(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 043790 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.23

(21) Номер заявки
201892068

(22) Дата подачи заявки
2017.03.13

(51) Int. Cl. ***A61P 35/00*** (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)

(54) КОНЪЮГАТЫ NaPi2b-НАЦЕЛЕННОЕ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **62/308,567; 62/323,068; 62/383,324**
(32) **2016.03.15; 2016.04.15; 2016.09.02**
(33) **US**
(43) **2019.03.29**
(86) **PCT/US2017/022155**
(87) **WO 2017/160754 2017.09.21**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕРСАНА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Бергстром Дональд А., Бодьяк Наталья Д., Лоуинджер Тимоти Б., Парк Питер Ю., Полинг Лаура Л., Юрковетский Александр В. (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) K. LIN ET AL.: "Preclinical Development of an Anti-NaPi2b (SLC34A2) Antibody-Drug Conjugate as a Therapeutic for Non-Small Cell Lung and Ovarian Cancers", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 21, no. 22, 8 July 2015 (2015-07-08), pages 5139-5150, XP055373355, US, ISSN: 1078-0432, DOI:10.1158/1078-0432.CCR-14-3383, page 5140, column 2, line 25 - line 37, page 5140, column 1, line 25 - line 35

DORONINA S.O. ET AL.: "Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy", NATURE BIOTECHNOLOGY, GALE GROUP INC, US, vol. 21, no. 7, 1 July 2003 (2003-07-01), pages 778-784, XP002280966, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/NBT832, figure 1

WO-A1-2012171020
WO-A1-2015054669
WO-A1-2009097128
WO-A1-2011130598

(57) Изобретение относится к конъюгатам NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство (например, конъюгатам NaPi2b-нацеленное антитело-полимер-лекарственное средство), которые специфически связываются с внеклеточной областью SLC34A2, и к способам применения таких конъюгатов во множестве терапевтических, диагностических и профилактических показаний.

043790 B1

043790 B1

Родственные заявки

По этой заявке испрашивается приоритет временной заявки на патент США 62/308,567, поданной 15 марта 2016; 62/323,068, поданной 15 апреля 2016, и 62/383,324, поданной 2 сентября 2016, на основании 35 USC 119 (e). Содержание каждой из этих заявок полностью включено в настоящее описание посредством ссылок.

Область раскрытия

Это раскрытие в целом относится к конъюгатам NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство (таким как NaPi2b-нацеленное антитело-полимер-лекарственное средство), которые специфически связываются с внеклеточной областью SLC34A2, и к способам применения этих конъюгатов в качестве терапевтических и/или диагностических средств.

Уровень техники

NaPi2b (SLC34A2, NaPiIIb, Npt2), мультитрансмембранный, натрий-зависимый транспортер фосфата (Xu et al., Genomics 62:281-284 62:281-284 (1999)), обычно экспрессируется в мембране щеточной каймы тонкого кишечника млекопитающих и участвует в трансцелюллярной абсорбции неорганического фосфата (Pi), способствуя поддержанию гомеостаза фосфата в организме. Экспрессия NaPi2b на уровне белка была обнаружена в печени, в апикальной поверхности эпителиальных клеток молочной, слюнной желез, а также в легких, яичке, слюнной железе, щитовидной железе, тонком кишечнике и матке. Мутации в NaPi2b были связаны с клиническими синдромами альвеолярного и тестикулярного микролитиаза. NaPi2b высоко экспрессируется при неплоскоклеточном немелкоклеточном раке легких (NSCLC), немуцинозном раке яичника и папиллярном раке щитовидной железы. NaPi2b-положительная иммунореактивность ткани присутствует в 61% образцов NSCLC и 92% образцов рака яичника.

Рак яичника является одним из наиболее распространенных гинекологических злокачественных заболеваний и пятой по частоте причиной смерти от рака у женщин. Высокие показатели смертности частично являются результатом частого диагностирования рака яичника на поздних стадиях, и смертность составляет приблизительно 65% от уровня заболеваемости. Эпителиальные опухоли яичника включают 58% всех опухолей яичника и более 90% злокачественных опухолей яичника. Хирургия для уменьшения объема опухоли и комбинированная химиотерапия на основе платины (включая таксаны) представляют собой используемые в настоящее время методики лечения; однако большинство пациентов с рецидивирующим эпителиальным раком яичника в конечном счете умирают от этого заболевания. Существует потребность в новых методиках лечения рака яичника, включая нацеленные терапии, такие как иммунотерапия с моноклональными антителами или подходы на основе противораковых вакцин.

NSCLC представляет собой эпителиальный рак легких любого типа кроме мелкоклеточного рака легкого (SCLC). NSCLC составляет приблизительно 85% всех заболеваний раком легких. Как класс, NSCLC относительно нечувствительны к химиотерапии по сравнению с мелкоклеточным раком. Если возможно, их прежде всего подвергают хирургической резекции с целью излечения, несмотря на то, что все более и более часто используется химиотерапия, как предоперационно (неоадъювантная химиотерапия), так и послеоперационно (адъювантная химиотерапия). При метастазировании или в неоперабельных случаях используется химиотерапия и/или иммунотерапия, несмотря на то, что заболевание на этой стадии является в основном неизлечимым, и время выживания остается коротким. Существует потребность в новых методиках лечения NSCLC, включая нацеленные терапии, такие как иммунотерапия с моноклональными антителами или подходы на основе противораковых вакцин.

Соответственно, существует потребность в терапевтических средствах, нацеливаемых на биологическую активность NaPi2b.

Сущность изобретения

Настоящее раскрытие относится к конъюгату NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство (такому как конъюгат NaPi2b-нацеленное антитело-полимер-лекарственное средство), который является биоразлагаемым, биологически совместимым и показывает высокую загрузку лекарственного средства, а также специфическое связывание с внеклеточной областью SLC34A2. Конъюгаты NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство (например, конъюгаты NaPi2b-нацеленное антитело-полимер-лекарственное средство) по изобретению включают антитело, специфически распознающее NaPi2b, также известный как натрий-зависимый белок транспорта фосфата 2B. Антитела, используемые в конъюгатах NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство, раскрытых здесь, также могут включать антитела, которые способны к и пригодны для модуляции, блокировки, ингибирования, ослабления, противодействия, нейтрализации или другого вмешательства в отношении по меньшей мере одной биологической активности NaPi2b. Антитела, раскрытые здесь, также включают антитела, связывающиеся с растворимым NaPi2b.

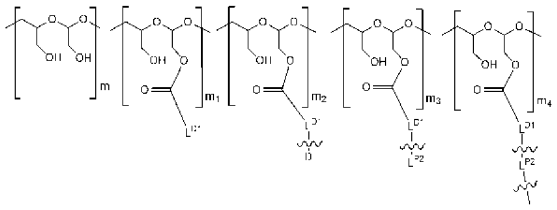
В некоторых вариантах осуществления NaPi2b-нацеленное антитело, раскрытое здесь, может быть связано с агентом с формированием конъюгата. В некоторых вариантах осуществления агент является терапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления агент является противоопухолевым средством. В некоторых вариантах осуществления агент является токсином или его фрагментом. В некоторых вариантах осуществления агент является (a) соединением ауристатина; (b) соединением калихеамицина; (c) соединением дуокармицина; (d) SN3 8, (e) пирролобензодиазепином; (f) соединением бар-

винка; (g) соединением тубулизина; (h) соединением неприродного камптотецина; (i) соединением маитансиноида; (j) ДНК-связывающим лекарственным средством; (k) ингибитором киназы; (l) ингибитором МЕК; (m) ингибитором KSP; (n) ингибитором топоизомеразы; (o) ДНК-алкилирующим лекарственным средством; (p) ингибитор РНК-полимеразы; или их аналогами. В некоторых вариантах осуществления агент конъюгируется с NaPi2b-нацеленным антителом через линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер является расщепляемым линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер является нерасщепляемым линкером. В некоторых вариантах осуществления агент является любым из токсинов, описанных здесь.

