсуа (FR),
Шампйон Тьєррі (FR),
Робер Ален (FR)**

(73) Власник(и):

**ПЬЕР ФАБР МЕДІКАМЕНТ,
45, Place Abel Gance, F-92100 Boulogne-
Billancourt, France (FR)**

(74) Представник:

Новікова Лідія Аркадіївна, реєстр. №36

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

WO 2012142164 A1, 18.10.2012

WO 2010146059 A2, 23.12.2010

Development of potent monoclonal antibody
auristatin conjugates for cancer therapy /
Svetlana O. Doronina, Brian E. Toki, Michael
Y. Torgov et al. // Nature biotechnology. –
2003. – Vol. 21 (7). – P. 778-784

(54) КОН'ЮГАТ АНТИТІЛА ДО IGF-1R З ЛІКАРСЬКИМ ЗАСОБОМ

(57) Реферат:

Винахід стосується кон'югата антитіла з лікарським засобом, де антитіло здатне до зв'язування з IGF-1R. Також винахід стосується композиції, що містить даний кон'югат, та способу лікування IGF-1R-експресуючого раку у суб'єкта, що потребує цього.

UA 120364 C2

Даний винахід відноситься до кон'югата антитіла з лікарським засобом, здатного до зв'язування з IGF-1R. В одному аспекті винахід відноситься до кон'югата антитіла з лікарським засобом, що містить антитіло, здатне до зв'язування з IGF-1R, де антитіло кон'юговане з щонайменше одним лікарським засобом, вибраним з похідних доластатину 10 і ауристатинів.

Винахід також включає в себе спосіб лікування і застосування зазначеного кон'югата антитіла з лікарським засобом для лікування раку.

Попередній рівень техніки

Рецептор інсуліноподібного фактора росту 1, званий IGF-1R (або іноді IGF1R або IGF-IR) являє собою рецептор, що володіє активністю тирозинкінази, який має 70% гомології з рецептором інсуліну IR. IGF-1R являє собою глікопротеїн з молекулярною масою приблизно 350 000. Він являє собою гетеродимерний рецептор, кожна половина якого, пов'язана з іншою дисульфідними містками, складається з позаклітинної α -субодиниці і трансмембранної β -субодиниці. IGF-1R пов'язує IGF1 і IGF2 з дуже високою спорідненістю ($K_d \approx 1$ нМ), але в рівній мірі здатний до зв'язування з інсуліном зі спорідненістю в 100-1000 разів нижче. Навпаки, IR пов'язує інсулін з дуже високою спорідненістю, хоча IGF зв'язуються з рецептором інсуліну зі спорідненістю в 100 разів нижче. Тирозинкіназний домен IGF-1R і IR мають дуже високу гомологію послідовності, хоча зони більш слабкої гомології відповідно стосуються багатой цистеїном ділянки, розташованої на α -субодиниці і С-кінцевій частині β -субодиниці. Відмінності послідовності, які спостерігаються в α -субодиниці, розташовані в зоні зв'язування лігандів і, отже є джерелом відносних значень спорідненості IGF-1R і IR до факторів IGF та інсуліну відповідно. Результатом відмінностей в С-кінцевій ділянці β -субодиниці є розбіжність біохімічних шляхів передачі сигналу двох рецепторів; IGF-1R опосередковує мітогенні ефекти, диференціювання і антиапоптичні ефекти, тоді як в активацію IR, головним чином, залучені ефекти на рівні метаболічних біохімічних шляхів.

Цитоплазматичні тирозинкіназні білки активуються зв'язуванням ліганда з позаклітинним доменом рецептора. У активацію кіназ, в свою чергу, залучена стимуляція різних внутрішньоклітинних субстратів, що включають IRS-1, IRS-2, Shc і Grb 10. Два основних субстрати IGF-1R являють собою IRS і Shc, які опосередковують за рахунок активації численних подальших ефекторів більшість дій на ріст і диференціювання, пов'язаних з приєднанням IGF до цього рецептора. Доступність субстратів може, отже, визначати кінцеву біологічну дію, пов'язану з активацією IGF-1R. У разі переважання IRS-1 клітини схильні до проліферації і до трансформації. У разі домінування Shc клітини схильні до диференціювання. Мабуть, в дії відносно захисту проти апоптозу, головним чином, залучений шлях, який являє собою шлях фосфадилінозит-3-кіназ (PI 3-кіназ).

За останні десять років роль системи IGF в канцерогенезі стала предметом інтенсивного дослідження. За цим інтересом послідувало відкриття того факту, що на додаток до його мітогенних і антиапоптичних властивостей IGF-1R, мабуть, потрібно для встановлення і підтримання трансформованого фенотипу. Насправді чітко встановлено, що гіперекспресія або конститутивна активація IGF-1R в широкому ряді клітин веде до зростання клітин незалежно від підживлення середовищем без фетальної сироватки теляти і до утворення пухлин у безтимусних мишей. Ця властивість сама по собі не є унікальною властивістю, оскільки до трансформації клітин може вести широке розмаїття продуктів гіперекспресованих генів, що включають значне число рецепторів факторів росту. Однак критичним відкриттям, що чітко продемонструвало провідну роль, яку відіграє IGF-1R в трансформації, стала демонстрація того, що клітини IGF-1R-, в яких інактивований ген, кодує IGF-1R, повністю стійкі до трансформації різними агентами, які зазвичай здатні трансформувати клітини, такими як білок E5 вірусу бичачої папіломи, гіперекспресія EGFR або PDGFR, антиген T SV40, активований ras або комбінація цих двох останніх факторів.

IGF-1R експресується в широкому ряді пухлин і пухлинних ліній, і IGF ампліфікують пухлинний ріст за допомогою їх приєднання до IGF-1R. Інші аргументи на користь ролі IGF-1R в канцерогенезі отримані з досліджень з використанням мишиних моноклональних антитіл, спрямованих проти рецептора, або з використанням негативних домінантів IGF-1R. Дійсно, мишині моноклональні антитіла, спрямовані проти IGF-1R, інгібують проліферацію різних ліній клітин в культурі і ріст пухлинних клітин in vivo. Було показано, що негативний домінант IGF-1R, ймовірно, здатний інгібувати проліферацію пухлини.

Розпочато велику кількість проектів по розробці ізолюваних антитіл до IGF-1R для лікування форм раку. Проте, до цієї дати жоден з цих проектів не мав успіху, і жодного антитіла до IGF-1R немає в продажу.

Крім того, серія клінічних досліджень, в яких були задіяні антитіла до IGF-1R в комбінації з антитілами до рецептора епідермального фактора росту (EGFR) для націлювання на обидві

мішені EGFR і IGF-1R, не мала успіху, оскільки жодне з цих антитіл при силікозі не було здатне до лікування пацієнтів з мутацією гомолога вірусного онкогена щурячої саркоми Кірстена (KRAS).

Внаслідок цього IGF-1R в даний час не вважають значною мішенню, і при дослідженні потенційних терапевтичних антитіл IGF-1R більше не вважають такими, що представляють інтерес.

Крім того, також необхідно зазначити, що прагнення до створення антитіл до IGF-1R були зосереджені на ізольованих антитілах, тобто антитілах, корисних за рахунок своїх власних властивостей. У цьому сенсі IGF-1R вважають невідповідним як мішень для створення ADC, тобто кон'югата антитіла з лікарським засобом (званим «ADC»), оскільки IGF-1R описаний як мішень, також широко експресовану нормальними клітинами, включаючи кровоносні судини. У цьому сенсі можна відзначити, що найбільш нещодавно одержане антитіло до IGF-1R, тобто AVE1642, розробляється у вигляді ізольованого антитіла, не навантаженого лікарським засобом. Те ж саме вірно для інших антитіл IGF-1R, які в даний час знаходяться в розробці, і для всіх антитіл, які не мали успіху в клінічних дослідженнях.

В даному контексті винахід відноситься до ADC або до кон'югата і до його застосування для лікування раку, і більш конкретно для лікування форм раку, що експресують IGF-1R.

Кон'югати ADC поєднують зв'язуючу специфічність з активністю лікарських засобів, таких як, наприклад, цитотоксичні агенти. В технології, що пов'язана з розробкою моноклональних антитіл, в застосуванні більш ефективних лікарських засобів і конструюванням хімічних лінкерів для ковалентного зв'язування цих компонентів, в останні роки відбувся швидкий прогрес.

Застосування ADC дає можливість для локального доставлення лікарських засобів, введення яких у вигляді некон'югованих лікарських засобів може призводити в результаті до неприйнятних рівнів токсичності для нормальних клітин.

Іншими словами, їх застосування, таким чином, має на увазі максимальну ефективність при мінімальній токсичності. Спроби конструювання та очищення ADC зосереджені як на селективності антитіла, так і на механізмі дії лікарського засобу, властивості зв'язування лікарського засобу, співвідношення лікарський засіб/антитіло (навантаження лікарським засобом або drug/antibody ratio, DAR) і вивільнення лікарського засобу. Угрупування лікарського засобу можуть передавати свої цитотоксичні і цитостатичні впливи за допомогою механізмів, що включають зв'язування тубуліну, зв'язування ДНК, протеасом, порушення функції рибосом, синтезу білка та/або інгібування топоізомераз. Деякі цитотоксичні лікарські засоби схильні до інактивації або до меншої активності при кон'югації з антитілом великого розміру.

Необхідно окремо охарактеризувати кожне антитіло, сконструювати відповідний лінкер і ідентифікувати відповідний цитотоксичний агент, який зберігає свою активність при доставленні в пухлинні клітини. Необхідно враховувати антигенну цільність на ракової мішені, а також враховувати, чи експресують нормальні тканини цільовий антиген. Інші міркування включають: чи відбувається інтерналізація ADC при зв'язуванні мішені; чи переважний цитостатичний або цитотоксичний лікарський засіб при розгляді можливого впливу на нормальну тканину та/або типу та стадії раку, що підлягає лікуванню; і чи являє собою лінкер, з'єднуючий антитіло з корисним навантаженням лікарським засобом, розщеплюваним або нерозщеплюваним зв'язком. Крім того, відносно процесу майбутньої розробки сполуки відношення кон'югації антитіла з угрупуванням лікарського засобу має бути достатнім, і при цьому повинен бути відсутнім ризик для зв'язуючої активності антитіла та/або активності лікарського засобу, а фізико-хімічні властивості ADC не повинні зазнавати модифікацій, що призводять внаслідок до агрегації.

ADC являє собою комплексну біологічну молекулу, і труднощі, пов'язані з розробкою ефективного ADC, залишаються суттєвим питанням.

Суть винаходу

Даний винахід направлено на вирішення даного питання і відноситься до ADC наступної формули (I):

Ab-(L-D)_n

(I)

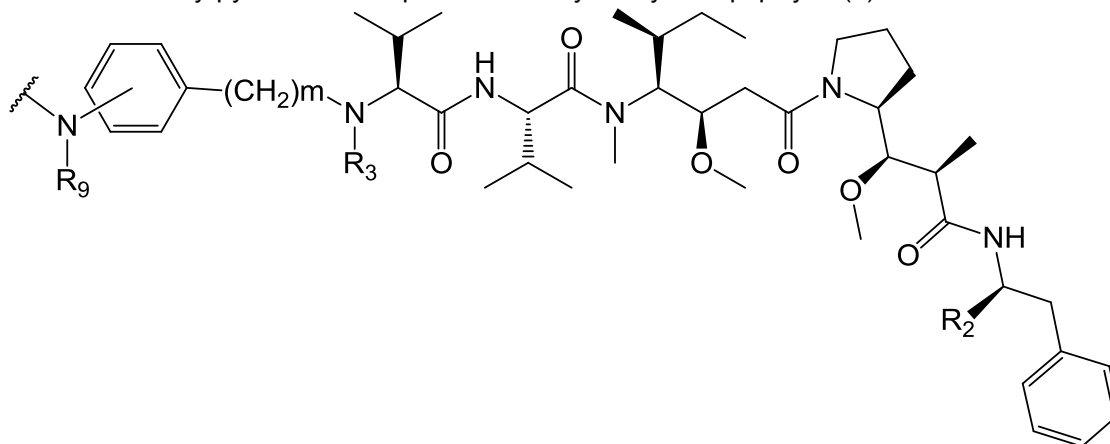
або її фармацевтично прийнятної солі,

де

Ab являє собою антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, здатні до зв'язування IGF-1R людини, вибрані з наступних:

i) антитіло, що містить три ділянки, які визначають комплементарність (CDR, від англ. complementarity-determining region), важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 1, 2 і 3, і три CDR легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 4, 5 і 6;

- ii) антитіло, конкуруюче за зв'язування з IGF-1R з антитілом i); i)
 iii) антитіло, що зв'язується з тим же епітопом, що i) антитіло i) до IGF-1R;
 L являє собою лінкер;
 D являє собою угруповання лікарського засобу наступної формули (II):



5

(II),

де:

R_2 являє собою $COOH$, $COOCH_3$ або тiazоліл;

R_3 являє собою H або (C_1-C_6) алкіл;

10 R_9 являє собою H або (C_1-C_6) алкіл;

m являє собою ціле число, що становить від 1 до 8;

хвилястою лінією показана точка приєднання до L; i

n дорівнює від 1 до 12.

Втілення винаходу відноситься до ADC, де Ab вибрано з:

15 а) антитіла, що містить три CDR важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 7, 2 i

3, i три CDR легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 9, 5 i 11;

b) антитіла, що містить три CDR важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 7, 2 i

3, i три CDR легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 10, 5 i 11;

c) антитіла, що містить три CDR важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 7, 2 i

20 3, i три CDR легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 9, 5 i 12; i

d) антитіла, що містить три CDR важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 8, 2 i

3, i три CDR легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 9, 5 i 11.

Втілення винаходу відноситься до ADC, де Ab вибрано з:

25 а) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 13, i три CDR легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 9, 5 i 11;

b) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 14, i три CDR легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 10, 5 i 11;

c) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 15, i три CDR легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 9, 5 i 12;

30 d) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 16, i три CDR легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 9, 5 i 11; i

e) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 17, i три CDR легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 9, 5 i 12.

Втілення винаходу відноситься до ADC, де Ab вибрано з:

35 а) антитіла, що містить варіабельний домен легкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 18, i три CDR важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 7, 2 i 3;

b) антитіла, що містить варіабельний домен легкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 19, i три CDR важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 7, 2 i 3;

40 c) антитіла, що містить варіабельний домен легкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 20, i три CDR важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 7, 2 i 3;

d) антитіла, що містить варіабельний домен легкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 21, i три CDR важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 8, 2 i 3; i

e) антитіла, що містить варіабельний домен легкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 22, i три CDR важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 7, 2 i 3.

45 У втіленні винахід відноситься до ADC, де Ab вибрано з:

i) антитіл 208F2, 212A11, 214F8, 219D6 i 213B10;

ii) антитіл, що конкурують за зв'язування з IGF-1R з антитілами i); i

iii) антитіл, що зв'язуються з тим же епітопом IGF-1R, що і антитіла i).

Втілення винаходу відноситься до ADC, де Ab являє собою гуманізоване антитіло.

Втілення винаходу відноситься до ADC, де Ab вибрано з:

антитіла, що містить:

5 а) важкий ланцюг, що має CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3 послідовностей SEQ ID NO 7, 2 і 3 відповідно, і FR1, FR2 і FR3, виділені з IGHV1-46*01 (SEQ ID NO 46) зародкової лінії людини, і FR4, виділений з IGHJ4*01 зародкової лінії людини (SEQ ID NO 48); і

10 б) легкий ланцюг, що має CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3 послідовностей SEQ ID NO 9, 5 і 11 відповідно, і FR1, FR2 і FR3, виділені з IGHV1-39*01 (SEQ ID NO 47) зародкової лінії людини, і FR4, виділений з IGKJ4*01 зародкової лінії людини (SEQ ID NO 49).

У втіленні винаходу Ab вибрано з:

а) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 33 або будь-яку послідовність, яка виявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 33, і три CDR легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 9, 5 і 11; і

15 б) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 34 або будь-яку послідовність, яка виявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 34, і три CDR легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 9, 5 і 11.

У втіленні винаходу Ab вибрано з:

20 а) антитіла, що містить варіабельний домен легкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 35 або будь-яку послідовність, яка виявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 35, і три CDR важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 7, 2 і 3; і

б) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 36 або будь-яку послідовність, яка виявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 36, і три CDR легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 7, 2 і 3.

25 У втіленні винаходу Ab вибрано з:

а) антитіла, що містить важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO 37 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 37, і легкий ланцюг послідовності SEQ ID NO 39 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 39, або такого, що складається з цих ланцюгів; і

30 б) антитіла, що містить важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO 38 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 38, і легкий ланцюг послідовності SEQ ID NO 40 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 40, або такого, що складається з цих ланцюгів.

У втіленні винаходу Ab вибрано з:

35 а) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність, вибрану з SEQ ID NO 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 і 80 або будь-якої послідовності, щонайменше на 80% ідентичної SEQ ID NO 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 або 80; і три CDR легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 9, 5 і 11;

40 б) антитіла, що містить варіабельний домен легкого ланцюга, який має послідовність, вибрану з SEQ ID NO 57 і 60 або будь-якої послідовності, щонайменше на 80% ідентичної SEQ ID NO 57 і 60; і три CDR важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 7, 2 і 3; і

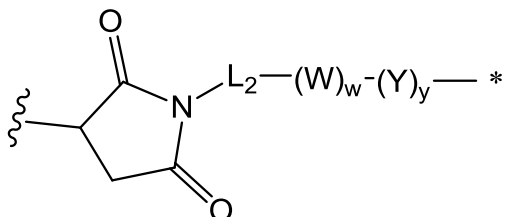
45 в) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність, вибрану з SEQ ID NO 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 і 80 або будь-якої послідовності, щонайменше на 80% ідентичної SEQ ID NO 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 або 80; і три CDR легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 57 або 60 або будь-яку послідовність, щонайменше на 80% ідентичну SEQ ID NO 57 або 60;

У втіленні винаходу Ab вибрано з:

50 а) важкого ланцюга, що має послідовність, вибрану з SEQ ID NO 58, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 і 81 або будь-якої послідовності, щонайменше на 80% ідентичної SEQ ID NO 58, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 або 81; і

б) легкого ланцюга, що має послідовність, вибрану з SEQ ID NO 59 і 61 або будь-якої послідовності, щонайменше на 80% ідентичної SEQ ID NO 59 або 61.

У втіленні винахід відноситься до ADC, де L являє собою лінкер наступної формули (III):



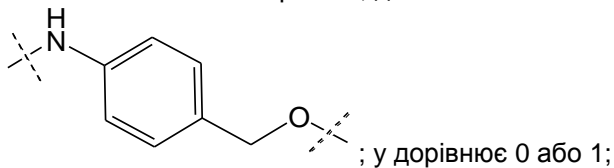
(III),

де

L_2 являє собою (C_4-C_{10}) циклоалкіл-карбоніл, (C_2-C_6) алкіл або (C_2-C_6) алкіл-карбоніл;

W являє собою амінокислотну ланку; w являє собою ціле число, що становить від 0 до 5;

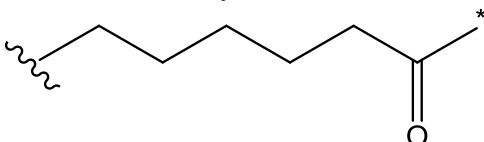
Y являє собою PAB-карбоніл, де PAB являє собою



зірочкою вказана точка приєднання до D; і

хвилястою лінією вказана точка приєднання до Ab.

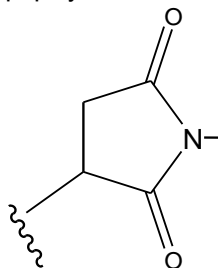
Втілення винаходу відноситься до ADC, де L_2 має наступну формулу (III):



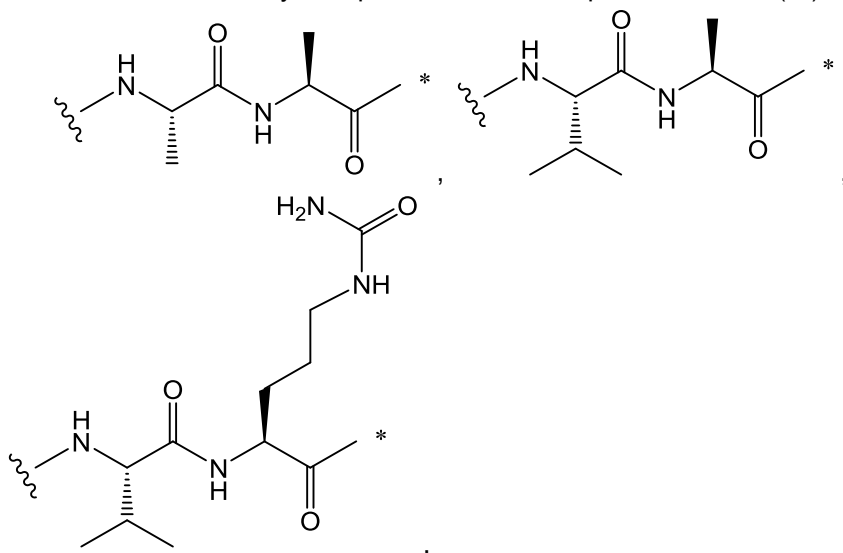
де

зірочкою вказана точка приєднання до $(W)_w$; і

хвилястою лінією вказана точка приєднання до атому азоту малеїмідного угруповання формули:



У втіленні винаходу w дорівнює 0, або w дорівнює 2, і тоді $(W)_w$ вибрана з:



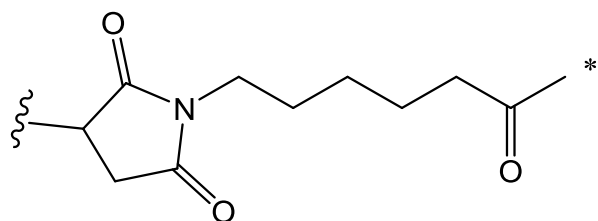
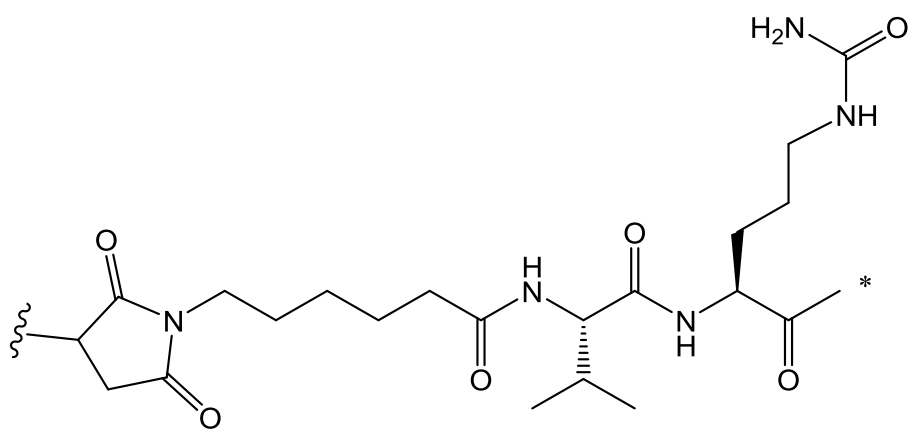
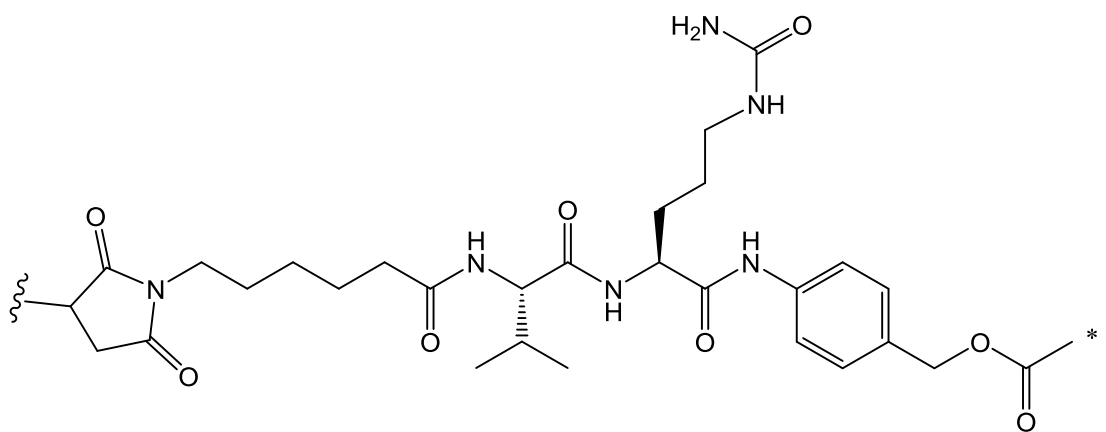
і

де

зірочкою вказана точка приєднання до $(Y)_y$; і

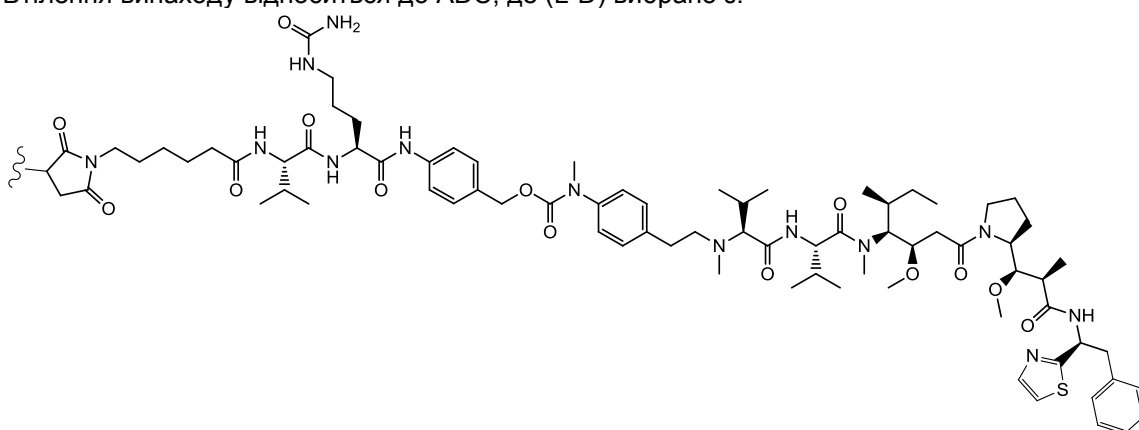
хвилястою лінією вказана точка приєднання до L_2 .

Втілення винаходу відноситься до ADC, де L вибраний з:

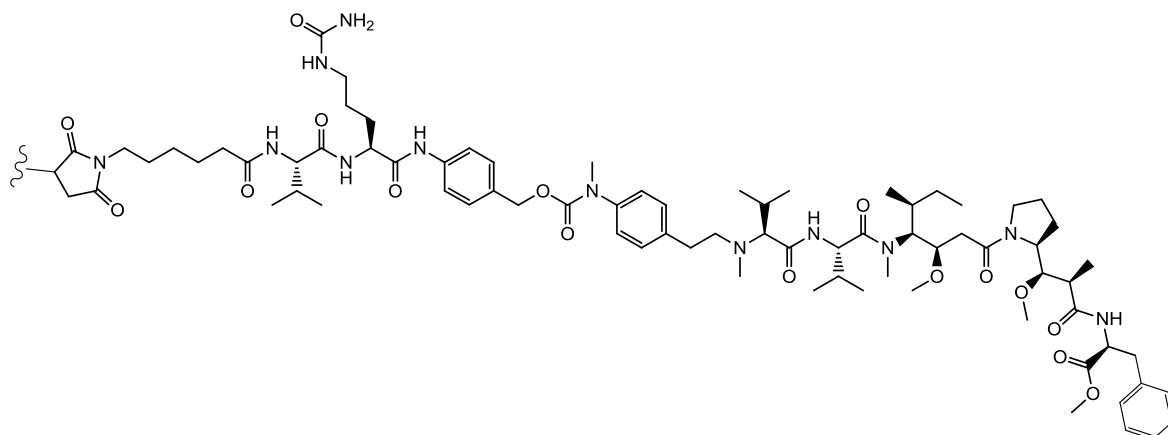


5 де зірочкою вказана точка приєднання до D, а хвилястою лінією вказана точка приєднання до Ab.

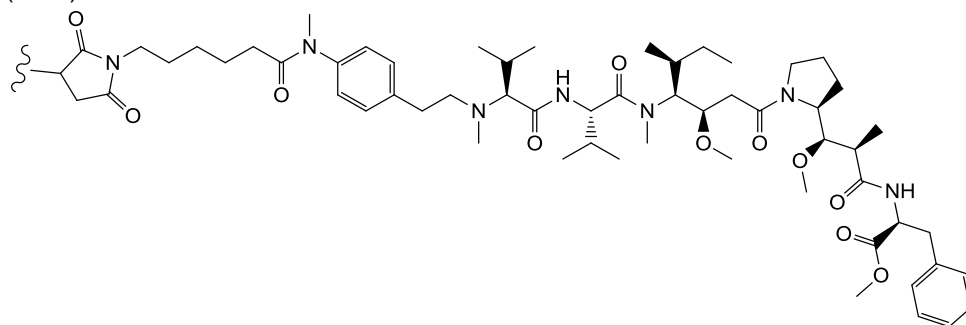
Втілення винаходу відноситься до ADC, де (L-D) вибрано з:



(E-11)

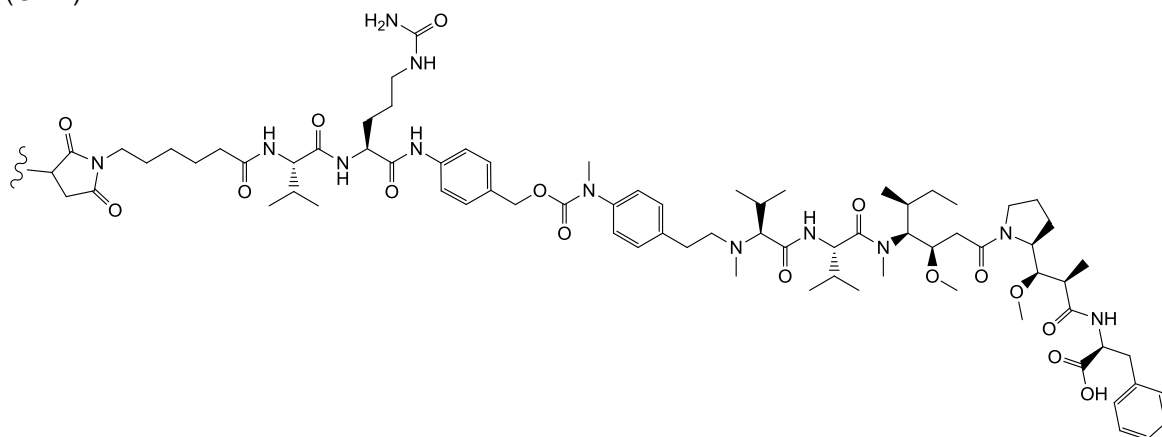


(E-12)

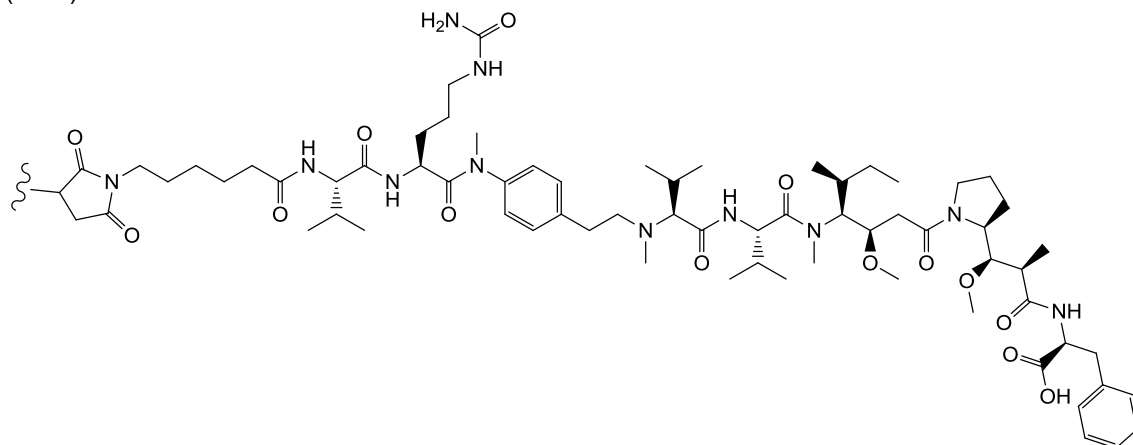


5

(G-12)

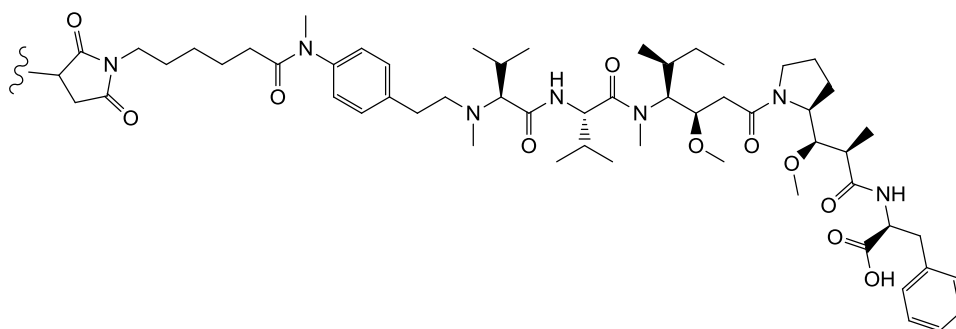


(E-13)

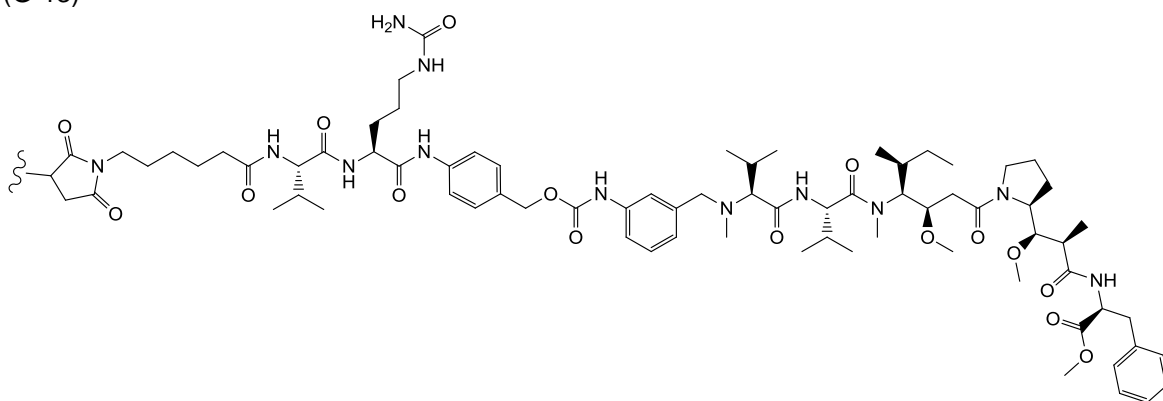


10

(F-13)

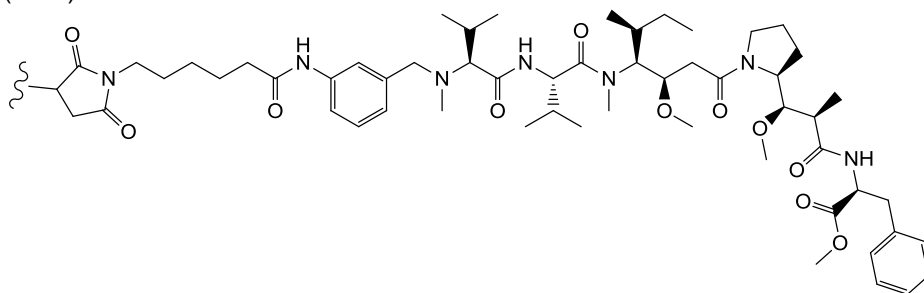


(G-13)

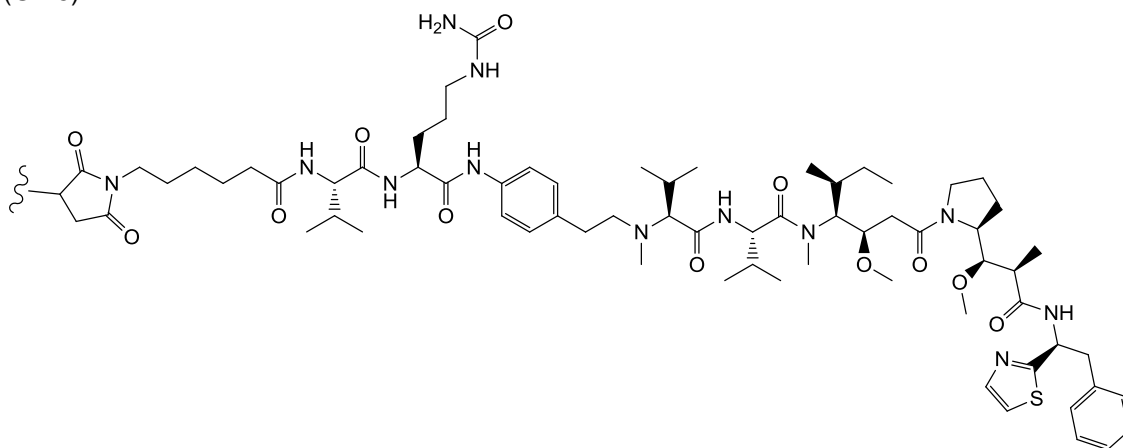


5

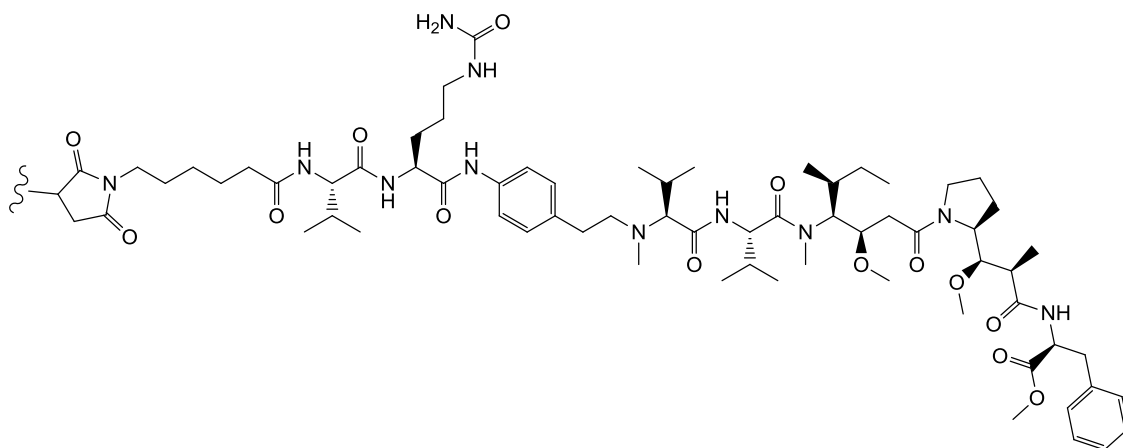
(E-15)



(G-15)

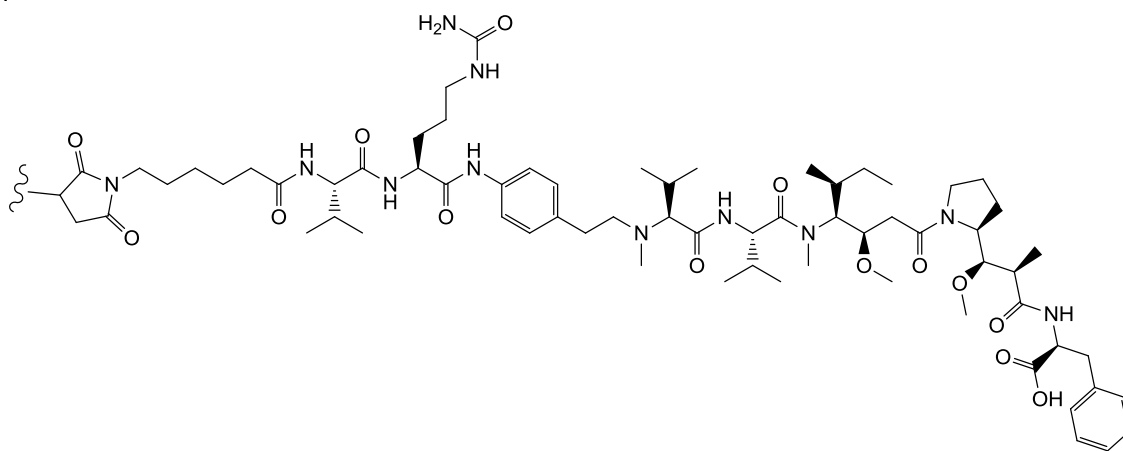


(F-61)



(F-62)

i

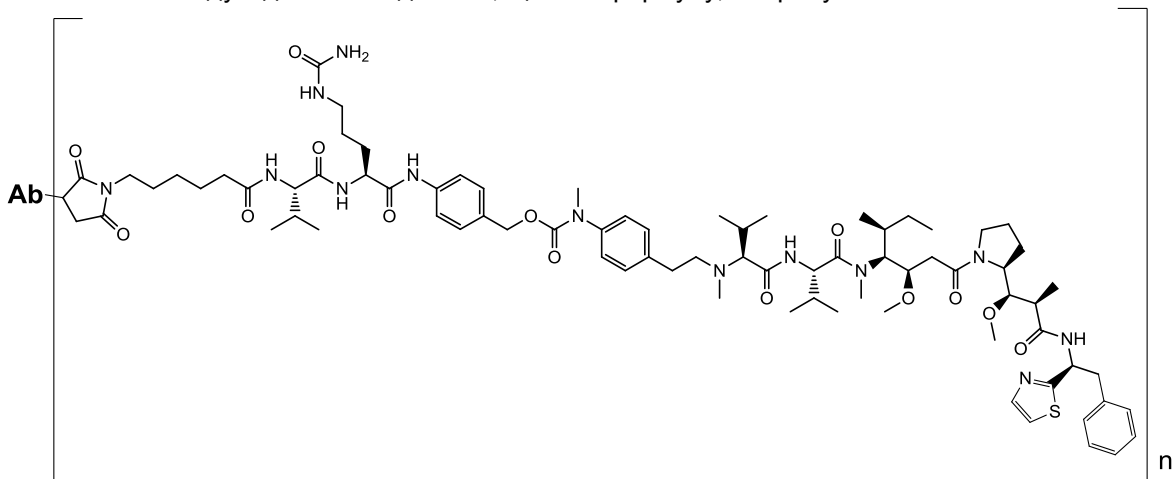


5

(F-63)

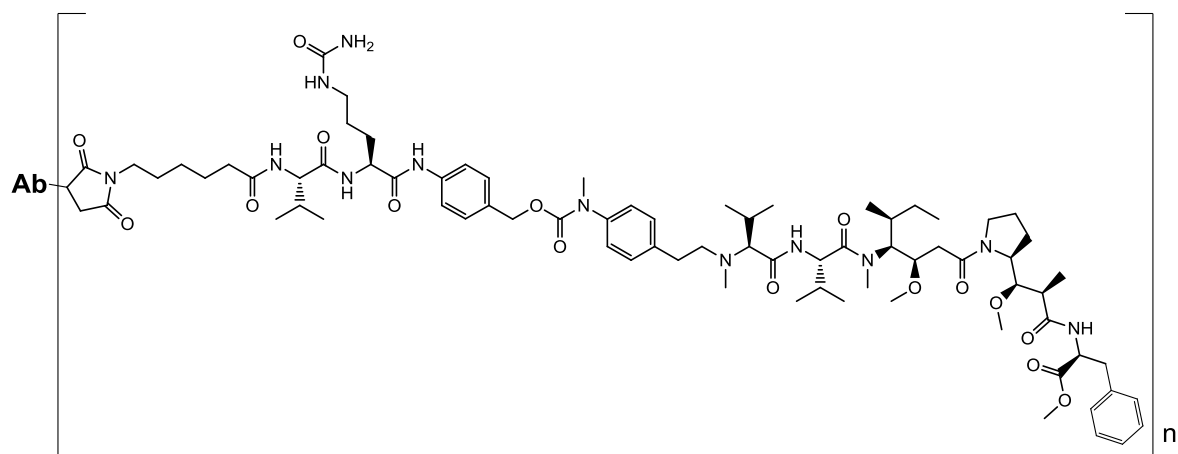
де хвилястою лінією вказана точка приєднання до Ab.

Втілення винаходу відноситься до ADC, що має формулу, вибрану з:

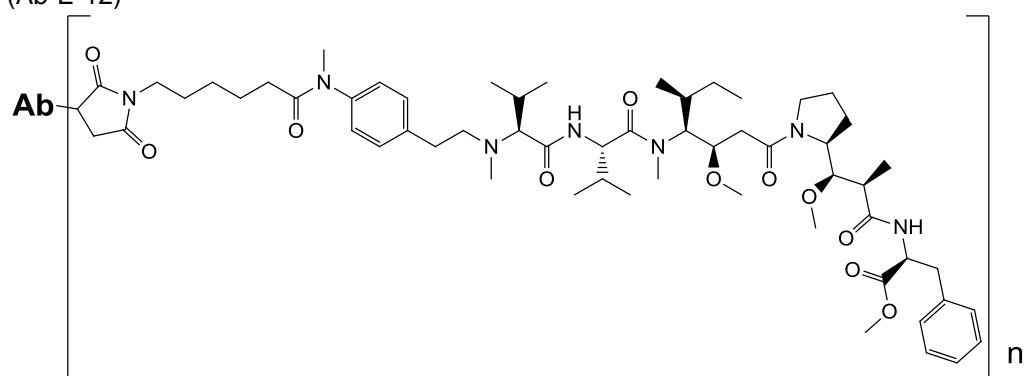


10

(Ab-E-11)

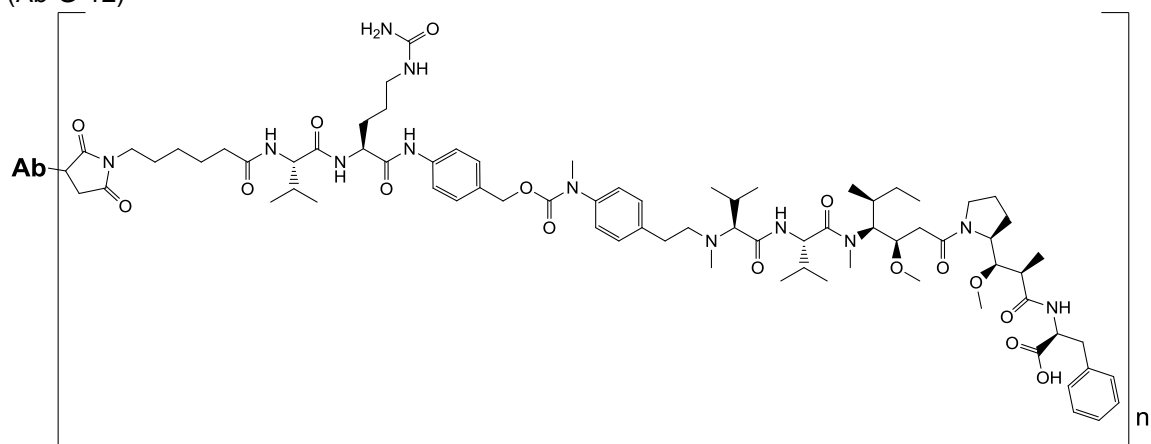


(Ab-E-12)

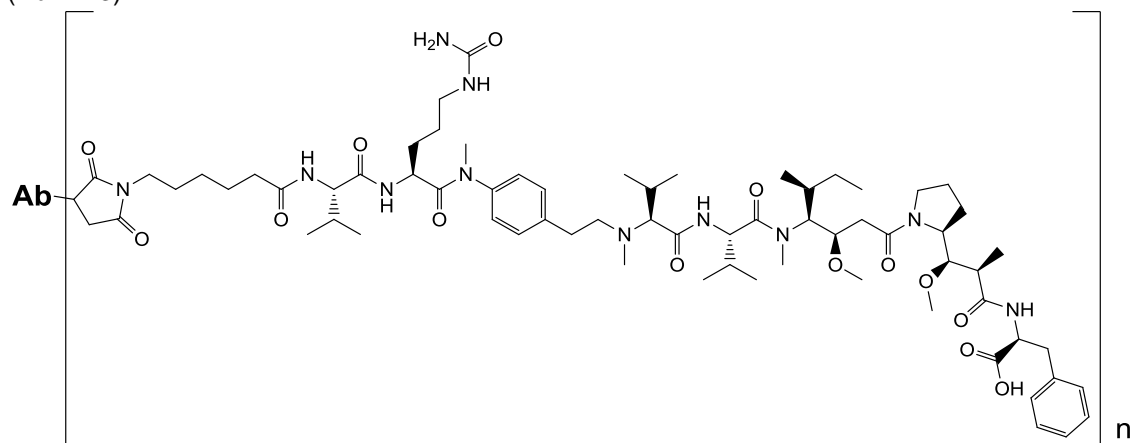


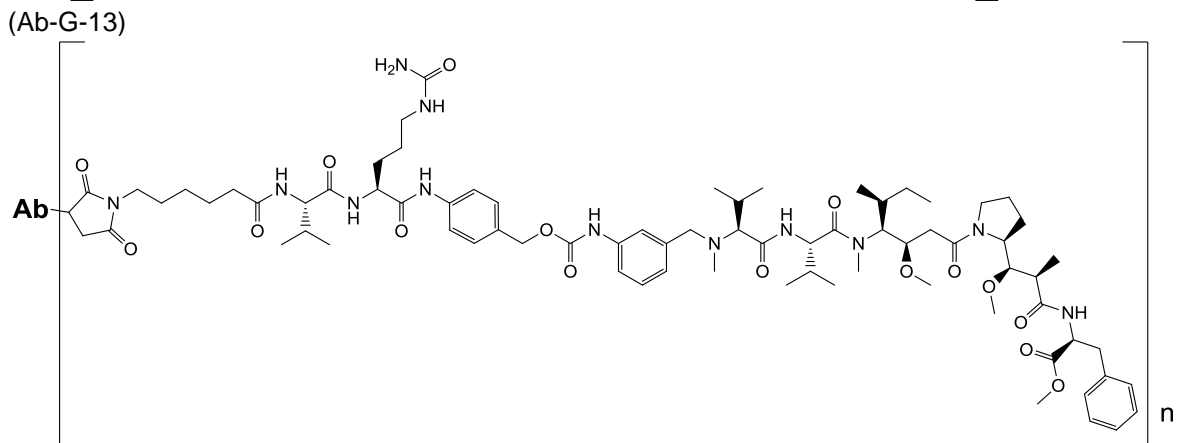
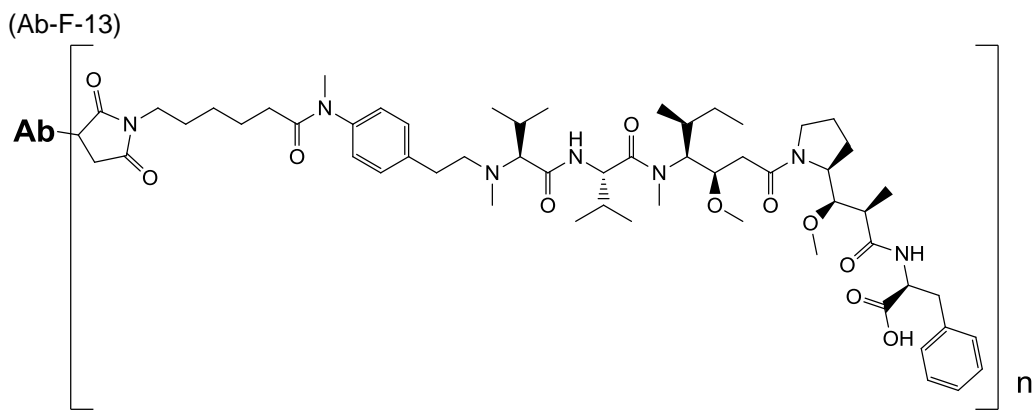
5

(Ab-G-12)

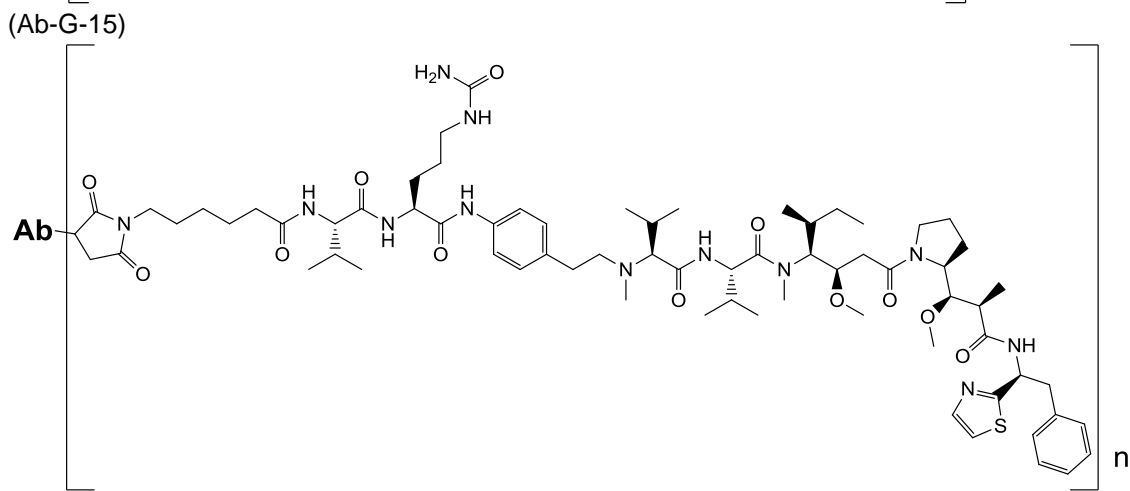
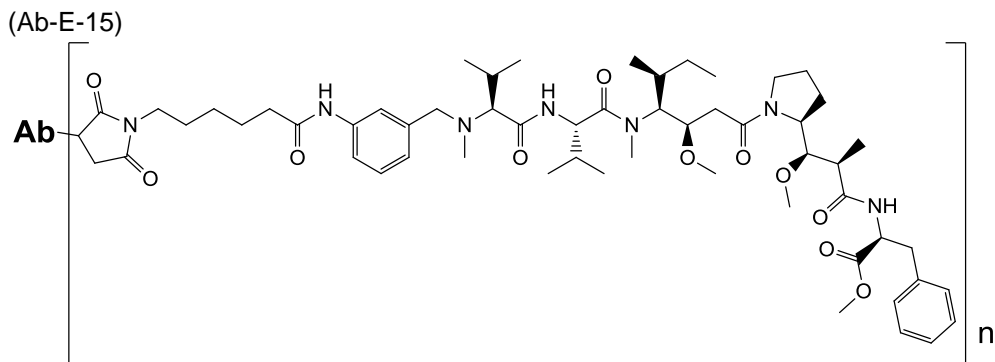


(Ab-E-13)

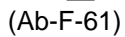


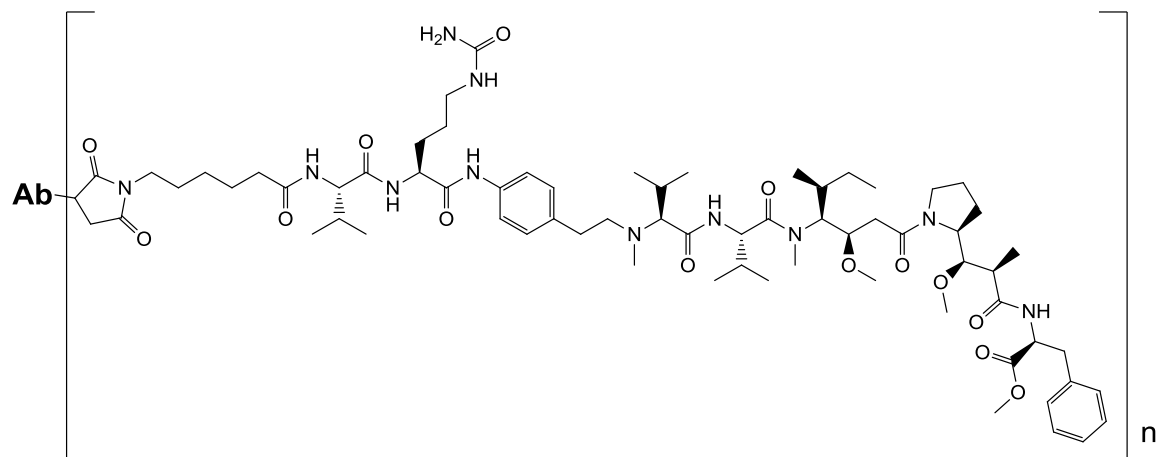


5

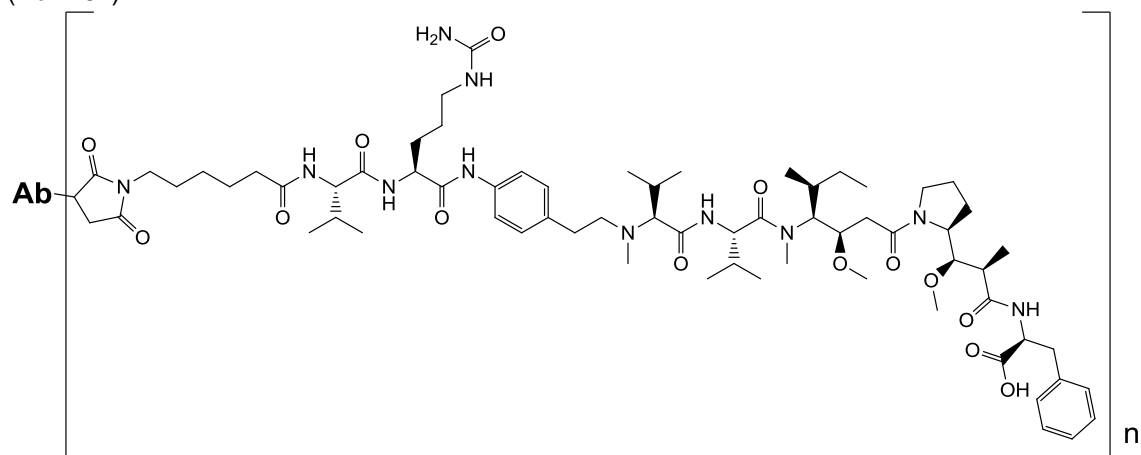


10





(Ab-F-62)



(Ab-F-63)

- 5 та їх фармацевтично прийнятних солей,
де Ab вибрано з групи, що складається з:
- i) антитіл 208F2, 212A11, 214F8, 219D6 і 213B10;
 - ii) антитіл, що конкурують за зв'язування з IGF-1R з антитілами i); і
 - iii) антитіл, що зв'язуються з тим же епітопом IGF-1R, що і антитіла i).
- 10 Втілення винаходу відноситься до ADC, де n дорівнює 2.
Втілення винаходу відноситься до ADC, де n дорівнює 4.
Втілення винаходу відноситься до ADC для застосування як лікарського засобу.
Втілення винаходу відноситься до композиції, що містить ADC, як описано вище.
Втілення винаходу відноситься до композиції, що додатково містить фармацевтично
- 15 прийнятний носій.

Втілення винаходу відноситься до композиції для застосування при лікуванні IGF-1R-експресуючого раку або форм раку, обумовлених IGF-1R.

IGF-1R-експресуючий рак або форми раку, обумовлені IGF-1R, включають пухлинні клітини, які експресують або володіють гіперекспресією повнорозмірного IGF-1R або його ділянки на їх поверхні.

Втілення винаходу відноситься до композиції, де IGF-1R-експресуючий рак являє собою рак, вибраний з карциноми молочної залози, ободової кишки, стравоходу, печінково-клітинного раку, раку шлунка, гліоми, раку легені, меланоми, остеосаркоми, раку яєчника, передміхурової залози, рабдоміосаркоми, раку нирки, щитовидної залози, ендометрія матки, мезотеліоми, плоскоклітинної карциноми порожнини рота і будь-якого лікарсько-стійкого раку.

Втілення винаходу відноситься до способу лікування IGF-1R-експресуючого раку у суб'єкта, що потребує цього, що включає введення суб'єкту ефективної кількості щонайменше одного кон'югата антитіла з лікарським засобом або композиції відповідно до винаходу.

Втілення винаходу відноситься до набору, який містить щонайменше i) кон'югат антитіла з лікарським засобом та/або композицію, як описано вище, та ii) шприц, флакон або ампулу, в які поміщають кон'югат антитіла з лікарським засобом та/або композицію.

Докладний опис винаходу

I – Антитіло (Ab)

Терміни «антитіло», «антитіла», «ab», «Ab», «MAb» або «імуноглобулін» використовуються як взаємозамінні в найширшому сенсі і включають моноклональні антитіла, ізольовані, сконструйовані методами генної інженерії або рекомбінантні антитіла (наприклад, повнорозмірні або інтактні моноклональні антитіла), поліклональні антитіла, полівалентні антитіла або

5 мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла), а також їх фрагмент антитіла за умови проявлення ними бажаної біологічної активності.

В одному втіленні винаходу антитіло ADC за винаходом складається з рекомбінантного антитіла. Термін «рекомбінантне антитіло» відноситься до антитіла, одержаного в результаті експресії рекомбінантної ДНК всередині живих клітин. Рекомбінантне антитіло ADC за

10 винаходом одержують шляхом використання лабораторних методик генетичної рекомбінації, добре відомих фахівцям в даній області техніки, що дозволяють створити послідовності ДНК, які не виявляються в живих організмах.

В іншому втіленні винаходу антитіло ADC за винаходом складається з хімічно синтезованого антитіла.

15 Більш конкретно така молекула складається з глікопротеїну, що містить щонайменше два важких (H) ланцюги і два легких (L) ланцюги, з'єднані один з одним дисульфідними зв'язками. Кожний важкий ланцюг містить варіабельну область (або домен) (в даному документі скорочену як HCVR або VH) і константну область важкого ланцюга. Константна область важкого ланцюга містить три домени, CH1, CH2 і CH3. Кожний легкий ланцюг містить варіабельну область (в

20 даному документі скорочену як LCVR або VL) і константну область легкого ланцюга. Константна область легкого ланцюга містить один домен, CL. Області VH і VL можуть бути додатково підрозділені на області гіперваріабельності, звані ділянками, що визначають компліментарність (complementarity determining regions, CDR), розташовані між більш консервативними областями, звані каркасними областями (framework regions, FR). Кожна VH і VL складається з трьох CDR і чотирьох FR, розташованих від аміно-кінця до карбокси-кінця в такому порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Варіабельні області важкого і легкого ланцюгів містять зв'язуючий

25 домен, який взаємодіє з антигеном. Константні області антитіл можуть опосередковувати зв'язування імуноглобуліну з тканинами або факторами хазяїна, включаючи різні клітини імунної системи (наприклад, ефекторні клітини) і перший компонент (C1q) класичної системи

30 комплементу.

Під «антигензв'язуючим фрагментом» або «IGF-1R-зв'язуючим фрагментом» антитіла ADC відповідно до винаходу мають на увазі вказівку на будь-який пептид, поліпептид або білок, який зберігає здатність до зв'язування з мішенню (також в цілому званої антигеном) антитіла.

У втіленні винаходу такі «антигензв'язуючі фрагменти» вибрані з групи, що складається з

35 фрагментів або діатіл Fv, scFv (sc для одного ланцюга), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc або будь-якого фрагмента, період напіввиведення якого збільшений в результаті хімічної модифікації, такий як приєднання полі(алкілен)гліколю, такого як полі(етилен)гліколь («ПЕГілування») (пегіловані фрагменти, звані Fv-PEG, scFv-PEG, Fab-PEG, F(ab')₂-PEG або Fab'-PEG) («PEG» означає полі(етилен)гліколь), або в результаті включення в ліпосому, при цьому дані фрагменти

40 мають щонайменше одну з ділянок CDR, характерних для антитіла відповідно до винаходу. Переважні «антигензв'язуючі фрагменти» складаються з часткової послідовності важкого або легкого варіабельного ланцюга антитіла, з якого вони виділені, або містять цю послідовність, де дана часткова послідовність достатня для збереження такої ж специфічності зв'язування, як у антитіла, з якого вона походить, і достатньої спорідненості по відношенню до мішені, переважно

45 щонайменше рівного 1/100, більш переважно щонайменше 1/10, від спорідненості антитіла, від якого вона походить. Більш переважно «антигензв'язуючі фрагменти» складаються щонайменше з трьох CDR CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3 важкого варіабельного ланцюга і трьох CDR CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3 легкого варіабельного ланцюга антитіла, від якого вони виділені, або містять ці ділянки.

50 Терміни «зв'язуючий», «зв'язує» і тому подібне мають на увазі, що антитіло або будь-який його антигензв'язуючий фрагмент утворює комплекс з антигеном, який є відносно стабільним в фізіологічних умовах. Специфічне зв'язування може характеризуватися рівноважною константою дисоціації щонайменше приблизно 1×10^{-6} М. Способи визначення, чи зв'язуються

55 дві молекули, добре відомі в даній області техніки і включають, наприклад, рівноважний діаліз, поверхневий плазмонний резонанс, кількісні аналізи з радіоактивною міткою і таке інше. Щоб уникнути сумнівів, це не означає, що антитіло не може зв'язуватися або взаємодіяти на низькому рівні з іншим антигеном. Проте, як втілення, дане антитіло зв'язується тільки з даним антигеном.

Як використовують в даному описі, вираз «антитіло до IGF-1R» слід інтерпретувати як

60 аналогічний вислів «антитіло проти IGF-1R» і означає антитіло, здатне до зв'язування з IGF-1R.

В одному втіленні даного винаходу епітоп антитіла переважно локалізований в позаклітинному домені IGF-1R людини (також званому IGF-1R ECD).

У конкретному втіленні даного винаходу антитіло або будь-який його антигензв'язуючий фрагмент здатний до зв'язування з IGF-1R з EC_{50} , що становить від 10×10^{-10} до 1×10^{-10} , і більш переважно, від 8×10^{-10} до 2×10^{-10} .

Термін «половинна максимальна ефективна концентрація» (EC_{50}) відповідає концентрації лікарського засобу, антитіла або токсичного агента, яка індукує відповідь, що знаходиться між вихідним рівнем і максимумом, після деякого заданого часу впливу. Її часто використовують як міру активності лікарського засобу. EC_{50} зростаючої кривої доза-відповідь, таким чином, являє собою концентрацію сполуки, де спостерігається 50% її максимального ефекту. EC_{50} квантової кривої доза-відповідь являє собою концентрацію сполуки, де 50% популяції проявляє відповідь після заданої тривалості впливу. Міри концентрації в характерному випадку слідує сигмоїдальній кривій з швидким зростанням протягом щодо незначної зміни концентрації. Це може бути визначено математично шляхом побудови кращої емпіричної кривої.

В якості переважного втілення EC_{50} , визначена в даному винаході, характеризує активність зв'язування антитіла з IGF-1R ECD, виявленим на поверхні пухлинних клітин людини. Параметр EC_{50} визначають з використанням аналізу сортування флуоресцентно-активованих клітин (FACS). Параметр EC_{50} відображає концентрацію антитіла, для якої одержують 50% максимального зв'язування на IGF-1R людини, експресованого на пухлинних клітинах людини. Кожне значення EC_{50} було обчислено як середня точка кривої доза-відповідь з використанням програми відповідності чотирьохпараметричної кривої регресії (програма забезпечення Prism). Цей параметр вибраний як репрезентативний параметр фізіологічних/патологічних умов.

Термін «епітоп» являє собою ділянку антигену, що зв'язується антитілом. Епітопи можуть бути визначені як структурні чи функціональні. Функціональні епітопи в цілому являють собою підгрупу структурних епітопів і мають залишки, які вносять безпосередній внесок в спорідненість взаємодії. Епітопи можуть бути також конформаційними, тобто складаються з нелінійних амінокислот. У деяких втіленнях винаходу епітопи можуть включати детермінанти, що представляють собою хімічно активні поверхневі угруповання молекул, таких як амінокислоти, бічні ланцюги цукрів, фосфорильні групи або сульфонільні групи, і в деяких втіленнях можуть володіти специфічними тривимірними структурними характеристиками та/або специфічними характеристиками заряду.

Конкуренція за зв'язування з IGF-1R може бути визначена будь-якими способами або методами, відомими фахівцям в даній області техніки, такими як, без обмежень, радіоактивність, Віасорге, твердофазний імуоферментний аналіз (ІФА), проточна цитометрія і т.д. Під «конкуруючим за зв'язування з IGF-1R» мають на увазі конкуренцію щонайменше 20%, переважно щонайменше 50% і більш переважно щонайменше 70%.

Визначення зв'язування з тим же епітопом можна здійснювати будь-якими способами або методами, відомими фахівцям в даній області техніки, такими як, без обмежень, радіоактивність, Віасорге, ІФА, проточна цитометрія і т.д. Під «такими, що зв'язуються з тим же епітопом IGF-1R» мають на увазі конкуренцію щонайменше 20%, переважно щонайменше 50% і більш переважно щонайменше 70%.

Як згадано вище, і на противагу загальним відомостям, даний винахід зосереджено на специфічних антитілах до IGF-1R, що представляють високу здатність до інтерналізації після зв'язування IGF-1R. При використанні в цьому документі антитіло, яке «інтерналізується» або «інтерналізовано» (ці два вирази аналогічні), являє собою антитіло, яке поглинається клітиною (що означає «входить в клітину») після зв'язування з IGF-1R на клітині ссавця. Таке антитіло становить інтерес в складі ADC, оскільки воно адресує або направляє пов'язаний з ним цитотоксичний агент в ракові клітини-мішені. Відразу після інтерналізації цитотоксичний агент ініціює загибель ракової клітини.

Несподівано виявлено, що всі антитіла відповідно до винаходу презентують одні й ті ж послідовності CDR-H2, CDR-H3 і CDR-L2, а інші 3 CDR розрізняються. Це спостереження, мабуть, є органічним, оскільки становить частину загальнодоступних відомостей про те, що стосовно зв'язуючої специфічності антитіла CDR-H3 описаний як найважливіша ділянка, в максимальному ступені задіяний в розпізнаванні епітопу.

Важливими аспектами успіху терапії ADC вважають специфічність до антигену-мішені і інтерналізацію комплексів антиген-антитіло в ракові клітини. Очевидно, що не інтерналізуючі антигени менш ефективні для доставлення цитотоксичних агентів, ніж інтерналізуючі антигени. Процеси інтерналізації розрізняються серед антигенів і залежать від безлічі параметрів, на які можуть впливати антитіла.

В ADC цитотоксичний агент надає цитотоксичну активність, а використовуване антитіло

відповідально за специфічність до ракових клітин, а також використовується в якості вектора всередині клітин для вірного направлення цитотоксичності. Таким чином, для вдосконалення ADC антитіло може проявляти високу здатність до інтерналізації в ракові клітини-мішені. Ефективність опосередкованої антитілом інтерналізації істотно відрізняється в залежності від епітопа-мішені. Для вибору антитіл, що активно інтерналізуються IGF-1R, необхідні різні експериментальні дані досліджень не тільки понижувальної регуляції IGF-1R, але також подальшої інтерналізації антитіла до IGF-1R в клітині.

В одному втіленні винаходу інтерналізацію антитіла ADC відповідно до винаходу можна оцінювати за допомогою імуофлуоресценції або FACS (проточної цитометрії) (приклади якої наведено далі в даному документі), або будь-якого способу або процесу, відомого фахівцям в даній області техніки, специфічного для механізму інтерналізації. У переважному втіленні винаходу антитіло ADC відповідно до винаходу може індукувати інтерналізацію після зв'язування з IGF-1R щонайменше на 30%, переважно 50% і більш переважно 80%.

Комплекс IGF-1R/антитіло інтерналізується після зв'язування антитіла з ECD IGF-1R та індукує зменшення кількості IGF-1R на поверхні клітин. Це зменшення можна визначити кількісно будь-яким способом, відомим фахівцям в даній області техніки, що не обмежуються прикладами в яких є вестерн-блотинг, FACS та імуофлуоресценція.

В одному втіленні винаходу це зменшення, відображуюче, таким чином, інтерналізацію, можна переважно вимірювати за допомогою FACS і висловлювати у вигляді різниці або дельта між середньою інтенсивністю флуоресценції (Mean Fluorescence Intensity, MFI), яка вимірюється при 4 °C, і MFI, виміряної при 37 °C, після 4 годин інкубації з антитілом.

В якості небмежувального прикладу цю різницю дельта визначають на основі MFI, отриманих на необроблених клітинах і на клітинах, оброблених антитілом, використовуючи i) клітини MCF7 раку молочної залози після 4-годинного періоду інкубації з антитілом, описаним в цьому документі, та ii) друге антитіло, мічене барвником Alexa488. Даний параметр визначають шляхом обчислення за такою формулою: $\Delta(MFI_{4^{\circ}C} - MFI_{37^{\circ}C})$.

Ця різниця між MFI відображає знижувальну регуляцію IGF-1R, оскільки MFI пропорційні IGF-1R, експресованим на клітинній поверхні.

У переважному аспекті антитіла складаються з антитіл, що ініціюють $\Delta(MFI_{4^{\circ}C} - MFI_{37^{\circ}C})$ на MCF-7 щонайменше 280, переважно щонайменше 400.

Більш детально, вищезгадану різницю дельта можна вимірювати в такий спосіб, який повинен розглядатися як ілюстративний і необмежувальний приклад:

а) Обробка та інкубація пухлинних клітин, що представляють інтерес, з антитілом за винаходом або в холодному (4 °C), або в теплому (37 °C) повному культуральному середовищі;

б) Обробка оброблених клітин стадії а) і паралельно - необроблених клітин другим антитілом;

с) Вимірювання MFI (репрезентативної для кількості IGF-1R, присутнього на поверхні) для оброблених та необроблених клітин за допомогою другого міченого антитіла, здатного до зв'язування з антитілом даного винаходу; і

д) Обчислення різниці дельта шляхом вирахування MFI, отриманої з обробленими клітинами, з MFI, отриманої з необробленими клітинами.

На підставі даного значення дельта MFI можна визначити відсоток інтерналізації як:

$$100 \times (MFI_{4^{\circ}C} - MFI_{37^{\circ}C}) / MFI_{4^{\circ}C}$$

Відсоток інтерналізації антитіл ADC відповідно до винаходу, присутніх переважно на клітинах MCF7, становив від 50% до 99%, від 70% до 90%, переважно від 75% до 87%.

Особлива перевага антитіл, описаних в даному документі, заснована на швидкості їх інтерналізації.

Загальновідомо, що для ADC бажано, щоб використовувані антитіла виявляли високу швидкість інтерналізації, переважно в межах 24 годин від введення антитіла і більш переважно в межах 12 годин, і навіть більш переважно в межах 6 годин.

В даному винаході швидкість інтерналізації, також званої зменшенням кількості антитіл, пов'язаних з клітинної поверхнею, або розпадом антитіл клітинної поверхні, виражена у вигляді $t_{1/2}$ (час напівжиття) і відповідає часу, необхідному для отримання зменшення MFI на 50% Δ (даний аспект буде чітко зрозумілий при розгляді наведених нижче прикладів).

Особлива перевага полягає в тому, що антитіла ADC за винаходом мають $t_{1/2}$, що становить від 5 до 25 хвилин і переважно від 10 і 20 хвилин.

Конкретне втілення винаходу відноситься до ADC, де антитіло Ab містить три ділянки CDR важкого ланцюга, з яких CDR-H2 має послідовність SEQ ID NO 2 і CDR-H3 - послідовність SEQ ID NO 3, і три ділянки CDR легкого ланцюга, з яких CDR-L2 має послідовність SEQ ID NO 5.

Конкретне втілення винаходу відноситься до ADC, де антитіло Ab містить три CDR важкого

ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 1, 2 і 3, і три CDR легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 4, 5 і 6.

Одне втілення ADC включає антитіло, що містить три CDR важкого ланцюга, що містять послідовності SEQ ID NO 1, 2 і 3 або будь-яку послідовність, яка виявляє щонайменше 80%, переважно 85%, 90%, 95% і 98% ідентичність SEQ ID NO 1, 2 або 3, або таких, складаються з цих послідовностей; і три CDR легкого ланцюга, що містять послідовності SEQ ID NO 4, 5 і 6 або будь-яку послідовність, яка виявляє щонайменше 80%, переважно 85%, 90%, 95% і 98% ідентичність SEQ ID NO 4, 5 або 6, або таких, що складаються з цих послідовностей.

В іншому втіленні винаходу антитіло або будь-який його антигензв'язуючий фрагмент містить три CDR важкого ланцюга, що містять послідовності SEQ ID NO 1, 2 і 3, і три CDR легкого ланцюга, що містять послідовності SEQ ID NO 4, 5 і 6.

Для порівняння варіабельних доменів незалежно від рецептора антигену, типу ланцюга або виду визначена унікальна нумерація IMGT [Lefranc M.-P., Immunology Today 18, 509 (1997) / Lefranc M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999) / Lefranc, M.-P., Pommié, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V. and Lefranc, Dev. Comp. Immunol., 27, 55-77 (2003)]. У цій унікальній нумерації IMGT консервативні амінокислоти завжди мають одне і те ж положення, наприклад цистеїн 23 (1st-CYS), триптофан 41 (CONSERVED-TRP), гідрофобна амінокислота 89, цистеїн 104 (2nd-CYS), фенілаланін або триптофан 118 (J-PHE або J-TRP). Унікальна нумерація IMGT забезпечує стандартизоване розмежування каркасних областей (FR1-IMGT: положення з 1 по 26, FR2-IMGT: з 39 по 55, FR3-IMGT: з 66 по 104 і FR4-IMGT: з 118 по 128) і ділянок, що визначають комплементарність: CDR1-IMGT: з 27 по 38, CDR2-IMGT: з 56 по 65 і CDR3-IMGT: з 105 по 117. Оскільки гепи являють собою незайняті положення, довжини CDR-IMGT (показані між дужками і розділені крапками, наприклад, [8.8.13]) стають критичною інформацією. Унікальну нумерацію IMGT використовують в графічних зображеннях 2D, позначених як IMGT Colliers de Perles [Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., Immunogenetics, 53, 857-883 (2002) / Kaas, Q. and Lefranc, M.-P., Current Bioinformatics, 2, 21-30 (2007)], і в структурах 3D в IMGT/3Dstructure-DB [Kaas, Q., Ruiz, M. and Lefranc, M.-P., T cell receptor and MHC structural data. Nucl. Acids. Res., 32, D208-D210 (2004)].

Повинно бути зрозуміло, що за відсутності суперечливих вказівок в даному описі ділянки, що визначають комплементарність, або CDR, означають гіперваріабельні ділянки важких і легких ланцюгів імуноглобулінів, як визначено відповідно до системи нумерації IMGT.

Проте, CDR також можна визначити відповідно до системи нумерації Кебота (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, і більш пізні видання). Існує три ділянки CDR важкого ланцюга і три ділянки CDR легкого ланцюга. У цьому документі терміни «ділянка CDR» і «ділянки CDR» використовують для зазначення залежно від випадку одної, декількох або навіть всіх ділянок, що містять більшість амінокислотних залишків, відповідальних за зв'язувальну спорідненість антитіла до антигену, що розпізнається, або епітопів. З метою спрощення читання даного документа CDR за Кеботом не визначені. Проте, фахівцю в даній галузі техніки повинно бути очевидно використання визначення CDR відповідно до IMGT для визначення CDR за Кеботом.

У сенсі, що відноситься до даного винаходу, «ідентичність» або «відсоток ідентичності» між двома послідовностями нуклеїнових кислот або амінокислот означає відсоток ідентичних нуклеотидів або амінокислотних залишків між двома порівнюваними послідовностями, отриманий після оптимального вирівнювання, при цьому даний відсоток є виключно статистичним, і відмінності між двома послідовностями розподілені випадковим чином по всій їх довжині. Порівняння двох нуклеїново-кислотних або амінокислотних послідовностей традиційно проводять шляхом порівняння послідовностей після того, як вони оптимально вирівняні, при цьому порівняння можна проводити посегментно або з використанням «вікна вирівнювання». Оптимальне вирівнювання послідовностей для порівняння можна проводити, крім порівняння вручну, за допомогою алгоритму локальної гомології Smith and Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], за допомогою алгоритму локальної гомології Needleman and Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], методом пошуку подібності Pearson and Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444] або за допомогою комп'ютерних програм, що використовують ці алгоритми (GAP, BESTFIT, FASTA і TFASTA в пакеті програм Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, або за допомогою програм порівняння BLAST NR або BLAST P).

Відсоток ідентичності обчислюють шляхом визначення числа положень, в яких амінокислота, нуклеотид або залишок ідентичні між двома послідовностями, переважно між двома повнорозмірними послідовностями, ділення числа ідентичних положень на загальне число положень у вікні вирівнювання і множення результату на 100 з отриманням відсотка

ідентичності між двома послідовностями.

Наприклад, можна використовувати програму BLAST "BLAST 2 sequences" (Tatusova et al., "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol., 1999, Lett. 174: 247-250), доступну на сайті <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, з параметрами за замовчуванням (конкретно для параметрів: «штраф на відкриття гепа»: 5 і «штраф на подовження гепа»: 2; вибрана матриця являє собою, наприклад, матрицю «BLOSUM 62», запропоновану програмою); відсоток ідентичності між двома порівнюваними послідовностями обчислюється безпосередньо програмою.

Для амінокислотної послідовності, яка проявляє щонайменше 80%, переважно 85%, 90%, 95% і 98% ідентичність еталонної амінокислотної послідовності, кращі приклади включають еталонну послідовність, що містять, деякі модифікації, зокрема, делецію, додавання або заміну щонайменше однієї амінокислоти, вкорочення або подовження. У разі заміни одної або більше послідовних або непослідовних амінокислот кращі заміни, в яких замінені амінокислоти заміщуються «еквівалентними» амінокислотами. В даному випадку під виразом «еквівалентні амінокислоти» мають на увазі вказівку на будь-які амінокислоти, з більшою ймовірністю здатні до заміни однієї з структурних амінокислот, при цьому, тим не менш, не модифікуючи біологічні активності відповідних антитіл, і конкретні приклади таких амінокислот наведені нижче.

Еквівалентні амінокислоти можна визначити або за їх структурною гомологією з амінокислотами, які вони замінюють, або за результатами порівняльних тестів на біологічну активність між різними антитілами, які, ймовірно, будуть створені.

В якості необмежувального прикладу, в таблиці 1 нижче наведена зведена інформація про можливі заміни, які, ймовірно, будуть зроблені, не приводячи в результаті до значної модифікації біологічної активності відповідного модифікованого антитіла; зворотні заміни можливі природним шляхом в тих же умовах.

Таблиця 1

Вихідний залишок	Заміна (-и)
Ala (A)	Val, Gly, Pro
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala
His (H)	Arg
Ile (I)	Leu
Leu (L)	Ile, Val, Met
Lys (K)	Arg
Met (M)	Leu
Phe (F)	Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr, Cys
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Phe, Trp
Val (V)	Leu, Ala

Конкретний аспект винаходу полягає в тому, що антитіло ADC не зв'язується з рецептором інсуліну (IR). Даний аспект представляє інтерес, оскільки антитіло, описане в даному документі, не зробить ніякого негативного впливу на IR, тобто на метаболізм інсуліну.

В іншому втіленні винаходу ще один інший переважний аспект антитіла ADC за винаходом полягає в тому, що воно здатне зв'язуватися не тільки з IGF-1R людини, але також з IGF-1R мавпи і більш конкретно з IGF-1R яванського макака. Даний аспект також представляє інтерес, оскільки сприяє оцінці токсичності, що вимагається для клінічних досліджень.

Ще в одному іншому втіленні винаходу антитіло ADC за винаходом складається з моноклонального антитіла.

Термін «моноклональне антитіло» або «Mab», як використовують в цьому документі,

відноситься до антитіла, одержаного з популяції по суті однорідних антитіл, тобто окремі антитіла популяції ідентичні за винятком можливих мутацій, що зустрічаються в природі, які можуть бути присутніми в незначних кількостях. Моноклональні антитіла мають високу специфічність, оскільки спрямовані на єдиний епітоп. Таке моноклональне антитіло може продукуватися єдиним клоном В клітин або гібридами. Моноклональні антитіла можуть бути також рекомбінантними, тобто можуть бути одержані методами білкової інженерії або хімічного синтезу. Моноклональні антитіла можуть бути також виділені з фагових бібліотек антитіл. Крім того, на противагу препаратам поліклональних антитіл, які в характерному випадку включають різні антитіла, спрямовані проти різних детермінант або епітопів, кожне моноклональне антитіло спрямовано проти єдиного епітопу антигену.

Моноклональне антитіло в даному документі включає мишине, химерне і гуманізоване антитіло, таке як описано нижче.

Антитіло переважно виділяють з гібридами мишиного походження, зареєстрованої у французькій колекції культур мікроорганізмів (CNCM, Інститут Пастера, 25 рю дю Доктор Руа, 75724 Париж, Седекс 15, Франція), де гібриди одержують шляхом злиття спленоцитів/лімфоцитів імунізованих мишей Balb/C і клітин лінії клітин мієломи Sp 2/O-Ag 14.

В одному втіленні винаходу антитіло до IGF-1R ADC за винаходом складається з мишиного антитіла, далі позначеного як m[назва антитіла].

В одному втіленні винаходу антитіло до IGF-1R складається з химерного антитіла, далі позначеного як c[назва антитіла].

В одному втіленні винаходу антитіло до IGF-1R складається з гуманізованого антитіла, далі позначеного як hz[назва антитіла].

Щоб уникнути сумнівів в подальшому описі вирази «антитіло до IGF-1R» і «[назва антитіла]» аналогічні і включають (за відсутності протилежного опису) мишиний, химерний і гуманізований варіанти антитіла до IGF-1R або «[назва антитіла]». При необхідності використовують префікс m- (мишине), c- (химерне) або hz- (гуманізоване).

Для більшої ясності в наступній таблиці 2 проілюстровані послідовності CDR, визначені відповідно до IMGT, для бажаних антитіл.

Таблица 2

	Важкий ланцюг	Легкий ланцюг	SEQ ID NO
Консенсус	CDR-H1		1
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	4
		CDR-L2	5
		CDR-L3	6
208F2	CDR-H1		7
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	9
		CDR-L2	5
		CDR-L3	11
212A11	CDR-H1		7
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	10
		CDR-L2	5
		CDR-L3	11
214F8 і 213B10	CDR-H1		7
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	9
		CDR-L2	5
		CDR-L3	12

Таблиця 2 (продовження)

	Важкий ланцюг	Легкий ланцюг	SEQ ID NO
219D6	CDR-H1		8
	CDR-H2		2
	CDR-H3		3
		CDR-L1	9
		CDR-L2	5
		CDR-L3	11

Фахівцю в даній області техніки очевидно, що будь-яку комбінацію 6 CDR, як описано вище, слід розглядати в складі даного винаходу.

5 Як можна спостерігати з даної таблиці 2, всі антитіла, описані в даному документі, мають однакові послідовності CDR-H2, CDR-H3 і CDR-L2, і ця властивість представляє особливий інтерес, як описано вище.

Конкретний аспект відноситься до ADC, де антитіло являє собою мишине антитіло, яке відрізняється тим, що антитіло також містить константні області легкого ланцюга і важкого ланцюга, виділені з антитіла виду, гетерологічного для миші, зокрема, людини.