В одном аспекте конъюгат NaPi2b-нацеливаемого антитела, описанный здесь, включает выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело, связанное прямо или косвенно с одним или более терапевтическими или диагностическими средствами ("D"). В некоторых вариантах осуществления конъюгат NaPi2b-нацеливаемого антитела также включает один или более полимерных остовов, связанных с антителом, причем каждое одно или более D независимо связан с антителом через один или более полимерных остовов.

В некоторых вариантах осуществления каждый один или более полимерных остовов, связанных с выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом независимо включает поли-(1-гидроксиметилэтилен гидроксиметил-формаль) (PHF), например, PHF, имеющий молекулярную массу в пределах от приблизительно 2 кДа до приблизительно 40 кДа.

В некоторых вариантах осуществления каждый один или более полимерных остовов независимо имеет формулу (Ic):



(Ic),

в которой L^{D1} является карбонилсодержащей группой;

каждый $-C(=O)-L^{D1}-\overset{S}{\sim}-$ в $-C(=O)-L^{D1}-\overset{S}{\sim}-D$ независимо обозначает первый линкер, содержащий биоразлагаемую связь так, что, когда связь разорвана, D высвобождается в активной форме для его намеченного терапевтического эффекта; и

$-\overset{S}{\sim}-$ в $-C(=O)-L^{D1}-\overset{S}{\sim}-D$ между L^{D1} и D обозначает прямое или опосредованное присоединение D к L^{D1};

каждый $-C(=O)-L^{D1}-\overset{S}{\sim}-L^{P2}$ независимо обозначает второй линкер, еще не присоединенный к выделенному антителу, в котором L^{P2} является группой, содержащей функциональную группу, которая должна образовывать ковалентную связь с функциональной группой выделенного антитела, и $-\overset{S}{\sim}-$ между L^{D1} и L^{P2} обозначает прямое или опосредованное присоединение L^{P2} к L^{D1}, и каждый второй линкер является отличным от каждого первого линкера;

каждый $-C(=O)-L^{D1}-\overset{S}{\sim}-L^{P2}-\overset{S}{\sim}-$ независимо обозначает третий линкер, соединяющий каждый D-несущий полимерный остов с выделенным антителом, в котором концевой $-\overset{S}{\sim}-$, присоединенный к L^{P2}, обозначает прямое или опосредованное присоединение L^{P2} к выделенному антителу после формирования ковалентной связи между функциональной группой L^{P2} и функциональной группой выделенного антитела; и каждый третий линкер является отличным от каждого первого линкера;

m является целым числом от 1 до приблизительно 300,

m_1 является целым числом от 1 до приблизительно 140,

m_2 является целым числом от 1 до приблизительно 40,

m_3 является целым числом от 0 до приблизительно 18,

m_4 является целым числом от 1 до приблизительно 10;

сумма m, m_1, m_2, m_3 и m_4 составляет от приблизительно 15 до приблизительно 300;

общее число L^{P2}, связанного с выделенным антителом, составляет 10 или меньше.

Конъюгат, описанный здесь, может включать один или более следующих признаков.

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело имеет молекулярную массу 40 кДа или более (например, 60 кДа или более, 80 кДа или более, 100 кДа или более, 120 кДа или более, 140 кДа или более, 160 кДа или более, 180 кДа или более, или 200 кДа или более, или приблизительно 40-200 кДа, 40-180 кДа, 40-140 кДа, 60-200 кДа, 60-180 кДа, 60-140 кДа, 80-200 кДа, 80-180 кДа, 80-140 кДа, 100-200 кДа, 100-180 кДа, 100-140 кДа или 140-150 кДа). В некоторых вариантах осуществления, выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело или любое антитело согласно раскрытию, включая, в качестве неограничивающего примера, антитело XMT 1535 и антитело 10H1.11.4B, описанное здесь.

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело специфически связывается с эпитопом человеческого NaPi2b. В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело специфически связывается с эпитопом на внеклеточной области человеческого NaPi2b.

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело является антителом XMT 1535 и/или антителом 10H1.11.4B, описанным здесь, а также их биоаналогами. Также моноклональное антитело является антителом, связывающимся с тем же эпитопом и/или перекрестно блокирует антитело согласно раскрытию или его биоаналоги. Эти антитела соответственно упоминаются здесь как "антитела NaPi2b" или "NaPi2b-нацеливаемые антитела". Антитела NaPi2b включают полностью человеческие моноклональные антитела, а также гуманизированные моноклональные антитела и химерные антитела. Эти антитела показывают специфичность в отношении человеческого NaPi2b, и они могут модулировать, блокировать, ингибировать, уменьшать, противодействовать, нейтрализовать или иначе вмешиваться по меньшей мере в одну активность NaPi2b.

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело является моноклональным антителом.

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело является антителом кролика, мыши, химерным, гуманизированным или полностью человеческим моноклональным антителом.

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело является изотипом IgG. В некоторых вариантах осуществления выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело является изотипом IgG1.

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 1 (CDRH1), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 5),

вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 2 (CDRH2), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности; и вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 3 (CDRH3), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности GETARATFAY (SEQ ID NO: 7). Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 1 (CDRL1), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 8); вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 2 (CDRL2), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности YTSSLYS (SEQ ID NO: 9); и вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 3 (CDRL3), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 10).

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает CDRH1, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 5); CDRH2, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 6); CDRH3, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности GETARATFAY (SEQ ID NO: 7); CDRL1, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 8); CDRL2, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности YTSSLYS (SEQ ID NO: 9); и CDRL3, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности QQYSKLPLT(SEQ ID NO: 10).

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 1 (CDRH1), включающий аминокислотную последовательность GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 5), вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 2 (CDRH2), включающий аминокислотную последовательность AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 6); и вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 3 (CDRH3), включающий аминокислотную последовательность GETARATFAY (SEQ ID NO: 7). Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 1 (CDRL1), включающий аминокислотную последовательность SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 8); вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 2 (CDRL2), включающий аминокислотную последовательность YTSSLYS (SEQ ID NO: 9); и вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 3 (CDRL3), включающий аминокислотную последовательность

QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 10).

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает CDRH1, включающий аминокислотную последовательность GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 5); CDRH2, включающий аминокислотную последовательность AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 6); переменный CDRH3, включающий аминокислотную последовательность GETARATFAY (SEQ ID NO: 7); CDRL1, включающий аминокислотную последовательность SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 8); CDRL2, включающий аминокислотную последовательность YTSSLYS (SEQ ID NO: 9); и CDRL3, включающий аминокислотную последовательность QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 10).

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3. например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает область VH, включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, и область VL, включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3. В некоторых вариантах осуществления антитела, используемые в конъюгатах антитело-лекарственное средство, раскрытых здесь, включают вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает область VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и область VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1. например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 1 (CDRH1), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности GFSFSDFAMS (SEQ ID NO: 18); вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 2 (CDRH2), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности ATIGRVAFHTYYPDSMKG (SEQ ID NO: 19); и вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 3 (CDRH3), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности ARHRGFDVGHFDF (SEQ ID NO: 20). Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 1 (CDRL1), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности

RSSETLVHSSGNTYLE (SEQ ID NO: 21); вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 2 (CDRL2), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности RVSNRFS (SEQ ID NO: 22); и вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 3 (CDRL3), включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности FQGSFNPLT(SEQ ID NO: 23).

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает CDRH1, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности GFSFSDFAMS (SEQ ID NO: 18); CDRH2, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности ATIGRVAFHTYYPDSMKG (SEQ ID NO: 19); CDRH3, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности ARHRGFDVGHFDF (SEQ ID NO: 20); CDRL1, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности RSSETLVHSSGNTYLE (SEQ ID NO: 21) CDRL2, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности RVSNRFS (SEQ ID NO: 22); и CDRL3, включающий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности FQGSFNPLT(SEQ ID NO: 23).

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 1 (CDRH1), включающий аминокислотную последовательность GFSFSDFAMS (SEQ ID NO: 18); вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 2 (CDRH2), включающий аминокислотную последовательность ATIGRVAFHTYYPDSMKG (SEQ ID NO: 19); и вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 3 (CDRH3), включающий аминокислотную последовательность ARHRGFDVGHFDF (SEQ ID NO: 20). Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 1 (CDRL1), включающий аминокислотную последовательность RSSETLVHSSGNTYLE (SEQ ID NO: 21); вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 2 (CDRL2), включающий аминокислотную последовательность RVSNRFS (SEQ ID NO: 22); и вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 3 (CDRL3), включающий аминокислотную последовательность FQGSFNPLT (SEQ ID NO: 23).

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает CDRH1, включающий аминокислотную последовательность GFSFSDFAMS (SEQ ID NO: 18); CDRH2, включающий аминокислотную последовательность ATIGRVAFHTYYPDSMKG (SEQ ID NO:19); CDRH3, включающий аминокислотную последовательность ARHRGFDVGHFDF (SEQ ID NO: 20); CDRL1, включающий аминокислотную последовательность RSSETLVHSSGNTYLE (SEQ ID NO: 21); CDRL2, включающий аминокислотную последовательность RVSNRFS (SEQ ID NO: 22); и CDRL3, включающий аминокислотную последовательность FQGSFNPLT (SEQ ID NO: 23).

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16. например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17.

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает область VH, включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16, и область VL, включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17.

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает вариабельную область тяжелой цепи (VH), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16. например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает вариабельную область легкой цепи (VL), включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает область VH, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, и область VL, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14. например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15.

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 15.

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15.

Например, в формуле (Ic) выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело является выделенным антителом, конкурирующим за специфическое связывание с человеческим NaPi2b с выделенным антителом, включающим (i) вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 1 (CDRH1), включающий аминокислотную последовательность GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 5); вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 2 (CDRH2), включающий аминокислотную последовательность AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 6); вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 3 (CDRH3), включающий аминокислотную последовательность GETARATFAY (SEQ ID NO: 7); вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 1 (CDRL1), включающий аминокислотную последовательность SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 8); вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 2 (CDRL2), включающий аминокислотную последовательность YTSSLYS (SEQ ID NO: 9); и вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 3 (CDRL3), включающий аминокислотную последовательность QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 10) или (ii) CDRH1, включающий аминокислотную последовательность GFSFSDFAMS (SEQ ID NO: 18); CDRH2, включающий аминокислотную последовательность ATIGRVAFHTYYPDSMKG (SEQ ID NO: 19); CDRH3, включающий аминокислотную последовательность ARHRGFDVGHFDF (SEQ ID NO: 20); CDRL1, включающий аминокислотную последовательность RSSETLVHSSGNTYLE (SEQ ID NO: 21); CDRL2, включающий аминокислотную последовательность RVSNRFS (SEQ ID NO: 22); и CDRL3, включающий аминокислотную последовательность FQGSFNPLT(SEQ ID NO: 23).

Например, в формуле (Ic) m_1 является целым числом от 1 до приблизительно 120 (например, приблизительно 1-90), и/или m_3 является целым числом от 1 до приблизительно 10 (например, приблизительно 1-8).

Например, когда PHF в формуле (Ic) имеет молекулярную массу в пределах от приблизительно 6 кДа до приблизительно 20 кДа (т.е. сумма m, m_1, m_2, m_3 и m_4 находится в пределах от приблизительно 45 до приблизительно 150), m_2 является целым числом от 2 до приблизительно 20, m_3 является целым числом от 0 до приблизительно 9, m_4 является целым числом от 1 до приблизительно 10, и/или m_1 является целым числом от 1 до приблизительно 75 (например, m_1 составляет приблизительно 4-45).

Например, когда PHF в формуле (Ic) имеет молекулярную массу в пределах от приблизительно 8 кДа до приблизительно 15 кДа (т.е. сумма m, m_1, m_2, m_3 и m_4 находится в пределах от приблизительно 60 до приблизительно 110), m_2 является целым числом от 2 до приблизительно 15, m_3 является целым числом от 0 до приблизительно 7, m_4 является целым числом от 1 до приблизительно 10, и/или m_1 является целым числом от 1 до приблизительно 55 (например, m_1 составляет приблизительно 4-30).

Например, когда PHF в формуле (Ic) имеет молекулярную массу в пределах от приблизительно 2 кДа до приблизительно 20 кДа (т.е. сумма m, m_1, m_2, m_3 и m_4 находится в пределах от приблизительно 15 до приблизительно 150), m_2 является целым числом от 1 до приблизительно 20, m_3 является целым числом от 0 до приблизительно 10 (например, m_3 в пределах от 0 до приблизительно 9), m_4 является целым числом от 1 до приблизительно 8, и/или m1 является целым числом от 1 до приблизительно 70, и общее число L^{P2}, связанных с выделенным антителом, составляет от приблизительно 2 до приблизительно 8 (например, приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

Например, когда PHF в формуле (Ic) имеет молекулярную массу в пределах от приблизительно 3 кДа до приблизительно 15 кДа (т.е. сумма m, m_1, m_2, m_3 и m_4 находится в пределах от приблизительно 20 до приблизительно 110), m_2 является целым числом от 2 до приблизительно 15, m_3 является целым числом от 0 до приблизительно 8 (например, m_3 в пределах от 0 до приблизительно 7), m_4 является целым

числом от 1 до приблизительно 8, и/или m_1 является целым числом от 2 до приблизительно 50, и общее число L^{P2}, связанных с выделенным антителом, составляет от приблизительно 2 до приблизительно 8 (например, приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

Например, когда PHF в формуле (Ic) имеет молекулярную массу в пределах от приблизительно 5 кДа до приблизительно 10 кДа, (т.е. сумма m, m_1, m_2, m_3 и m_4 находится от приблизительно 40 до приблизительно 75), m_2 является целым числом от приблизительно 2 до приблизительно 10 (например, m_2 составляет приблизительно 3-10), m_3 является целым числом от 0 до приблизительно 5 (например, m_3 находится в пределах от 0 до приблизительно 4), m_4 является целым числом от 1 до приблизительно 8 (например, m_4 находится в пределах от 1 до приблизительно 5), и/или m_1 является целым числом от приблизительно 2 до приблизительно 35 (например, m_1 составляет приблизительно 5-35), и общее число L^{P2}, связанных с выделенным антителом, составляет от приблизительно 2 до приблизительно 8 (например, приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

Например, каждый D независимо является терапевтическим средством, например, имеющим молекулярную массу ≤ 5 кДа.

Например, каждый D независимо является диагностическим средством или меткой.

Например, в некоторых случаях D независимо являются терапевтическими средствами (например, имеющими молекулярную массу ≤5 кДа), и в других случаях D являются диагностическими средствами или метками.

Например, каждый D независимо является лекарственным средством от рака, например, выбранный из алкалоидов барвинка, ауристатинов, тубулизинов, дуокармицинов, ненатуральных соединений камптотецина, маитансиноидов, соединений калихеамицина, ингибиторов топоизомеразы, пирролобензодиазепинов, ДНК-связывающих лекарственных средств, ДНК-алкилирующих лекарственных средств, ингибиторов РНК-полимеразы, ингибиторов киназы, ингибиторов МЕК, ингибиторов KSP и их аналогов.