10 Інший конкретний аспект відноситься до ADC, де антитіло являє собою химерне (с) антитіло, яке відрізняється тим, що антитіло також містить константні області легкого ланцюга і важкого ланцюга, виділені з антитіла виду, гетерологічного для миші, зокрема, людини.

Химерне антитіло являє собою антитіло, що містить природну варіабельну область (легкого ланцюга і важкого ланцюга), виділену з антитіла даного виду в комбінації з константними областями легкого ланцюга і важкого ланцюга антитіла виду, гетерологічного для даного виду.

15 Химерні антитіла можуть бути одержані шляхом використання методів рекомбінантної генетики. Наприклад, химерне антитіло може бути одержано шляхом клонування рекомбінантної ДНК, що містить промотор і послідовність, що кодує варіабельну ділянку моноклонального антитіла, що відрізняється від людського, зокрема, мишиного, і послідовність, що кодує константну область антитіла гетерологічного виду, переважно людини. Химерне антитіло ADC відповідно до винаходу, які кодуються одним таким рекомбінантним геном, може являти собою, наприклад, химерне антитіло миші-людини, при цьому специфічність цього антитіла визначається варіабельною областю, виділеної з мишиної ДНК, а його ізотип визначається константною областю, виділеної з ДНК людини.

У переважному, але не обмежувальному втіленні винаходу антитіло ADC за винаходом вибрано з:

а) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 13 або будь-яку послідовність, що виявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 13, і три CDR легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 9, 5 і 11;

б) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 14 або будь-яку послідовність, що виявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 14, і три CDR легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 10, 5 і 11;

35 в) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 15 або будь-яку послідовність, що виявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 15, і три CDR легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 9, 5 і 12;

д) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 16 або будь-яку послідовність, що виявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 16, і три CDR легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 9, 5 і 11; і

40 е) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 17 або будь-яку послідовність, що виявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 17, і три CDR легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 9, 5 і 12.

Під «будь-якою послідовністю, яка проявляє щонайменше 80%, переважно 85%, 90%, 95% і 98% ідентичність SEQ ID NO з 13 по 17» мають на увазі позначення послідовностей, що містять три CDR важкого ланцюга SEQ ID NO 1, 2 і 3, і, крім того, такі, що виявляють щонайменше 80%, переважно 85%, 90%, 95% і 98% ідентичність з повнорозмірною послідовністю SEQ ID NO з 13 по 17 поза послідовностей, що відповідають CDR (тобто SEQ ID NO 1, 2 і 3).

В іншому переважному, але не обмежувальному втіленні винаходу антитіло ADC за винаходом вибрано з:

50 а) антитіла, що містить варіабельний домен легкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 18 або будь-яку послідовність, що виявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 18, і

три CDR важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 7, 2 і 3;

b) антитіла, що містить варіабельний домен легкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 19 або будь-яку послідовність, що виявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 19, і три CDR важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 7, 2 і 3;

5 c) антитіла, що містить варіабельний домен легкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 20 або будь-яку послідовність, що виявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 20, і три CDR важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 7, 2 і 3;

d) антитіла, що містить варіабельний домен легкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 21 або будь-яку послідовність, що виявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 21, і 10 три CDR важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 8, 2 і 3; і

e) антитіла, що містить варіабельний домен легкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 22 або будь-яку послідовність, що виявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 22, і три CDR важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 7, 2 і 3.

15 Під «будь-якою послідовністю, яка проявляє щонайменше 80%, переважно 85%, 90%, 95% і 98% ідентичність SEQ ID NO з 18 по 22» мають на увазі позначення послідовностей, що містять три CDR важкого ланцюга SEQ ID NO 4, 5 і 6, і, крім того, такі, що виявляють щонайменше 80%, переважно 85%, 90%, 95% і 98% ідентичність з повнорозмірною послідовністю SEQ ID NO з 18 по 22 поза послідовностей, відповідних CDR (тобто SEQ ID NO 4, 5 і 6).

Втілення винаходу відноситься до ADC, де Ab являє собою антитіло, вибране з:

20 a) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO 13 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 13, і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO 18 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 18;

b) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO 14 25 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 14, і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO 19 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 19;

c) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO 15 30 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 15, і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO 20 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 20;

d) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO 16 35 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 16, і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO 21 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 21; і

e) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO 17 40 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 17, і варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO 22 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 22.

Химерні антитіла, описані в даному документі, можуть також відрізнятися константним доменом, і більш конкретно химерні антитіла можуть бути вибрані або позначені як, наприклад, без обмеження IgG1, IgG2, IgG3, IgM, IgA, IgD або IgE. Більш переважно в контексті даного винаходу химерні антитіла є IgG1 або IgG4.

45 Одне втілення винаходу відноситься до ADC, де Ab являє собою химерне антитіло, що містить варіабельні домени VH і VL, як описано вище, в форматі IgG1. Більш переважно це химерне антитіло містить константний домен для VH послідовності SEQ ID NO 43 і домен каппа для VL послідовності SEQ ID NO 45.

50 Одне втілення винаходу відноситься до ADC, де Ab являє собою химерне антитіло, що містить варіабельні домени VH і VL, як описано вище, в форматі IgG4. Більш переважно це химерне антитіло містить константний домен для VH послідовності SEQ ID NO 44 і домен каппа для VL послідовності SEQ ID NO 45.

В іншому переважному, але не обмежувальному втіленні винаходу антитіло ADC за винаходом вибрано з:

55 a) антитіла, що містить важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO 23 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 23, і легкий ланцюг послідовності SEQ ID NO 28 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 28, або такого, що складається з цих ланцюгів;

60 b) антитіла, що містить важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO 24 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 24, і легкий ланцюг послідовності SEQ ID NO 29 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80%

ідентичність SEQ ID NO 29, або такого, що складається з цих ланцюгів;

с) антитіла, що містить важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO 25 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 25, і легкий ланцюг послідовності SEQ ID NO 30 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80%

ідентичність SEQ ID NO 30, або такого, що складається з цих ланцюгів;

д) антитіла, що містить важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO 26 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 26, і легкий ланцюг послідовності SEQ ID NO 31 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 31, або такого, що складається з цих ланцюгів; і

е) антитіла, що містить важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO 27 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 27, і легкий ланцюг послідовності SEQ ID NO 32 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 32, або такого, що складається з цих ланцюгів.

Для більшої ясності в наступній таблиці 3 проілюстровані послідовності VH і VL відповідно для бажаних химерних антитіл.

Таблиця 3

	Важкий ланцюг	Легкий ланцюг	SEQ ID NO
c208F2	Варіабельний домен (VH)		13
		Варіабельний домен (VL)	18
	Повнорозмірний		23
		Повнорозмірний	28
c212A11	Варіабельний домен (VH)		14
		Варіабельний домен (VL)	19
	Повнорозмірний		24
		Повнорозмірний	29
c214F8	Варіабельний домен (VH)		15
		Варіабельний домен (VL)	20
	Повнорозмірний		25
		Повнорозмірний	30
c219D6	Варіабельний домен (VH)		16
		Варіабельний домен (VL)	21
	Повнорозмірний		26
		Повнорозмірний	31
c213B10	Варіабельний домен (VH)		17
		Варіабельний домен (VL)	22
	Повнорозмірний		27
		Повнорозмірний	32

Ще один інший конкретний аспект даного винаходу стосується ADC, де «Ab» являє собою гуманізоване антитіло, яке відрізняється тим, що константні області легкого ланцюга і важкого ланцюга, виділені з антитіла людини, являють собою відповідно лямбда- або каппа-область і область гамма-1, гамма-2 або гамма-4.

«Гуманізовані антитіла» означають антитіло, яке містить ділянки CDR, виділені з антитіла походження, що відрізняється від людського, де інші частини молекули антитіла виділено з одного (або кількох) антитіл людини. Крім того, деякі з залишків каркасного сегмента (званого FR) можуть бути модифіковані для збереження зв'язуючої спорідненості.

Гуманізовані антитіла або їх фрагменти можуть бути одержані методами, відомими фахівцям в даній області техніки. Такі гуманізовані антитіла переважні для застосування в способах, що включають діагностику in vitro або превентивне та/або терапевтичне лікування in vivo. Інші методи гуманізації, також відомі фахівцям в даній області техніки, такі як, наприклад, метод «прищеплення CDR», описаний PDL в патентах EP 0 451 216, EP 0 682 040, EP 0 939 127, EP 0 566 647 або US 5,530,101, US 6,180,370, US 5,585,089 і US 5,693,761. Можна також процитувати патенти US 5,639,641 або 6,054,297, 5,886,152 і 5,877,293.

В якості конкретного втілення винаходу, і як буде більш детально пояснено нижче в прикладах, в даному документі описано антитіло, що складається з h208F2. Таку гуманізацію можна також застосовувати до інших антитіл, що є частиною даного винаходу.

У переважному втіленні винаходу антитіло ADC відповідно до даного винаходу містить

варіабельний домен важкого ланцюга (VH), що має:

- i) CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3 послідовностей SEQ ID NO 7, 2 і 3 відповідно і
- ii) FR1, FR2 і FR3, виділені з IGHV1-46*01 (SEQ ID NO 46) зародкової лінії людини, і
- iii) FR4, виділений з IGHJ4*01 (SEQ ID NO 48) зародкової лінії людини.

5 У кращому втіленні винаходу антитіло ADC відповідно до даного винаходу містить варіабельний домен легкого ланцюга (VL), що має:

- i) CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3 послідовностей SEQ ID NO 9, 5 і 11 відповідно і
- ii) FR1, FR2 і FR3, виділені з IGHV1-39*01 (SEQ ID NO 47) зародкової лінії людини, і
- iii) FR4, виділений з IGHJ4*01 (SEQ ID NO 49) зародкової лінії людини.

10 У кращому, але не обмежувальному втіленні винаходу антитіло містить:

а) важкий ланцюг, що має CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3 послідовностей SEQ ID NO 7, 2 і 3 відповідно, і FR1, FR2 і FR3, виділені з IGHV1-46*01 (SEQ ID NO 46) зародкової лінії людини, і FR4, виділений з IGHJ4*01 зародкової лінії людини (SEQ ID NO 48); і

15 б) легкий ланцюг, що має CDR-L1, CDR-L2 і CDR-L3 послідовностей SEQ ID NO 9, 5 і 11 відповідно, і FR1, FR2 і FR3, виділені з IGHV1-39*01 (SEQ ID NO 47) зародкової лінії людини, і FR4, виділений з IGHJ4*01 зародкової лінії людини (SEQ ID NO 49).

20 В одному втіленні винаходу антитіло ADC відповідно до винаходу містить варіабельний домен важкого ланцюга (VH) послідовності SEQ ID NO 33 і варіабельний домен легкого ланцюга (VL) послідовності SEQ ID NO 35. Дане гуманізоване антитіло далі в даному документі називають hz208F2 («варіант 1» або «вар. 1»).

В іншому втіленні винаходу антитіло ADC відповідно до даного винаходу містить варіабельний домен важкого ланцюга (VH) послідовності SEQ ID NO 33, де дана послідовність SEQ ID NO 33 містить щонайменше одну зворотну мутацію, обрану із залишків 20, 34, 35, 38, 48, 50, 59, 61, 62, 70, 72, 74, 76, 77, 79, 82 і 95.

25 Під виразом «зворотна мутація» мають на увазі мутацію або заміну залишку, присутнього в зародковій лінії людини, відповідним залишком, початково присутніх в мишиній послідовності.

В іншому втіленні винаходу антитіло ADC відповідно до даного винаходу містить варіабельний домен важкого ланцюга (VH) послідовності SEQ ID NO 33, де дана послідовність SEQ ID NO 33 містить 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 або 17 зворотних мутацій, обраних із залишків 20, 34, 35, 38, 48, 50, 59, 61, 62, 70, 72, 74, 76, 77, 79, 82 і 95.

Для більшої ясності в наступній таблиці 4 проілюстровані переважні зворотні мутації.

Таблиця 4

N° залишку	20	34	35	38	48	50	59	61
Миша	M	I	Y	K	L	W	K	N
Людина	V	M	H	R	M	I	S	A

Таблиця 4 (продовження)

N° залишку	62	70	72	74	76	77	79	82	95
Миша	E	L	A	K	S	N	A	F	F
Людина	Q	M	R	T	T	S	V	E	Y

35 В одному втіленні винаходу антитіло ADC відповідно до даного винаходу містить варіабельний домен легкого ланцюга (VL) послідовності SEQ ID NO 35, де дана послідовність SEQ ID NO 35 містить щонайменше одну зворотну мутацію, вибрану із залишків 22, 53, 55, 65, 71, 72, 77 і 87.

40 В одному втіленні винаходу антитіло ADC відповідно до даного винаходу містить варіабельний домен легкого ланцюга (VL) послідовності SEQ ID NO 35, де дана послідовність SEQ ID NO 35 містить 2, 3, 4, 5, 6, 7 або 8 зворотних мутацій, вибраних із залишків 22, 53, 55, 65, 71, 72, 77 або 87.

В іншому втіленні винаходу антитіло ADC відповідно до даного винаходу містить:

45 а) варіабельний домен важкого ланцюга (VH) послідовності SEQ ID NO 33, де дана послідовність SEQ ID NO 33 містить щонайменше одну зворотну мутацію, вибрану із залишків 20, 34, 35, 38, 48, 50, 59, 61, 62, 70, 72, 74, 76, 77, 79, 82 і 95; і

б) варіабельний домен легкого ланцюга (VL) послідовності SEQ ID NO 35, де дана послідовність SEQ ID NO 35 містить щонайменше одну зворотну мутацію, вибрану із залишків

22, 53, 55, 65, 71, 72, 77 і 87.

Для більшої ясності в наступній таблиці 5 проілюстровані переважні зворотні мутації.

Таблиця 5

N° залишку	22	53	55	65	71	72	77	87
Миша	S	R	H	R	Y	S	N	F
Людина	T	S	Q	S	F	T	S	Y

5 У такому втіленні винаходу антитіло ADC відповідно до винаходу містить всі згадані вище зворотні мутації і відповідає антитілу, яке містить варіабельний домен важкого ланцюга (VH) послідовності SEQ ID NO 34 і варіабельний домен легкого ланцюга (VL) послідовності SEQ ID NO 36. Дане гуманізоване антитіло далі в даному документі називають hz208F2 («варіант 3» або «вар. 3»).

10 В іншому втіленні винаходу всі гуманізовані форми, що містяться між варіантом 1 і варіантом 3, також охоплені даним винаходом. Іншими словами, антитіло згідно винаходу відповідає антитілу, яке містить варіабельний домен важкого ланцюга (VH) «консенсус» послідовності SEQ ID NO 41 і варіабельний домен легкого ланцюга (VL) «консенсус» послідовності SEQ ID NO 42. Дане гуманізоване антитіло в цілому далі в даному документі буде називатися hz208F2 («варіант 2» або «вар. 2»).

15 У переважному, але не обмежувальному втіленні винаходу антитіло ADC за винаходом вибрано з:

а) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 33 або будь-яку послідовність, яка виявляє щонайменше 80%, переважно 85%, 90%, 95% і 98% ідентичність SEQ ID NO 33, і три CDR легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 9, 5 і 11; і

20 б) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 34 або будь-яку послідовність, яка виявляє щонайменше 80%, переважно 85%, 90%, 95% і 98% ідентичність SEQ ID NO 34, і три CDR легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 9, 5 і 11.

25 Під «будь-якою послідовністю, яка проявляє щонайменше 80%, переважно 85%, 90%, 95% і 98% ідентичність SEQ ID NO 33 або 34» мають на увазі позначення послідовностей, що містять три CDR важкого ланцюга SEQ ID NO 1, 2 і 3, і, крім того, такі, що виявляють щонайменше 80%, переважно 85%, 90%, 95% і 98% ідентичність з повнорозмірною послідовністю SEQ ID NO 33 або 34 поза послідовностей, відповідних CDR (тобто SEQ ID NO 1, 2 і 3).

30 Якщо це не вказано у відповідних абзацах, в даному описі під будь-якою послідовністю або під послідовністю, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність конкретної послідовності, має бути зрозуміло, що ця послідовність проявляє щонайменше 80% і переважно 85%, 90%, 95% і 98% ідентичність еталонній послідовності. Якщо ці послідовності містять послідовності CDR, це має на увазі, що послідовності, що проявляють ідентичність щонайменше цих ділянок CDR ділянок CDR еталонної послідовності 80%, переважно 85%, 90%, 95% і 98%, ідентичність повнорозмірної послідовності, яку слід обчислити для решти послідовності, розташована поза послідовностей, які відповідають цим ділянкам CDR.

35 У переважному, але не обмежувальному втіленні винаходу антитіло даного винаходу вибрано з:

а) антитіла, що містить варіабельний домен легкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 35 або будь-яку послідовність, яка виявляє щонайменше 80%, переважно 85%, 90%, 95% і 98% ідентичність SEQ ID NO 35, і три CDR важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 7, 2 і 3; і

40 б) антитіла, що містить варіабельний домен легкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO 36 або будь-яку послідовність, яка виявляє щонайменше 80%, переважно 85%, 90%, 95% і 98% ідентичність SEQ ID NO 36, і три CDR важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 7, 2 і 3.

45 Під «будь-якою послідовністю, яка проявляє щонайменше 80%, переважно 85%, 90%, 95% і 98% ідентичність SEQ ID NO 35 або 36» мають на увазі позначення послідовностей, що містять три CDR легкого ланцюга SEQ ID NO 4, 5 і 6, і, крім того, такі, що виявляють щонайменше 80%, переважно 85%, 90%, 95% і 98% ідентичність з повнорозмірною послідовністю SEQ ID NO 35 або 36 поза послідовностей, відповідних CDR (тобто SEQ ID NO 4, 5 і 6).

50 Гуманізовані антитіла, описані в даному документі, можуть також відрізнятися константним доменом, і більш конкретно гуманізовані антитіла можуть бути вибрані або позначені як,

наприклад, без обмеження IgG1, IgG2, IgG3, IgM, IgA, IgD або IgE. Більш переважно в контексті даного винаходу гуманізовані антитіла є IgG1 або IgG4.

Одне втілення винаходу відноситься до ADC, де «Ab» являє собою гуманізоване антитіло, що містить варіабельні домени VH і VL, як описано вище, в форматі IgG1. Більш переважно це гуманізоване антитіло містить константний домен для VH послідовності SEQ ID NO 43 і домен каппа для VL послідовності SEQ ID NO 45.

Одне втілення винаходу відноситься до ADC, де «Ab» являє собою гуманізоване антитіло, що містить варіабельні домени VH і VL, як описано вище, в форматі IgG4. Більш переважно це гуманізоване антитіло містить константний домен для VH послідовності SEQ ID NO 44 і домен каппа для VL послідовності SEQ ID NO 45.

Ще одне інше втілення винаходу відноситься до ADC, де «Ab» являє собою антитіло, вибране з:

а) антитіла, що містить важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO 37 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 37, і легкий ланцюг послідовності SEQ ID NO 39 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 39, або такого, що складається з цих ланцюгів; і

б) антитіла, що містить важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO 38 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 38, і легкий ланцюг послідовності SEQ ID NO 40 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 40, або такого, що складається з цих ланцюгів.

Для більшої ясності в наступній таблиці 6а проілюстровані необмежувальні приклади послідовностей VH і VL для варіанта 1 (вар. 1) і варіанта 3 (вар. 3) гуманізованих антитіла hz208F2. Вона також містить консенсус-послідовність для варіанта 2 (вар. 2).

Таблиця 6а

	Важкий ланцюг	Легкий ланцюг	SEQ ID NO
hz208F2 (вар. 1)	Варіабельний домен (VH)		33
		Варіабельний домен (VL)	35
	Повнорозмірний		37
		Повнорозмірний	39
hz208F2 (вар. 3)	Варіабельний домен (VH)		34
		Варіабельний домен (VL)	36
	Повнорозмірний		38
		Повнорозмірний	40
hz208F2 (вар. 2)	Варіабельний домен (VH)		41
		Варіабельний домен (VL)	42

В іншому переважному, але не обмежувальному втіленні винаходу антитіло ADC за винаходом вибрано з:

а) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність, вибрану з SEQ ID NO 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 і 80 або будь-якої послідовності, щонайменше на 80%, переважно на 85%, 90%, 95% і 98% ідентичної SEQ ID NO 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 і 80; і три CDR легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 9, 5 і 1;

б) антитіла, що містить варіабельний домен легкого ланцюга, який має послідовність, вибрану з SEQ ID NO 57 або 60 або будь-якої послідовності, щонайменше на 80%, переважно на 85%, 90%, 95% і 98% ідентичної SEQ ID NO 57 або 60; і три CDR важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 7, 2 і 3; і

с) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність, вибрану з SEQ ID NO 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 і 80 або будь-якої послідовності, щонайменше на 80%, переважно на 85%, 90%, 95% і 98% ідентичної SEQ ID NO 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 і 80; і варіабельний домен легкого ланцюга, який має послідовність, вибрану з SEQ ID NO 57 або 60, або будь-яку послідовність, щонайменше на 80%, переважно на 85%, 90%, 95% і 98% ідентичну SEQ ID NO 57 або 60.

Ще одне інше втілення винаходу відноситься до ADC, де «Ab» являє собою антитіло, вибране з:

а) антитіла, що містить важкий ланцюг, що має послідовність SEQ ID NO 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 і 80 або будь-якої послідовності, щонайменше на 80% ідентичної SEQ ID NO 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 або 80; і легкий ланцюг, що має послідовність SEQ ID NO 57 або будь-яку послідовність, яка виявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 57; і

послідовності SEQ ID NO 61 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 61, або такого, що складається з цих ланцюгів; і

- 5 о) антитіла, що містить важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO 81 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 81, і легкий ланцюг послідовності SEQ ID NO 59 або будь-якої послідовності, яка проявляє щонайменше 80% ідентичність SEQ ID NO 59, або такого, що складається з цих ланцюгів.

Іншими словами, винахід відноситься до ADC, де Ab являє собою антитіло, що містить:

- 10 а) важкий ланцюг, що має послідовність, вибрану з SEQ ID NO 58, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 і 81 або будь-якої послідовності, щонайменше на 80% ідентичної SEQ ID NO 58, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 або 81; і

б) легкий ланцюг, що має послідовність, вибрану з SEQ ID NO 59 і 61 або будь-якої послідовності, щонайменше на 80% ідентичної SEQ ID NO 59 або 61.

- 15 Для більшої ясності в наступній таблиці 6b проілюстровані необмежувальні приклади послідовностей VH і VL (варіабельного домену і повнорозмірного) для різних варіантів гуманізованого антитіла hz208F2.

Таблиця 6b

	Важкий ланцюг	Легкий ланцюг	SEQ ID NO
hz208F2 H037/L018	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірний	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірний	56
			57
			58
			59
Hz208F2 H037/L021	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірний	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірний	56
			60
			58
			61
Hz208F2 H047/L018	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірний	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірний	62
			57
			63
			59
Hz208F2 H049/L018	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірний	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірний	64
			57
			65
			59
Hz208F2 H049/L021	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірний	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірний	64
			60
			65
			61
Hz208F2 H051/L018	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірний	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірний	66
			57
			67
			59
Hz208F2 H052/L018	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірний	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірний	68
			57
			69
			59
Hz208F2 H052/L021	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірний	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірний	68
			60
			69
			61
Hz208F2 H057/L018	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірний	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірний	70
			57
			71
			59
Hz208F2 H068/L018	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірний	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірний	72
			57
			73
			59

Таблиця 6b

	Важкий ланцюг	Легкий ланцюг	SEQ ID NO
Hz208F2 H070/L018	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірний	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірний	74
			57
			75
			59
Hz208F2 H071/L018	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірний	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірний	76
			57
			77
			59
Hz208F2 H076/L018	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірний	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірний	78
			57
			79
			59
Hz208F2 H076/L021	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірний	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірний	78
			60
			79
			61
Hz208F2 H077/L018	Варіабельний домен (VH) Повнорозмірний	Варіабельний домен (VL) Повнорозмірний	80
			57
			81
			59

Інший аспект даного винаходу являє собою ADC, в якому Ab являє собою антитіло, вибране з i) антитіла, що продукується гібридомою I-4757, I-4773, I-4775, I-4736 або I-4774, депонованою в CNCM, Інститут Пастера, Франція, 30 травня 2013 року, 26 червня 2013 року, 26 червня 2013 року, 24 квітня 2013 року і 26 червня 2013 року відповідно, або ii) антитіла, яке конкурує за зв'язування з IGF-1R з антитілом i); або iii) антитіла, яке зв'язується з тим же епітопом IGF-1R, що і антитіло i).

Дійсно, в даному документі описана мишина гібридома, вибрана з гібридами I-4757, I-4773, I-4775, I-4736 і I-4774, які депоновані в CNCM, Інститут Пастера, Франція, 30 травня 2013 року, 26 червня 2013 року, 26 червня 2013 року, 24 квітня 2013 року і 26 червня 2013 року відповідно.

Також описана ізольована нуклеїнова кислота, що кодує антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент згідно винаходу.

Терміни «нуклеїнова кислота», «послідовність нуклеїнової кислоти», «нуклеїново-кислотна послідовність», «полінуклеотид», «олігонуклеотид», «полінуклеотидна послідовність» і «нуклеотидна послідовність», що використовуються в даному документі як взаємозамінні, означають точну послідовність нуклеотидів, модифіковану або немодифіковану, що визначає фрагмент або ділянку нуклеїнової кислоти, яка містить або що не містить неприродні нуклеотиди і являє собою або двониткову ДНК, або одониткову ДНК, або продукти транскрипції цих ДНК.

Ці послідовності ізольовані та/або очищені, тобто відібрані прямим або непрямим шляхом, наприклад шляхом копіювання, з їх оточення, щонайменше частково модифікованого. У даному документі слід також згадати ізольовані нуклеїнові кислоти, одержані методами рекомбінантної генетики, наприклад, за допомогою клітин-хазяївів, або одержані шляхом хімічного синтезу.

Також описаний вектор, який містить нуклеїнову кислоту, що кодує антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент ADC відповідно до винаходу, зокрема, клонуючі та/або експресійні вектори, які містять таку нуклеотидну послідовність.

Вектори переважно містять елементи, які дають можливість для експресії та/або секреції нуклеотидних послідовностей в даній клітині-хазяїні. Таким чином, вектор може містити промотор, сигнали ініціації і термінації трансляції, а також відповідні регуляторні ділянки транскрипції. Він повинен мати здатність до стабільного збереження в клітині-хазяїні і може необов'язково містити специфічні сигнали, які задають секрецію трансльованого білка. Ці різні елементи вибирає і оптимізує фахівець в даній області техніки відповідно до використовуваної клітини-хазяїна. Для цієї мети нуклеотидні послідовності можуть бути вбудовані в вектори, автономно репліковані всередині обраної клітини-хазяїна, або в інтеграційні вектори обраної клітини-хазяїна.

Вектори є, наприклад, векторами плазмідного або вірусного походження. Їх використовують

для трансформації клітин-хазяївів з метою клонування або експресії нуклеотидних послідовностей за винаходом.

Такі вектори одержують способами, зазвичай використовуваними фахівцями в даній області техніки, і одержані в результаті клони можна вводити в відповідну клітину-хазяїна стандартними

5 способами, такими як ліпофекція, електропорація, кон'югація, тепловий шок або хімічні способи.

Ці ізольовані клітини-хазяїва трансформовані описаним вище вектором або містять цей вектор.

Клітина-хазяїн може бути вибрана з прокаріотичних або еукаріотичних систем, таких як, наприклад, бактеріальні клітини, а також дріжджові клітини або клітини тварин, зокрема, клітини

10 ссавців (за винятком людини). Можна також використовувати клітини комах або рослин.

Також розкрито спосіб одержання антитіла ADC відповідно до винаходу або його антигензв'язуючого фрагмента, що включає наступні стадії:

а) культивування в середовищі в умовах культивування, придатних для описаної вище клітини-хазяїна; і

15 б) виділення одержаного таким шляхом антитіла з культурального середовища або з культивованих клітин.

Трансформовані клітини використовують в способах одержання рекомбінантних антитіл ADC відповідно до винаходу. В даний опис також включені способи одержання антитіл в рекомбінантній формі з використанням вектора та/або клітини, трансформованої вектором, як

20 розкрито вище. Переважно клітину, трансформовану вектором, як описано вище, культивують в умовах, що дають можливість експресії описаного вище антитіла і виділення цього антитіла.

Як уже згадувалося, клітина-хазяїн може бути вибрана з прокаріотичних або еукаріотичних систем. Зокрема, можливо ідентифікувати нуклеотидні послідовності, що сприяють секреції в такій прокаріотичній або еукаріотичній системі. Вектор, як розкрито вище, несе таку

25 послідовність, можна, отже, переважно використовувати для одержання секретованих рекомбінантних білків. Дійсно, очищення цих рекомбінантних білків, що представляють інтерес, полегшується за рахунок факту їх більш ймовірної присутності в супернатанті, ніж усередині клітин-хазяївів.

Антитіло ADC за даним винаходом може бути також одержано шляхом хімічного синтезу. Один такий спосіб одержання також становить об'єкт винаходу. Фахівцю в даній області техніки

30 відомі способи хімічного синтезу, такі як твердофазні методи або часткові твердофазні методи, шляхом конденсації фрагментів або шляхом традиційного синтезу в розчині. Можна також вказати поліпептиди, одержані шляхом хімічного синтезу і здатні до вмісту відповідних неприродних амінокислот.

В даний винахід також включено антитіло, яке може бути одержано описаним вище способом.

Згідно конкретного аспекту винахід відноситься до ADC, в якому АВ являє собою антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, як описано вище, для застосування в якості

40 направляючого носія для доставлення цитотоксичного агента в сайт-мішень хазяїна, де сайт-мішень хазяїна складається з епітопа, локалізованого в IGF-1R, переважно у позаклітинному домені IGF-1R, більш переважно IGF-1R людини (SEQ ID NO 50) і ще більш переважно у позаклітинному домені IGF-1R людини (SEQ ID NO 51) і ще більш переважно в N-кінцевій ділянці позаклітинного домену IGF-1R людини (SEQ ID NO 52) в будь-якому природному варіанті цієї послідовності.

У переважному втіленні винаходу сайт-мішень хазяїна являє собою сайт-мішень клітини ссавця, більш переважно клітини людини, більш переважно клітини, які природно або шляхом

45 генетичної рекомбінації експресують IGF-1R.

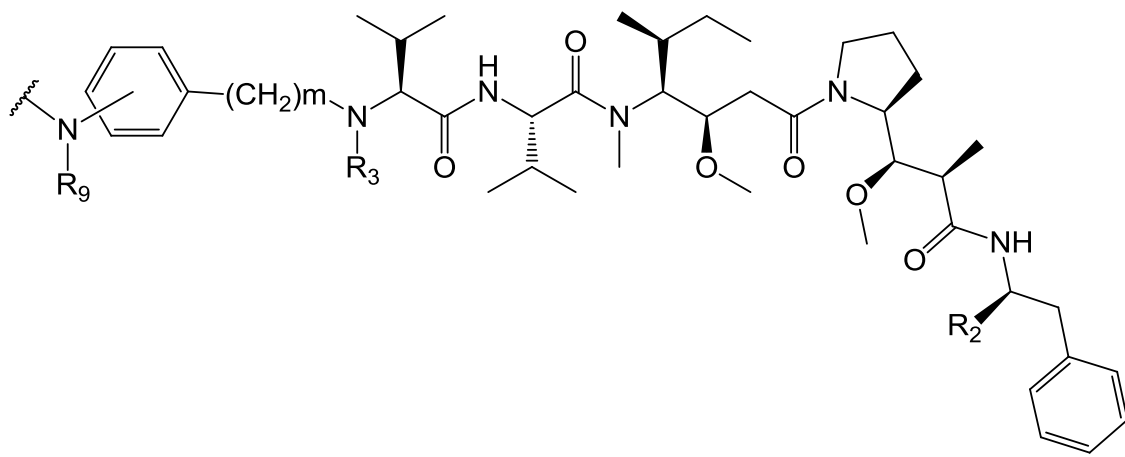
У більш переважному втіленні винаходу сайт-мішень хазяїна являє собою сайт-мішень клітини пацієнта, переважно людини, яка страждає на рак, переважно IGF-1R-експресуючим

50 раком або раком, обумовленим IGF-1R.

IGF-1R-експресуючі форми раку або форми раку, обумовлені IGF-1R, включають, зокрема, форми раку, де пухлинні клітини експресують або характеризуються гіперекспресією повнорозмірного IGF-1R або його ділянки на їх поверхні.

II – Лікарський засіб (D)

55 Угрупування лікарського засобу відповідно до винаходу має наступну формулу (II):



де:

- R_2 являє собою COOH , COOCH_3 або тiazоліл (такий як тiazол-2-іл),
- R_3 являє собою H або $(\text{C}_1\text{--C}_6)$ алкіл (такий як метил), зокрема, $(\text{C}_1\text{--C}_6)$ алкільну групу,
- R_9 являє собою H або $(\text{C}_1\text{--C}_6)$ алкіл (такий як метил),
- m являє собою ціле число, що складає від 1 до 8, і
- хвилястою лінією вказана точка приєднання до L .

Під «алкілом» в даному винаході мають на увазі прямоланцюговий або розгалужений насичений вуглеводневий ланцюг. Наприклад, можна згадати метильні, етильні, пропільні, ізопропільні, бутильні, ізобутильні, втор-бутильні, трет-бутильні, пентильні або гексильні групи.

Під « $(\text{C}_x\text{--C}_y)$ алкілом» в даному винаході мають на увазі алкільний ланцюг, такий як визначено вище, що містить від x до y атомів вуглецю. Таким чином, $(\text{C}_1\text{--C}_6)$ алкільна група являє собою алкільний ланцюг, що має від 1 до 6 атомів вуглецю.

$(\text{C}_1\text{--C}_6)$ алкіл здебільшого являє собою $(\text{C}_1\text{--C}_4)$ алкіл, переважно $(\text{C}_1\text{--C}_2)$ алкіл.

Серед сполук даного винаходу одному з особливо прийнятих класів угруповань лікарського засобу відповідають угруповання лікарського засобу формули (II), в яких R_2 являє собою групу COOH .

Другому особливо прийнятному класу угруповань відповідають угруповання формули (II), в яких R_2 являє собою тiazол (зокрема, групу тiazол-2-іл).

Другому класу особливо прийнятих угруповань відповідають угруповання формули (II), в яких R_2 являє собою COOMe .

Відповідно до одного конкретного втілення винаходу R_2 більш переважно являє собою групу COOH , COOMe або тiazол-2-іл.

Відповідно до першого переважного втілення R_2 являє собою COOH .

Відповідно до другого переважного втілення R_2 являє собою COOMe .

R_3 , зокрема, являє собою $(\text{C}_1\text{--C}_6)$ алкіл, переважно метильну групу.

m являє собою ціле число, яке складає від 1 до 8, зокрема, від 1 до 6, переважно від 1 до 4, переважно дорівнює 1 або 2.

У кращому втіленні винаходу R_2 являє собою COOH , R_3 являє собою метильну групу, і m дорівнює 1 або 2.

Серед угруповань лікарських засобів за винаходом одному з особливо прийнятих класів угруповань лікарського засобу відповідають угруповання лікарського засобу формули (II), в яких R_9 являє собою метильну групу або атом водню.

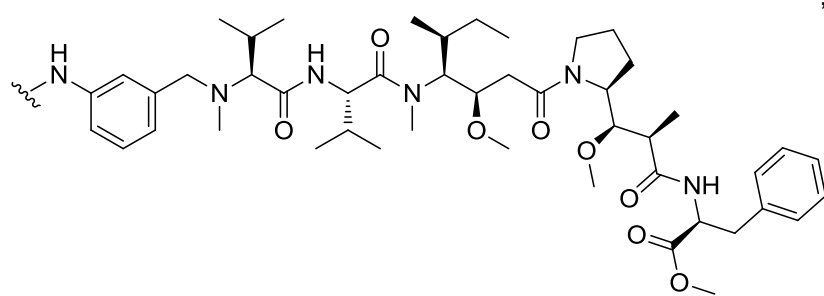
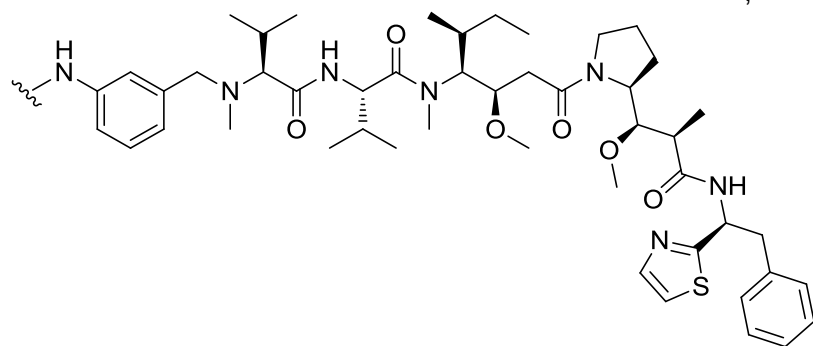
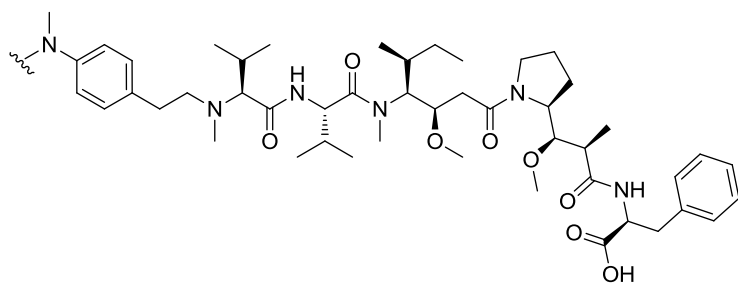
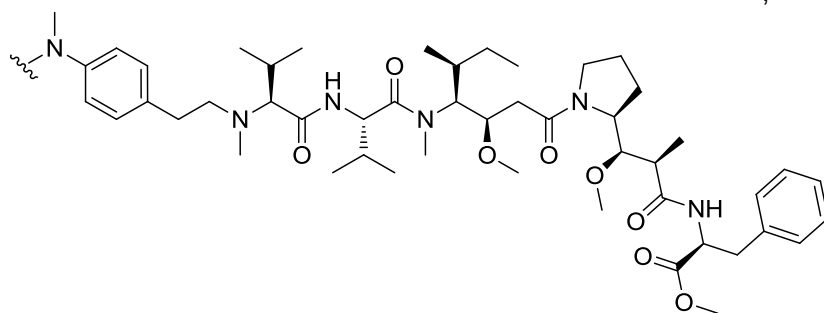
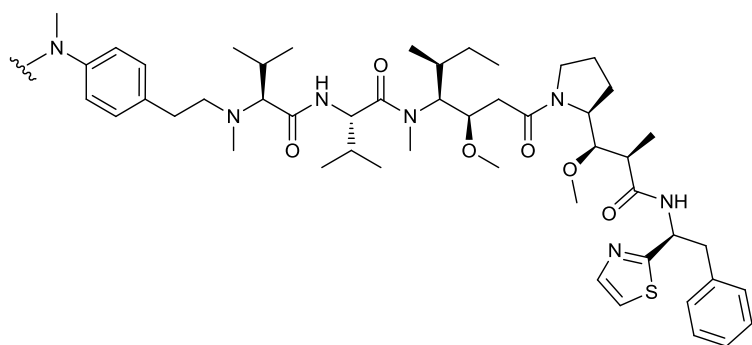
У кращому втіленні винаходу:

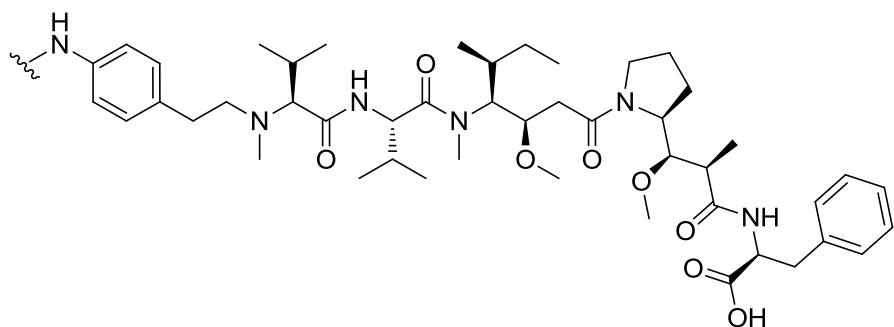
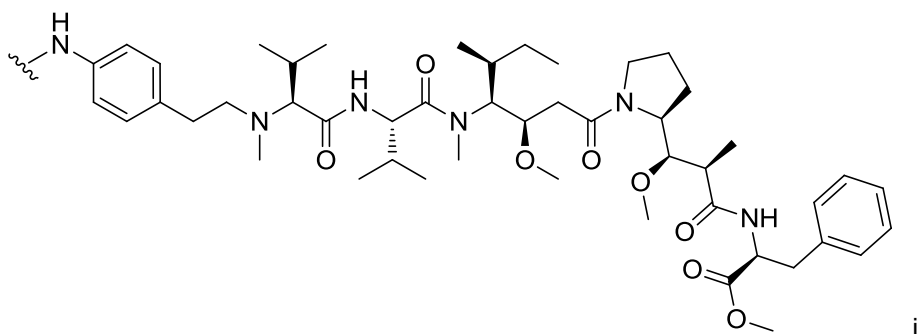
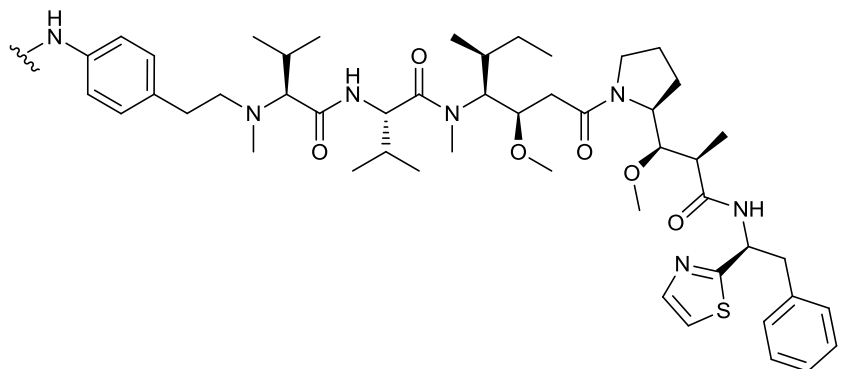
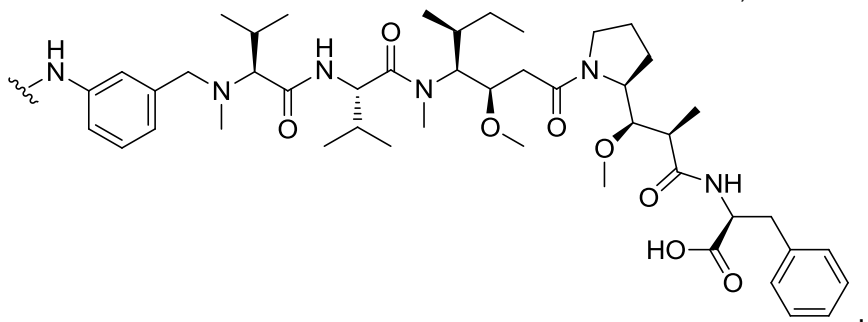
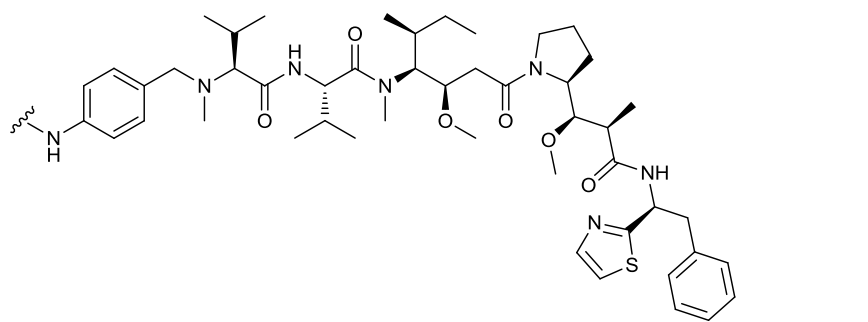
- R_2 являє собою COOH , R_3 являє собою метильну групу, R_9 являє собою метильну групу, і m дорівнює 1 або 2, або

- R_2 являє собою COOH , R_3 являє собою метильну групу, R_9 являє собою атом водню, і m дорівнює 1 або 2.

Згідно з переважним втіленням винаходу група NR_9 розташована на фенільному кільці в пара-положенні по відношенню до групи $(\text{CH}_2)_m$.

Переважно угруповання лікарського засобу вибрано з наступних угруповань:





5

Одержання лікарського засобу (формули ДН):

Лікарський засіб може бути одержано загальними способами, описаними на наступних нижче схемах синтезу, необов'язково доповнених при необхідності будь-якою стандартною операцією, описаної в літературі або добре відомої фахівцям в даній області техніки, або

описаної в прикладах в експериментальному розділі цього документа.

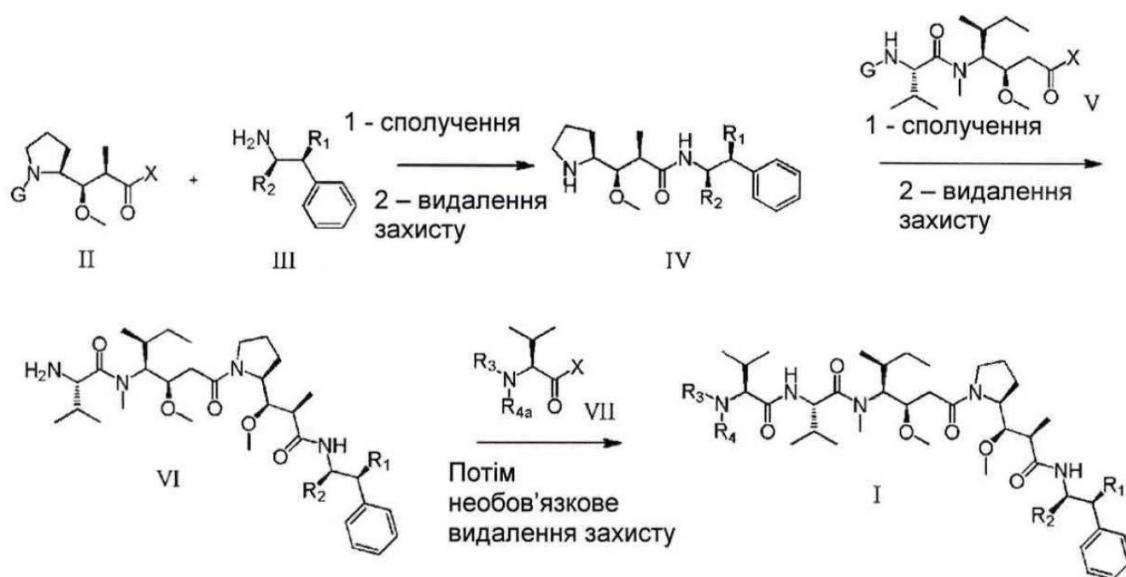
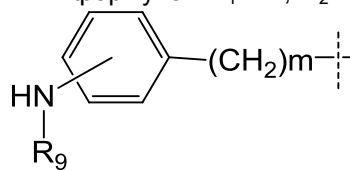


Схема 1

- 5 На схемі 1 проілюстровано перший загальний спосіб, який можна використовувати для одержання лікарського засобу. У наведених вище загальних формулах R_1 - H, R_2 і R_3 є такими,



як визначено вище для формули II, R_4 являє собою R_9 , R_{4a} являє собою групу R_4 , як визначено вище, необов'язково в захищеній формі, і G являє собою захисну групу.

- 10 Перша стадія полягає в конденсації сполуки (II), захищеної на її аминній функціональній групі захисної групою G, із сполукою (III). X може являти собою групу, що заміщується, таку як атом хлору. У цьому випадку перша стадія полягає у взаємодії між хлорангідридом і аміном. Цю взаємодію можна проводити, використовуючи способи і методи, добре відомі фахівцям в даній області техніки. При одному особливо прийнятному способі викликають взаємодію двох хімічних
- 15 сполук в присутності органічної або неорганічної основи, наприклад Et_3N , і Pr_2NEt , піридину, NaN , Cs_2CO_3 , K_2CO_3 в розчиннику, такому як ТГФ, дихлорметан, ДМФ, ДМСО, при температурі, зокрема, від $-20^\circ C$ до $100^\circ C$. X може також являти собою гідроксил (OH). У цьому випадку перша стадія являє собою реакцію конденсації між карбоною кислотою (II) і аміном (III). Цю взаємодію можна проводити, дотримуючись способів і методів, добре відомих фахівцям в даній області техніки. При одному особливо прийнятному способі викликають взаємодію цих двох хімічних
- 20 сполук в присутності агента сполучення, такого як 1-(3-диметиламінопропіл)-3-етилкарбодіїмід (EDC), 3-гідрокси-1,2,3-бензотриазин-4(3H)-он, третинного аміну, такого як діізопропілетиламін, в полярному апротонному розчиннику, такому як дихлорметан або ДМФ, при температурі, зокрема, від $-15^\circ C$ до $40^\circ C$. При іншому особливо прийнятному способі викликають взаємодію цих двох хімічних сполук в присутності діетилфосфороціанідату (DEPC), третинного аміну, такого як триетиламін, в полярному апротонному розчиннику, такому як дихлорметан або ДМФ, при температурі, зокрема, від $-15^\circ C$ до $40^\circ C$. Інший особливо прийнятний спосіб полягає в тому, що викликають взаємодію двох хімічних сполук в присутності О-(7-азабензотриазол-1-іл)-1,1,3,3-тетраметилуронію гексафторфосфату (HATU), а третинного
- 30 аміну, такого як діізопропілетиламін, в полярному апротонному розчиннику, такому як дихлорметан або ДМФ, при температурі від $-15^\circ C$ до $100^\circ C$.

- Після видалення захисту проміжної сполуки з використанням методів, добре відомих фахівцям в даній області техніки («Protective Groups in Organic Synthesis», T.W. Greene, John Wiley & Sons, 2006 і «Protecting Groups», P.J. Kocienski, Thieme Verlag, 1994), сполуку (IV) можна конденсувати із сполукою (V), слідуючи способам і методам, описаним вище, що приводять до сполуки (VI) після стадії видалення захисту. Потім ця сполука після конденсації з проміжною
- 35

сполукою (VII) і необов'язкового видалення захисту веде до утворення лікарського засобу. Сполуку (VI) можна також піддавати сполученню із сполукою (VII'), в якій R₃ являє собою попередник R₃, зокрема, групу R₃, захищену захисною групою. Сполучення, наступне за видаленням захисту групи R₃ з одержанням R₃ можна здійснювати, дотримуючись таких же

5

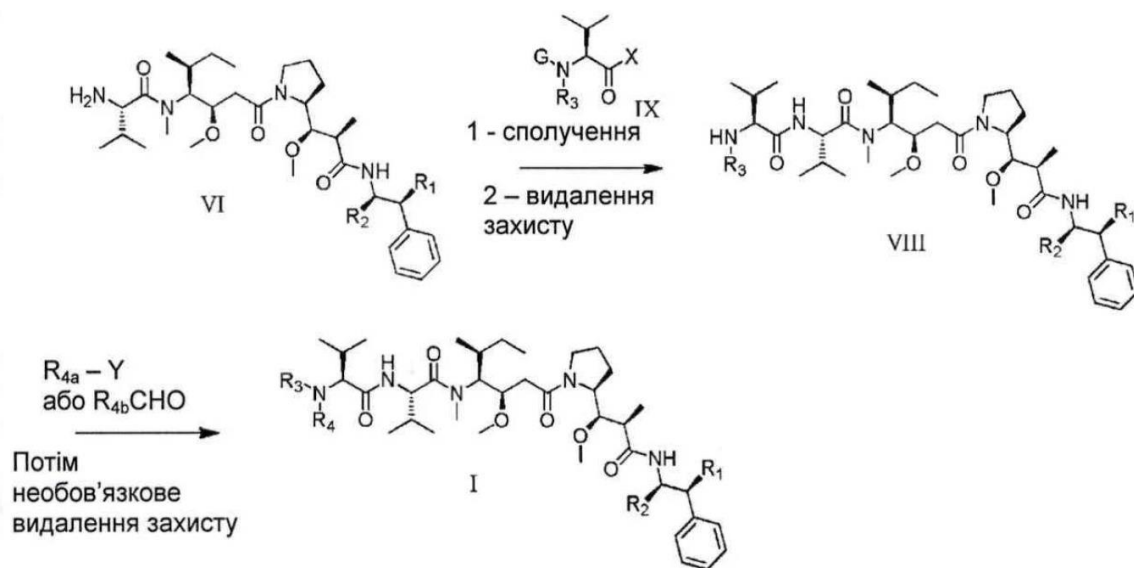
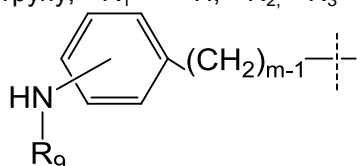


Схема 2

На схемі 2 проілюстровано другий загальний спосіб, який можна використовувати для одержання лікарського засобу. У наведених вище загальних формулах G являє собою захисну групу, R₁ - H, R₂, R₃ і R_{4a} є такими, як визначено вище, і R_{4b} являє собою

10



На першій стадії сполуку (IX), захищену на її аминній функціональній групі захисною групою G, конденсують з сполукою (VI). X може являти собою групу, що заміщується, наприклад, атом хлору. У цьому випадку перша стадія полягає у взаємодії між хлорангідридом і аміном. Цю взаємодію можна проводити, використовуючи способи і методи, добре відомі фахівцям в даній області техніки. При одному особливо прийнятному способі викликають взаємодію двох хімічних сполук в присутності органічної або неорганічної основи, наприклад Et₃N, iPr₂NEt, піридину, NaNH, Cs₂CO₃, K₂CO₃ в розчиннику, такому як ТГФ, дихлорметан, ДМФ, ДМСО, при температурі, зокрема, від -20 °С до 100 °С. X може також являти собою гідроксил. В цьому випадку перша стадія являє собою реакцію конденсації між карбоною кислотою (IX) та аміном (VI). Цю взаємодію можна проводити, дотримуючись способів і методів, добре відомих фахівцям в даній області техніки. При одному особливо прийнятному способі викликають взаємодію двох хімічних сполук в присутності 1-(3-диметиламінопропіл)-3-етил-карбодіімід (EDC), 3-гідрокси-1,2,3-бензотриазин-4(3H)-он, третинного аміну, такого як діізопропілетиламін, в полярному апротонному розчиннику, такому як дихлорметан або ДМФ, при температурі, зокрема, від -15 °С до 40 °С. При іншому особливо прийнятному способі викликають взаємодію цих двох хімічних сполук в присутності діетилфосфороціанідату (DEPC), третинного аміну, такого як триетиламін, в полярному апротонному розчиннику, такому як дихлорметан або ДМФ, при температурі, зокрема, від -15 °С до 40 °С.

15

20

25

30

Після видалення захисту проміжної сполуки, використовуючи методи, добре відомі фахівцям в даній області техніки, одержана сполука (VIII) може призводити до одержання лікарського засобу після взаємодії з R₄Y. В цьому випадку Y являє собою групу, що заміщується, таку як Cl, Br, I, OSO₂CH₃, OSO₂CF₃ або O-тозил. Реакцію проводять в присутності органічної або неорганічної основи, такої як Et₃N, iPr₂NEt, NaNH, Cs₂CO₃, K₂CO₃, в полярному безводному розчиннику, такому як дихлорметан, ТГФ, ДМФ, ДМСО, при температурі, зокрема, від -20° до 100 °С. При іншому особливо прийнятному способі викликають взаємодію сполуки (VIII) з

35

альдегідом формули $R_{4b}-CHO$, де R_{4b} є відповідним попереднику R_4 . В цьому випадку реакція являє собою відновне амінування в присутності відновного агента, такого як $NaBH_4$, $NaBH_3CN$, $NaBH(OAc)_3$, в полярному розчиннику, такому як 1,2-дихлоретан, дихлорметан, ТГФ, ДМФ, MeOH, необов'язково в присутності ізопропоксиду титану (IV), при pH, який можна регулювати додаванням кислоти, такої як оцтова кислота, при температурі від $-20^\circ C$ до $100^\circ C$.

На наведених вище схемах синтезу лікарський засіб може привести до одержання іншого лікарського засобу після додаткової стадії взаємодії, такого як омилення, наприклад, використовуючи способи, добре відомі фахівцям в даній області техніки, за допомогою яких група R_2 , що являє собою складний ефір ($COOMe$), змінюється на групу R_2 , що являє собою карбонову кислоту ($COOH$).

Якщо бажано виділити лікарський засіб, що містить щонайменше одну функціональну групу основи в стані кислотнo-адитивної солі, це можливо шляхом обробки лікарського засобу у формі вільної основи (що містить щонайменше одну функціональну групу основи) відповідною кислотою, переважно в еквівалентній кількості. Відповідна кислота може, зокрема, являти собою трифтороцтову кислоту.

III – Лінкер (L)

«Лінкер», «лінкерних ланка», «L» або «зв'язок» означають в даному винаході хімічне угруповання, що містить ковалентний зв'язок або ланцюг атомів, який ковалентно приєднує антитіло щонайменше до одного лікарського засобу.

Лінкери можуть бути одержані з використанням різноманітних біфункціональних агентів сполучення білків, таких як N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP), сукцинімідил-4-(N-малеїдометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), імінотіолан (IT), біфункціональних похідних складних імідоефірів (таких як диметиладипімідат HCl), активних складних ефірів (таких як дисукцинімідилсуберат), альдегідів (таких як глутаральдегід), біс-азидосполук (таких як біс(пара-азидобензоїл)гександіамін), біс-діазонієвих похідних (таких як біс(пара-діазонійбензоїл)-етилендіамін), діізоціанатів (таких як толуол-2,6-діізоціанат) і біс-активних сполук фтору (таких як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Вуглець-14-мічена 1-ізоціанатобензил-3-метилдіетилентриамінпентаоцтова кислота (MX-DTPA) є ілюстративним хелатуючим агентом для кон'югації цитотоксичних агентів з направляючою системою. Інші перехресно-зшиваючі агенти можуть являти собою BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC і сульфо-SMPB і SVSB (сукцинімідил-(4-вінілсульфон)бензоат), які мають в продажу (наприклад, від Pierce Biotechnology, Inc., Рокфорд, Іл., США).

Лінкер може бути «нерозщеплюваним» або «розщеплюваним».

У переважному втіленні винаходу лінкер являє собою «розщеплюваний лінкер», що сприяє вивільненню лікарського засобу в клітині. Наприклад, можна використовувати кислотолабільний лінкер, пептидазочутливий лінкер, фотоллабільний лінкер, диметильний лінкер або дисульфід-містять лінкер. У переважному втіленні винаходу лінкер є розщеплювальним у внутрішньоклітинних умовах, так що в результаті розщеплення лінкера лікарський засіб вивільняється від антитіла у внутрішньоклітинне середовище.

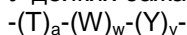
Наприклад, в деяких втіленнях винаходу лінкер є розщеплюючим розщеплювальним агентом, присутнім у внутрішньоклітинному середовищі (наприклад, всередині лізосоми, або ендосоми, або кавеоли). Лінкер може являти собою, наприклад, пептидильний лінкер, який розщеплюється внутрішньоклітинними ферментами пептидазою або протеазою, включаючи без обмежень лізосомальну або ендосомальну протеазу. Як правило, пептидильний лінкер містить щонайменше дві послідовні амінокислоти або щонайменше три послідовні амінокислоти, або має довжину щонайменше дві амінокислоти або довжину щонайменше три амінокислоти. Розщеплюючі агенти можуть включати катепсини B і D і плазмін, при цьому відомо, що всі ці агенти гідролізують дипептидні похідні лікарських засобів, приводячи в результаті до вивільнення активного лікарського засобу всередині клітин-мішеней. Наприклад, можна використовувати пептидильний лінкер, розщеплюваний тіолзалежною протеазою катепсином-B, володіє високим рівнем експресії в раковій тканині (наприклад, лінкер, що містить або являє собою Phe-Leu або Gly-Phe-Leu-Gly). У конкретних втіленнях винаходу пептидильний лінкер, розщеплюваний внутрішньоклітинною протеазою, містить або являє собою Val-Cit або Phe-Lys. Одна з переваг використання внутрішньоклітинного протеолітичного вивільнення лікарського засобу полягає в тому, що при кон'югації лікарський засіб, як правило, аттенується, і стабільності кон'югатів в сироватці, як правило, високі.

В інших втіленнях винаходу розщеплюваний лінкер є pH-чутливим, тобто чутливим до гідролізу при деяких значеннях pH. У характерному разі pH-чутливий лінкер є гідролізованим в

кислих умовах. Наприклад, можна використовувати кислотолабільний лінкер, який піддається гідролізу в лізосомах (наприклад, гідразон, семікарбазон, тіосемікарбазон, цис-аконітовий амід, складний ортоєфір, ацеталь, кеталь або тощо). Такі лінкери відносно стабільні в нейтральних умовах pH, наприклад, в крові, але нестабільні при pH менше 5,5 або 5,0, приблизному pH лізосом. У деяких втіленнях винаходу гідролізований лінкер являє собою простий тіоефірний лінкер (такий як, наприклад, простий тіоефір, приєднаний до лікарського засобу за допомогою ацилгідразонового зв'язку).

Ще в інших втіленнях лінкер є розщеплюєваним в відновних умовах (наприклад, дисульфідний лінкер). У даній області техніки відомий ряд дисульфідних лінкерів, що включають, наприклад, лінкери, які можуть бути утворені з використанням SATA (N-сукцинімідил-S-ацетилтіоацетат), SPDP (N-сукцинімідил-3-(2-піридилдитіо)пропіонат), SPDB (N-сукцинімідил-3-(2-піридилтіо)бутират) і SMPT (N-сукцинімідил-оксикарбоніл-альфа-метил-альфа-(2-піридил-дитіо)толуол).

У деяких бажаних втіленнях винаходу лінкерна ланка може мати таку загальну формулу:



де:

T являє собою подовжуючу ланку;

a дорівнює 0 або 1;

W являє собою амінокислотну ланку;

w являє собою ціле число в діапазоні від 0 до 12;

Y являє собою спейсерну ланку;

y дорівнює 0, 1 або 2.

Подовжуюча ланка (T) при її наявності пов'язує антитіло з амінокислотною ланкою (W) при її наявності, або зі спейсерною ланкою при її наявності, або безпосередньо з лікарським засобом. Корисні функціональні групи, які можуть бути присутніми на антитілі, або природним шляхом, або за допомогою хімічної маніпуляції, включають сульфгідрил, аміно, гідроксил, аномірну гідроксильну групу вуглеводу і карбоксил. Відповідними функціональними групами є сульфгідрил і аміно. Сульфгідрильні групи можуть бути утворені шляхом відновлення внутрішньомолекулярних дисульфідних зв'язків антитіла при їх наявності. Альтернативно сульфгідрильні групи можуть бути утворені шляхом взаємодії аміногрупи лізінового угруповання антитіла з 2-імінотіолоном або з іншими реагентами, що утворюють сульфгідрил. У конкретних втіленнях винаходу антитіло сконструйовано таким чином, що воно несе один або більше лізинів. Більш переважно антитіло може бути сконструйовано таким чином, що воно несе один або більше цистеїнів (див. ThioMab).

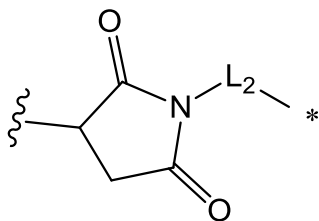
У деяких конкретних втіленнях винаходу подовжуюча ланка утворює зв'язок з атомом сірки антитіла. Атом сірки може мати походження від сульфгідрильної (-SH) групи відновленого антитіла.

У деяких інших конкретних втіленнях винаходу подовжуюча ланка пов'язана з антитілом за допомогою дисульфідного зв'язку між атомом сірки антитіла і атомом сірки подовжуючої ланки.

В інших конкретних втіленнях винаходу активна група подовжуючої ланки містить активний центр, який може взаємодіяти з аміногрупою антитіла. Аміногрупа може являти собою аміногрупу аргініну або лізину. Відповідні активні центри, які взаємодіють з амінами, включають без обмежень активовані складні ефіри (такі як сукцинімідні складні ефіри, 4-нітрофенільні складні ефіри, пентафторфенільні складні ефіри), ангідриди, хлорангідриди, сульфонілхлориди, ізоціанати та ізотіоціанати.

Ще в одному іншому аспекті винаходу реакційна функціональна група подовжуючої ланки містить активний центр, який взаємодіє з модифікованою вуглеводною групою, яка може бути присутньою на антитілі. У конкретному втіленні винаходу антитіло глікозильованого ферментативним шляхом з одержанням вуглеводного угруповання або глікозильованого природним шляхом. Вуглевод можна піддавати м'якому окисленню реагентом, таким як періодат натрію, і одержана в результаті карбонільна ланка окисленого вуглеводу може бути конденсована з подовжуючою ланкою, яка містить функціональну групу, таку як гідразид, оксим, активний амін, гідразин, тіосемікарбазид, гідразинкарбоксилат або арилгідразид.

Згідно конкретного втілення винаходу подовжуюча ланка має наступну формулу:



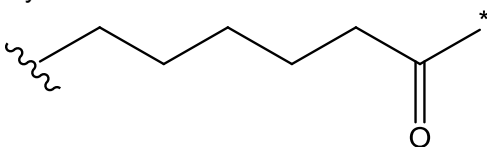
де

L_2 являє собою (C_4-C_{10}) циклоалкіл-карбоніл, (C_2-C_6) алкіл або (C_2-C_6) алкіл-карбоніл (циклоалкільні або алкільні угруповання пов'язані з атомом азоту малеїмідного угруповання), зірочкою вказана точка приєднання до амінокислотної ланки при її наявності, до спейсерної ланки при її наявності або до лікарського засобу D, і

хвилястою лінією вказана точка приєднання до антитіла Ab.

Під « (C_4-C_{10}) циклоалкілом» в даному винаході мають на увазі вуглеводневий цикл, що має від 4 до 10 атомів вуглецю, що включає без обмежень цикlopентил, циклогексил тощо.

L_2 може переважно являти собою (C_2-C_6) алкіл-карбоніл, такий як пентил-карбоніл, наступної формули:



де

зірочкою вказана точка приєднання до амінокислотної ланки при її наявності, до спейсерної ланки при її наявності або до лікарського засобу D; і

хвилястою лінією вказана точка приєднання до атому азоту малеїмідного угруповання.

Амінокислотну ланку (W) при її наявності пов'язує подовжуюча ланка (T) при її наявності або в іншому випадку антитіло з спейсерною ланкою (Y) при наявності спейсерної ланки або з лікарським засобом під час відсутності спейсерної ланки.

Як зазначено вище, $(W)_w$ відсутня (w дорівнює 0) або може являти собою дипептидну, трипептидну, тетрапептидну, пентапептидну, гексапептидну, гептапептидну, октапептидну, нонапептидну, декапептидну, ундекапептидну або додекапептидну ланку, де амінокислоти, що утворюють пептиди, можуть відрізнятися один від одного.

Так, $(W)_w$ може бути представлена наступною формулою: $(W1)_{w1}(W2)_{w2}(W3)_{w3}(W4)_{w4}(W5)_{w5}$, де кожний з $W1-W5$ являє собою незалежно один від одного амінокислотну ланку, і кожна $w1-w5$ дорівнює 0 або 1.

У деяких втіленнях винаходу амінокислотна ланка $(W)_w$ може містити амінокислотні залишки, такі як зустрічаються в природі, а також мінорні амінокислоти і такі, що не зустрічаються в природі аналоги амінокислот, такі як цитрулін.

Амінокислотні залишки амінокислотної ланки $(W)_w$ включають без обмеження аланін, валін, лейцин, ізолейцин, метіонін, фенілаланін, триптофан, пролін, лізин, незахищений або захищений ацетилом або формілом, аргінін, аргінін, незахищений або захищений тозилними групами або нітрогрупами, гістидин, орнітин, орнітин, захищений ацетилом або формілом, і цитрулін. Ілюстративні компоненти амінокислотного лінкера включають переважно дипептид, трипептид, тетрапептид або пентапептид, зокрема, дипептид або трипептид.

Ілюстративні дипептиди включають: Val-Cit, Ala-Val, Ala-Ala, Val-Ala, Lys-Lys, Cit-Cit, Val-Lys, Ala-Phe, Phe-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, Phe-Ala, Phe-N⁹-тозил-Arg, Phe-N⁹-нітро-Arg.

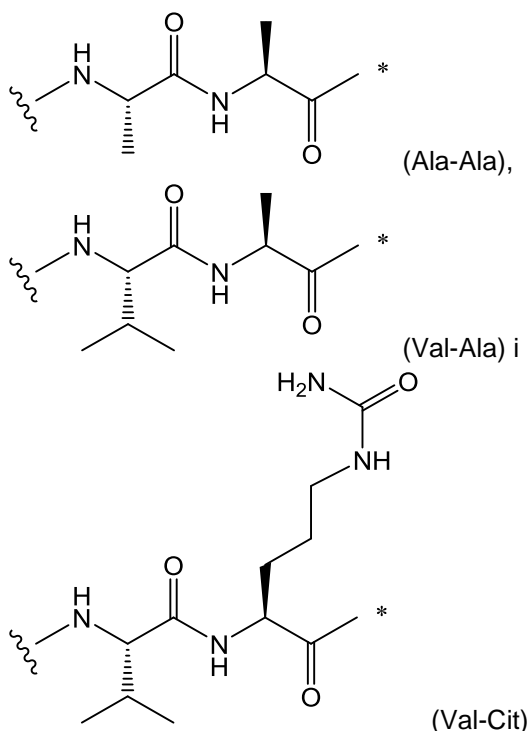
Ілюстративні трипептиди включають: Val-Ala-Val, Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Phe-Phe-Lys, Gly-Gly-Gly, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys.

Ілюстративні тетрапептиди включають: Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO 53), Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO 54).

Ілюстративний пентапептид включає: Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO 55).

Згідно конкретного втілення винаходу $(W)_w$ може являти собою дипептид (тобто w дорівнює 2), такий як Val-Cit, або в лінкері відсутня амінокислотна ланка (w дорівнює 0). При відсутності в лінкері амінокислотної ланки переважно в ньому також відсутня спейсерна ланка.

Згідно з переважним втіленням винаходу w дорівнює 0 (тобто $(W)_w$ являє собою простий зв'язок) або w дорівнює 2 (тобто $(W)_w$ являє собою дипептид) і $(W)_w$ може бути, таким чином, вибрана з:



i, зокрема, являє собою Val-Cit,

5 де

зірочкою вказана точка приєднання до спейсерної ланки при її наявності або до лікарському засобу D; i

хвилястою лінією вказана точка приєднання до L₂.

10 Компоненти амінокислотного лінкера можуть бути сконструйовані і оптимізовані за їх селективністю до ферментативного розщеплення конкретним ферментом, наприклад, пухлиноасоційованою протеазою, катепсином B, C і D або плазміновою протеазою.

Амінокислотна ланка лінкера може ферментативно розщеплюватися ферментом, що включає без обмеження пухлиноасоційовану протеазу, з вивільненням лікарського засобу.

15 Амінокислотна ланка може бути сконструйована і оптимізована за її селективністю до ферментативного розщеплення конкретною пухлиноасоційованою протеазою. Відповідні ланки є ланками, розщеплення яких каталізується протеазами, катепсином B, C і D та плазміном.

20 Спейсерна ланка (Y) при її наявності пов'язує амінокислотну ланку при її наявності або подовжуючу ланку при її наявності або в іншому випадку антитіло з лікарським засобом. Спейсерні ланки належать до двох різних типів: саморозщеплювальні і не саморозщеплювальні. Не саморозщеплювальна спейсерна ланка являє собою ланку, в якій вся спейсерна ланка або її частина залишається пов'язаною з лікарським засобом після ферментативного відщеплення амінокислотної ланки від кон'югата антитіла з лікарським засобом. Приклади не саморозщеплювальної спейсерної ланки включають без обмежень спейсерну ланку (гліцин-гліцин) і гліцинову спейсерну ланку. Для вивільнення лікарського засобу всередині клітини-мішені повинна відбуватися незалежна реакція гідролізу для розщеплення зв'язку гліцин-лікарська ланка.

25 У конкретному втіленні винаходу не саморозщеплювальна спейсерна ланка (Y) являє собою Gly.

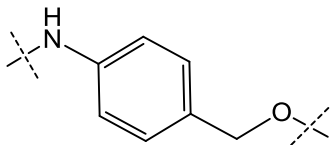
30 Альтернативно кон'югат антитіла з лікарським засобом, що містить саморозщеплювальну спейсерну ланку, може вивільняти лікарський засіб без необхідності в окремій стадії гідролізу. У цих втіленнях винаходу (Y) являє собою залишок ланки пара-амінобензилового спирту (PAB), який пов'язаний з (W)_w за допомогою атома азоту групи PAB і з'єднаний безпосередньо з лікарським засобом складноефірною, карбонатною, карбаматною або простою ефірною групою.

35 Інші приклади саморозщеплювальних спейсерів включають без обмежень ароматичні сполуки, електронно еквівалентні групі PAB, такі як залишки похідних 2-аміноімідазол-5-метанолу та орто або пара-амінобензилацеталей. Можна використовувати спейсери, що легко зазнають циклізації після гідролізу амідного зв'язку, такі як заміщені і незаміщені аміди 4-аміномасляної кислоти, заміщені відповідним чином біцикло[2.2.1] і біцикло[2.2.2] кільцеві системи та аміди 2-амінофенілпропіонової кислоти.

40 В альтернативному втіленні винаходу спейсерна ланка являє собою розгалужену біс

(гідроксиметил)стирольну (BHMS) ланку, яку можна використовувати для включення додаткових лікарських засобів.

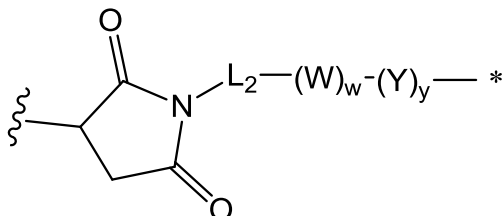
У конкретному втіленні винаходу спейсерна ланка (Y) являє собою PAB-карбоніл, де PAB



являє собою

5 дорівнює 1, або в лінкері відсутня спейсерна ланка (у дорівнює 0).

В конкретному втіленні винаходу лінкер має наступну формулу (III):

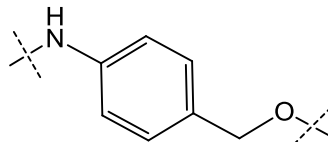


(III)

де

10 L_2 являє собою (C_4-C_{10}) циклоалкіл-карбоніл, (C_2-C_6) алкіл або (C_2-C_6) алкіл-карбоніл (де карбоніл цих угруповань при його наявності зв'язаний з $(W)_w$),

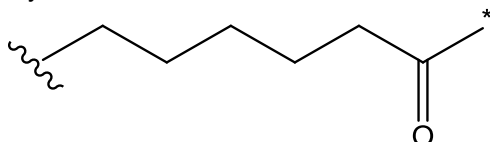
W являє собою амінокислотну ланку, де w являє собою ціле число, що складає від 0 до 5,



Y являє собою PAB-карбоніл, де PAB являє собою ланки PAB зв'язаний з карбонілом), і у дорівнює 0 або 1 (переважно у дорівнює 0, коли w дорівнює 0, і у дорівнює 0 або 1, коли w складає від 1 до 5),

15 зірочкою вказана точка приєднання до лікарського засобу D, і хвилястою лінією вказана точка приєднання до антитіла Ab.

Переважаю L_2 являє собою (C_2-C_6) алкіл-карбоніл, такий як пентил-карбоніл наступної формули:



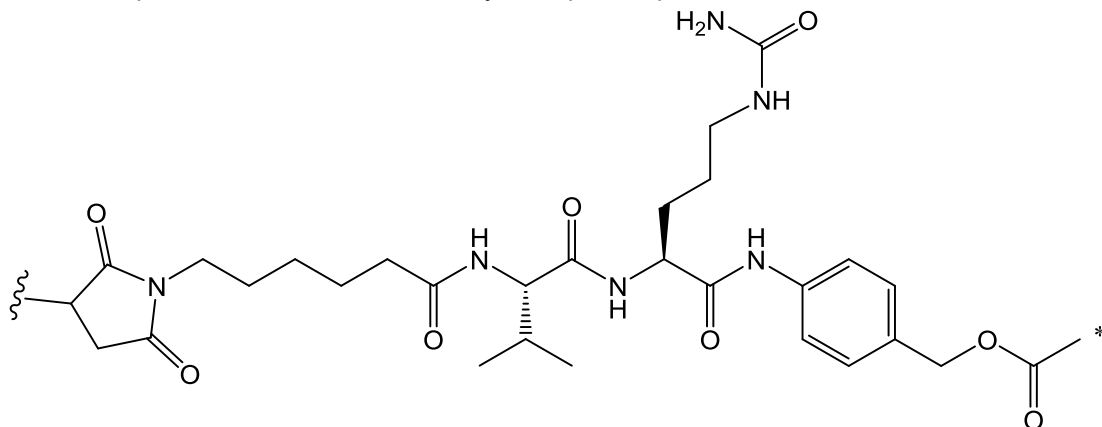
20

де

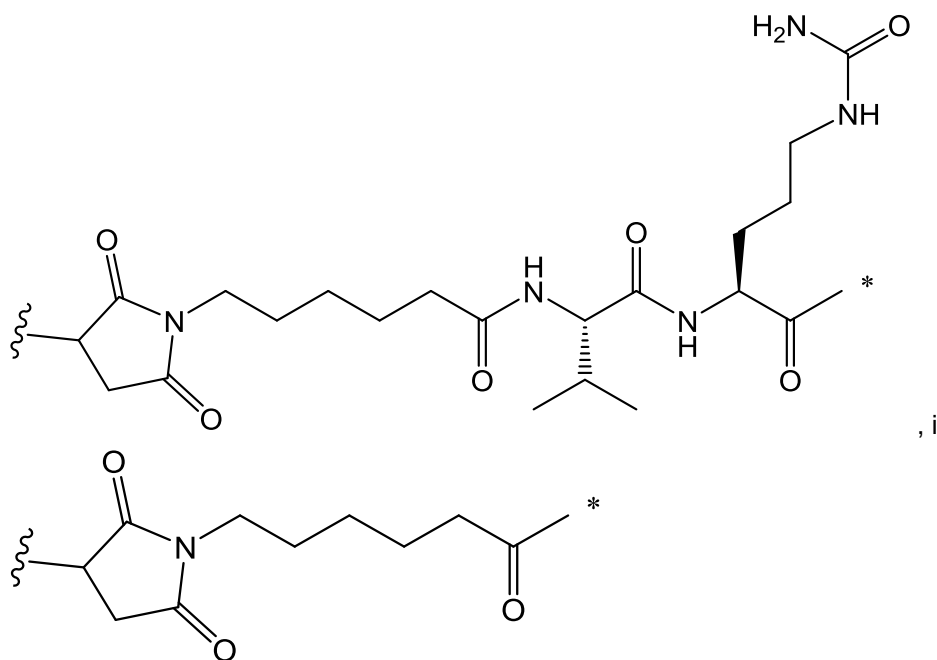
зірочкою вказана точка приєднання до $(W)_w$; і

хвилястою лінією вказана точка приєднання до атому азоту малеїмідного угруповання.

Згідно з переважним втілення винаходу лінкер L вибраний з:



25



де зірочкою вказана точка приєднання до лікарського засобу D, а хвилястою лінією вказана точка приєднання до антитіла Ab.

IV – Кон'югат антитіла з лікарським засобом (ADC)

У переважному втіленні винаходу кон'югат антитіла з лікарським засобом за винаходом може бути одержаний будь-яким способом, відомим фахівцям в даній області техніки, таким як, без обмежень, i) взаємодія нуклеофільної групи антитіла з двовалентним лінкерним реагентом з наступною взаємодією з нуклеофільною групою лікарського засобу або ii) взаємодія нуклеофільної групи лікарського засобу з двовалентним лінкерним реагентом з наступною взаємодією з нуклеофільною групою антитіла.

Нуклеофільні групи на антитілі включають без обмежень N-кінцеві амінні групи, амінні групи бічного ланцюга (наприклад, лізину), тіольні групи бічного ланцюга і гідроксильні або аміногрупи цукру в разі глікозильованого антитіла.

Нуклеофільні групи на лікарському засобі включають без обмежень амінні, тіольні і гідроксильні групи, і переважно амінні групи.

Амінні, тіольні і гідроксильні групи є нуклеофільними та здатні взаємодіяти з утворенням ковалентних зв'язків з електрофільними групами на лінкерних угрупованнях і лінкерних реагентах, що включають без обмежень активні складні ефіри, такі як складні ефіри N-гідроксисукциніміди (NHS), складні ефіри N-гідроксибензотриазоли (HOBT), галогенформіати і галогенангідриди; алкіл- і бензилгалогеніди, такі як галогенацетаміди; альдегіди; кетони; карбоксил і малеїмідні групи. Антитіло може мати відновлювані міжланцюгові дисульфідні зв'язки, тобто цистеїнові місточки. Антитіло можна зробити активним для кон'югації з лінкерними реагентами шляхом обробки відновлювальним агентом, таким як ДТТ (дитіотрейтол). Кожен цистеїновий місток, таким чином, теоретично утворює дві активні тіольні нуклеофільні групи. Додаткові нуклеофільні групи можна вводити в антитіло за допомогою будь-якої реакції, відомої фахівцям в даній області техніки. В якості необмежувального прикладу активні тіольні групи можна вводити в антитіло шляхом введення одного або більше залишків цистеїну.

Кон'югати антитіла з лікарським засобом можуть бути також одержані шляхом модифікації антитіла з введенням електрофільних угруповань, які можуть взаємодіяти з нуклеофільними замісниками на лінкерному реагенті. Цукри глікозильованого антитіла можуть бути окислені з утворенням альдегідних або кетонних груп, які можуть взаємодіяти з аміною групою лінкерних реагентів або лікарського засобу. Одержані в результаті іміногрупи, що являють собою Шиффові основи, можуть утворити стабільний зв'язок або можуть бути відновлені з утворенням стабільних аміних зв'язків. В одному втіленні винаходу в результаті взаємодії вуглеводної частини глікозильованого антитіла або з галактозооксидазою, або з мета-періодатом натрію можна одержати карбонільні (альдегідні або кетонні) групи в білку, які можуть взаємодіяти з відповідними групами на лікарському засіб. В іншому втіленні винаходу білки, що містять N-кінцеві залишки серину або треоніну, можуть взаємодіяти з мета-періодатом натрію з одержанням в результаті альдегіду замість першої амінокислоти.

У переважному втіленні винаходу кон'югат антитіла з лікарським засобом за винаходом

одержують шляхом підготовки угруповання лікарський засіб-лінкер з подальшим сполученням між нуклеофільною групою антитіла (наприклад, групою SH цистеїнового угруповання) і електрофільною групою угруповання лікарський засіб-лінкер (наприклад, малеїміду).

1. Лікарський засіб-лінкер

Угруповання лікарський засіб-лінкер може бути одержано шляхом сполучення:

- лінкера з лікарським засобом,
- частини лінкера з лікарським засобом до завершення синтезу лінкера,
- лінкера з частиною або попередником лікарського засобу до завершення синтезу лікарського засобу, або

- частини лінкера з частиною або попередником лікарського засобу до завершення синтезу лікарського засобу.

Реакції сполучення є добре відомими реакціями для фахівця в даній області техніки між нуклеофільною групою і електрофільною групою.

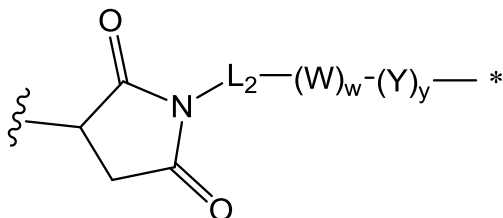
Нуклеофільна група може являти собою, зокрема, амінну, тіольну або гідроксильну групу. У переважному втіленні винаходу вона являє собою первинну або вторинну амінну групу.

Електрофільна група може являти собою карбоново-кислотну групу (COOH), необов'язково в активованій формі, або активоване карбонатне складноефірне угруповання.

Під «активованою формою» карбонової кислоти мають на увазі карбонову кислоту, в якій угруповання OH функціональної групи COOH заміщене активованою групою, що заміщується (LG), що забезпечує сполучення активованої карбоново-кислотної групи з аміногрупою з метою утворення амідного зв'язку і вивільнення сполуки LG-H. Активовані форми можуть являти собою активовані складні ефіри, активовані амідні, ангідриди або галогенангідриди, такі як хлорангідриди. Активовані складні ефіри включають похідні, утворені шляхом взаємодії карбоново-кислотної групи з N-гідроксибензотриазолом або N-гідроксисукцинімідом.

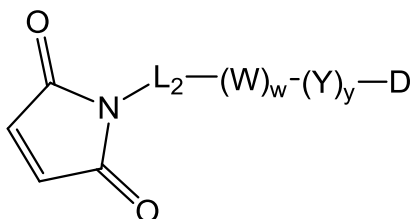
Під «активованим карбонатним складним ефіром» мають на увазі карбонатний складний ефір, що містить угруповання -OC(O)OR, в якому OR являє собою гарну групу, яка заміщується, що забезпечує сполучення активованого карбонатного складного ефіру з аміногрупою з метою утворення карбаматного угруповання і вивільнення сполуки ROH. Група R активованого карбонатного складного ефіру включає без обмежень пара-нітрофенільну, пентафторфенільну, 2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-ільну і бензильну групи, переважно пара-нітрофенільну і пентафторфенільну групи.

Коли лінкер має наступну формулу (III):



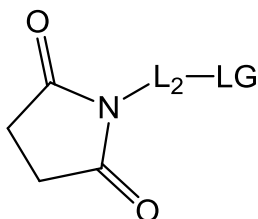
(III)

угруповання лікарський засіб-лінкер має наступну формулу (III):



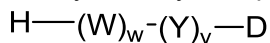
(IV)

і остання стадія синтезу угруповання лікарський засіб-лінкер в цілому являє собою сполучення сполуки наступної формули (V):



(V)

де L_2 є таким, як визначено вище, і LG являє собою групу, що заміщується, зокрема, галогенід, такий як хлорид або групу, одержану з N-гідроксисукциніміду, і сполуки наступної формули (VI):



5 (VI).

Коли у дорівнює 1 і Y - PAB-карбоніл, сполука формули (VI) може бути одержана шляхом сполучення між лікарським засобом (DH) і сполукою наступної формули (VII), переважно її захищеної форми:



10 (VII)

де W і w є такими, як визначено вище, і R є таким, як вказано у визначенні «активованого карбонатного складного ефіру», і G являє собою H або захисну групу.

Коли сполука формули (VII) знаходиться в захищеній формі, необхідна кінцева стадія видалення захисту.

15 Коли у дорівнює 0, сполука (VI) має формулу $H-(W)_w-D$, де $(W)_w$ і переважно D складаються з амінокислотних ланок. Отже, сполука (VI) може бути одержана в даному випадку способом традиційного пептидного синтезу, добре відомим фахівцям в даній області техніки.

2. Аб-лінкер-лікарський засіб

20 Бажане втілення відповідно до винаходу полягає в сполученні між цистеїном, присутнім на антитілі, і електрофільної групою угруповання лікарський засіб-лінкер, переважно з малеїмідним угрупованням, присутнім на угрупованні лікарський засіб-лінкер.