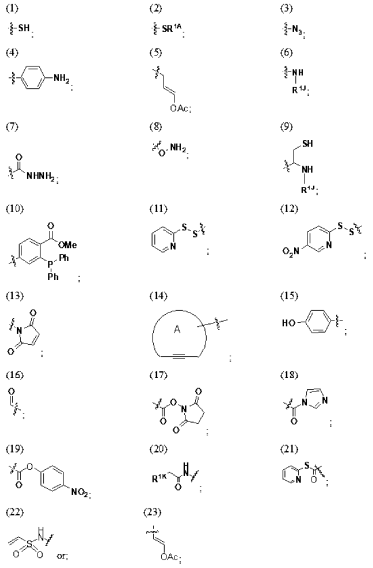
Например, каждое соединение ауристатина представляет собой ауристатин, доластатин (например, доластатин 10 или доластатин 15), монометилауристатин E (MMAE), монометилауристатин F (MMAF), ауристатин F гидроксипропил амид (AF HPA), монометилауристатин F гидроксипропил амид (AF HPA) или ауристатин F фенилендиамин (AFP).

Например, каждый дуокармицин или его аналог представляет собой дуокармицин A, дуокармицин B1, дуокармицин B2, дуокармицин C1, дуокармицин C2, дуокармицин D, дуокармицин SA, CC-1065, адозелезин, бизелезин или карзелезин.

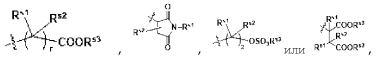
Например, каждое соединение камптотецина представляет собой камптотецин, CPT-11 (иринотекан), SN-38 или топотекан.

Например, каждое соединение пирролобензодиазепина представляет собой мономер пирролобензодиазепина, симметрический димер пирролобензодиазепина или несимметрический димер пирролобензодиазепина.

Например, каждый , если он не связан с выделенным антителом, независимо включает концевую группу W_P, причем каждая W^P независимо обозначает:



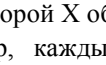
в которых R^{1K} является уходящей группой (например, галогенидом или RC(O)O-, в котором R является водородом, алифатической, гетероалифатической, карбоциклической или гетероциклоалкильной группой), R^{1A} является защитной группой для серы, и кольцо A является циклоалкилом или гетероциклоалкилом, и R^{1J} является водородом, алифатической, гетероалифатической, карбоциклической или гетероциклоалкильной группой.

Например, каждый R^{1A} независимо обозначает  , в которых r равняется 1 или 2 и каждый из R^{s1}, R^{s2} и R^{s3} является водородом, алифатической, гетероалифатической, карбоциклической или гетероциклоалкильной группой.

Например, функциональная группа L^{P2}, которая служит для формирования ковалентной связи с функциональной группой выделенного антитела (такой как функциональная группа или реакционоспособная группа на аминокислотном остатке антитела, например, функциональная группа на остатке цистеина или остатке лизина антитела), выбрана из - SR^P, -S-S-LG, и галогена,

причем LG является уходящей группой, R^p обозначает H или защитную группу для серы, и один из X_a и X_b обозначает H, и другой обозначает водорастворимую защитную группу малеимидогруппы, или X_a и X_b, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют двойную связь углерод-углерод, например, функциональная группа L^{P2}, которая служит для формирования ковалентной связи, является функциональной группой, не реагирующей с функциональной группой выделенного антитела, например, как функциональная группа L^{P2}, в которой из X_a и X_b обозначает H, а другой обозначает водорастворимую защитную группу малеимидогруппы, или X_a и X_b.

Например, L^{D1} включает -X-$(CH_2)_v$-C (=O) -, где X непосредственно связан с карбонильной группой , в которой X обозначает CH_2, O или NH, и v является целым числом от 1 до 6.

Например, каждый  независимо обозначает -C(=O)-X-$(CH_2)_v$-C(=O)-NH-$(CH_2)_u$-NH-C(=O)-$(CH_2)_w$-$(OCH_2)_x$-NHC(=O)-$(CH_2)_y$-M, в котором X обозначает CH_2, O или NH, каждый из v, u, w, x и y независимо является целым числом от 1 до 6, и M обозначает , в котором один из X_a и X_b обозначает H, и другой обозначает водорастворимую защитную группу малеимидогруппы, или X_a и X_b, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют двойную связь углерод-углерод.

Например, каждый из v, u, w, x и y равняется 2.

Например, отношение между D и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом составляет приблизительно 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, б; 1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 или 1:1.

Например, отношение между D и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом составляет приблизительно 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 2:1 или 1:1.

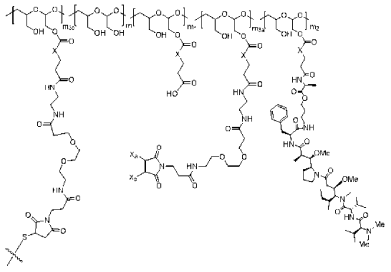
Например, отношение между D и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом составляет приблизительно 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1 или 10:1.

Например, отношение между D и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом составляет приблизительно 15:1, 14:1, 13:1, 12:1 или 11:1.

Например, отношение между D и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом составляет приблизительно 15:1, 14:1, 13:1 или 12:1.

Например, отношение между D и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом составляет приблизительно 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 или 1:1.

Например, каждый один или более D-несущих полимерных остовов независимо имеет формулу (Id):



(Id),

в которой m_{3a} является целым числом от 0 до приблизительно 17,

m_{3b} является целым числом от 1 до приблизительно 8, и

концевая обозначает прямое присоединение одного или более полимерных остовов к выделенному NaPi2b-нацеливаемоеу антителу, имеющему молекулярную массу 40 кДа или более и включающему (i) вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 1 (CDRH1), включающий аминокислотную последовательность GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 5); вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 2 (CDRH2), включающий аминокислотную последовательность AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 6); вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 3 (CDRH3), включающий аминокислотную последовательность GETARATFAY (SEQ ID NO: 7); вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 1 (CDRL1), включающий аминокислотную последовательность

SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 8); вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 2 (CDRL2), включающий аминокислотную последовательность YTSSLYS (SEQ ID NO: 9); и вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 3 (CDRL3), включающий аминокислотную последовательность QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 10), или (ii) CDRH1, включающий аминокислотную последовательность GFSFSDFAMS (SEQ ID NO: 18); CDRH2, включающий аминокислотную последовательность ATIGRVAFHTYYPDSMKG (SEQ ID NO: 19); CDRH3, включающий аминокислотную последовательность ARHRGFDVGHFDF (SEQ ID NO: 20); CDRL1, включающий аминокислотную последовательность RSSETLVHSSGNTYLE (SEQ ID NO: 21); CDRL2, включающий аминокислотную последовательность RVSNRFS (SEQ ID NO: 22); и CDRL3, включающий аминокислотную последовательность FQGSFNPLT(SEQ ID NO: 23).

В некоторых вариантах осуществления выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело имеет молекулярную массу 40 кДа или более и включает (i) CDRH1, включающий аминокислотную последовательность GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 5); CDRH2, включающий аминокислотную последовательность AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 6); CDRH3, включающий аминокислотную последовательность GETARATFAY (SEQ ID NO: 7); CDRL1, включающий аминокислотную последовательность SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 8); CDRL2, включающий аминокислотную последовательность YTSSLYS (SEQ ID NO: 9); и CDRL3, включающий аминокислотную последовательность QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 10).

В некоторых вариантах осуществления выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело имеет молекулярную массу 40 кДа или более и включает CDRH1, включающий аминокислотную последовательность GFSFSDFAMS (SEQ ID NO: 18); CDRH2, включающий аминокислотную последовательность ATIGRVAFHTYYPDSMKG (SEQ ID NO:19); CDRH3, включающий аминокислотную последовательность ARHRGFDVGHFDF (SEQ ID NO: 20); CDRL1, включающий аминокислотную последовательность RSSETLVHSSGNTYLE (SEQ ID NO: 21) CDRL2, включающий аминокислотную последовательность RVSNRFS (SEQ ID NO: 22); и CDRL3, включающий аминокислотную последовательность FQGSFNPLT (SEQ ID NO: 23).

Остов формулы (Id) может включать один или более следующих признаков.

Сумма m_{3a} и m_{3b} от 1 до 18.

Когда PHF в формуле (Id) имеет молекулярную массу в пределах от приблизительно 2 кДа до приблизительно 40 кДа, сумма m, m_1, m_2, m_{3a} и m_{3b} составляет от приблизительно 15 до приблизительно 300, m_1 является целым числом от 1 до приблизительно 140, m_2 является целым числом от 1 до приблизительно 40, m_{3a} является целым числом от 0 до приблизительно 17, m_{3b} является целым числом от 1 до приблизительно 8, сумма m_{3a} и m_{3b} составляет от 1 до приблизительно 18, и отношение между PHF и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом составляет 10 или менее.

Когда PHF в формуле (Id) имеет молекулярную массу в пределах от приблизительно 2 кДа до приблизительно 20 кДа, сумма m, m_1, m_2, m_{3a} и m_{3b} составляет от приблизительно 15 до приблизительно 150, m_1 является целым числом от 1 до приблизительно 70, m_2 является целым числом от 1 до приблизительно 20, m_{3a} является целым числом от 0 до приблизительно 9, m_{3b} является целым числом от 1 до приблизительно 8, сумма m3a и m3b составляет от 1 до приблизительно 10, и отношение между PHF и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом является целым числом от 2 до приблизительно 8.

Когда PHF в формуле (Id) имеет молекулярную массу в пределах от приблизительно 3 кДа до приблизительно 15 кДа, сумма m, m_1, m_2, m_{3a} и m_{3b} составляет от приблизительно 20 до приблизительно 110, m_1 является целым числом от 2 до приблизительно 50, m_2 является целым числом от 2 до приблизительно 15, m_{3a} является целым числом от 0 до приблизительно 7, m_{3b} является целым числом от 1 до приблизительно 8, сумма m_{3a} и m_{3b} составляет от 1 до приблизительно 8; и отношение между PHF и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом является целым числом от 2 до приблизительно 8 (например, от приблизительно 2 до приблизительно 6 или от приблизительно 2 до приблизительно 4).

Когда PHF в формуле (Id) имеет молекулярную массу в пределах от приблизительно 5 кДа до приблизительно 10 кДа, сумма m, m_1, m_2, m_{3a} и m_{3b} составляет от приблизительно 40 до приблизительно 75, m_1 является целым числом от приблизительно 2 до приблизительно 35, m_2 является целым числом от приблизительно 2 до приблизительно 10, m_{3a} является целым числом от 0 до приблизительно 4, m_{3b} является целым числом от 1 до приблизительно 5, сумма m_{3a} и m_{3b} составляет от 1 до приблизительно 5; и отношение между PHF и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом является целым числом от 2 до приблизительно 8 (например, от приблизительно 2 до приблизительно 6 или от приблизительно 2 до приблизительно 4).

В некоторых вариантах осуществления отношение между ауристатин F гидроксипропил амидом ("AF HPA") и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом может составлять приблизительно 30:1, 29:1, 28:1, 27:1, 26:1, 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 или 6:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение между AF HPA и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом может составлять приблизительно 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 или 6:1.

В других вариантах осуществления отношение между AF HPA и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом может составлять приблизительно 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 или 6:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение между AF HPA и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом может составлять приблизительно 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1 или 10:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение между AF HPA и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом может составлять приблизительно 15:1, 14:1, 13:1, 12:1 или 11:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение между AF HPA и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом может составлять приблизительно 15:1, 14:1, 13:1 или 12:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение между PHF и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом может составлять приблизительно 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 или 1:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение между PHF и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом может составлять приблизительно 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1 или 2:1.

В других вариантах осуществления отношение между PHF и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом может составлять приблизительно 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 или 1:1.

В других вариантах осуществления отношение между PHF и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом может составлять приблизительно 6:1, 5:1, 4:1, 3:1 или 2:1.

В других вариантах осуществления отношение между PHF и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом может составлять приблизительно 6:1, 5:1, 4:1 или 3:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение между PHF и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом может составлять приблизительно 5:1, 4:1 или 3:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение между PHF и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом может составлять приблизительно 4:1, 3:1 или 2:1.

Водорастворимые блокирующие группы для малеимидо группы (например, X_a или X_b) представляют собой группы, которые могут быть ковалентно присоединены к одному из двух атомов углерода олефина после реакции малеимидо группы с содержащим тиол соединением формулы (II):

$$R_{90}\text{-}(CH_2)_d\text{-}SH \quad (II),$$

в которой R_{90} обозначает NHR_{91}, OH, $COOR_{93}$, CH (NHR_{91}) $COOR_{93}$ или замещенную фенильную группу;

R_{93} является водородом или C_{1-4} алкилом;

R_{91} является водородом, CH_3 или CH_3CO и

d является целым числом от 1 до 3.

В одном варианте осуществления водорастворимое малеимидо-блокирующее соединение формулы (II) может быть цистеином, N-ацетил цистеином, сложным метиловым эфиром цистеина, N-метил цистеином, 2-меркаптоэтанолом, 3-меркаптопропановой кислотой, 2-меркаптоуксусной кислотой, меркаптометанолом (т.е. $HOCH_2SH$), бензил тиолом, в котором фенил замещен одним или более гидрофильными заместителями, или 3-аминопропан-1-тиолом. Один или более гидрофильных заместителей на фениле включают OH, SH, метокси, этокси, COOH, CHO, COC_{1-4} алкил, NH_2, F, циано, SO_3H, PO_3H и т.п.

В другом аспекте водорастворимая блокирующая группа для малеимидогруппы представляет собой $-S\text{-}(CH_2)_d\text{-}R_{90}$,

в которой R_{90} обозначает OH, COOH или CH (NHR_{91}) $COOR_{93}$;

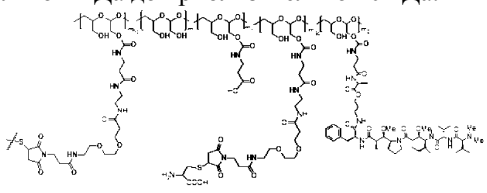
R_{93} является водородом или CH_3;

R_{91} является водородом или CH_3CO и

d равен 1 или 2.

В другом варианте осуществления водорастворимая блокирующая группа для малеимидо группы представляет собой $-S\text{-}CH_2\text{-}CH(NH_2)COOH$.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат, описанный здесь, включает один или несколько D-несущих PHF, каждый из которых независимо имеет формулу (If), причем PHF имеет молекулярную массу в пределах от приблизительно 2 кДа до приблизительно 40 кДа:



(If)

в которой m является целым числом от 1 до приблизительно 300,

m_1 является целым числом от 1 до приблизительно 140,

m_2 является целым числом от 1 до приблизительно 40,

m_{3a} является целым числом от 0 до приблизительно 17,

m_{3b} является целым числом от 1 до приблизительно 8;

сумма m_{3a} и m_{3b} варьирует от 1 до приблизительно 18;

сумма m, m_1, m_2, m_{3a} и m_{3b} составляет от приблизительно 15 до приблизительно 300;

концевой $-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-$ обозначает присоединение одного или более полимерных остовов PHF к выделенному антителу, специфически связывающемуся с SLC34A2, причем выделенное антитело, специфически связывающееся с SLC34A2, является выделенным антителом, включающим (i) вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 1 (CDRH1), включающий аминокислотную последовательность GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 5); вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 2 (CDRH2), включающий аминокислотную последовательность AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 6); вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 3 (CDRH3), включающий аминокислотную последовательность GETARATFAY (SEQ ID NO: 7); вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 1 (CDRL1), включающий аминокислотную последовательность SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 8); вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 2 (CDRL2), включающий аминокислотную последовательность YTSSLYS (SEQ ID NO: 9); и вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 3 (CDRL3), включающий аминокислотную последовательность QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 10), или (ii) CDRH1, включающий аминокислотную последовательность GFSFSDFAMS (SEQ ID NO: 18); CDRH2, включающий аминокислотную последовательность ATIGRVAFHTYYPDSMKG (SEQ ID NO: 19); CDRH3, включающий аминокислотную последовательность ARHRGFDVGHFDF (SEQ ID NO: 20); CDRL1, включающий аминокислотную последовательность RSSETLVHSSGNTYLE (SEQ ID NO: 21); CDRL2, включающий аминокислотную последовательность RVSNRFS (SEQ ID NO: 22); и CDRL3, включающий аминокислотную последовательность FQGSFNPLT(SEQ ID NO: 23); и отношение между PHF и антителом составляет 10 или менее.