Сполучення малеїмід-цистеїн можна виконувати способами, добре відомими фахівцям в даній області техніки.

25 В цілому антитіла не містять велику кількість або зовсім не містять вільних і активних тиольних груп цистеїну, які можна зшивати з угрупованням лікарського засобу. Більшість тиольних груп цистеїнових залишків в антитілах існує у вигляді дисульфідних місточків і повинні бути відновлені відновлюючим агентом, таким як дитіотрейтол (ДТТ) або трис-2-карбоксіетилфосфін (ТСЕР), в умовах часткового або повного відновлення. Навантаження (відношення лікарський засіб/антитіло) ADC можна регулювати кількома різними шляхами, що включають: (i) обмеження молярного надлишку проміжної сполуки лікарський засіб-лінкер (DL) або лінкерного реагенту відносно антитіла, (ii) обмеження часу або температури реакції кон'югації, і (iii) умови часткового або обмеженого відновлення для модифікації тіолу цистеїну.

30 Структура дисульфідного зв'язку IgG людини в даний час добре встановлена (огляд в Liu and May, mAbs 4 (2012): 17-23). Насправді є безліч подібностей і деякі відмінності, що стосуються структур дисульфідного зв'язку 4 підкласів IgG людини, а саме IgG1, IgG2, IgG3 і IgG4. Всі підкласи IgG містять 12 інваріантних внутрішньоланцюгових дисульфідних місточків, і відмінності полягають в їх міжланцюгових дисульфідних зв'язках, утворених між важким і легким ланцюгами. Кожний внутрішньоланцюговий дисульфідний зв'язок асоційований з окремим доменом IgG, тобто варіабельними (VL і VH) і константними (CL, CH1, CH2 і CH3) доменами. 40 важкі ланцюги зшиті в їх шарнірній області варіабельності числом дисульфідних місточків: 2 для IgG1 і IgG4, 4 для IgG2 і 11 для IgG3. Важкі і легкі ланцюги IgG1 з'єднані дисульфідним зв'язком між останнім залишком цистеїну легкого ланцюга і п'ятим залишком важкого ланцюга, тоді як для інших підкласів, IgG2, IgG3 і IgG4, легкий ланцюг зшитий з важким ланцюгом дисульфідним зв'язком між останнім залишком цистеїну легкого ланцюга і третім залишком цистеїну важкого ланцюга, який розташований на межі доменів VH і CH1. Структури дисульфідних зв'язків, що відрізняються від цих класичних структур, описані для IgG2 і IgG4 (огляд в Liu and May, mAbs 4 (2012): 17-23). Міжланцюгові дисульфідні зв'язки в високому ступені піддаються впливу розчинника і, отже, значно активніші, ніж внутрішньоланцюгові дисульфідні зв'язки, які поглиблені в антипаралельних структурах бета-шару всередині кожного домена і не піддаються впливу розчинника. З цих причин незалежно від ізо типу антитіла сполучення буде відбуватися на міжланцюгових відкритих залишках цистеїну після відновлення в м'яких умовах. Таким чином, кожен міжланцюговий дисульфідний місточок може теоретично утворити два центри кон'югації.

55 Додаткові нуклеофільні групи можна вводити в антитіла за допомогою взаємодії лізину з 2-імінотіолоном (реагентом Трота), що приводить в результаті до перетворення аміну в тіол. Активні тиольні групи також можна вводити в антитіло (або його фрагмент) шляхом конструювання одного, двох, трьох, чотирьох або більше залишків цистеїну (наприклад, одержання мутантних антитіл, що містять один або більше ненативних амінокислотних залишків цистеїну). У патенті US 7521541 заявлено конструювання антитіл шляхом введення активних

цистеїнових амінокислот.

Цистеїнові амінокислоти можуть бути сконструйовані в активних центрах в антитілі, і які не утворюють внутрішньоланцюгові або міжмолекулярні дисульфідні зшивання (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26 (8): 925-932; Dornan et al (2009) Blood 114 (13): 2721-2729; US 7521541; US 7723485; WO2009/052249). Сконструйовані тіоли цистеїну можуть взаємодіяти з лінкерними реагентами або з реагентами лікарський засіб-лінкер за даним винаходом, які мають взаємодіючі з тіолом, електрофільні групи, такі як малеїмід, або альфа-галогенаміди з утворенням ADC з антитілами з сконструйованими цистеїнами і угрупованнями лікарського засобу. Таким чином, положення угруповання лікарського засобу може бути сконструйовано, відрегульовано і відомо. Навантаження лікарським засобом можна регулювати, оскільки сконструйовані тіольні групи цистеїну в характерному випадку взаємодіють з лінкерними реагентами, взаємодіючими з тіолами, або реагентами лікарський засіб-лінкер з високим виходом. В результаті конструювання IgG антитіла з введенням амінокислоти цистеїну шляхом заміни в одному сайті на важкому або легкому ланцюзі одержують два нових цистеїни на симетричному антитілі. Навантаження лікарським засобом близько 2 може бути досягнуто майже з однорідністю продукту кон'югації ADC.

Де більше ніж одна нуклеофільна або електрофільна група антитіла взаємодіє з проміжною сполукою лікарський засіб-лінкер або лінкерним реагентом з наступною взаємодією з реагентом угруповання лікарського засобу, одержаний в результаті продукт являє собою суміш сполук ADC з розподілом угруповань лікарського засобу, приєднаних до антитіла, наприклад, 1, 2, 3 і т.д. Способами рідинної хроматографії, такими як полімерна звернена фаза (ПЛЗФ) і гідрофобна інтерактивна хроматографія (ГІХ), можна розділяти сполуки в суміші за величиною навантаження лікарським засобом. Можна виділити препарати ADC з одною величиною навантаження лікарським засобом (p), проте, ці ADC з одною величиною навантаження лікарським засобом можуть все ж являти собою гетерогенні суміші, оскільки угруповання лікарського засобу можуть бути приєднані за допомогою лінкера в різних сайтах на антитілі.

Для деяких кон'югатів антитіло-лікарський засіб частку лікарського засобу можна обмежити числом сайтів приєднання на антитілі. Високе навантаження лікарським засобом, наприклад, частка лікарського засобу понад 5, може викликати агрегацію, нерозчинність, токсичність або втрату клітинної проникності деяких кон'югатів антитіло-лікарський засіб. Як правило, в ході реакції кон'югації з антитілом кон'югують менше число угруповань лікарського засобу, ніж теоретичний максимум.

Навантаження лікарським засобом, також звана відношенням лікарського засобу до антитіла (DAR), являє собою середнє число угруповань лікарського засобу на клітинно-зв'язуючий агент.

У разі ізотипів антитіла IgG1 і IgG4, де лікарські засоби пов'язують з цистеїнами після часткового відновлення антитіла, навантаження лікарським засобом може перебувати в діапазоні від 1 до 8 угруповань лікарського засобу (D) на антитіло, тобто де 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 і 8 угруповань лікарського засобу ковалентно приєднані до антитіла.

У разі ізотипу антитіла IgG2, де лікарські засоби пов'язують з цистеїнами після часткового відновлення антитіла, навантаження лікарським засобом може перебувати в діапазоні від 1 до 12 угруповань лікарського засобу (D) на антитіло, тобто де 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 і 12 угруповань лікарського засобу ковалентно приєднані до антитіла.

Композиції ADC включають колекції клітинно-зв'язуючих агентів, наприклад, антитіл, кон'югованих з лікарськими засобами в кількості, що знаходиться в діапазоні від 1 до 8 або від 1 до 12.

Середнє число угруповань лікарського засобу на антитіло в препаратах ADC з реакцій кон'югації можна охарактеризувати традиційними методами, такими як УФ-спектрометрія, високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) з оберненою фазою, ГІХ, мас-спектрометрія, кількісний аналіз ІФА і електрофорез.

В якості необмежувального втілення винаходу в даному документі представлена кон'югація з антитілом c208F2. В цьому випадку лікарський засіб піддають сполученню щонайменше з одним цистеїном, обраним з i) залишку Cys в положенні 214 легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO 28 і ii) залишків Cys в положенні 223, 229 і 232 важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO 23.

В якості необмежувального втілення винаходу в даному документі представлена кон'югація з антитілом c208F2. В цьому випадку лікарський засіб піддають сполученню з двома, трьома або чотирма цистеїнами, вибраними з i) залишку Cys в положенні 214 легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO 28 і ii) залишків Cys в положенні 223, 229 і 232 важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO 23.

В якості необмежувального втілення винаходу в даному документі представлена кон'югація з антитілом hz208F2. (вар. 1). В цьому випадку лікарський засіб піддають сполученню щонайменше з одним цистеїном, вибраним з i) залишку Cys в положенні 214 легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO 39 і ii) залишків Cys в положенні 223, 229 і 232 важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO 37.

В якості необмежувального втілення винаходу в даному документі представлена кон'югація з антитілом hz208F2 (вар. 3). В цьому випадку лікарський засіб піддають сполученню з двома, трьома або чотирма цистеїнами, вибраними з i) залишку Cys в положенні 214 легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO 40 і ii) залишків Cys в положенні 223, 229 і 232 важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO 38.

Альтернатива полягає в сполученні лізину. Антитіло може містити, наприклад, багато залишків лізину, які не взаємодіють з проміжною сполукою лікарський засіб-лінкер (D-L) або з лінкерним реагентом. Тільки найбільш активні групи лізину можуть взаємодіяти з лінкерним реагентом, що реагує з аміном. Також тільки найбільш активні тіольні групи цистеїну можуть взаємодіяти з лінкерним реагентом, що реагує з тіолом.

У разі зв'язування сполук за винаходом з лізінами навантаження лікарським засобом може перебувати в діапазоні від 1 до 80 угруповань лікарського засобу (D) на клітинне антитіло, хоча може бути переважна верхня межа 40, 20, 10 або 8. Композиції ADC включають колекції клітинно-зв'язуючих агентів, наприклад, антитіл, кон'югованих з лікарськими засобами в кількості, що знаходиться в діапазоні від 1 до 10 або від 1 до 8.

ADC формули (I) відповідно до винаходу може перебувати в формі фармацевтично прийнятної солі.

В даному винаході під «фармацевтично прийнятним» мають на увазі те, що можна застосовувати при одержанні фармацевтичної композиції, в цілому безпечної, нетоксичної та ні біологічно, ні інакше небажаної, і прийнятною як для ветеринарного застосування, так і для фармацевтичного застосування для людини.

Під «фармацевтично прийнятною сіллю» сполуки мають на увазі сіль, яка є фармацевтично прийнятною, як визначено в даному документі, і яка має бажану фармакологічну активність вихідної сполуки.

Фармацевтично прийнятні солі, зокрема, включають:

(1) фармацевтично прийнятні кислотно-адитивні солі, утворені з фармацевтично прийнятними неорганічними кислотами, такими як хлористоводнева, бромистоводнева, фосфорна, сірчана і подібні кислоти; або утворені з фармацевтично прийнятними органічними кислотами, такими як оцтова, трифтороцтова, пропіонова, бурштинова, фумарова, яблучна, винна, лимонна, аскорбінова, малеїнова, глутамінова, бензойна, саліцилова, толуолсульфонова, метансульфонова, стеаринова, молочна і подібні кислоти; і

(2) фармацевтично прийнятні основно-адитивні солі, утворені в разі, коли протон кислоти, присутній у вихідній сполуці, або заміщений іоном металу, наприклад, іоном лужного металу, іоном лужноземельного металу або іоном алюмінію; або координований з фармацевтично прийнятною органічною основою, такою як лізин, аргінін тощо; або з фармацевтично прийнятною неорганічною основою, такою як гідроксид натрію, поташ, гідроксид кальцію тощо.

Ці солі можуть бути одержані із сполук за винаходом, що містять основну або кислотну функціональну групу, і відповідних кислот або основ з використанням традиційних хімічних методів.

V – Лікування

Нарешті, винахід відноситься до ADC, як описано вище, для застосування як лікарського засобу, зокрема, при лікуванні раку.

Наступним об'єктом даного винаходу є сполука формули (I), така як визначено вище, для застосування як лікарського препарату, зокрема, для лікування раку.

Даний винахід також відноситься до застосування сполуки формули (I), такої як визначено вище, для одержання лікарського препарату, зокрема, призначеного для лікування раку.

Даний винахід також відноситься до способу лікування раку, який включає введення людині, що потребує цього, ефективної кількості сполуки формули (I), такої як визначено вище.

Форми раку можуть бути переважно вибрані з IGF-1R-обумовлених форм раку, що включають пухлинні клітини, які експресують або володіють гіперекспресією повнорозмірного IGF-1R або його ділянки на їх поверхні.

Більш конкретно ці форми раку являють собою рак молочної залози, рак ободової кишки, карциному стравоходу, печінково-клітинний рак, рак шлунка, гліому, рак легені, меланому, остеосаркому, рак яєчника, рак передміхурової залози, рабдоміосаркому, рак нирки, рак щитовидної залози, рак ендометрію матки, шванному, нейробластому, плоскоклітинний рак

порожнини рота, мезотеліому, лейоміосаркому і будь-які лікарсько-стійкі явища або форми раку.

Щоб уникнути сумнівів під лікарсько-стійкими IGF-1R-експресуючими формами раку необхідно розуміти не тільки стійкі раки, які початково експресують IGF-1R, але також форми раку, які початково не виявляють експресії або гіперекспресії IGF-1R, але починають експресувати IGF-1R, як тільки стають стійкими до попередньої терапії.

Іншим об'єктом винаходу є фармацевтична композиція, що містить ADC, як розкрито в описі.

Більш конкретно винахід відноситься до фармацевтичної композиції, що містить ADC за винаходом, щонайменше з ексципієнтом та/або фармацевтично прийнятним носієм.

В даному описі вираз «фармацевтично прийнятний носій» або «ексципієнт» призначений для позначення сполуки або комбінації сполук, що входять в фармацевтичну композицію, що не викликають вторинних реакцій, і які дають можливість, наприклад, полегшити введення активної (-их) сполук (и), збільшити тривалість її (їх) перебування та/або ефективності в організмі, збільшити її (їх) розчинність в розчині або, крім того, поліпшити її (їх) збереження. Ці фармацевтично прийнятні носії та наповнювачі добре відомі і пристосовані фахівцем в даній області техніки в залежності від їх природи і вибраного способу введення активної (-их) сполук (-и).

Активний інгредієнт можна вводити в одиничних формах введення, в суміші з традиційними фармацевтичними носіями, тваринам або людям. Відповідні одиничні форми введення включають форми за допомогою перорального шляху і форми для введення за допомогою парентерального шляху (підшкірного, внутрішньошкірного, внутрішньом'язового або внутрішньовенного).

В якості твердих композицій для перорального введення можна застосовувати таблетки, пігулки, порошки (тверді або м'які желатинові капсули) або гранули. У цих композиціях активний інгредієнт за винаходом змішують з одним або більше інертних розріджувачів, таких як крохмаль, целюлоза, сахароза, лактоза або діоксид кремнію, в потоці аргону. Ці композиції можуть також містити речовини, що відрізняються від розріджувачів, наприклад одна або більше змащувальних речовин, таких як стеарат магнію або тальк, барвник, покриття (таблетки з покриттям) або глазур.

Стерильні композиції для парентерального введення можуть переважно являти собою водні або неводні розчини, суспензії або емульсії. В якості розчинника або носія можна застосовувати воду, пропіленгліколь, поліетиленгліколь, рослинні олії, зокрема, оливкову олію, ін'єкційні органічні складні ефіри, наприклад, етилолеат, або інші відповідні органічні розчинники. Ці композиції можуть також містити ад'юванти, зокрема, зволожуючі, ізотонічні, емульгуючі, диспергуючі і стабілізуючі засоби. Стерилізацію можна виконувати декількома шляхами, наприклад, шляхом стерилізаційного фільтрування, шляхом включення стерилізуючих агентів в композицію, шляхом опромінювання або шляхом нагрівання. Їх можна також готувати у формі твердих стерильних композицій, які можна розчиняти під час застосування в стерильній воді або будь-якому іншому ін'єкційному стерильному середовищі.

Переважно ці ADC будуть вводити системним шляхом, зокрема, внутрішньовенним шляхом, внутрішньом'язовим, внутрішньошкірним, інтраперитонеальним або підшкірним шляхом, або пероральним шляхом. Більш переважно композицію, яка містить ADC відповідно до винаходу, будуть вводити кілька разів послідовно.

Винахід, таким чином, також відноситься до набору, який містить щонайменше i) кон'югат антитіла з лікарським засобом та/або фармацевтичну композицію відповідно до винаходу і ii) шприц, або флакон, або ампулу, в які поміщають кон'югат антитіла з лікарським засобом та/або фармацевтичну композицію.

Способи її введення, дозування і оптимальні фармацевтичні форми можуть бути визначені відповідно до критеріїв, що зазвичай приймаються до уваги при встановленні терапії, адаптованої для пацієнта, такими як, наприклад, вік або маса тіла пацієнта, серйозність його/її загального стану, переносимість терапії і зазначених вторинних ефектів.

Інші характеристики і переваги винаходу очевидні при продовженні описування прикладами і графічними матеріалами, підписи до яких наведено нижче

Підписи до графічних матеріалів

Фігури 1A-1C: Зв'язування антитіла з нативним IGF-1R людини на підставі аналізів FACS. На Фіг. 1A представлена крива титрування на лінії клітин MCF-7. MFI являє собою середню інтенсивність флуоресценції. На Фіг. 1B представлена EC₅₀ обох антитіл до IGF-1R, мишиного та химерного, на лінії клітин MCF-7. На Фіг. 1C представлена V_{max} химерних антитіл до IGF-1R на лінії клітин MCF-7.

Фігури 2A-2B: Оцінка розпізнавання hIGF-1R з використанням трансфікованих клітин в порівнянні з нетрансфікованими. На фіг. 2A) представлені криві титрування одного химерного

Ab до IGF-1R на лінії клітин IGF-1R⁺. MFI являє собою середню інтенсивність флуоресценції. На фіг. 2B представлено зв'язування химерних Ab до IGF-1R на лінії клітин IGF-1R- людини.

Фігури 3A-3B: Оцінка специфічності Ab до IGF-1R в порівнянні з hIR з використанням трансфікованих клітин. На фіг. 3A представлено зв'язування мишиного Ab до IGF-1R на лінії трансфікованих клітин hIR⁺. На фіг. 3B представлено зв'язування химерного Ab до IGF-1R на лінії клітин IR⁺. MFI являє собою середню інтенсивність флуоресценції. Mab GRO5 до hIR (Calbiochem) було введено в якості позитивного контролю.

Фігура 4: Зв'язування мишиного Ab до IGF-1R на лінії клітин IM-9. MFI являє собою середню інтенсивність флуоресценції. Mab GRO5 до hIR було введено в якості позитивного контролю.

Фігури 5A-5C: Оцінка розпізнавання IGF-1R мавпи. На фіг. 5A представлені криві титрування химерного Ab до IGF-1R на лінії клітин COS-7. MFI являє собою середню інтенсивність флуоресценції. На фіг. 5B представлена EC₅₀ обох антитіл до IGF-1R, мишиного та химерного, на лінії клітин COS-7. На фіг. 5C представлена EC₅₀ химерних антитіл до IGF-1R на обох лініях клітин - трансфікованих клітинах NIH 3T3 hIGF-1R + і клітинах COS-7.

Фігура 6: Сенсограми, отримані за допомогою Biacore X100 на основі технології поверхневого плазмонного резонансу (SPR), використовуючи сенсорний чіп CM5, активований більше 11 000 резонансних одиниць (PE) мишиного антитіла до гістидинової мітки, щепленого хімічним шляхом на карбоксиметилдекстрановому матриксі. Експеримент проводили при швидкості струму 30 мкл/хв при 25 °C, використовуючи HBS-EP+ в якості буфера для хроматографії та для розведення проб. На фігурі показано поєднання 4 незалежних сенсограм, вирівняних по x-осі на початку першого введення проб аналітів і по y-осі по вихідному рівню, визначеного безпосередньо перед цим першим введенням проби. Сенсограми, отримані із захопленням послідовності на основі послідовності рекомбінантного розчинного IGF1R людини, відзначені ромбиками. Сенсограми, отримані із захопленням послідовності на основі послідовності рекомбінантного розчинного IGF1R яванського макака, відзначені трикутниками. Білі символи відповідають циклам холостої проби (5 введів проби буфера для хроматографії), а чорні символи відповідають вводам ряду зростаючих концентрацій c208F2 (5, 10, 20, 40 і 80 нМ).

Фігура 7: Оцінка власної дії антитіл до hIGF-1R фосфорилування рецептора в порівнянні з IGF1.

Фігура 8: Інгібування фосфорилування IGF-1R у відповідь на IGF-1 мишиним антитілом до hIGF-1R.

Фігура 9: Інтенсивність сигналу клітинної поверхні антитіл до IGF-1R зазнає знижувальну регуляцію після інкубації клітин при 37 °C. Клітини MCF-7 інкубували при 4 °C або 37 °C протягом 4 г з 10 мкг/мл Ab. На фігурі представлена ΔMFI.

Фігури 10A-10B: Розпад антитіл клітинної поверхні. Зв'язане з клітинною поверхнею антитіло оцінювали після 10, 20, 30, 60 і 120 хв при 37 °C. На Фіг. 10A представлений % залишкового IGF-1R в порівнянні з інтенсивністю сигналу, яка вимірюється при 4 °C. На Фіг. 10B представлено обчислення періоду напіввиведення з використанням програмного забезпечення Prims і з використанням збігу з експоненційною кривою розпаду.

Фігура 11: Ab до hIGF-1R інтерналізуються. Клітини інкубували з 10 мкг/мл мишиних Ab протягом 0, 30 або 60 хв при 37 °C. Клітини піддавали або не піддавали пермеабілізації та інкубували з другим антимишиним IgG-Alexa 488. Мембрана відповідає пермеабілізації мас./об. інтенсивності сигналу. Загальний сигнал відповідає інтенсивності сигналу після пермеабілізації клітин, а цитоплазматичний відповідає інтерналізованому Ab. Назва кожного оцінюваного антитіла зображено зверху кожного графіка.

Фігури 12A-12B: Візуалізація інтерналізації Ab. Фігура 12A: Клітини MCF-7 інкубували з m208F2 протягом 20 хв при 4 °C і промивали, після чого інкубували (W) при 37 °C протягом 15 (X), 30 (Y) і 60 (Z) хв. Клітини фіксували і піддавали пермеабілізації. Ab m208F2 виявляли з використанням антимишиного IgG Alexa488 і Lamp-1, використовуючи кроляче антитіло до Lamp-1 і другий антикролячий IgG Alexa 555. Фігура 12B: Клітини MCF-7 інкубували протягом 30 хвилин при 37 °C з мишиними антитілами до hIGF-1R і фарбували, як описано вище. Колокалізацію ідентифікували, використовуючи маркерний плагін колокалізації програми ImageJ.

Фігура 13: Залучення лізосомального біохімічного шляху в розкладання антитіла.

Фігура 14: Кислий pH зменшує зв'язувальну здатність п'яти мишиних антитіл до IGF-1R.

Фігури 15A-15D: Зв'язування, характеристичне для першої гуманізованої форми Mab c208F2. Зв'язуючі властивості h208F2 VH3/VL3 mAb оцінювали на лінії клітин людини MCF-7 (A), на лінії клітин мавпи COS-7 (B) і на трансфікованій лінії клітин миші, експресуючий рецептор інсуліну людини (C). Зв'язування обох mAb, мишиного та химерного 208F2, оцінювали

паралельно. Антитіло до hIR, клон GRO5, використовували для підтвердження експресії hIR на трансфікованій лінії клітин (D).

Фігура 16: Розпад поверхневого антитіла hz208F2 VH3/VL3

Фігура 17: Поєднання сенсограм, отриманих за допомогою пристрою Biacore X100 на основі SPR при температурі 25 °C з сенсорним чіпом CM5, активованим на обох проточних кюветах приблизно 12 000 PE мишиних моноклональних антитіл до гістидинової мітки, щеплених хімічним шляхом на карбоксиметилдекстрановому матриксі, використовуючи HBS-EP+ в якості буфера для хроматографії при швидкості струму 30 мкл/хв. Кожна сенсограма (перша відзначена трикутниками, а друга відзначена ромбиками) відповідає повному циклу:

1- Введення протягом однієї хвилини проби розчину рекомбінантного h-IGF-1R (10 мкг/мл) у другу проточну кювету.

2- Для першої сенсограми 5 введів проби буфера для хроматографії протягом 90 с кожний.

Для другої сенсограми: п'ять введів проби в ряді зростаючих концентрацій розчинів антитіла c208F2 до IGF-1R протягом 90 с кожний.

3- Відстрочка 300 с для визначення кінетики швидкості дисоціації.

4- Регенерація поверхні шляхом введення протягом 45 с 10 mM буфера гліцин, HCl pH 1,5.

Фігура 18: Сенсограма, відповідна відніманню холостої сенсограми (5 введів HBS-EP+) з сенсограми, отриманої для ряду зростаючих концентрацій розчинів антитіл c208F2 до IGF-1R, представлена сірим кольором. Теоретична сенсограма, відповідна моделі 1:1 з наступними параметрами: $k_{on}=(1,206\pm0,036)\times10^6 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, $k_{off}=(7,81\pm0,18)\times10^{-5} \text{ s}^{-1}$, $R_{max}=3076 \pm 0,3 \text{ PE}$ представлена тонкою чорною лінією. Обчислені концентрації c208F2 наведені на графіку: тільки найвищу концентрацію (24 nM) розглядають як константи).

Фігура 19: Константи дисоціації, відповідні середньому з чотирьох експериментів, проведених для кожного антитіла, і відповідні відношенню: $k_{off}/k_{on} \times 10^{12}$, вираженому в одиницях nM. Вуса діаграми відповідають стандартній помилці (n дорівнює 4).

Фігура 20: Періоди напівжиття відповідають середньому з чотирьох експериментів, проведених для кожного антитіла, і відповідають відношенню: $\text{Ln}(2)/k_{off}/3600$ вираженому в одиницях г. Вуса діаграми відповідають стандартній помилці (n дорівнює 4).

Фігура 21: Клітинна цитотоксичність антитіла до IGF-1R при поєднанні з трьома різними сполуками. П'ять химерних антитіл до IGF-1R піддавали сполученню з E-13, G-13 або F-63. Нерелевантне антитіло c9G4 також піддавали сполученню з тими ж сполуками.

Фігури 22A-22C: Оцінка in vivo c208F2-E-13 (Фіг. 22A), c208F2-G-13 (Фіг. 22B) і c208F2-F-63 (Фіг. 22C) в моделі ксенотрансплантата MCF-7.

Фігури 23A-23B: Оцінка in vivo обох антитіл c208F2-E-13 (Фіг. 23A) і c208F2-G-13 (Фіг. 23B) в порівнянні з контролем ADC (c9G4-E13 і c9G4-G-13) в моделі ксенотрансплантата MCF-7.

Фігури 24A і B: Кислий pH зменшує специфічність зв'язування гуманізованих антитіл до IGF-1R hz208F2 H076/L024 (A) і hz208F2 (H077/L018 (B). Фігура 25: Оцінка цитотоксичності c208F2-G-13 на нормальних клітинах.

Фігура 26: Клітинна цитотоксичність гуманізованих варіантів hz208F2 в сполученні з G-13. Нерелевантне антитіло c9G4 також піддавали сполученню з тою же сполукою.

Фігура 27: Оцінка in vivo гуманізованих форм 208F2-G-13 в порівнянні з c208F2-G-13 в моделі ксенотрансплантата MCF-7.

Фігури 28A і 28B: Оцінка in vivo або c208F2-G-13 (28A), або hz208F2-4-G-13 (28B), введених 4 рази, в порівнянні з одним вводом в моделі ксенотрансплантата MCF-7.

Фігури 29A і 29B: Оцінка in vivo c208F2-E-13 (29A) і c208F2-G-13 (29B) в моделі ксенотрансплантата CaOV-3.

Приклади

Приклад 1: Одержання мишиних антитіл, індукованих проти IGF-1R ECD

Для одержання мишиних моноклональних антитіл (Mab) проти людського позаклітинного домену (ECD) рецептора IGF-1 людини (hIGF-1R) 5 мишей BALB/c імунізували 3 рази підшкірно (s.c.) 10 мкг білка rhIGF-1R (R & D Systems, № за каталогом 391-GR). В якості альтернативи у деяких тварин було проведено три додаткових імунізації 10 мкг мишиного позаклітинного домену (ECD) IGF-1R (R & D Systems, № за каталогом 6630-GR/Fc). Перша імунізація була виконана в присутності повного ад'юванта Фрейнда (Sigma, Сент-Луїс, штат Меріленд, США). Для подальших імунізацій додавали неповний ад'ювант Фрейнда (Sigma). Через три дні після злиття імунізованим мишам проводили бустер-ін'єкцію 10 мкг білка rhIGF-1R. Спленоцити і лімфоцити одержували шляхом перфузії селезінки і шляхом подрібнення проксимальних лімфатичних вузлів відповідно, зібраних від однієї з 5 імунізованих мишей (відібраної після титрування сироватки всіх мишей) і проводили злиття з клітинами міеломи SP2/O-Ag14 (ATCC, Роквілл, штат Меріленд, США). Протокол злиття описаний в статті Kohler and Milstein (Nature,

256: 495-497, 1975). Потім злиті клітини піддавали відбору на середовищі з гіпоксантином, аміноптерином і тимідином (HAT). Як правило, для одержання моноклональних антитіл або їх функціональних фрагментів, особливо мишиного походження, можна зробити посилання на методи, які описані, зокрема, в керівництві "Antibodies" (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988). Приблизно через 10 днів після злиття гібридні клітини піддавали скринінгу. Для первинного скринінгу супернатанти гібридом оцінювали на секрецію Mab, індукованих проти білка IGF-1R ECD, за допомогою аналізу FACS з використанням пухлинних клітин MCF7 раку молочної залози людини (ATCC) та/або клітин мавпи COS7 (трансформованих SV40 клітин нирок африканської зеленої мавпи), експресуючих IGF-1R на їх клітинній поверхні. Точніше, для відбору за допомогою проточної цитометрії 10^5 клітин (або MCF7, або COS7) висівали в кожну лунку 96-лункового планшета в фосфатно-сольовому буфері (ФСБ), що містить 1% бичачий сироватковий альбумін (БСА) та 0,01% азид натрію (буфер FACS) при 4 °C. Після 2 хв центрифугування при 2000 об/хв буфер видаляли і додавали тестовані супернатанти гібридами. Після 20 хв інкубації при 4 °C клітини двічі промивали і додавали Alexa 488-кон'юговане козяче антимишине антитіло 1/500^о, розведене в буфері FACS (# A11017, Molecular Probes Inc., Юджин, США) та інкубували протягом 20 хв при 4 °C. Після остаточного відмивання буфером FACS клітини аналізували за допомогою FACS (Facsclibur, Becton-Dickinson) після додавання в кожну пробірку пропідію йодиду при кінцевій концентрації 40 мкг/мл. Як негативний контроль включали лунки, що містять тільки клітини і клітини, що проінкубували з другим Alexa 488-кон'югованим антитілом. У кожному експерименті використовували контроль ізотипу (Sigma, ref M90351MG). Для обчислення середнього значення інтенсивності флуоресценції (MFI) оцінювали 5000 клітин.

З метою відбору тільки інтерналізуючих антитіл додатково проводили аналіз інтерналізації. Для цього аналізу лінію пухлинних клітин MCF7 культивували в середовищі RPMI 1640 без фенолового червоного з 1% L-глутаміном і 10% FACS протягом 3 днів до експерименту. Потім клітини відокремлювали, використовуючи трипсин, і 100 мкл клітинної суспензії висівали при $4 \cdot 10^5$ клітин/мл в 96-лункові планшети в середовищі RPMI1640 без фенолового червоного з 1% L-глутаміном і 5% фетальною бичачою сироваткою (ФСБ). Після 2 хв центрифугування при 2000 об/хв клітини ресуспендували в 50 мкл або супернатантів гібридами, або розчинів контрольного антитіла (позитивний контроль і контроль ізотипу 1 мкг/мл). Після 20 хв періоду інкубації при 4 °C клітини центрифугували протягом 2 хв при 2000 об/хв і ресуспендували або в холодному (4 °C), або в теплому (37 °C) повному культуральному середовищі. Потім клітини інкубували протягом 2 годин або при 37 °C, або при 4 °C. Потім клітини промивали три рази буфером FACS. Alexa 488-мічене антитіло козячий антимишиний IgG інкубували протягом 20 хвилин, і клітини промивали три рази, після чого проводили аналіз FACS на популяції клітин, що не забарвлюються пропідію йодидом.

Після аналізу FACS визначали два параметри: (i) різниця сигналу флуоресценції, що визначається на поверхні клітин, проінкубованих при 4 °C, і одержаного з клітинами, проінкубованими при 37 °C з одним супернатантом гібридами, і (ii) відсоток залишкового IGF-1R на клітинній поверхні.

Відсоток залишкового hIGF-1R обчислюють таким чином: $\% \text{ залишкового IGF-1R} = (\text{MFI}_{\text{Ab } 4^\circ\text{C}} / \text{MFI}_{\text{Ab } 37^\circ\text{C}}) \times 100$.

Крім того, було проведено три твердофазні імуоферментні аналізи (ІФА) (або до, або після клонування) для дослідження зв'язування антитіл на рекомбінантних білках людини (hIGF-1R) і миші (mIGF-1R) і на рекомбінантному білку рецептора інсуліну людини (hIR). Зберігали гібридному, секретоване антитіло, що проявляє зв'язування на rh- та/або gm-IGF-1R і відсутність зв'язування на rhIR. Коротко, в 96-лункові планшети ELISA (Costar 3690, Корнінг, штат Нью-Йорк, США) наносили 100 мкл/лунка або білка rhIGF-1R (R & D Systems, № за каталогом 391-GR) концентрації 0,6 мкг/мл, або білка mIGF-1R (R & D Systems, № за каталогом 6630-GR / Fc) при 1 мкг/мл, або білка rhIR (R & D Systems, № за каталогом 1544-IR/CF) концентрації 1 мкг/мл в ФСБ протягом ночі при 4 °C. Потім планшети блокували ФСБ, що містить 0,5% желатин (№22151, Serva Electrophoresis GmbH, Хайдельберг, Німеччина) і міцно зв'язували протягом 2 г при 37 °C. Після видалення буфера насичення шляхом постукування перевернутих планшетів в кожну лунку додавали 100 мкл кожного розведення супернатанта (або нерозведеного супернатанта гібридами, або серійних розведень супернатанта) та інкубували протягом 1 г при 37 °C. Після трьох промивок додавали 100 мкл кон'югованого з пероксидазою хрому поліклонального козячого антимишиного IgG (№115-035-164, Jackson Immuno-Research Laboratories, Inc., Уест-Гров, штат Пенсільванія, США) додавали при розведенні 1/5000 в ФСБ, що містить 0,5% желатин і 0,05% Твін 20 (мас./мас.) протягом 1 г при 37 °C. Потім планшети для

ІФА промивали 3 рази і додавали тетраметилбензидиновий субстрат (ТМБ) (№UP664782, Uptima, Interchim, Франція). Після 10 хв періоду інкубації при кімнатній температурі реакцію зупиняли, використовуючи 1 М сірчану кислоту, і вимірювали оптичну щільність при 450 нм.

Гібридому, декретовану, що представляє інтерес антитіло, розмножували і клонували шляхом граничного розведення. Після ізотипування по одному клону під кожним кодом розмножували і заморожували. Кожне антитіло, що представляє інтерес, одержували в системах продукування *in vitro*, званих CellLine (Integra Biosciences), для подальшої характеристики.

Додаткові кількісні визначення для аналізів спрямованої зв'язуючої специфічності FACS проводили на клітинах IM9 (В-лімфобластів людини, що експресують ІР), а також на клітинах, трансфікованих hIGF-1R, в порівнянні з нетрансфікованими клітинами.

Всі дані, відповідні відібраним антитілам, підсумовані в таблиці 7, і показано, що п'ять відібраних антитіл характеризуються сильним розпізнаванням нативного людського IGF-1R, експресованого або на клітинах MCF-7 раку молочної залози, або на трансфікованих клітинах. Вони також розпізнають IGF-1R мавпи на клітинах COS-7. Ці антитіла перехресно не реагують з рецептором інсуліну людини, експресованого на клітинах IM9 у високому ступені. Слід зазначити, що ці антитіла слабо розпізнають білок rhIGF-1R ECD при безпосередньому нанесенні на планшети ІФА.

Таблиця 7

НАЗВА ГІБРИДОМИ	ІЗОТИП	CNCM	ІФА (SNT при 5 пг/мл) DO 450 нм			АНАЛІЗ ІНТЕРНАЛІЗАЦІЇ MCF7 (SNT при 5 мкг/мл)				FACS (SNT при 5 мкг/мл)			
			RH IGF-1R	RM IGF-1R	RH ІНСУЛІН R	MFI		%	Δ (MFI 4 °C – MFI 37 °C)	MFI			
						4 °C	37 °C			IM9 (H IR*)	Cos-7 (IGF1R+ МАВПИ)	Tf IGF1R+	HE Tf КЛІТИН (IGF1R+)
208F2	LGG1 K	I-4757	0,163	0,099	0,140	355	94	27	261	4	106	2197	22
212A11	LGG1 K	I-4773	0,232	0,102	0,141	390	106	27	284	7	125	2187	23
213B10	LGG1 K	I-4774	0,399	0,127	0,110	366	115	30	271	7	122	2055	23
214F8	LGG1 K	I-4775	0,349	0,102	0,115	366	111	29	275	7	132	2137	20
219D6	LGG1 K	I-4736	0,329	0,112	0,106	349	106	30	243	7	114	2110	21

Приклад 2: Зв'язування антитіла з нативним IGF-1R людини на основі аналізів FACS

П'ять мишиних антитіл до IGF-1R були химеризовані. Зв'язуючі властивості обох антитіл до IGF-1R, мишиного та химерного, оцінювали за допомогою аналізів FACS на лінії клітин MCF-7 аденокарциноми молочної залози людини (ATCC # HTB-22), використовуючи зростаючі концентрації антитіла. З цією метою клітини (1×10^6 клітин/мл) інкубували з антитілами до IGF-1R протягом 20 хв при 4 °C в буфері FACS (ФСБ, 0,1% БСА, 0,01% NaN_3). Потім їх промивали 3 рази та інкубували з відповідним другим антитілом, пов'язаним з Alexa 488, протягом 20 додаткових хвилин при 4 °C в темряві, після чого промивали 3 рази в буфері FACS. Зв'язування антитіл до IGF-1R відразу проводили на життєздатних клітинах, які ідентифікували, використовуючи пропідію йодид (який забарвлює мертві клітини). Максимальна інтенсивність сигналу, отримана з кожним антитілом, була позначена як B_{\max} і виражена як середня інтенсивність флуоресценції (MFI). EC_{50} зв'язування, виражену в молярності (M), обчислювали, використовуючи аналіз нелінійної регресії (GraphPad Prims 4.0).

Крива титрування кожного мишиного або химерного Ab продемонструвала, що всі одержані антитіла здатні розпізнавати нативну форму IGF-1R з типовим профілем насичення (Фіг. 1A). З метою ранжирування антитіл і порівняння зв'язуючих властивостей обох Ab, мишиного та химерного, EC_{50} зв'язування кожної сполуки визначали з використанням аналізу нелінійної регресії. Порівняння EC_{50} кожного мишиного Ab з його відповідної химерної формою показало, що 2 форми проявляли однакові зв'язуючі властивості, демонструючи, що химеризація Ab не впливає на розпізнавання IGF-1R (Фіг. 1B-C). Значення EC_{50} і B_{\max} химерних антитіл підсумовані

в таблиці 8.

Таблиця 8

AC	B _{max}	EC ₅₀
c208F2	981	6,7E-10
c212A11	991	6,7E-10
c214F8	1069	5,0E-10
c219D6	993	4,7E-10
c213B10	1103	4,4E-10

5 Приклад 3: Підтвердження специфічності антитіла шляхом використання клітин, трансфікованих або IGF-1R, або IR, або клітин IM9, експресуючих значні рівні IR

10 Щоб підтвердити специфічність одержаних антитіл до IGF-1R в порівнянні з IR, стабільні трансформанти, які експресують або hIGF-1R, або hIR, оцінювали за допомогою аналізів FACS. Коротко, химерні mAb в зростаючих концентраціях інкубували з клітинами протягом 20 хв при 4 °C в буфері FACS (ФСБ, 0,1% БСА, 0,01% NaN₃). Потім клітини промивали 3 рази та інкубували з відповідним другим антитілом, пов'язаним з Alexa 488 перед інкубацією протягом 20 додаткових хвилин при 4 °C в темряві, а потім промивали 3 рази в буфері FACS. Зв'язування антитіл до IGF-1R відразу проводили на життєздатних клітинах, які ідентифікували, використовуючи пропідію йодид (який забарвлює мертві клітини). EC₅₀ зв'язування, виражену в молярності (M), обчислювали, використовуючи аналіз нелінійної регресії (GraphPad Prims 4.0).

15 Криві титрування, отримані на лінії клітин, трансфікованих hIGF-1R (Фіг. 2A), в порівнянні з нетрансфікованими клітинами (Фіг. 2B) підтвердили специфічність зв'язування химерних Ab з IGF-1R людини. Значення EC₅₀ і B_{max} химерних антитіл підсумовані в таблиці 9.

Таблиця 9

Ac	B _{max}	EC ₅₀ (M)
c208F2	2008	3,2E-10
c212A11	2513	4,4E-10
c214F8	2094	2,7E-10
c219D6	2521	5,5E-10
c213B10	2029	3,3E-10

20 З метою перевірки відсутності зв'язування обох антитіл, мишиного та химерного, на hIR, використовували стабільну лінію клітин, що експресує IR людини (hIR). Розпізнавання hIR людини на клітинній поверхні обома Ab, мишиним і химерним, досліджували за допомогою аналізів FACS. Або мишині, або химерні mAb в зростаючих концентраціях інкубували на лінії трансфікованих клітин hIR⁺ протягом 20 хвилин при 4 °C в буфері FACS (ФСБ, 0,1% БСА, 0,01% NaN₃). Потім клітини промивали 3 рази та інкубували з відповідним другим антитілом, пов'язаним з Alexa 488 перед інкубацією протягом 20 додаткових хвилин при 4 °C в темряві, а потім промивали 3 рази в буфері FACS. Зв'язування антитіл до IGF-1R відразу проводили на життєздатних клітинах, які ідентифікували, використовуючи пропідію йодид (який забарвлює мертві клітини). EC₅₀ зв'язування, виражену в молярності (M), обчислювали, використовуючи аналіз нелінійної регресії (GraphPad Prims 4.0). Як позитивний контроль використовували антитіло до hIR, клон GRO5. Мишине і химерне антитіла до 9G4 вводили в якості нерелевантних антитіл.

35 Високий рівень експресії hIR на клітинній поверхні трансфікованих клітин підтверджували з використанням комерційного антитіла до hIR GRO5 (Фіг. 3A і 3B). Навіть при використанні високих концентрацій або мишиного (Фіг. 3A), або химерного (Фіг. 3B) Ab до hIGF-1R зв'язування на клітинній поверхні клітин, трансфікованих hIR⁺, не спостерігали. Ці результати продемонстрували, що ні мишині, ні химерні Ab до hIGF-1R не розпізнавали hIR.

40 Ця специфічність розпізнавання hIGF-1R в порівнянні з IR також продемонстрована за допомогою аналізів FACS з використанням клітин IM9 лінії клітин В-лімфоми, що експресують hIR (Фіг. 4). Для цих аналізів FACS протокол був таким же, як описано вище, і мишині антитіла використовували з метою запобігання перехресній реактивності другого Ab проти людини (клітини IM9 експресують Ig людини на їх клітинній поверхні). Результати, представлені на Фіг. 4, ще раз продемонстрували, що очікуваний сигнал спостерігали при використанні антитіла GRO5 до hIR, при цьому жодне з оцінюваних мишиних антитіл не проявляло будь-якого

значного сигналу зв'язування на даній лінії клітин.

Приклад 4: Зв'язування антитіла з нативним IGF-1R мавпи на основі аналізів FACS і Biacore

Однією з перших передумов для нормативних токсикологічних досліджень є знаходження релевантного виду тварини для оцінки вибраної сполуки. Оскільки серія антитіл, описаних в даному документі, не спроможна розпізнавати мишиний IGF-1R, найбільш вірогідним видом для токсикологічної оцінки є нелюдиноподібний примат (NHP).

З метою оцінки зв'язування антитіл до IGF-1R на IGF-1R мавпи спочатку оцінювали зв'язування обох антитіл до hIGF-1R, мишиного та химерного, за допомогою аналізів FACS на лінії клітин COS-7, використовуючи зростаючі концентрації антитіла. Клітини (1×10^6 клітин/мл) інкубували з антитілами до IGF-1R протягом 20 хв при 4 °C в буфері FACS (ФСБ, 0,1% БСА, 0,01% NaN_3). Потім клітини промивали 3 рази та інкубували з відповідним другим антитілом, пов'язаним з Alexa 488 перед інкубацією протягом 20 додаткових хвилин при 4 °C в темряві і, нарешті, промивали 3 рази в буфері FACS. Зв'язування антитіл до IGF-1R відразу оцінювали на життєздатних клітинах, які ідентифікували, використовуючи пропідію йодид (який забарвлює мертві клітини). EC_{50} зв'язування, виражену в молярності (M), обчислювали, використовуючи аналіз нелінійної регресії (GraphPad Prims 4.0).

Криві титрування, отримані на лінії клітин COS-7 мавпи, показали, що Ab до hIGF-1R специфічно розпізнавали IGF-1R, експресований на поверхні в лінії клітин мавп (Фіг. 5A). Визначення EC_{50} для кожного мишиного і химерного Ab показало, що 2 форми у високому ступені можна порівняти з їх зв'язуючими властивостями з IGF-1R мавпи (Фіг. 5B). Ці результати показали, що всі одержані антитіла до hIGF-1R розпізнавали IGF-1R мавпи.

Порівняння EC_{50} зв'язування на клітинах COS-7 зі зв'язуванням на трансфікованих клітинах IGF-1R проводили з метою перевірки величини розпізнавання химерним антитілом IGF-1R людини в порівнянні з IGF-1R мавпи. Результати, показані на Фіг. 5C, продемонстрували подібне розпізнавання IGF-1R людини і мавпи усіма антитілами.

З метою підтвердження розпізнавання на іншому типі мавп клітини трансфіковані IGF-1R яванського макака для продукування розчинного IGF-1R ECD мавпи і проводили експерименти за допомогою пристрою Biacore з одним з химерних антитіл (c208F2) з метою порівняння їх властивостей зв'язування або hIGF-1R, або IGF-1R яванського макака.

Експерименти по розпізнаванню проводили на пристрої Biacore $\times 100$, використовуючи сенсорний чіп CM5, активований антитілом до гістидинової мітки (набір для антитіла захоплення His (capture kit) GE Healthcare, номер за каталогом 28-9950-56). Більш 11000 PE антитіл прищеплюють хімічним шляхом на карбоксиметилдекстрановому матриксі, використовуючи набір для аміної хімії. Експерименти проводили при 25 °C при швидкості струму 30 мкл/хв, використовуючи буфер HBS-EP (GE Healthcare) як буфер для хроматографії та розведення зразка. Для визначення кінетичних параметрів зв'язування химерної форми антитіла c208F2 (c208F2) на hIGF-1R в порівнянні з IGF-1R макаки використовували кінетичну схему одного циклу.

Розчин розчинного рекомбінантного варіанту гетеротетрамеру IGF-1R, що складається з 2 α ланцюгів і позаклітинних доменів з 2 β ланцюгів, експресованого з додатковою C-кінцевою міткою 10-His, на основі послідовності або людини (R & D Systems номер за каталогом 305-GR-50), або послідовності яванського макака (виділяється в лабораторії), вводили протягом 1 хвилини до другої проточної кювети при розведенні, визначеному для захоплення близько 160 PE антигену. Після фази захоплення або вводили буфер для хроматографії 5 разів (кожне введення проби 90 с), або вводили ряд зростаючих 5 концентрацій c208F2 (кожен введення проби 90 с) в обидві проточні осередки. В кінці п'ятого введення проби буфер для хроматографії пропускали з метою визначення швидкості дисоціації.

Потім поверхню регенерували введенням буфера 10 mM гліцин, HCl pH 1,5 протягом 30 с.

Обчислений за допомогою комп'ютерної програми сигнал відповідає різниці між відповіддю проточного осередка 2 (з іммобілізованим IGF-1R) і відповіддю проточного осередка 1 (без будь-яких молекул IGF-1R) (Фіг. 6).

Для кожної молекули IGF-1R (людини або яванського макака) сигнал за рахунок введення ряду зростаючих концентрацій c208F2 коректували шляхом віднімання сигналу, отриманого в результаті 5 введів буфера (подвійний контроль). Отримані в результаті сенсограми аналізували з використанням програмного забезпечення Biaevaluation в моделі 1:1. Кінетичні коефіцієнти оцінювали або незалежно (2 кінетичних коефіцієнти c208F2 на кожному IGF-1R), або спільно (однакові кінетичні коефіцієнти зв'язування c208F2 на IGF-1R людини і яванського макака). Якість відповідності оцінювали на підставі відношення χ^2/Rmax нижче 0,05 PE.

Кінетичні коефіцієнти зв'язування (див. Таблицю 10), визначені окремо для кожного IGF-1R, близькі, і якість відповідності обох сенсограм з однаковими кінетичними коефіцієнтами є

високою.

- Антитіло с208F2 розпізнає як рекомбінантний людський IGF-1R, так і IGF-1R яванського макака з константою дисоціації (KD) приблизно 0,2 нМ. Значення спорідненості, визначені в цьому дослідженні, відповідають значенням функціональної спорідненості (авидності) антитіл для рівня захоплення IGF-1R людини і яванського макака близько 160 PE.

Таблиця 10

IGF1R	kon [1/M.c]	koff [1/c]	Kd [нМ]	Chi ² /Rmax
Людина	1,52E+06	3,40E-04	0,23	0,045
Яванський макак	1,85E+06	3,10E-04	0,17	0,032
Людина і яванський макак	1,52E+06	3,33E-04	0,22	0,039

Приклад 5: Агоністична дія одержаних антитіл на фосфорилування IGF-1R

- Добре відомо, що антитіла можуть індукувати агоністичну дію при їх зв'язуванні з тирозинкіназними рецепторами. Оскільки автори винаходу не хотіли б вибрати такі агоністичні антитіла, була проведена оцінка фосфорилування hIGF-1R з використанням химерних антитіл.

- Для цієї мети клітини MCF-7 інкубували в середовищі без сироватки протягом ночі. Потім додавали або IGF-1 (100 нМ), або тестовані Ab (10 мкг/мл) протягом 10 хвилин при 37 °C. Середовище видаляли, і клітини зішкрывували в буфер для лізису (pH 7,5), що містить 10 mM буфер Трис HCl (pH 7,5), 15% NaCl (1 M), 10% суміш детергентів (10 mM Tris-HCl, 10 % буфер для лізису Igepal) (Sigma Chemical Co.), 5% дезоксихолат натрію (Sigma Chemical Co.), 1 таблетку ТМ повної суміші інгібіторів протеаз (Roche), 1% суміш інгібіторів фосфатаз Cocktail Set II (Calbiochem) та інкубували протягом 90 хв при 4 °C. Лізати освітлювали центрифугуванням при 4 °C, нагрівали протягом 5 хв при 100 °C і витримували при -20 °C або безпосередньо наносили на 4-12% поліакриламідні гелі з додецилсульфатом натрію для електрофорезу (ДСН-ПААГ). Інкубацію з першим антитілом проводили протягом 2 годин при кімнатній температурі, а потім інкубували з HRP-пов'язаними другими антитілами протягом 1 г при кімнатній температурі. Мембрани промивали в буфері TBST, після чого білки візуалізували методом електрохемілюмінесцентного визначення (ЕХЛ). Кількісне визначення блоттинга проводять за допомогою програмного забезпечення Image J. Значення фосфорилування білків нормалізували по гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназі (GAPDH). Фосфорилування hIGF-1R у відповідь на IGF-1 вважали за 100% стимуляцію. Дія Ab до hIGF-1R на фосфорилування hIGF-1R визначали як % фосфорилування, індукованого IGF-1.

- Результати, описані на Фіг. 7, являють собою середнє значення % pIGF-1R у відповідь на химерні Ab до IGF-1R з незалежних експериментів +/- S.D. в порівнянні з IGF-1. Як проілюстровано, ні значного, ні незначного (менше 10%) фосфорилування hIGF-1R не було виявлено при інкубації клітин MCF-7 з 10 мкг Ab до IGF-1R.

Приклад 6: Інгібування фосфорилування IGF-1R у відповідь на IGF-1 мишиними антитілами до hIGF-1R

- Щоб охарактеризувати відібрані антитіла, досліджували їх здатність до інгібування IGF1-індукованого фосфорилування. Для цієї мети клітини MCF-7 інкубували в середовищі без сироватки протягом ночі. Потім клітини інкубували протягом 5 хвилин з мишиними Ab до hIGF, після чого додавали IGF-1 протягом 2 хвилин при 37 °C. Середовище видаляли, і клітини зішкрывували в буфер для лізису (pH 7,5), що містить 10 mM буфер Трис HCl (pH 7,5), 15% NaCl (1 M), 10% суміш детергентів (10 mM трис-HCl, 10 % буфер для лізису Igepal) (Sigma Chemical Co.), 5% дезоксихолат натрію (Sigma Chemical Co.), 1 таблетку ТМ повної суміші інгібіторів протеаз (Roche), 1% суміш інгібіторів фосфатаз Cocktail Set II (Calbiochem) та інкубували протягом 90 хв при 4 °C. Лізати освітлювали центрифугуванням при 4 °C, нагрівали протягом 5 хв при 100 °C і витримували при -20 °C або безпосередньо наносили на 4-12% поліакриламідні гелі з додецилсульфатом натрію для електрофорезу (ДСН-ПААГ). Інкубацію з першим антитілом проводили протягом 2 годин при кімнатній температурі, а потім інкубували з HRP-пов'язаними другими антитілами протягом 1 г при кімнатній температурі. Мембрани промивали в буфері TBST, після чого білки візуалізували методом електрохемілюмінесцентного визначення (ЕХЛ). Кількісне визначення блоттинга проводять за допомогою програмного забезпечення Image J. Значення фосфорилування білків нормалізували по гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназі (GAPDH). Фосфорилування hIGF-1R у відповідь на IGF-1 вважали за 100% стимуляцію. Дія Ab до hIGF-1R на фосфорилування hIGF-1R визначали як % фосфорилування, індукованого IGF-1.

Всі Ab до IGF-1R сильно інгібували фосфорилування hIGF-1R у відповідь на IGF-1

(зменшення > 80%) (Фіг. 8). Кращими інгібіторами IGF1-індукованого фосфорилування hIGF-1R є Mab m208F2, m212A11 і m214F8.

Приклад 7: Дослідження інтерналізації IGF-1R після зв'язування одержаних антитіл до IGF-1R за допомогою аналізів FACS

- 5 Клітини MCF-7 інкубували з 10 мкг/мл химерних антитіл при 4 °C протягом 20 хв. Потім клітини промивали та інкубували при 4 °C або 37 °C протягом 4 г. Кількість зв'язаного з клітинною поверхнею антитіла визначали з використанням другого антитіла. ΔMFI визначали як різницю між MFI, виміряну при 4 °C, і MFI, виміряну при 37 °C, після 4-годинного періоду інкубації, відповідно до кількості інтерналізованого Ab. ΔMFI була представлена на Фіг. 9 і в
- 10 таблиці 11. Відсоток інтерналізації при 10 мкг/мл Ab вираховували, слідуючи формулі $100 \cdot (MFI \text{ при } 4^\circ\text{C} - MFI \text{ при } 37^\circ\text{C}) / MFI \text{ при } 4^\circ\text{C}$, і результати представлені в таблиці 11.

Таблиця 11

Ab	% Інтерналізації	ΔMFI	ΔMFI EC ₅₀
c208F2	83	288	1,8E-10
c212A11	80	322	2,7E-10
c214F8	87	403	2,2E-10
c219D6	80	353	4,4E-10
c231B10	85	369	2,3E-10

- 15 Щоб визначити, чи здатні антитіла, які також розпізнають IGF-1R мавпи, до інтерналізації даного рецептора, був проведений такий же самий експеримент по інтерналізації. Результати, підсумовані в таблиці 12, продемонстрували, що всі протестовані антитіла здатні до опосередкування інтерналізації IGF-1R.

Таблиця 12

Ab	Мишині Ab		Химерні Ab	
	ΔMFI	% інтерналізації	ΔMFI	% інтерналізації
208F2	53	74	52	67
212A11	83	73	98	75
214F8	76	71	98	72
219D6	80	71	102	74
213B10	84	74	101	73

- 20 Далі оцінювали кінетику зменшення кількості антитіла, зв'язаного з клітинної поверхнею. З цією метою клітини MCF-7 висівали в 96-лункові планшети та інкубували з 10 мкг/мл мишиного антитіла протягом 20 хв при 4 °C. Потім клітини промивали для видалення незв'язаного антитіла і поміщали в середовище при 37 °C на 10, 20, 30, 60 або 120 хв. У кожен момент часу клітини центрифугували, а потім мітили клітинну поверхню на льоду другим антимишиним
- 25 антитілом IgG-Alexa488, щоб визначити кількість антитіла, що залишилося на клітинній поверхні. Інтенсивність флуоресценції для кожного мишиного Ab і для кожного моменту часу нормалізували по сигналу при 4 °C (% решти IGF-1R) і приводили у відповідність з експоненціальним розпадом, щоб визначити час напівжиття ($t_{1/2}$). $t_{1/2}$ вважали часом, протягом якого отримували 50% зниження сигналу. Як проілюстровано на Фіг. 10, рівень всіх мишиних Ab на поверхні швидко падав протягом перших 30 хв, і зниження було майже максимальним після
- 30 60 хв інкубації (Фіг. 10A). Розрахований час напівжиття становив від 10 до 18 хв відповідно до мишиних Ab (Фіг. 10B).

- З метою валідації, що зменшення сигналу клітинної поверхні є наслідком інтерналізації Ab і не пов'язана з шеддінгом рецептора клітини інкубували з мишиними Ab протягом 0, 30 і 60 хв
- 35 при 37 °C (Фіг. 11). Потім клітини фіксували і або пермеабілізували, або не пермеабілізували, щоб визначити антитіло, пов'язане з клітинної поверхнею (за відсутності пермеабілізації), і сумарний сигнал антитіла, відповідний пов'язаному з клітинної поверхнею + інтерналізованому Ab (з пермеабілізацією). Кількість інтерналізованого Ab (цитоплазматичного) визначали наступним чином: MFI після пермеабілізації - MFI без пермеабілізації. Цей експеримент показав,
- 40 що зниження кількості зв'язаного з клітинною поверхнею Ab відбувалося внаслідок зростання кількості цитоплазматичних Ab, що демонструє, що Ab були інтерналізованими (Фіг. 11). Крім того, розщеплення Ab починалося після 1 г інкубації, що показано на підставі зниження сигналу після пермеабілізації (сумарного).

Приклад 8: Дослідження інтерналізації IGF-1R після зв'язування одержаних антитіл до IGF-1R за допомогою аналізів FACS

Для додаткового підтвердження інтерналізації антитіл проводили конфокальну мікроскопію, щоб оцінити субклітинний розподіл антитіл після внутрішньоклітинного транспортування. Клітини інкубували з Ab до hIGF-1R 37 °C, фіксували і пермеабілізували. Таким чином, клітини фарбували з використанням другого антитіла Alexa-488 і кролячого антитіла до Lamp-1, яке було виявлено з використанням другого антикролячого IgG, міченого Alexa 555. Перед інкубацією при 37 °C мишине Ab 208F2 було локалізовано на мембрані клітин MCF-7 (Фіг. 12A). Відсутність колокалізації з лізосомним маркером lamp-1 було зазначено з використанням маркерного плагіну колокалізації програми Image J. Кількість зв'язаного з клітинною поверхнею антитіла різко зменшувалася після 15 хв інкубації при 37 °C. Одночасно зі зменшенням зв'язаного з клітинною поверхнею антитіла внутрішньоклітинне антитіло виявлялося в везикулах. Можна було спостерігати рідкісну колокалізацію з lamp-1. Після 30 хв інкубації зв'язане з клітинною поверхнею антитіло насилу виявлялося. Проте колокалізація Ab в лізосомах зростала. Після 1 г інкубації зменшувалося як фарбування внутрішньоклітинного Ab, так і число колокалізацій з lamp-1. Кінетика зв'язаного з клітинною поверхнею антитіла і його внутрішньоклітинної акумуляції корелювала з кінетикою розпаду поверхневого антитіла, вимірюваною за допомогою FACS. Крім того, як вже описано для досліджень FACS, на підставі конфокальної мікроскопії розщеплення мишиних Ab починалося після 1 г інкубації.

Також оцінювали інтерналізацію всіх інших мишиних антитіл до hIGF-1R та їх колокалізацію з Lamp-1 (Фіг. 12B). Після 30 хв інкубації при 37 °C виявлялося внутрішньоклітинне антитіло, і можна було спостерігати колокалізацію з lamp-1, що вказує на те, що всі відібрані антитіла до IGF-1R ефективно інтерналізувалися в лізосоми.

Приклад 9: Інгібування розщеплення Ab з використанням інгібітора лізосом бафіломіцину A1
Щоб підтвердити, що антитіла, які досягли лізосом, розщеплюються, клітини обробляли бафіломіцином A1, що представляє собою активний інгібітор функції лізосом, або залишають без обробки. Потім клітини інкубували з 10 мкг/мл тестованого Ab при 4 °C, промивали і інкубували протягом 2 г при 37 °C. Інтерналізоване Ab визначали після пермеабілізації клітин, використовуючи друге антимішине Ab IgG-Alexa 488. Додавання бафіломіцину A1 запобігало розщепленню внутрішньоклітинного Ab (Фіг. 13), що вказує на те, що Ab були ефективно інтерналізовані і розщеплювалися в лізосомах.

Приклад 10: Дія pH на зв'язування антитіло-IGF-1R

Оскільки антитіла були відібрані на основі їх потенціалу до інтерналізації, і, як показано вище, колокалізуються з ранніми ендосомами перед входженням в лізосомальний компартмент, цікавий підхід полягав у відборі антитіл, для яких відбувається модулювання стабільності зв'язування Ab/hIGF-1R в залежності від pH навколишнього середовища, і переважно антитіл, дисоціюючих від IGF-1R, коли pH навколишнього середовища стає кислим. Дійсно, основна відмінність між ранніми ендосомами і лізосомами складається в pH їх просвіту: в ендосомальному компартменті pH становить приблизно 6, тоді як в лізосомальному компартменті pH становить близько 4,5.

Добре відомо, що відразу після інтерналізації після зв'язування ліганда (IGF1) hIGF-1R повертається до клітинної поверхні за допомогою біохімічного шляху рециклінгу.

Без зв'язку з будь-якої теорією гіпотеза, описана в цьому документі, полягає в тому, що антитіла, більш схильні до раннього вивільнення від їх мішені при кислому pH, ймовірно, сприятимуть рециклінгу мішені на мембрані і, отже, можуть вважатися кращими кандидатами для підходів ADC.

Щоб вивчити, чи виявляють деякі з антитіл таку властивість, і досліджувати кореляцію цієї властивості з цитотоксичною активністю, зв'язування мишиних Mab до hIGF-1R на лінії клітин MCF-7 проводили в буферах при різних значеннях pH. Зростаючі концентрації мишиних mAb інкубували на лінії клітин MCF-7 протягом 20 хв при 4 °C при різних значеннях pH в діапазоні від 5 до 8. Потім клітини промивали 3 рази та інкубували з відповідним другим антитілом, пов'язаним з Alexa 488, в буфері FACS. Клітини інкубували додатково протягом 20 хвилин при 4 °C в темряві, а потім промивали 3 рази в буфері FACS. Зв'язування антитіл до IGF-1R відразу проводили на життєздатних клітинах, які ідентифікували, використовуючи пропідію йодид, який забарвлює мертві клітини. EC₅₀ зв'язування, виражену в молярності (M), обчислювали, використовуючи аналіз нелінійної регресії (GraphPad Prims 4.0). Всі відібрані мишині антитіла до IGF-1R проявляли знижену зв'язуючу здатність при кислому pH, як проілюстровано на Фіг. 14.

Зв'язування гуманізованих Mab до IGF-1R на лінії клітин MCF-7 проводили в буферах при різних pH. Зростаючі концентрації мишиних mAb інкубували на лінії клітин MCF-7 протягом 20 хв при 4 °C при різних значеннях pH в діапазоні від 5 до 8. Потім клітини промивали 3 рази і

інкубували з відповідним другим антитілом, пов'язаним з Alexa 488, в буфері FACS. Клітини інкубували додатково протягом 20 хвилин при 4 °C в темряві, а потім промивали 3 рази в буфері FACS. Зв'язування гуманізованих антитіл до IGF-1R відразу проводили на життєздатних клітинах, які ідентифікували, використовуючи пропідію йодид, який забарвлює мертві клітини. EC₅₀ зв'язування, виражену в молярності (M), обчислювали, використовуючи аналіз нелінійної регресії (GraphPad Prims 4.0). Гуманізовані антитіла до IGFR проявляли знижену зв'язуючу здатність при кислому pH, як проілюстровано на Фіг. 24.

Приклад 12: Оцінка гуманізованої форми 208F2 Mab

12.1 Оцінка зв'язування та інтерналізації першої гуманізованої форми hz208F2 VH3/VL3 (також званої hz208F2 H026/L024)

Зв'язування першої гуманізованої форми c208F2 mAb оцінювали на лініях клітин MCF-7, COS-7 і NIH 3T3 IR⁺. До кожної клітинної лінії додавали зростаючі концентрації m208F2, c208F2 або hz208F2 VH3VL3 на 20 хв при 4 °C. Потім клітини промивали, і зв'язування тестованих mAb виявляли з використанням відповідного другого антитіла. З метою валідації експресії IR людини на трансфіковані лінії клітин використовували клон GRO5 комерційного антитіла до hIR і використовували в якості прикладу профілю розпізнавання, наведеного на Фіг. 15D.

Порівняння гуманізованої форми з мишиними або химерними формами на клітинах MCF-7 (Фіг. 15A) або COS-7 мавпи (Фіг. 15B) показало близькі профілі для 3 тестованих форм. Процес гуманізації не модифікував специфічність розпізнавання антитіла, яка є точно порівняною з мишиною і химерною формами з відсутності перехресної реактивності на рецепторі інсуліну людини (Фіг. 15C).

Обчислені значення EC₅₀ першої гуманізованої форми 208F2 на лінії клітин MCF-7 людини і лінії клітин COS-7 мавпи були подібними зі значенням, визначеним або для мишиної, або для химерної форми mAb 208F2.

Здатність mAb hz208F2 VH3/VL3 до інтерналізації оцінювали за допомогою проточної цитометрії. Клітини MCF-7 інкубували з 10 мкг/мл антитіл при 4 °C протягом 20 хв. Потім клітини промивали та інкубували при 4 °C або 37 °C протягом 4 г. Кількість пов'язаного з клітинною поверхнею антитіла визначали з використанням другого антитіла. ΔMFI, що визначається як різниця між MFI, вимірюваною при 4 °C, і MFI, вимірюваною при 37 °C, після 4-годинного періоду інкубації відповідає кількості інтерналізованого Ab. ΔMFI представлена на Фіг. 16 і в таблиці 13. Відсоток інтерналізації при 10 мкг/мл Ab вираховували, слідуючи формулі $100 \times (\text{MFI при } 4^\circ\text{C} - \text{MFI при } 37^\circ\text{C}) / \text{MFI при } 4^\circ\text{C}$, і результати представлені в таблиці 13. Таким чином, гуманізоване антитіло hz208F2 VH3/VL3 мало властивості зв'язування та інтерналізації, подібні властивостям, виміряним для відповідного мишиного і химерного антитіл 208F2.

Таблиця 13а

	Δmfi	% інтерналізації
m208F2	294	88
C208F2	278	82
H208F2 VH3/VL3	344	87

12.2 Оцінка зв'язування додаткових гуманізованих форм hz208F2

mAb 208F2 піддавали гуманізації і оцінювали зв'язуючі властивості шістнадцяти гуманізованих варіантів (включаючи першу форму, описану в 12.1). Зв'язуючі властивості гуманізованих варіантів оцінювали за допомогою аналізів FACS на лінії клітин MCF-7 аденокарциноми молочної залози людини і лінії клітин Cos-7 мавпи з використанням зростаючих концентрацій антитіла. З цією метою клітини (1×10^6 клітин/мл) інкубували з антитілами до IGF-1R протягом 20 хв при 4 °C в буфері FACS (ФСБ, 0,1% БСА, 0,01% NaN₃). Потім їх промивали 3 рази та інкубували з відповідним другим антитілом, зв'язаним з Alexa 488, протягом 20 додаткових хвилин при 4 °C в темряві, після чого промивали 3 рази в буфері FACS. Зв'язування антитіл до IGF-1R відразу проводили на життєздатних клітинах, які ідентифікували, використовуючи пропідію йодид (який забарвлює мертві клітини). EC₅₀ зв'язування, виражену в молярності (M), обчислювали, використовуючи аналіз нелінійної регресії (GraphPad Prims 4.0).

Значення EC₅₀ гуманізованих варіантів показали, що все гуманізовані варіанти проявляють еквівалентні зв'язуючі властивості на обох лініях клітин людини і мавпи.

Значення EC₅₀ гуманізованих антитіл були підсумовані в таблиці 13b.

Таблиця 13b

		EC50	
		MCF-7	COS-7
Гуманізовані варіанти	hz208F2 H026/L024	7,09E-10	5,1E-10
	hz208F2 H037/L018	4,9E-10	7,4E-10
	hz208F2 H047/L018	7,7E-10	9,2E-10
	hz208F2 H049/L018	4,9E-10	6,9E-10
	hz208F2 H051/L018	5,7E-10	7,2E-10
	hz208F2 H052/L018	8,4E-10	9,9E-10
	hz208F2 H057/L018	5,8E-10	8,3E-10
	hz208F2 H068/L018	1,1E-09	1,2E-09
	hz208F2 H070/L018	4,6E-10	7,3E-10
	hz208F2 H071/L018	5,5E-10	1,1E-09
	hz208F2 H076/L018	6,5E-10	1,1E-09
	hz208F2 H077/L018	7,7E-10	1,1E-09
	hz208F2 H037/L021	4,8E-10	8,2E-10
	hz208F2 H049/L021	6,6E-10	8,5E-10
	hz208F2 H052/L021	5,7E-10	1,2E-09
	hz208F2 H076/L021	5,8E-10	1,1E-09

12.3 Оцінка інтерналізації іншої гуманізованої форми hz208F2

- Клітини MCF-7 інкубували з 10 мкг/мл гуманізованих антитіл при 4 °C протягом 20 хв. Потім клітини промивали та інкубували при 4 °C або 37 °C протягом 4 г. Кількість зв'язаного з клітинною поверхнею антитіла визначали з використанням другого антитіла на проточному цитометрі FacsCalibur Flow (Becton Dickinson). Δ MFI, що визначається як різниця між MFI, виміряною при 4 °C, і MFI, виміряною при 37 °C, після 4-годинного періоду інкубації відповідає кількості інтерналізованого Ab. Δ MFI представлена в таблиці 13с. Відсоток інтерналізації при 10 мкг/мл Ab вираховували за такою формулою: $100 \cdot (\text{MFI при } 4^\circ\text{C} - \text{MFI при } 37^\circ\text{C}) / \text{MFI при } 4^\circ\text{C}$. Гуманізоване антитіло hz208F2 H077/L018 здатне індукувати значиму інтерналізацію IGF-1R.

Таблиця 13с

	Δ mfi	% інтерналізації
hz208F2 H077/L018	468	88

- Приклад 13: Визначення константи дисоціації (K_D) зв'язування п'яти химерних антитіл до IGF-1R (c208F2, c213B10, c212A11, c214F8 і c219D6) і гуманізованого варіанта (VH3/VL3) антитіла 208F2 на розчинному рекомбінантному IGF-1R людини

- Константи дисоціації (K_D) зв'язування антитіл на рекомбінантному розчинному IGF-1R людини визначали по відношенню між швидкістю дисоціації (k_{off}) і швидкістю асоціації (k_{on}). Експерименти з кінетики проводили на пристрої Biacore $\times 100$, використовуючи сенсорний чіп CM5, активований мишиним моноклональним антитілом до гистидинової мітки. Близько 12 000 PE антитіл прищеплюють хімічним шляхом на карбоксиметилдекстрановому матриксі, використовуючи набір для аміної хімії.

- Експерименти проводили при 25 °C при швидкості струму 30 мкл/хв, використовуючи буфер HBS-EP (GE Healthcare) як буфер для хроматографії та розведення зразка.

- Для визначення кінетичних параметрів зв'язування антитіл до IGF-1R на розчинному рекомбінантному IGF-1R людини, захопленому його двома С-кінцевими 10-гістидиновими мітками, використовували кінетичну схему одного циклу.

- 1- Розчинення розчинного рекомбінантного варіанта гетеротетрамеру IGF-1R людини: 2 α ланцюга і позаклітинні домени 2 β ланцюгів, експресовані з додатковою С-кінцевою міткою 10-His (R&D Systems номер за каталогом 305-GR-50), вводили протягом одної хвилини в другий проточний осередок при концентрації 10 мкг/мл. В середньому в кожному з 24 циклів, виконаних для даного дослідження, було захоплено 587 PE (зі стандартним відхиленням 24 PE) розчинного рецептора.

- 2- Після фази захоплення або вводили буфер для хроматографії 5 разів (кожне введення проби 90 с), або вводили ряд зростаючих 5 концентрацій одного з шести антитіл (кожне

введення проби 90 с) в обидва проточні осередки. В кінці п'ятого введення проби буфер для хроматографії пропускали протягом 5 хвилин з метою визначення швидкості дисоціації.

3- Потім поверхню регенерували введенням буфера 10 mM гліцин, HCl pH 1,5 протягом 45 с.

Обчислений за допомогою комп'ютерної програми сигнал відповідає різниці між відповіддю проточного осередка 2 (з іммобілізованим IGF-1R) і відповіддю проточного осередка 1 (без будь-яких молекул IGF-1R).

Для кожного IGF-1R сигнал за рахунок введення ряду зростаючих концентрацій одного антитіла коректували шляхом віднімання сигналу, отриманого в результаті 5 введів буфера (подвійний контроль), див. Фіг. 17.

Отримані в результаті сенсограми аналізували з використанням програмного забезпечення Biaevaluation в моделі 1:1.

Для кожного антитіла проводили чотири експерименти, використовуючи два різних ряди концентрацій: 40, 20, 10, 5 і 2,5 nM для перших двох експериментів і 24, 12, 6, 3 і 1,5 nM для двох останніх експериментів, проведених з кожним антитілом.

Для 6 антитіл, тестованих в даному експерименті, експериментальні дані відповідали моделі 1:1 зі значними значеннями K_{off} , де більш високу концентрацію визначали як константи, і обчислювали чотири інші концентрації (див. Фіг. 18).

Константи дисоціації (K_D), обчислені як відношення: k_{off}/k_{on} , а час напівжиття комплексів, обчислене як відношення: $\ln(2)/k_{off}$, представлені на Фіг. 19 і 20. Вони відповідають середнім значенням чотирьох незалежних експериментів, проведених для кожного антитіла. Вуса діаграми відповідають стандартній помилці (n дорівнює 4) значень.

Константи дисоціації знаходяться в діапазоні від 10 до 100 pM. Антитіло c208F2 володіє більш слабкою спорідненістю (більш високим значенням константи дисоціації) до h-IGF-1R (при K_D близько 75 pM), а його гуманізований варіант володіє щонайменше такою же гарною спорідненістю, як химерний варіант (при K_D близько 60 pM). Чотири інших химерних антитіл до IGF-1R володіють в достатній мірі подібною спорідненістю до hIGF1-R (при K_D близько 30 pM). Різниця значень спорідненості, в основному, пов'язана зі швидкістю дисоціації отриманого в результаті часу напівжиття комплексів. З антитілом 208F2 час напівжиття комплексу становить від 2 до 3 годин для химерного і гуманізованого (VH3/VL3) варіантів. Для чотирьох інших химерних антитіл середні значення часу напівжиття становлять від 7,0 до 9,4 г.

Ці дуже повільні значення кінетики дисоціації явно пов'язані з двухвалентною структурою антитіл, які здатні до одночасного зв'язування обома плечима Fab з двома сусідніми молекулами h-IGF-1R. У цьому випадку рівень захоплених молекул IGF-1R може впливати на швидкість дисоціації. Значення спорідненості, визначені в цьому дослідженні, відповідають значенням функціональної спорідненості (або авидності) антитіл для рівня захоплення h-IGF-1R близько 600 PE. 3-кратна відмінність K_D , що спостерігається між представленими вище даними (таблиця 10), і значення, наведені в Прикладі 13, пов'язані зі зміною рівня захоплення hIGF-1R (600 PE в порівнянні з 160 PE в Прикладі 4).

Приклад 14: Синтез лікарських засобів за винаходом

У наведених нижче прикладах використані такі скорочення:

aq. водний розчин

ен енантімерний надлишок

екв еквівалент

IEP Іонізація електророзпилюванням

РХ/МС Рідинна хроматографія, сполучена з мас-спектрометрією

ВЕРХ Високоєфективна рідинна хроматографія

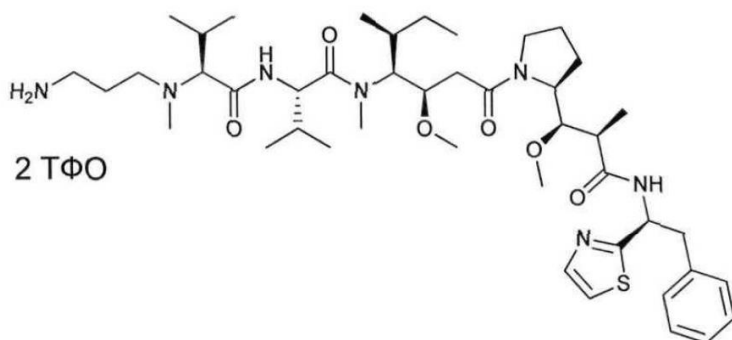
ЯМР Ядерний магнітний резонанс

нас. насичений

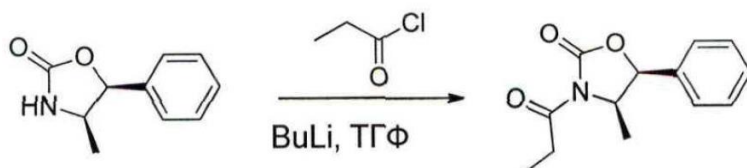
УФ ультрафіолетове випромінювання

Еталонна сполука 1

(S)-2-((S)-2-((3-амінопропіл)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N-((3R,4S,5S)-3-метокси-1-((S)-2-((1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-((S)-2-феніл-1-(тіазол-2-іл)етил)аміно)пропіл)піролідин-1-іл)-5-метил-1-оксогептан-4-іл)-N,3-диметилбутанамід, біс-трифтороцтова кислота



Сполука 1А: (4R, 5S)-4-метил-5-феніл-3-пропаноїл-1,3-оксазолідин-2-он



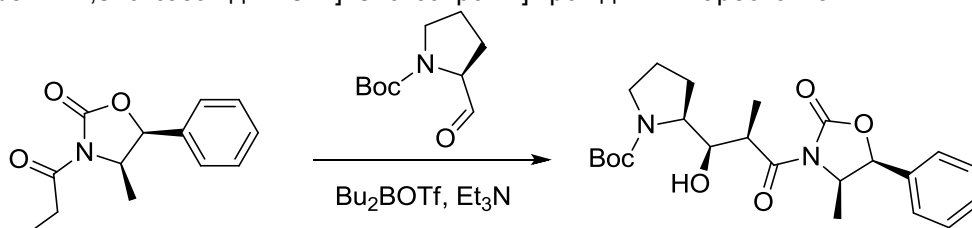
5

(4R, 5S)-4-метил-5-феніл-1,3-оксазолідин-2-он (5,8 г, 32,7 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в тетрагідрофурані (ТГФ, 120 мл) в інертній атмосфері. Суміш охолоджували до -78°C і додавали по краплях н-бутиллітій (14,4 мл). Після перемішування протягом 30 хвилин при -78°C додавали пропаноїлхлорид (5,7 мл). Перемішування продовжували протягом 30 хвилин при -78°C , потім протягом ночі при температурі навколишнього середовища. Реакційну суміш концентрували, потім повторно розчиняли в 200 мл води. рН розчину доводили до 7 насиченим водним розчином бікарбонату натрію. Водну фазу екстрагували 3 рази 100 мл етилацетату (EtOAc). Органічні фази об'єднували, висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували з одержанням 6,8 г (89%) сполуки 1А в формі жовтого масла.

10

15

Сполука 1В: трет-Бутил-(2S)-2-[(1R,2R)-1-гідрокси-2-метил-3-[(4R,5S)-4-метил-2-оксо-5-феніл-1,3-оксазолідин-3-іл]-3-оксopропіл]піролідин-1-карбоксилат



20

25

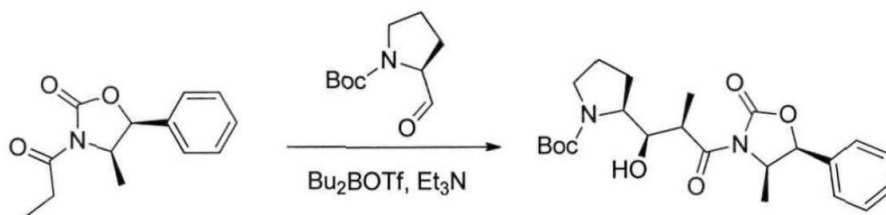
30

35

Сполуку 1А (17,6 г, 75,45 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в дихлорметані (ДХМ, 286 мл) в інертній атмосфері. Цей розчин охолоджували в крижаній бані. Додавали по краплях триетиламін (ТЕА, 12,1 мл, 1,15 екв) і Bu_2BOTf (78,3 мл, 1,04 екв), при цьому підтримуючи температуру реакційної суміші нижче 2°C . Перемішування продовжували при 0°C протягом 45 хвилин, після чого реакційну суміш охолоджували до -78°C . Додавали по краплях розчин трет-бутил (2S)-2-формілпіролідин-1-карбоксилат (8,5 г, 42,66 ммоль, 0,57 екв) в ДХМ (42 мл). Перемішування продовжували протягом 2 годин при -78°C , потім протягом 1 години при 0°C і, нарешті, 1 години за нормальної температури доквілля. Реакційну суміш нейтралізували 72 мл фосфатного буфера (рН становить від 7,2 до 7,4) та 214 мл метанолу і охолоджували до 0°C . Додавали по краплях розчин 30% пероксиду водню в метанолі (257 мл), підтримуючи при цьому температуру нижче 10°C . Перемішування продовжували протягом 1 години при 0°C . Реакційну суміш нейтралізували 142 мл води, потім концентрували при зниженому тиску. Одержаний в результаті водний розчин екстрагували 3 рази 200 мл EtOAc. Органічні фази об'єднували, висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували. Залишок очищали на колонці силікагелю сумішшю EtOAc і петролейного ефіру (EtOAc: РЕ становить 1:8) з одержанням 13,16 г (40%) сполуки 1В в формі безбарвного масла.

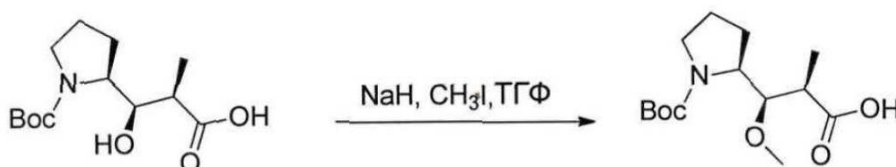
40

Сполука 1С: (2R,3R)-3-[(2S)-1-[(трет-бутоксикарбоніл)піролідин-2-іл]-3-гідрокси-2-метилпропанова кислота



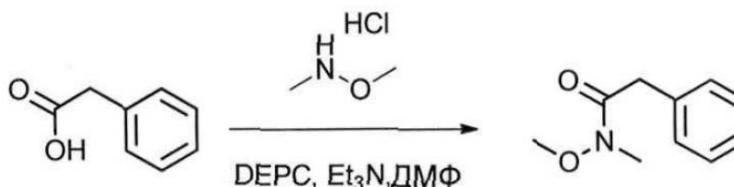
Сполуку 1В (13,16 г, 30,43 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в ТГФ (460 мл) в присутності пероксиду водню (30% у воді, 15,7 мл), потім охолоджували в крижаній бані. Додавали по краплях водний розчин гідроксиду літію (0,4 моль/л, 152,1 мл), підтримуючи при цьому температуру реакційної суміші нижче 4 °С. Реакційну суміш перемішували протягом 2,5 годин при 0 °С. Додавали по краплях водний розчин Na₂SO₃ (1 моль/л, 167,3 мл), підтримуючи при цьому температуру реакційної суміші при 0 °С. Реакційну суміш перемішували протягом 14 годин при температурі навколишнього середовища, потім нейтралізували 150 мл холодного насиченого розчину бікарбонату натрію і промивали 3 рази 50 мл ДХМ. рН водного розчину доводили до 2-3 1М водним розчином KHSO₄. Водний розчин екстрагували 3 рази 100 мл EtOAc. Органічні фази об'єднували, промивали один раз насиченим розчином NaCl, висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували з одержанням 7,31 г (88%) сполуки 1С в формі жовтого масла.

Сполука 1D: (2R,3R)-3-[(2S)-1-[(трет-бутоксикарбоніл)піролідін-2-іл]-3-метокси-2-метилпропанова кислота



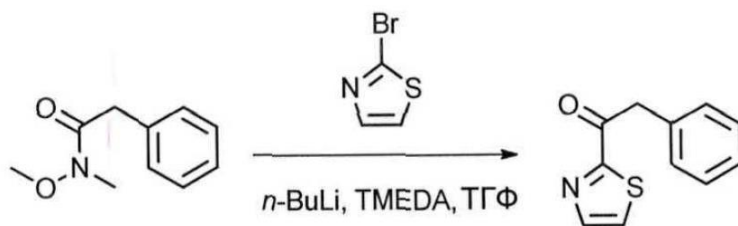
Сполуку 1С (7,31 г, 26,74 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в інертній атмосфері в ТГФ (135 мл) в присутності йодметану (25,3 мл). Реакційну суміш охолоджували в крижаній бані, після чого додавали порціями NaH (60% в маслі, 4,28 г). Реакційну суміш залишали при перемішуванні на 3 дні при 0 °С, а потім нейтралізували 100 мл насиченого водного розчину бікарбонату натрію і промивали 3 рази 50 мл ефіру. рН водного розчину доводили до 3 1М водним розчином KHSO₄. Водний розчин екстрагували 3 рази 100 мл EtOAc. Органічні фази об'єднували, промивали один раз Na₂S₂O₃ (5% в воді), один раз насиченим розчином NaCl, потім висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували з одержанням 5,5 г (72%) сполуки 1D в формі безбарвного масла.

Сполука 1E: N-метокси-N-метил-2-фенілацетамід



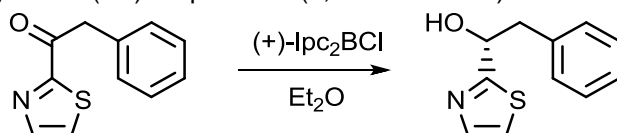
2-Фенілоцтову кислоту (16,2 г, 118,99 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в диметилформаміді (ДМФ, 130 мл), потім охолоджували до -10 °С. Додавали діетилфосфороціанідат (DEPC, 19,2 мл), гідрохлорид метокси(метил)аміну (12,92 г, 133,20 ммоль, 1,12 екв) і триетиламін (33,6 мл). Реакційну суміш перемішували протягом 30 хвилин при -10 °С, потім 2,5 години при температурі навколишнього середовища. Потім її двічі екстрагували 1 літром EtOAc. Органічні фази об'єднували, двічі промивали 500 мл NaHCO₃ (нас.), Один раз 400 мл води, потім висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували. Залишок очищали на колонці силікагелю сумішшю EtOAc і PE (від 1:100 до 1:3) з одержанням 20,2 г (95%) сполуки 1E у формі жовтого масла.

Сполука 1F: 2-Феніл-1-(1,3-тіазол-2-іл)етан-1-он



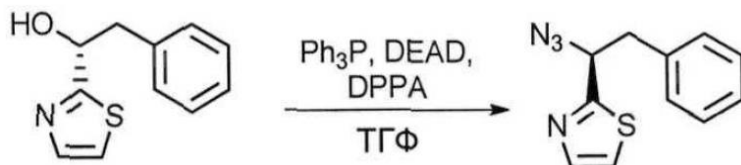
Тетраметилетилендіамін (TMEDA, 27,2 мл) розчиняли в ТГФ (300 мл) в інертній атмосфері, потім охолоджували до -78°C , після чого додавали по краплях $n\text{-BuLi}$ (67,6 мл, 2,5 М). Додавали по краплях 2-бром-1,3-тіазол (15,2 мл), і перемішування продовжували протягом 30 хвилин при -78°C . Додавали по краплях сполуку 1Е (25 г, 139,50 ммоль, 1,00 екв), розчинену в ТГФ (100 мл). Перемішування продовжували протягом 30 хвилин при -78°C , потім 2 годин при -10°C . Реакційну суміш нейтралізували 500 мл KHSO_4 (нас.), Потім екстрагували 3 рази 1 літром EtOAc . Органічні фази об'єднували, двічі промивали 400 мл води і двічі 700 мл NaCl (нас.), Потім висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували. Залишок очищали на колонці силікагелю сумішшю EtOAc і PE (від 1:100 до 1:10) з одержанням 25 г (88%) сполуки 1F в формі жовтого масла.

Сполука 1G: (1R)-2-феніл-1-(1,3-тіазол-2-іл)етан-1-ол



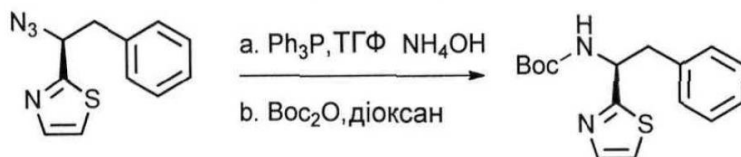
В інертній атмосфері розчин сполуки 1F (15 г, 73,8 ммоль, 1,00 екв.) в ефірі (300 мл) додавали по краплях до (+)-В-хлордіізопінокамфелборану ((+)- Ipc_2BCl , 110,8 мл). Реакційну суміш перемішували протягом 24 годин при 0°C , потім нейтралізували 300 мл суміші (1:1) NaOH (10% в воді) і H_2O_2 (30% в воді), нарешті, екстрагували три рази 500 мл EtOAc . Органічні фази об'єднували, двічі промивали 300 мл K_2CO_3 (нас.) і один раз 500 мл NaCl (нас.), потім висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували. Залишок очищали на колонці силікагелю сумішшю EtOAc і PE (від 1:20 до 1:2) з одержанням 6,3 г (42%) сполуки 1G в формі білої твердої речовини.

Сполука 1H: 2-[(1S)-1-азидо-2-фенілетил]-1,3-тіазол



Сполуку 1G (6 г, 29,23 ммоль, 1,00 екв.) розчиняли в інертній атмосфері в ТГФ (150 мл) в присутності трифенілфосфіну (13 г, 49,56 ммоль, 1,70 екв.), потім охолоджували до 0°C . Додавали по краплях діетилазодикарбоксилат (DEAD, 7,6 мл) з наступним додаванням дифенілфосфорилазиду (DPPA, 11 мл), потім охолоджуючу баню видаляли, і розчин залишали при перемішуванні на 48 годин при температурі навколишнього середовища. Суміш концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали на колонці силікагелю сумішшю EtOAc і PE (від 1:100 до 1:30) з одержанням 8 г частково очищеної сполуки 1H в формі жовтого масла. Сполуку 1H використовували в такому вигляді в наступній стадії.

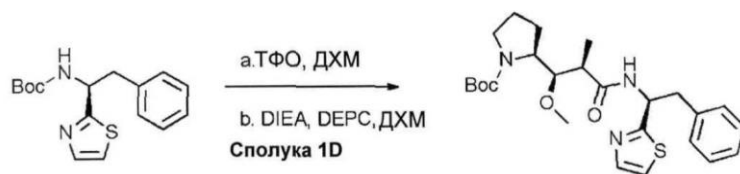
Сполука 1I: трет-Бутил-N-[(1S)-2-феніл-1-(1,3-тіазол-2-іл)етил]карбамат



Сполуку 1H (6,5 г, 28,2 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в інертній атмосфері в ТГФ (100 мл) в

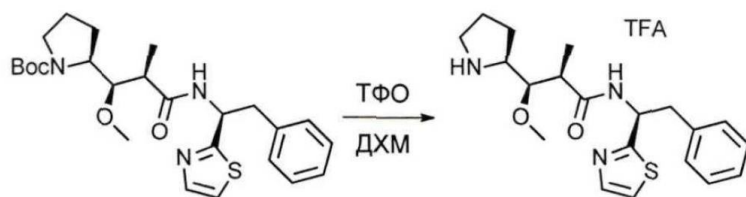
присутності трифенілфосфіну (6,5 г, 33,9 ммоль, 1,20 екв.) і нагрівали до 50 °С протягом 2 годин. Потім додавали аміак (70 мл), і нагрівання продовжували протягом 3 годин. Реакційну суміш охолоджували, нейтралізували 500 мл води, потім екстрагували 3 рази 500 мл EtOAc. Органічні фази об'єднували і двічі екстрагували 500 мл 1 н. HCl. Водні фази об'єднували, доводили до pH 8-9 додаванням розчину гідроксиду натрію (10% у воді), потім екстрагували 3 рази 500 мл ДХМ. Органічні фази об'єднували, висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували з одержанням 4,8 г (83 %) (1S)-2-феніл-1-(1,3-тіазол-2-іл)етан-1-аміну в формі жовтого масла. Потім ці сполуки захищали групою Boc ((трет-бутокси)карбоніл), щоб її можна було очистити. Її розчиняли в інертній атмосфері в 1,4-діоксані (40 мл), потім охолоджували до 0 °С. Додавали по краплях (Boc)₂O (10,26 г, 47,01 ммоль, 2,00 екв), розведений в 20 мл 1,4-діоксану. Охолоджуючу баню видаляли, і розчин залишали при перемішуванні на ніч при температурі навколишнього середовища, після чого нейтралізували 300 мл води і двічі екстрагували 500 мл EtOAc. Органічні фази об'єднували, висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували. Залишок очищали на колонці силікагелю сумішшю EtOAc і PE (від 1:100 до 1:20, ен дорівнює 93%). Потім суміш перекристалізованої в суміші гексан/ацетон (~ 5-10/1,1 г/10 мл) з одержанням 6 г (84%) сполуки 1I в формі білої твердої речовини (ен > 99%).

Сполука 1J: трет-Бутил (2S)-2-[(1R,2R)-1-метокси-2-метил-2-[(1S)-2-феніл-1-(1,3-тіазол-2-іл)етил]карбамоїл]етил]піролідін-1-карбоксилат



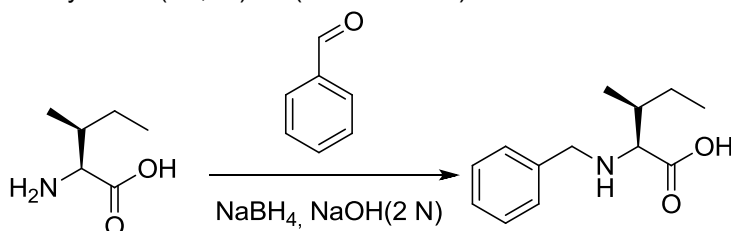
Сполуку 1I (3 г, 9,86 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в інертній атмосфері в 10 мл ДХМ. Додавали трифтороцтову кислоту (ТФО, 10 мл), і розчин залишали при перемішуванні на ніч при температурі навколишнього середовища, потім концентрували при зниженому тиску з одержанням 2,0 г (64%) (1S)-2-феніл-1-(1,3-тіазол-2-іл)етан-1-аміну; трифтороцтова кислота в формі жовтого масла. Цю проміжну сполуку повторно розчинили в 20 мл ДХМ, після чого додавали сполуку 1D (1,8 г, 6,26 ммоль, 1,05 екв), DEPC (1,1 г, 6,75 ммоль, 1,13 екв) і діізопропілетиламін (DIEA, 1,64 г, 12,71 ммоль, 2,13 екв). Реакційну суміш залишали при перемішуванні на ніч при температурі навколишнього середовища, потім концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали на колонці силікагелю сумішшю EtOAc і PE (від 1:100 до 1:3) з одержанням 2,3г (81%) сполуки 1J в формі блідо-жовтої твердої речовини.

Сполука 1K: (2R,3R)-3-метокси-2-метил-N-[(1S)-2-феніл-1-(1,3-тіазол-2-іл)етил]-3-[(2S)-піролідін-2-іл]пропанамід; трифтороцтова кислота



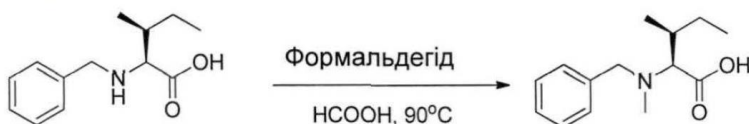
Сполуку 1J (2,25 г, 4,75 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в інертній атмосфері в 10 мл ДХМ. Додавали ТФО (10 мл), і розчин залишали при перемішуванні на ніч при температурі навколишнього середовища, потім концентрували при зниженому тиску з одержанням 2,18 г (94%) сполуки 1K в формі жовтого масла.

Сполука 1L: (2S,3S)-2-(бензиламіно)-3-метилпентанова кислота



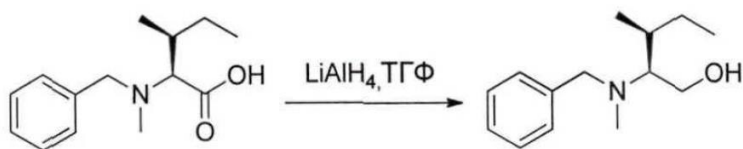
(2S,3S)-2-аміно-3-метилпентанову кислоту (98,4 г, 750 ммоль, 1,00 екв) додавали при температурі навколишнього середовища і порціями до 2 н. розчину гідроксиду натрію (375 мл). Швидко додавали бензальдегід (79,7 г, 751,02 ммоль, 1,00 екв), і одержаний в результаті розчин перемішували протягом 30 хвилин. Додавали невеликими порціями боргідрид натрію (10,9 г, 288,17 ммоль, 0,38 екв), підтримуючи при цьому температуру від 5 до 15 °С. Перемішування продовжували протягом 4 годин при температурі навколишнього середовища. Реакційну суміш розбавляли 200 мл води, потім двічі промивали 200 мл EtOAc. pH водного розчину доводили до 7-2 зв. розчином соляної кислоти. Осад збирали фільтруванням і одержали 149,2 г (90%) сполуки 1L в формі білої твердої речовини.

Сполука 1M: (2S,3S)-2-[бензил(метил)аміно]-3-метилпентанова кислота



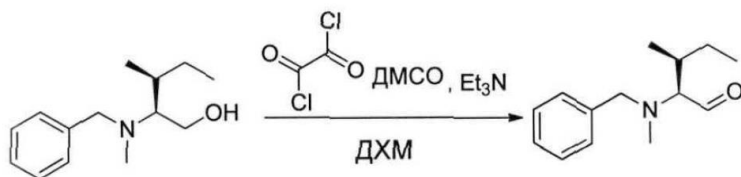
Сполуку 1L (25 г, 112,97 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в інертній атмосфері в мурашиній кислоті (31,2 г) в присутності формальдегіду (36,5% в воді, 22,3 г). Розчин перемішували протягом 3 годин при 90 °С, потім концентрували при зниженому тиску. Залишок розтирали в 250 мл ацетону, потім концентрували. Операцію розтирання/випарювання повторювали двічі з 500 мл ацетону з одержанням 21,6 г (81%) сполуки 1M в формі білої твердої речовини.

Сполука 1N: (2S,3S)-2-[бензил(метил)аміно]-3-метилпентан-1-ол



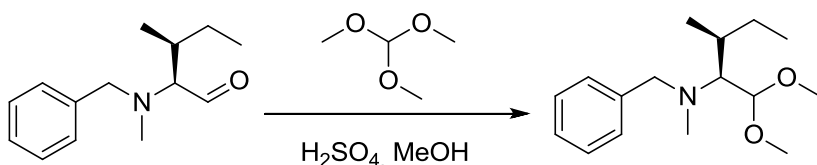
LiAlH₄ (0,36 г) суспендували в 10 мл ТГФ в інертній атмосфері при 0 °С. Додавали невеликими порціями сполуку 1M (1,5 г, 6,37 ммоль, 1,00 екв), підтримуючи при цьому температуру від 0 до 10 °С. Реакційну суміш перемішували протягом 2 годин при 65 °С і знову охолоджували до 0 °С, після чого нейтралізували послідовними доповненнями 360 мкл води, 1 мл 15% гідроксиду натрію і 360 мкл води. Осаджені солі алюмінію відокремлювали фільтруванням. Фільтрат висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували. Залишок очищали на колонці силікагелю сумішшю EtOAc і PE (1:50) з одержанням 820 мг (58%) сполуки 1N в формі блідо-жовтого масла.

Сполука 1O: (2S,3S)-2-[бензил(метил)аміно]-3-метилпентаналь



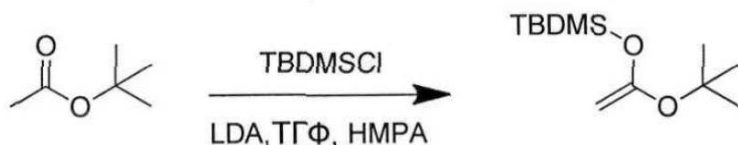
Оксалілхлорид (0,4 мл) розчиняли в ДХМ (15 мл) в інертній атмосфері. Розчин охолоджували до -70 °С і додавали по краплях розчин диметилсульфоксиду (ДМСО (0,5 мл) у ДХМ (10 мл)) протягом 15 хвилин. Реакційну суміш перемішували 30 хвилин, після чого додавали по краплях розчин сполуки 1N (820 мг, 3,70 ммоль, 1,00 екв) в ДХМ (10 мл) протягом 15 хвилин. Реакційну суміш перемішували додатково протягом 30 хвилин при низькій температурі, потім повільно додавали триетиламін (2,5 мл). Реакційну суміш перемішували 1 годину при -50 °С, потім охолоджуючу баню видаляли, і реакційну суміш нейтралізували 25 мл води, при цьому даючи температурі суміші повернутися до звичайної. Розчин двічі промивали 30 мл насиченого розчину NaCl, потім висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували. Залишок очищали на колонці силікагелю сумішшю EtOAc і PE (1:200) з одержанням 0,42 г (52%) сполуки 1O в формі жовтого масла.

Сполука 1P: (2S,3S)-N-бензил-1,1-диметокси-N,3-диметилпентан-2-амін



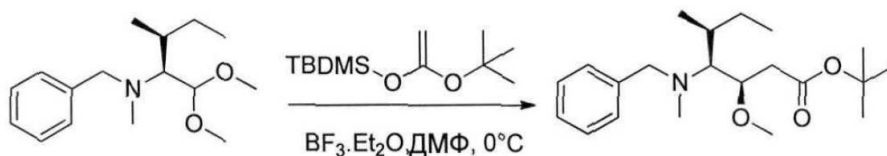
Сполуку 1O (4,7 г, 21,43 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в 20 мл метанолу при 0 °С. Додавали по краплях концентровану сірчану кислоту (4,3 мл), і перемішування продовжували протягом 30 хвилин при 0 °С. Додавали триметилортоформіат (21,4 мл), охолоджуючу баню видаляли, і реакційну суміш залишали при перемішуванні на 3 години при температурі навколишнього середовища. Реакційну суміш розбавляли 200 мл EtOAc, послідовно промивали 100 мл 10% Na₂CO₃ і 200 мл насиченого розчину NaCl, потім висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували при зниженому тиску з одержанням 3,4 г (60%) сполуки 1P в формі блідо-жовтого масла.

Сполука 1Q: [[1-(трет-бутокс)етеніл]окси](трет-бутил)диметилсилан



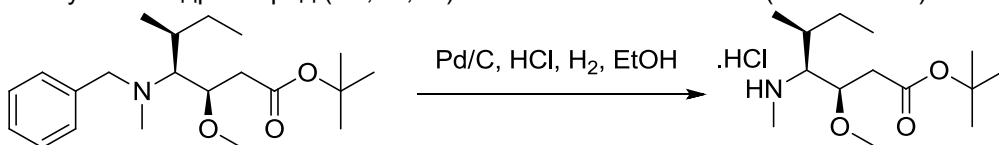
Діізопропіламін (20 г, 186,71 ммоль, 1,08 екв) розчиняли в 170 мл ТГФ в інертній атмосфері і охолоджували до -78 °С. Додавали по краплях nBuLi (2,4 М, 78,8 мл), і розчин перемішували протягом 30 хвилин при низькій температурі (з одержанням LDA – діізопропіламіді літію), після чого додавали трет-бутилацетат (20 г, 172,18 ммоль, 1,00 екв). Реакційну суміш перемішували 20 хвилин при -78 °С, після чого додавали гексаметилфосфорамід (HMPA, 25,8 мл) і розчин трет-бутилдиметилхлорсилану (TBDMSCl, 28 г, 185,80 ммоль, 1,08 екв) в 35 мл ТГФ. Перемішування продовжували додатково протягом 20 хвилин при низькій температурі, а потім охолоджуючу баню видаляли. Розчин концентрували при зниженому тиску. Залишок повторно розчиняли в 100 мл води, потім екстрагували 3 рази 100 мл РЕ. Органічні фази об'єднували, промивали один раз 500 мл насиченого розчину NaCl, висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували. Залишок очищали перегонкою з одержанням 16,6 г (83%) сполуки 1Q в формі безбарвного масла.

Сполука 1R: трет-Бутил (3R,4S,5S)-4-[бензил(метил)аміно]-3-метокси-5-метилгептаноат



Сполуку 1P (2,0 г, 7,54 ммоль, 1,00 екв) і сполуку 1Q (2,6 г, 11,28 ммоль, 1,50 екв) розчиняли в 33 мл ДХМ в інертній атмосфері. Розчин охолоджували до 0 °С. Додавали по краплях ДМФ (1,2 г) разом з розчином BF₃·Et₂O (2,1 г) в 7,5 мл ДХМ. Перемішування продовжували протягом 24 годин при 0 °С. Реакційну суміш промивали один раз 30 мл карбонату натрію (10%) і двічі 50 мл насиченого водного розчину NaCl, потім висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували. Залишок очищали на колонці силікагелю сумішшю EtOAc і РЕ (1:100) з одержанням 1,82 г (91%) сполуки 1R в формі жовтого масла.

Сполука 1S: Гідрохлорид (3R,4S,5S)-3-метокси-5-метил-4-(метиламіно)гептаноату

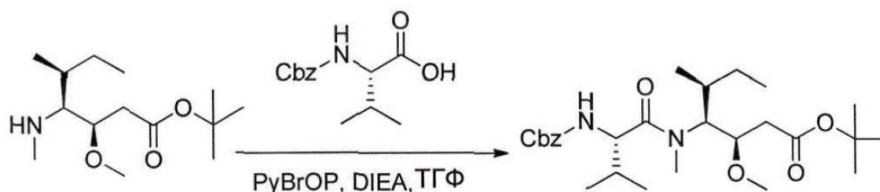


Сполуку 1R (2,4 г, 6,87 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в інертній атмосфері в 35 мл етанолу в присутності Pd/C (0,12 г) і концентрованої соляної кислоти (0,63 мл). Атмосферу азоту витісняли атмосферою водню, і реакційну суміш залишали при перемішуванні на 18 годин при температурі навколишнього середовища. Реакційну суміш фільтрували і концентрували при зниженому тиску. Залишок розтирали в 50 мл гексану, і супернатант видаляли, в результаті

після висушування при зниженому тиску одержали 1,66 г (82%) сполуки 1S в формі білої твердої речовини.

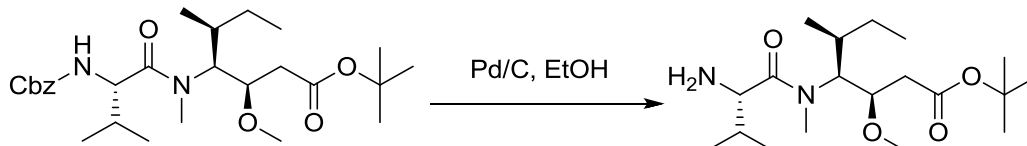
Сполука 1T: трет-Бутил (3R,4S,5S)-4-[(2S)-2-[[бензилокси]карбоніл]аміно]-N,3-диметилбутанамідо]-3-метокси-5-метилгептаноат

5



(2S)-2-[[бензилокси]карбоніл]аміно]-3-метилбутанову кислоту (15 г, 0,40 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в 300 мл ДХМ в присутності DIEA (38,3 мл) і бромтрипіролідінфосфонію гексафторфосфату (PyBrOP, 32,3 г). Розчин перемішували 30 хвилин при температурі навколишнього середовища, після чого додавали сполуку 1S (15,99 г, 0,42 ммоль, 1,07 екв). Реакційну суміш перемішували протягом 2 годин, а потім концентрували. Залишок очищали на колонці з оберненою фазою (C18) сумішшю ацетонітрилу (ACN) та води (від 30:70 до 100:0 за 40 хвилин) з одержанням 17 г (58%) сполуки 1T в формі безбарвного масла.

Сполука 1U: трет-Бутил-(3R,4S,5S)-4-[(2S)-2-аміно-N,3-диметилбутанамідо]-3-метокси-5-метилгептаноат



Сполуку 1T (76 мг, 0,15 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в інертній атмосфері в 10 мл етанолу в присутності Pd/C (0,05 г). Атмосферу азоту витісняли атмосферою водню, і реакційну суміш перемішували протягом 2 годин при температурі навколишнього середовища. Реакційну суміш фільтрували і концентрували при зниженому тиску з одержанням 64 мг сполуки 1U в формі безбарвного масла.

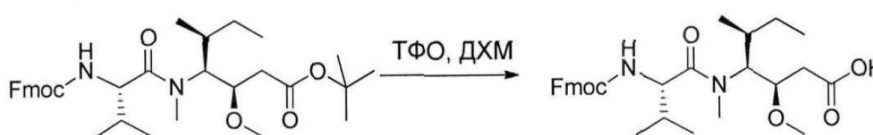
Сполука 1V: (3R,4S,5S)-4-[(2S)-2-[[9H-флуорен-9-ілметокси]карбоніл]аміно]-N,3-диметилбутанамідо]-3-метокси-5-метилгептаноат

25



Сполуку 1U (18,19 г, 50,74 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в 400 мл суміші 1,4-діоксан/вода (1:1) в присутності бікарбонату натрію (12,78 г, 152 ммоль, 3,00 екв) і 9H-флуорен-9-ілметилхлорформіат (Fmoc-Cl, 19,69 г, 76 ммоль, 1,50 екв), потім перемішували протягом 2 годин при температурі навколишнього середовища. Потім реакційну суміш розбавляли 500 мл води і екстрагували 3 рази 200 мл EtOAc. Органічні фази об'єднували, промивали один раз 200 мл насиченого водного розчину NaCl, висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували з одержанням 40 г частково очищеної сполуки 1V в формі блідо-жовтого масла.

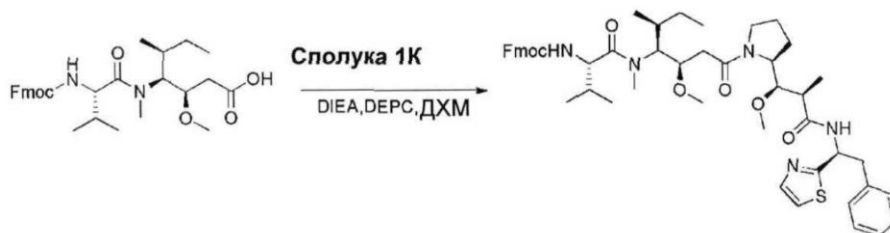
Сполука 1W: (3R,4S,5S)-4-[(2S)-2-[[9H-флуорен-9-ілметокси]карбоніл]аміно]-N,3-диметилбутанамідо]-3-метокси-5-метилгептанова кислота



Сполуку 1V (40 г, 68,88 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в нейтральній атмосфері в 600 мл ДХМ. Додавали ТФО (300 мл). Розчин перемішували 2 години при температурі навколишнього середовища, потім концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали на колонці

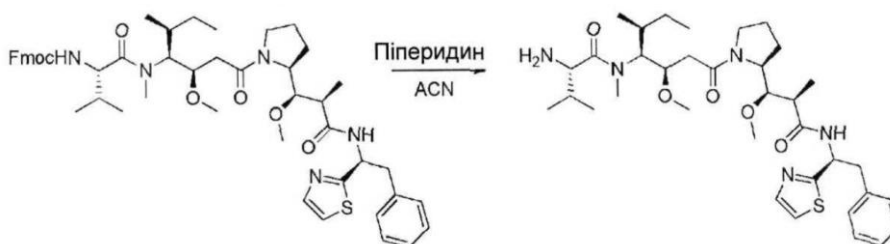
силікагелю сумішшю метанолу та ДХМ (1:10) з одержанням 23,6 г (65%) сполуки 1W в формі безбарвного масла.

Сполука 1X: 9H-флуорен-9-ілметил N-[(1S)-1-[[[(3R,4S,5S)-3-метокси-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-метокси-2-метил-2-[[[(1S)-2-феніл-1-(1,3-тіазол-2-іл)етил]карбамоїл]етил] піролідін-1-іл]-5-метил-1-оксогептан-4-іл](метил)карбамоїл]-2-метилпропіл]карбамат



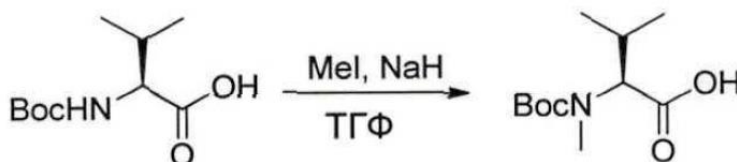
Сполуку 1W (2,53 г, 4,82 ммоль, 1,08 екв) розчиняли в 20 мл ДХМ в присутності сполуки 1K (2,18 г, 4,47 ммоль, 1,00 екв), DEPC (875 мг, 5,37 ммоль, 1,20 екв) і DIEA (1,25 г, 9,67 ммоль, 2,16 екв). Реакційну суміш залишали на ніч при перемішуванні при температурі навколишнього середовища, потім послідовно промивали 50 мл насиченого розчину KHSO_4 і 100 мл води, висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували. Залишок очищали на колонці силікагелю сумішшю метанолу та ДХМ (від 1: 200 до 1:40) з одержанням 2,8 г (71%) сполуки 1X в формі блідо-жовтої твердої речовини.

Сполука 1Y: (2S)-2-аміно-N-[(3R,5S)-3-метокси-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-1-метокси-2-метил-2-[[[(1S)-2-феніл-1-(1,3-тіазол-2-іл)етил]карбамоїл]етил]піролідін-1-іл]-5-метил-1-оксогептан-4-іл]-N,3-диметилбутанамід



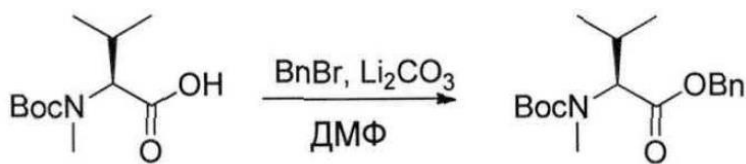
Сполуку 1X (2,8 г, 3,18 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в ацетонітрилі (ACN, 12 мл) в присутності піперидину (3 мл) і залишали при перемішуванні на 18 годин при температурі навколишнього середовища. Реакційну суміш нейтралізували 50 мл води, потім двічі екстрагували 100 мл ДХМ. Органічні фази об'єднували, висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували. Залишок очищали на колонці силікагелю сумішшю метанолу та ДХМ (від 1:100 до 1:40) з одержанням 1,2 г (57%) сполуки 1Y в формі жовтої твердої речовини.

Сполука 1ZA: (2S)-2-[[трет-бутоксикарбоніл](метил)аміно]-3-метилбутанова кислота



(2S)-2-[[трет-бутоксикарбоніл]аміно]-3-метилбутанову кислоту (63 г, 289,97 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в інертній атмосфері в ТГФ (1000 мл) в присутності йодметану (181 мл). Розчин охолоджували до 0°C , після чого додавали гідрід натрію (116 г, 4,83 моль, 16,67 екв) невеликими порціями. Реакційну суміш перемішували протягом 1,5 годин при 0°C , потім охолоджуючу баню видаляли, і перемішування продовжували протягом 18 годин. Реакційну суміш нейтралізували 200 мл води, а потім концентрували при зниженому тиску. Залишкову водну фазу розбавляли 4 літрами води, промивали один раз 200 мл EtOAc і доводили pH до значення між 3 і 4 зв. розчином соляної кислоти. Одержану суміш екстрагували 3 рази 1,2 л EtOAc. Органічні фази об'єднували, висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували з одержанням 60 г (89%) сполуки 1ZA в формі жовтого масла.

Сполука 1ZB: бензил-(2S)-2-[[трет-бутоксикарбоніл](метил)аміно]-3-метилбутаноат



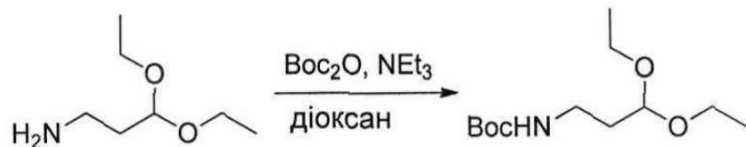
- 5 Сполуку 1ZA (47 г, 203,21 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в ДМФ (600 мл) в присутності Li_2CO_3 (15,8 г, 213,83 ммоль, 1,05 екв). Розчин охолоджували до 0°C , потім додавали по краплях бензилбромід (BnBr 57,9 г, 338,53 ммоль, 1,67 екв). Реакційну суміш залишали на ніч при перемішуванні, після чого нейтралізували 400 мл води і фільтрували. Одержаний розчин двічі екстрагували 500 мл EtOAc. Органічні фази об'єднували, висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували. Залишок очищали на колонці силікагелю сумішшю EtOAc і PE (від 1:100 до 1:20) з одержанням 22,5 г (34%) сполуки 1ZB в формі жовтого масла.

Сполука 1ZC: гідрохлорид бензил-(2S)-3-метил-2-(метиламіно)бутаноату



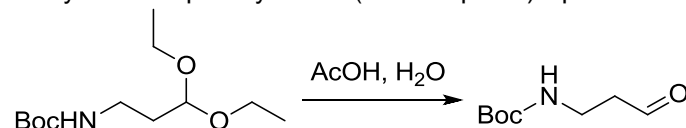
- 15 Сполуку 1ZB (22,5 г, 70,00 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в 150 мл ДХМ. Барботували газоподібну соляну кислоту. Реакційну суміш перемішували 1 годину при температурі навколишнього середовища, а потім концентрували при зниженому тиску з одержанням 17 г (94%) сполуки 1ZC в формі жовтої твердої речовини.

20 Сполука 1ZD: трет-Бутил-N-(3,3-діетоксипропіл)карбамат



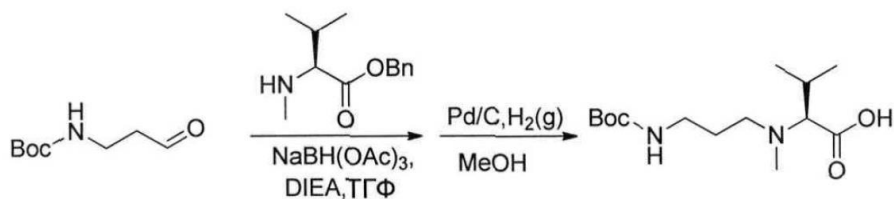
- 25 3,3-Діетоксипропан-1-амін (6 г, 40,76 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в 1,4-діоксані (30 мл) в присутності TEA (4,45 г, 43,98 ммоль, 1,08 екв), потім охолоджували до 0°C . Додавали по краплях $(\text{Boc})_2\text{O}$ (9,6 г, 43,99 ммоль, 1,08 екв), розведений в 20 мл 1,4-діоксану. Розчин перемішували 2 години при 0°C , потім протягом ночі при температурі навколишнього середовища, після чого нейтралізували 10 мл води. рН доводили до 5 HCl (1%). Розчин екстрагували 3 рази 50 мл EtOAc. Органічні фази об'єднували, висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували з одержанням 8,21 г (81%) сполуки 1ZD в формі блідо-жовтого масла.

Сполука 1ZE: трет-Бутил-N-(3-оксопропіл)карбамат



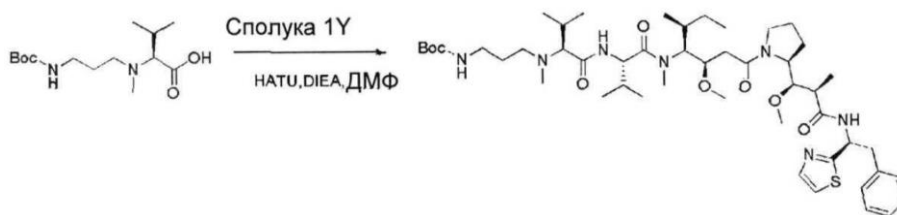
- 35 Сполуку 1ZD (8,20 г, 33,15 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в 18,75 мл оцтової кислоти і залишали на ніч при перемішуванні при температурі навколишнього середовища. Потім реакційну суміш екстрагували 3 рази 30 мл EtOAc. Органічні фази об'єднували, промивали 3 рази 30 мл насиченого розчину NaCl, висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували з одержанням 5 г (87%) сполуки 1ZE в формі темно-червоного масла.

40 Сполука 1ZF: (2S)-2-[(3-[[трет-бутоксикарбоніл]аміно]пропіл)(метил)аміно]-3-метилбутанова кислота



Сполуку 1ZE (2,4 г, 13,86 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в 50 мл ТГФ у присутності сполуки 1ZC (3,56 г, 13,81 ммоль, 1,00 екв) і DIEA (9,16 мл, 4,00 екв). Реакційну суміш перемішували 30 хвилин при температурі навколишнього середовища, після чого додавали триацетоксиборгідрид натрію (5,87 г, 27,70 ммоль, 2,00 екв). Перемішування продовжували протягом ночі, потім реакційну суміш нейтралізували 100 мл води і екстрагували 3 рази 50 мл EtOAc. Органічні фази об'єднували, висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували. Залишок частково очищали на колонці силікагелю сумішшю EtOAc і PE (1:4). Одержаний неочищений продукт повторно розчиняли в 20 мл метанолу в присутності Pd/C (1,2 г) і гідрогенізували протягом 20 хвилин при звичайній температурі і тиску. Реакційну суміш фільтрували і концентрували при зниженому тиску з одержанням 200 мг (5%) сполуки 1ZF в формі білої твердої речовини.

Сполука 1ZG: трет-бутил-N-(3-[[[(1S)-1-[[[(1S)-1-[[[(3R,4S,5S)-3-метокси-1-[(2S)-2-[[[(1R,2R)-1-метокси-2-метил-2-[[[(1S)-2-феніл-1-(1,3-тіазол-2-іл)етил]карбамоїл]тііл]піролідин-1-іл]-5-метил-1-оксогептан-4-іл](метил)карбамоїл]-2-метилпропіл]карбамоїл]-2-метилпропіл](метил)аміно]пропіл]карбамат



Сполуку 1Y (50 мг, 0,08 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в 2 мл ДМФ в присутності сполуки 1ZF (26,2 мг, 0,09 ммоль, 1,20 екв), DIEA (37,7 мл) і O-(7-азабензотриазол-1-іл)-N,N,N',N'-тетраметилуранію гексафторфосфату (HATU, 43,3 мг, 0,11 ммоль, 1,50 екв). Реакційну суміш залишали на ніч при перемішуванні при температурі навколишнього середовища, потім розбавляли 10 мл води і екстрагували 3 рази 5 мл EtOAc. Органічні фази об'єднували, висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували з одержанням 100 мг сполуки 1ZG в формі частково очищеного безбарвного масла.

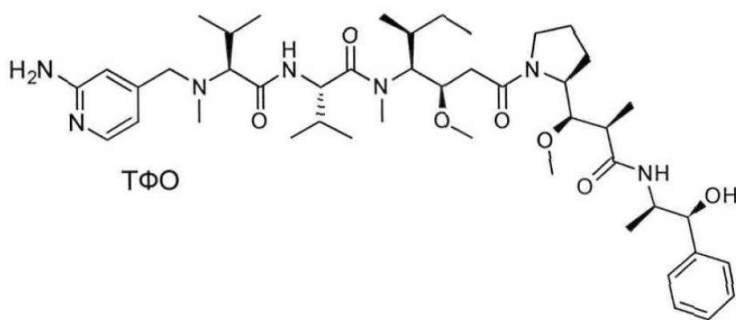
Сполуку 1ZG (90 мг, 0,10 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в нейтральній атмосфері в 2 мл ДХМ, і розчин охолоджували в крижаній бані. ТФО (1 мл) додавали, і реакційну суміш перемішували 2 години при температурі навколишнього середовища, потім концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали препаративною ВЕРХ (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 150 мм; елюююча фаза: суміш вода / ACN, забуферена 0,05% ТФО; градієнт від 18% до 31% ACN протягом 7 хвилин, потім від 31% до 100% ACN протягом 2 хвилин; Waters 2489, УФ детектор при 254 нм і 220 нм). Сполуку 1 було одержано при виході 25% (23 мг) у формі білої твердої речовини.

РХ/МС/УФ (колонка Atlantis T3, 3 мкм, 4,6 × 100 мм; 35 °C; 1 мл/хв, від 30% до 60% ACN в воді (20 mM ацетат амонію протягом 6 хвилин); IEP (C44H73N7O6S, точна маса 827,53) m/z: 829 (MH⁺), 5,84 хв (93,7%, 254 нм).

¹H ЯМР (300 МГц, CD₃OD, ppm): δ (присутність ротамерів) 7.85 - 7.80 (m, 1H); 7.69 - 7.66 (m, 1H), 7.40 - 7.10 (m, 5H), 5.80 - 5.63 (m, 1H), 4.80 - 4.65 (m, 2H), 4.22 - 4.00 (m, 1H), 3.89 - 0.74 (m, 58H).

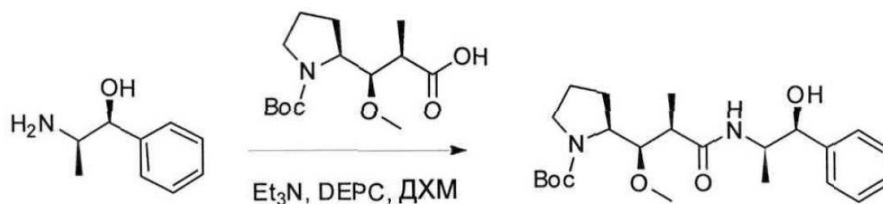
Еталонна сполука 2

(S)-2-((S)-2-(((2-амінопіридин-4-іл)метил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-(((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гідрокси-1-фенілпропан-2-іл)аміно)-1-метокси-2-метил-3-оксопропіл)піролідин-1-іл)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-іл)-N,3-диметилбутанамід, трифтороцтова кислота



Сполука 2A: трет-бутил-(S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гідрокси-1-фенілпропан-2-іл)аміно)-1-метокси-2-метил-3-оксипропіл)піролідин-1-карбоксилат

5



Сполуку 1D (2,5 г, 8,70 ммоль, 1,00 екв) і (1S,2R)-2-аміно-1-фенілпропан-1-ол (1,315 г, 8,70 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в інертній атмосфері в ДМФ (35 мл). Розчин охолоджували до 0 °С, потім додавали по краплях DEPC (1,39 мл) і TEA (1,82 мл). Реакційну суміш перемішували 2 години при 0 °С, потім 4 години при температурі навколишнього середовища. Реакційну суміш розбавляли 200 мл води і екстрагували 3 рази 50 мл EtOAc. Органічні фази об'єднували, промивали один раз 50 мл H_2SO_4 (1 моль/л), один раз 50 мл NaHCO_3 (нас.), один раз 50 мл NaCl (нас.), потім висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували при зниженому тиску з одержанням 3,6 г (98%) сполуки 2A в формі жовтої твердої речовини.

15

Сполука 2B: (2R,3R)-N-((1S,2R)-1-гідрокси-1-фенілпропан-2-іл)-3-метокси-2-метил-3-((S)-піролідин-2-іл)пропанамід 2,2,2-трифторацетат

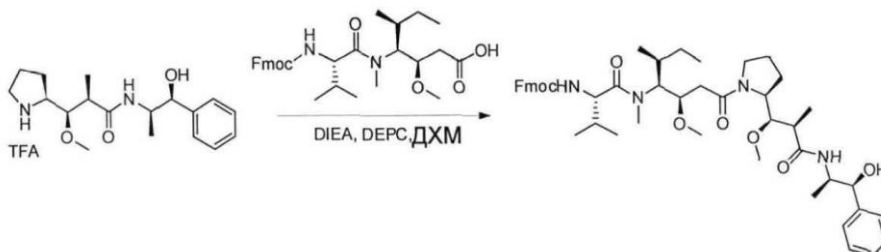


20

Сполуку 2A (2,7 г, 6,42 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в інертній атмосфері в ДХМ (40 мл), потім охолоджували до 0 °С. Додавали ТФО (25 мл), і розчин перемішували протягом 2 годин при 0 °С. Реакційну суміш концентрували при зниженому тиску з одержанням 4,4 г сполуки 2B в формі жовтого масла.

25

Сполука 2C: (9H-флуорен-9-іл)метил ((S)-1-(((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гідрокси-1-фенілпропан-2-іл)аміно)-1-метокси-2-метил-3-оксипропіл)піролідин-1-іл)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-іл)(метил)аміно)-3-метил-1-оксобутан-2-іл)карбамат

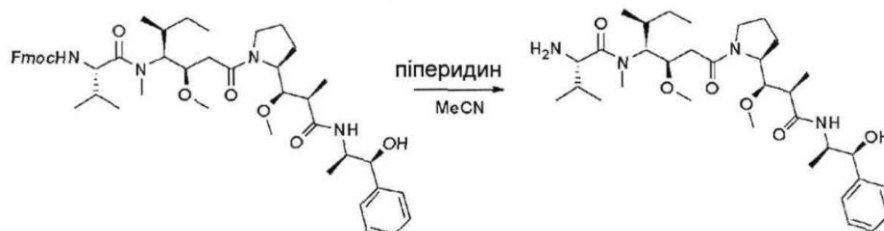


30

Сполуки 2B (4,4 г, 10,13 ммоль, 1,00 екв) і 1W (5,31 г, 10,12 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в інертній атмосфері в ДХМ (45 мл). Розчин охолоджували до 0 °С, потім додавали по краплях DEPC (1,62 мл) і DIEA (8,4 мл). Реакційну суміш перемішували протягом 2 годин при 0 °С, потім

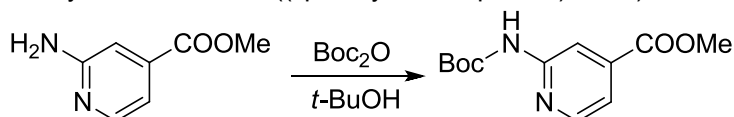
при температурі навколишнього середовища протягом ночі. Реакційну суміш розбавляли 200 мл води і екстрагували 3 рази 50 мл EtOAc. Органічні фази об'єднували, промивали один раз 50 мл KHSO₄ (1 моль/л), один раз 50 мл NaHCO₃ (нас.), Один раз 50 мл NaCl (нас.), Потім висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували при зниженому тиску з одержанням 3,3г (39%) сполуки 2C в формі жовтої твердої речовини.

Сполука 2D: (S)-2-аміно-N-((3R,4S,5S)-1-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гідрокси-1-фенілпропан-2-іл)аміно)-1-метокси-2-метил-3-оксопропіл)піролідін-1-іл)-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-іл)-N,3-диметилбутанамід



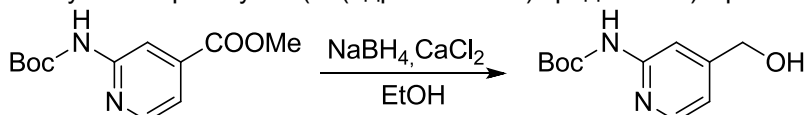
Сполуку 2C (300 мг, 0,36 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в інертній атмосфері в ACN (2 мл) і піперидині (0,5 мл). Розчин залишали при перемішуванні на ніч при температурі навколишнього середовища, потім випарювали до сухого стану при зниженому тиску. Залишок очищали на колонці силікагелю сумішшю ДХМ та MeOH (1:100) з одержанням 150 мг (68%) сполуки 2D в формі білої твердої речовини.

Сполука 2E: метил 2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)ізонікотинат



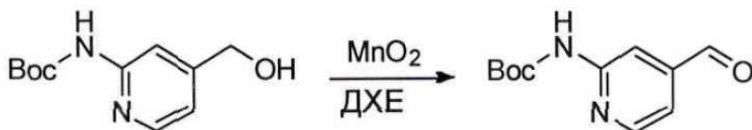
Метил-2-амінопіридин-4-карбоксилат (2 г, 13,14 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в трет-бутанолі (20 мл), після чого додавали ди-трет-бутилдикарбонат (4,02 г, 18,42 ммоль, 1,40 екв). Реакційну суміш перемішували при 60 °С протягом ночі, потім реакцію зупиняли за допомогою додавання водного розчину 1M NaHCO₃ (50 мл). Тверду речовину виділяли фільтруванням, промивали 50 мл EtOH, потім висушували у вакуумі з одержанням 2,5 г (75%) сполуки 2E в формі білої твердої речовини.

Сполука 2F: трет-бутил (4-(гідроксиметил)піридин-2-іл)карбамат



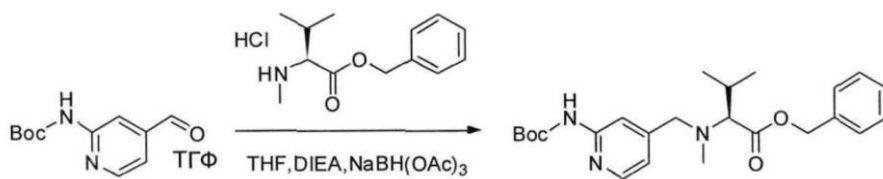
Сполуку 2E (2,5 г, 9,91 ммоль, 1,00 екв) і CaCl₂ (1,65 г) розчиняли в EtOH (30 мл). Розчин охолоджували до 0 °С, потім поступово додавали NaBH₄ (1,13 г, 29,87 ммоль, 3,01 екв). Розчин залишали при перемішуванні на ніч при температурі навколишнього середовища, потім реакцію зупиняли додаванням води (50 мл). Суміш екстрагували три рази 20 мл EtOAc. Органічні фази об'єднували, промивали двічі 20 мл NaCl (нас.), Потім висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували при зниженому тиску з одержанням 2,0 г (90%) сполуки 2F в формі безбарвної твердої речовини.

Сполука 2G: трет-бутил (4-формілпіридин-2-іл)карбамат



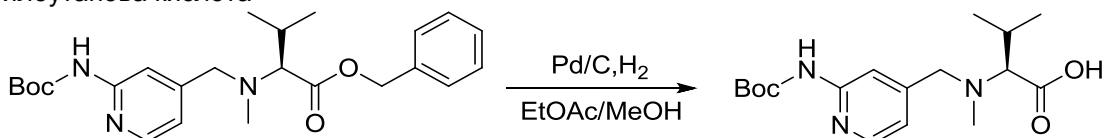
Сполуку 2F (2,5 г, 11,15 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в ДХЕ (25 мл), потім додавали 19,4 г (223,14 ммоль, 20,02 екв) MnO₂. Суміш залишали при перемішуванні на ніч при 70 °С, потім тверді речовини видаляли фільтруванням. Фільтрат випарювали до сухого стану з одержанням 1,4 г (57%) сполуки 2G в формі білої твердої речовини.

Сполука 2H: бензил-(S)-2-(((2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)піридин-4-іл)метил)(метил)аміно)-3-метилбутаноат



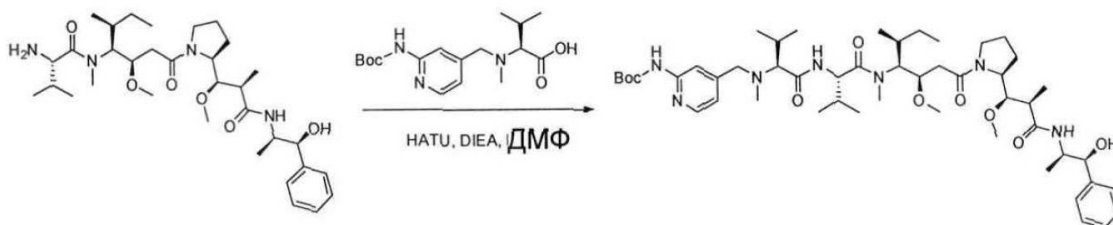
Сполуку 2G (2,3 г, 10,35 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в 25 мл ТГФ в присутності сполуки 1ZC (2,93 г, 11,37 ммоль, 1,10 екв), DIEA (5,39 г, 41,71 ммоль, 4,03 екв) і NaBH(OAc)₃ (4,39 г, 20,71 ммоль, 2,00 екв). Реакційну суміш перемішували протягом 6 годин при температурі навколишнього середовища, потім нейтралізували 60 мл NaHCO₃ (нас.) і екстрагували 3 рази 20 мл AcOEt. Органічні фази об'єднували, промивали двічі 20 мл NaCl (нас.), висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували. Залишок очищали на колонці силікагелю сумішшю EtOAc і PE (1:15) з одержанням 2,7 г (61%) сполуки 2H в формі білої твердої речовини.

Сполука 2I: (S)-2-(((2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)піридин-4-іл)метил) (метил)аміно)-3-метилбутанова кислота



Сполуку 2H (500 мг, 1,17 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в 10 мл AcOEt і 2 метанолу в присутності Pd/C (250 мг) і гідрогенізували протягом 3 годин при температурі навколишнього середовища і атмосферному тиску. Реакційну суміш фільтрували і концентрували при зниженому тиску з одержанням 254 мг (64%) сполуки 2I в формі безбарвної твердої речовини.

Сполука 2J: трет-бутил (4-(((3S,6S,9S,10R)-9-((S)-втор-бутил)-10-(2-(((S)-2-(((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гідрокси-1-фенілпропан-2-іл)аміно)-1-метокси-2-метил-3-оксопропіл)піролідин-1-іл)-2-оксоетил)-3,6-діізопропіл-2,8-диметил-4,7-діоксо-11-окса-2,5,8-триазидодецил)піридин-2-іл) карбамат



Сполуку 2J було одержано аналогічно сполуці 1ZG з аміну 2D (85,2 мг, 0,14 ммоль, 1,50 екв), кислоти 2I (31,7 мг, 0,09 ммоль, 1,00 екв), HATU (42,9 мг, 0,11 ммоль, 1,20 екв) і DIEA (36,7 мг, 0,28 ммоль, 3,02 екв) в ДМФ (3 мл). Після випарювання до сухого стану було одержано 100 мг неочищеного продукту в формі білої твердої речовини.

Сполуку 2J (100 мг, 0,11 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в 2 мл ДХМ та 1 мл ТФО. Реакційну суміш перемішували протягом 1 години при температурі навколишнього середовища, потім концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали препаративною ВЕРХ (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 150 мм; елюююча фаза: суміш вода/ACN, забуферена 0,05% ТФО; градієнт від 20% до 40% ACN протягом 10 хвилин, потім від 40% до 100% ACN протягом 2 хвилин; Waters 2489, детектор УФ при 254 нм і 220 нм). Сполуку 2 було одержано при виході 6% (6,3 мг) у формі білої твердої речовини.

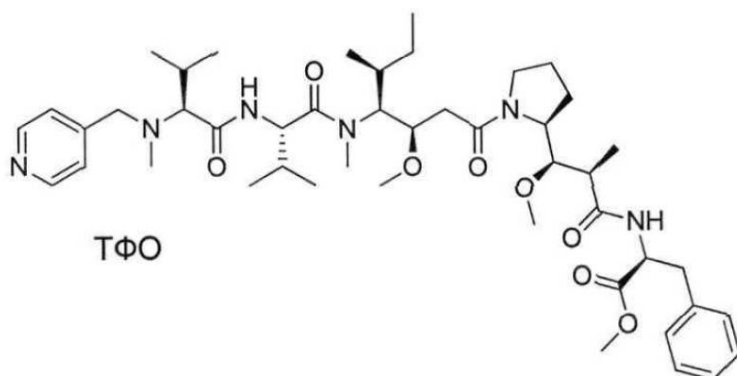
PX/MC/УФ (колонка Ascentis Express C18, 2,7 мкм, 4,6 × 100 мм; 40 °C; 1,8 мл / хв, від 10 % до 95 % ACN в воді (0,05% ТФО) протягом 6 хвилин; IEP (C₄₅H₇₃N₇O₇, точна маса 823,56) m/z: 824,5 (MH⁺) і 412,9 (M.2H⁺/2, 100 %), 3,21 хв (99,2%, 210 нм)

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD, ppm): δ (присутність ротамерів) 7.81 - 7.79 (m, 1H); 7.39 - 7.29 (m, 5H); 6.61 - 6.59 (m, 2H); 4.84 - 4.52 (m, 1H); 4.32 - 4.02 (m, 1H); 3.90 - 2.98 (m, 10H); 2.90 - 2.78 (m, 1H); 2.55 - 0.81 (m, 39H).

Еталонна сполука 3

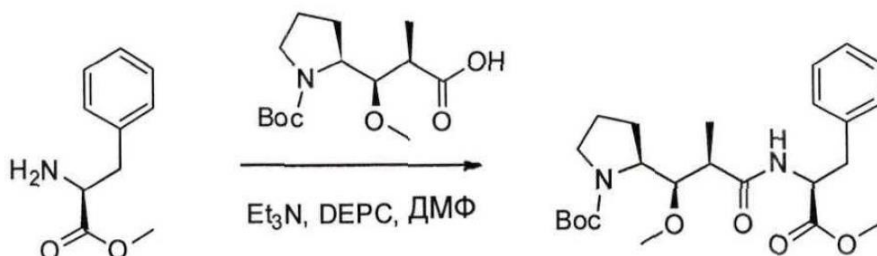
метил ((S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((S)-3-метил-2-(метил(піридин-4-ілметил)аміно)бутанамідо)бутанамідо)-3-метокси-5-

метилгептаноїл)піролідин-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанамідо)-3-фенілпропаноат, трифтороцтова кислота



5

Сполука 3А: трет-бутил (S)-2-((1R,2R)-1-метокси-3-(((S)-1-метокси-1-оксо-3-фенілпропан-2-іл)аміно)-2-метил-3-оксопропіл)піролідин-1-карбоксилат



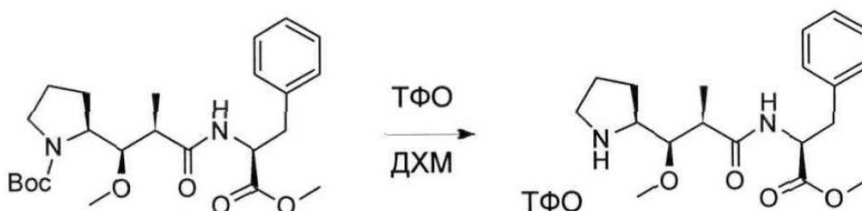
10

Сполуку 1D (3 г, 10,44 ммоль, 1,00 екв) і метил-(S)-2-аміно-3-фенілпропаноат (2,25 г, 12,55 ммоль, 1,20 екв) розчиняли в інертній атмосфері в ДМФ (40 мл). Розчин охолоджували до 0 °С, потім додавали по краплях DEPC (1,67 мл, 1,05 екв) і TEA (3,64 мл, 2,50 екв). Реакційну суміш перемішували протягом 2 годин при 0 °С, потім при температурі навколишнього середовища протягом ночі. Реакційну суміш розбавляли 100 мл води і екстрагували три рази 50 мл EtOAc. Органічні фази об'єднували, промивали один раз 100 мл KHSO₄ (1 моль/л), один раз 100 мл NaHCO₃ (нас.), один раз 100 мл NaCl (нас.), потім висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували при зниженому тиску з одержанням 4 г (85%) сполуки 3А в формі безбарвного масла.

15

20

Сполука 3В: 2,2,2-трифторацетат метил (S)-2-((2R,3R)-3-метокси-2-метил-3-((S)-піролідин-2-іл)пропанамідо)-3-фенілпропаноат

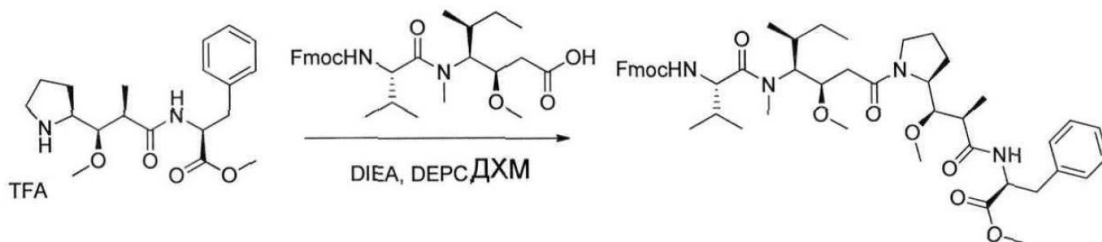


25

Сполуку 3А (5 г, 11,15 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в інертній атмосфері в ДХМ (40 мл). Додавали ТФО (25 мл), і розчин перемішували протягом 2 годин. Реакційну суміш концентрували при зниженому тиску з одержанням 8 г сполуки 3В в формі жовтого масла.

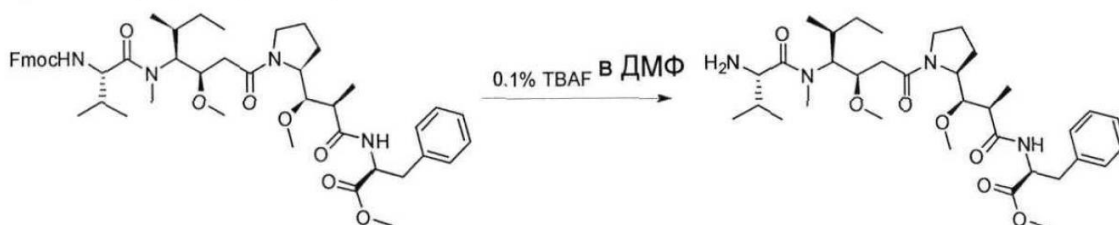
Сполука 3С: метил (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-(((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)аміно)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептаноїл)піролідин-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанамідо)-3-фенілпропаноат

30



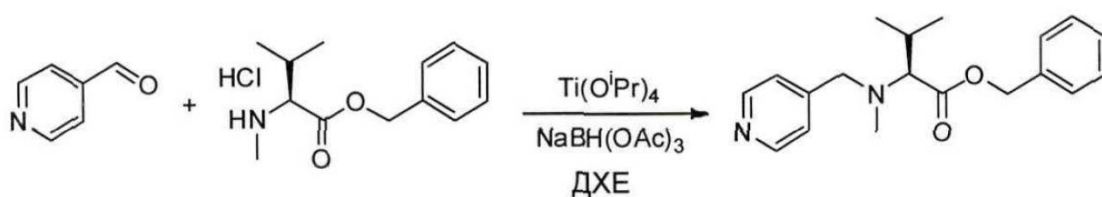
Сполуку 3В (8,03 г, 17,36 ммоль, 1,00 екв) і 1W (9,1 г, 17,34 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в інертній атмосфері в ДХМ (80 мл). Розчин охолоджували до 0 °С, потім додавали по краплях DEPC (2,8 мл) і DIEA (12 мл). Реакційну суміш перемішували протягом 2 годин при 0 °С, потім при температурі навколишнього середовища протягом ночі. Реакційну суміш розбавляли 200 мл води і екстрагували три рази 50 мл ДХМ. Органічні фази об'єднували, промивали один раз 50 мл KHSO_4 (1 моль/л), один раз 50 мл NaHCO_3 (нас.), один раз 50 мл NaCl (нас.), потім висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували при зниженому тиску з одержанням 5 г (34%) сполуки 3С в формі жовтої твердої речовини.

Сполука 3D: метил (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-аміно-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептаноїл)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанамідо)-3-фенілпропаноеат



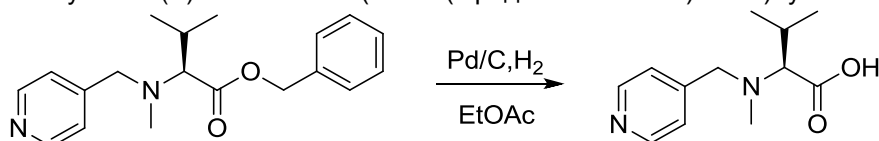
Сполуку 3С (5,5 г, 6,43 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в інертній атмосфері в розчині фториду тетрабутиламонію (TBAF, 2,61 г, 9,98 ммоль, 1,55 екв) в ДМФ (100 мл). Розчин перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 2 годин, потім розбавляли 100 мл води і екстрагували три рази 50 мл EtOAc. Органічні фази об'єднували, потім висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували при зниженому тиску з одержанням 3,3 г (81%) сполуки 3D в формі жовтої твердої речовини.

Сполука 3Е: бензил-(S)-3-метил-2-(метил(піридин-4-ілметил)аміно)бутаноеат



Піридин-4-карбальдегід (1 г, 9,34 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в 10 мл 1,2-дихлоретану (ДХЕ) в присутності сполуки 1ZС (2,9 г, 11,25 ммоль, 1,21 екв) та ізопропоксиду титану (IV) (4,19 мл, 1,40 екв). Суміш перемішували при температурі навколишнього середовища протягом 30 хвилин, потім додавали 2,77 г $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (13,07 ммоль, 1,40 екв). Реакційну суміш залишали на ніч при перемішуванні, потім нейтралізували 100 мл води, і суміш екстрагували 3 рази 50 мл AcOEt . Органічні фази об'єднували і випарювали до сухого стану. Залишок очищали на колонці силікагелю сумішшю EtOAc і PE (1:20) з одержанням 1,3 г (45%) сполуки 3Е в формі безбарвного масла.

Сполука 3F: (S)-3-метил-2-(метил(піридин-4-ілметил)аміно)бутанова кислота



Сполуку 3Е (800 мг, 2,56 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в 30 мл AcOEt в присутності Pd/C (300

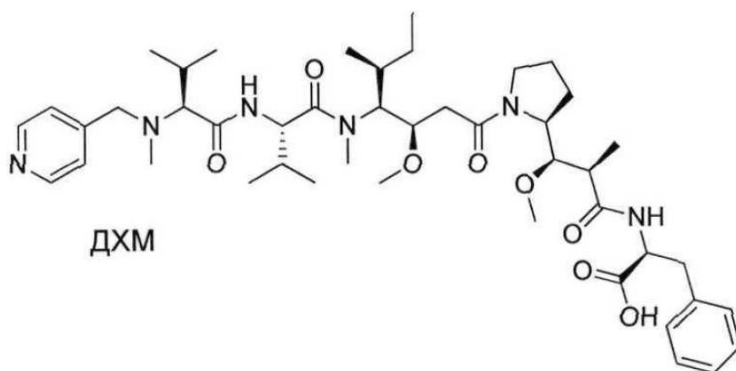
мг) і гідрогенізували протягом 3 годин при температурі навколишнього середовища і атмосферному тиску. Реакційну суміш фільтрували і концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали на колонці силікагелю сумішшю ДХМ та MeOH (від 100:1 до 5:1) з одержанням 100 мг (18%) сполуки 3F в формі білої твердої речовини.

Сполуку 3D (50 мг, 0,08 ммоль, 1,00 екв) і 3F (26,34 мг, 0,12 ммоль, 1,50 екв) розчиняли в 3 мл ДХМ. Розчин охолоджували до 0 °C, потім додавали по краплях 0,018 мл DEPC і 0,0392 мл DIEA. Реакційну суміш перемішували при 0 °C протягом 2 годин, потім при температурі навколишнього середовища протягом ночі. Реакційну суміш концентрували при зниженому тиску, і залишок (70 мг) очищали препаративною ВЕРХ (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 150 мм; елюююча фаза: суміш вода/ACN, забуферена 0,05 % ТФО; градієнт від 20% до 40% ACN протягом 10 хвилин, потім від 40% до 100% ACN протягом 2 хвилин; Waters 2545, детектор УФ при 254 нм і 220 нм). Сполуку 3 було одержано при виході 27% (20 мг) у формі білої твердої речовини.

РХ/МС/УФ (колонка Ascentis Express C18, 2,7 мкм, 4,6 × 100 мм; 40 °C; 1,5 мл / хв, від 10 % до 95 % ACN в воді (0,05% ТФО) протягом 8 хв; IEP (C₄₆H₇₂N₆O₈, точна маса 836,5) m/z: 837,5 (MH⁺) і 419,4 (M.2H⁺/2 (100%)), 7,04 хв (90,0%, 210 нм)

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD, ppm): δ (присутність ротамерів) 8.76 - 8.74 (m, 2H); 8.53 - 8.48 (m, 0.4H, NHCO неповний обмін); 8.29 - 8.15 (m, 0.8H, NHCO неповний обмін); 8.01 (s, 2H), 7.31 - 7.22 (m, 5H), 4.88 - 4.68 (m, 3H); 4.31 - 4.07 (m, 2H); 3.94 - 2.90 (m, 18H); 2.55 - 0.86 (m, 38H).

Еталонна сполука 4
(S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((S)-3-метил-2-(метил(піридин-4-ілметил)аміно)бутанамідо)бутанамідо)-3-метокси-5-метилгептаноїл)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанамідо)-3-фенілпропанова кислота, трифтороцтова кислота

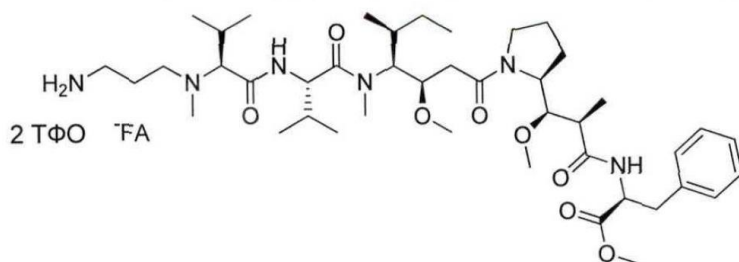


Сполуку 3 (100 мг, 0,11 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в суміші води (5 мл), ACN (5 мл) і піперидину (2,5 мл). Реакційну суміш залишали при перемішуванні на ніч, потім концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали препаративною ВЕРХ (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 150 мм; елюююча фаза: суміш вода/ACN, забуферена 0,05% ТФО; градієнт від 20% до 40% ACN в протягом 10 хвилин, потім від 40% до 100% ACN протягом 2 хвилин; Waters 2545, детектор УФ при 254 нм і 220 нм).

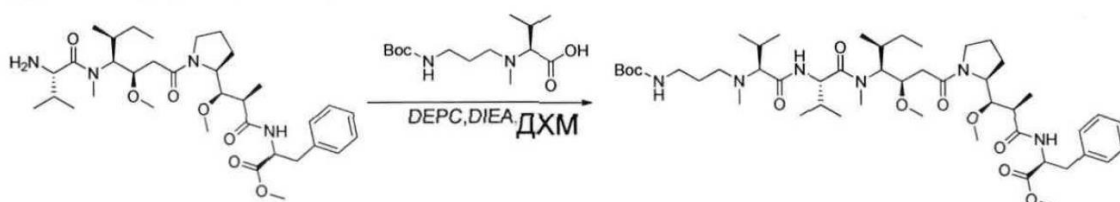
РХ/МС/УФ (колонка Ascentis Express C18, 2,7 мкм, 4,6 × 100 мм; 40 °C; 1,5 мл / хв, від 10% до 95% ACN в воді (0,05% ТФО) протягом 8 хвилин; IEP (C₄₅H₇₀N₆O₈, точна маса 822,5) m/z: 823,5 (MH⁺) і 412,4 (M.2H⁺/2, 100%), 6,84 хв (89,1%, 210 нм).

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD, ppm): δ (присутність ротамерів) 8.79 - 8.78 (m, 2H); 8.09 (m, 2H); 7.30 - 7.21 (m, 5H); 4.80 - 4.80 (m, 1H), 4.36 - 0.87 (m, 58H).

Еталонна сполука 6
метил (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-амінопропіл) (метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептаноїл)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанамідо)-3-фенілпропаноат, біс-трифтороцтова кислота



Сполука 6A: метил (2S)-2-[(2R)-2-[(R)-[(2S)-1-[(3R,4S,5S)-4-[(2S)-2-[(2S)-2-[(3-[[трет-
 5 метокси-5-метилгептанойл]піролідин-2-іл](метокси)метил] пропанамідо]-3-фенілпропаноат



Сполуку 3D (157,5 мг, 0,25 ммоль, 1,00 екв) розчиняли при 0 °C в інертній атмосфері в 3 мл
 10 ДХМ в присутності карбонової кислоти 1ZF (78,7 мг, 0,27 ммоль, 1,10 екв), DEPC (46 мкл) і DIEA (124 мкл). Реакційну суміш перемішували протягом 2 годин при низькій температурі, а потім охолоджуючу баню видаляли, і перемішування продовжували протягом 4 годин. Потім її концентрували при зниженому тиску з одержанням 200 мг сполуки 6A в формі неочищеного жовтого масла. Суміш використовували в такому вигляді в наступній стадії.

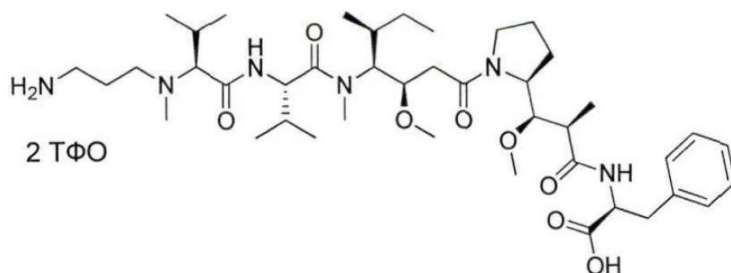
Сполуку 6A (200 мг, 0,22 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в інертній атмосфері при 0 °C в 2 мл
 15 ДХМ. Додавали по краплях ТФО (1 мл), і охолоджуючу баню видаляли. Реакційну суміш перемішували 1 годину при температурі навколишнього середовища, потім концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали препаративною ВЕРХ (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 150 мм; елюююча фаза: суміш вода/ACN, забуферена 0,05% ТФО; градієнт від 20% до 40% ACN в протягом 10 хвилин, потім від 40% до 100% ACN протягом
 20 2 хвилин; Waters 2489, детектор УФ при 254 нм і 220 нм) з одержанням 60 мг (26%, вихід за 2 стадії) сполуки 6 в формі білої твердої речовини.

РХ/МС/УФ (колонка Zorbax Eclipse Plus C8, 3,5 мкм, 4,6 × 150 мм; 1 мл / хв, 40 °C; від 30 до
 25 80% метанолу в воді (0,1 % H₃PO₄) протягом 18 хвилин; ІЕР (C₄₃H₇₄N₆O₈, точна маса 802,56) m/z: 804 (M⁺); 11,50 хв (91,5%, 210 нм).

¹H ЯМР (300МГц, CD₃OD, ppm): δ (присутність ротамерів) 8.52 (d, 0.3H, NHCO неповний обмін); 8.25 (d, 0.5H, NHCO неповний обмін); 7.30–7.22 (m, 5H); 4.9–4.6 (m, 3H); 4.2–4.0 (m, 1H); 4.0–0.86 (m, 61H).

Еталонна сполука 7

(S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-амінопропіл) (метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептанойл) піролідин-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанамідо)-3-фенілпропанова кислота, біс-трифтороцтова кислота



Сполуку 6 (70 мг, 0,08 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в суміші води (5 мл), ACN (2,5 мл) і піперидин (5 мл). Реакційну суміш залишали при перемішуванні на ніч при температурі

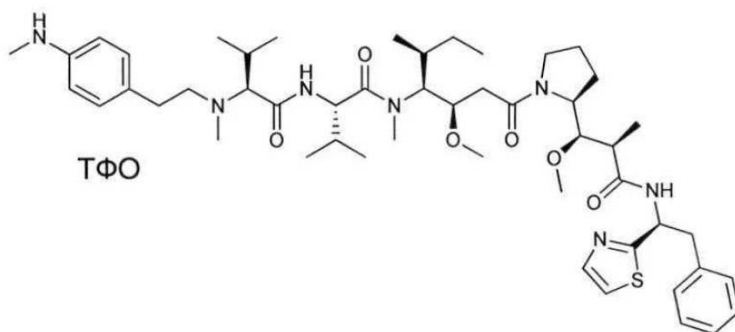
навколишнього середовища, потім концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали препаративною ВЕРХ (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 150 мм; елююча фаза: суміш вода / ACN, забуферена 0,05% ТФО; градієнт від 20% до 40% ACN в протягом 10 хвилин, потім від 40% до 100% ACN протягом 2 хвилин; Waters 2489, детектор УФ при 254 нм і 220 нм) з одержанням 14,6 мг (21%) сполуки 7 в формі білої твердої речовини.

РХ/МС/УФ (колонка Ascentis Express C18, 2,7 мкм, 4,6 × 100 мм; 1,5 мл / хв, 40 °С; від 0 до 80% метанолу в воді (0,05% ТФО) протягом 8 хвилин; ІЕР (C₄₂H₇₂N₆O₈, точна маса 788,54) m/z: 790 (MH⁺), 5,71 хв (96,83%, 210 нм).

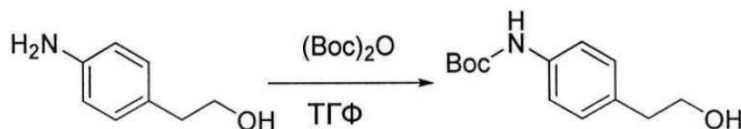
¹H ЯМР (300 МГц, CD₃OD, ppm): δ (присутність ротамерів) 8.42 (d, 0.3H, NHCO неповний обмін); 8.15 (d, 0.2H, NHCO неповний обмін); 7.31–7.21 (m, 5H); 4.9–4.6 (m, 3H); 4.25–4.0 (m, 1H); 4.0–0.86 (m, 59H).

Сполука 11

(S)-N-((3R,4S,5S)-3-метокси-1-((S)-2-((1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-(((S)-2-феніл-1-(тіазол-2-іл)етил)аміно)пропілпіролідін-1-іл)-5-метил-1-оксогептан-4-іл)-N,3-диметил-2-((S)-3-метил-2-(метил(4-(метиламіно)фенетил)аміно) бутанамідо)бутанамід, трифтороцтова кислота



Сполука 11А: трет-бутил-N-[4-(2-гідроксіетил)феніл]карбамат



Ди-трет-бутилдикарбонат (16,7 г, 77 ммоль, 1,05 екв) додавали до розчину 2-(4-амінофеніл)етанолу (10 г, 72,9 ммоль, 1 екв) в ТГФ (200 мл), і реакційну суміш перемішували протягом ночі при температурі навколишнього середовища. Суміш розбавляли EtOAc (200 мл), промивали водою (200 мл), потім HCl 1M (100 мл), потім насиченим водним розчином NaHCO₃ (100 мл), потім соляним розчином (100 мл). Органічну фазу висушували над MgSO₄, потім випарювали до сухого стану при зниженому тиску. Неочищений продукт двічі розтирали з гептаном (150 мл) і висушували у вакуумі з одержанням сполуки 11А у вигляді білої твердої речовини (14,7 г, 84%).

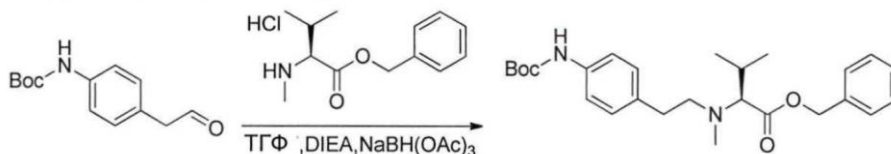
Сполука 11В: трет-бутил-N-[4-(2-оксоетил)феніл]карбамат



Сполуку 11А (2,5 г, 10,5 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в 25 мл ДХМ, потім охолоджували до -78 °С. Додавали по краплях розчин періодинану Десса-Мартіна (DMP, 6,71 г, 15,8 ммоль, 1,5 екв) в ДХМ (10 мл) Охолоджуючу баню видаляли, і перемішування продовжували протягом 1 години при температурі навколишнього середовища. Реакційну суміш нейтралізували 60 мл суміші 50/50 насиченого водного розчину бікарбонату натрію і насиченого водного розчину

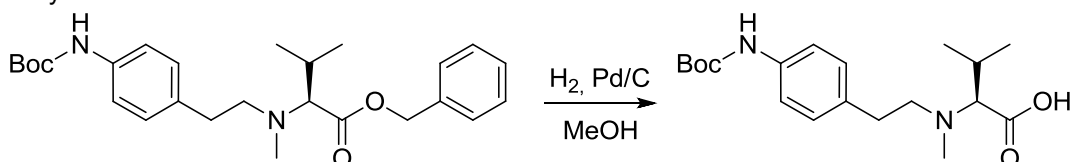
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Одержаний в результаті розчин екстрагували 3 рази 30 мл EtOAc. Органічні фази об'єднували, двічі промивали насиченим водним розчином NaCl, висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали на силікагелі (EtOAc/PE 1/15) з одержанням 1,0 г (40%) сполуки 11B в формі блідо-жовтої твердої речовини.

5 Сполука 11C: бензил-(2S)-2-[[2-(4-[[трет-бутоксикарбоніл]аміно]феніл)етил](метил)аміно]-3-метилбутаноат



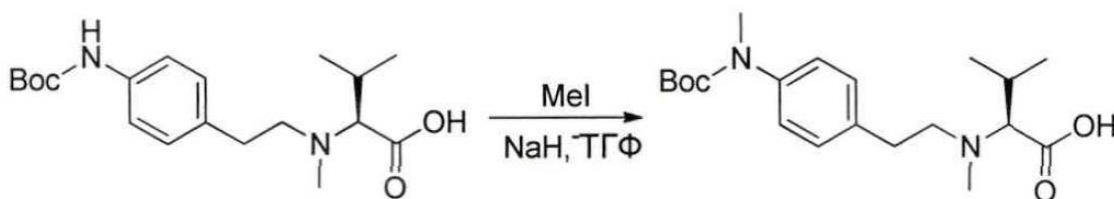
10 Сполуку 1ZC (3,5 г, 13,6 ммоль, 1,1 екв) розчиняли в ТГФ (30 мл) в присутності DIEA (6,4 г, 49,7 ммоль, 4,0 екв), альдегіду 11B (2,9 г, 12,3 ммоль, 1,0 екв) і триацетоксиборгідриду натрію (5,23 г, 49,7 ммоль, 2,0 екв). Реакційну суміш залишали на ніч при перемішуванні при температурі навколишнього середовища, потім нейтралізували 60 мл насиченого розчину бікарбонату натрію. Одержаний в результаті розчин екстрагували 3 рази 30 мл EtOAc. Органічні фази об'єднували, двічі промивали насиченим водним розчином NaCl, висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали на силікагелі (EtOAc/PE 1:20) з одержанням 3,7 г (68%) сполуки 11C в формі жовтого масла.

15 Сполука 11D: (2S)-2-[[2-(4-[[трет-бутоксикарбоніл]аміно]феніл)етил] (метил)аміно]-3-метилбутанова кислота



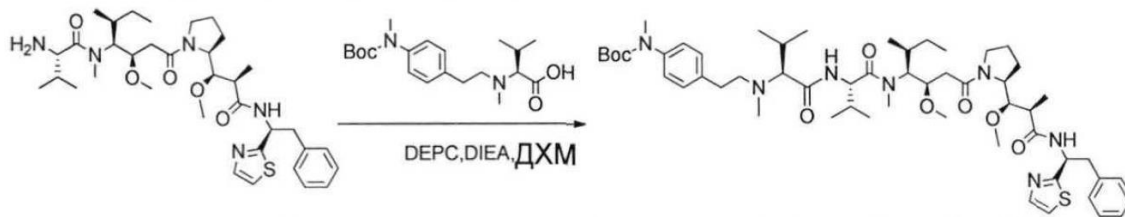
20 Сполуку 11C (2 г, 4,5 ммоль, 1 екв) розчиняли в 10 мл метанолу в присутності Pd/C (2 г) і гідрогенізували протягом 2 годин при звичайній температурі і тиску. Реакційну суміш фільтрували і концентрували при зниженому тиску з одержанням 1,2 г (75%) сполуки 11D в формі жовтого масла.

25 Сполука 11E: (2S)-2-[[2-(4-[[трет-бутоксикарбоніл](метил)аміно]феніл)етил](метил)аміно]-3-метилбутанова кислота



30 Сполуку 11D (1,2 г, 3,4 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в інертній атмосфері в ТГФ (20 мл). Реакційну суміш охолоджували в крижаній бані, після чого додавали порціями NaH (60% в маслі, 549 мг, 13,7 ммоль, 4,0 екв) з подальшим додаванням йодметану (4,9 г, 34 ммоль, 10 екв). Реакційну суміш залишали на ніч при перемішуванні при температурі навколишнього середовища, потім нейтралізували водою і промивали 100 мл EtOAc. pH водного розчину доводили до 6-7 1 н. розчином HCl. Водний розчин екстрагували 3 рази 100 мл EtOAc. Органічні фази об'єднували, висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували з одержанням 800 мг (64%) сполуки 11E в формі жовтої твердої речовини.

35 Сполука 11F: трет-бутил-N-[4-(2-[[[(1S)-1-[[[(3R,4S,5S)-3-метокси-1-[(2S)-2-[[[(1R,2R)-1-метокси-2-метил-2-[[[(1S)-2-феніл-1-(1,3-тіазол-2-іл)етил]карбамоїл]етил
40]піролідин-1-іл]-5-метил-1-оксогептан-4-іл](метил)карбамоїл]-2-метилпропіл]карбамоїл]-2-метилпропіл](метил)аміно] етил)феніл]-N-метилкарбамат



Сполуку 11F було одержано аналогічно сполуці 6A з аміну 1Y (150 мг, 0,22 ммоль, 1,2 екв) і кислоти 11E (70 мг, 0,19 ммоль, 1,0 екв). Після очищення на силікагелі (EtOAc/PE 1:1) одержали

5

100 мг (52%) бажаного продукту в формі блідо-жовтої твердої речовини. Сполуку 11 було одержано так само, як і сполуку 1, з проміжної сполуки 11F (100 мг, 0,1 ммоль). Залишок очищали препаративною ВЕРХ (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 150 мм; елюююча фаза: суміш вода / ACN, забуферена 0,05% ТФО; градієнт від 20% до 40% ACN в протягом 10 хвилин, потім від 40% до 100% ACN протягом 2

10

хвилин; Waters 2489, детектор УФ при 254 нм і 220 нм). Сполуку 11 було одержано при виході 39% (39,7 мг) у формі білої твердої речовини. РХ/МС/УФ (колонка Eclipse Plus C8, 3,5 мкм, 4,6 × 150 мм; 1 мл / хв, 40 °С; від 50 до 95% метанолу в воді (0,05% ТФО) протягом 18 хвилин); ІЕР ($C_{50}H_{77}N_7O_6S$, точна маса 903,57) m/z: 904,5 (MH^+), 7,53 хв (93,68%, 254 нм).

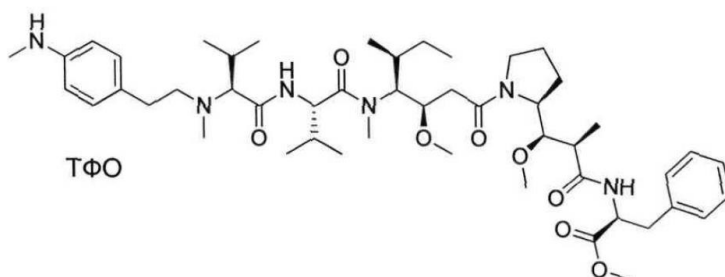
15

1H ЯМР (300 МГц, CD_3OD , ppm): δ (присутність ротамерів) 8.84 (d, 0.5H, NHCO неповний обмін); 8.7–8.5 (m, 0.9H, NHCO неповний обмін); 7.76–7.73 (m, 1H); 7.55 - 7.4 (m, 1H); 7.28–7.22 (m, 7H); 7.08–7.05 (m, 2H); 5.51–5.72 (m, 1H); 4.9–4.80 (m, 2H); 4.3–0.7 (m, 60H).

Сполука 12

метил-(S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((S)-3-метил-2-(метил(4-(метиламіно)фенетил)аміно)бутанамідо)бутанамідо)-3-метокси-5-метилгептанойл)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанамідо)-3-фенілпропаноат, трифтороцтова кислота

20



25

Так само, як і для кінцевих фаз синтезу сполуки 1, сполуку 12 було одержано за дві стадії з аміну 3D (118 мг, 0,19 ммоль) і кислоти 11E (82 мг, 0,22 ммоль). Кінцевий залишок очищали препаративною ВЕРХ (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 150 мм; елюююча фаза: суміш вода / ACN, забуферена 0,05% ТФО; градієнт від 20% до 40% ACN протягом 10 хвилин, потім від 40% до 100% ACN протягом 2 хвилин; Waters 2489, детектор УФ при 254 нм і 220 нм). Сполуку 12 було одержано при виході 7% (13,7 мг) у формі білої твердої речовини.

30

РХ/МС/УФ (колонка Eclipse Plus C8, 3,5 мкм, 4,6 × 150 мм; 1 мл / хв, 40 °С; від 40 до 95% метанолу в воді (0,05% ТФО) протягом 18 хвилин); ІЕР ($C_{49}H_{78}N_6O_8$, точна маса 878,59) m/z: 879,7 (MH^+), 10,07 хв (90,6%, 254 нм).