В некоторых вариантах осуществления выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело специфически связывается с SLC34A2 и включает (i) CDRH1, включающий аминокислотную последовательность GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 5); CDRH2, включающий аминокислотную последовательность AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 6); CDRH3, включающий аминокислотную последовательность GETARATFAY (SEQ ID NO: 7); CDRL1, включающий аминокислотную последовательность SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 8); CDRL2, включающий аминокислотную последовательность YTSSLYS (SEQ ID NO: 9); и CDRL3, включающий аминокислотную последовательность QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 10).

В некоторых вариантах осуществления выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело специфически связывается с SLC34A2 и включает CDRH1, включающий аминокислотную последовательность GFSFSDFAMS (SEQ ID NO: 18); CDRH2, включающий аминокислотную последовательность ATIGRVAFHTYYPDSMKG (SEQ ID NO: 19); CDRH3, включающий аминокислотную последовательность ARHRGFDVGHFDF (SEQ ID NO: 20); CDRL1, включающий аминокислотную последовательность RSSETLVHSSGNTYLE (SEQ ID NO: 21); CDRL2, включающий аминокислотную последовательность RVSNRFS (SEQ ID NO: 22); и CDRL3, включающий аминокислотную последовательность FQGSFNPLT(SEQ ID NO: 23).

Остов формулы (If) может включать один или более следующих признаков.

Когда PHF в формуле (If) имеет молекулярную массу в пределах от приблизительно 2 кДа до приблизительно 20 кДа, сумма m, m_1, m_2, m_{3a} и m_{3b} составляет от приблизительно 15 до приблизительно 150, m_1 является целым числом от 1 до приблизительно 70, m_2 является целым числом от 1 до приблизительно 20, m_{3a} является целым числом от 0 до приблизительно 9, m_{3b} является целым числом от 1 до приблизительно 8, сумма m_{3a} и m_{3b} составляет от 1 до приблизительно 10, и отношение между PHF и антителом является целым числом от 2 до приблизительно 8.

Когда PHF в формуле (If) имеет молекулярную массу в пределах от приблизительно 3 кДа до приблизительно 15 кДа, сумма m, m_1, m_2, m_{3a} и m_{3b} составляет от приблизительно 20 до приблизительно 110, m_1 является целым числом от 2 до приблизительно 50, m_2 является целым числом от 2 до приблизительно 15, m_{3a} является целым числом от 0 до приблизительно 7, m_{3b} является целым числом от 1 до приблизительно 8, сумма m_{3a} и m_{3b} составляет от 1 до приблизительно 8; и отношение между PHF и антителом является целым числом от 2 до приблизительно 8 (например, от приблизительно 2 до приблизительно 6 или от приблизительно 2 до приблизительно 4).

Когда PHF в формуле (If) имеет молекулярную массу в пределах от приблизительно 5 кДа до приблизительно 10 кДа, сумма m, m_1, m_2, m_{3a} и m_{3b} составляет от приблизительно 40 до приблизительно 75, m_1 является целым числом от приблизительно 2 до приблизительно 35, m_2 является целым числом от приблизительно 2 до приблизительно 10, m_{3a} является целым числом от 0 до приблизительно 4, m_{3b} является целым числом от 1 до приблизительно 5, сумма m_{3a} и m_{3b} составляет от 1 до приблизительно 5; и отношение между PHF и антителом является целым числом от 2 до приблизительно 8 (например, от приблизительно 2 до приблизительно 6 или от приблизительно 2 до приблизительно 4).

В некоторых вариантах осуществления отношение между ауристатин F гидроксипропил амидом ("AF HPA") и антителом может составлять приблизительно 30:1, 29:1, 28:1, 27:1, 26:1, 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 или 6:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение между AF HPA и антителом может составлять приблизительно 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 или 6:1.

В других вариантах осуществления отношение между AF HPA и антителом может составлять приблизительно 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 или 6:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение между AF HPA и антителом может составлять приблизительно 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1 или 10:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение между AF и антителом может составлять приблизительно 15:1, 14:1, 13:1, 12:1 или 11:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение между AF HPA и антителом может составлять приблизительно 15:1, 14:1, 13:1 или 12:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение между PHF и антителом может составлять приблизительно 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 или 1:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение между PHF и антителом может составлять приблизительно 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1 или 2:1.

В других вариантах осуществления отношение между PHF и антителом может составлять приблизительно 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 или 1:1.

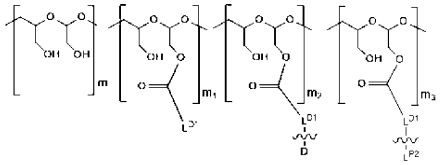
В других вариантах осуществления отношение между PHF и антителом может составлять приблизительно 6:1, 5:1, 4:1, 3:1 или 2:1.

В других вариантах осуществления отношение между PHF и антителом может составлять приблизительно 6:1, 5:1, 4:1 или 3:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение между PHF и антителом может составлять приблизительно 5:1, 4:1 или 3:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение между PHF и антителом может составлять приблизительно 4:1, 3:1 или 2:1.

Другой аспект раскрытия относится к способу препарирования конъюгата, описанного здесь. Способ включает реакцию выделенного антитела с D-несущим полимерным остовом формулы (Ia) таким образом, что формируется конъюгат:



(Ia),

в которой L^{D1} является карбонилсодержащей группой;

каждый $-C(=O)-L^{D1}-\xi-$ в $-C(=O)-L^{D1}-\xi-D$ независимо обозначает первый линкер, содержащий биоразлагаемое соединение, так, что, когда связь разорвана, D высвобождается в активной форме для его намеченного терапевтического эффекта; и

$-\xi-$ в $-C(=O)-L^{D1}-\xi-D$ между L^{D1} и D обозначает прямое или опосредованное присоединение D к L^{D1};

каждый $-C(=O)-L^{D1}-\xi-L^{P2}$ независимо обозначает второй линкер, еще не связанный с выделенным антителом, в котором L^{P2} является группой, содержащей функциональную группу, которая должна образовывать ковалентную связь с функциональной группой выделенного антитела, и $-\xi-$ между L^{D1} и L^{P2} обозначает прямое или опосредованное присоединение L^{P2} к L^{D1}, и каждый второй линкер является отличным от каждого первого линкера;

m является целым числом от 1 до приблизительно 300,

m_1 является целым числом от 1 до приблизительно 140,

m_2 является целым числом от 1 до приблизительно 40,

m_3 является целым числом от 1 до приблизительно 18 и

сумма m, m_1, m_2 и m_3 составляет от приблизительно 15 до приблизительно 300.

В формулах для полимерных остовов, раскрытых здесь, разрыв или промежуток между полиацетальными звеньями показывает, что эти звенья могут быть связаны друг с другом в любом порядке.

Другими словами, присоединяемые группы, содержащие, например, D, L^{P2} и выделенное антитело, могут быть рандомизированно распределены вдоль полимерного остова.