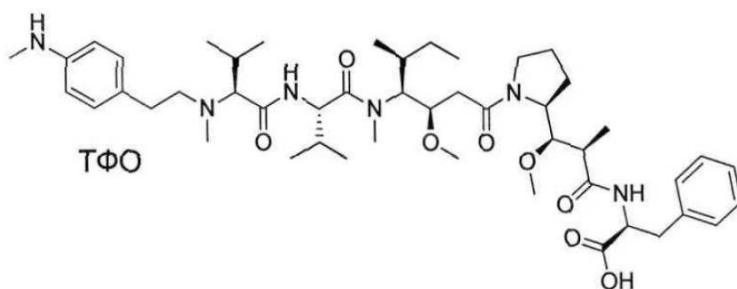
35

1H ЯМР (300 МГц, CD_3OD , ppm): δ (присутність ротамерів) 7.40 (se, 2H); 7.38–7.22 (m, 7H); 4.95–4.7 (m, 3H); 4.2–4.0 (m, 1H); 3.9–0.86 (m, 62H).

Сполука 13

(S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-N,3-диметил-2-((S)-3-метил-2-(метил(4-(метиламіно)фенетил)аміно)бутанамідо)бутанамідо)-3-метокси-5-метилгептанойл)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанамідо)-3-фенілпропанова кислота, трифтороцтова кислота

40



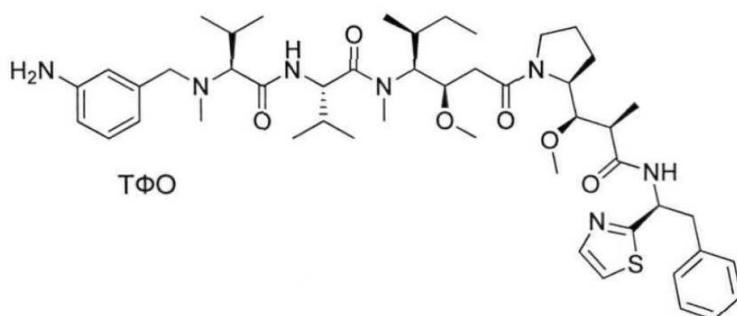
Сполуку 13 було одержано так само, як і сполуку 7, із сполуки 12 (100 мг, 0,10 ммоль). Залишок очищали препаративною ВЕРХ (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 150 мм; елюююча фаза: суміш вода / ACN, забуферена 0,05% ТФО; градієнт від 20% до 40% ACN в протягом 10 хвилин, потім від 40% до 100% ACN протягом 2 хвилин; Waters 2489, детектор УФ при 254 нм і 220 нм). Сполуку 13 було одержано при виході 20% (20 мг) у формі білої твердої речовини.

РХ/МС/УФ (колонка Ascentis Express C18, 2,7 мкм, 4,6 × 100 мм; 1,5 мл / хв, 40 °С; від 10 до 95 % метанолу в воді (0,05% ТФО) протягом 8 хвилин; IEP (C₄₈H₇₆N₆O₈, точна маса 864,57) m/z: 865,6 (MH⁺), 6,05 хв (90,9 %, 210 нм).

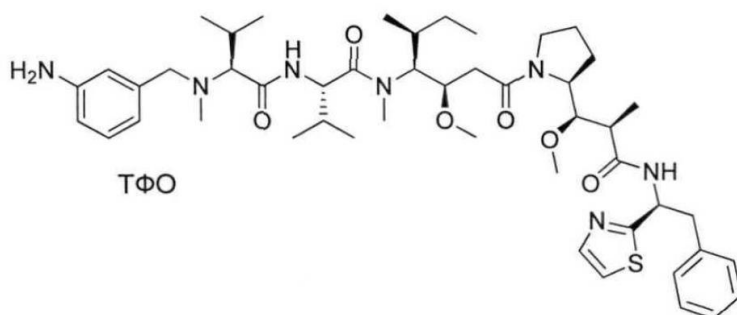
¹H ЯМР: (300 МГц, CD₃OD, ppm): δ (присутність ротамерів) 7.32–7.19 (m, 9H); 4.9–4.65 (m, 3H); 4.2–4.0 (m, 1H); 3.9–0.86 (m, 59H).

Сполука 14

(S)-2-((S)-2-((3-амінобензил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N-((3R,4S,5S)-3-метокси-1-((S)-2-((1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-(((S)-2-феніл-1-(тіазол-2-іл)етил)аміно)пропіл)піролідин-1-іл)-5-метил-1-оксогептан-4-іл)-N,3-диметилбутанамід, трифтороцтова кислота

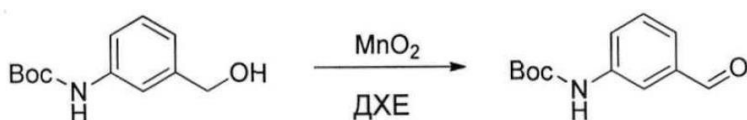


Сполука 14А: трет-бутил (3-(гідроксиметил)феніл)карбамат



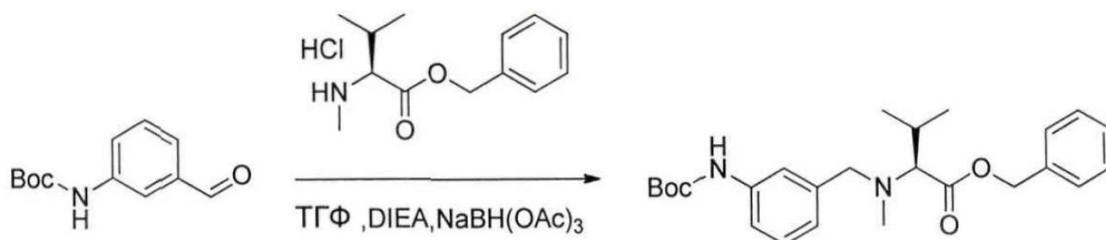
(3-Амінофеніл)метанол (3 г, 24,36 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в ТГФ (60 мл), після чого додавали ди-трет-бутилдикарбонат (6,38 г, 29,23 ммоль, 1,20 екв). Реакційну суміш залишали на ніч при перемішуванні при температурі навколишнього середовища, а потім реакційну суміш розбавляли додаванням 200 мл води. Продукт екстрагували 3 рази 100 мл AcOEt, а потім органічні фази повторно об'єднували, висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували при зниженому тиску з одержанням неочищеного продукту (13,85 г сполуки 14А) в формі жовтого масла.

Сполука 14В: трет-бутил(3-формілфеніл)карбамат



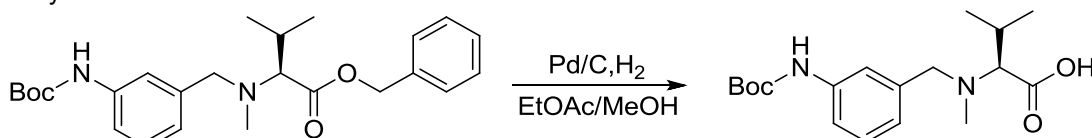
Сполуку 14А (13,8 г, 61,81 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в ДХЕ (400 мл), а потім додавали MnO_2 (54 г, 621,14 ммоль, 10,05 екв). Суміш залишали при перемішуванні при температурі навколишнього середовища на 3 дні, після чого тверді речовини видаляли фільтруванням. Фільтрат випарювали до сухого стану, і залишок очищали на колонці силікагелю сумішшю EtOAc і PE (1:30) з одержанням 3 г (22%) сполуки 14В в формі білої твердої речовини.

Сполука 14С: бензил (S)-2-((3-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)бензил) (метил)аміно)-3-метилбутаноат



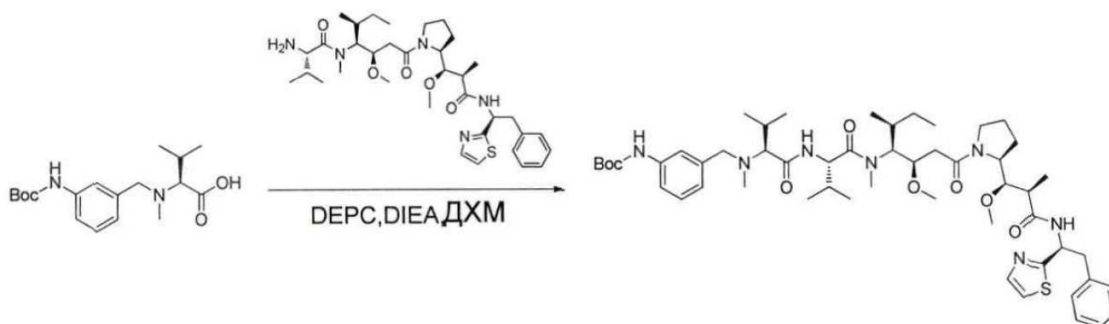
Сполуку 14В (1 г, 4,52 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в 20 мл ТГФ в присутності сполуки 1ЗС (1,16 г, 4,50 ммоль, 1,00 екв), DIEA (3 мл) і $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (1,92 г, 9,06 ммоль, 2,01 екв). Реакційну суміш залишали на ніч при перемішуванні при температурі навколишнього середовища, а потім нейтралізували 100 мл води і екстрагували 3 рази 50 мл AcOEt . Органічні фази об'єднували, висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували. Залишок очищали на колонці силікагелю сумішшю EtOAc і PE (1:50) з одержанням 1,9г (99%) сполуки 14С в формі білої твердої речовини.

Сполука 14D: (S)-2-((3-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)бензил)(метил)аміно)-3-метилбутанова кислота



Сполуку 14С (1 г, 2,34 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в 30 мл AcOEt і 4 мл метанолу в присутності Pd/C (400 мг) і гідрогенізували протягом 1 години при температурі навколишнього середовища і атмосферному тиску. Реакційну суміш фільтрували і концентрували при зниженому тиску з одержанням 680 мг (86%) сполуки 14D в формі білої твердої речовини.

Сполука 14Е: трет-бутил (3-((3S,6S,9S,10R)-9-((S)-втор-бутил)-3,6-діізопропіл-10-(2-((S)-2-((1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-(((S)-2-феніл-1-(тіазол-2-іл)етил)аміно)пропіл)піролідін-1-іл)-2-оксоетил)-2,8-диметил-4,7-діоксо-11-окса-2,5,8-триазадодецил)феніл)карбамат



Сполуку 14Е синтезували таким же чином, як для сполуки 3, з аміну 1Y (100 мг, 0,15 моль, 1,00 екв), кислоти 14D (102,27 мг, 0,30 ммоль, 2,00 екв), DEPC (0,053 мл) і DIEA (0,046 мл) в ДХМ (3 мл). Неочищений продукт (80 г) очищали на колонці силікагелю сумішшю EtOAc і PE (1:1) з одержанням 100 мг (67%) сполуки 14Е в формі блідо-жовтого масла.

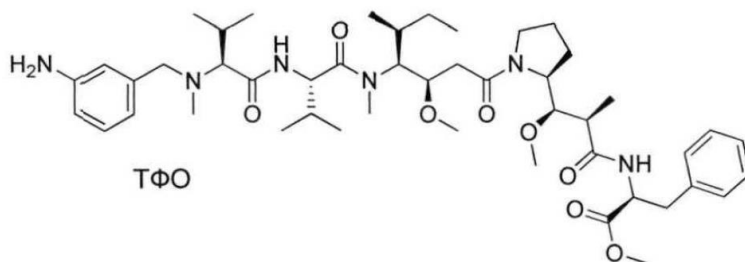
5 Сполуку 14 синтезували таким же чином, як сполуку 2, з проміжної сполуки 14Е (100 мг, 0,10 ммоль, 1,00 екв). Неочищений продукт (80 мг) очищали препаративною ВЕРХ (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 150 мм; елююча фаза: суміш вода / ACN, забуферена 0,05% ТФО; градієнт від 20% до 40% ACN протягом 10 хвилин, потім від 40% до 100% ACN протягом 2 хвилин; Waters 2545, детектор УФ при 254 нм і 220 нм). Сполуку 14

10 було одержано при виході 10% (10 мг) в формі білої твердої речовини.
РХ/МС/УФ (колонка Eclipse plus C8, 3,5 мкм, 4,6 × 150 мм; 40 °C; 1,0 мл / хв, від 40% до 95% MeOH в воді (0,05% ТФО) протягом 18 хвилин); ІЕР ($C_{48}H_{73}N_7O_6S$, точна маса 875,5) m/z: 876,5 (MH^+) і 438,9 ($M.2H^+/2$, 100%), 11,35 хв (95,6%, 210 нм).

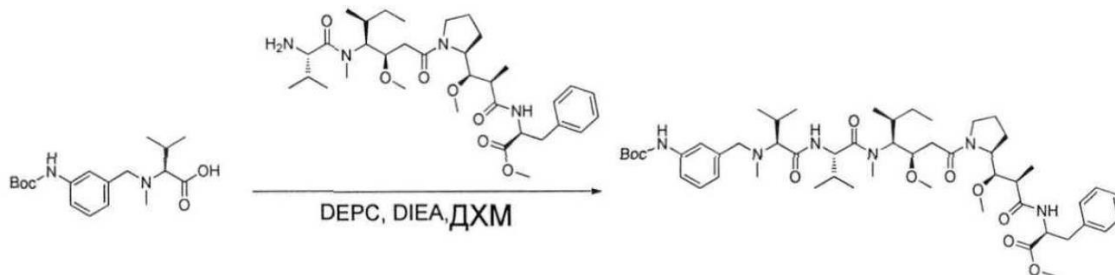
¹H ЯМР (400МГц, CD₃OD, ppm): δ (присутність ротамерів) 8.92 - 8.86 (m, 0.4H, NH неповний обмін); 8.70 - 8.54 (m, 0.6H, NH неповний обмін); 7.88 - 7.78 (m, 1H); 7.60 - 7.50 (m, 1H); 7.45 - 6.97 (m, 9H); 5.80 - 5.65 (m, 1H); 4.85 - 4.70 (m, 1H); 4.40 - 0.80 (m, 56H).

Сполука 15

метил (S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-амінобензил) (метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептанойл)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанамідо)-3-фенілпропаноат, трифтороцтова кислота



25 Сполука 15А: метил-(S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)бензил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептанойл)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанамідо)-3-фенілпропаноат



30 Сполуку 15А синтезували таким же чином, як для сполуки 3, з аміну 3D (200 мг, 0,32 ммоль, 1,00 екв), кислоти 14D (212,6 мг, 0,63 ммоль, 2,00 екв), DEPC (0,1103 мл) і DIEA (0,157 мл, 3,00 екв) в ДХМ (5 мл). Неочищений продукт очищали на колонці силікагелю сумішшю EtOAc і PE (1:1) з одержанням 200 мг (67%) сполуки 15А у формі жовтої твердої речовини.

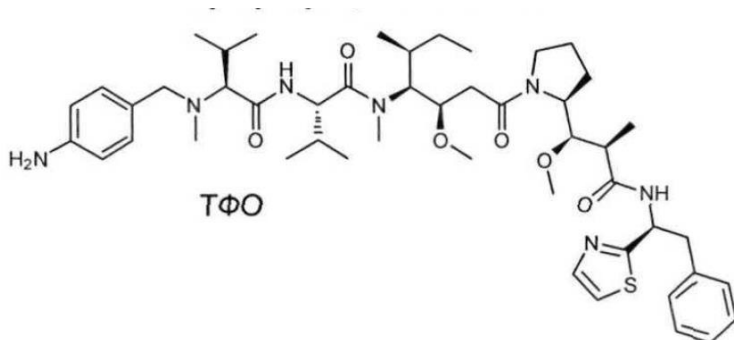
35 Сполука 15: Сполуку 15 синтезували так само, як сполуку 2, з проміжної сполуки 15А (200 мг, 0,21 ммоль, 1,00 екв). Неочищений продукт очищали препаративною ВЕРХ (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 150 мм; елююча фаза: суміш вода / ACN, забуферена 0,05% ТФО; градієнт від 20% до 40% ACN протягом 10 хвилин, потім від 40% до 100% ACN протягом 2 хвилин; Waters 2545, детектор УФ при 254 нм і 220 нм). Сполуку 15

40 було одержано при виході 19% (38,6 мг) у формі білої твердої речовини.
РХ/МС/УФ (колонка Ascentis Express C18, 2,7 мкм, 4,6 × 100 мм; 40 °C; 1,5 мл / хв, від 10 % до 95 % MeOH в воді (0,05% ТФО) протягом 8 хвилин); ІЕР ($C_{47}H_{74}N_6O_8$, точна маса 850,5) m/z: 851,5 (MH^+) і 426,4 ($M.2H^+/2$, 100%), 6,61 хв (91,1%, 210 нм).

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD, ppm): δ (присутність ротамерів) 7.53 - 7.42 (m, 1H); 7.35 - 7.18 (m, 8H); 4.88 - 4.79 (m, 2H); 4.42 - 4.00 (m, 3H); 3.93 - 2.71 (m, 22H); 2.61 - 0.81 (m, 33H).

Сполука 20

(S)-2-((S)-2-((4-амінобензил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N-((3R,4S,5S)-3-метокси-1-((S)-2-((1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-(((S)-2-феніл-1-(тіазол-2-іл)етил)аміно)пропіл)піролідин-1-іл)-5-метил-1-оксогептан-4-іл)-N,3-диметилбутанамід, трифтороцтова кислота



10

Сполуку 20 було одержано так само, як і сполуку 1, з аміну 1ZC і відповідного альдегіду.

4-Нітробензальдегід, залучений в одержання сполуки 20, придбаний комерційним шляхом.

Синтез сполуки 20 виконували шляхом відновлення нітрогрупи. Синтез проводили в такий спосіб:

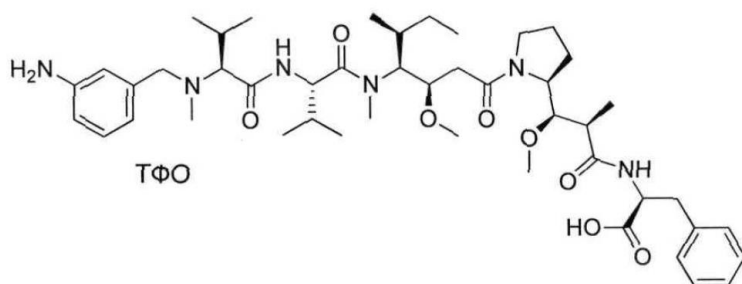
(2S)-N-[(3R,4S,5S)-1-[(2S)-2-[(1R,2R)-2-[(1S,2R)-1-гідрокси-1-фенілпропан-2-іл]карбамоїл]-1-метокси-2-метилетил]піролідин-1-іл]-3-метокси-5-метил-1-оксогептан-4-іл]-N,3-диметил-2-[(2S)-3-метил-2-[метил[4-нітрофеніл]метил]аміно]бутанамідо]бутанамід (40 мг, 0,05 ммоль, 1,0 екв) розчиняли в 15 мл етанолу. Додавали дигідрат хлориду олова (II) (317 мг, 1,4 ммоль, 30 екв), і розчин залишали при перемішуванні на 3 дні при температурі навколишнього середовища. Реакційну суміш нейтралізували 50 мл води, потім екстрагували 3 рази 50 мл EtOAc. Органічні фази об'єднували, висушували над сульфатом натрію, фільтрували і концентрували при зниженому тиску з одержанням сполуки 20 в неочищеному стані (чистота: 93,2%; кількість: 21,6 мг).

Сполуку очищали препаративною ВЕРХ (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 150 мм; елюююча фаза: суміш вода / ACN, забуферена 0,05% ТФО; градієнт від 20% до 40% ACN в протягом 10 хвилин, потім від 40% до 100% ACN протягом 2 хвилин; Waters 2489 детектор УФ при 254 нм і 220 нм).

¹H ЯМР: (400 МГц, CD₃OD, ppm): δ (присутність ротамерів) 7.85–7.80 (m, 1H); 7.6–7.5 (m, 1H); 7.4–7.15 (m, 5H); 7.1–7.05 (m, 2H); 6.73–6.70 (m, 2H); 5.8–5.55 (m, 1H); 5.0–4.7 (m, 2H); 4.25–4.05 (m, 1H); 4.0–0.8 (m, 54H). РХ/МС/УФ ІЕР: (C₄₈H₇₃N₇O₇S, точна маса 875,53) m/z 876 (MH⁺), 439 [75%, (M-2H⁺)/2]; УФ: час утримання (RT) дорівнює 4,83 хв (96,8%, 254 нм). ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD, ppm): δ (присутність ротамерів) 7.85–7.80 (m, 1H); 7.6–7.5 (m, 1H); 7.4–7.1 (m, 7H); 6.76–6.72 (m, 2H); 5.8–5.55 (m, 1H); 4.9–4.65 (m, 2H); 4.25–4.05 (m, 1H); 4.0–0.8 (m, 54H).

Сполука 29

(S)-2-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-амінобензил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептан-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанамідо)-3-фенілпропанова кислота, трифтороцтова кислота



40

Сполуку 15 (100 мг, 0,10 ммоль, 1,00 екв) розчиняли в суміші води (5 мл), ACN (5 мл) і піперидину (2,5 мл). Реакційну суміш залишали на ніч при перемішуванні при температурі

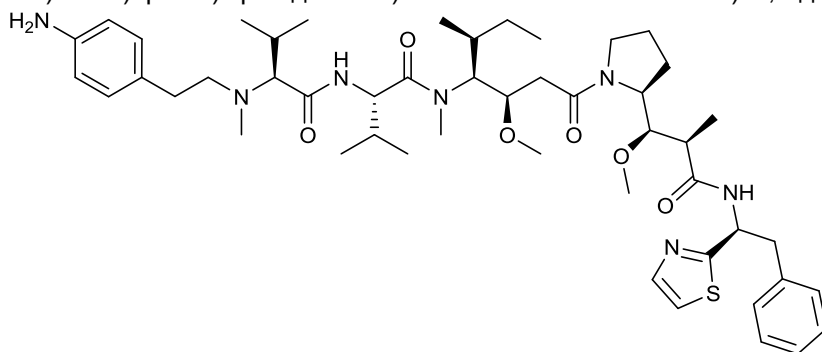
навоколишнього середовища, а потім концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали препаративною ВЕРХ (Pre-HPLC-001 SHIMADZU, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 150 мм; елююча фаза: суміш вода / ACN, забуферена 0,05% ТФО; градієнт від 20% до 40% ACN протягом 10 хвилин, потім від 40% до 100% ACN протягом 2 хвилин; Waters 2545 детектор УФ при 254 нм і 220 нм).

РХ/МС/УФ (колонка Eclipse plus C8, 3,5 мкм, 4,6 × 150 мм; 40 °С; 1,0 мл / хв, від 40% до 95% MeOH в воді (0,05% ТФО) протягом 18 хвилин); ІЕР (C₄₆H₇₂N₆O₈, точна маса 836,54) m/z: 837,5 (MH⁺) і 419,4 (M.2H⁺/2, 100%), 10,61 хв (92,5%, 210 нм).

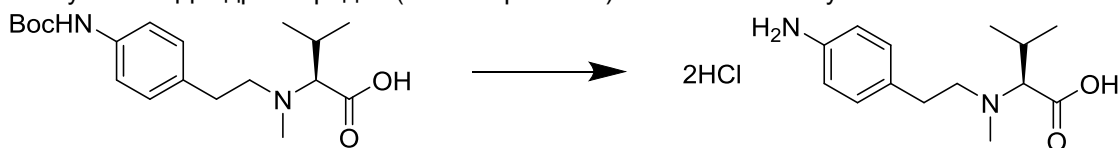
¹H ЯМР: (400 МГц, CD₃OD, ppm): δ (присутність ротамерів) 7.38 - 7.15 (m, 6H); 7.00 - 6.99 (m, 3H); 4.85 - 4.68 (m, 2H); 4.37 - 3.38 (m, 11H); 3.31 - 2.70 (m, 8H); 2.60 - 0.82 (m, 35H).

Сполука 61

(S)-2-((S)-2-((4-амінофенетил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N-((3R,4S,5S)-3-метокси-1-((S)-2-((1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-(((S)-2-феніл-1-(тіазол-2-іл)етил)аміно)пропіл)піролідін-1-іл)-5-метил-1-оксогептан-4-іл)-N,3-диметилбутанамід



Сполука 61А: Дигідрохлорид N-(4-амінофенетил)-N-метил-L-валіну



Сполуку 11D (962 мг, 2,75 ммоль) розчиняли в 10 мл наявного в продажу розчину HCl в пропан-2-олі (5 - 6 М) і перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин. Аналіз ТШХ показав повне витрачання вихідної речовини. Розчинник випарювали при зниженому тиску, і одержану в результаті жовту тверду речовину розтирали з Et₂O (2 × 10 мл). Продукт висушували у вакуумі з одержанням сполуки 61А у вигляді жовтої твердої речовини (322 мг, 47%).

Сполука 61: Карбонову кислоту 61А (73 мг, 0,23 ммоль, 1 екв) і амін 1Y (150 мг, 0,23 ммоль, 1 екв) розчиняли в сухому ДМФ (2 мл). Додавали DIEA (158 мкл, 0,90 ммоль, 4 екв) і DECP (також званий DEPC) (51 мкл, 0,34 ммоль, 1,5 екв), і реакційну суміш перемішували протягом 4 годин при кімнатній температурі. Аналіз за допомогою РХ-МС показав повне витрачання вихідної речовини. Розчинник випарювали при зниженому тиску, і залишок очищали флеш-хроматографією на силікагелі (ДХМ/MeOH) з одержанням сполуки 61 у вигляді світло-жовтої твердої речовини (83 мг, 40%).

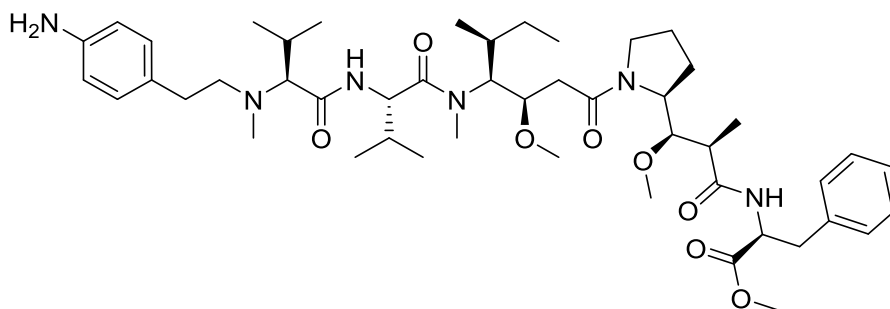
¹H ЯМР: (500 МГц, DMSO-d₆, ppm): δ (присутність ротамерів) 8.86 (d, 0.5H, NHCO); 8.65 (d, 0.5H, NHCO), 8.11-8.05 (m, 1H, NHCO), 7.80 (d, 0.5H, тіазол), 7.78 (d, 0.5H, тіазол), 7.65 (d, 0.5H, тіазол), 7.63 (d, 0.5H, тіазол), 7.32 - 7.12 (m, 5H), 6.83 (d, J дорівнює 8.3 Гц, 2H), 6.45 (d, J дорівнює 8.3 Гц, 2H), 5.56 - 5.49 (m, 0.5 H), 5.42 - 5.35 (m, 0.5H), 4.78 (s, 2H, NH₂), 4.74 - 4.46 (m, 2H), 4.01 - 0.66 (m, 57H).

ВЕРХ (Xbridge Shield C18, 3,5 мкм, 4,6 × 50 мм; 3,5 мл/хв, 40 °С, від 0 до 95% MeCN в воді (0,1% ТФО) в 2,25 хвилин, потім 95% MeCN протягом 0,5 хвилин, Тг складає 1,31 хв (96,5%, 220 нм).

m/z (Q-TOF ІЕР⁺) 890,5558 (2%, MH⁺, C₄₉H₇₆N₇O₆S потрібно 890,5572), 445,7834 (100%, (MH₂)²⁺, C₄₉H₇₇N₇O₆S потрібно 445,7823).

Сполука 62

Метил-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-амінофенетил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептаноїл)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанойл)-L-фенілаланінат



Сполуку 62 було одержано так само, як і сполуку 61, з використанням карбонової кислоти 61A (69 мг, 0,21 ммоль, 1 екв), аміну 3D (135 мг, 0,21 ммоль, 1 екв), DIEA (75 мкл, 0,43 ммоль, 2 екв) і DECP (49 мкл, 0,32 ммоль, 1,5 екв). Неочищений продукт очищали флеш-хроматографією на силікагелі (ДХМ/MeOH) з одержанням сполуки 62 у вигляді жовтуватої твердої речовини (82 мг, 45%).

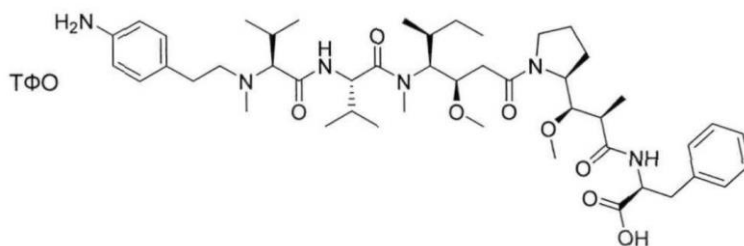
^1H ЯМР: (500 МГц, DMSO-d_6 , ppm): δ (присутність ротамерів), 8.50 (d, J дорівнює 8.3, 0.5H, NHCO); 8.27 (d, J дорівнює 8.0, 0.5H, NHCO), 8.15-8.04 (m, 1H, NHCO), 7.27 – 7.13 (m, 5H), 6.86 – 6.79 (m, 2H), 6.48 – 6.42 (m, 2H), 4.78 (s, 2H, NH_2), 4.74 – 4.44 (m, 3H), 4.01 – 3.72 (m, 1.5H), 3.66 (s, 1.5H, CO_2Me), 3.63 (s, 1.5H, CO_2Me), 3.57 – 0.65 (m, 55.5H).

ВЕРХ (Xbridge Shield C18, 3,5 мкм, 4,6 × 50 мм; 3,5 мл/хв, 40 °C, від 0 до 95% MeCN в воді (0,1% ТФО) протягом 2,25 хвилин, потім 95% MeCN протягом 0,5 хвилин, Tr дорівнює 1,29 хв (95,3%, 220 нм).

m/z (Q-TOF IEP⁺) 865,5800 (2%, MH^+ , $\text{C}_{48}\text{H}_{77}\text{N}_6\text{O}_8$ потрібно 865,5797), 433,2937 (100%, $(\text{MH}_2)^{2+}$, $\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{N}_6\text{O}_8$ потрібно 433,2935).

Сполука 63

((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-амінофенетил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептаноїл)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропаноїл)-L-фенілаланіну 2,2,2-трифторацетат



Сполуку 62 (23 мг, 0,03 ммоль) розчиняли в суміші води (1 мл) і ацетонітрилу (1 мл). Додавали піперидин (0,75 мл), і суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 5 годин. Аналіз ТШХ показав повне витрачання вихідної речовини. Розчинник випарювали при зниженому тиску, і залишок очищали препаративною ВЕРХ (колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 150 мм; рухома фаза: вода/MeCN, забуферена 0,1% ТФО; градієнт від 20% до 40% MeCN протягом 10 хвилин, потім від 40% до 100% MeCN протягом 2 хвилин; Waters 2545, детектор УФ при 254 нм і 220 нм). Сполуку 63 було одержано у вигляді білої твердої речовини (14 мг, 66%).

^1H ЯМР: (500 МГц, DMSO-d_6 , ppm): δ (присутність ротамерів), 12.7 (s(br), 1H, CO_2H), 9.58 (m(br), 1H); 9.04 – 8.89 (m, 1H), 8.41 (d, 0.6H, NHCO), 8.15 (d, 0.4H, NHCO), 7.27 – 7.13 (m, 5H), 7.13 – 6.99 (m(br), 2H), 6.90 – 6.64 (s(br), 2H), 4.77 – 3.40 (m, 10H), 3.34 – 2.75 (m, 20H), 2.34 – 1.94 (m, 4H), 1.90 – 0.7 (m, 25H).

ВЕРХ (Xbridge Shield C18, 3,5 мкм, 4,6 × 50 мм; 3,5 мл/хв, 40 °C, від 0 до 95% MeCN в воді (0,1% ТФО) протягом 2,25 хвилин, потім 95% MeCN протягом 0,5 хвилин, Tr дорівнює 1,24 хв (100%, 220 нм).

m/z (Q-TOF IEP⁺) 851,5641 (6%, MH^+ , $\text{C}_{47}\text{H}_{75}\text{N}_6\text{O}_8$ потрібно 851,5641), 426,2854 (100%, $(\text{MH}_2)^{2+}$, $\text{C}_{47}\text{H}_{76}\text{N}_6\text{O}_8$ потрібно 426,2857).

Приклад 15: Антипроліферативна активність лікарських засобів

Методика:

Культура клітин Клітини A549 (недрібноклітинний рак легені - ATCC CCL-185) і MDA-MB-231 (аденокарцинома молочної залози - ATCC HTB-26) культивували в мінімальному живильному

середовищі Ігла (MEM) з 5% фетальною телячою сироваткою (ФСТ) та модифікованому Дульбекко середовищі Ігла (DMEM) з 10% ФСТ відповідно. Клітини MCF7 (дуктальна карцинома молочної залози - ATCC HTB-22) і клітини SN-12C (карцинома нирки - ATCC) підтримували в середовищі RPMI1640 (без фенолового червоного для клітин MCF7), що містить 10% ФСТ. У всі

5

Клітини культивували в стандартних умовах в інкубаторі при 37 °C, 5% CO₂ і 95% атмосферної вологості.

Антипроліферативна активність на 4 лініях пухлинних клітин

10

Вибрані лікарські засоби досліджували на їх антипроліферативну активність з використанням кількісного визначення проліферації ATPlite (Perkin Elmer, Villebon sur Yvette, Франція) на об'ємній панелі з 4 ліній клітин. Клітини висівали в 96-лункові планшети (10³ клітин/лунка для A549, 2.10³ для MCF7, MDA-MB-231 і SN12C) в день 0 при концентрації, що забезпечує збереження клітин в логарифмічній фазі росту протягом 72 годин періоду обробки лікарським засобом. Після 24 год періоду інкубації все клітини інкубували з серійними розведеннями тестованих сполук (11 мкл 10×розчину в 1% ДМСО - 6 клітин/умова). Щоб уникнути прилипання сполук до наконечників піпеток наконечники міняли між двома послідовними розведеннями. Потім клітини поміщали в інкубатор при 37 °C, 5% CO₂. На день 4 життєздатність клітин оцінювали шляхом визначення дози АТФ, що вивільняється життєздатними клітинами. Проводили аналіз числа життєздатних клітин в порівнянні з числом клітин, інкубуємих з розчинником. Значення EC₅₀ визначали за допомогою аналізу апроксимації кривої (моделі нелінійної регресії з сигмоїдної кривої доза-відповідь, змінний коефіцієнт нахилу Хілла), проведеного за допомогою алгоритму, що забезпечується програмою GraphPad (GraphPad Software Inc., штат Каліфорнія, США).

20

Результати:

25

Різні лікарські засоби:

Різні лікарські засоби досліджували з визначенням їх антипроліферативної активності на лінії клітин MDA-MB-231, слідуючи описаній вище методиці. При вимірюванні активностей отримали значення EC₅₀ менше 0,1 мкМ.

30

У кількох наведених нижче прикладах, вибраних з наведених вище ілюстративних лікарських засобів, показані їх повністю значущі антипроліферативні властивості:

Приклад 12: EC₅₀ = 5,80×10⁻¹⁰ М; Приклад 13: EC₅₀ = 7,95×10⁻⁸ М; Приклад 15: EC₅₀ = 1,70×10⁻¹⁰ М; Приклад 27: EC₅₀ = 1,20×10⁻¹⁰ М.

Різні лінії клітин:

35

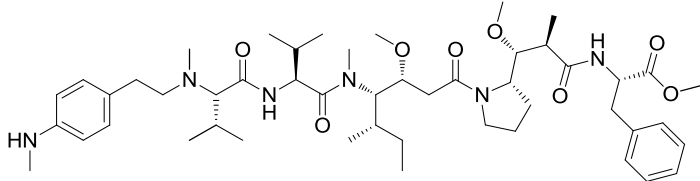
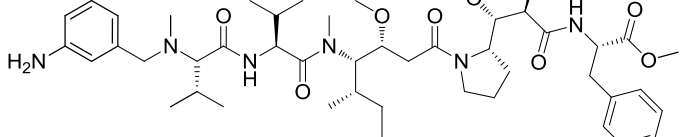
Сполуку 15 досліджували на різних лініях клітин (A549, MDA-MB-231, MCF-7, SN12C), слідуючи описаній вище методиці. При вимірюванні активностей на всіх досліджених лініях клітин отримали значення EC₅₀ менше 0,1 мкМ.

EC ₅₀ (М)	A549	MDA-MB-231	MCF-7	SN12C
Сполука 15	1,45×10 ⁻¹⁰	1,70×10 ⁻¹⁰	7,15×10 ⁻¹⁰	2,18×10 ⁻¹⁰

Порівняльні приклади:

40

Заміщення на фенільному кільці (аміно в порівнянні з карбоксилем) було досліджено в наведених нижче порівняльних прикладах і показало поліпшену антипроліферативну активність лікарських засобів відповідно до винаходу, що містять аміно-замісник.

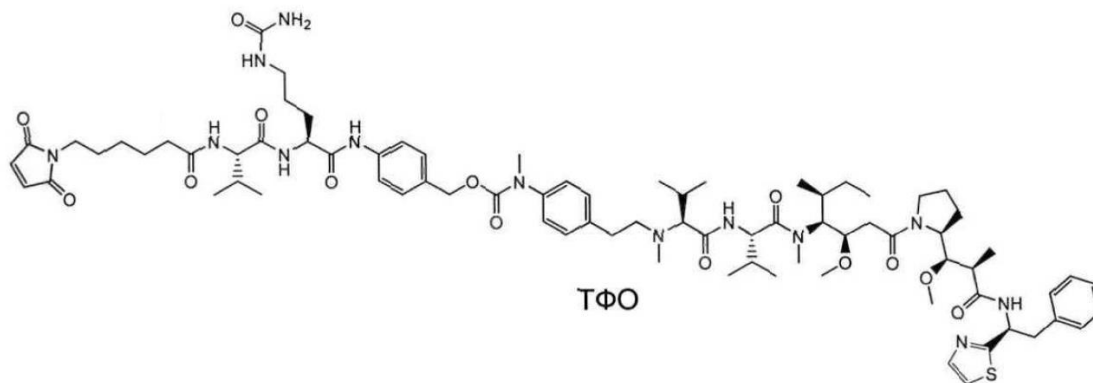
N°	Структура	EC ₅₀ (М)	
		A549	MDA-MB-231
12		1,48×10 ⁻¹⁰	5,80×10 ⁻¹⁰
15		1,45×10 ⁻¹⁰	1,70×10 ⁻¹⁰

N°	Структура	EC ₅₀ (M)	
		A549	MDA-MB-231
Порівняльний приклад 1		$3,76 \times 10^{-9}$	$2,29 \times 10^{-9}$
13		$2,71 \times 10^{-8}$	$7,95 \times 10^{-8}$
Порівняльний приклад 2		$4,03 \times 10^{-7}$	$9,75 \times 10^{-7}$

Приклад 16: Синтез угруповання лікарський засіб-лінкер

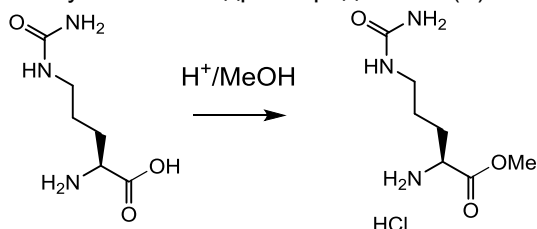
Сполука Е-11

- 5 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамідо)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил(4-((3R,4S,7S,10S)-4-((S)-втор-бутил-7,10-діізопропіл-3-(2-((S)-2-((1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-(((S)-2-феніл-1-(тіазол-2-іл)етил)аміно)пропіл)піролідін-1-іл)-2-оксоетил)-5,11-диметил-6,9-діоксо-2-окса-5,8,11-триазатридекан-13-іл)феніл)(метил)карбамату 2,2,2-трифторацетат



10

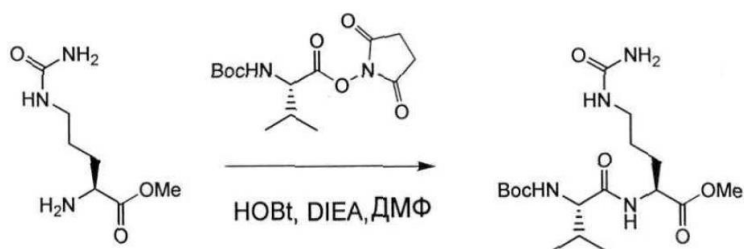
Сполука Е-11-1: гідрохлорид метил-(S)-2-аміно-5-уреїдопентаноату



- 15 Ацетилхлорид (10 мл) додавали по краплях до MeOH (120 мл) при 0 °C при перемішуванні. Через 20 хвилин додавали L-цитрулін (10 г, 57 ммоль, 1,00 екв), і суміш нагрівали зі зворотним холодильником протягом ночі. Розчинник випарювали при зниженому тиску з одержанням 15 г (116%) сполуки Е-11-1 у вигляді білої твердої речовини. Продукт використовували в наступній стадії без додаткового сушіння.

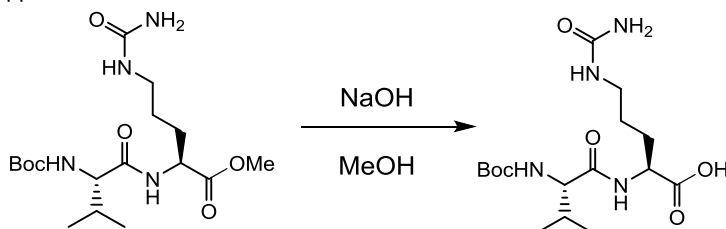
Сполука Е-11-2: метил-(S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)-3-метилбутанамідо)-5-

уреїдопентаноат

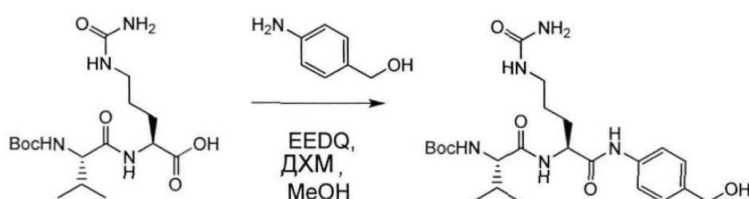


- 5 Сполуку E-11-1 (13 г, 57,6 ммоль, 1,1 екв) розчиняли в ДМФ (140 мл) при 0 °С в інертній атмосфері. Додавали DIEA (30 мл, 173 ммоль, 3,0 екв), гідроксибензотриазол (HOBT - 10,59 г, 69,1 ммоль, 1,2 екв) і складний ефір гідроксисукцинімід Вос-L-валіну (Вос-L-валіну (Вос-Val-OSu - 18,1 г, 57,6 ммоль, 1,0 екв). Реакційну суміш перемішували протягом ночі при температурі навколишнього середовища, потім розчинник випарювали при зниженому тиску. Залишок розчиняли в воді (100
- 10 мл) і двічі екстрагували ДХМ (150 мл). Органічні фази об'єднували, висушували над Na₂SO₄ і концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали на силікагелі (ДХМ/МеОН) з одержанням 18,8 г (84%) сполуки E-11-2 у вигляді білої твердої речовини.

Сполука E-11-3: (S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанова кислота

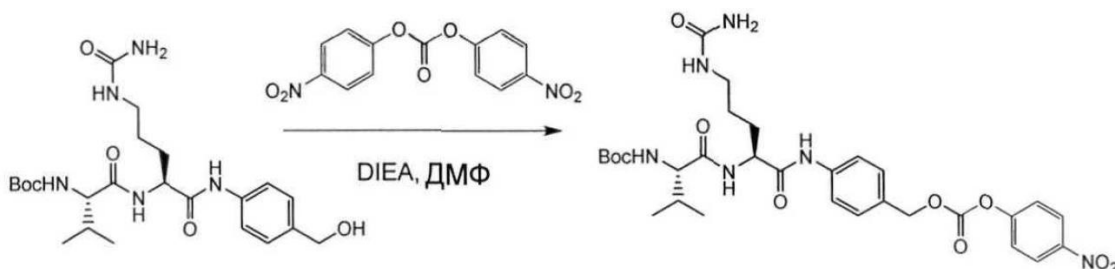


- 15 Сполуку E-11-2 (18,8 г, 48,4 ммоль, 1 екв) розчиняли в МеОН (200 мл) при 0 °С. Додавали розчин NaOH 1 М (72 мл, 72 ммоль, 1,5 екв), і суміш перемішували протягом 2 годин при кімнатній температурі. МеОН видаляли при зниженому тиску, і залишковий водний розчин підкислювали HCl 1 М. Водну фазу випарювали до сухого стану, і залишок очищали на силікагелі (ДХМ/МеОН) з одержанням 18 г (99%) сполуки E-11-3 у вигляді білої твердої речовини.
- 20 Сполука E-11-4: трет-бутил-((S)-1-(((S)-1-((4-гідроксиметил)феніл)аміно)-1-оксо-5-уреїдопентан-2-іл)аміно)-3-метил-1-оксобутан-2-іл)карбамат



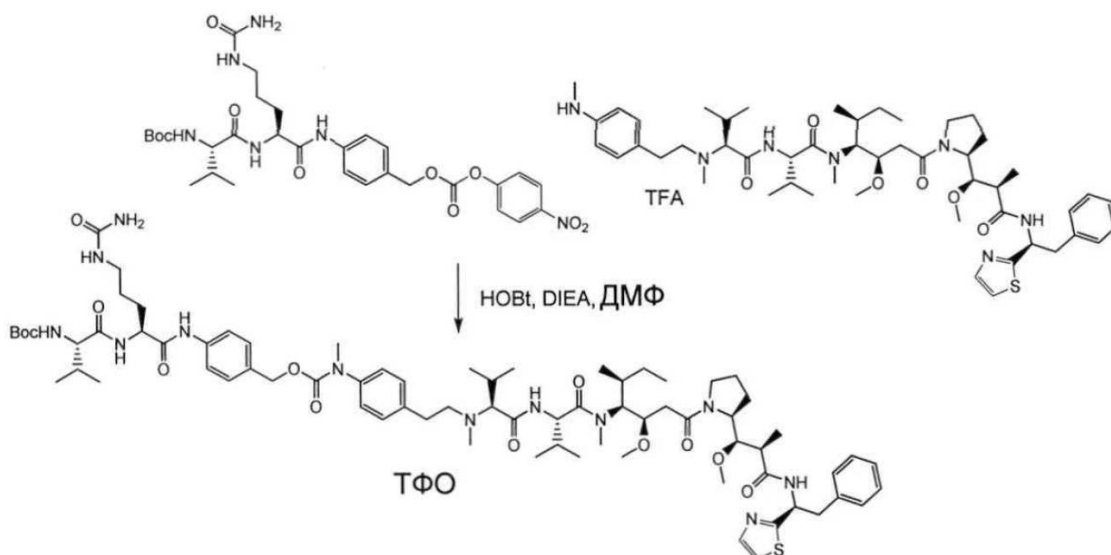
- 25 Сполуку E-11-3 (5 г, 13,4 ммоль, 1 екв) розчиняли в суміші безводного ДХМ (65 мл) і безводного МеОН (35 мл). Додавали (4-амінофеніл)метанол (1,81 г, 14,7 ммоль, 1,1 екв) і N-етоксикарбоніл-2-етокси-1,2-дигідрохінолін (EEDQ - 6,60 г, 26,7 ммоль, 2 екв), і суміш перемішували в темряві протягом ночі. Розчинники випарювали при зниженому тиску, і залишок очищали на силікагелі (ДХМ/МеОН) з одержанням 5,2 г (73%) сполуки E-11-4 у вигляді білуватої твердої речовини.
- 30 Сполука E-11-5: трет-бутил-((S)-3-метил-1-(((S)-1-((4-нітрофенокси)карбоніл)окси)метил)феніл)аміно)-1-оксо-5-уреїдопентан-2-іл)аміно)-1-оксобутан-2-іл)карбамат

35 Сполука E-11-5: трет-бутил-((S)-3-метил-1-(((S)-1-((4-нітрофенокси)карбоніл)окси)метил)феніл)аміно)-1-оксо-5-уреїдопентан-2-іл)аміно)-1-оксобутан-2-іл)карбамат



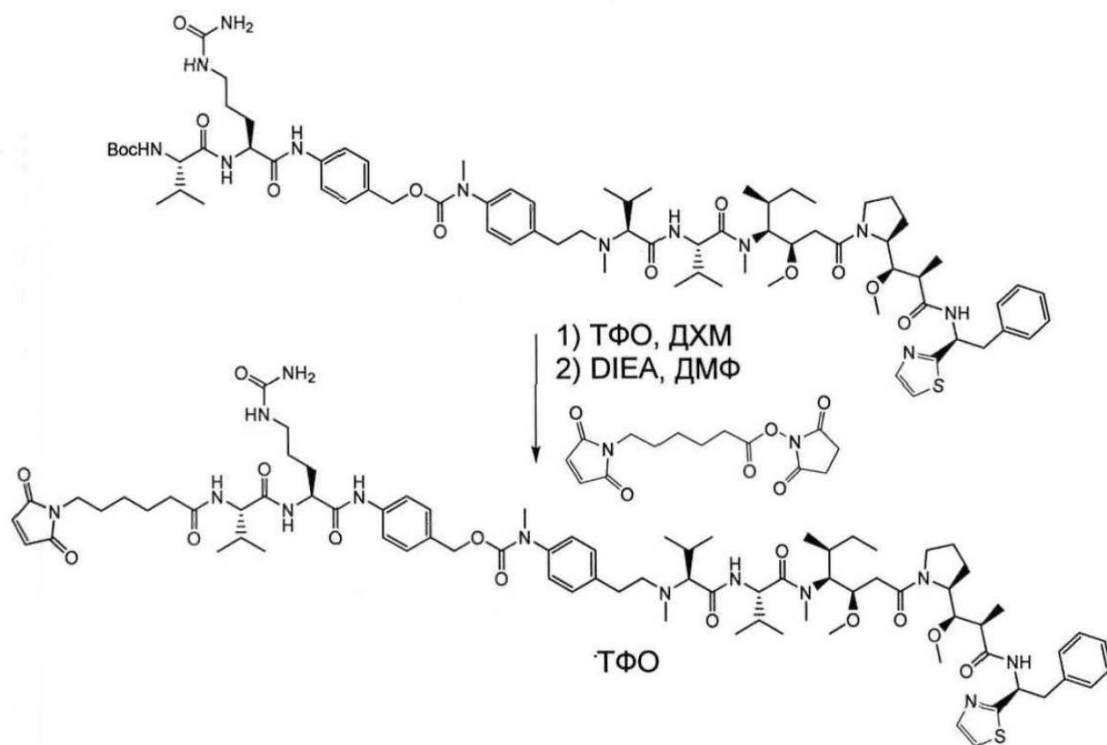
Сполуку E-11-4 (1,1 г, 2,29 ммоль, 1 екв) розчиняли в безводному ДМФ (5 мл) при температурі навколишнього середовища в інертній атмосфері. Додавали біс(4-нітрофеніл)карбонат (1,40 г, 4,59 ммоль, 2 екв) з подальшим додаванням DIEA (600 мкл, 3,44 ммоль, 1,5 екв.), і одержаний в результаті жовтий розчин перемішували протягом ночі. ДМФ випарювали при зниженому тиску, і залишок очищали на силікагелі (ДХМ/MeOH) з одержанням 1,27 г (84%) сполуки E-11-5 у вигляді білуваті твердої речовини.

Сполука E-11-6: 4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил (4-((3R,4S,7S,10S)-4-((S)-втор-бутил)-7,10-діізопропіл-3-(2-((S)-2-((1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-(((S)-2-феніл-1-(тіазол-2-іл)етил)аміно)пропіл)піролідін-1-іл)-2-оксоетил)-5,11-диметил-6,9-діоксо-2-окса-5,8,11-триазатридекан-13-іл)феніл)(метил)карбамату 2,2,2-трифторацетат



Карбонат E-11-5 (114 мг, 0,177 ммоль, 1,2 екв) і анілін 11F (150 мг, 0,147 ммоль, 1 екв) розчиняли в безводному ДМФ (4 мл). Додавали HOBT (38 мг, 0,295 ммоль, 2 екв) і DIEA (54 мкл, 0,295 ммоль, 2 екв), і суміш перемішували протягом вихідних днів при кімнатній температурі. ДМФ випарювали при зниженому тиску, і залишок очищали флеш-хроматографією на силікагелі, елюючи ДХМ. Продукт піддавали переочищенню препаративною ВЕРХ (Waters 600E, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 100 мм; елююча фаза: вода / MeCN, забуферена 0,1% ТФО; градієнт від 5% до 100% MeCN в 15 хвилин; Waters 2487, детектор УФ 220 нм). Відібрані фракції об'єднували і ліофілізували з одержанням сполуки E-11-6 у вигляді білої твердої речовини (89 мг, 39%).

Сполука E-11:

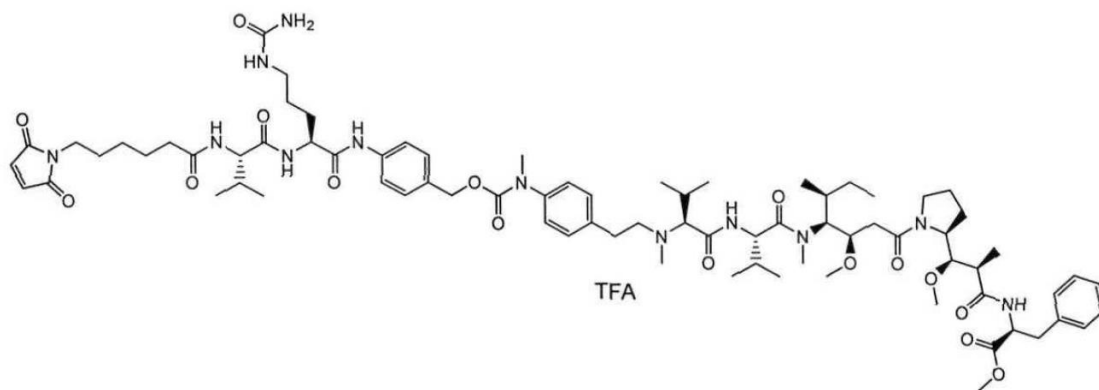


Сполуку E-11-6 (21 мг, 0,014 ммоль, 1,0 екв) розчиняли в ДХМ (0,25 мл) і додавали ТФО (40 мкл). Розчин перемішували протягом 2 годин при кімнатній температурі, після чого аналіз РХ-МС показав повне витрачання вихідної речовини. Суміш швидко охолоджували (баня з рідким азотом), при цьому одночасно додавали ДМФ (0,5 мл), потім DIEA (100 мкл), щоб нейтралізувати ТФО. Потім охолоджуючу баню видаляли і додавали 2,5-діоксопіролідін-1-іл-6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1Н-пірол-1-іл)гексаноат (4 мг, 0,012 ммоль, 1 екв). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 48 годин, і продукт очищали препаративною ВЕРХ (Waters 600E, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 100 мм; елюююча фаза: вода / MeCN, забуферена 0,1% ТФО; градієнт від 5 % до 100% MeCN протягом 15 хвилин; Waters 2487 детектор УФ при 220 нм). Відібрані фракції об'єднували і ліофілізували з одержанням сполуки E-11 у вигляді білої твердої речовини (11 мг, 54%).

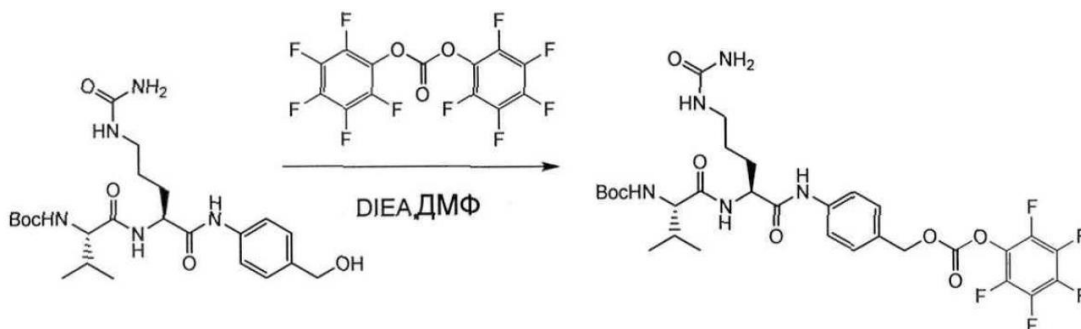
m/z (Q-TOF MS IEP⁺) 1524,8282 (2%, MNa^+ , $C_{79}H_{115}N_{13}NaO_{14}S$ потрібно 1524,8299), 751,9283 (100%, $(MH_2)^{2+}$, $C_{79}H_{117}N_{13}O_{14}S$ потрібно 751,9276).

Сполука E-12

метил-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-(((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1Н-пірол-1-іл)гексаноамідо)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдо-пентанамідо)бензил)окси)карбоніл)(метил)аміно)фенетил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептаноїл)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропаноїл)-L-фенілаланінату 2,2,2-трифторацетат



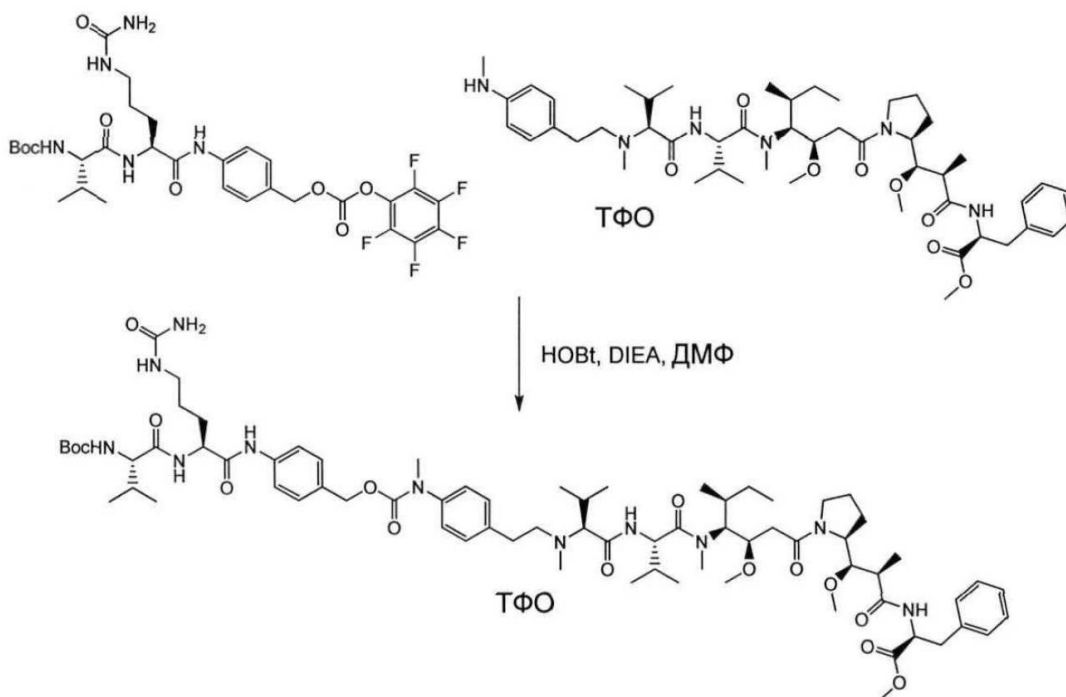
Сполука Е-12-1: трет-бутил-((S)-3-метил-1-оксо-1-(((S)-1-оксо-1-((4-(((перфторфенокси)карбоніл)окси)метил)феніл)аміно)-5-уреїдопентан-2-іл)аміно)бутан-2-іл)карбамат



5

Сполуку Е-11-4 (670 мг, 1,26 ммоль, 1 екв) розчиняли в безводному ДМФ (6 мл) при 0 °С в інертній атмосфері. Додавали біс(перфторфеніл)карбонат (991 мг, 2,51 ммоль, 2 екв) з подальшим додаванням DIEA (329 мкл, 1,89 ммоль, 1,5 екв), і одержаний в результаті безбарвний розчин перемішували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. ДМФ випарювали при зниженому тиску, і залишок очищали на силікагелі (ДХМ/MeOH) з одержанням 836 мг (96%) сполуки Е-12-1 у вигляді білуватої твердої речовини.

Сполука Е-12-2: метил-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-(((4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил)окси)карбоніл)(метил)аміно)фенетил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептаноїл)піролідин-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанойл)-L-фенілаланінату-2,2,2-трифторацетат



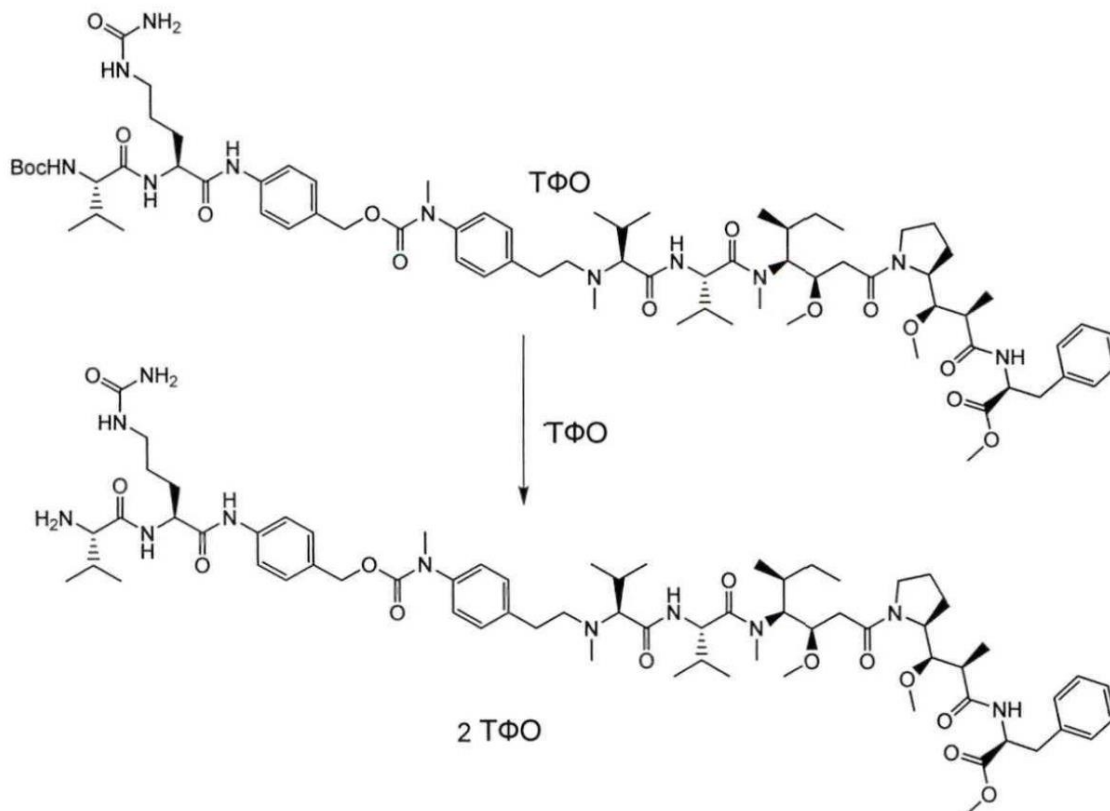
20

Анілін 12 (165 мг, 0,189 ммоль, 1,0 екв) розчиняли в ДМФ (5 мл) при 0 °С в інертній атмосфері. Додавали карбонат Е-12-1 (194 мг, 0,282 ммоль, 1,5 екв), HOBT (51 мг, 0,375 ммоль, 2 екв) і DIEA (66 мкл, 0,375 ммоль, 2 екв), і суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 8 годин. Розчинник випарювали при зниженому тиску, і залишок очищали препаративною ВЕРХ (Waters 600E, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 100 мм; елююча фаза: вода / MeCN, забуферена 0,1% ТФО; градієнт від 5% до 100% MeCN протягом 15 хвилин; Waters 2487 детектор УФ при 220 нм). Відібрані фракції об'єднували і ліофілізували з одержанням сполуки Е-12-7 у вигляді білої твердої речовини (247 мг, 77%).

25

Сполука Е-12-3: метил-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-(((4-((S)-2-((S)-2-аміно-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил)окси)карбоніл)(метил)аміно)фенетил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептаноїл)піролідин-2-іл)-3-метокси-2-метилпропаноїл)-L-фенілаланінату біс(2,2,2-трифторацетат)

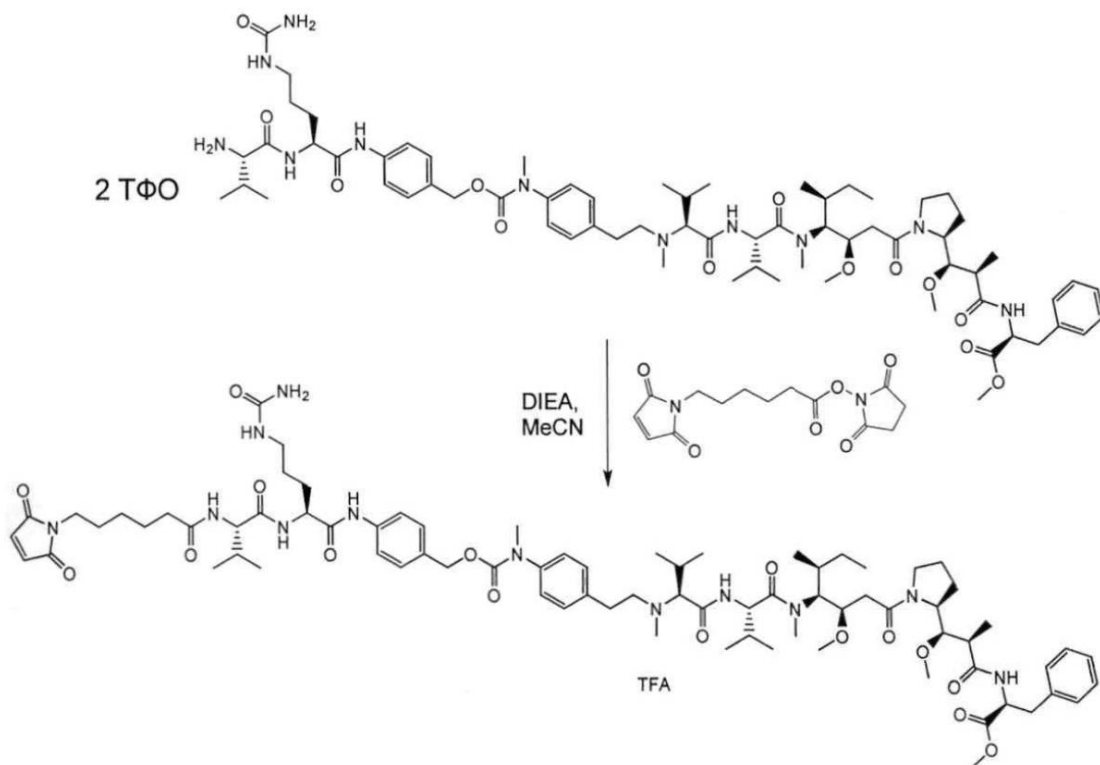
5



Сполуку Е-12-2 (5,6 мг, 4,04 мкмоль, 1,0 екв) розчиняли ТФО (100 мкл). Через 5 хвилин додавали 2 мл води, і суміш ліюфілізували протягом ночі з одержанням сполуки Е-12-3 у вигляді білуватої твердої речовини (5,6 мг, 98%).

10

Сполука Е-12:

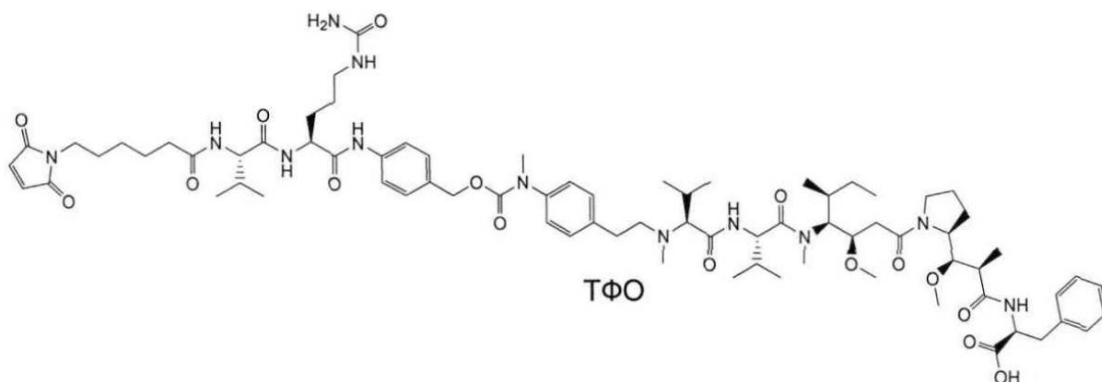


Сполуку E-12-3 (5,6 мг, 4 мкмоль, 1,0 екв) розчиняли в ацетонітрилі (0,5 мл) і додавали DIEA (5 мкл, 7 екв) з подальшим додаванням 2,5-діоксопіролідин-1-іл-6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексаноату (2,5 мг, 8 мкмоль, 2 екв). Суміш перемішували протягом 6 годин при кімнатній температурі. Після перевірки реакції по РХ-МС додавали 200 мкл води, і одержаний в результаті розчин очищали препаративною ВЕРХ (Waters 600E, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 100 мм; елююча фаза: вода / MeCN, забуферена 0,1% ТФО; градієнт від 5% до 100% MeCN протягом 15 хвилин; Waters 2487, детектор УФ при 220 нм). Відібрані фракції об'єднували і ліофілізували з одержанням сполуки E-12 у вигляді білої твердої речовини (4,6 мг, 70%).

m/z (Q-TOF MC IEP⁺) 739,4389 (100%, (MH₂)²⁺, C₇₈H₁₁₈N₁₂O₁₆ потрібно 739,4389).

Сполука E-13

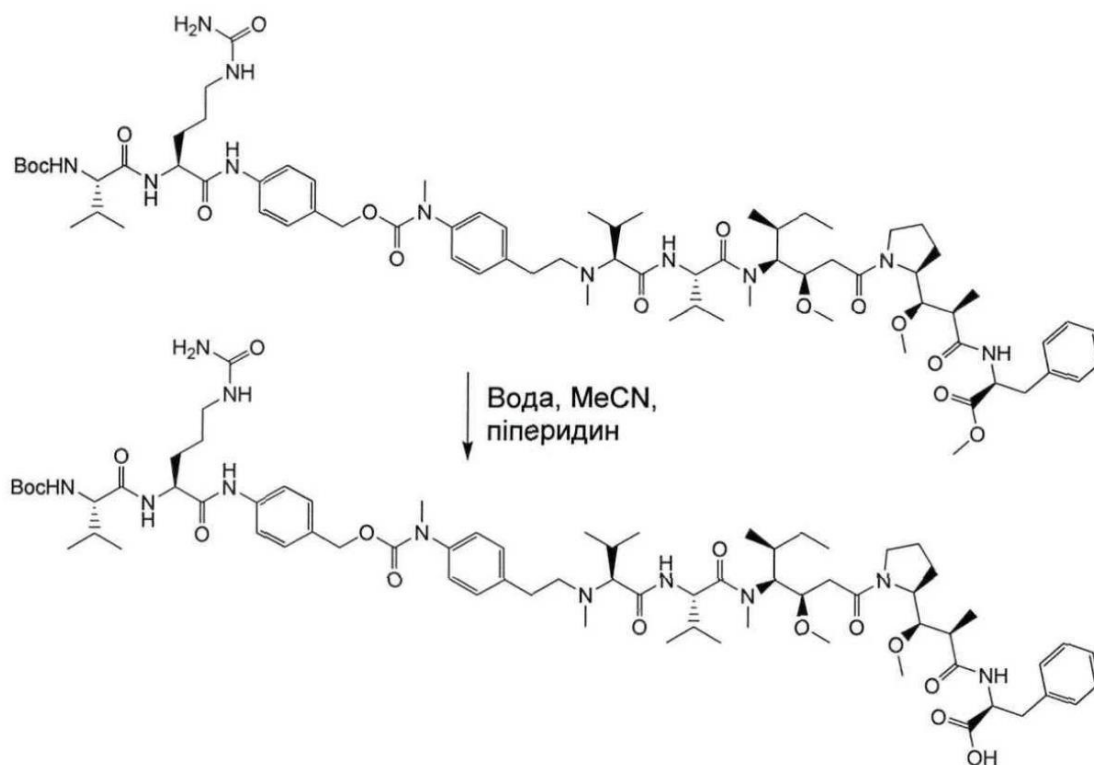
((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-(((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексаноамідо)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил)окси)карбоніл)(метил)аміно)фенетил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептаноїл)піролідин-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанол)-L-фенілаланіну 2,2,2-трифторацетат



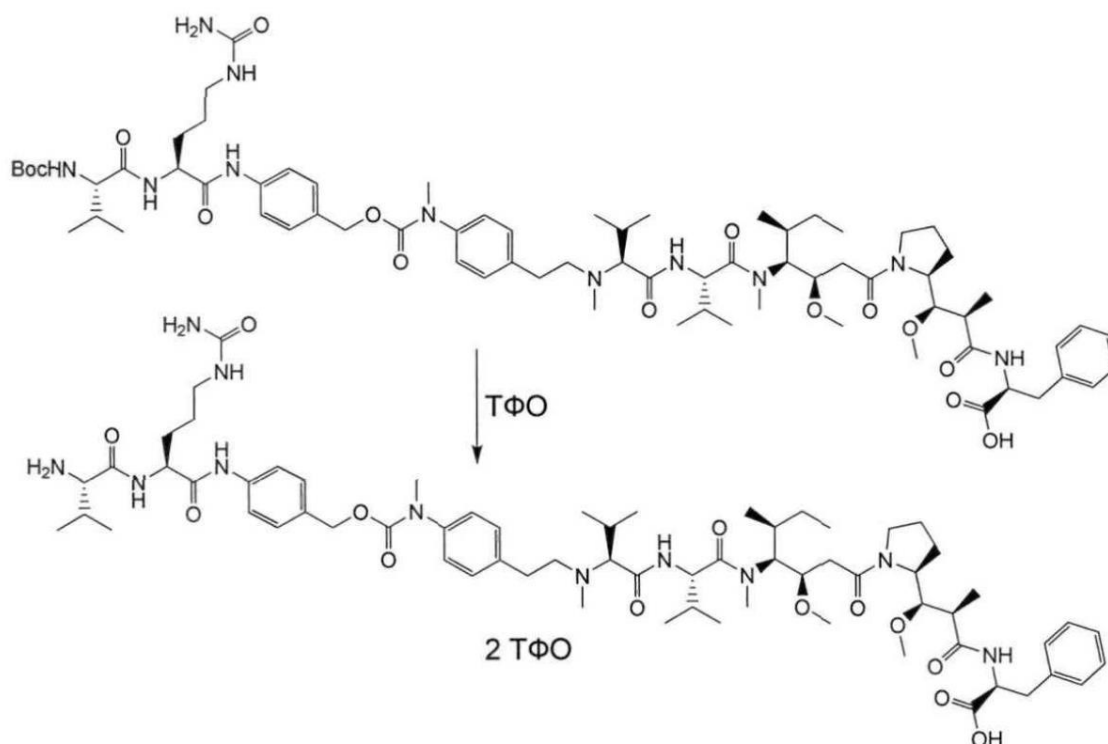
20

Сполука E-13-1: ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-(((4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил)окси)карбоніл)(метил)аміно)фенетил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-

метилгептаноїл)піролідин-2-іл)-3-метокси-2-метилпропаноїл)-L-фенілаланін



- 5 Сполуку E-12-2 (185 мг, 0,123 ммоль, 1,0 екв) розчиняли в суміші води (5 мл) і ацетонітрилу (5 мл) при кімнатній температурі. Додавали піперидин (3,67 мл, 300 екв), і суміш перемішували протягом 6 годин при кімнатній температурі. Розчинники випарювали до сухого стану при зниженому тиску, і залишок розтирали з Et₂O (60 мл). Тверду речовину двічі промивали Et₂O (20 мл) і висушували в вакуумі з одержанням сполуки E-13-1 у вигляді білуватої твердої речовини
- 10 (175 мг, 95%).
- 10 Сполука E-13-2: ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-(((4-((S)-2-((S)-2-аміно-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил)окси)карбоніл)(метил)аміно)фенетил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептаноїл)піролідин-2-іл)-3-метокси-2-метилпропаноїл)-L-фенілаланіну біс-(2,2,2-трифторацетат)
- 15

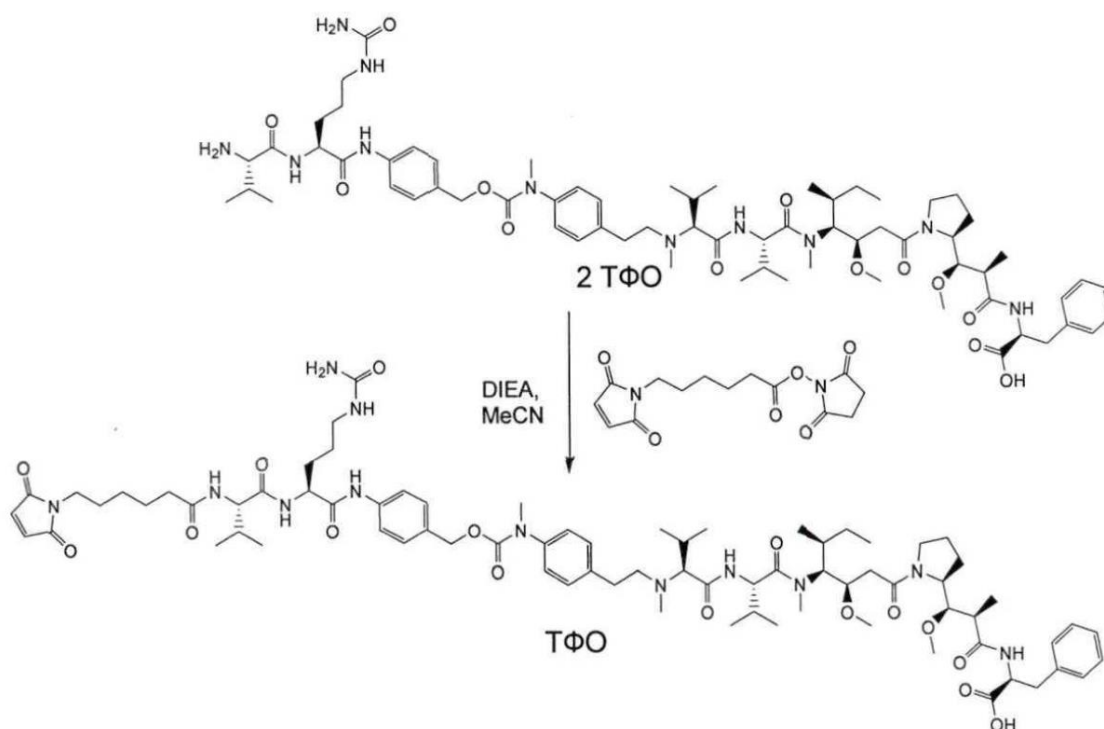


Сполуку E-13-1 (175 мг, 0,128 ммоль, 1,0 екв) розчиняли ТФО (200 мкл). Через 5 хвилин додавали воду (1 мл) і ацетонітрил (1 мл), і розчин ліофілізували протягом ночі з одержанням

5

сполуки E-12-2 у вигляді білуватої твердої речовини (180 мг, 87%).
Сполука E-13: ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-(((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамідо)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил)окси)карбоніл)(метил)аміно)фенетил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептаноїл)піролідин-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанойл)-L-фенілаланіну 2,2,2-трифторацетат

10

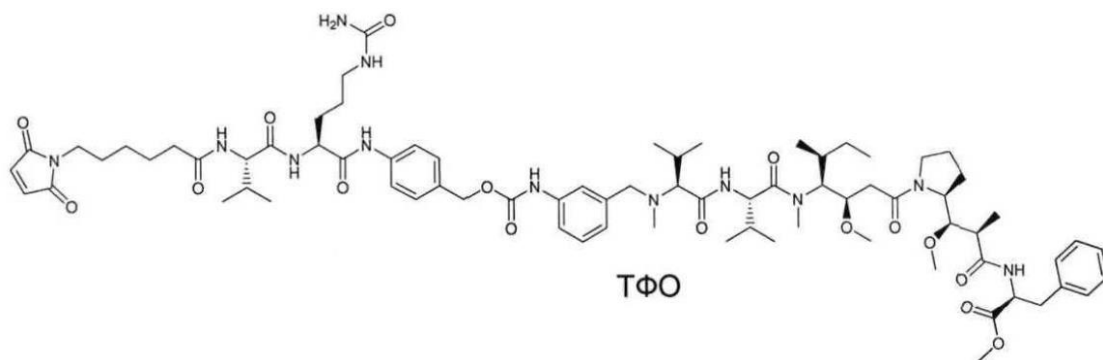


Сполуку E-13-2 (80 мг, 0,058 ммоль, 1,0 екв) розчиняли в суміші ацетонітрилу (1,5 мл) і ДМФ (0,4 мл). Додавали DIEA (50 мкл, 0,289 ммоль, 5 екв) з подальшим додаванням 2,5-діокспіролідін-1-іл-6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексаноату (36 мг, 0,116 ммоль, 2 екв). Суміш перемішували протягом 3 годин при кімнатній температурі. Після перевірки реакції по РХ-МС розчинник випарювали при зниженому тиску, і залишок очищали препаративною ВЕРХ (Waters 600Е, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 100 мм; елююча фаза: вода/MeCN, забуферена 0,1% ТФО; градієнт від 5% до 100% MeCN протягом 15 хвилин; Waters 2487, детектор УФ при 220 нм). Відібрані фракції об'єднували і ліофілізували з одержанням сполуки E-13 у вигляді білої твердої речовини (32 мг, 35%).

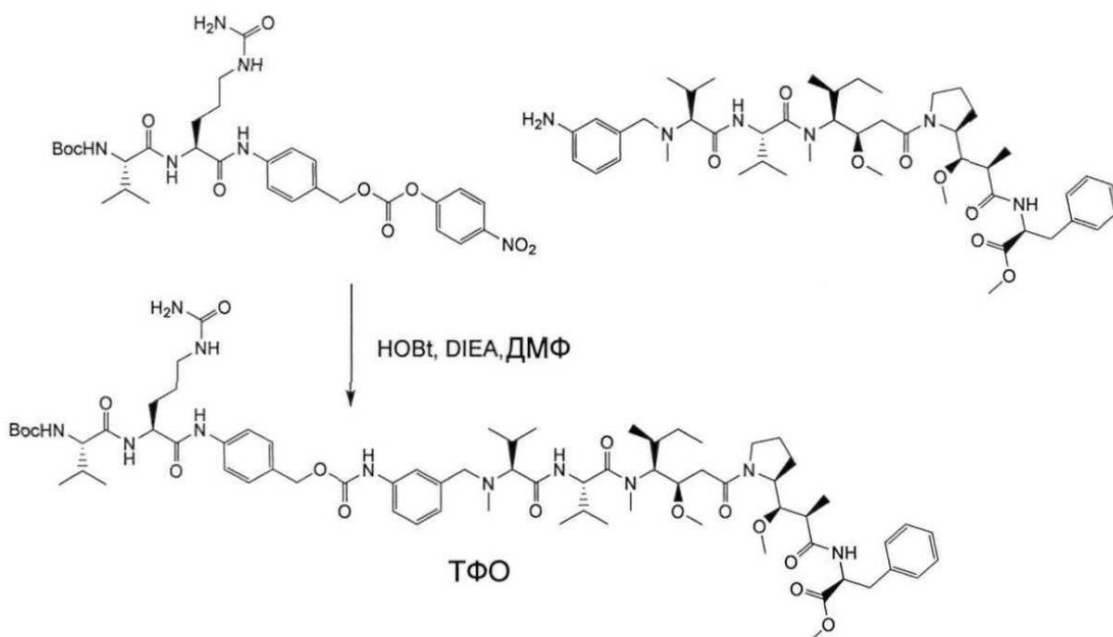
m/z (Q-TOF MS IEP-) 1461,8336 (100%, (M-H)⁻, C₇₇H₁₁₃N₁₂O₁₆ потрібно 1461,8403). m/z (Q-TOF MS IEP+) 1463,8565 (2%, MH⁺, C₇₇H₁₁₅N₁₂O₁₆ потрібно 1463,8549), 732,4317 (100%, (MH₂)²⁺, C₇₇H₁₁₆N₁₂O₁₆ потрібно 732,4311).

Сполука E-15

метил-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-(((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамідо)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил)окси)карбоніл)аміно)бензил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептаноїл)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропаноїл)-L-фенілаланінату 2,2,2-трифторацетат

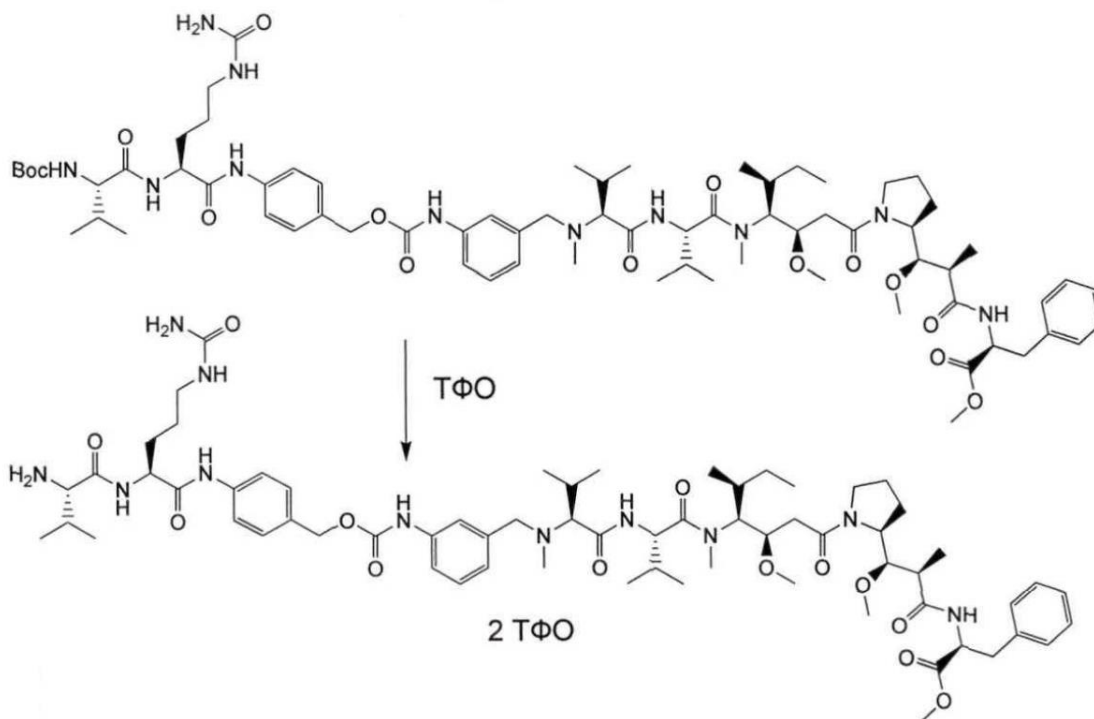


Сполука E-15-1: метил-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-(((4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил)окси)карбоніл)аміно)бензил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептаноїл)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропаноїл)-L-фенілаланінату 2,2,2-трифторацетат



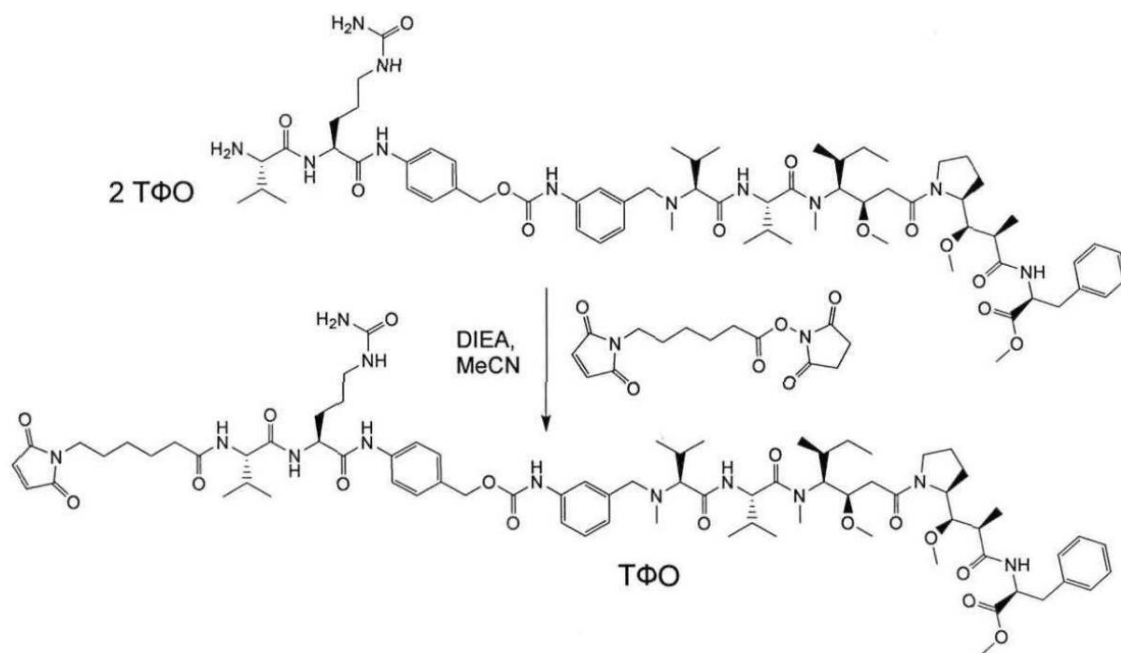
Сполуку E-15-1 було одержано відповідно до такої ж методики, як для сполуки E-11-6, з використанням карбонату E-11-5 (28 мг, 0,044 ммоль, 1 екв), аніліну 15 (42 мг, 0,044 ммоль, 1 екв), HOBt (3 мг, 0,022 ммоль, 0,5 екв) і DIEA (15 мкл, 0,087 ммоль, 2 екв) в ДМФ (2 мл). Сполуку E-15-1 виділили у вигляді твердої речовини (8,2 мг, 13%).

Сполука E-15-2: метил-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-(((4-((S)-2-((S)-2-аміно-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил)окси)карбоніл)аміно)бензил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептанол)піролідин-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанол)-L-фенілаланінату біс(2,2,2-трифторацетат)



Сполуку E-15-1 (8,2 мг, 5,58 мкмоль, 1,0 екв) розчиняли в ТФО (200 мкл). Через 5 хвилин додавали воду (1 мл), і розчин ліофілізували протягом ночі з одержанням сполуки E-15-8 у вигляді білої твердої речовини (7,6 мг, 99%).

Сполука E-15:

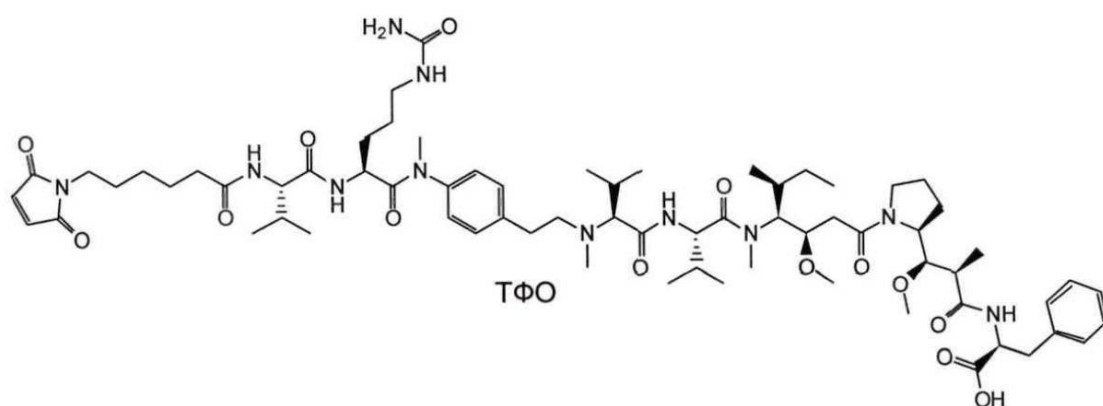


Сполуку Е-15 було одержано відповідно до такої ж методики, як для сполуки Е-12, з використанням аміну Е-15-2 (7,6 мг, 5,55 мкмоль, 1 екв), 2,5-діоксопіролідін-1-іл-6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1Н-пірол-1-іл)гексаноату (2 мг, 6,65 мкмоль, 1.2 екв) і DIEA (5 мкл, 0,028 ммоль, 5 екв) в ацетонітрилі (0,5 мл). Сполуку Е-15 виділили у вигляді білої твердої речовини (4,2 мг, 48%).

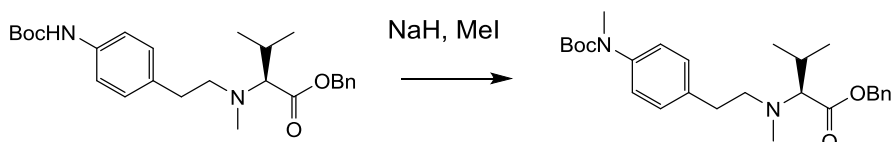
m/z (Q-TOF MS IEP⁺) 1471,8169 (2%, MNa⁺, C₇₆H₁₁₂N₁₂NaO₁₆ потрібно 1471,8211), 725,4223 (100%, (MH₂)²⁺, C₇₆H₁₁₄N₁₂O₁₆ потрібно 725,4232), 483,9482 (10%, (MH₃)³⁺, C₇₆H₁₁₅N₁₂O₁₆ потрібно 483,9513).

Сполука F-13

((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1Н-пірол-1-іл)гексанамідо)-3-метилбутанамідо)-N-метил-5-уреїдопентанамідо)фенетил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептаноїл)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропаноїл)-L-фенілаланіну 2,2,2-трифторацетат

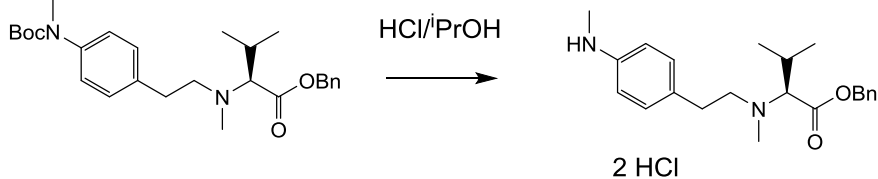


20 Сполука F-13-1: бензил-N-(4-((трет-бутоксикарбоніл)(метил)аміно)фенетил)-N-метил-L-валінат



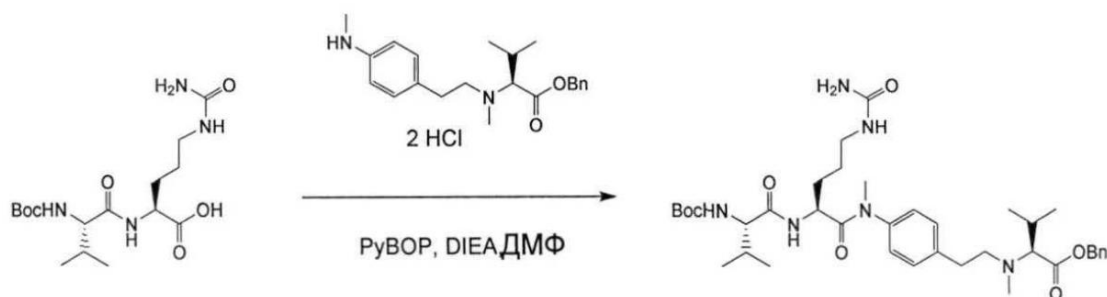
Сполуку 11C (250 мг, 0,567 ммоль, 1 екв) розчиняли в ТГФ (10 мл) з подальшим додаванням NaH (60% суспензія в мінеральному маслі, 68 мг, 1,702 ммоль, 3 екв). Суміш перемішували протягом 5 хвилин, потім додавали йодметан (106 мкл, 1,702 ммоль, 3 екв). Реакційну суміш перемішували протягом 2 годин при кімнатній температурі, після чого гасили водою і розділяли між EtOAc (100 мл) і водою (50 мл). Органічну фазу висушували над MgSO_4 і випарювали до сухого стану з одержанням сполуки F-13-1 у вигляді жовтого масла (250 мг, 97%), яке використовували без додаткового очищення.

Сполука F-13-2: бензил-N-метил-N-(4-(метиламіно)фенетил)-L-валінат



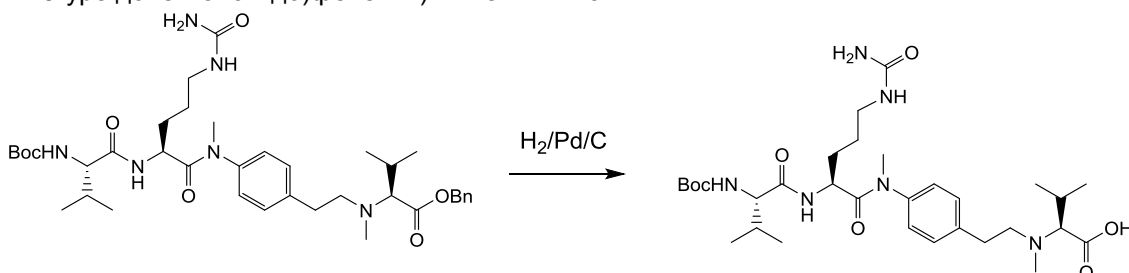
Вос-захищений анілін F-13-1 (250 мг, 0,550 ммоль, 1 екв) розчиняли в MeOH (5 мл) з подальшим додаванням 1 мл наявного в продажу розчину HCl в iPrOH (5-6 M). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 2 годин, після чого випарювали до сухого стану при зниженому тиску. Одержане в результаті жовте масло розтирали з Et_2O з одержанням сполуки F-13-2 у вигляді жовтої твердої речовини (202 мг, 94%).

Сполука F-13-3: бензил-N-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)-3-метилбутанамідо)-N-метил-5-уреїдопентанамідо)фенетил)-N-метил-L-валінат



Кислоту E-11-3 (190 мг, 0,508 ммоль, 1,5 екв) розчиняли в безводному ДМФ (1 мл) з подальшим додаванням DIEA (118 мкл, 0,677 ммоль, 2 екв), бензотриазол-1-іл-окситрипіролідінофосфонію гексафторфосфату (PyBOP - 264 мг, 0,508 ммоль, 1,5 екв) і аніліну F-13-2 (120 мг, 0,339 ммоль, 1 екв). Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом ночі, і розчинники випарювали при зниженому тиску. Залишок очищали препаративною ВЕРХ (Waters 600E, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 x 100 мм; елюююча фаза: вода/MeCN, забуферена 0,1% ТФО; градієнт від 5% до 100% MeCN в 15 хвилин; Waters 2487, детектор УФ при 220 нм). Відібрані фракції об'єднували і ліофілізували з одержанням сполуки F-13-3 у вигляді білої твердої речовини (140 мг, 45%).

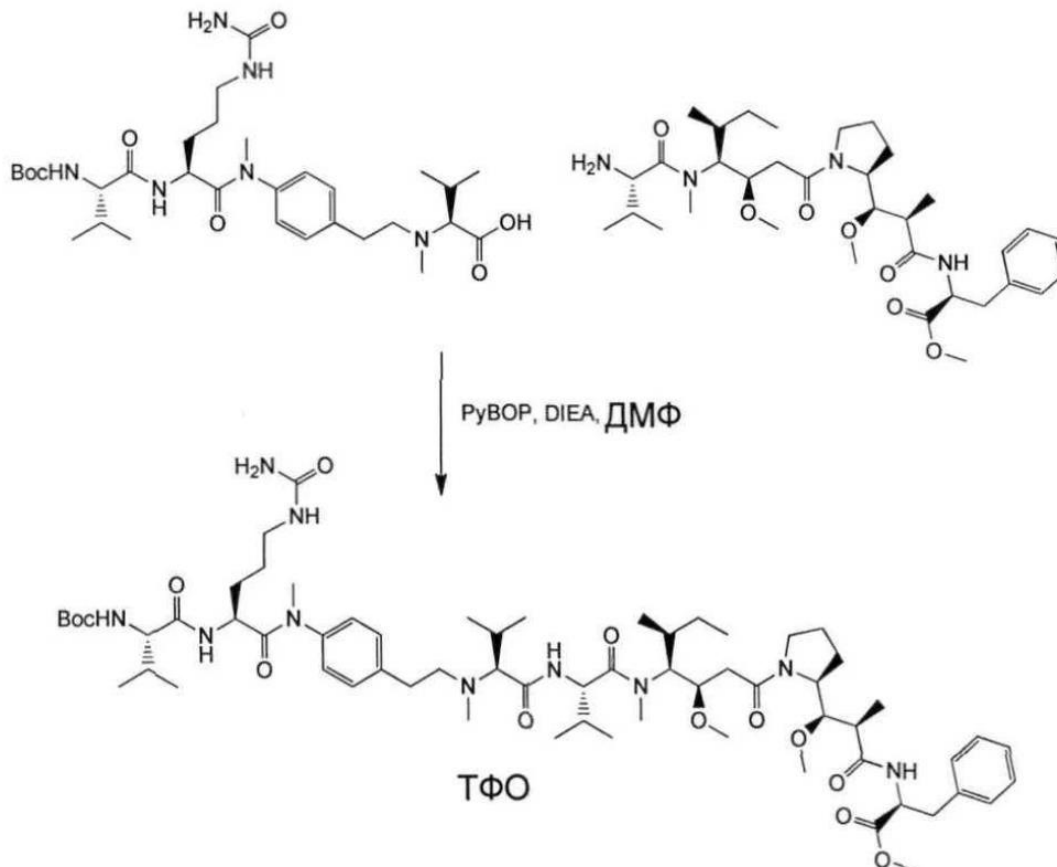
Сполука F-13-4: N-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)-3-метилбутанамідо)-N-метил-5-уреїдопентанамідо)фенетил)-N-метил-L-валін



Сполуку F-13-3 (116 мг, 0,163 ммоль, 1 екв) розчиняли в MeOH (5 мл) в присутності Pd/C 10% (30 мг) і гідроґенізували протягом 2 годин при температурі навколишнього середовища і

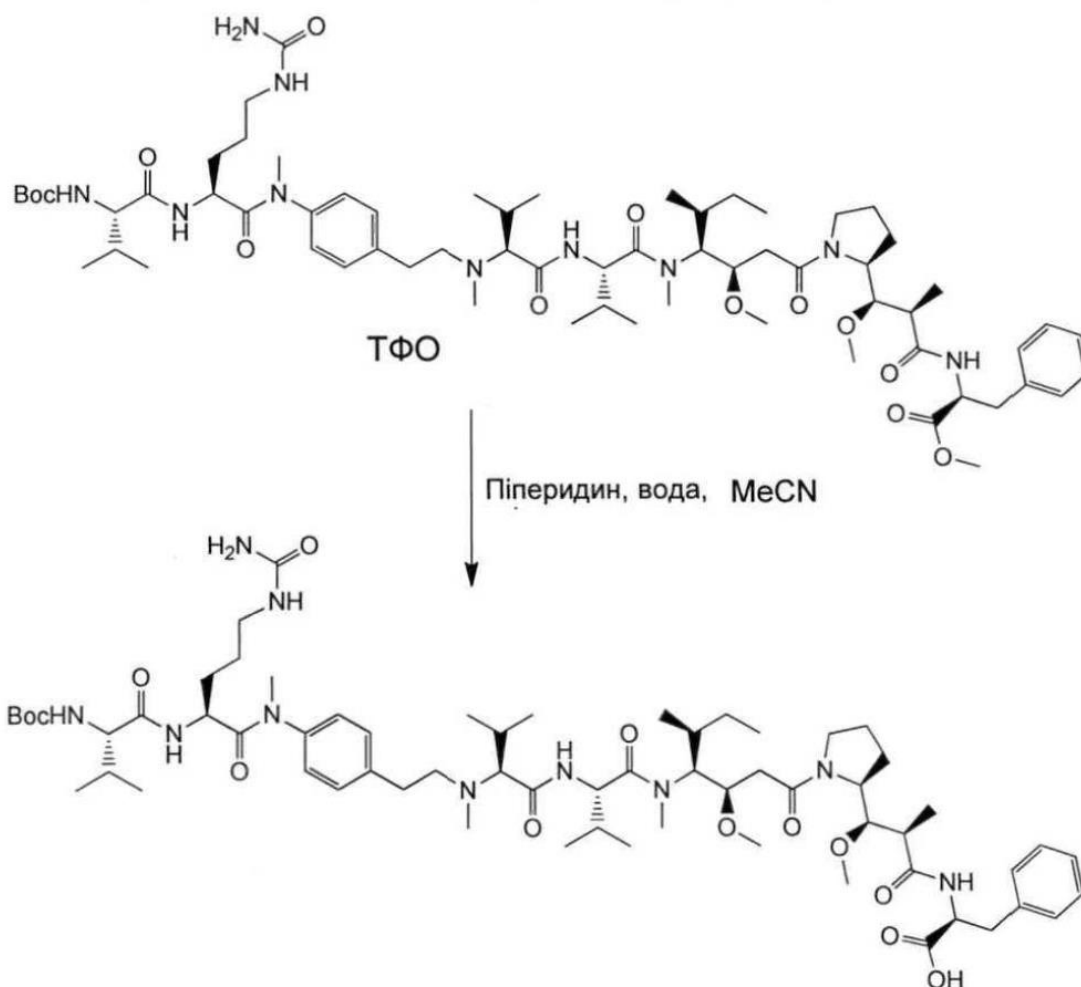
атмосферному тиску. Реакційну суміш фільтрували і концентрували при зниженому тиску з одержанням 110 мг (99%) сполуки F-13-4 у вигляді бежевої твердої речовини.

- 5 Сполука F-13-5: метил-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)-3-метилбутанамідо)-N-метил-5-уреїдопентанамідо)фенетил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептанол)піролідин-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанол)-L-фенілаланінату 2,2,2-трифторацетат



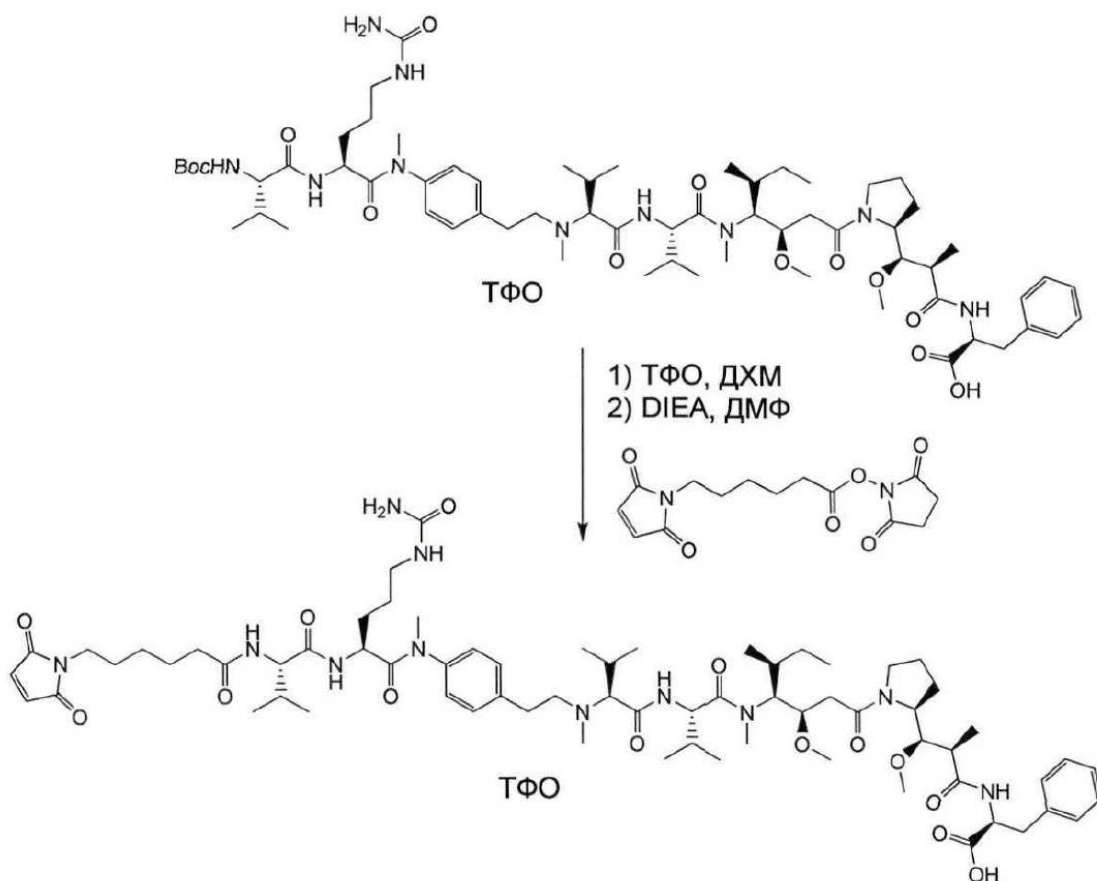
- 10 Амін 3D (89 мг, 0,140 ммоль, 1 екв) і кислоту F-13-4 (145 мг, 0,210 ммоль, 1,5 екв) розчиняли в безводному ДМФ (4 мл) і додавали PyBOP (109 мг, 0,210 ммоль, 1,5 екв) і DIEA (73 мкл, 0,420 ммоль, 3 екв). Суміш перемішували протягом 1 години при кімнатній температурі, і розчинник випарювали. Залишок розділяли між EtOAc і водою, і органічну фазу висушували над $MgSO_4$, фільтрували і випарювали при зниженому тиску. Неочищений продукт очищали препаративною
- 15 ВЕРХ (Waters 600E, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 100 мм; елюююча фаза: вода/MeCN, забуферена 0,1% ТФО; градієнт від 5% до 100% MeCN в 15 хвилин; Waters 2487, детектор УФ при 220 нм). Відібрані фракції об'єднували і ліофілізували з одержанням сполуки F-13-5 у вигляді білої твердої речовини (140 мг, 73%).

- 20 Сполука F-13-6: ((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)-3-метилбутанамідо)-N-метил-5-уреїдопентанамідо)фенетил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептанол)піролідин-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанол)-L-фенілаланіну 2,2,2-трифторацетат



Сполуку F-13-5 (140 мг, 0,104 ммоль, 1 екв) розчиняли в суміші води (4 мл), ацетонітрилу (4 мл) і піперидину (2 мл) і перемішували при кімнатній температурі протягом 4 годин. Розчинник випарювали при зниженому тиску, і залишок очищали препаративною ВЕРХ (Waters 600E, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 100 мм; елюююча фаза: вода/MeCN, забуферена 0,1% ТФО; градієнт від 5% до 100% MeCN протягом 15 хвилин; Waters 2487 детектор УФ при 220 нм). Відібрані фракції об'єднували і ліофілізували з одержанням сполуки F-13-6 у вигляді білої твердої речовини (115 мг, 83%).

Сполука F-13:

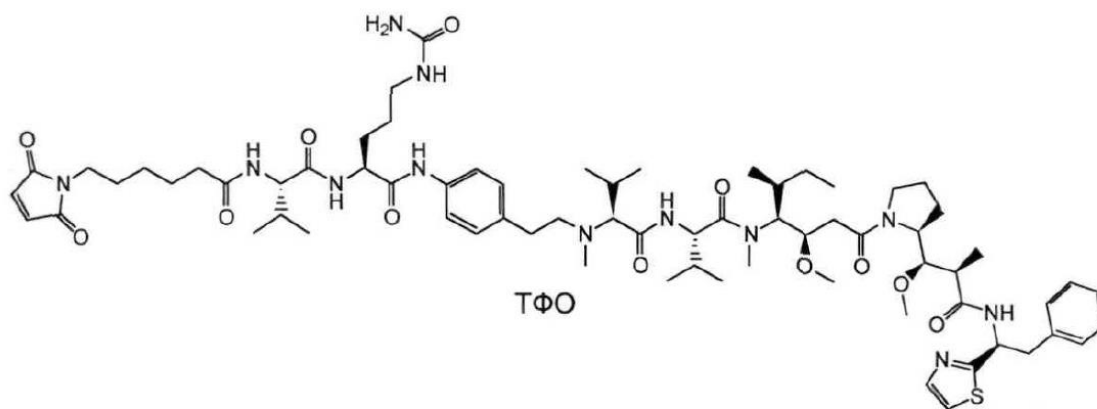


Сполуку F-13 було одержано відповідно до такої ж методики, як для сполуки E-11, з використанням Вос-захищеного аміну F-13-6 (55 мг, 0,041 ммоль, 1,0 екв) в ДХМ (0,5 мл) і ТФО (100 мкл, 30 екв) з подальшим розведенням ДМФ (1 мл), гасінням DIEA (320 мкл, 45 екв), потім взаємодією з 2,5-діоксопіролідин-1-іл-6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексаноатом (15 мг, 0,049 ммоль, 1,2 екв). Після очищення препаративною ВЕРХ і ліофілізації сполуку F-13 було одержано у вигляді білої твердої речовини (14 мг, 24%).

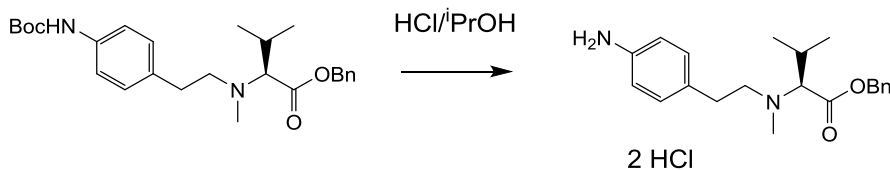
m/z (Q-TOF MS IEP+) 1314,8067 (2%, MH⁺, C₆₉H₁₀₈N₁₁O₁₄ потрібно 1314,8072), 657,9067 (100%, (MH₂)²⁺, C₆₉H₁₀₉N₁₁O₁₄ потрібно 657,9072).

Сполука F-61

N-((S)-1-(((S)-1-((4-((3R,4S,7S,10S)-4-((S)-втор-бутил)-7,10-Діізопропіл-3-(2-((S)-2-((1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-(((S)-2-феніл-1-(тіазол-2-іл)етил)аміно)пропіл)піролідин-1-іл)-2-оксоетил)-5,11-диметил-6,9-діоксо-2-окса-5,8,11-триазатридекан-13-іл)феніл)аміно)-1-оксо-5-уреїдопентан-2-іл)аміно)-3-метил-1-оксобутан-2-іл)-6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанаמידу 2,2,2-трифторацетат

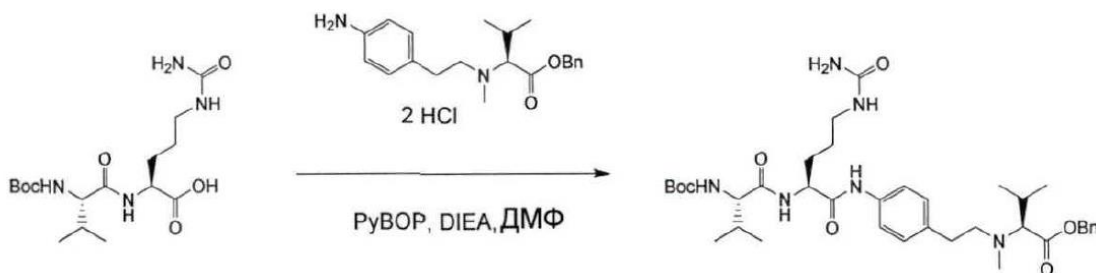


Сполука F-61-1: дигідрохлорид бензил-N-(4-амінофенетил)-N-метил-L-валінат



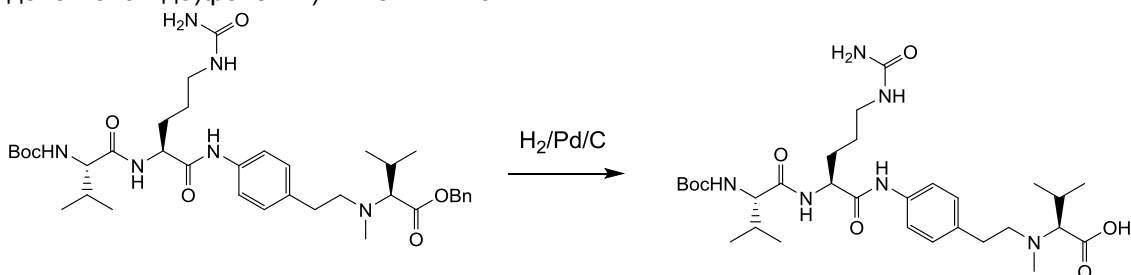
Сполуку 11C (1,0 г, 2,27 ммоль, 1 екв) розчиняли в 8 мл наявного в продажу розчину HCl в iPrOH (5-6 M). Суміш перемішували протягом 2 годин при кімнатній температурі, після чого випарювали до сухого стану при зниженому тиску. Залишок двічі розтирали з Et₂O (30 мл) і висушували у вакуумі з одержанням сполуки F-61-1 у вигляді білої твердої речовини (916 мг, 98%).

Сполука F-61-2: бензил-N-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)фенетил)-N-метил-L-валінат



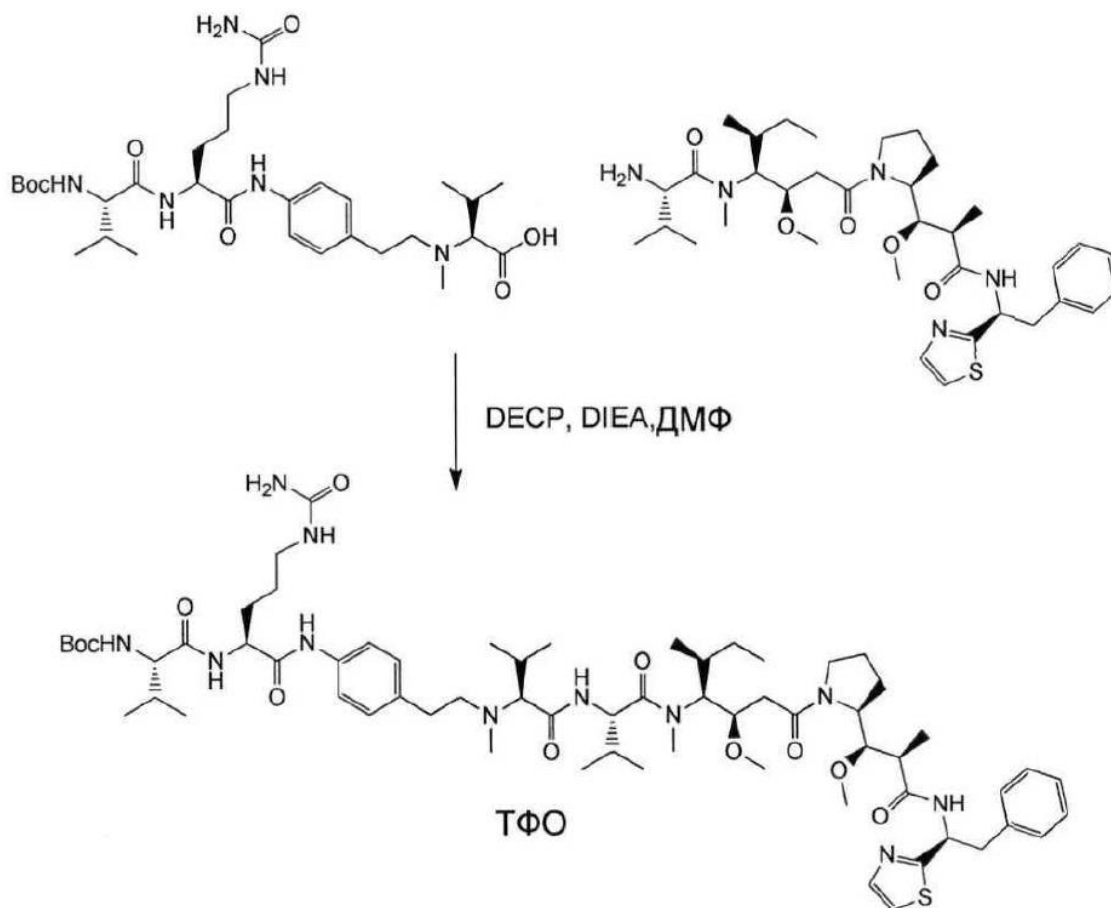
Кислоту E-11-3 (769 мг, 2,05 ммоль, 1,5 екв) розчиняли в безводному ДМФ (2,5 мл) з подальшим додаванням DIEA (957 мкл, 5,48 ммоль, 4 екв) і PyBOP (1,07 г, 2,05 ммоль, 1,5 екв). Додавали анілін F-61-1 (566 мг, 1,369 ммоль, 1 екв), і суміш перемішували при кімнатній температурі протягом ночі. Розчинники випарювали при зниженому тиску, і залишок очищали на силікагелі (ДХМ/MeOH) з одержанням 969 мг (102%) сполуки F-61-2 у вигляді білої твердої речовини.

Сполука F-61-3: N-(4-((S)-2-((S)-2-((трет-бутоксикарбоніл)аміно)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)фенетил)-N-метил-L-валін



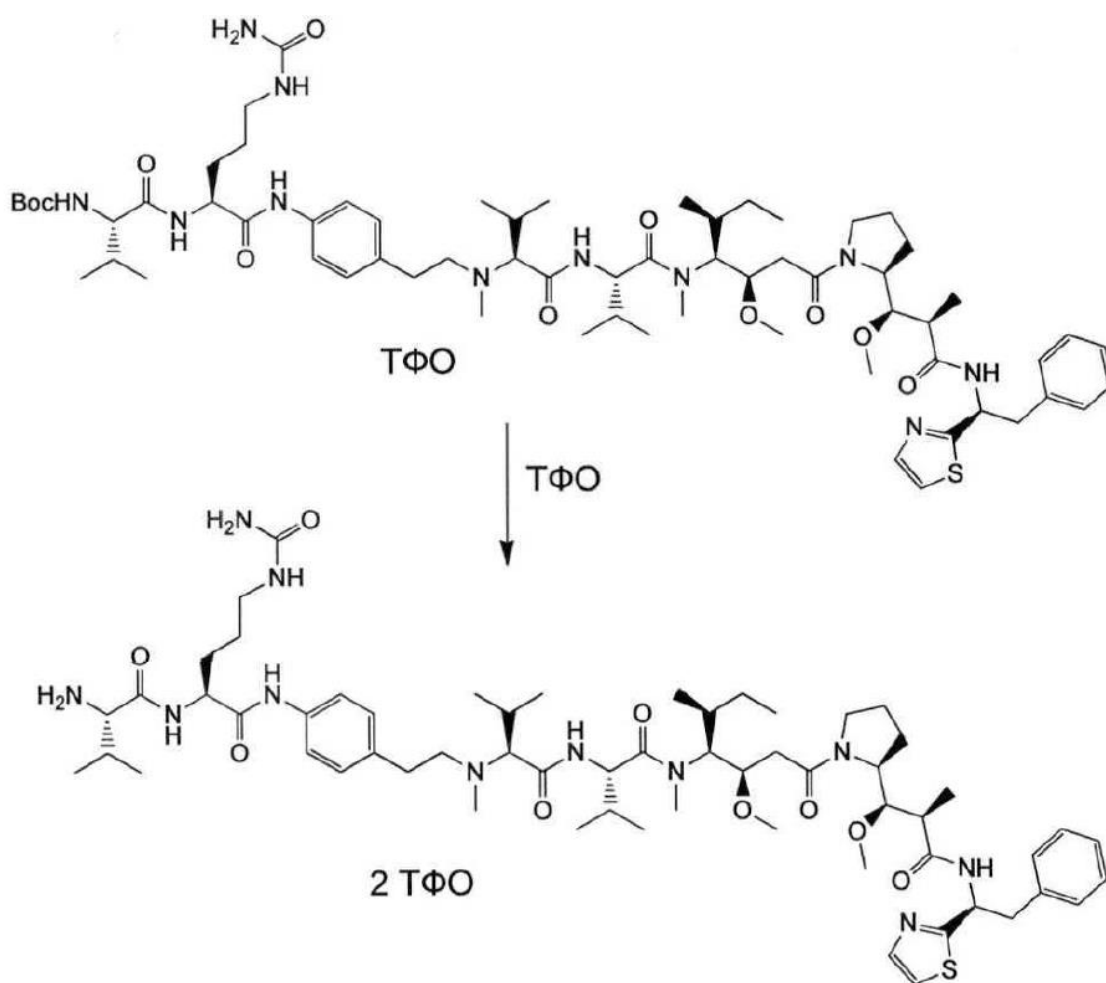
Сполуку F-61-2 (969 мг, 1,28 ммоль, 1 екв) розчиняли в MeOH (20 мл) в присутності Pd/C 10% (270 мг) і гідрогенізували протягом 3 годин при температурі навколишнього середовища і атмосферному тиску. Реакційну суміш фільтрували і концентрували при зниженому тиску, і залишок очищали на силікагелі (ДХМ/MeOH/AcOH) з одержанням 520 мг (67%) сполуки F-61-3 у вигляді білої твердої речовини.

Сполука F-61-4: трет-бутил-((S)-1-(((S)-1-((4-((3R,4S,7S,10S)-4-((S)-втор-бутил)-7,10-Діізопропіл-3-(2-((S)-2-((1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-(((S)-2-феніл-1-(тіазол-2-іл)етил)аміно)пропіл)піролідін-1-іл)-2-оксоетил)-5,11-диметил-6,9-діоксо-2-окса-5,8,11-триазатридекан-13-іл)феніл)аміно)-1-оксо-5-уреїдопентан-2-іл)аміно)-3-метил-1-оксобутан-2-іл)карбамату 2,2,2-трифторацетат



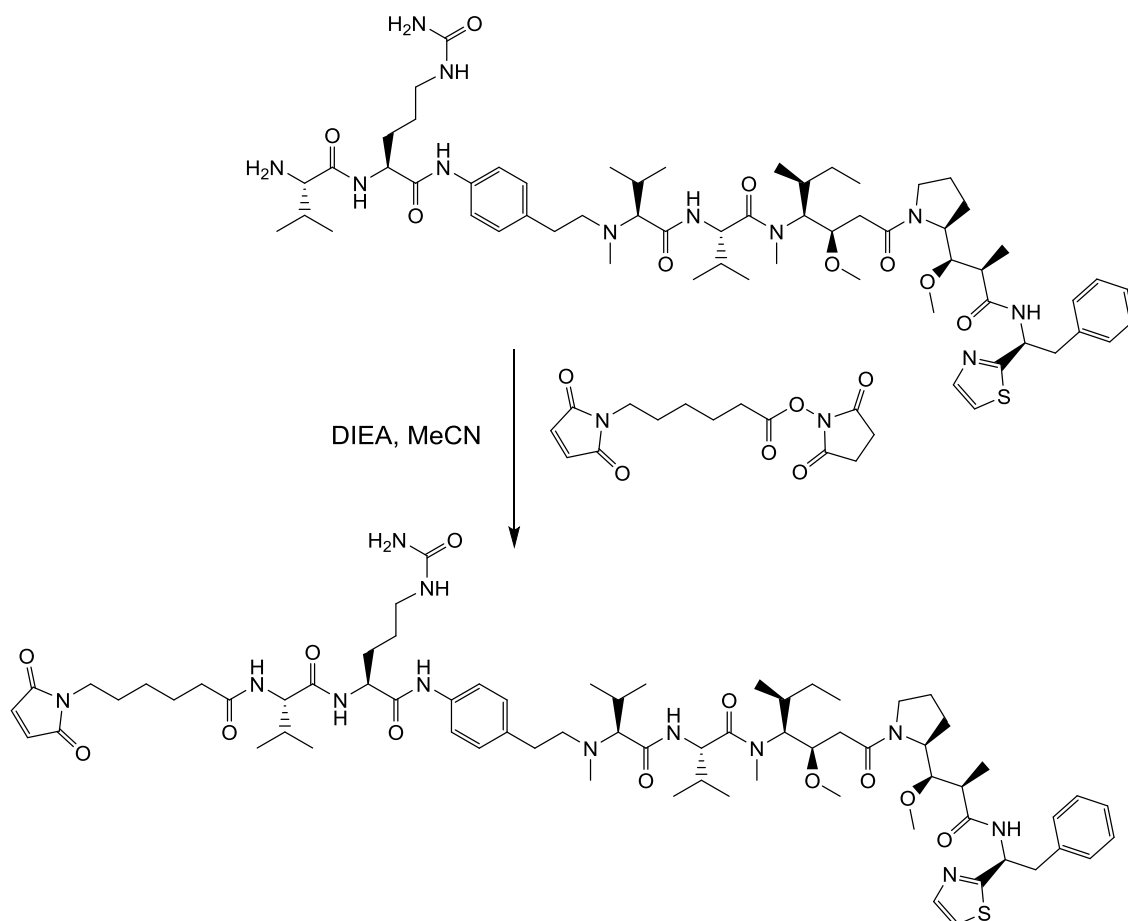
Кислоту F-61-3 (67,5 мг, 0,111 ммоль, 1,5 екв) розчиняли в безводному ДМФ (2 мл) і додавали DECP (17 мкл, 0,111 ммоль, 1,5 екв) і DIEA (39 мкл, 0,223 ммоль, 3 екв). Після перемішування протягом 15 хвилин при кімнатній температурі додавали амін 1Y (50 мг, 0,074 ммоль, 1 екв), і розчин перемішували протягом ночі. Розчинник випарювали при зниженому тиску, і залишок очищали препаративною ВЕРХ (Waters 600E, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 100 мм; елюююча фаза: вода / MeCN, забуферений 0,1% ТФО; градієнт від 5% до 100% MeCN протягом 15 хвилин; Waters 2487, детектор УФ при 220 нм). Відібрані фракції об'єднували і ліофілізували з одержанням сполуки F-61-4 у вигляді білої твердої речовини (28 мг, 28%).

Сполука F-61-5: (S)-2-((S)-2-аміно-3-метилбутанамідо)-N-(4-((3R,4S,7S,10S)-4-((S)-втор-бутил)-7,10-Діізопропіл-3-((S)-2-((1R,2R)-1-метокси-2-метил-3-оксо-3-(((S)-2-феніл-1-(тіазол-2-іл)етил)аміно)пропіл)піролідін-1-іл)-2-оксоетил)-5,11-диметил-6,9-діоксо-2-окса-5,8,11-триазатридекан-13-іл)феніл)-5-уреїдопентанаміду біс(2,2,2-трифторацетат)



Сполуку F-61-4 (28 мг, 0,021 ммоль, 1,0 екв) розчиняли в ТФО (200 мкл). Через 5 хвилин додавали воду (2 мл) і ацетонітрил (0,5 мл), і розчин ліофілізували протягом ночі з одержанням
 5 сполуки F-61-5 у вигляді безбарвного масла (38 мг, 134%).

Сполука F-61:

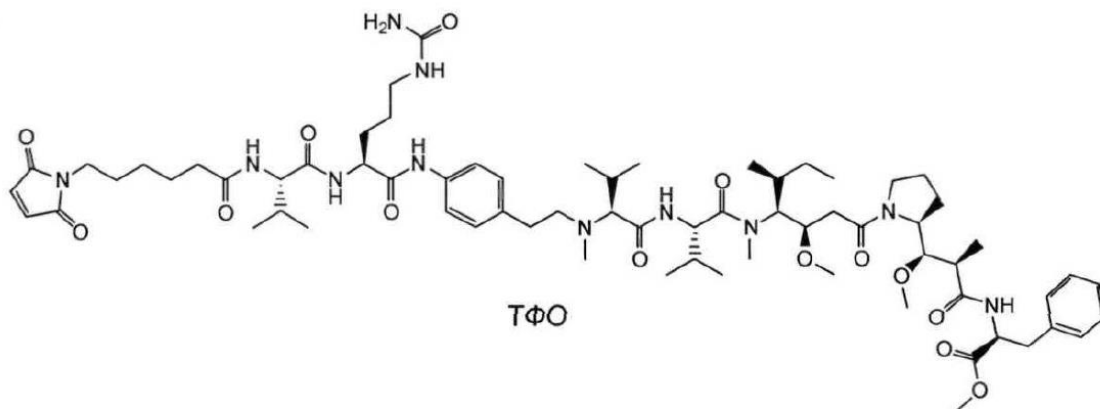


Сполуку F-61-5 (28,3 мг, 0,020 ммоль, 1 екв) розчиняли в ацетонітрилі (0,5 мл) з подальшим додаванням 2,5-діоксопіролідін-1-іл-6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексаноату (9 мг, 0,029 ммоль, 1,4 екв) і DIEA (25 мкл, 0,143 ммоль, 7 екв). Суміш перемішували протягом 4,5 годин, після чого аналіз ВЕРХ показав присутність вихідної речовини, але повне витрачання сукциніміду. Тому додавали додаткову кількість 2,5-діоксопіролідін-1-іл-6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексаноату (3 мг, 0,01 ммоль, 0,5 екв), і реакційну суміш перемішували протягом 1,5 годин. Аналіз ВЕРХ показав повне витрачання вихідної речовини. Розчинник випарювали до сухого стану, і залишок двічі розтирали з сумішшю EtOAc/Et₂O (80/20) з утворенням сполуки F-61 у вигляді білуватої твердої речовини (19,4 мг, 70%).

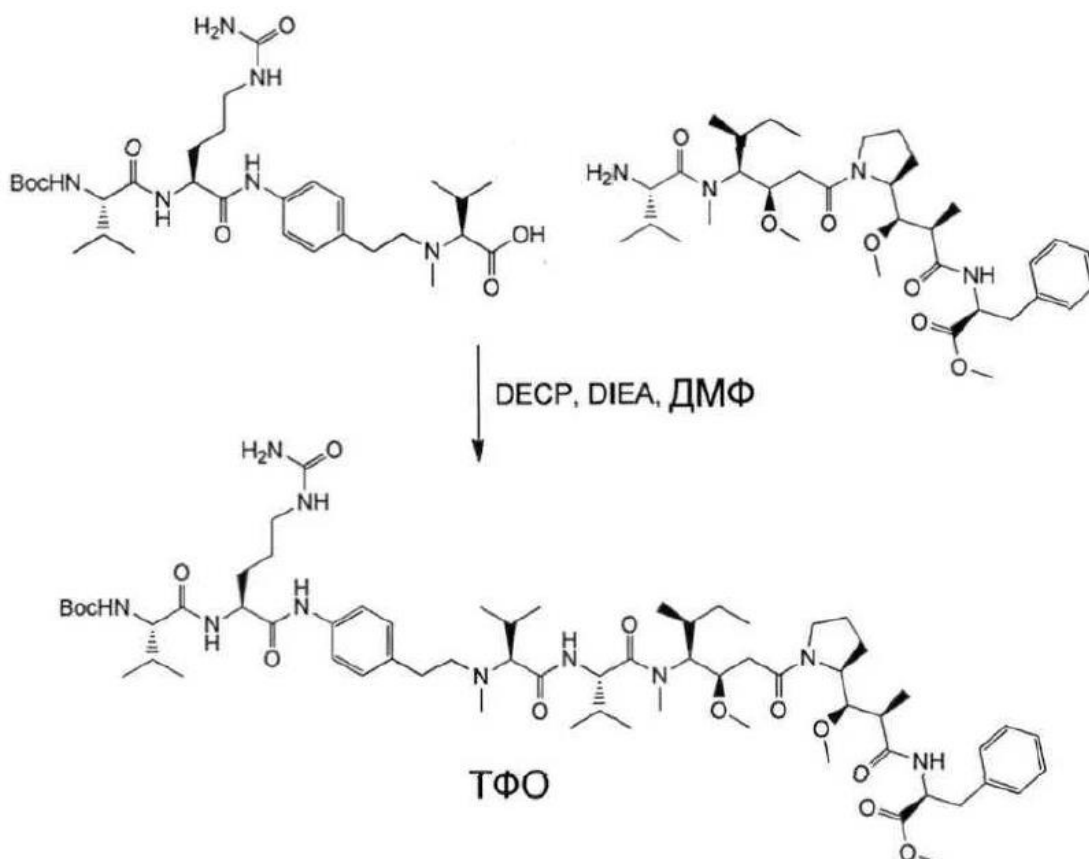
m/z (Q-TOF MC IEP+) 1361,7725 (2%, MNa⁺, C₇₀H₁₀₆N₁₂NaO₁₂S потрібно 1361,7666), 670,3961 (100%, (MH₂)²⁺, C₇₀H₁₀₈N₁₂O₁₂S потрібно 670,3960).

Сполука F-62:

метил-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамідо)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)фенетил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептаноїл)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропанол)-L-фенілаланінату 2,2,2-трифторацетат

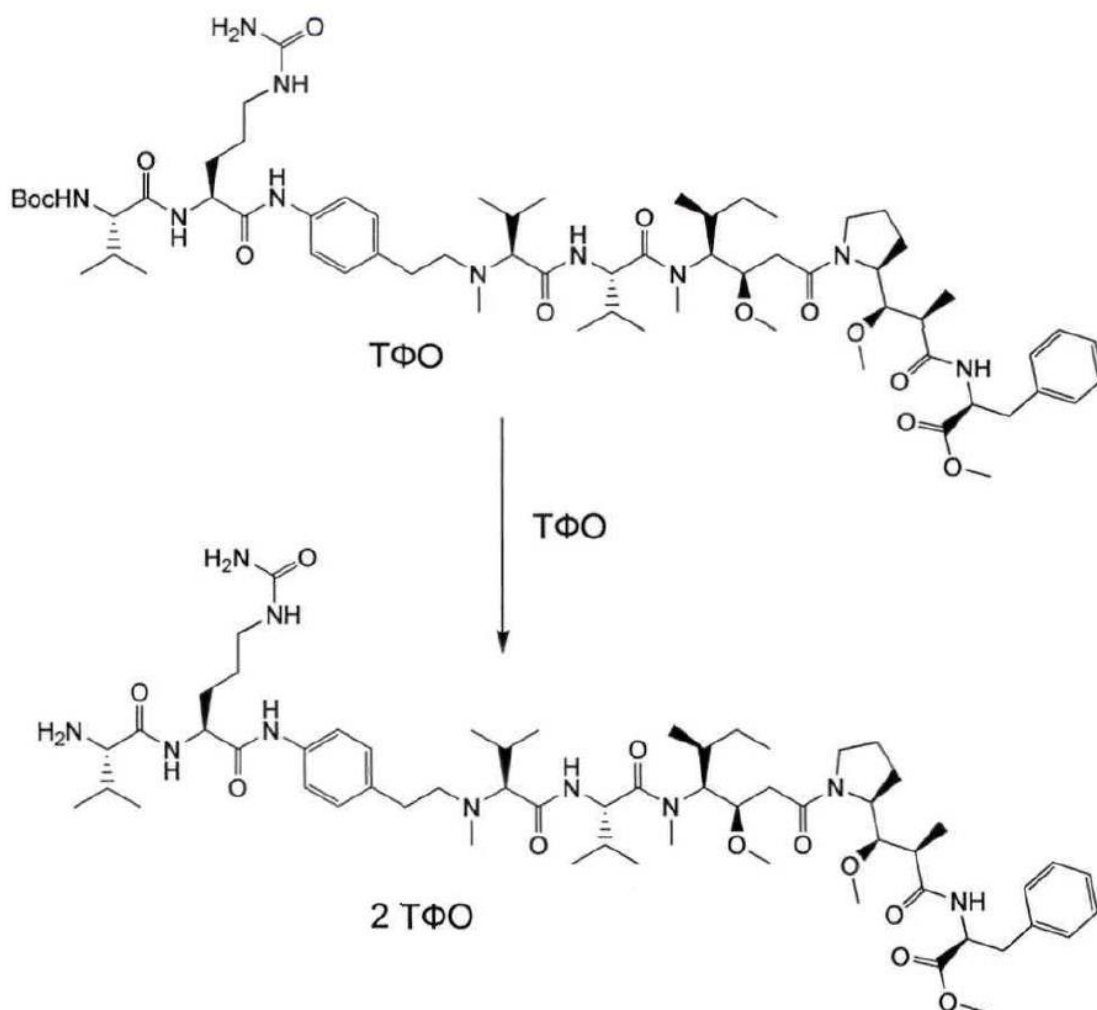


5 Сполука F-62-1: метил-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-((S)-2-((S)-2-((трет-
бутоксикарбоніл)аміно)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)фенетил) (метил)аміно)-3-
метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептанойл) піролідин-2-іл)-3-
метокси-2-метилпропаноїл)-L-фенілаланінату 2,2,2-трифторацетат



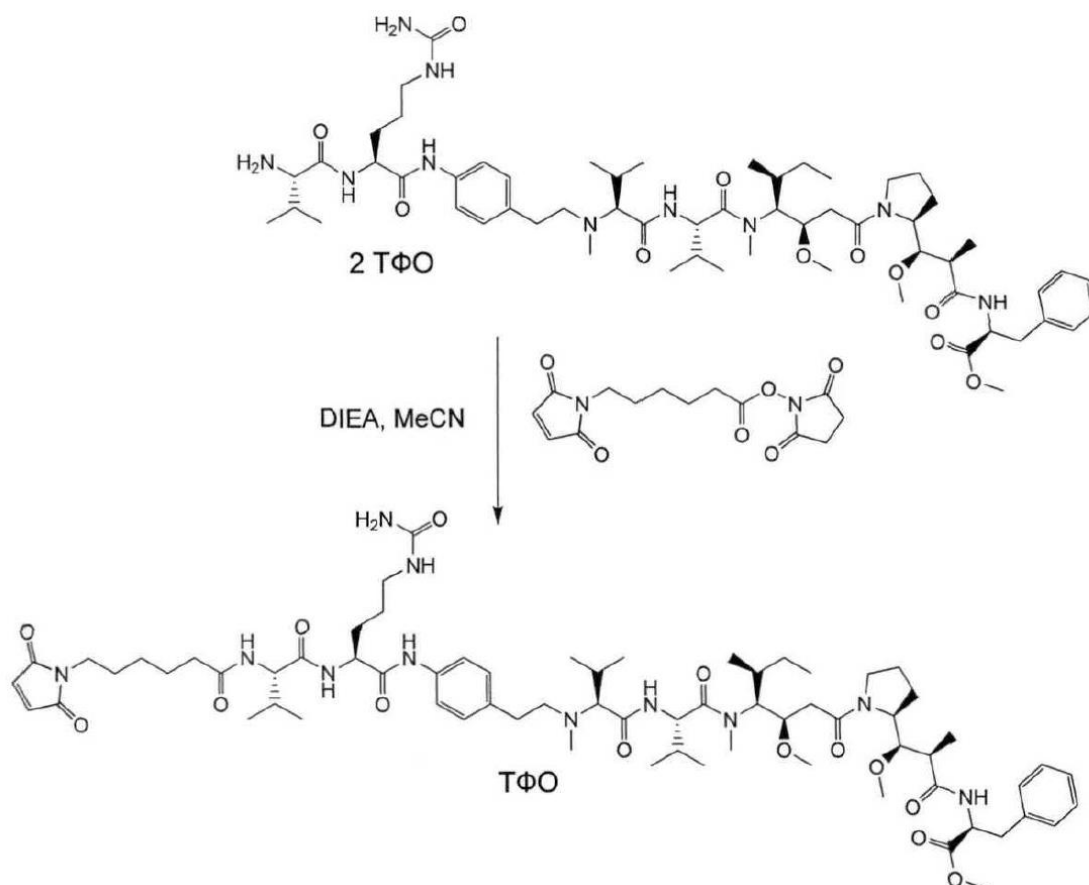
10 Сполуку F-62-1 було одержано аналогічно сполуці F-61-4 з аміну 3D (100 мг, 0,158 ммоль, 0,9 екв), кислоти F-61-3 (108 мг, 0,178 ммоль, 1 екв), DECP (41 мкл, 0,267 ммоль, 1,5 екв) і DIEA (93 мкл, 0,534 ммоль, 3 екв) в ДМФ (2 мл). Після очищення препаративною ВЕРХ сполуку F-62-1 було одержано у вигляді білої твердої речовини (93 мг, 39%).

15 Сполука F-62-2: метил-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-((S)-2-((S)-2-аміно-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)фенетил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептанойл)піролідин-2-іл)-3-метокси-2-метилпропаноїл)-L-фенілаланінату біс(2,2,2-трифторацетат)



Сполуку F-62-1 (35 мг, 0,026 ммоль, 1,0 екв) розчиняли в ТФО (200 мкл). Через 10 хвилин додавали воду (2 мл) і ацетонітрил (0,5 мл), і розчин ліофілізували протягом ночі з одержанням
 5 сполуки F-62-2 у вигляді білої твердої речовини (34 мг, 105%).

Сполука F-62:

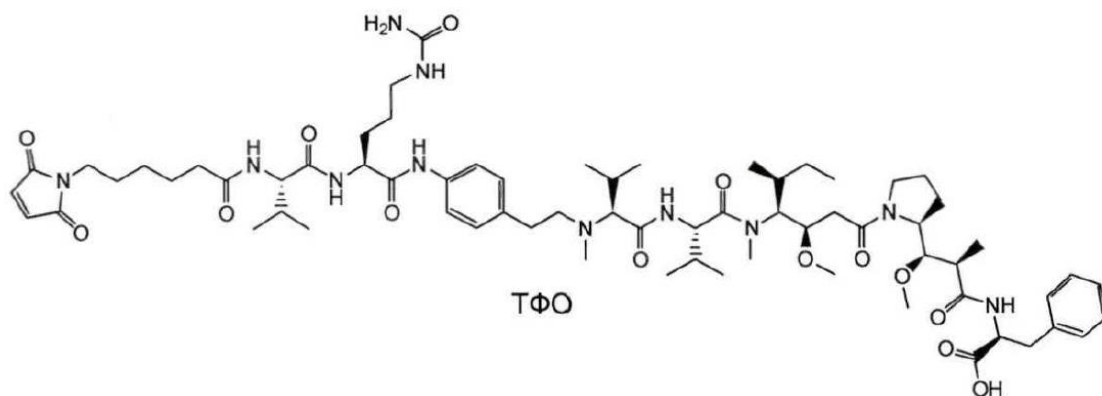


Амін F-62-2 (34 мг, 5,55 мкмоль, 1 екв) розчиняли в ацетонітрилі (3 мл). Додавали DIEA (5 мкл, 0,028 ммоль, 5 екв) і 2,5-діоксопіролідін-1-іл-6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексаноат (2 мг, 6,65 мкмоль, 1,2 екв). Аналіз ВЕРХ показав повне витрачання вихідної речовини. Розчинник випарювали до сухого стану, і залишок розтирали з сумішшю EtOAc/Et₂O (80/20). Неочищений продукт очищали препаративною ВЕРХ (Waters 600E, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 100 мм; елюююча фаза: вода / MeCN, забуферена 0,1% ТФО; градієнт від 5% до 100% MeCN в 15 хвилин; Waters 2487, детектор УФ при 220 нм). Відібрані фракції об'єднували і ліофілізували з одержанням сполуки F-62 у вигляді білої твердої речовини (5,5 мг, 13%).

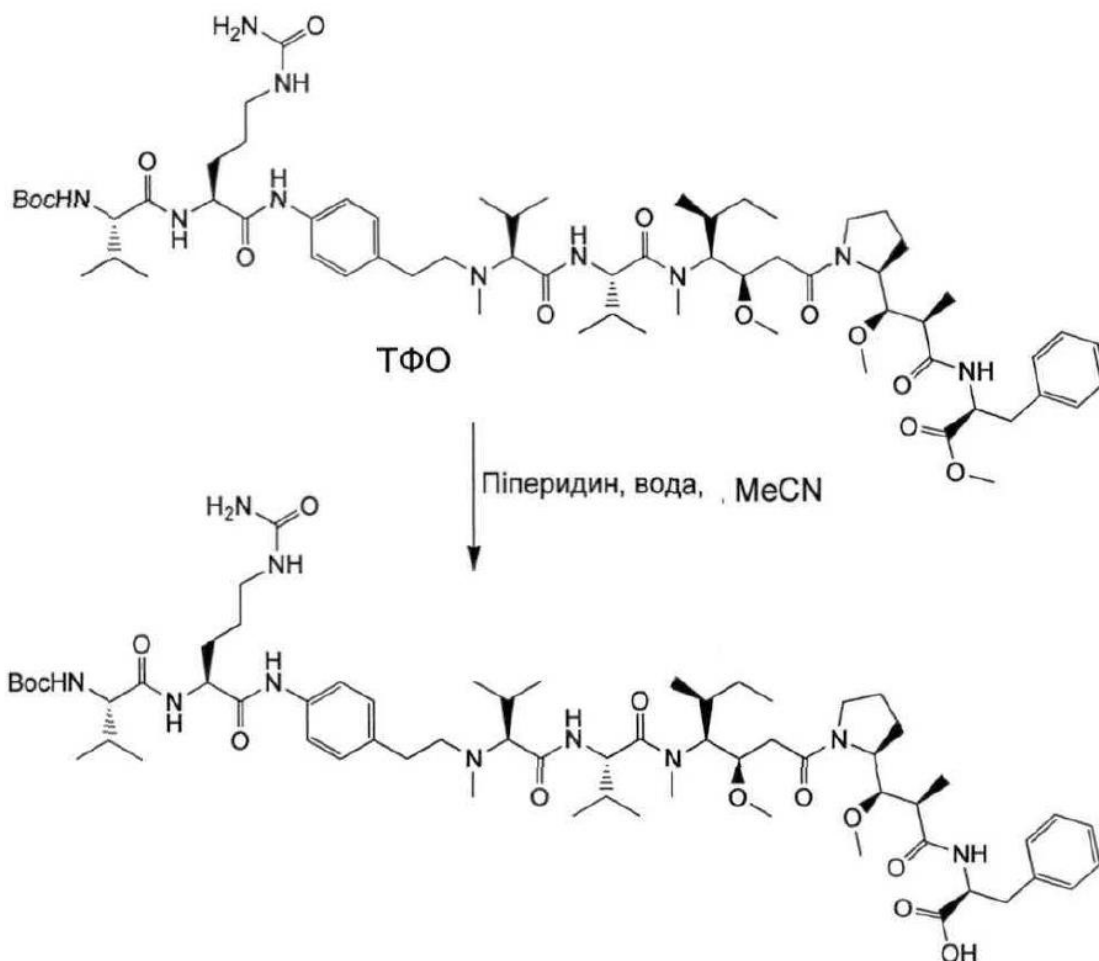
m/z (Q-TOF MS IEP+) 1336,7859 (2%, MNa⁺, C₆₉H₁₀₇N₁₁NaO₁₄ потрібно 1336,7891), 657,9073 (100%, (MH₂)²⁺, C₆₉H₁₀₉N₁₁O₁₄ потрібно 657,9072).

Сполука F-63:

((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамідо)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)фенетил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептаноїл)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропаноїл)-L-фенілаланіну 2,2,2-трифторацетат



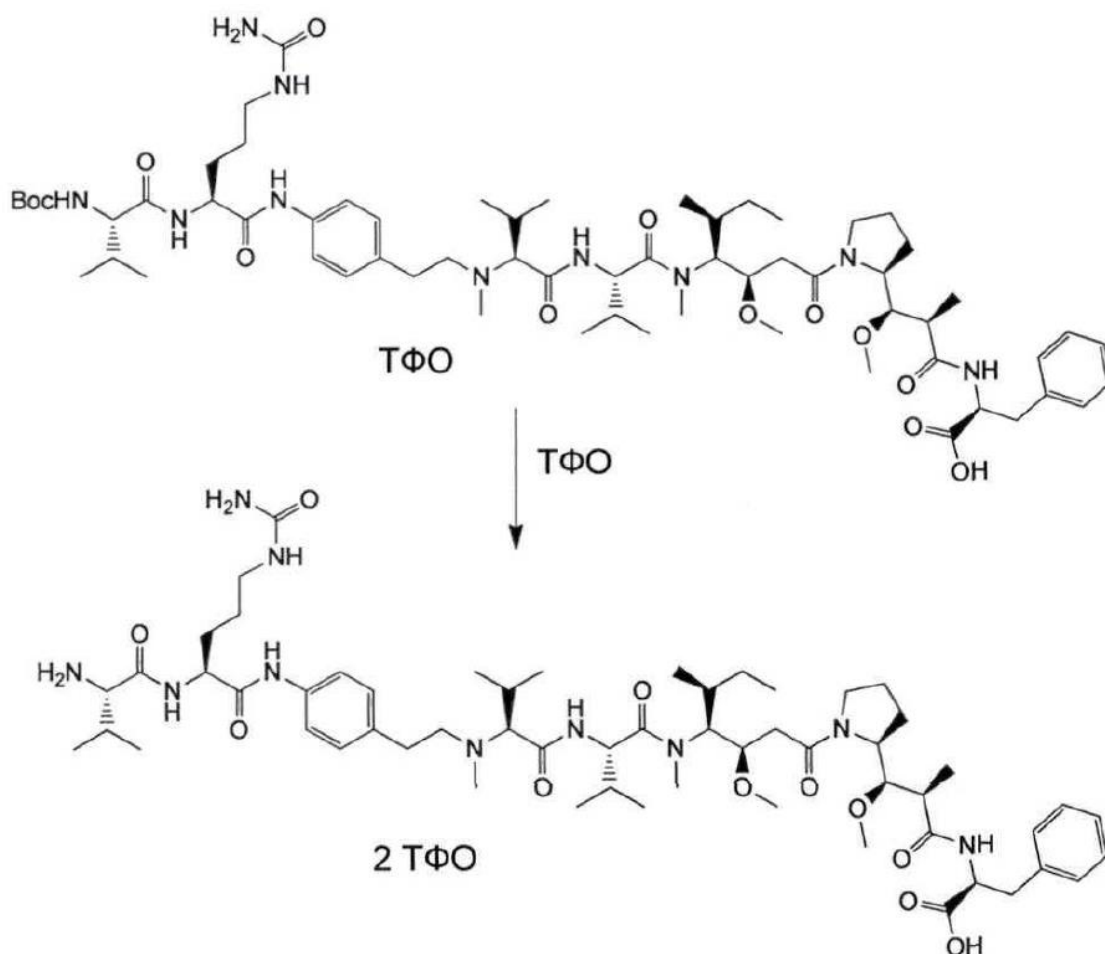
5



10

15

диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептаноїл)піролідин-2-іл)-3-метокси-2-метилпропаноїл)-
L-фенілаланіну біс-2,2,2-трифторацетат

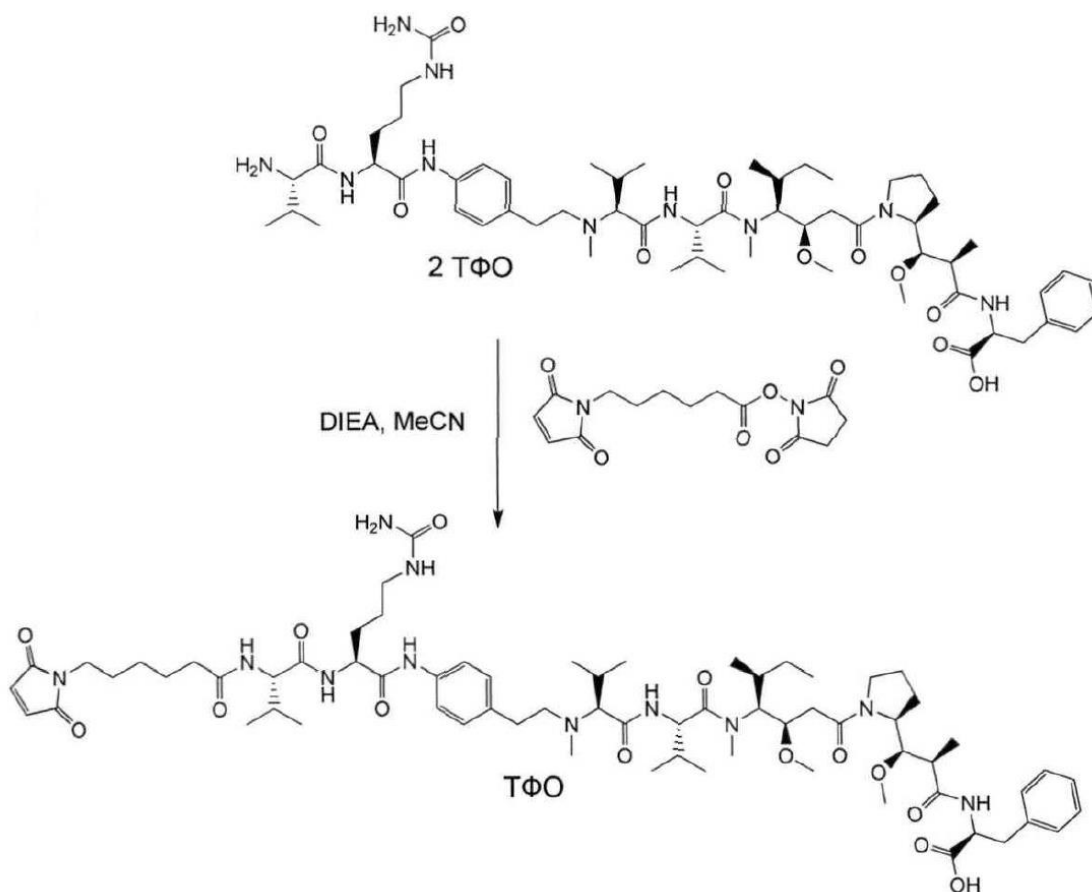


5

Сполуку F-63-1 (153 мг, 0,127 ммоль, 1,0 екв) розчиняли в ТФО (200 мкл). Через 10 хвилин додавали воду (2 мл) і ацетонітрил (0,5 мл), і розчин ліофілізували протягом ночі з одержанням сполуки F-63-2 у вигляді білої твердої речовини (34 мг, 105%).

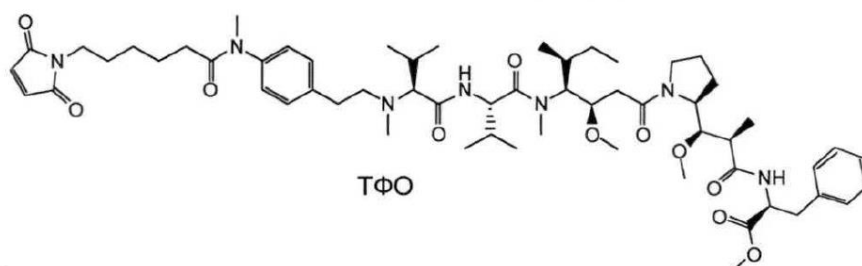
10

Сполука F-63:



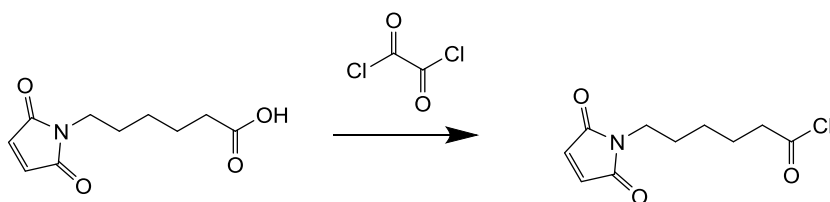
Амін F-63-2 (100 мг, 0,082 ммоль, 1 екв) розчиняли в суміші ацетонітрилу (2 мл) і ДМФ (0,5
 5 мл) і додавали 2,5-діокспіролідін-1-іл-6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексаноат (45 мг,
 0,147 ммоль, 1,8 екв) і DIEA (71 мкл, 0,409 ммоль, 5 екв). Після перемішування при кімнатній
 температурі протягом 4,5 годин розчинник випарювали при зниженому тиску. Неочищений
 продукт очищали препаративною ВЕРХ (Waters 600E, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19
 10 × 100 мм; елюююча фаза: вода / MeCN, забуферений 0,1% ТФО; градієнт від 5% до 100%
 MeCN в 15 хвилин; Waters 2487, детектор УФ при 220 нм). Відібрані фракції об'єднували і
 ліофілізували з одержанням сполуки F-63 у вигляді білої твердої речовини (42 мг, 36%).
 m/z (Q-TOF MS IEP⁺) 1300,7901 (2%, MH⁺, C₆₈H₁₀₆N₁₁O₁₄ потрібно 1300,7915), 650,8990
 (100%, (MH₂)²⁺, C₆₈H₁₀₇N₁₁O₁₄ потрібно 650,8994).

Сполука G-12
 15 метил-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((4-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-
 іл)-N-метилгексанамідо)фенетил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-
 метокси-5-метилгептаноїл)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропаноїл)-L-фенілаланінату 2,2,2-
 трифторацетат

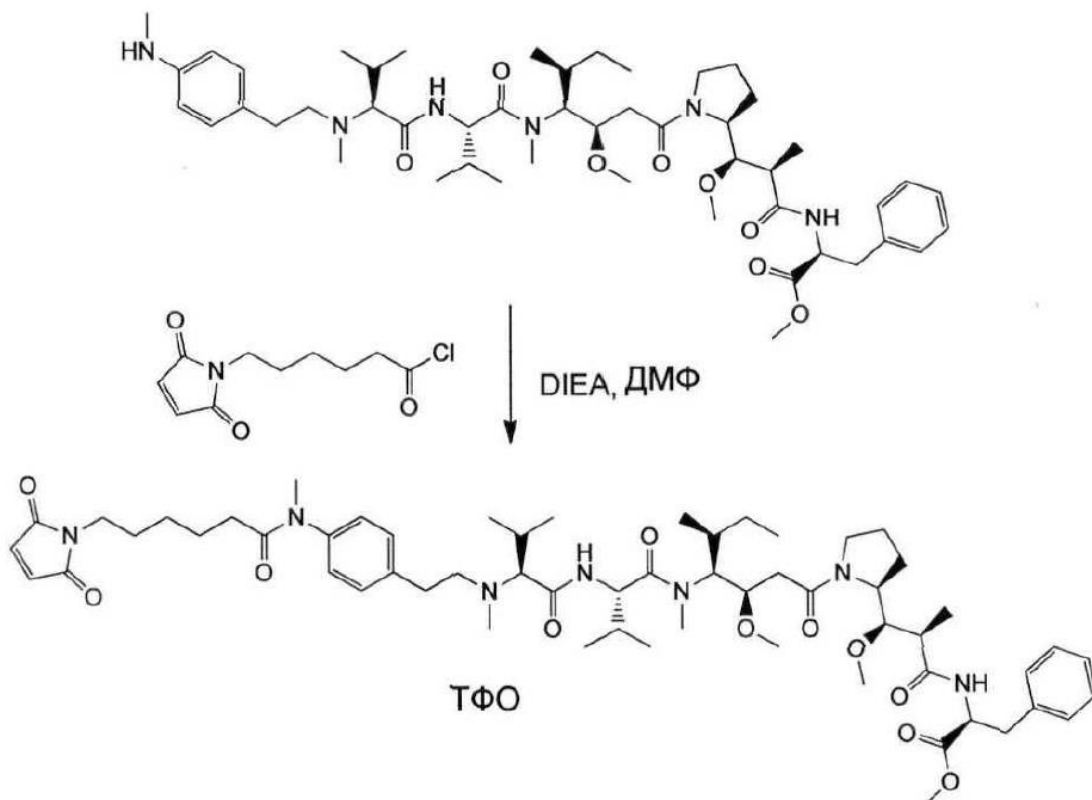


20

Сполука G-12-1: дигідрохлорид бензил-N-(4-амінофенетил)-N-метил-L-валінату



- В оксалілхлориді (3 мл) розчиняли 6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1Н-пірол-1-іл)гексанову кислоту (200 мг, 0,947 ммоль, 1 екв). Розчин перемішували при кімнатній температурі протягом 5 годин, після чого випарювали до сухого стану при зниженому тиску. Сполуку G-12-1 було одержано у вигляді бежевої твердої речовини (217 мг, 100%) і використано в наступній стадії без очищення.
- Сполука G-12:

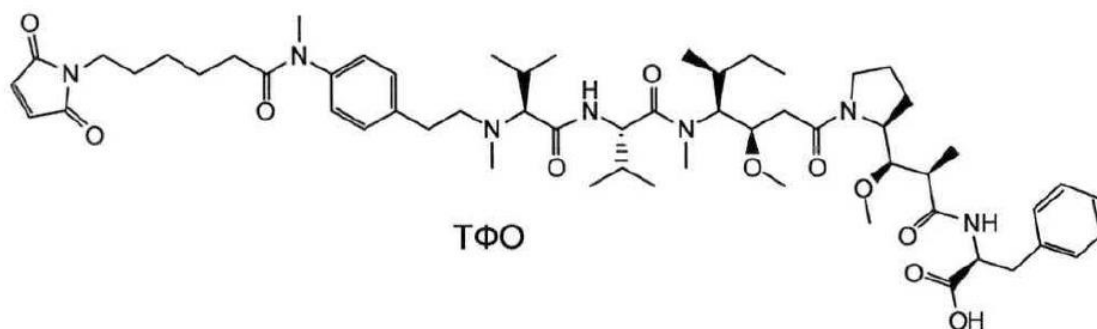


- Анілін 12 (40 мг, 0,045 ммоль, 1 екв) розчиняли в безводному ДХМ (1 мл) при 0 °С і додавали DIEA (8 мкл, 0,045 ммоль, 1 екв). Після перемішування протягом 30 хвилин вводили розчин сполуки G-12-1 (10 мг, 0,45 ммоль, 1 екв) в безводному ДХМ (1 мл), і реакційну суміш перемішували протягом 1 години при 0 °С. Суміш розбавляли ДХМ (25 мл) і двічі промивали водою (20 мл), один раз соляним розчином (10 мл). Органічну фазу висушували над Na₂SO₄, фільтрували і випарювали при зниженому тиску з одержанням неочищеного продукту у вигляді світло-коричневої твердої речовини (54 мг). Цей продукт очищали флеш-хроматографією на силікагелі (ДХМ/MeOH), а потім препаративною ВЕРХ (Waters 600E, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 100 мм; елююча фаза: вода / MeCN, забуферена 0,1% ТФО; градієнт від 5% до 100% MeCN в 15 хвилин; Waters 2487, детектор УФ при 220 нм). Виділений продукт ліофілізували з одержанням білої твердої речовини (23 мг), яку піддавали переочищенню препаративною ВЕРХ, і відібрані фракції об'єднували і ліофілізували з одержанням сполуки G-12 у вигляді білої твердої речовини (9 мг, 16 %).
- m/z (Q-TOF MS IEP⁺) 1094,6543 (20%, MNa⁺, C₅₉H₈₉N₇NaO₁₁ потрібно 1094,6512), 1072,6722 (16%, MH⁺, C₅₉H₉₀N₇O₁₁ потрібно 1072,6693), 536,8358 (100%, (MH₂)²⁺, C₅₉H₉₁N₇O₁₁ потрібно 536,8383).

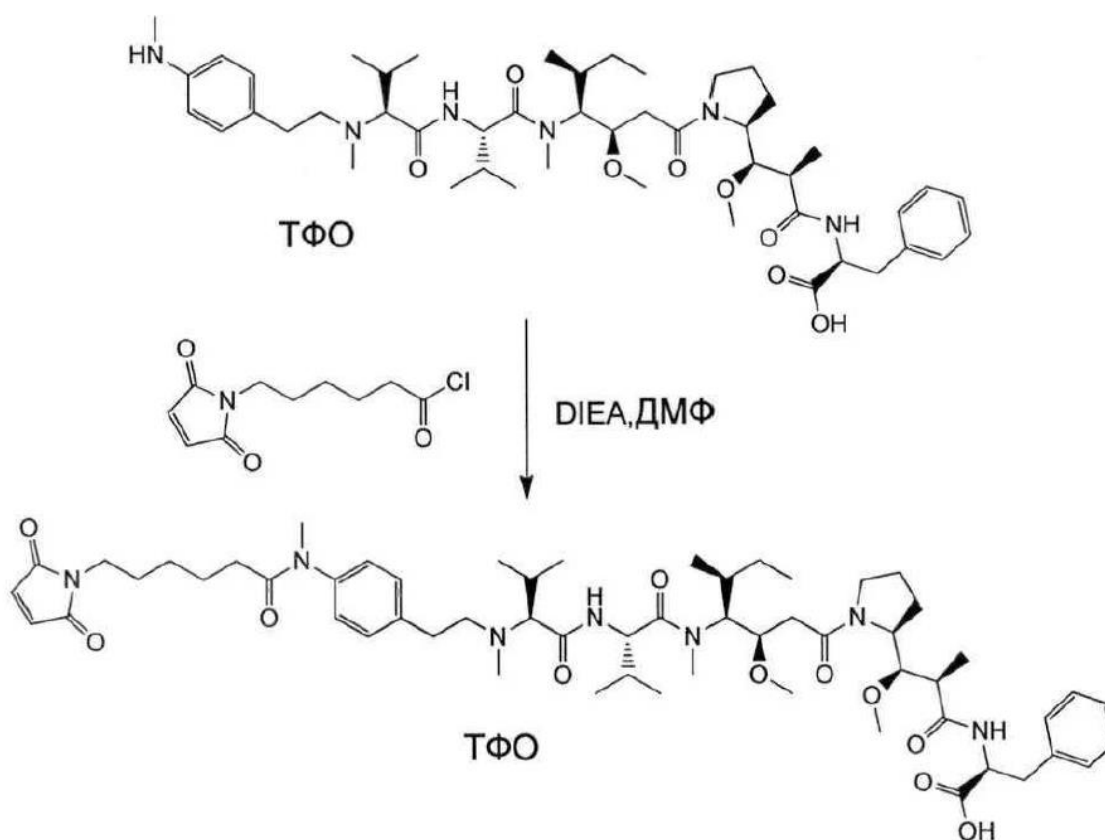
Сполука G-13

((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-((4-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1Н-пірол-1-іл)-N-метилгексанамідо)фенетил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-метилгептаноїл)піролідін-2-іл)-3-метокси-2-метилпропаноїл)-L-феніланіну 2,2,2-

трифторацетат



5 Сполука G-13:



Анілін 13 (15 мг, 0,015 ммоль, 1 екв) розчиняли в безводному ДХМ (1,5 мл) при 0 °С і додавали DIEA (8 мкл, 0,046 ммоль, 3 екв). Вводили розчин сполуки G-12-1 (3,5 мг, 0,046 ммоль, 1 екв) в безводному ДХМ (0,5 мл), і реакційну суміш перемішували протягом 1,5 годин при 0 °С. Розчинник випарювали при зниженому тиску, і сирий продукт очищали препаративною ВЕРХ (Waters 600E, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 100 мм; елюююча фаза: вода / MeCN, забуферена 0,1% ТФО; градієнт від 5% до 100 % MeCN протягом 15 хвилин; Waters 2487, детектор УФ при 220 нм). Відібрані фракції об'єднували і ліофілізували з одержанням сполуки G-13 у вигляді білої твердої речовини (11,4 мг, 62%).

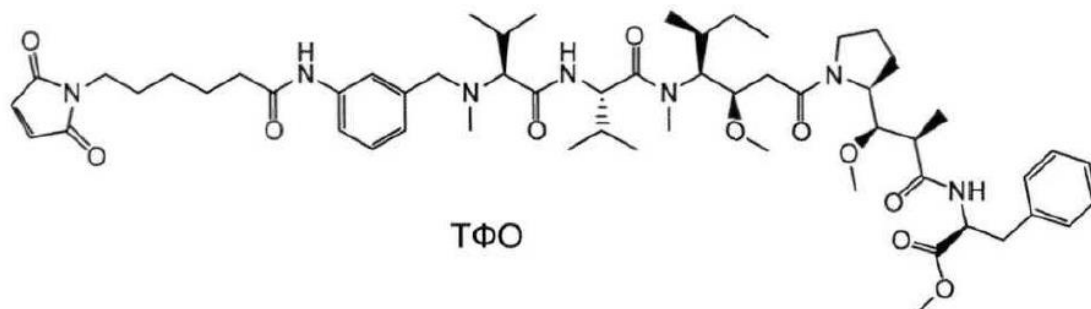
m/z (Q-TOF MS IEP+) 1058,6510 (30%, MH⁺, C₅₈H₈₈N₇O₁₁ потрібно 1058,6536), 529,8285 (100%, (MH₂)²⁺, C₅₈H₈₉N₇O₁₁ потрібно 529,8305).

Сполука G-15

метил-((2R,3R)-3-((S)-1-((3R,4S,5S)-4-((S)-2-((S)-2-((3-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамідо)бензил)(метил)аміно)-3-метилбутанамідо)-N,3-диметилбутанамідо)-3-метокси-5-

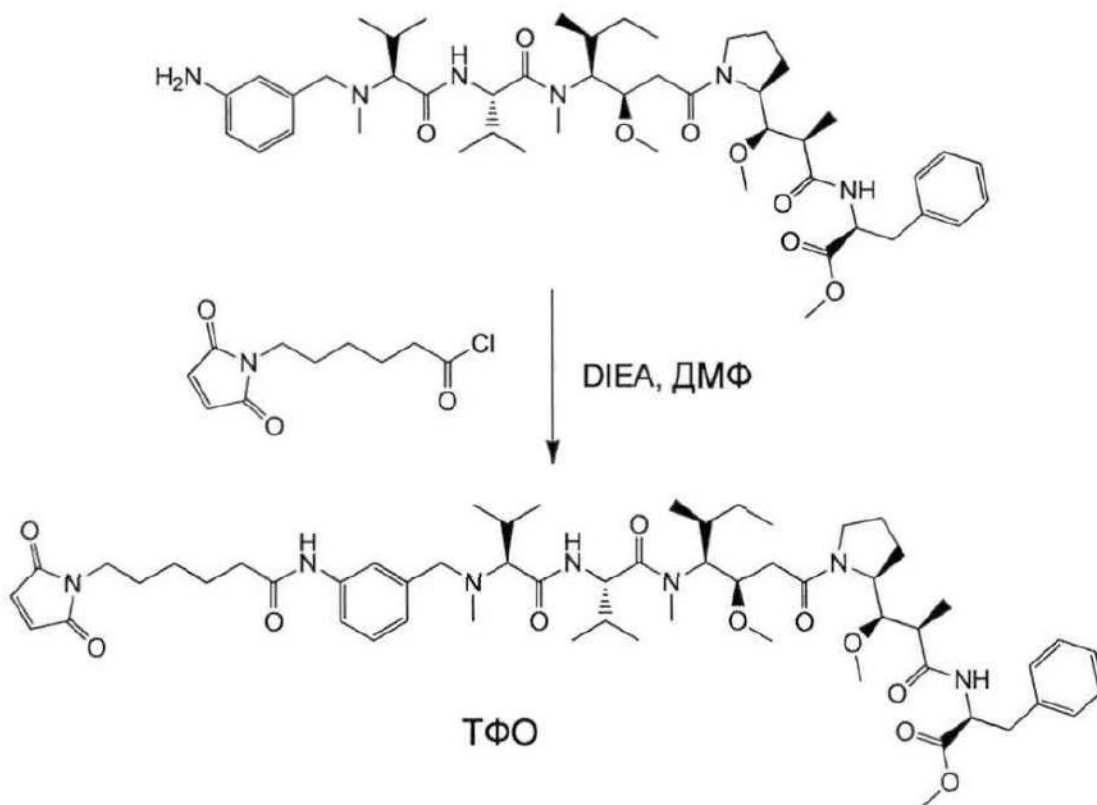
метилгептаноїл)піролідин-2-іл)-3-метокси-2-метилпропаноїл)-L-фенілаланінату
трифторацетат

2,2,2-



5

Сполука G-15:



10 Анілін 15 (40 мг, 0,047 ммоль, 1 екв) розчиняли в сухому ДХМ (2 мл) при 0 °С і додавали
DIEA (10 мкл, 0,056 ммоль, 1,2 екв). Вводили розчин сполуки G-12-1 (108 мг, 0,47 ммоль, 10 екв)
в сухому ДХМ (1 мл), і реакційну суміш перемішували протягом 1,5 годин при 0 °С. Суміш
розбавляли ДХМ (10 мл) і двічі промивали водою (5 мл). Органічну фазу висушували над
15 MgSO₄, фільтрували і випарювали при зниженому тиску з одержанням неочищеного продукту у
вигляді бежевої твердої речовини (54 мг). Цей продукт очищали препаративною ВЕРХ (Waters
600E, колонка SunFire Prep C18 OBD, 5 мкм, 19 × 100 мм; елююча фаза: вода / MeCN,
забуферена 0,1% ТФО; градієнт від 5% до 100% MeCN в 15 хвилин; Waters 2487, детектор УФ
при 220 нм). Відібрані фракції об'єднували і ліофілізували з одержанням сполуки G-15 у вигляді
білої твердої речовини (27 мг, 50%).