Настоящее раскрытие также относится к способам лечения, профилактики, задержки прогрессии или иного улучшения в отношении симптома одной или более патологий, связанных с аберрантной экспрессией, функцией и/или активацией NaPi2b, или облегчения симптома, связанного с такими патологиями, путем введения конъюгата, раскрытого здесь, пациенту, для которого желаемы такое лечение или профилактика. Пациент, получающий лечение, представляет собой, например, человека. Конъюгаты вводят в количестве, достаточном для лечения, профилактики или облегчения симптома, связанного с патологией.

Настоящее раскрытие также относится к способам лечения, профилактики, задержки прогрессии или иного улучшения в отношении симптома одной или более патологий, связанных с экспрессией, функцией и/или активацией NaPi2b, или облегчения симптома, связанного с такими патологиями, путем введения конъюгата, раскрытого здесь, пациенту, для которого желаемы такое лечение или профилактика. Пациент, получающий лечение, представляет собой, например, человека. Конъюгат вводят в количестве, достаточном для лечения, профилактики или облегчения симптома, связанного с патологией.

Патологии, которые лечат и/или предотвращают с использованием конъюгатов, раскрытых здесь, включают, например, рак. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты, раскрытые здесь, могут быть использованы в лечении, профилактике, задержке прогрессии или ином улучшении в отношении NaPi2b-экспрессирующего рака, например, конъюгаты, раскрытые здесь, могут быть использованы в лечении, профилактике, задержке прогрессии или ином улучшении в отношении симптома рака, выбранного из группы, состоящей из рака яичника (такого как эпителиальный рак яичника), рака щитовидной железы, рака ободочной и прямой кишки, рака легких, немелкоклеточного рака легких (NSCLC), такого как неплоскоклеточный NSCLC, рака молочной железы, рака почек и рака слюнных протоков.

В некоторых вариантах осуществления конъюгаты, раскрытые здесь, могут быть использованы в лечении, профилактике, задержке прогрессии или ином улучшении в отношении симптома рака яичника. В некоторых вариантах осуществления рак яичника является эпителиальным раком яичника.

В некоторых вариантах осуществления конъюгаты, раскрытые здесь, могут быть использованы в лечении, профилактике, задержке прогрессии или ином улучшении в отношении симптома NSCLC. В некоторых вариантах осуществления NSCLC является неплоскоклеточным NSCLC.

В некоторых вариантах осуществления конъюгаты, раскрытые здесь, могут быть использованы в лечении, профилактике, задержке прогрессии или ином улучшении в отношении симптома рака яичника. В некоторых вариантах осуществления рак яичника является эпителиальным раком яичника.

Раскрытие также относится к наборам и/или способам идентификации или иначе конкретизации, например, стратификации, популяции пациентов, подходящей для терапевтического введения конъюгата NaPi2b-нацеливаемое антитело-лекарственное средство, раскрытого здесь, путем идентификации оценки NaPi2b у пациента до лечения конъюгатом NaPi2b-нацеливаемое антитело-лекарственное средство, раскрытым здесь. В некоторых вариантах осуществления пациент идентифицируется как имеющий оценки 1+ или 2+, или 3+ в отношении экспрессии NaPi2b. В некоторых вариантах осуществления популяцию тестируемых клеток получено из новой, размороженной ткани от образца биопсии. В некоторых вариантах осуществления популяцию тестируемых клеток получают из первичного или метастатического сайта. В некоторых вариантах осуществления популяцию тестируемых клеток получают из замороженной ткани от биопсии или хирургического образца, или асцитной жидкости, или плевральной жидкости. В некоторых вариантах осуществления популяцию тестируемых клеток получают из фиксированной ткани (например, фиксация в формалине) от биопсии или хирургического образца.

Тест IHC измеряет количество белка рецептора NaPi2b на поверхности клеток в образце раковой ткани, например, образце ткани рака яичника или образце рака легких, и дает оценку обнаруженного уровня рецептора NaPi2b на поверхности клеток как NaPi2b 0, 1+, 2+ или 3+.

В некоторых вариантах осуществления пациент является рефрактерным к химиотерапии, включая стандартный химиотерапевтические средства первой линии.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет резистентный к платине рак яичника.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет чувствительный к платине рак яичника.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет рефрактерный к платине рак яичника.

В некоторых вариантах осуществления пациент имеет прогрессирующий рак яичника и не получал предшествующей терапии для лечения рака (например, рака яичника). В некоторых вариантах осуществления пациент имеет прогрессирующий рак яичника и не получал предшествующей химиотерапии для лечения рака (например, рака яичника).

Конъюгаты NaPi2b-нацеливаемое антитело-лекарственное средство, используемые в любом из вариантов осуществления способов и применений, описанных здесь, могут быть введены на любой стадии заболевания, например, такой конъюгат NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство может быть введен пациенту, страдающему раком, на любой стадии, от ранней до метастатической.

В некоторых вариантах осуществления конъюгаты NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство согласно раскрытию могут быть введены либо индивидуально, либо в комбинации с другими композициями в терапии, например, конъюгат согласно раскрытию можно использовать совместно с по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим средством и/или адъювантом. В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство является ингибитором, представляющим собой малую молекулу, другим терапевтическим средством на основе антител, полипептидом или терапевтическим средством на основе пептида, терапевтическим средством на основе нуклеиновой кислоты и/или другим биологическим средством. Дополнительное терапевтическое средство может быть либо тем же самым, что и "D", используемый для формирования конъюгата, либо отличаться.

В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство является цитотоксическим агентом, химиотерапевтическим агентом, подавляющим рост агентом, ингибитором ангио-