20 m/z (Q-TOF MS IEP+) 1066,6517 (2%, MNa⁺, C₅₇H₈₅N₇NaO₁₁ потрібно 1066,6199), 522,8224
(100%, (MH₂)²⁺, C₅₇H₈₇N₇O₁₁ потрібно 522,8226).

Приклад 17: Синтез, очищення і характеристика ADC

Описана нижче методика застосовна до химерних і гуманізованих форм IgG1. Необхідно

розуміти, що для інших форм, таких як IgG2, IgG4 і т.д., фахівець в даній області техніки здатний адаптувати цю методику з використанням загальних знань.

Антитіла (1-5 мг/мл) частково відновлювали гідрохлоридом трис(2-карбоксietил)фосфіну (ТСЕР) в 10 мм боратному буфері pH 8,4, що містить 150 мМ NaCl і 2 мМ ЕДТА, протягом 2 г при 37 °С. Як правило, для одержання цільових відносин лікарського засобу до антитіла (DAR) близько 4 відповідно використовували 2,5-3 молярних еквіваленти ТСЕР. Часткове відновлення антитіла підтверджували аналізом в ДСН-ПААГ електрофорезі в невідновлювальних умовах. Перед сполученням угрупування лінкер-лікарський засіб з вивільненими міжланцюговими залишками цистеїну відновлену суміш залишали охолоджуватися до кімнатної температури. Потім концентрацію антитіла доводили до 1 мг/мл 10 мМ боратним буфером pH 8,4, що містить 150 мМ NaCl і 2 мМ ЕДТА, і додавали 5-кратний молярний надлишок лікарського засобу до антитіла з 10 мМ розчину в диметилсульфоксиді (ДМСО). Кінцеву концентрацію ДМСО доводили до 10% для підтримки розчинності лікарського засобу у водному середовищі в процесі сполучення. Реакцію проводили протягом 1 г при кімнатній температурі. Надлишок лікарського засобу гасили додаванням 1,5 моль N-ацетилцистеїну на моль лікарського засобу та інкубації протягом 1 г при кімнатній температурі. Після діалізу проти 25 мМ His буфера pH 6,5, що містить 150 мМ NaCl, протягом ночі при 4 °С кон'югат антитіла з лікарськими препаратами очищали шляхом використання способів, відомих фахівцям в даній області техніки, заснованих на комерційних хроматографічних колонках і ультрафільтраційних пристроях. Спочатку незв'язаний лікарський засіб і агрегати ADC видаляли за допомогою ексклюзивної хроматографії (EX) на колонці S200 (GE Life Sciences) або TSK G3000 SW (Tosoh). Потім очищені мономери ADC концентрували до 2-3 мг/мл за допомогою ультрафільтрації на фільтраційних пристроях з номінальним відсіканням по молекулярній масі (HOMM) 30 або 50 кДа або афінної хроматографії на білку А. Очищені ADC зберігали при 4 °С після стерилізації фільтруванням на фільтрах 0,2 мкм. Далі їх аналізували шляхом електрофорезу в ДСН-ПААГ в відновлювальних і в невідновлювальних умовах для підтвердження кон'югації лікарського засобу та шляхом хроматографії на EX або аналітичних колонках S200 або TSK G3000 SWXL для визначення вмісту мономерів і агрегованих форм. Концентрації білка визначали шляхом кількісного аналізу з використання біцінхонінової кислоти (БЦК) з IgG в якості стандарту. DAR оцінювали для кожного очищеного ADC за допомогою ГІХ і РХ-МС. Як правило, вміст агрегованих форм був нижче 5%, і DAR становило від 3,5 до 5.

Приклад 18: Аналіз цитотоксичності антитіл IGF-1R, кон'югованих з різними лікарськими засобами

18.1 Оцінка химерних антитіл на клітинах MCF-7

Було показано, що п'ять антитіл до IGF-1R зазнають швидку інтерналізацію в лізосомах і мають низьку зв'язуючу здатність в кислих середовищах. У зв'язку з цим дані Ab володіли всіма властивостями для використання в складі ADC. Таким чином, п'ять химерних антитіл до IGF-1R піддавали сполученню з трьома різними сполуками (G-13; E-13 і F-63). Відношення лікарського засобу до антитіла цих ADC становило близько 4. З метою оцінки неспецифічної токсичності нерелевантне химерне антитіло c9G4 також піддавали сполученню з цими сполуками при таких же DAR. Клітини MCF-7 інкубували зі зростаючими концентраціями кожного ADC при 37 °С протягом 6 днів в повному культуральному середовищі. Життєздатність клітин оцінювали, використовуючи кількісне визначення життєздатності клітин за допомогою люмінесцентного аналізу (CellTiter-Glo, Promega). Люмінесцентний сигнал зчитували з використання планшет-рідера Mithras (Berthold Technologies). Нерелевантне химерне антитіло c9G4, кон'юговане з будь-яким з E-13, G-13 або F-63, не проявляло або проявляло помірну цитотоксичну активність на клітинах MCF-7 (Фіг. 21). Навпаки, при додаванні всіх інших ADC, одержаних в результаті сполучення антитіл до IGF-1R з будь-яким з E-13, G-13 або F-63, життєздатність клітин MCF-7 різко знижувалася.

18.2 Оцінка химерних антитіл на нормальних клітинах

Рівні експресії IGF-1R оцінювали на первинній культурі нормальних клітин (PromoCell GmbH) з використання c208F2 mAb. З цією метою клітини ($0,5 \times 10^6$ клітин/мл) інкубували з 10 мкг/мл антитіла c208F2 протягом 20 хв при 4 °С в буфері FACS (ФСБ, 0,1% БСА, 0,01% NaN₃). Потім їх промивали 3 рази та інкубували з відповідним другим антитілом, пов'язаним з Alexa 488, протягом 20 додаткових хвилин при 4 °С в темряві, після чого промивали 3 рази в буфері FACS. Зв'язування антитіл до IGF-1R відразу проводили на життєздатних клітинах, які ідентифікували, використовуючи пропідію йодид (який забарвлює мертві клітини). Рівень експресії (Bmax) на нормальних клітинах (таблиця 14) був низьким у порівнянні з експресією IGF-1R на клітинах MCF-7 (див. Приклад 2, таблиця 8).

Таблиця 14

Нормальні клітини	Bmax
Ендотеліальні клітини аорти людини (HAoEC)	21
Ендотеліальні клітини мікросудин легень людини (HPMEC)	33
Гладком'язові клітини бронхів людини (HBSMC)	26
Епітеліальні клітини нирок людини (HREpC)	110
Уротеліальні клітини людини (HUC)	181

Цитотоксичність ADC c208F2-G-13 оцінювали на нормальних клітинах. Клітини інкубували зі зростаючими концентраціями c208F2-G-13 при 37 °C протягом 6 днів в повному культуральному середовищі. Життєздатність клітин оцінювали, використовуючи кількісне визначення життєздатності клітин за допомогою люмінесцентного аналізу (CellTiter-Glo, Promega). Люмінесцентний сигнал зчитували з використанням планшет-рідера Mithras (Berthold Technologies). На HBSMC, HPMEC, HAoEC і HREpC значної цитотоксичності не спостерігали (Фіг. 25). Незначна цитотоксичність була виміряна тільки на клітинах HUC при високих концентраціях c208F2-G-13.

18.3 Оцінка гуманізованих варіантів hz208F2

Шістнадцять гуманізованих варіантів 208F2 піддавали сполученню із сполукою G-13. Відношення лікарського засобу до антитіла цих ADC становило близько 4. З метою оцінки неспецифічної токсичності нерелевантне химерне антитіло c9G4 також піддавали сполученню з цими сполуками при таких же DAR. Химерне антитіло c208F2 також піддавали сполученню з G-13. Клітини MCF-7 інкубували зі зростаючими концентраціями кожного ADC при 37 °C протягом 6 днів в повному культуральному середовищі. Життєздатність клітин оцінювали, використовуючи кількісне визначення життєздатності клітин за допомогою люмінесцентного аналізу (CellTiter-Glo, Promega). Люмінесцентний сигнал зчитували з використанням планшет-рідера Mithras (Berthold Technologies). Нерелевантне химерне антитіло c9G4, кон'юговане з G-13, не проявляло або проявляло помірну цитотоксичну активність на клітинах MCF-7 (Фіг. 26). Навпаки, при додаванні всіх інших ADC, одержаних в результаті сполучення антитіл до IGF-1R з G-13, життєздатність клітин MCF-7 різко знижувалася. Здатність шістнадцяти гуманізованих варіантів до індукції клітинної цитотоксичності була щонайменше еквівалентною або навіть кращою в порівнянні з певною для химерної форми c208F2-G-13, як показано в таблиці 15 і проілюстровано для одного гуманізованого варіанту на Фіг. 26.

Таблиця 15

Химерні mAb	C208F2-G-13	EC50
	H208F2 (H026/L024)-G-13	9,0E-11
	hz208F2 (H037/L018)-G-13	1,1E-10
	hz208F2 (H047/L018)-G-13	3,7E-11
	hz208F2 (H049/L018)-G-13	4,4E-11
	hz208F2 (H051/L018)-G-13	6,6E-11
	hz208F2 (H052/L018)-G-13	3,6E-11
	hz208F2 (H057/L018)-G-13	3,4E-11
	hz208F2 (H068/L018)-G-13	5,2E-11
	hz208F2 (H070/L018)-G-13	6,2E-11
	hz208F2 (H071/L018)-G-13	5,7E-11
	hz208F2 (H076/L018)-G-13	8,5E-11
	hz208F2 (H077/L018)-G-13	5,3E-11
	hz208F2 (H037/L021)-G-13	3,0E-11
	hz208F2 (H049/L021)-G-13	3,9E-11
	hz208F2 (H052/L021)-G-13	5,2E-11
	hz208F2 (H076/L021)-G-13	3,7E-11
Гуманізовані варіанти	hz208F2 (H076/L021)-G-13	4,5E-11

Приклад 19: Активність in vivo антитіла c208F2, кон'югованого з будь-якою з сполук E-13, G-13 або F-63 в моделі ксенотрансплантата MCF-7

З метою підтвердження, що ефективність c208F2 в поєднанні з сполуками G-13, E-13 або F-63 in vitro може бути трансльована in vivo, їх тестували в моделі ксенотрансплантата MCF-7.

Методи роботи з тваринами виконували у відповідності з керівними принципами Директиви 2010/63/ЕС щодо захисту тварин, що використовуються в наукових цілях. Протокол був схвалений Комітетом з контролю етичних норм поводження з тваринами інституту Pierre Fabre. П'ять мільйонів клітин MCF-7 ін'єктували підшкірно 7-тижневим мишам лінії Swiss/Nude.

5 Перед ін'єкцією клітин в лівий бік мишей імплантували пелети естрогену (Innovative Research of America), необхідного для росту *in vivo* пухлин MCF-7.

Через двадцять днів після імплантації MCF-7, коли пухлини досягали середнього розміру 120-150 мм³, тварин ділили на групи по 5 мишей відповідно до розміру і аспектом пухлини. Різні препарати вводили шляхом інтраперитонеальних ін'єкцій. Стан здоров'я тварин контролювали щодня. Обсяг пухлини вимірювали два рази на тиждень за допомогою електронного циркуля до кінця дослідження. Обсяг пухлини обчислюють за такою формулою: $\pi/6 \times \text{довжина} \times \text{ширина} \times \text{висота}$. Токсичність оцінювали шляхом спостереження за масою тіла тварин три рази на тиждень. Статистичні аналізи проводили для кожного показника за допомогою критерію Уїлкоксона-Манна-Уїтні. Всі сполуки ін'єктували інтраперитонеально (i.p.). В даному Прикладі протипухлинна активність c208F2 mAb в сполученні з будь-яким з E-13, F-13 або F-63 при DAR близько 4 оцінювали після 2 ін'єкцій дози 7 мг/кг при D20 і D27 (Фіг. 22A, 22B і 22C). Паралельно блоковані угруповання лікарського засобу E-13, F-13 і F-63 ін'єктували в еквівалентній дозі, що відповідає дозі 7 мг/кг c208F2-E-13, c208F2-F-13 і c208F2-F-63 DAR близько 4.

Ін'єкція будь-якого з c208-E-13 (Фіг. 22A), c208F2-G-13 (Фіг. 22B) або c208F2-F-63 (Фіг. 22C) приводила до значного інгібування і навіть індукції повної регресії зростання пухлини (p менше 0,05 в порівнянні з відповідним блокованим лікарським засобом). Статистично значна відмінність активності c208-E-13, c208F2-G-13 і c208F2-F-63 не була відзначена. Блоковані лікарські засоби не чинили впливу на ріст пухлини MCF-7 ($p > 0,05$ у порівнянні з контрольною групою).

25 Друга серія експериментів була проведена з c208F2, кон'югованим або з E-13, або з G-13 і з нерелевантним антитілом c9G4, кон'югованим або з E-13, або з G-13, в моделі ксенотрансплантата MCF-7, як описано вище. Мишам ін'єктували i.p. 7 мг/кг кожного ADC при D20 і D27 (Фіг. 23A і 23B).

Ін'єкція обох c9G4-E-13 і c9G4-F-13 надавала помірний і транзиторий вплив на ріст пухлин ксенотрансплантата MCF-7. Проте, цей другий експеримент підтвердив, що ін'єкції або c208-E-13, або c208F2-G-13 призводять до індукції повної регресії D43, що показує високу протипухлинну активність ADC.

Приклад 20: Активність *in vivo* антитіла h208F2, кон'югованого із сполукою G-13, в моделі ксенотрансплантата 3⁺ MCF-7

35 Гуманізовані форми 208F2 в сполученні із сполукою G-13 оцінили *in vivo* в моделі ксенотрансплантата MCF-7.

Методи роботи з тваринами виконували у відповідності з керівними принципами Директиви 2010/63/ЕС щодо захисту тварин, що використовуються в наукових цілях. Протокол був схвалений Комітетом з контролю етичних норм поводження з тваринами інституту Pierre Fabre. П'ять мільйонів клітин MCF-7 ін'єктували підшкірно 7-тижневим мишам лінії Swiss/Nude. Перед ін'єкцією клітин в лівий бік мишей імплантували пелети естрогену (Innovative Research of America), необхідного для росту *in vivo* пухлин MCF-7.

Через двадцять днів після імплантації MCF-7, коли пухлини досягали середнього розміру 120-150 мм³, тварин ділили на групи по 6 мишей відповідно до розміру і аспектом пухлини. Різні препарати вводили шляхом інтраперитонеальних ін'єкцій по протоколу 4 ін'єкцій: одна ін'єкція один раз в чотири дні (Q4d4). Стан здоров'я тварин контролювали щодня. Обсяг пухлини вимірювали два рази на тиждень за допомогою електронного циркуля до кінця дослідження. Обсяг пухлини обчислюють за такою формулою: $\pi/6 \times \text{довжина} \times \text{ширина} \times \text{висота}$. Токсичність оцінювали шляхом спостереження за масою тіла тварин три рази на тиждень. Статистичні аналізи проводили для кожного показника за допомогою критерію Уїлкоксона-Манна-Уїтні. Всі сполуки ін'єктували інтраперитонеально (i.p.). В даному Прикладі протипухлинну активність c208F2 mAb, кон'югованого з сполукою G-13, порівнювали з різними гуманізованими формами, також кон'югованими з G-13 (Фіг. 27). Протестовані гуманізовані форми описані в таблиці 16 нижче:

55

Таблиця 16

Гуманізовані форми	Відповідні VH/VL	Інша назва форми hz	Відповідні ADC
208F2 085hz0107 (GI)	H057/L018	Не застосовується	hz208F2 (H057/L018)-G-13
208F2 085hz0119 (GI)	H070/L018	Не застосовується	hz208F2 (H070/L018)-G-13
208F2 085hz0126 (GI)	H077/L018	hz208F2-4	hz208F2 (H077/L018)-G-13
hz208F2 (VH3VL3)	H26/L024	Не застосовується	hz208F2 (H026/L024)-G-13

Ін'єкція будь-якої з гуманізованих форм c208-G-13 або 208F2 приводила до значного інгібування і навіть індукції повної регресії зростання пухлини (p менше 0,05 в порівнянні з відповідним контролем). Статистично значимої різниці активності між c208F2-G-13 і протестованими гуманізованими формами не спостерігали.

Другу серію експериментів проводили або з c208F2, або з hz208F2-4 в сполученні з G-13 в моделі ксенотрансплантата MCF-7, як описано вище (Фіг. 28A і 28B відповідно). Мишам ін'єктували і.р. 3 мг/кг кожного ADC у вигляді 4 ін'єкцій раз на чотири дні (Q4d4) або тільки один раз.

У моделі ксенотрансплантата MCF-7 спостерігали таку ж сильну протипухлинну активність при чотириразовому або тільки одноразовому введенні ADC.

Приклад 21: Активність *in vivo* антитіла 208F2, кон'югованого з сполукою G-13 або E-13 в моделі ксенотрансплантата 2⁺ CaOV-3

Протипухлинну активність також досліджували в 2⁺ експресуючій пухлині в моделі ксенотрансплантата CaOV-3, що представляє собою лінію клітин карциноми яєчника. З цією метою мишам ін'єктували підшкірно на день D0 7×10^6 клітин. Коли пухлини досягали приблизно 120 мм³ (19 днів після ін'єкції пухлинних клітин) тварин ділили на 5 груп по 5 мишей з порівнянним розміром пухлини і вводили інтраперитонеально c208F2, кон'юговане або з E-13, або з G-13, і нерелевантне антитіло c9G4, кон'юговане або з E-13, або з G-13. Мишам ін'єктували і.р. 3 мг/кг кожного ADC по 6 ін'єкцій на цикл; одна ін'єкція раз на чотири дні. У мишей спостерігали зростання ксенотрансплантата. Обсяг пухлини обчислювали за формулою: $\pi/6 \times \text{довжина} \times \text{ширина} \times \text{висота}$.

У порівнянні з c9G4-E-13, яке помірно або транзиторно індукувало уповільнення зростання, c9G4-G-13 не впливало на зростання ксенотрансплантатів пухлини CaOV-3. Ін'єкції або c208F2-E-13, або c208F2-G-13 приводили до індукції в середньому 95% і 77% інгібування росту пухлини відповідно на день 50 (Фіг. 29A і 29B).

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> PIERRE FABRE MEDICAMENT

<120> КОН'ЮГАТ АНТИТІЛА ПРОТИ IGF-1R З ЛІКАРСЬКИМ ЗАСОБОМ ТА ЙОГО ЗАСТОСУВАННЯ
ДЛЯ ЛІКУВАННЯ РАКУ

<130> D33593

<140> PCT/EP2015/059045

<141> 2015-04-27

<150> EP14305620.8

<151> 2014-04-25

<160> 81

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Consensus CDR -H1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Thr may be replaced by Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Tyr may be replaced by Phe

<400> 1

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr
1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Consensus CDR-H2

<400> 2

Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr
1 5

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Consensus CDR-H3

<400> 3

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Consensus CDR-L1

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Ser may be replaced by Asn

<400> 4

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 1 5

<210> 5
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Consensus CDR-L2

<400> 5

Tyr Thr Ser
 1

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Consensus CDR-L3

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Thr may be replaced by Ala

<400> 6

Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> CDR-H1

<400> 7

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr
 1 5

<210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> CDR-H1

<400> 8

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Phe
 1 5

<210> 9
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> CDR-L1

<400> 9

Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
1 5

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR-L1

<400> 10

Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
1 5

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR-L3

<400> 11

Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> CDR-L3

<400> 12

Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 13
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c208F2, heavy chain, VH

<400> 13

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 14
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c212A11, heavy chain, VH

<400> 14

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c214F8, heavy chain, VH

<400> 15

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> c219D6, heavy chain, VH

<400> 16

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Asp
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Phe Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 17
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> c213B10, heavy chain, VH

<400> 17

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 18
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> c208F2, light chain, VL
 <400> 18
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Val Glu Gln
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 19
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> c212A11, light chain, VL
 <400> 19
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 20
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> c214F8, light chain, VL
 <400> 20
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Ala Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 21
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c219D6, light chain, VL

<400> 21

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 22
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c213B10, light chain, VL

<400> 22

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

			85					90				95
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys		
			100					105				

<210> 23
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> c208F2, heavy chain, full length
 <400> 23

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

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly

<210> 24
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> c212A11, heavy chain, full length
 <400> 24

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys

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

Gly

<210> 25
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> c214F8, heavy chain, full length

<400> 25

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

Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly

<210> 26
<211> 449

<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c219D6, heavy chain, full length

<400> 26

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Asp
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Phe Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Phe Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly

<210> 27
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> c213B10, heavy chain, full length

<400> 27

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Phe Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Ala Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

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

<210> 28
<211> 214
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> c208F2, light chain, full length
<400> 28

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Val Glu Gln
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 29
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> c212A11, light chain, full length

<400> 29

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

<210> 30
 <211> 214

<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c214F8, light chain, full length

<400> 30

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

<210> 31
<211> 214
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c219D6, light chain, full length

<400> 31

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 32
<211> 214
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> c213B10, light chain, full length

<400> 32

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

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 33
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 (var.1) heavy chain, VH

<400> 33

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Ile Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 34
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 (var. 3), VH

<400> 34

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Phe Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 35
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 (var. 1), VL

<400> 35

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 36
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 (var.3), VL

<400> 36

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 37
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 (var. 1), heavy chain, full length

<400> 37

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Ile Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 38
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 (var.3), heavy chain full length

<400> 38

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Ile Tyr Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Phe Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly

<210> 39
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> hz208F2 (var. 1), light chain, full length

<400> 39

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145						150						155						160
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser			
				165					170					175				
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr			
			180					185					190					
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser			
		195					200					205						
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys													
210																		

<210>	40
<211>	214
<212>	PRT
<213>	artificial

<220>
<223> hz208F2 (var.3), light chain, full length

<400> 40

[illegible]

<210>	41
<211>	120
<212>	PRT
<213>	artificial

<220>
<223> hz208F2 (var.2) heavy chain, VH

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(20)
<223> Met may be replaced by Val

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (34)..(34)
<223> Ile may be replaced by Met

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (35)..(35)
<223> Tyr may be replaced by His

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (38)..(38)
<223> Lys may be replaced by Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (48)..(48)
<223> Leu may be replaced by Met

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (50)..(50)
<223> Trp may be replaced by Ile

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (59)..(59)
<223> Lys may be replaced by Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (61)..(61)
<223> Asn may be replaced by Ala

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (62)..(62)
<223> Glu may be replaced by Gln

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (70)..(70)
<223> Leu may be replaced by Met

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (72)..(72)
<223> Ala may be replaced by Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (74)..(74)
<223> Lys may be replaced by Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (76)..(76)
<223> Ser may be replaced by Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (77)..(77)
<223> Asn may be replaced by Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (79)..(79)

```

<223> Ala may be replaced by Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (82)..(82)

<223> Phe may be replaced by Glu

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (95)..(95)

<223> Phe may be replaced by Tyr

<400> 41

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Phe Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> hz208F2 (var. 2), light chain, VL

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Ser may be replaced by Thr

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (53)..(53)

<223> Arg may be replaced by Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (55)..(55)

<223> His may be replaced by Gln

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (65)..(65)

<223> Arg may be replaced by Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (71)..(71)

<223> Tyr may be replaced by Phe

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (72)..(72)
<223> Ser may be replaced by Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (77)..(77)
<223> Asn may be replaced by Ser

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (87)..(87)
<223> Phe may be replaced by Tyr

<400> 42

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1      5      10     15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20     25     30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35     40     45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50     55     60
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln Pro
65     70     75     80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85     90     95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100    105

```

<210> 43
<211> 329
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Constant domain (VH) IgG1

<400> 43

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1      5      10     15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20     25     30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35     40     45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50     55     60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65     70     75     80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85     90     95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100    105    110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115    120    125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130    135    140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

```

145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val₁₆₅ Glu Val His Asn Ala₁₇₀ Lys Thr Lys Pro Arg₁₇₅ Glu
 Glu Gln Tyr Asn₁₈₀ Ser Thr Tyr Arg Val₁₈₅ Ser Val Leu Thr₁₉₀ Val Leu
 His Gln Asp₁₉₅ Trp Leu Asn Gly₂₀₀ Glu Tyr Lys Cys₂₀₅ Val Ser Asn
 Lys Ala₂₁₀ Leu Pro Ala Pro Ile₂₁₅ Glu Lys Thr Ile₂₂₀ Ser Lys Ala Lys Gly
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln₂₃₀ Val Tyr Thr Leu Pro₂₃₅ Pro Ser Arg Glu₂₄₀ Glu
 Met Thr Lys Asn₂₄₅ Gln Val Ser Leu Thr Cys₂₅₀ Leu Val Lys Gly Phe₂₅₅ Tyr
 Pro Ser Asp Ile₂₆₀ Ala Val Glu Trp Glu₂₆₅ Ser Asn Gly Gln Pro₂₇₀ Glu Asn
 Asn Tyr Lys₂₇₅ Thr Thr Pro Pro Val₂₈₀ Leu Asp Ser Asp Gly₂₈₅ Ser Phe Phe
 Leu Tyr₂₉₀ Ser Lys Leu Thr Val₂₉₅ Asp Lys Ser Arg Trp₃₀₀ Gln Gln Gly Asn
 Val₃₀₅ Phe Ser Cys Ser Val₃₁₀ Met His Glu Ala Leu₃₁₅ His Asn His Tyr Thr₃₂₀
 Gln Lys Ser Leu Ser₃₂₅ Leu Ser Pro Gly

<210> 44
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Constant domain (VH) IgG4 (S228P)

<400> 44

Ala Ser Thr Lys₅ Gly Pro Ser Val Phe₁₀ Pro Leu Ala Pro Cys₁₅ Ser Arg
 Ser Thr Ser Glu₂₀ Ser Thr Ala Ala₂₅ Leu Gly Cys Leu Val₃₀ Lys Asp Tyr
 Phe Pro Glu₃₅ Pro Val Thr Val₄₀ Ser Trp Asn Ser Gly₄₅ Ala Leu Thr Ser
 Gly Val₅₀ His Thr Phe Pro Ala₅₅ Val Leu Gln Ser Ser₆₀ Gly Leu Tyr Ser
 Leu Ser Ser Val Val₇₀ Thr Val Pro Ser Ser₇₅ Leu Gly Thr Lys Thr₈₀
 Tyr Thr Cys Asn₈₅ Val Asp His Lys Pro Ser₉₀ Asn Thr Lys Val₉₅ Asp Lys
 Arg Val Glu Ser₁₀₀ Lys Tyr Gly Pro Pro₁₀₅ Cys Pro Pro Cys₁₁₀ Pro Ala Pro
 Glu Phe Leu₁₁₅ Gly Gly Pro Ser Val₁₂₀ Phe Leu Phe Pro₁₂₅ Lys Pro Lys
 Asp Thr₁₃₀ Leu Met Ile Ser Arg₁₃₅ Thr Pro Glu Val₁₄₀ Thr Cys Val Val Val
 Asp Val₁₄₅ Ser Gln Glu Asp₁₅₀ Pro Glu Val Gln Phe₁₅₅ Asn Trp Tyr Val Asp₁₆₀

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly
325

<210> 45
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Domain kappa (VL)

<400> 45

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 46
<211> 98
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> Human germline IGHV1-46*01

<400> 46

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

Ala Arg

<210> 47
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Human germline IGKV1-39*01

<400> 47

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

<210> 48
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Human germline IGHJ4*01

<400> 48

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10 15

<210> 49
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> Human germline IGKJ4*01

<400> 49

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 50

<211> 1367

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> IGF-1R (human)

<400> 50

Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
1 5 10 15

Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
20 25 30

Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
35 40 45

Leu Glu Asn Cys Thr Val Ile Glu Gly Tyr Leu His Ile Leu Leu Ile
50 55 60

Ser Lys Ala Glu Asp Tyr Arg Ser Tyr Arg Phe Pro Lys Leu Thr Val
65 70 75 80

Ile Thr Glu Tyr Leu Leu Leu Phe Arg Val Ala Gly Leu Glu Ser Leu
85 90 95

Gly Asp Leu Phe Pro Asn Leu Thr Val Ile Arg Gly Trp Lys Leu Phe
100 105 110

Tyr Asn Tyr Ala Leu Val Ile Phe Glu Met Thr Asn Leu Lys Asp Ile
115 120 125

Gly Leu Tyr Asn Leu Arg Asn Ile Thr Arg Gly Ala Ile Arg Ile Glu
130 135 140

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
145 150 155 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
165 170 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
180 185 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
195 200 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
210 215 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
225 230 235 240

Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
245 250 255

Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
260 265 270

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
275 280 285

Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
290 295 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
 305 310 315 320
 Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
 325 330 335
 Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
 340 345 350
 Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
 355 360 365
 Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
 370 375 380
 Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser
 385 390 395 400
 Phe Leu Lys Asn Leu Arg Leu Ile Leu Gly Glu Glu Gln Leu Glu Gly
 405 410 415
 Asn Tyr Ser Phe Tyr Val Leu Asp Asn Gln Asn Leu Gln Gln Leu Trp
 420 425 430
 Asp Trp Asp His Arg Asn Leu Thr Ile Lys Ala Gly Lys Met Tyr Phe
 435 440 445
 Ala Phe Asn Pro Lys Leu Cys Val Ser Glu Ile Tyr Arg Met Glu Glu
 450 455 460
 Val Thr Gly Thr Lys Gly Arg Gln Ser Lys Gly Asp Ile Asn Thr Arg
 465 470 475 480
 Asn Asn Gly Glu Arg Ala Ser Cys Glu Ser Asp Val Leu His Phe Thr
 485 490 495
 Ser Thr Thr Thr Ser Lys Asn Arg Ile Ile Ile Thr Trp His Arg Tyr
 500 505 510
 Arg Pro Pro Asp Tyr Arg Asp Leu Ile Ser Phe Thr Val Tyr Tyr Lys
 515 520 525
 Glu Ala Pro Phe Lys Asn Val Thr Glu Tyr Asp Gly Gln Asp Ala Cys
 530 535 540
 Gly Ser Asn Ser Trp Asn Met Val Asp Val Asp Leu Pro Pro Asn Lys
 545 550 555 560
 Asp Val Glu Pro Gly Ile Leu Leu His Gly Leu Lys Pro Trp Thr Gln
 565 570 575
 Tyr Ala Val Tyr Val Lys Ala Val Thr Leu Thr Met Val Glu Asn Asp
 580 585 590
 His Ile Arg Gly Ala Lys Ser Glu Ile Leu Tyr Ile Arg Thr Asn Ala
 595 600 605
 Ser Val Pro Ser Ile Pro Leu Asp Val Leu Ser Ala Ser Asn Ser Ser
 610 615 620
 Ser Gln Leu Ile Val Lys Trp Asn Pro Pro Ser Leu Pro Asn Gly Asn
 625 630 635 640
 Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr
 645 650 655
 Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys
 660 665 670
 Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys
 675 680 685
 Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys
 690 695 700

Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys
 705 710 715 720
 Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
 725 730 735
 Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser
 740 745 750
 Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro
 755 760 765
 Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn
 770 775 780
 Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
 785 790 795 800
 Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
 805 810 815
 Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
 820 825 830
 Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile
 835 840 845
 Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met
 850 855 860
 Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
 865 870 875 880
 Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
 885 890 895
 Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
 900 905 910
 Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr
 915 920 925
 Gly Tyr Glu Asn Phe Ile His Leu Ile Ile Ala Leu Pro Val Ala Val
 930 935 940
 Leu Leu Ile Val Gly Gly Leu Val Ile Met Leu Tyr Val Phe His Arg
 945 950 955 960
 Lys Arg Asn Asn Ser Arg Leu Gly Asn Gly Val Leu Tyr Ala Ser Val
 965 970 975
 Asn Pro Glu Tyr Phe Ser Ala Ala Asp Val Tyr Val Pro Asp Glu Trp
 980 985 990
 Glu Val Ala Arg Glu Lys Ile Thr Met Ser Arg Glu Leu Gly Gln Gly
 995 1000 1005
 Ser Phe Gly Met Val Tyr Glu Gly Val Ala Lys Gly Val Val Lys
 1010 1015 1020
 Asp Glu Pro Glu Thr Arg Val Ala Ile Lys Thr Val Asn Glu Ala
 1025 1030 1035
 Ala Ser Met Arg Glu Arg Ile Glu Phe Leu Asn Glu Ala Ser Val
 1040 1045 1050
 Met Lys Glu Phe Asn Cys His His Val Val Arg Leu Leu Gly Val
 1055 1060 1065
 Val Ser Gln Gly Gln Pro Thr Leu Val Ile Met Glu Leu Met Thr
 1070 1075 1080
 Arg Gly Asp Leu Lys Ser Tyr Leu Arg Ser Leu Arg Pro Glu Met
 1085 1090 1095

Glu Asn Asn Pro Val Leu Ala Pro Pro Ser Leu Ser Lys Met Ile
 1100 1105 1110
 Gln Met Ala Gly Glu Ile Ala Asp Gly Met Ala Tyr Leu Asn Ala
 1115 1120 1125
 Asn Lys Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Val
 1130 1135 1140
 Ala Glu Asp Phe Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Met Thr Arg
 1145 1150 1155
 Asp Ile Tyr Glu Thr Asp Tyr Tyr Arg Lys Gly Gly Lys Gly Leu
 1160 1165 1170
 Leu Pro Val Arg Trp Met Ser Pro Glu Ser Leu Lys Asp Gly Val
 1175 1180 1185
 Phe Thr Thr Tyr Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Val Leu Trp
 1190 1195 1200
 Glu Ile Ala Thr Leu Ala Glu Gln Pro Tyr Gln Gly Leu Ser Asn
 1205 1210 1215
 Glu Gln Val Leu Arg Phe Val Met Glu Gly Gly Leu Leu Asp Lys
 1220 1225 1230
 Pro Asp Asn Cys Pro Asp Met Leu Phe Glu Leu Met Arg Met Cys
 1235 1240 1245
 Trp Gln Tyr Asn Pro Lys Met Arg Pro Ser Phe Leu Glu Ile Ile
 1250 1255 1260
 Ser Ser Ile Lys Glu Glu Met Glu Pro Gly Phe Arg Glu Val Ser
 1265 1270 1275
 Phe Tyr Tyr Ser Glu Glu Asn Lys Leu Pro Glu Pro Glu Glu Leu
 1280 1285 1290
 Asp Leu Glu Pro Glu Asn Met Glu Ser Val Pro Leu Asp Pro Ser
 1295 1300 1305
 Ala Ser Ser Ser Ser Leu Pro Leu Pro Asp Arg His Ser Gly His
 1310 1315 1320
 Lys Ala Glu Asn Gly Pro Gly Pro Gly Val Leu Val Leu Arg Ala
 1325 1330 1335
 Ser Phe Asp Glu Arg Gln Pro Tyr Ala His Met Asn Gly Gly Arg
 1340 1345 1350
 Lys Asn Glu Arg Ala Leu Pro Leu Pro Gln Ser Ser Thr Cys
 1355 1360 1365

<210> 51
 <211> 932
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> IGF-1R ECD (human)

<400> 51

Met Lys Ser Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Thr Ser Leu Trp Gly Leu
 1 5 10 15
 Leu Phe Leu Ser Ala Ala Leu Ser Leu Trp Pro Thr Ser Gly Glu Ile
 20 25 30
 Cys Gly Pro Gly Ile Asp Ile Arg Asn Asp Tyr Gln Gln Leu Lys Arg
 35 40 45

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

435					440					445						
Ala	Phe	Asn	Pro	Lys	Leu	Cys	Val	Ser	Glu	Ile	Tyr	Arg	Met	Glu	Glu	
450					455					460						
Val	Thr	Gly	Thr	Lys	Gly	Arg	Gln	Ser	Lys	Gly	Asp	Ile	Asn	Thr	Arg	
465					470					475						480
Asn	Asn	Gly	Glu	Arg	Ala	Ser	Cys	Glu	Ser	Asp	Val	Leu	His	Phe	Thr	
				485					490					495		
Ser	Thr	Thr	Thr	Ser	Lys	Asn	Arg	Ile	Ile	Ile	Thr	Trp	His	Arg	Tyr	
			500					505					510			
Arg	Pro	Pro	Asp	Tyr	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Phe	Thr	Val	Tyr	Tyr	Lys	
		515					520					525				
Glu	Ala	Pro	Phe	Lys	Asn	Val	Thr	Glu	Tyr	Asp	Gly	Gln	Asp	Ala	Cys	
	530					535					540					
Gly	Ser	Asn	Ser	Trp	Asn	Met	Val	Asp	Val	Asp	Leu	Pro	Pro	Asn	Lys	
545					550					555					560	
Asp	Val	Glu	Pro	Gly	Ile	Leu	Leu	His	Gly	Leu	Lys	Pro	Trp	Thr	Gln	
				565					570					575		
Tyr	Ala	Val	Tyr	Val	Lys	Ala	Val	Thr	Leu	Thr	Met	Val	Glu	Asn	Asp	
			580					585					590			
His	Ile	Arg	Gly	Ala	Lys	Ser	Glu	Ile	Leu	Tyr	Ile	Arg	Thr	Asn	Ala	
		595					600					605				
Ser	Val	Pro	Ser	Ile	Pro	Leu	Asp	Val	Leu	Ser	Ala	Ser	Asn	Ser	Ser	
	610					615					620					
Ser	Gln	Leu	Ile	Val	Lys	Trp	Asn	Pro	Pro	Ser	Leu	Pro	Asn	Gly	Asn	
625					630					635					640	
Leu	Ser	Tyr	Tyr	Ile	Val	Arg	Trp	Gln	Arg	Gln	Pro	Gln	Asp	Gly	Tyr	
				645					650					655		
Leu	Tyr	Arg	His	Asn	Tyr	Cys	Ser	Lys	Asp	Lys	Ile	Pro	Ile	Arg	Lys	
			660					665					670			
Tyr	Ala	Asp	Gly	Thr	Ile	Asp	Ile	Glu	Glu	Val	Thr	Glu	Asn	Pro	Lys	
		675					680					685				
Thr	Glu	Val	Cys	Gly	Gly	Glu	Lys	Gly	Pro	Cys	Cys	Ala	Cys	Pro	Lys	
	690					695					700					
Thr	Glu	Ala	Glu	Lys	Gln	Ala	Glu	Lys	Glu	Glu	Ala	Glu	Tyr	Arg	Lys	
705					710					715					720	
Val	Phe	Glu	Asn	Phe	Leu	His	Asn	Ser	Ile	Phe	Val	Pro	Arg	Pro	Glu	
				725					730					735		
Arg	Lys	Arg	Arg	Asp	Val	Met	Gln	Val	Ala	Asn	Thr	Thr	Met	Ser	Ser	
			740					745					750			
Arg	Ser	Arg	Asn	Thr	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Tyr	Asn	Ile	Thr	Asp	Pro	
		755				760						765				
Glu	Glu	Leu	Glu	Thr	Glu	Tyr	Pro	Phe	Phe	Glu	Ser	Arg	Val	Asp	Asn	
	770					775					780					
Lys	Glu	Arg	Thr	Val	Ile	Ser	Asn	Leu	Arg	Pro	Phe	Thr	Leu	Tyr	Arg	
785					790					795					800	
Ile	Asp	Ile	His	Ser	Cys	Asn	His	Glu	Ala	Glu	Lys	Leu	Gly	Cys	Ser	
				805					810					815		
Ala	Ser	Asn	Phe	Val	Phe	Ala	Arg	Thr	Met	Pro	Ala	Glu	Gly	Ala	Asp	
			820					825					830			
Asp	Ile	Pro	Gly	Pro	Val	Thr	Trp	Glu	Pro	Arg	Pro	Glu	Asn	Ser	Ile	
		835					840					845				

Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met
850 855 860
Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
865 870 875 880
Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
885 890 895
Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
900 905 910
Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr
915 920 925
Gly Tyr Glu Asn
930

<210> 52
<211> 512
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> IGF-1R ECD Nterminal (human)

<400> 52

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

			245						250					255	
Ala	Gly	Val	Cys 260	Val	Pro	Ala	Cys	Pro 265	Pro	Asn	Thr	Tyr	Arg 270	Phe	Glu
Gly	Trp	Arg 275	Cys	Val	Asp	Arg	Asp 280	Phe	Cys	Ala	Asn	Ile 285	Leu	Ser	Ala
Glu	Ser 290	Ser	Asp	Ser	Glu	Gly 295	Phe	Val	Ile	His	Asp 300	Gly	Glu	Cys	Met
Gln	Glu	Cys	Pro	Ser	Gly 310	Phe	Ile	Arg	Asn	Gly 315	Ser	Gln	Ser	Met	Tyr 320
Cys	Ile	Pro	Cys	Glu 325	Gly	Pro	Cys	Pro	Lys 330	Val	Cys	Glu	Glu	Glu 335	Lys
Lys	Thr	Lys	Thr 340	Ile	Asp	Ser	Val	Thr 345	Ser	Ala	Gln	Met	Leu 350	Gln	Gly
Cys	Thr	Ile 355	Phe	Lys	Gly	Asn	Leu 360	Leu	Ile	Asn	Ile	Arg 365	Arg	Gly	Asn
Asn	Ile 370	Ala	Ser	Glu	Leu	Glu 375	Asn	Phe	Met	Gly	Leu 380	Ile	Glu	Val	Val
Thr	Gly	Tyr	Val	Lys	Ile 390	Arg	His	Ser	His	Ala 395	Leu	Val	Ser	Leu	Ser 400
Phe	Leu	Lys	Asn	Leu 405	Arg	Leu	Ile	Leu	Gly 410	Glu	Glu	Gln	Leu	Glu 415	Gly
Asn	Tyr	Ser	Phe 420	Tyr	Val	Leu	Asp	Asn 425	Gln	Asn	Leu	Gln	Gln 430	Leu	Trp
Asp	Trp	Asp 435	His	Arg	Asn	Leu	Thr 440	Ile	Lys	Ala	Gly	Lys 445	Met	Tyr	Phe
Ala	Phe 450	Asn	Pro	Lys	Leu	Cys 455	Val	Ser	Glu	Ile	Tyr	Arg 460	Met	Glu	Glu
Val	Thr	Gly	Thr	Lys	Gly 470	Arg	Gln	Ser	Lys	Gly 475	Asp	Ile	Asn	Thr	Arg 480
Asn	Asn	Gly	Glu	Arg 485	Ala	Ser	Cys	Glu	Ser 490	Asp	Val	Leu	His	Phe 495	Thr
Ser	Thr	Thr	Thr 500	Ser	Lys	Asn	Arg	Ile 505	Ile	Ile	Thr	Trp	His 510	Arg	Tyr

<210> 53
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> tetrapeptide (linker)

<400> 53

Gly Phe Leu Gly
 1

<210> 54
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> tetrapeptide (linker)

<400> 54

Ala Leu Ala Leu
1

<210> 55
<211> 5
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> tetrapeptide (linker)

<400> 55

Pro Val Gly Val Val
1 5

<210> 56
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 heavy chain H037, VH

<400> 56

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 57
<211> 107
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 light chain L018, VL

<400> 57

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Arg Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 58
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 heavy chain H037 full length

<400> 58

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

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly

<210> 59
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> hz208F2 light chain L018 full length
 <400> 59

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

180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 60
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> hz208F2 light chain L021, VL

<400> 60

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 61
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> hz208F2 light chain L021 full length

<400> 61

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Arg Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 62
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 heavy chain H047, VH

<400> 62

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 63
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 heavy chain H047 full length

<400> 63

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 Gly

<210> 64
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> hz208F2 heavy chain H049, VH

<400> 64

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 65
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> hz208F2 heavy chain H049 full length

<400> 65

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ala₁₆₅ Leu Thr Ser Gly Val₁₇₀ His Thr Phe Pro Ala Val
 Leu Gln Ser Ser₁₈₀ Gly Leu Tyr Ser Leu₁₈₅ Ser Ser Val Val Thr₁₉₀ Val Pro
 Ser Ser Ser₁₉₅ Leu Gly Thr Gln Thr₂₀₀ Tyr Ile Cys Asn Val₂₀₅ Asn His Lys
 Pro Ser₂₁₀ Asn Thr Lys Val Asp₂₁₅ Lys Arg Val Glu Pro₂₂₀ Lys Ser Cys Asp
 Lys Thr His Thr Cys Pro₂₃₀ Pro Cys Pro Ala Pro₂₃₅ Glu Leu Leu Gly Gly₂₄₀
 Pro Ser Val Phe Leu₂₄₅ Phe Pro Pro Lys Pro₂₅₀ Lys Asp Thr Leu Met₂₅₅ Ile
 Ser Arg Thr Pro₂₆₀ Glu Val Thr Cys Val₂₆₅ Val Val Asp Val Ser₂₇₀ His Glu
 Asp Pro Glu₂₇₅ Val Lys Phe Asn Trp₂₈₀ Tyr Val Asp Gly Val₂₈₅ Glu Val His
 Asn Ala₂₉₀ Lys Thr Lys Pro Arg₂₉₅ Glu Glu Gln Tyr Asn₃₀₀ Ser Thr Tyr Arg
 Val Val Ser Val Leu Thr₃₁₀ Val Leu His Gln Asp₃₁₅ Trp Leu Asn Gly Lys₃₂₀
 Glu Tyr Lys Cys Lys₃₂₅ Val Ser Asn Lys Ala₃₃₀ Leu Pro Ala Pro Ile₃₃₅ Glu
 Lys Thr Ile Ser₃₄₀ Lys Ala Lys Gly Gln₃₄₅ Pro Arg Glu Pro Gln₃₅₀ Val Tyr
 Thr Leu Pro₃₅₅ Pro Ser Arg Glu Glu₃₆₀ Met Thr Lys Asn Gln₃₆₅ Val Ser Leu
 Thr Cys₃₇₀ Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile₃₈₀ Ala Val Glu Trp
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro₃₉₀ Glu Asn Asn Tyr Lys₃₉₅ Thr Thr Pro Pro Val₄₀₀
 Leu Asp Ser Asp Gly₄₀₅ Ser Phe Phe Leu Tyr₄₁₀ Ser Lys Leu Thr Val₄₁₅ Asp
 Lys Ser Arg Trp₄₂₀ Gln Gln Gly Asn Val₄₂₅ Phe Ser Cys Ser Val₄₃₀ Met His
 Glu Ala Leu₄₃₅ His Asn His Tyr Thr₄₄₀ Gln Lys Ser Leu Ser₄₄₅ Leu Ser Pro
 Gly

<210> 66
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> hz208F2 heavy chain H051, VH

<400> 66

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

```

          35          40          45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
      85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
      100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115 120

```

<210> 67
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> hz208F2 heavy chain H051 full length
 <400> 67

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
      20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
      35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
      85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
      100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
      115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
      195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
      210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

```


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

Gly

<210> 68
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> hz208F2 heavy chain H052, VH

<400> 68

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 69
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> hz208F2 heavy chain H052 full length

<400> 69

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser₃₄₀ Lys Ala Lys Gly₃₄₅ Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 Thr Leu Pro₃₅₅ Pro Ser Arg Glu₃₆₀ Glu Met Thr Lys Asn₃₆₅ Gln Val Ser Leu
 Thr Cys₃₇₀ Leu Val Lys Gly₃₇₅ Phe Tyr Pro Ser Asp Ile₃₈₀ Ala Val Glu Trp
 Glu₃₈₅ Ser Asn Gly Gln₃₉₀ Glu Asn Asn Tyr Lys₃₉₅ Thr Thr Pro Pro Val₄₀₀
 Leu Asp Ser Asp₄₀₅ Gly Ser Phe Phe Leu Tyr₄₁₀ Ser Lys Leu Thr Val₄₁₅ Asp
 Lys Ser Arg Trp₄₂₀ Gln Gln Gly Asn Val₄₂₅ Phe Ser Cys Ser Val₄₃₀ Met His
 Glu Ala Leu₄₃₅ His Asn His Tyr Thr₄₄₀ Gln Lys Ser Leu Ser₄₄₅ Leu Ser Pro

Gly

<210> 70
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> hz208F2 heavy chain H057, VH
 <400> 70

Gln Val Gln Leu Val₅ Gln Ser Gly Ala₁₀ Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala₁₅
 Ser Val Lys Val₂₀ Ser Cys Lys Ala₂₅ Ser Gly Tyr Thr Phe Thr₃₀ Ser Tyr
 Tyr Ile His₃₅ Trp Val Arg Gln Ala₄₀ Pro Gly Gln Gly Leu₄₅ Glu Trp Met
 Gly Trp₅₀ Ile Trp Pro Gly₅₅ Asp Gly Ser Thr Lys Tyr₆₀ Ala Gln Lys Phe
 Gln Gly Arg Val Thr₇₀ Met Thr Arg Asp Lys₇₅ Thr Asn Thr Val Tyr₈₀
 Met Glu Leu Ser₈₅ Ser Leu Arg Ser Glu₉₀ Asp Thr Ala Val Tyr Tyr₉₅ Cys
 Ala Ser Pro Met₁₀₀ Ile Thr Pro Asn Tyr₁₀₅ Ala Met Asp Tyr Trp₁₁₀ Gly Gln
 Gly Thr Leu₁₁₅ Val Thr Val Ser Ser₁₂₀

<210> 71
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> hz208F2 heavy chain H057 full length
 <400> 71

Gln Val Gln Leu Val₅ Gln Ser Gly Ala₁₀ Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala₁₅
 Ser Val Lys Val₂₀ Ser Cys Lys Ala₂₅ Ser Gly Tyr Thr Phe Thr₃₀ Ser Tyr

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Lys Ser Thr Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 72
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 heavy chain H068, VH
<400> 72

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 73
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 heavy chain H068 full length
<400> 73

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

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

Gly

<210> 74
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> hz208F2 heavy chain H070, VH

<400> 74

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 75
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 heavy chain H070 full length
<400> 75

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

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

<210> 76
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> artificial

<220>
 <223> hz208F2 heavy chain H071, VH
 <400> 76

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 77
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 heavy chain H071 full length

<400> 77

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

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 78
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> hz208F2 heavy chain H076, VH
<400> 78

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 79
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> hz208F2 heavy chain H076 full length
<400> 79

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 195 200 205
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 80
<211> 120
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 heavy chain H077, VH

<400> 80

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 81
<211> 449
<212> PRT
<213> artificial

<220>
<223> hz208F2 heavy chain H077 full length

<400> 81

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

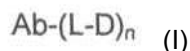
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Met Ile Thr Pro Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly 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 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

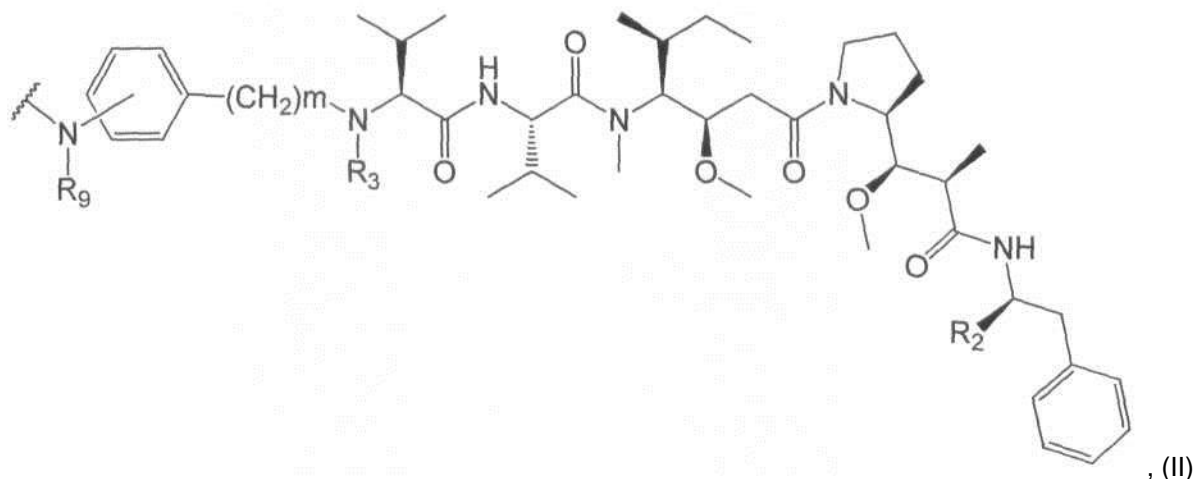
- 5 1. Кон'югат антитіла з лікарським засобом наступної формули (I)



або його фармацевтично прийнятна сіль,

де:

- 5 Ab являє собою антитіло або його антигензв'язуючий фрагмент, здатний до зв'язування з IGF-1R людини, де зазначене антитіло містить три визначаючі компліментарності ділянки важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO: 1, 2 і 3, і три CDR ділянки легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO: 4, 5 і 6;
- L являє собою лінкер;
- 10 D являє собою угруповання лікарського засобу наступної формули (II):



де:

- R₂ являє собою COOH, COOCH₃ або тіазоліл;
- 15 R₃ являє собою H або (C₁-C₆)алкіл;
- R₉ являє собою H або (C₁-C₆)алкіл;
- m являє собою ціле число, що складає від 1 до 8;
- хвилястою лінією показана точка приєднання до L; i
- 20 n дорівнює від 1 до 12.
2. Кон'югат антитіла з лікарським засобом за п. 1, де Ab вибрано з:
- a) антитіла, що містить три CDR ділянки важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO: 7, 2 і 3, і три CDR ділянки легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO: 9, 5 і 11;
- b) антитіла, що містить три CDR ділянки важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO: 7, 2 і 3, і три CDR ділянки легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO: 10, 5 і 11;
- 25 c) антитіла, що містить три CDR ділянки важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO: 7, 2 і 3, і три CDR ділянки легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO: 9, 5 і 12; і
- d) антитіла, що містить три CDR ділянки важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO: 8, 2 і 3, і три CDR ділянки легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO: 9, 5 і 11.
3. Кон'югат антитіла з лікарським засобом за п. 1 або п. 2, де Ab вибрано з:
- 30 a) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO: 13, і три CDR ділянки легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO: 9, 5 і 11;
- b) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO: 14, і три CDR ділянки легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO: 10, 5 і 11;
- 35 c) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO: 15, і три CDR ділянки легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO: 9, 5 і 12;
- d) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO: 16, і три CDR ділянки легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO: 9, 5 і 11; і
- e) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO: 17, і три CDR ділянки легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO: 9, 5 і 12.
- 40 4. Кон'югат антитіла з лікарським засобом за п. 1 або 2, де Ab вибрано з:
- a) антитіла, що містить варіабельний домен легкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO: 18, і три CDR ділянки важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO: 7, 2 і 3;
- b) антитіла, що містить варіабельний домен легкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO: 19, і три CDR ділянки важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO: 7, 2 і 3;

с) антитіла, що містить варіабельний домен легкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO: 20, і три CDR ділянки важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO: 7, 2 і 3;

d) антитіла, що містить варіабельний домен легкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO: 21, і три CDR ділянки важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO: 8, 2 і 3; і

5 е) антитіла, що містить варіабельний домен легкого ланцюга, який має послідовність SEQ ID NO: 22, і три CDR ділянки важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO: 7, 2 і 3.

5. Кон'югат антитіла з лікарським засобом за п. 1, де Ab вибрано з антитіл 208F2, 212A11, 214F8, 219D6 і 213B10.

6. Кон'югат антитіла з лікарським засобом за п. 1, де Ab містить:

10 а) варіабельний домен важкого ланцюга (VH) послідовності SEQ ID NO: 33, де дана послідовність SEQ ID NO: 33 містить щонайменше одну зворотну мутацію, вибрану із залишків 20, 34, 35, 38, 48, 50, 59, 61, 62, 70, 72, 74, 76, 77, 79, 82 і 95; і

15 б) варіабельний домен легкого ланцюга (VL) послідовності SEQ ID NO: 35, де дана послідовність SEQ ID NO: 35 містить щонайменше одну зворотну мутацію, вибрану із залишків 22, 53, 55, 65, 71, 72, 77 або 87.

7. Кон'югат антитіла з лікарським засобом за п. 1, де Ab вибрано з:

а) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 і 80; і три CDR ділянки легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO: 9, 5 і 11;

20 б) антитіла, що містить варіабельний домен легкого ланцюга, який має послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 57 або 60; і три CDR ділянки важкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO: 7, 2 і 3; і

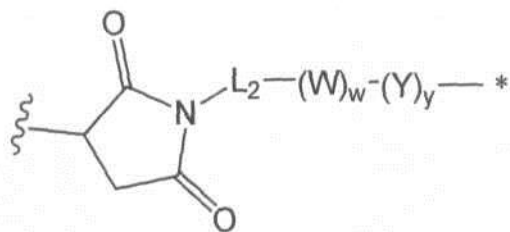
25 с) антитіла, що містить варіабельний домен важкого ланцюга, який має послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 56, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78 і 80; і три CDR ділянки легкого ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO: 57 або 60 або будь-яку послідовність, щонайменше на 80 % ідентичну SEQ ID NO: 57 або 60.

8. Кон'югат антитіла з лікарським засобом за п. 1, де Ab містить:

а) важкий ланцюг, що має послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 58, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79 і 81; і

30 б) легкий ланцюг, що має послідовність, вибрану з SEQ ID NO: 59 і 61.

9. Кон'югат антитіла з лікарським засобом за будь-яким з пп. 1-8, де L являє собою лінкер наступної формули (III):



, (III)

де:

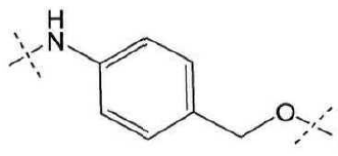
L₂ являє собою (C₄-C₁₀)циклоалкілкарбоніл, (C₂-C₆)алкіл, (C₂-C₆)алкілкарбоніл,

W являє собою амінокислотну ланку; w являє собою ціле число, що складає від 0 до 5;

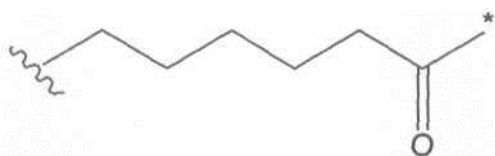
Y являє собою PAB-карбоніл, де PAB являє собою у дорівнює 0 або 1;

зірочкою вказана точка приєднання до D; і

хвилястою лінією вказана точка приєднання до Ab.

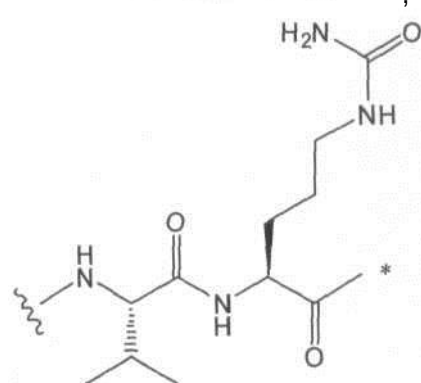


45 10. Кон'югат антитіла з лікарським засобом за п. 9, де L₂ має наступну формулу:



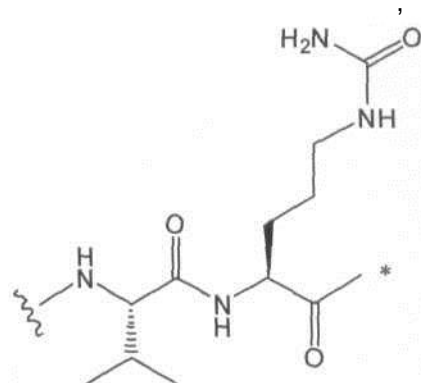
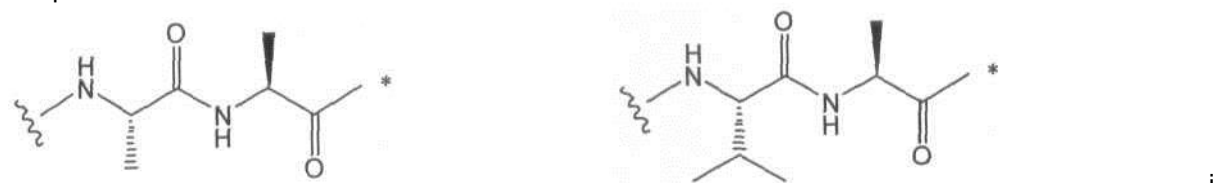
де зірочкою вказана точка приєднання до $(W)_w$; і
хвилястою лінією вказана точка приєднання до атому азоту малеїмідного угруповання.

11. Кон'югат антитіла з лікарським засобом за п. 9, де $(W)_w$ вибраний з: простого зв'язку,



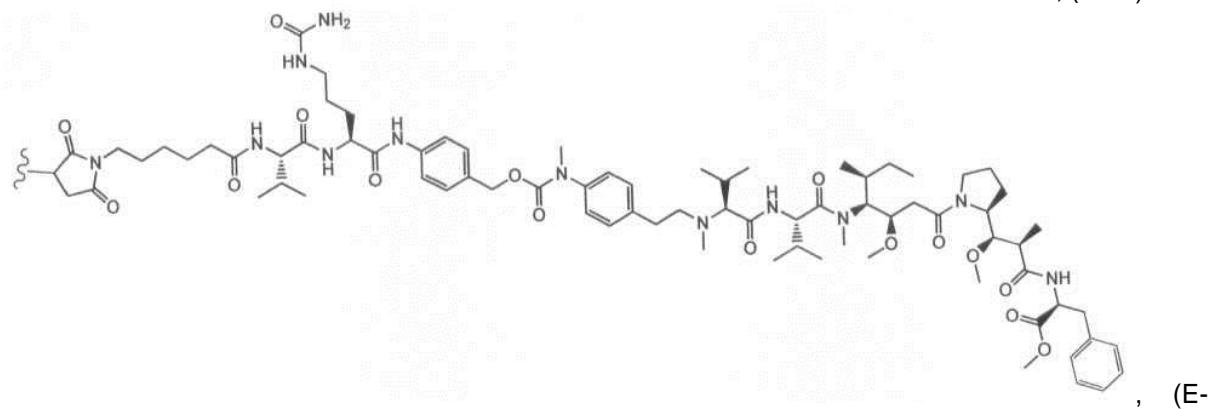
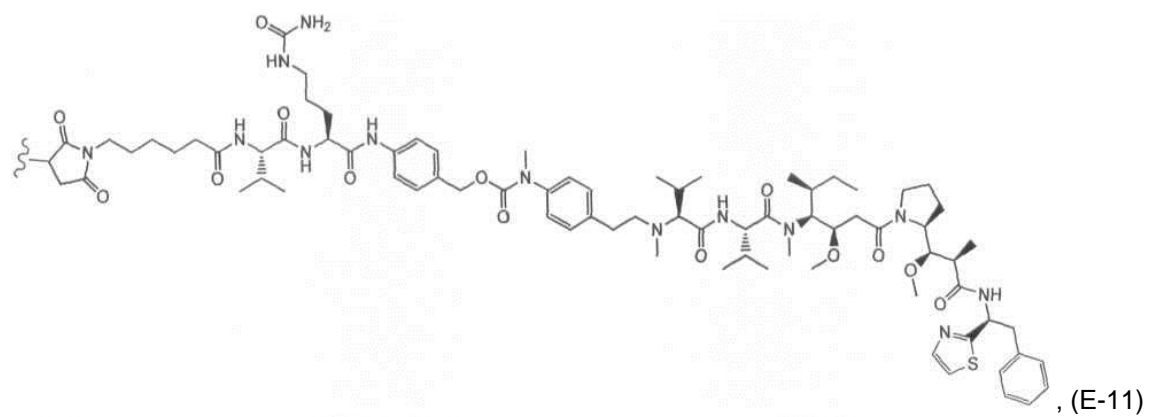
де зірочкою вказана точка приєднання до $(Y)_y$; і
хвилястою лінією вказана точка приєднання до L_2 .

10 12. Кон'югат антитіла з лікарським засобом за п. 9, де w дорівнює 0; або w дорівнює 2, і $(W)_w$ вибраний з:

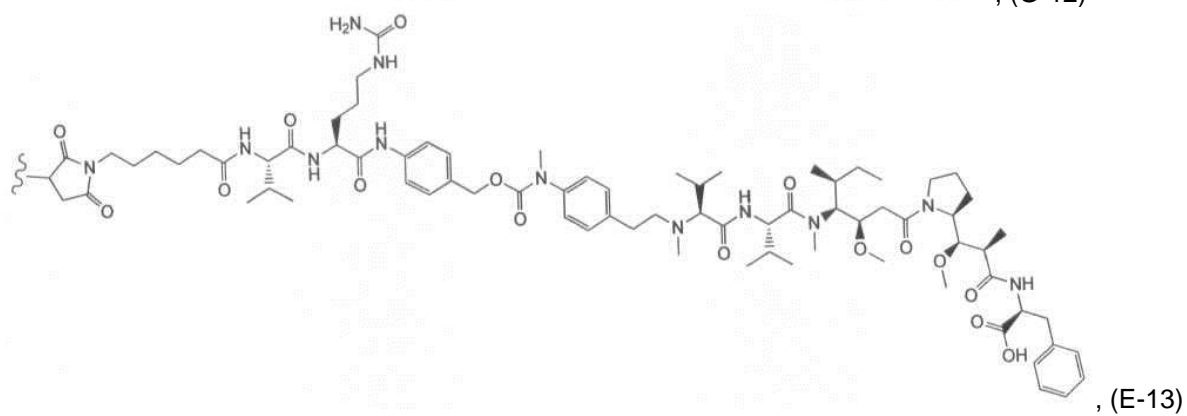
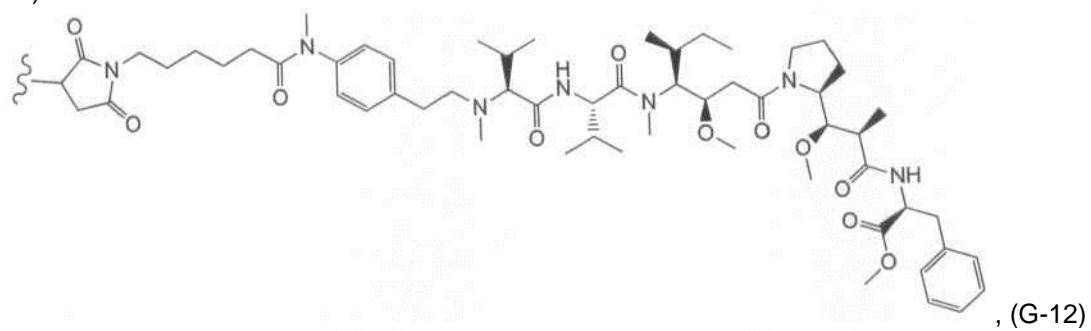


де зірочкою вказана точка приєднання до $(Y)_y$; і
хвилястою лінією вказана точка приєднання до L_2 .

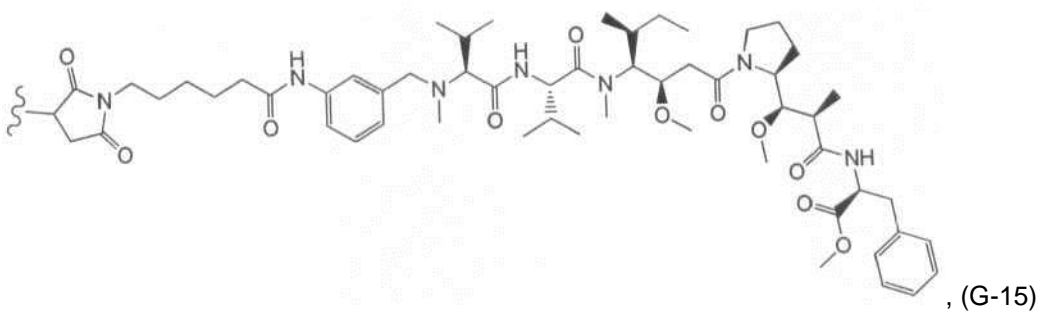
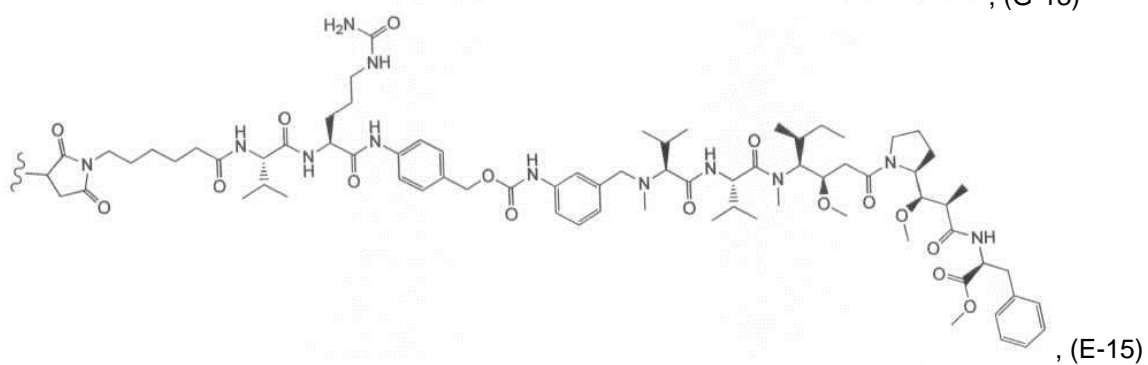
15 13. Кон'югат антитіла з лікарським засобом за будь-яким з пп. 1-12, де $(L-D)$ вибраний з:

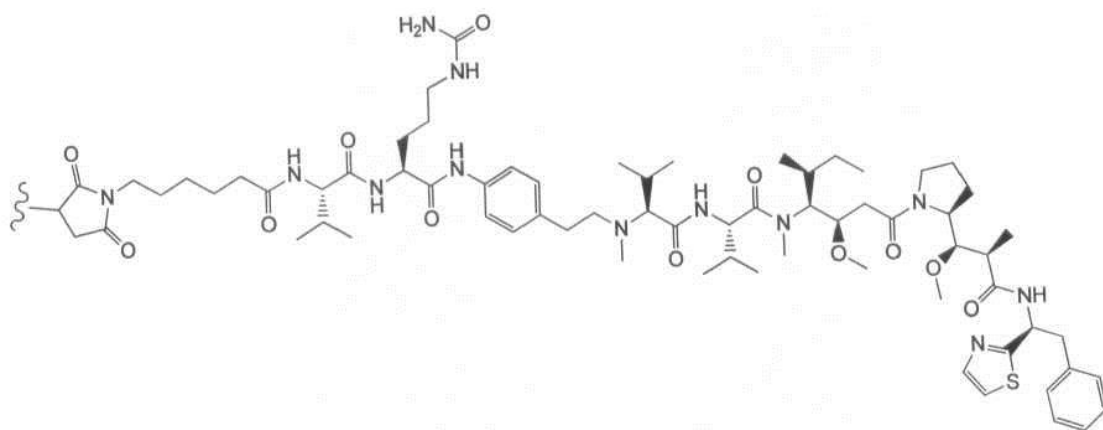


12)



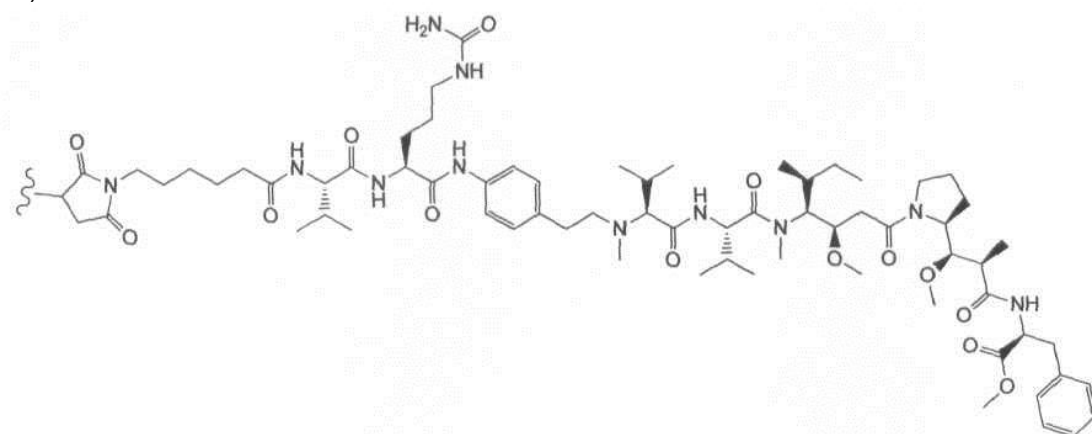
(G-13)



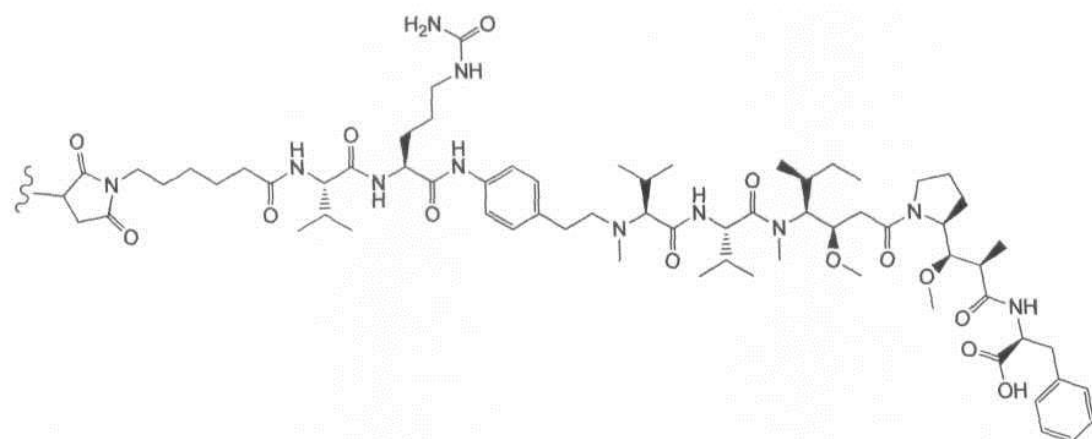


61)

, (F-

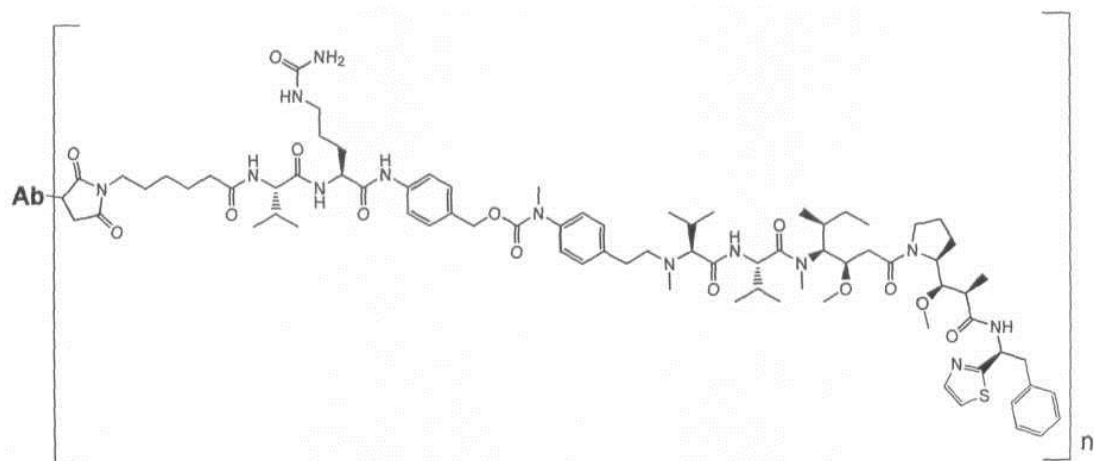


, (F-62)



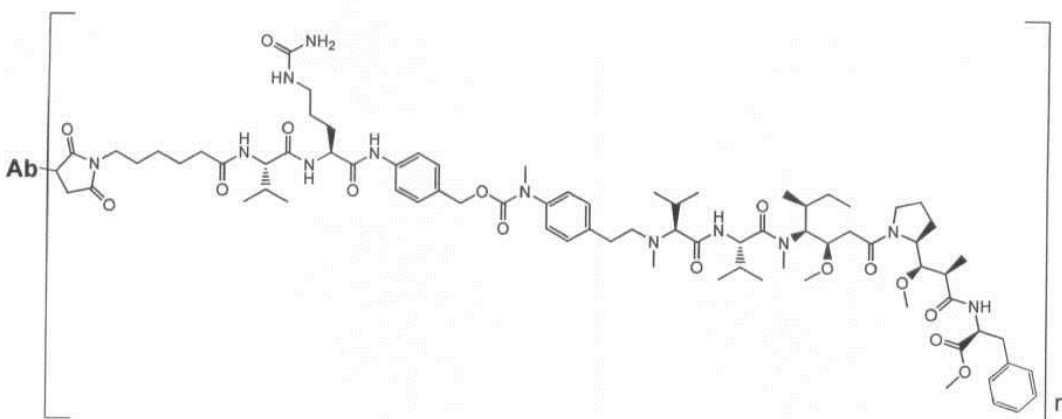
, (F-63)

- 5 де хвилястою лінією вказана точка приєднання до Ab.
 14. Кон'югат антитіла з лікарським засобом за п. 1, що має формулу, вибрану з:



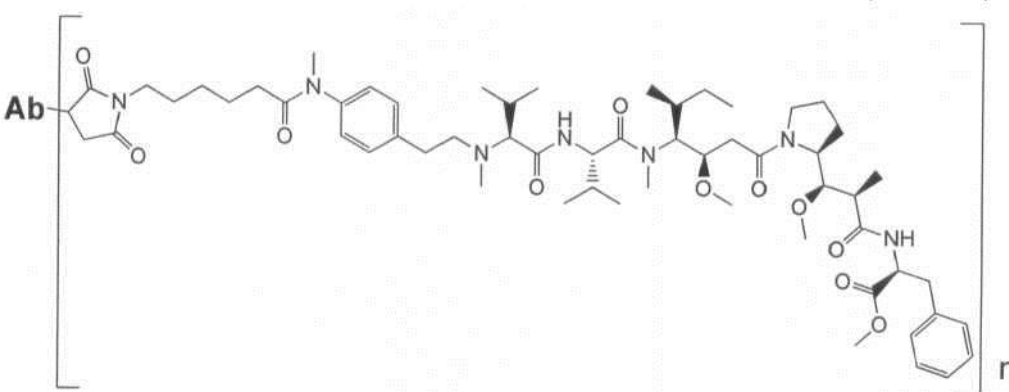
E-11)

, (Ab-

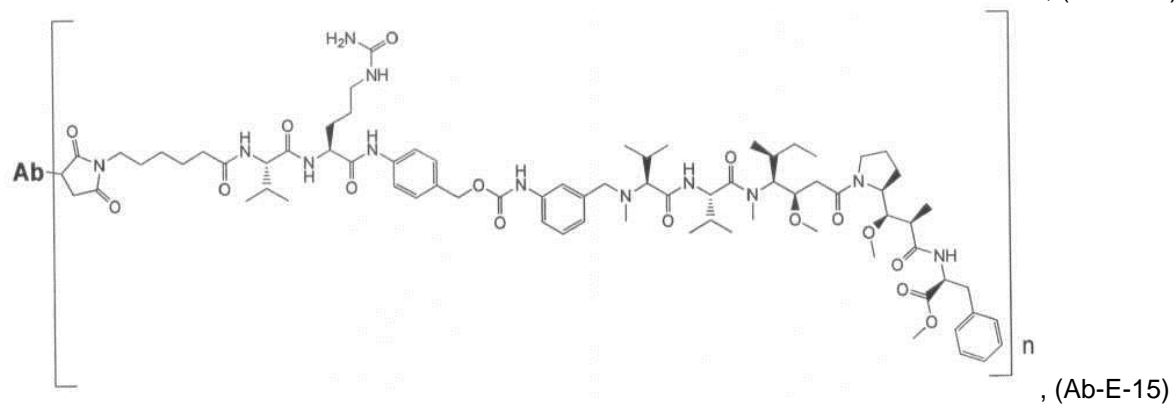
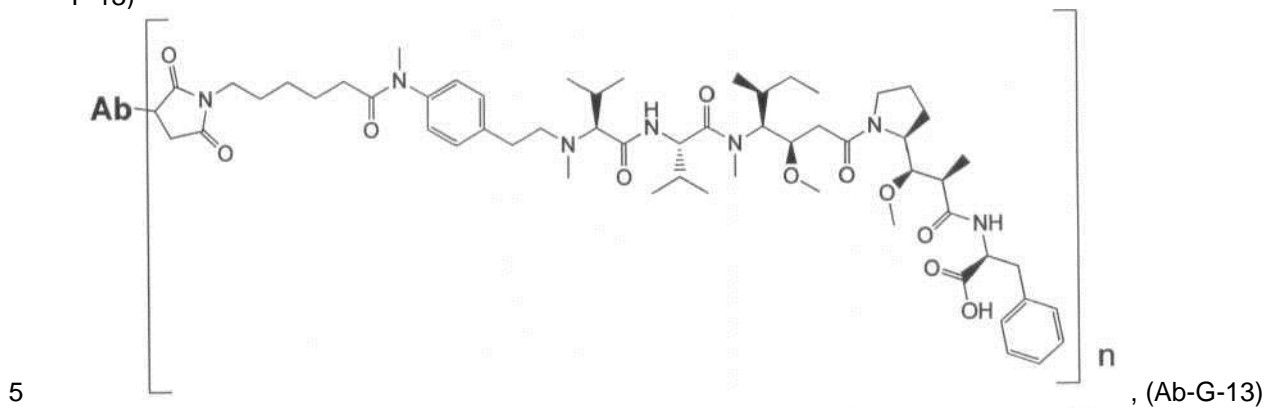
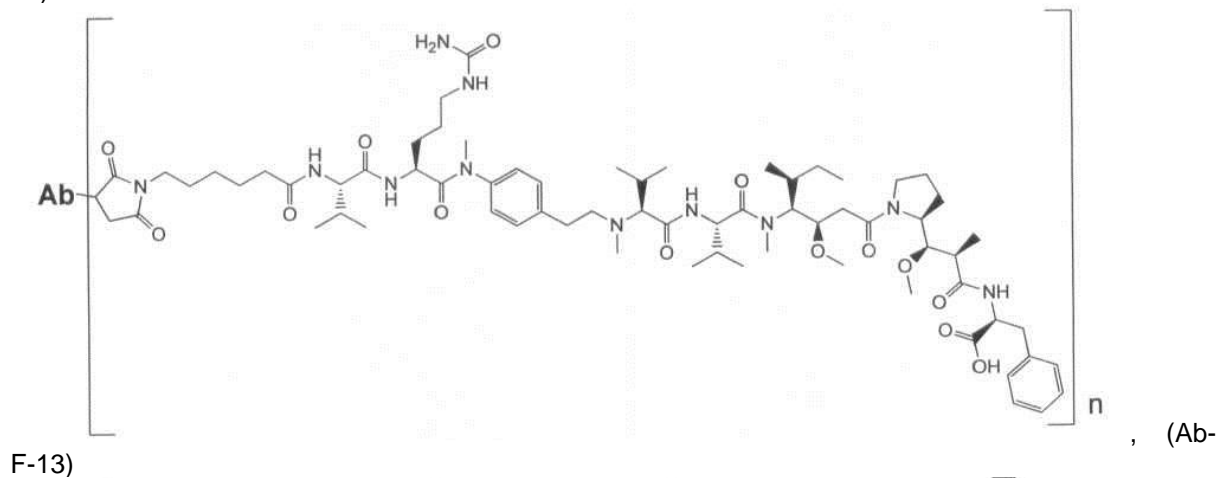
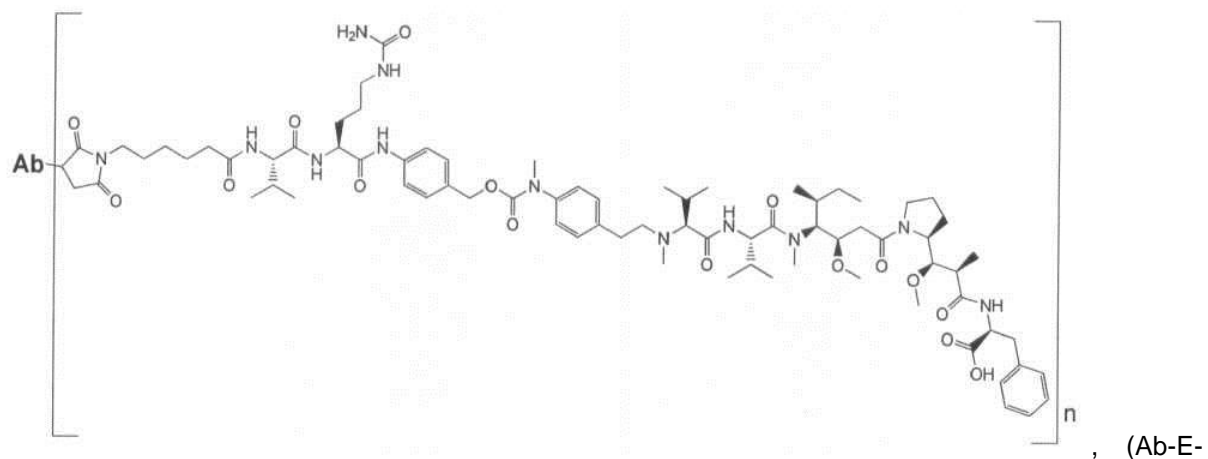


12)

, (Ab-E-




, (Ab-G-12)



*[C@@H]1CC(=O)N(CCCCCC(=O)NC[C@H](C)C(=O)NC[C@H](CN=C(N)=O)C(=O)Nc2ccc(cc2)CCN(C)[C@H](C)C(=O)NC[C@H](C)C(=O)N[C@@H](C)[C@H](OC)CC(=O)N[C@@H]3C[C@H](C)[C@H](CO)CC3)c4ccccc41

(Ab-), (F-61)

62)  , (Ab-F-

NC(=O)NCCC[C@H](NC(=O)N[C@@H](C)C(=O)NCCCCC1C(=O)N(C1)C(=O)N2CCCC2)C(=O)Nc3ccc(cc3)CCN(C)C(C)C(=O)N[C@@H](C)C(=O)N(C)C[C@H](C)[C@H](OC)C(=O)N4CC[C@H](C4)[C@H](C)[C@@H](OC)C(=O)N[C@@H](Cc5ccccc5)C(=O)O

(Ab-F-63)

(Ab-F-63)

та їх фармацевтично прийнятних солей,

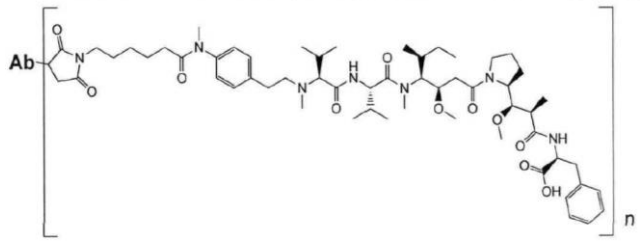
де Ab вибрано з групи, що складається з антитіл 208F2, 212A11, 214F8, 219D6 і 213B10.

15. Кон'югат антитіла з лікарським засобом за п. 13, де Ab вибраний з групи, що складається з:

- [illegible]

- антитіла, що містить важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO: 79 та легкий ланцюг послідовності SEQ ID NO: 61; та
- антитіла, що містить важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO: 81 та легкий ланцюг послідовності SEQ ID NO: 59.

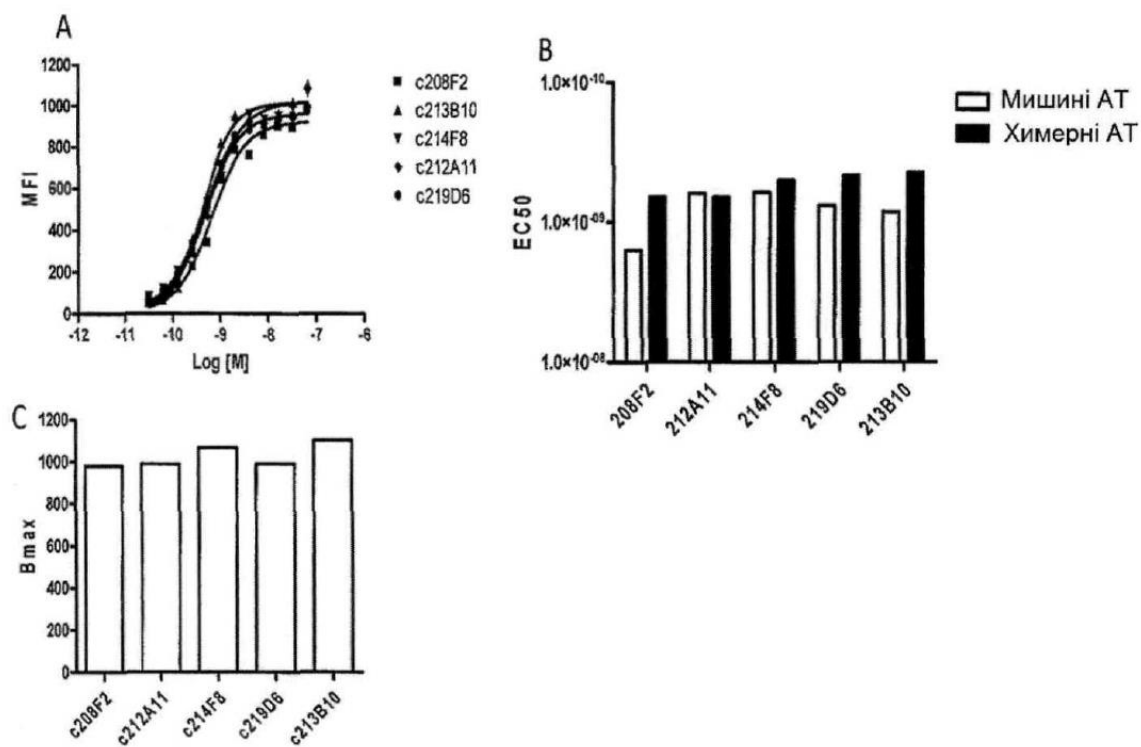
5 17. Кон'югат антитіла з лікарським засобом за п. 13, що має формулу:



або його фармацевтично прийнятна сіль,

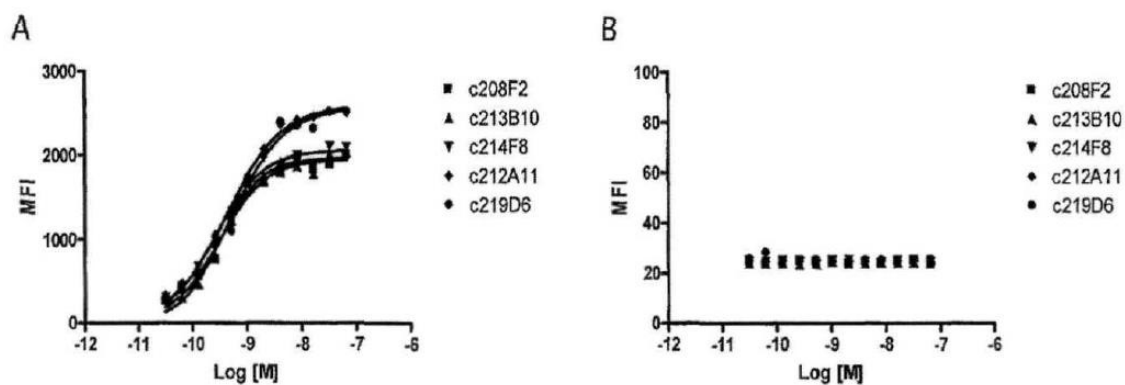
де Ab являє собою антитіло, що містить варіабельний домен важкого ланцюга послідовності SEQ ID NO: 80 та варіабельний домен легкого ланцюга послідовності SEQ ID NO: 57.

- 10 18. Кон'югат антитіла з лікарським засобом за п. 17, де Ab являє собою антитіло, що містить важкий ланцюг послідовності SEQ ID NO: 81 та легкий ланцюг послідовності SEQ ID NO: 59.
19. Кон'югат антитіла з лікарським засобом за п. 1, де n дорівнює 2.
20. Кон'югат антитіла з лікарським засобом за п. 1, де n дорівнює 4.
21. Кон'югат антитіла з лікарським засобом за будь-яким з попередніх пунктів для застосування
- 15 як лікарського засобу.
22. Композиція, що містить щонайменше один кон'югат антитіла з лікарським засобом за будь-яким з попередніх пунктів.
23. Композиція за п. 22, яка додатково містить фармацевтично прийнятний носій.
24. Композиція за п. 22 або п. 23 для застосування при лікуванні IGF-1R-експресуючого раку.
- 20 25. Композиція за п. 24, де IGF-1R-експресуючий рак являє собою рак, вибраний з карциноми молочної залози, ободової кишки, стравоходу, печінково-клітинного раку, раку шлунка, гліоми, раку легені, меланоми, остеосаркоми, раку яєчника, передміхурової залози, рабдоміосаркоми, раку нирки, щитовидної залози, ендометрію матки, мезотеліоми, плоскоклітинної карциноми порожнини рота і будь-якого лікарсько-стійкого раку.
- 25 26. Спосіб лікування IGF-1R-експресуючого раку у суб'єкта, що потребує цього, який включає введення суб'єкту ефективної кількості щонайменше одного кон'югата антитіла з лікарським засобом за будь-яким з пп. 1-20 або композиції за п. 22 або п. 23.

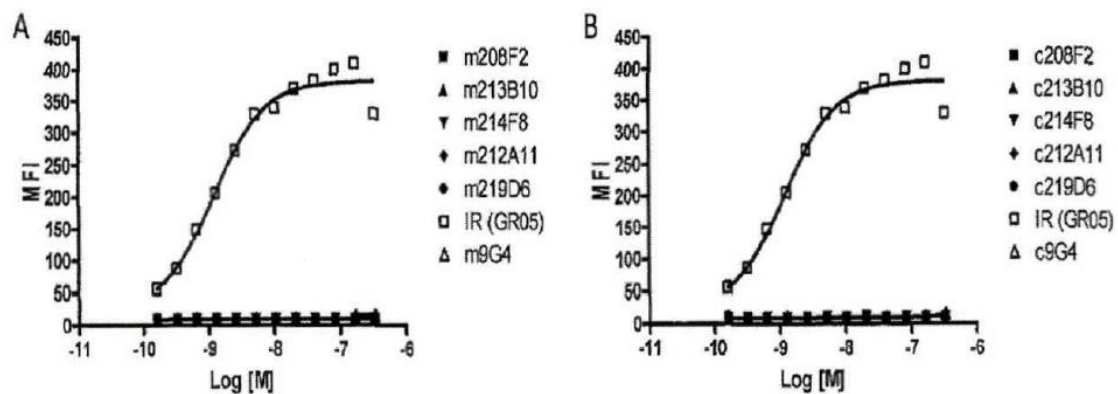


MFI, від англійської mean fluorescent intensity – середня інтенсивність флуоресценції

ФІГ. 1

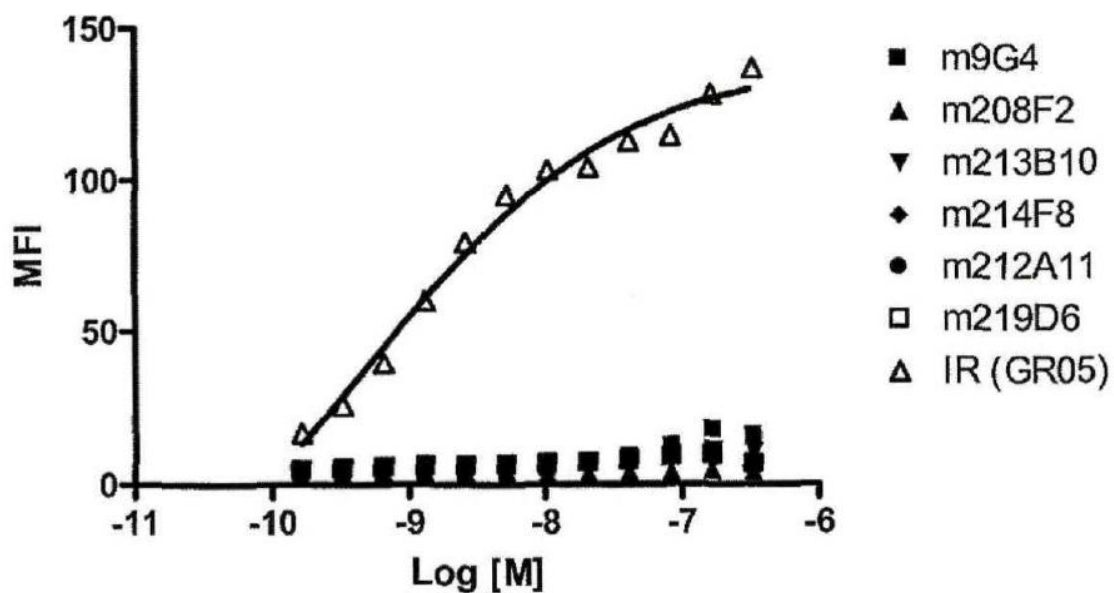


ФІГ. 2

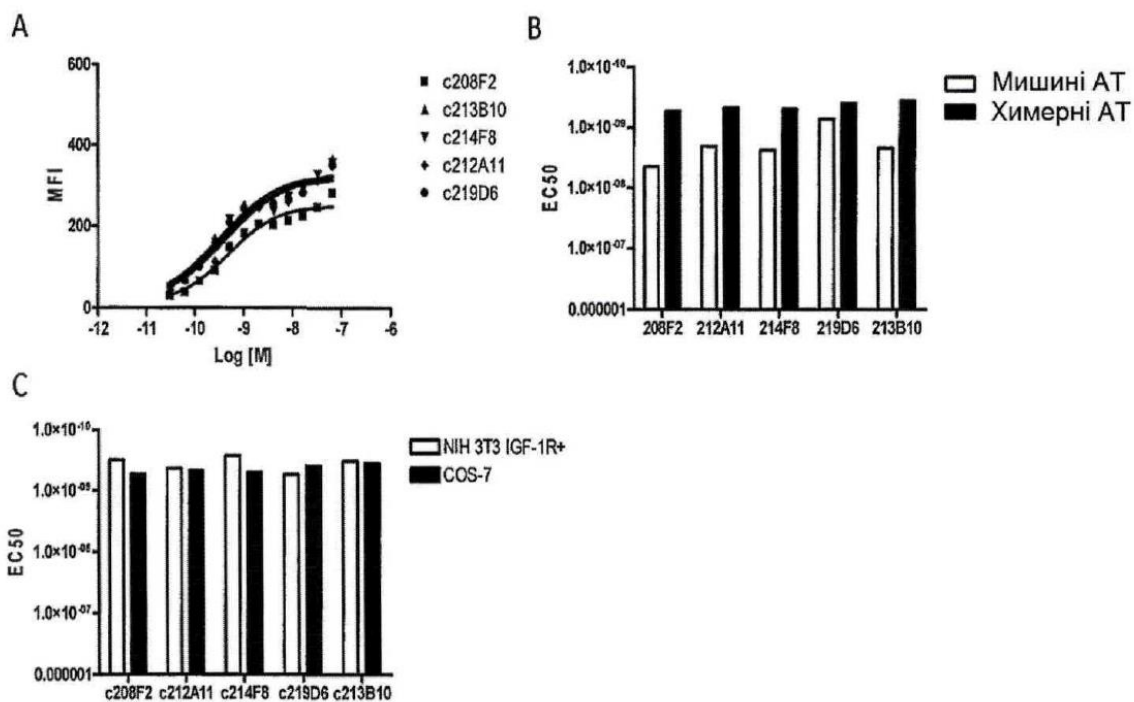


ΦΙΓ. 3

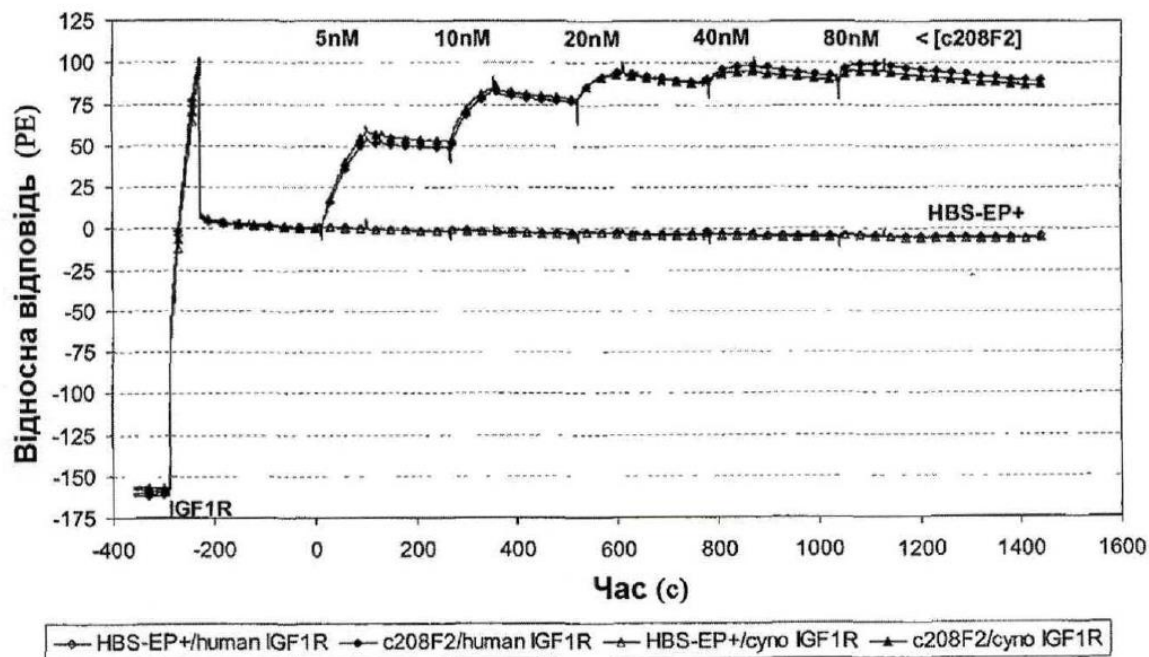
IM9



ΦΙΓ. 4

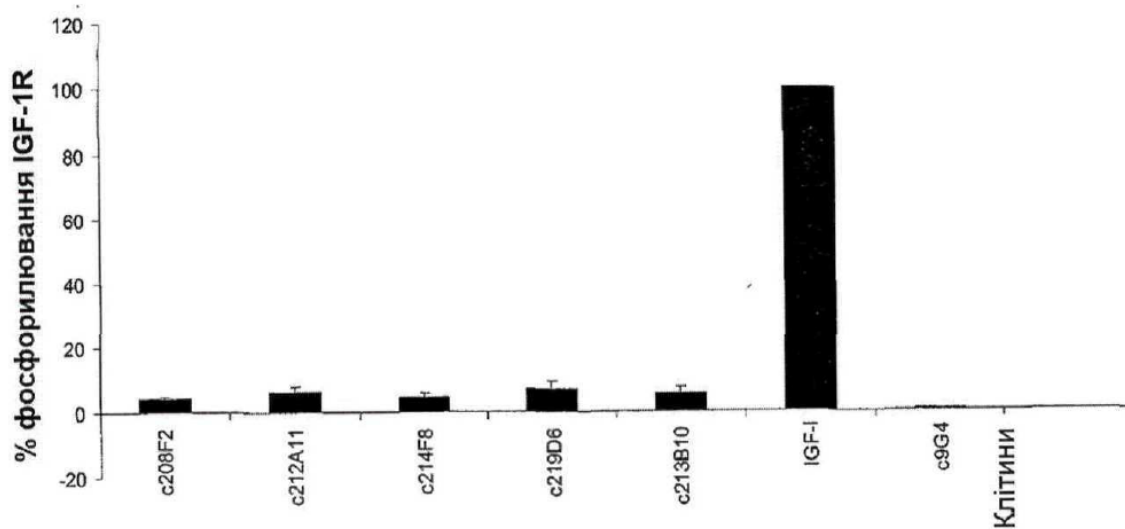


ФІГ. 5

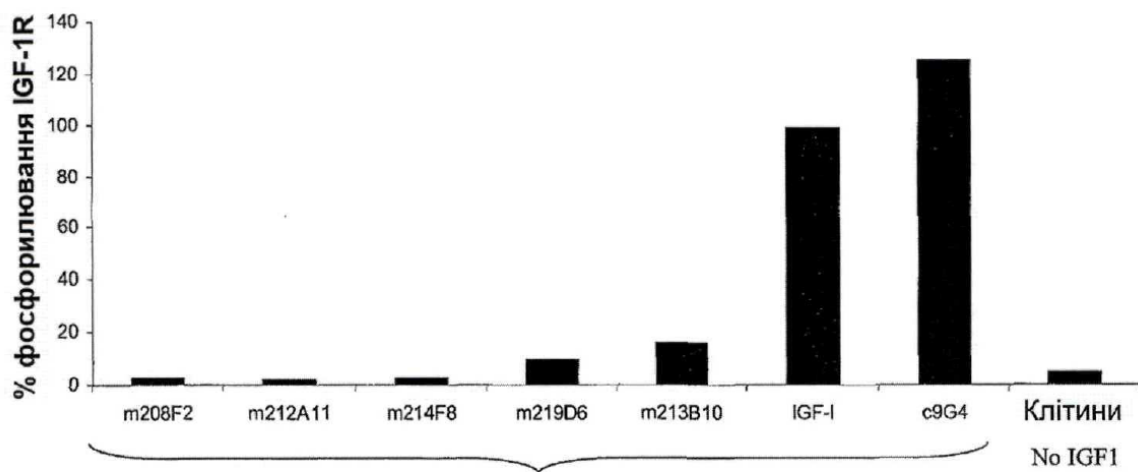


«human» в перекладі з англійської – людський
«cyno» в перекладі з англійської – мавпячий

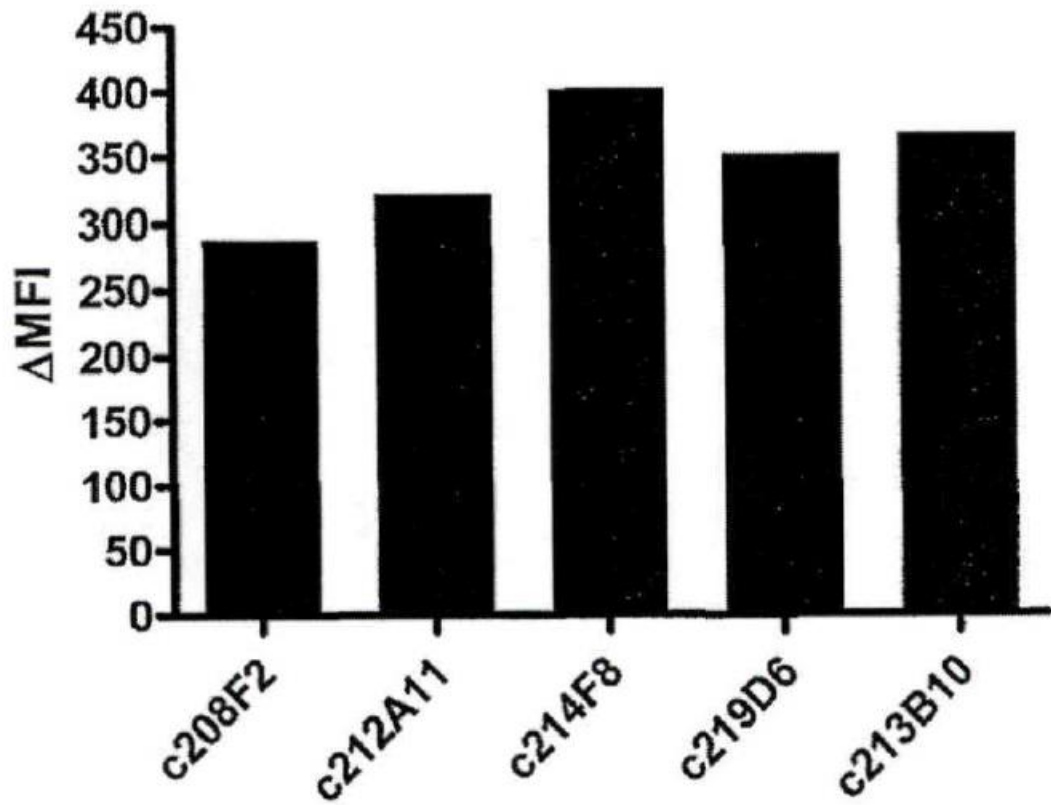
ФІГ. 6



ФІГ. 7

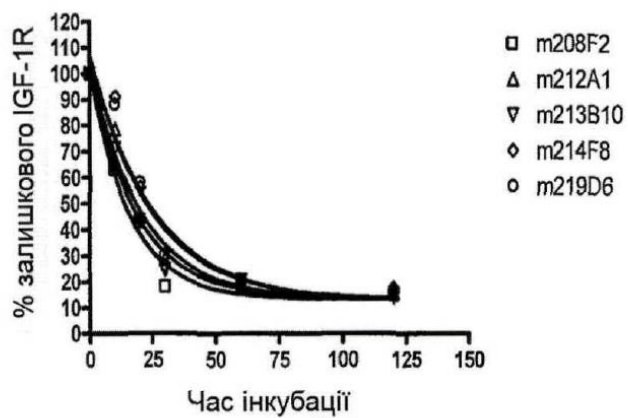


ФІГ. 8



ФІГ. 9

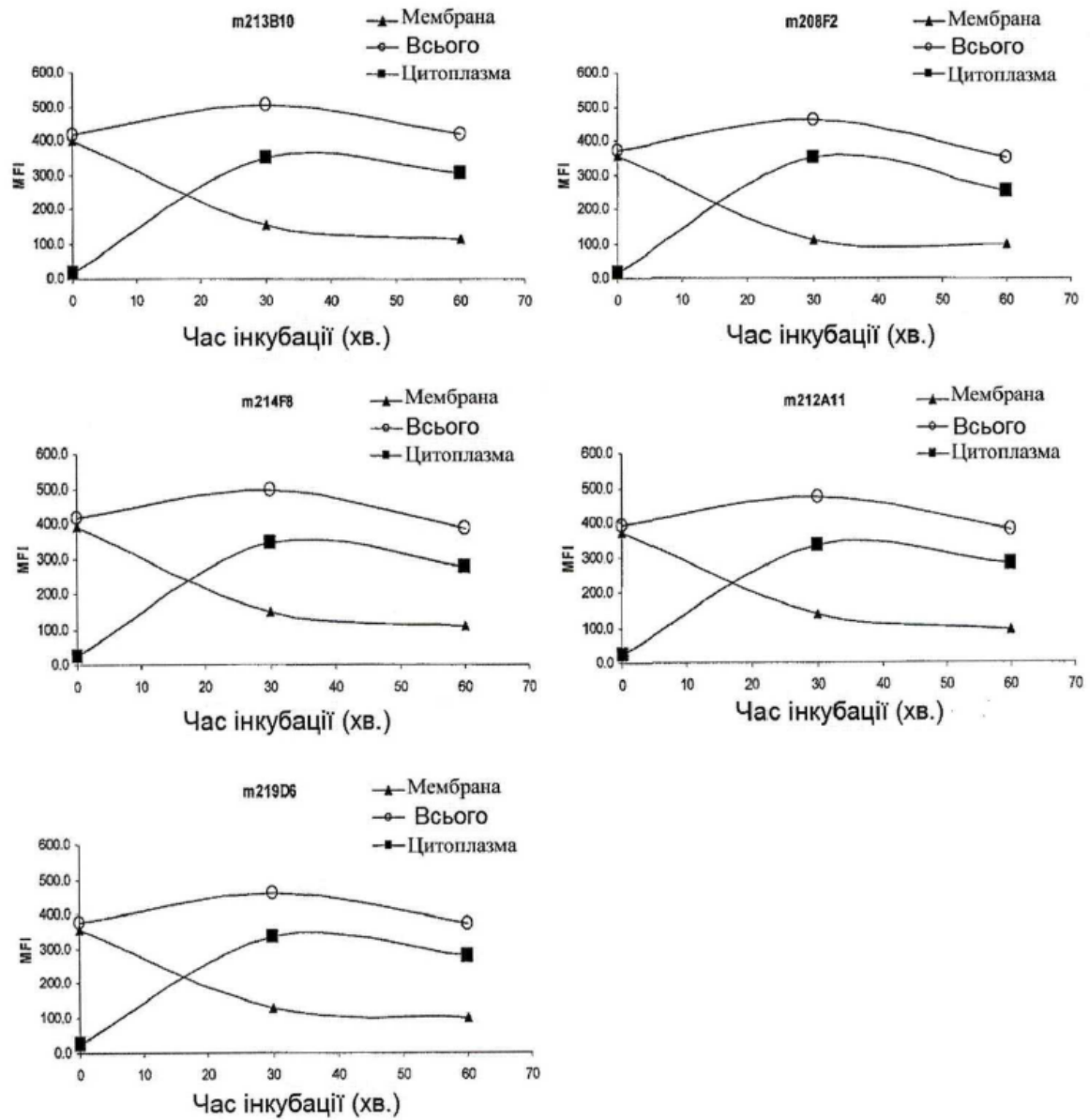
A



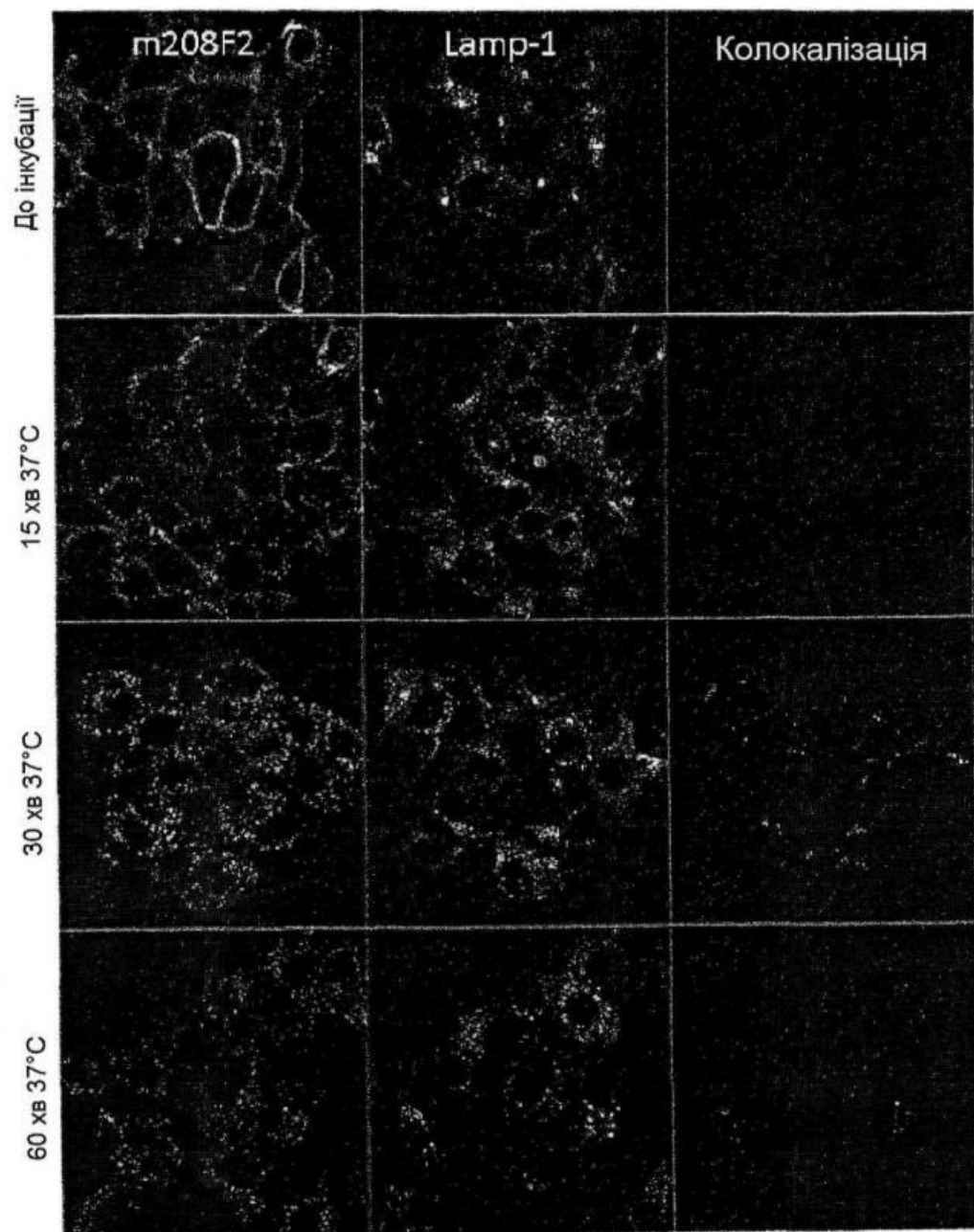
B

Антитіла	Час напівжиття (t1/2)
m208F2	11.11
m212A11	14.3
m214F8	16.81
m219D6	17.85
m213B10	12.83

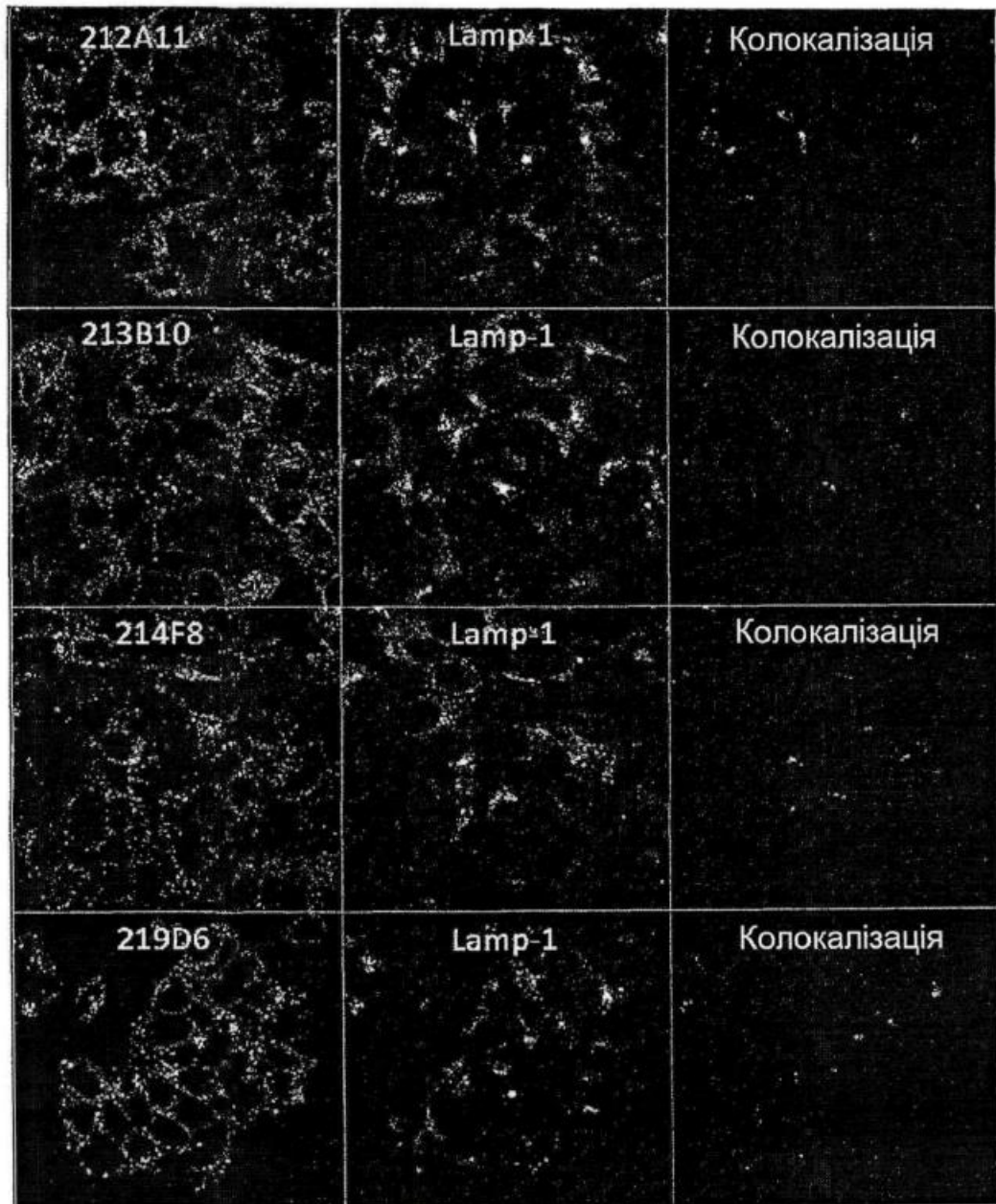
ФІГ. 10



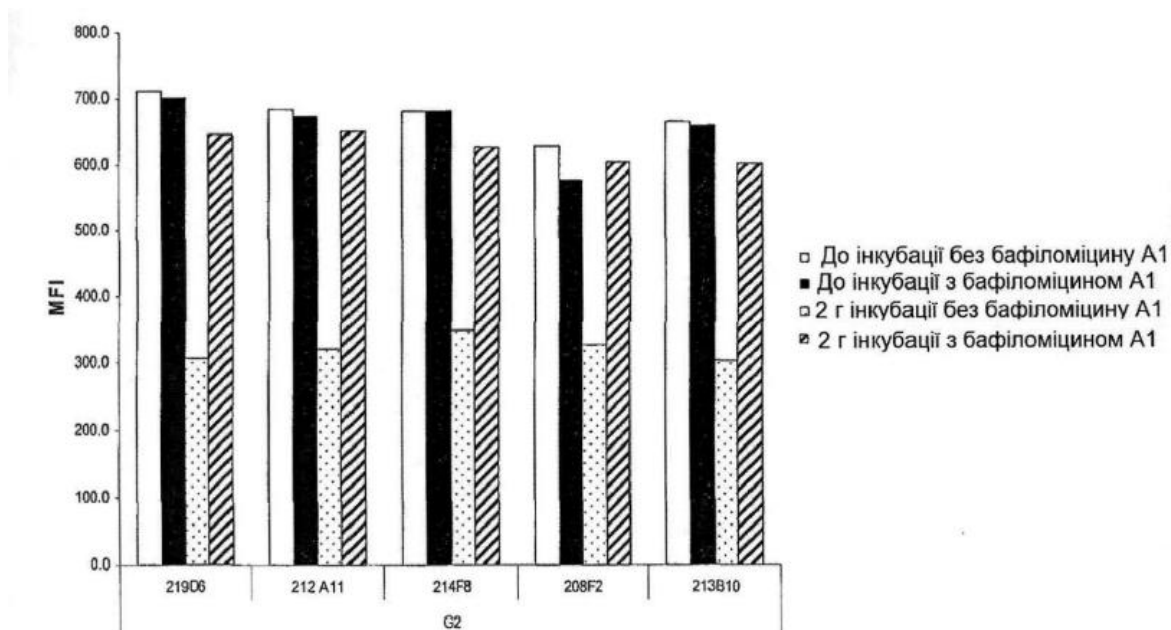
ФІГ. 11



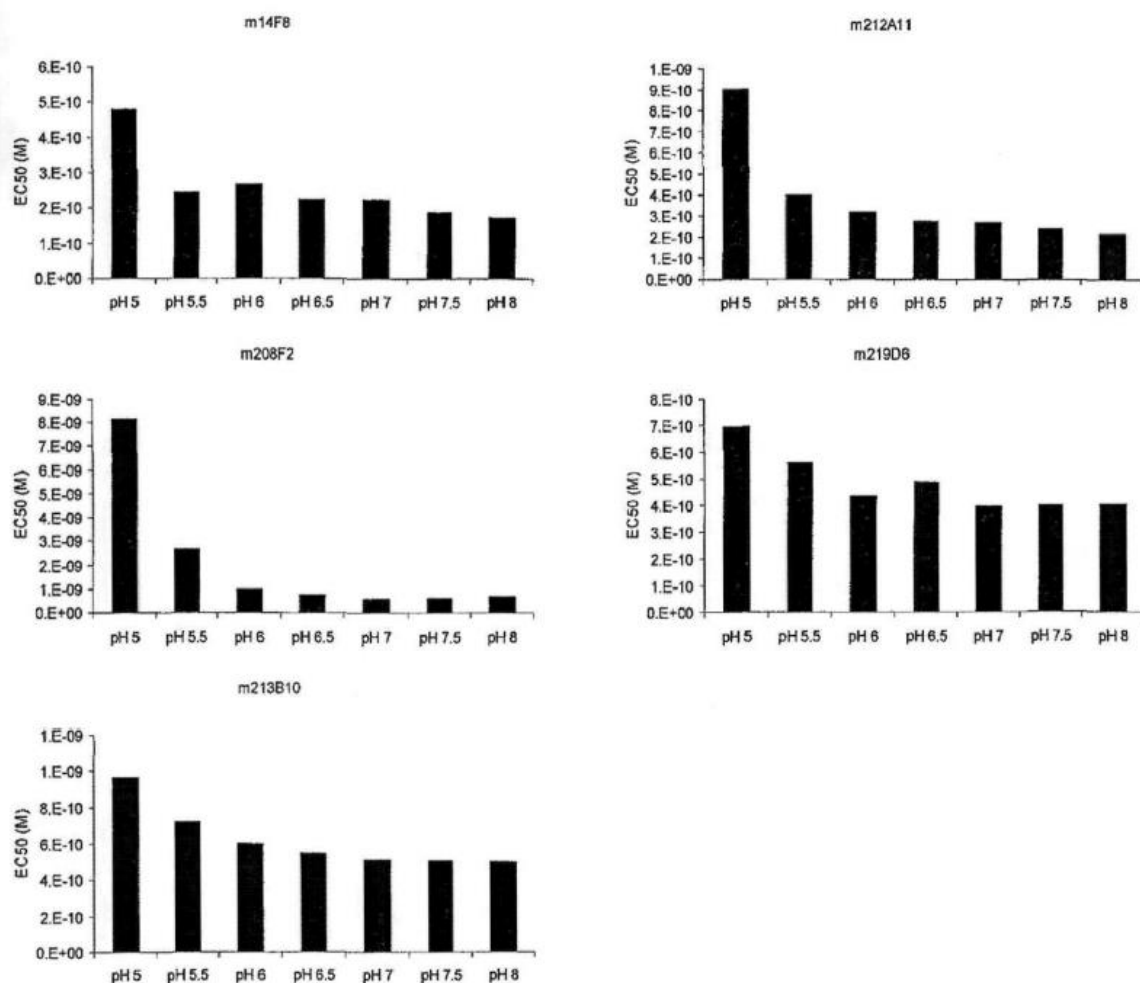
ФІГ. 12А



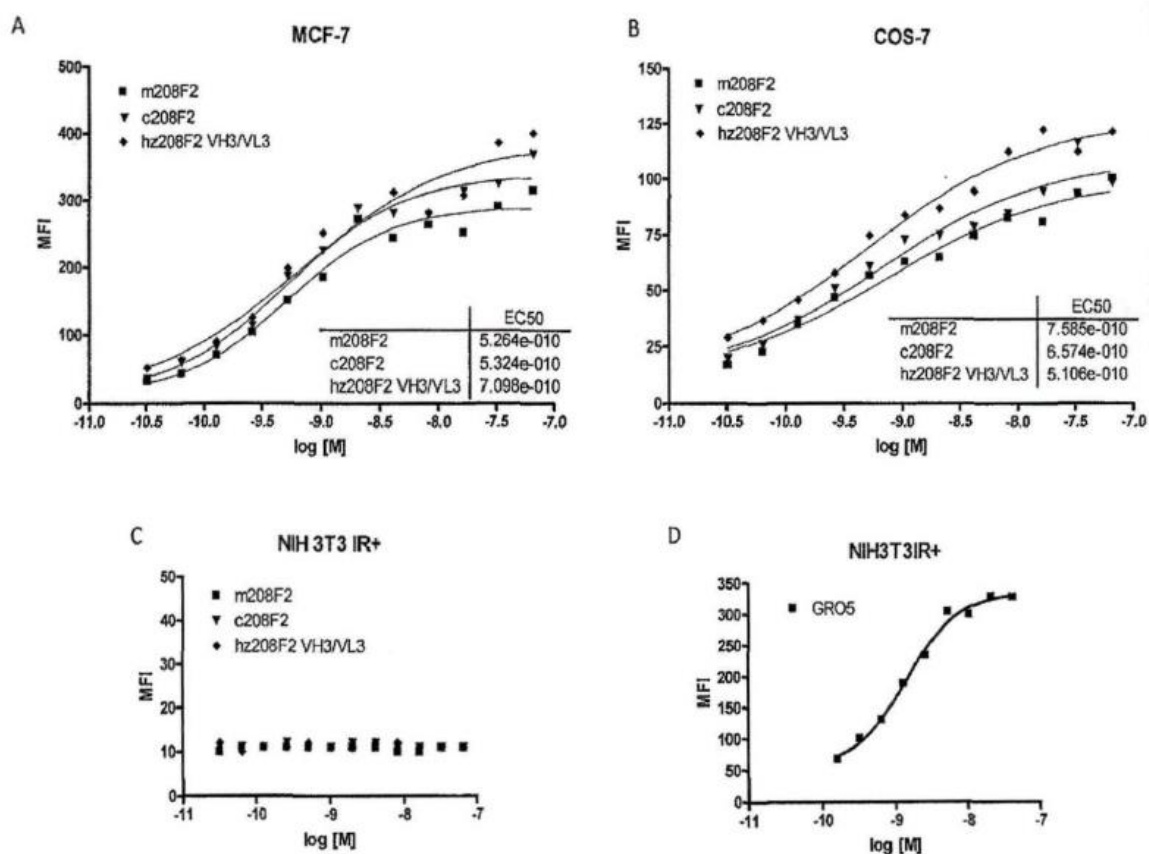
ФІГ. 12В



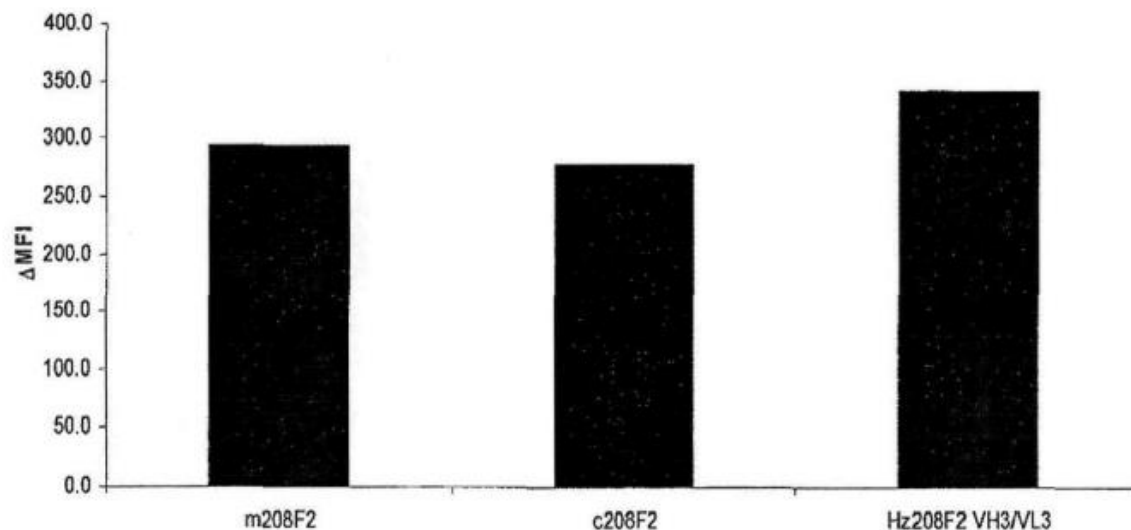
ФІГ. 13



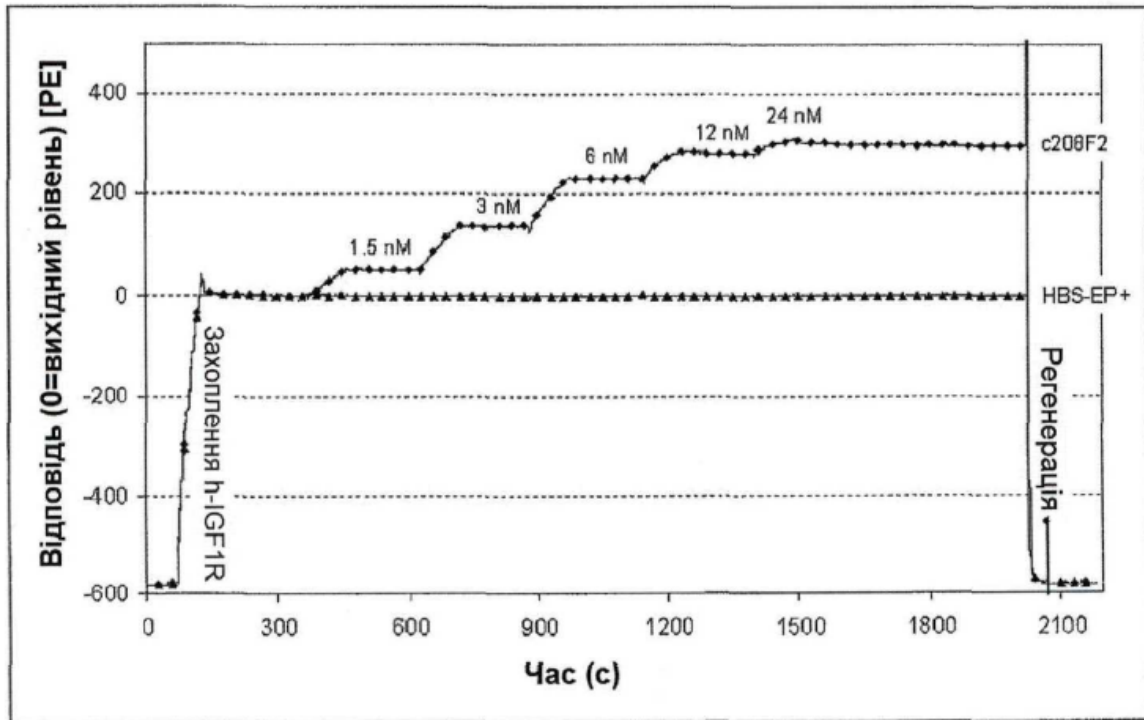
ФІГ. 14



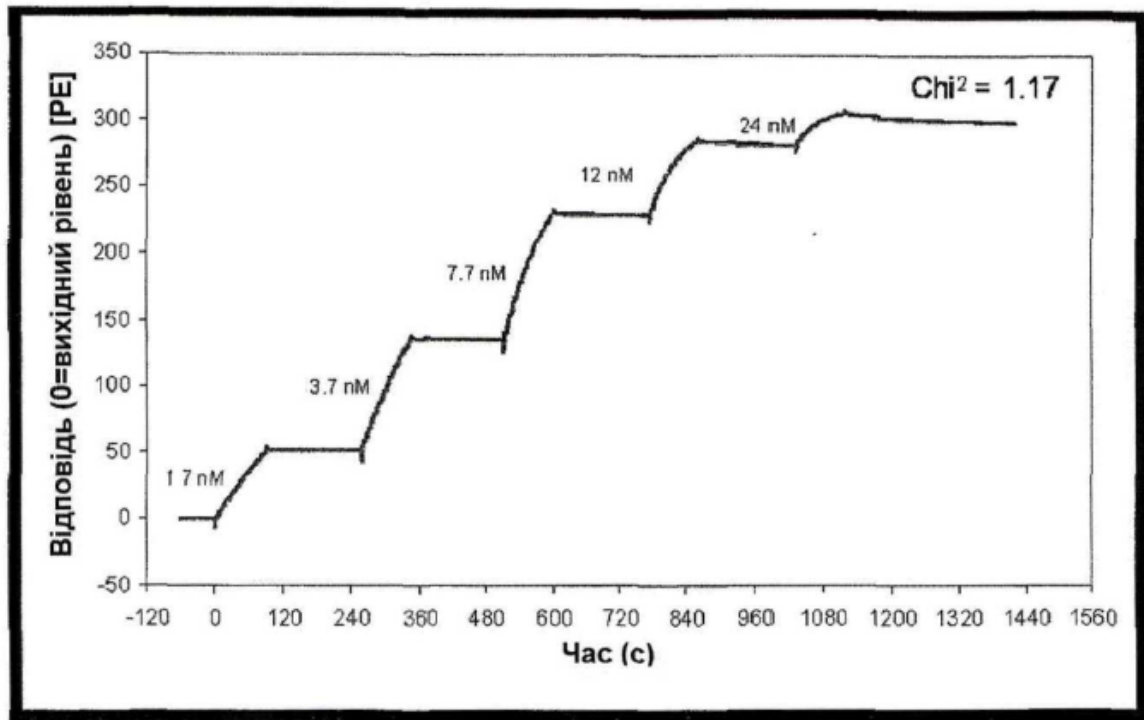
ΦΙΓ. 15



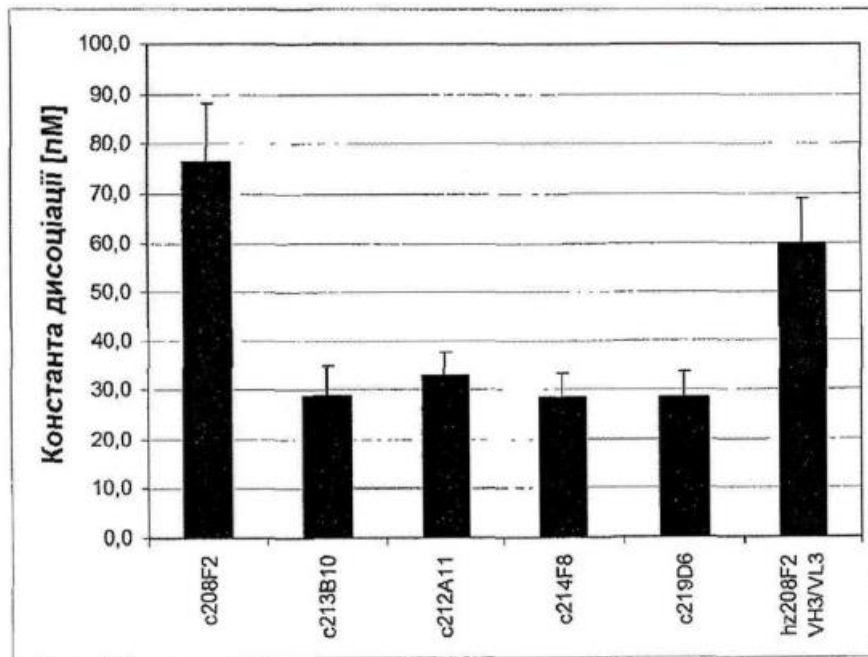
ΦΙΓ. 16



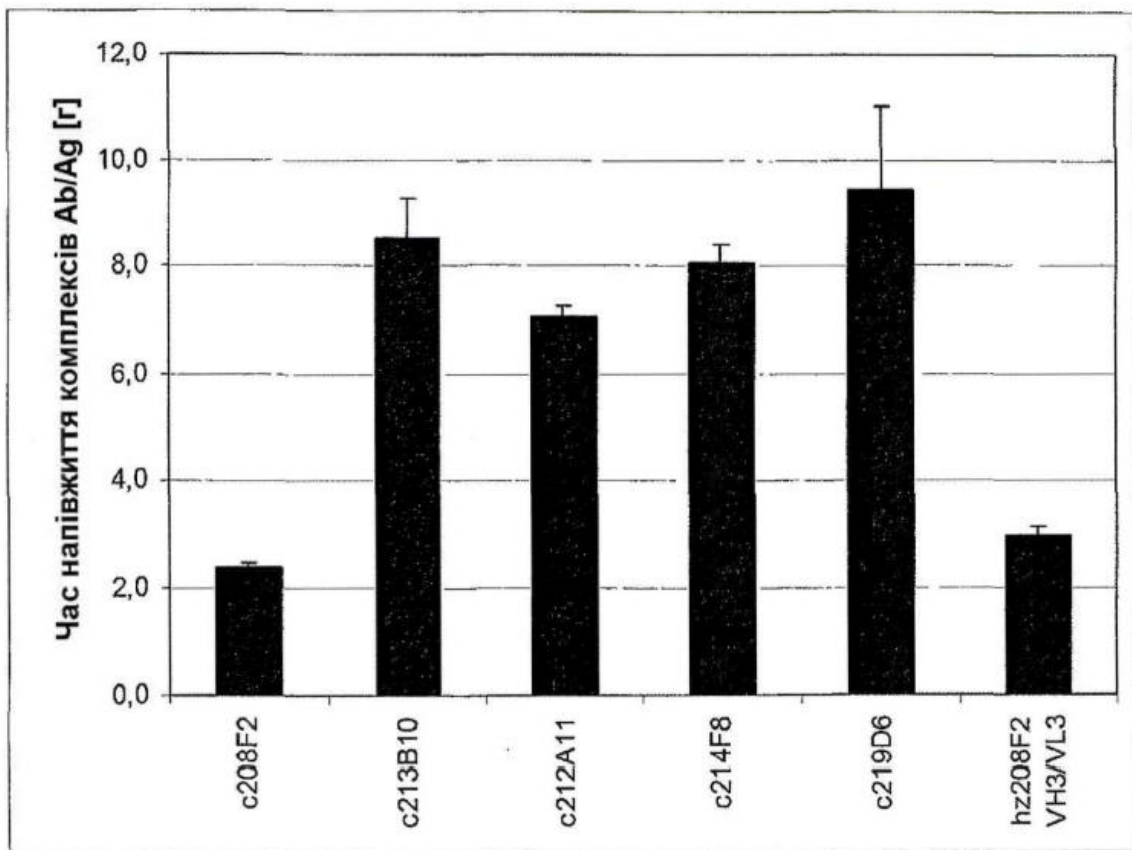
ФІГ. 17



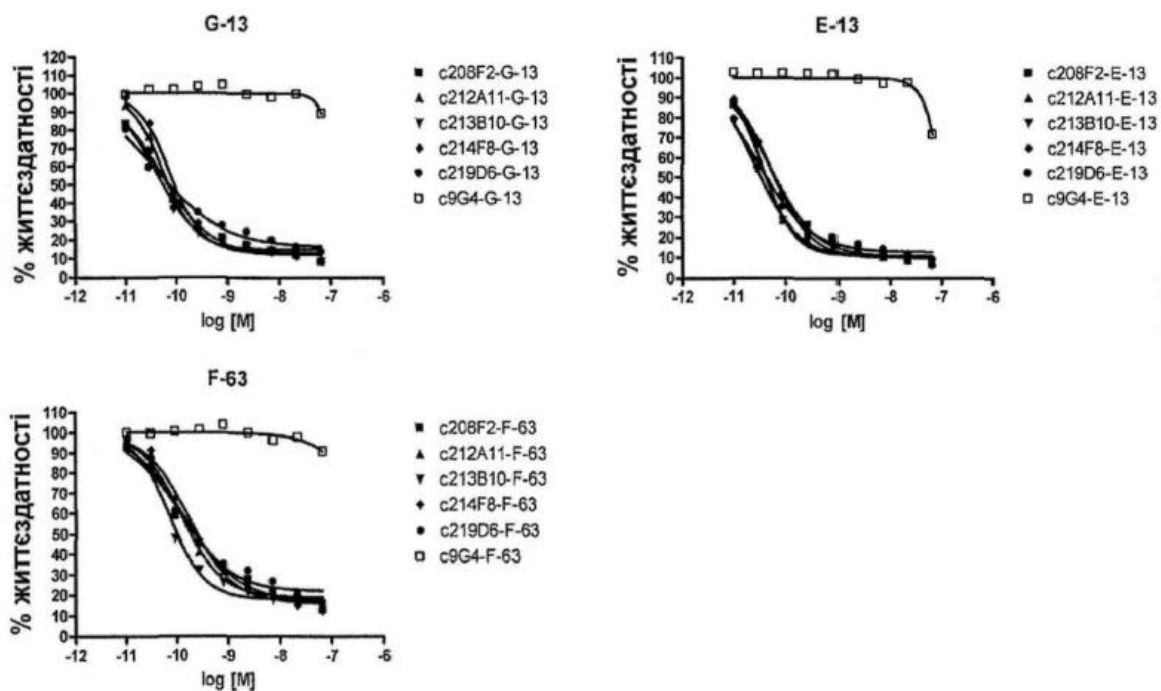
ФІГ. 18



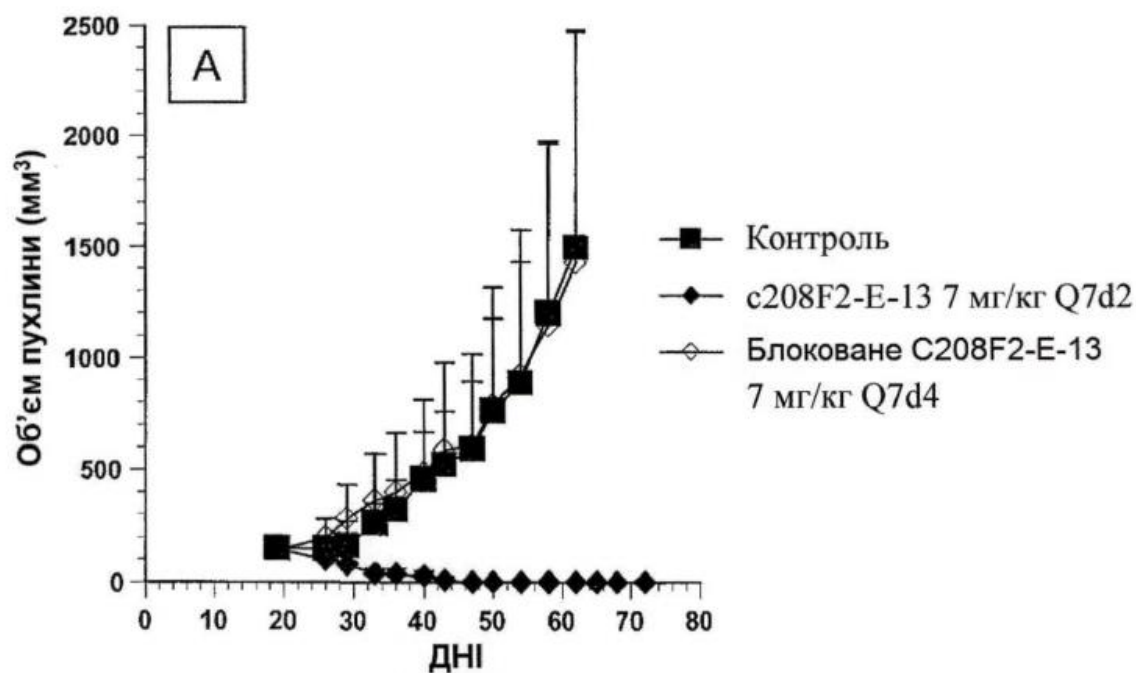
ФІГ. 19



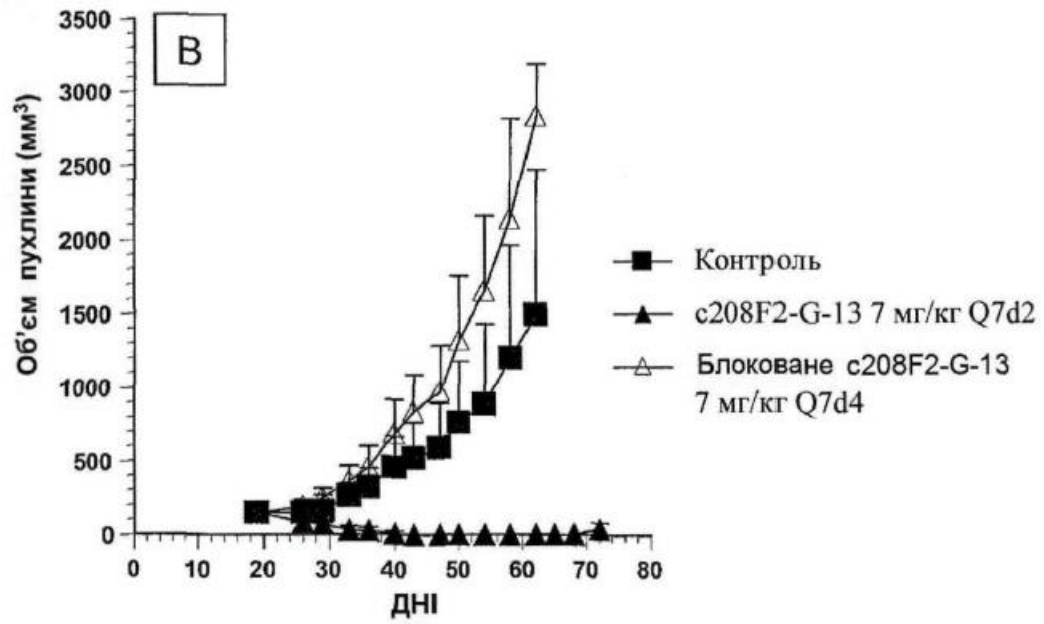
ФІГ. 20



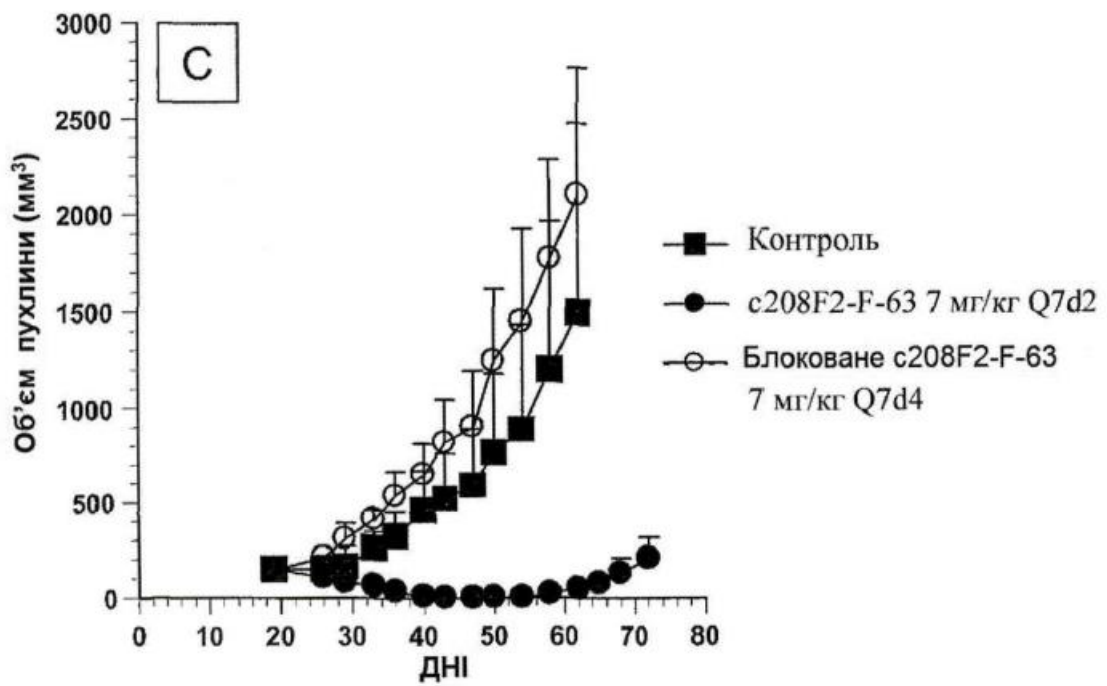
ФІГ. 21



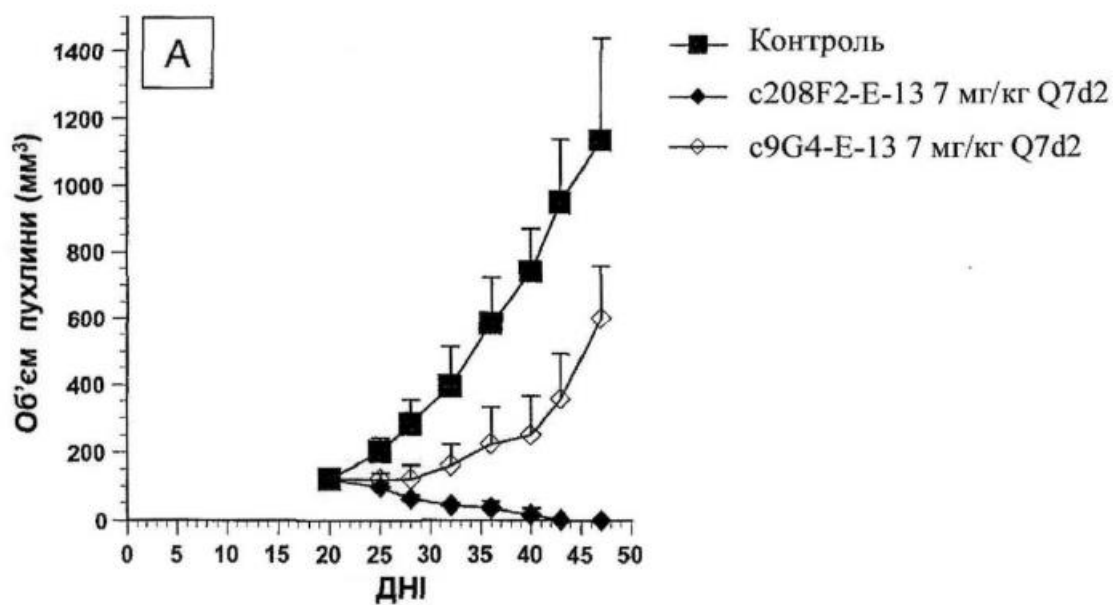
ФІГ. 22А



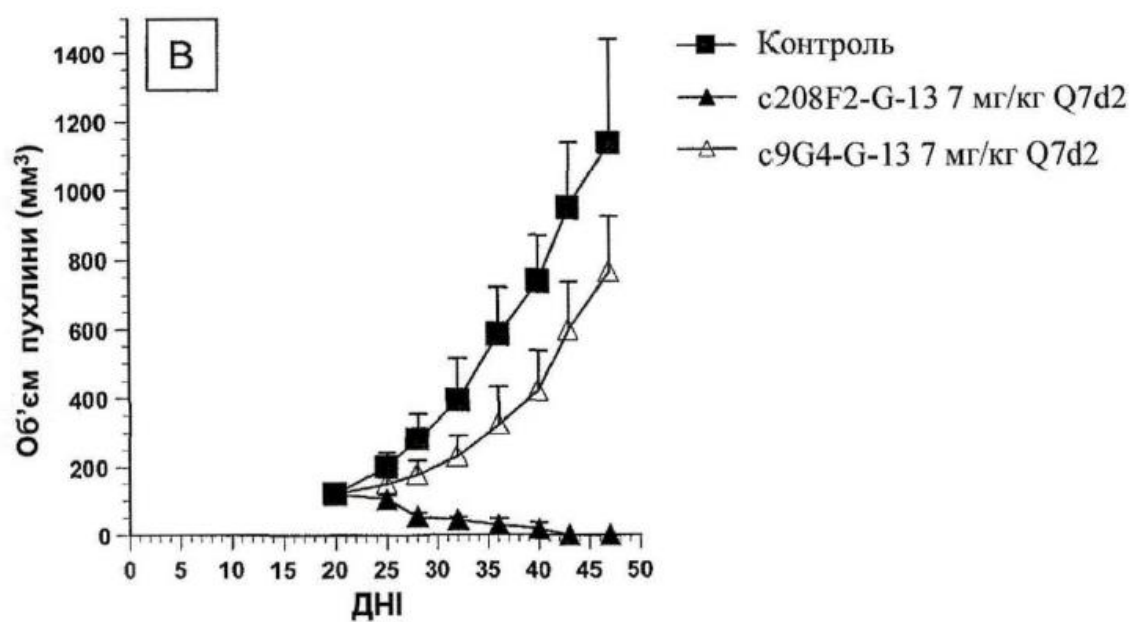
ФІГ. 22В



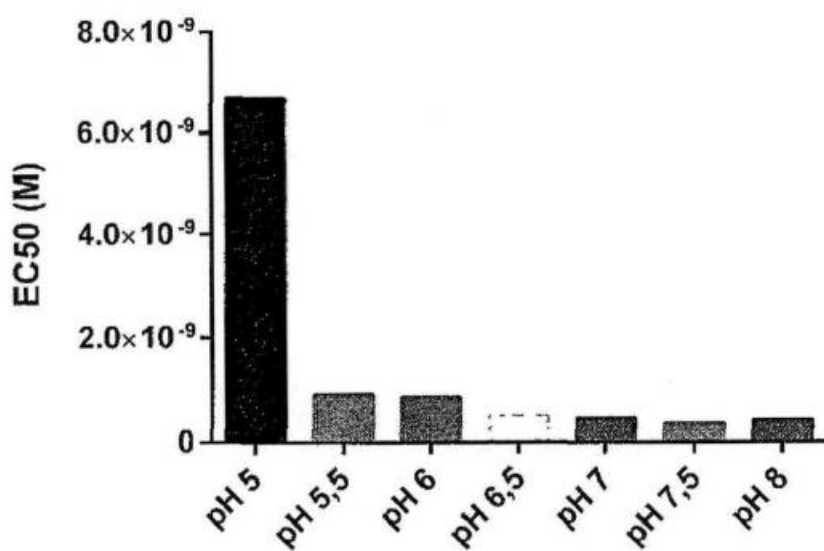
ФІГ. 22С



ФІГ. 23А

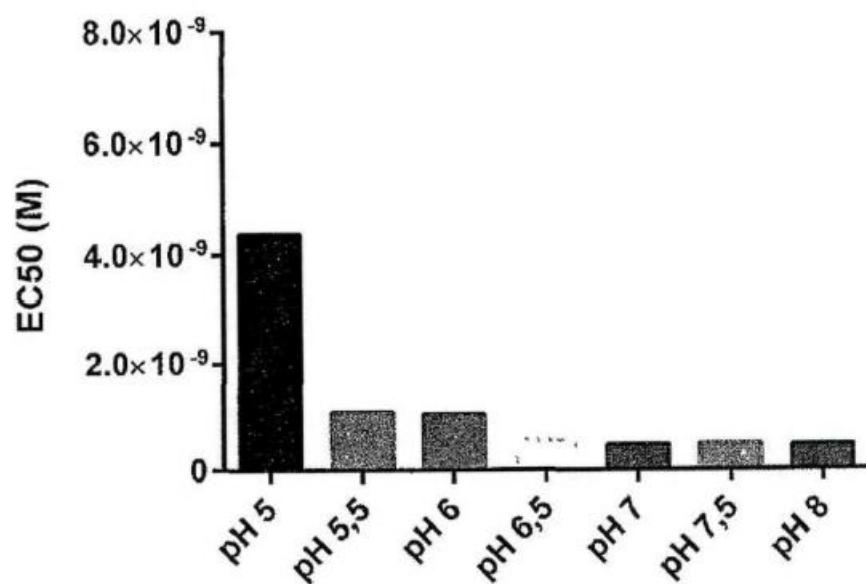


ФІГ. 23В

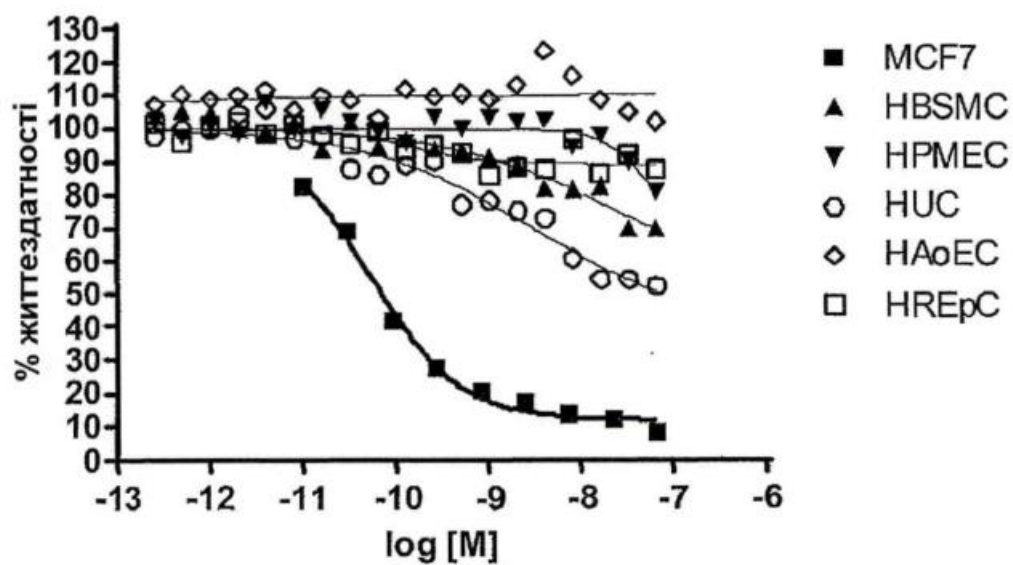


ФІГ. 24А

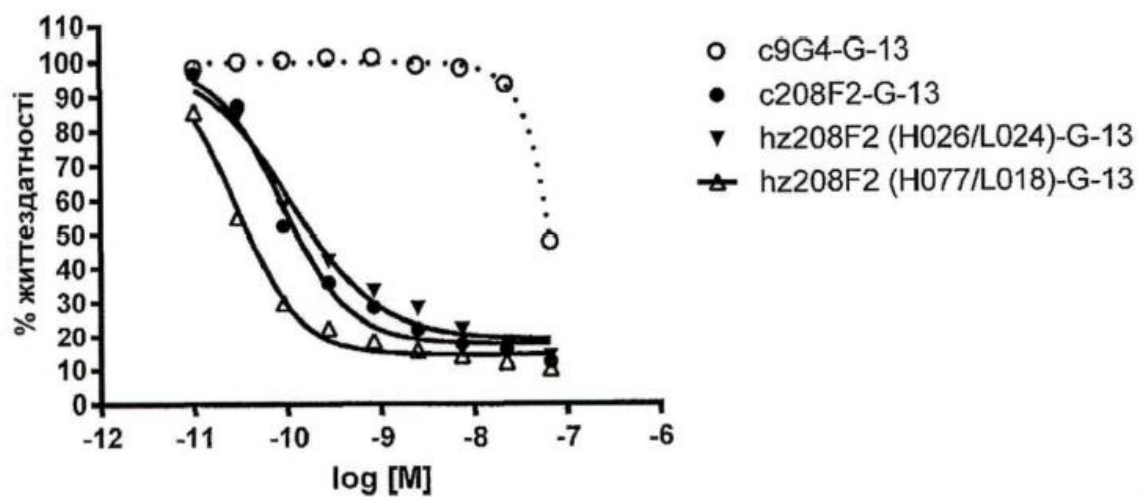
hz208F2 (H077/L018)



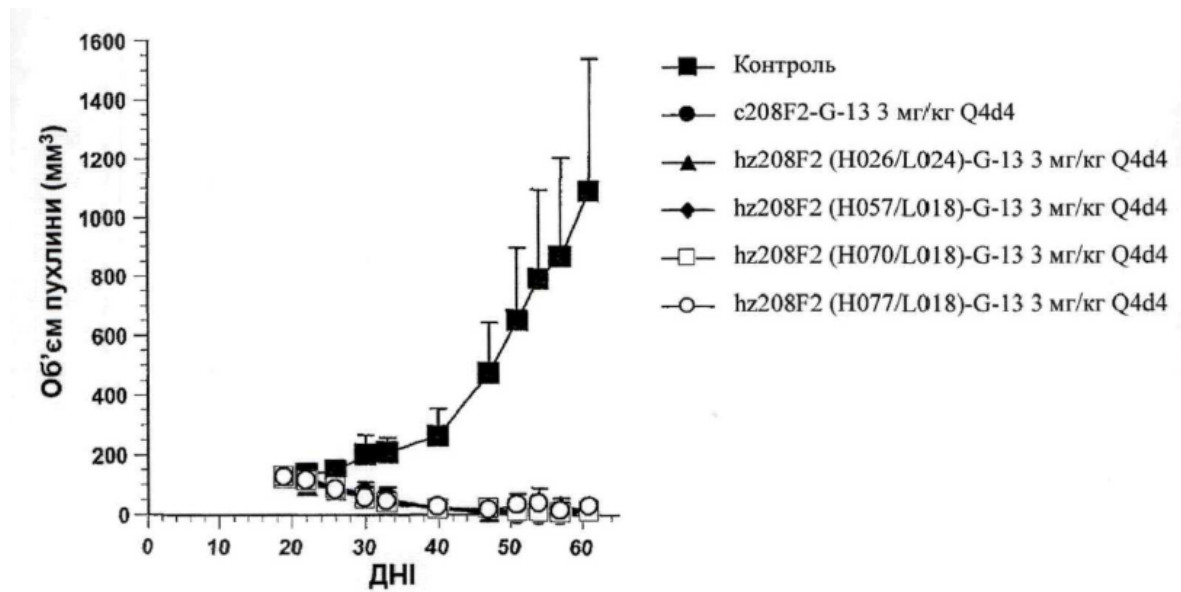
ФІГ. 24В



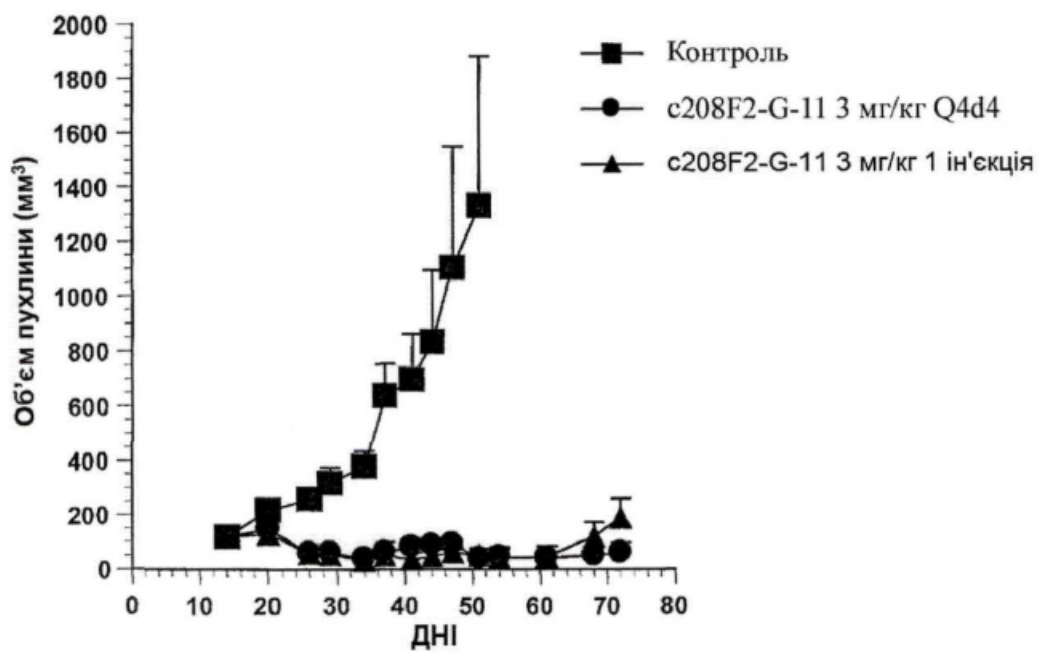
ФІГ. 25



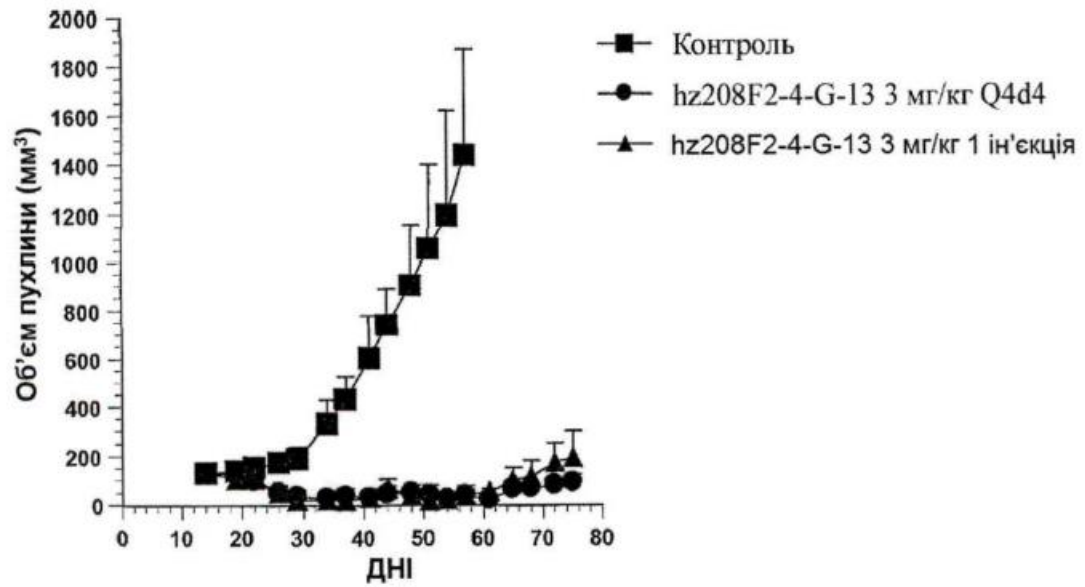
ФІГ. 26



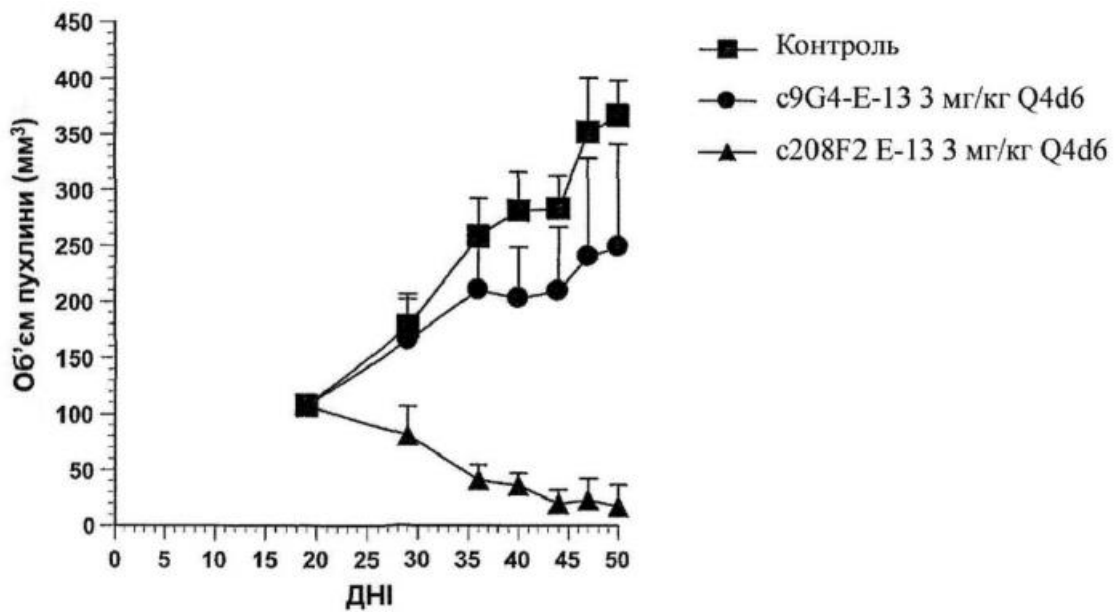
ФІГ. 27



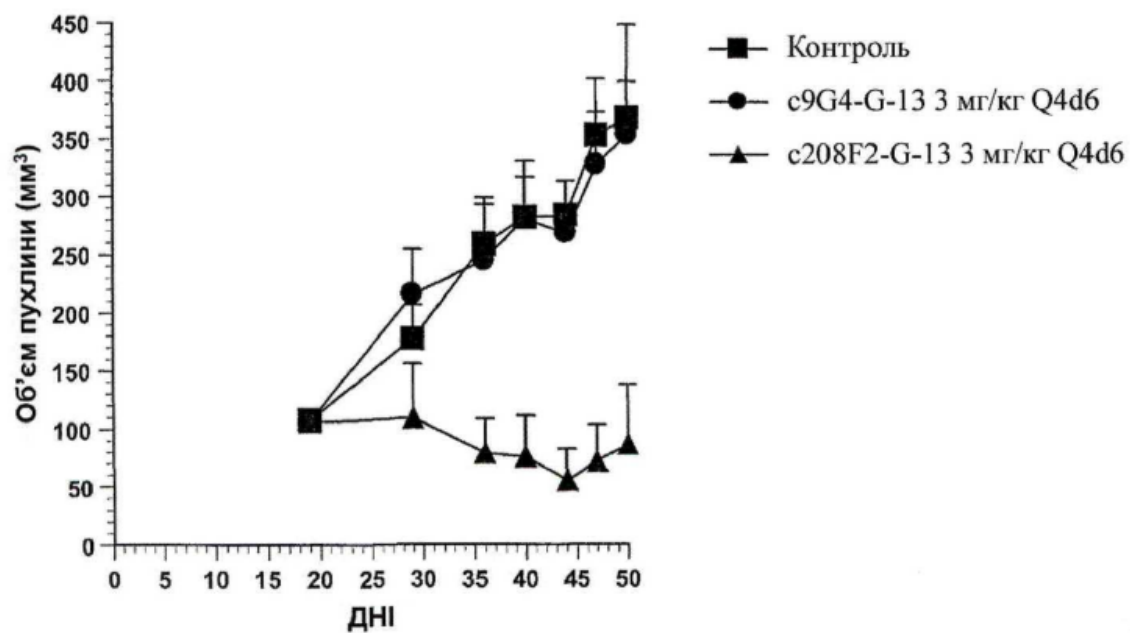
ФІГ. 28А



ФІГ. 28В



ФІГ. 29А



ФІГ. 29В

Комп'ютерна верстка А. Крижанівський

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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