генеза, ингибитором PARP (поли-(ADP)-рибоза полимераза), алкилирующим агентом, антиметаболитом, агентом, препятствующим формированию микротрубочек, ингибитором топоизомеразы, цитотоксическим антибиотиком, любым другим агентом, разрушающим нуклеиновую кислоту, или ингибитором иммунной контрольной точки. В одном варианте осуществления, терапевтическое средство, используемое в лечении рака, включает, но не ограничено ими, платиновое соединение (например, цисплатин или карбоплатин); таксан (например, паклитаксел или доцетаксел); ингибитор топоизомеразы (например, иринотекан или топотекан); антрациклин (например, доксорубицин (ADRIAMYCIN®) или липосомальный доксорубицин (DOXIL®)); антиметаболит (например, гемцитабин, пеметрексед); циклофосфамид; винорелбин (NAVELBINE®); гексаметилмеламин; ифосфамид; этопозид; ингибитор ангиогенеза (например, Бевацизумаб (Avastin®)), талидомид, TNP-470, тромбоцитарный фактор 4, интерферон или эндостатин); ингибитор PARP (например, Олапариб (Lynparza™)); ингибитор иммунной контрольной точки, такой как, например, моноклональное антитело, нацеливаемое на PD-1 или для PD-L ((например, пембролизумаб (Keytruda®), атезолизумаб (MPDL3280A) или ниволумаб (Opdivo®)) или CTLA-4 (например, Ипилимумаб (Yervoy®)), ингибитор киназы (например, сорафениб или эрлотиниб), ингибитор ALK (например, кризотиниб (Xalkori), церитиниб (Zykadia), алектиниб (Alecensa), далантерцепт (ACE 041), бригатиниб (AP26113), энтректиниб (NMS-E628), PF-06463922 TSR-011, CEP-37440 и X-396), ингибитор протеасомы (например, бортезомиб или карфилзомиб), иммуномодулирующий агент (например, леналидомид или IL-2), радиационный агент и/или его биоаналог и/или их комбинации. Другие подходящие агенты включают агент, который специалисты рассматривают как стандарт и/или химиотерапевтический агент, известный специалисту.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунной контрольной точки, подходящий для комбинаций и способов согласно раскрытию, является моноклональным антителом, гуманизированным антителом, полностью человеческим антителом, слитым белком или их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления ингибиторы иммунных контрольных точек ингибируют белок контрольной точки, включающий CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, A2aR, лиганд семейства B-7, CD2, CD27, CD28, CD30, CD40, CD70, CD80, CD86, CD137, CD226, CD276, DR3, GITR, HAVCR2, HVEM, IDO1, IDO2, ICOS (индуцируемый Т-клеточный ко-стимулятор), LAIR1, LIGHT, MARCO (рецептор макрофага с коллагеновой структурой), OX-40, SLAM, TIGHT, VTCN1 или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек взаимодействует с лигандом белка контрольной точки, включающего CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, A2aR, лиганд семейства B-7, CD2, CD27, CD28, CD30, CD40, CD70, CD80, CD86, CD137, CD226, CD276, DR3, GITR, HAVCR2, HVEM, IDO1, IDO2, ICOS (индуцируемый Т-клеточный ко-стимулятор), LAIR1, LIGHT, MARCO (рецептор макрофага с коллагеновой структурой), OX-40, SLAM, TIGHT, VTCN1 или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек ингибирует белок контрольной точки, включающий CTLA-4, PDL1, PD1 или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек включает пембролизумаб (MK-3475), ниволумаб (BMS-936558), пидилизумаб (CT-011), AMP-224, MDX-1 105, дурвалумаб (MEDI4736), MPDL3280A, BMS-936559, IPH2101, TSR-042, TSR-022, ипилимумаб, лирилумаб, атезолизумаб, авелумаб, тремелимумаб или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек включает ниволумаб (BMS-936558), ипилимумаб, пембролизумаб, атезолизумаб, тремелимумаб, дурвалумаб, авелумаб или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство и дополнительный агент(ы) составляют в единственную терапевтическую композицию, и конъюгат NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство и дополнительный агент вводят одновременно. Альтернативно, конъюгат NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство и дополнительный агент находиться отдельно друг от друга, например, каждый составляют в отдельную терапевтическую композицию, и конъюгат NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство и дополнительный агент вводят одновременно, или конъюгаты NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство и дополнительный агент вводят в разное время во время режима лечения, например, конъюгат NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство вводят до введения дополнительного агента, конъюгат NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство вводят после введения дополнительного агента, или конъюгат NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство и дополнительный агент вводят попеременно. Как описано здесь, конъюгат NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство и дополнительный агент вводят в единственных дозах или в многократных дозах.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство и ингибитор иммунных контрольных точек составляют в одном и том же составе.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство и ингибитор иммунных контрольных точек составляют в отдельных составах.

В некоторых вариантах осуществления комбинация, включающая конъюгат NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство и ингибитор иммунных контрольных точек, раскрытые здесь, может быть использована в лечении, профилактике, задержке прогрессии или ином улучшении в отношении симптома рака яичника. В некоторых вариантах осуществления рак яичника является эпителиальным раком яичника.

В некоторых вариантах осуществления комбинация, включающая конъюгат NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство и ингибитор иммунных контрольных точек, раскрытые здесь, может быть использована в лечении, профилактике, задержке прогрессии или ином улучшении в отношении симптома NSCLC. В некоторых вариантах осуществления NSCLC является неплоскоклеточным NSCLC.

Также раскрыты наборы, включающие конъюгат NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство и ингибитор иммунных контрольных точек. Компоненты набора могут быть упакованы вместе или разделены на два или более контейнеров. В некоторых вариантах осуществления контейнеры могут быть пузырьками, содержащими стерильные лиофилизированные составы композиции, подходящие для воссоздания. Набор может также содержать один или несколько буферов, подходящих для воссоздания и/или разбавления других реактивов. Другие контейнеры, которые могут использоваться, включают, но не ограничены ими, мешок, кювету, коробку, пробирку и т.п. Компоненты набора могут упаковываться и сохраняться стерильно в контейнерах. Другой компонент, который может быть включен, представляет собой инструкции по использованию набора потребителем.

Фармацевтические композиции согласно раскрытию могут включать конъюгат NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство, раскрытый здесь, и подходящий носитель. Эти фармацевтические композиции могут быть включены в наборы, такие как, например, диагностические наборы.

Специалисту понятно, что антитела, раскрытые здесь, имеют множество вариантов использования. например, белки, раскрытые здесь, используются в качестве терапевтических средств. Антитела, раскрытые здесь, также используются в качестве реактивов в диагностических наборах или в качестве диагностических инструментов, или эти антитела могут использоваться в конкурентных тестах для получения терапевтических реактивов.

Если не указано иное, все технические и научные термины, использованные здесь, имеют те же значения, которые обычно понимаются специалистом в области техники, к которой относится это раскрытие. В описании формы единственного числа также включают множественное число, если из контекста ясно не следует иное. Несмотря на то, что способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным здесь, могут использоваться в практике или тестировании настоящего изобретения, подходящие способы и материалы описаны ниже. В случае конфликта будет превалировать настоящее описание, включая определения. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

Другие особенности и преимущества изобретения будут очевидны из следующего подробного описания и формулы изобретения.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 иллюстрирует противоопухолевую эффективность XMT-1535; примера 3A, ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))); примера 4A ((10H1.11.4B)-(MC-VC-PABA-MMAE)); примера 2C ((10H1.11.4B)-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))) и примера 1B, XMT 1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))), измеренную на модели ксенотрансплантата опухоли мыши OVCAR3.

Фиг. 2 иллюстрирует противоопухолевую эффективность примера 3B, ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))); примера 4B ((10H1.11.4B)-(MC-VC-PABA-MMAE)); и примера 1C, XMT 1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))), измеренную на модели ксенотрансплантата опухоли мыши OVCAR3.

Фиг. 3 иллюстрирует противоопухолевую эффективность примера 3B, ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))); примера 4B ((10H1.11.4B)-(MC-VC-PABA-MMAE)); и примера 1C, XMT 1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))), измеренную на модели полученного от пациента-мутанта KRAS ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легких.

Фиг. 4 иллюстрирует противоопухолевую эффективность примера 3B, ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))); примера 4B ((10H1.11.4B)-(MC-VC-PABA-MMAE)); и примера 1C, XMT 1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))), измеренную на модели полученного от пациента ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легких.

Фиг. 5 иллюстрирует противоопухолевую эффективность примера 1C, XMT 1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))), измеренную на модели полученного от пациента ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легких.

Фиг. 6A и 6B, соответственно, показывают плазменную фармакокинетику для общего антитела и общего лекарственного средства после введения примера 1C в количестве 1,25 мг/кг (1074 мкг/м^2 эквивалент полезной загрузки ауристатина), 2,5 мг/кг (2147 мкг/м^2 эквивалент полезной загрузки ауристатина) или 5 мг/кг (или 4294 мкг/м^2 эквивалент полезной загрузки ауристатина) в форме единственнй в/в инфузии у обезьян cynomolgus.

Фиг. 7 иллюстрирует противоопухолевую эффективность примера 3B, ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа

PHF-BA-(AF-HPA-Ala))); примера 4B ((10H1.11.4B)-(MC-VC-PABA-MMAE)); и примера 1C, XMT 1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))), измеренную на модели полученного от пациента ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легких.

Фиг. 8 иллюстрирует противоопухолевую эффективность примера 1C, XMT 1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))), измеренную на модели полученного от пациента ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легких.

Фиг. 9 иллюстрирует противоопухолевую эффективность примера 1C, XMT 1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))), измеренную на модели полученного от пациента ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легких.

Фиг. 10 иллюстрирует противоопухолевую эффективность примера 1C, XMT 1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))), измеренную на модели полученного от пациента ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легких.

Подробное описание

Настоящее раскрытие относится к конъюгату NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство (такому как конъюгат NaPi2b-нацеленное антитело-полимер-лекарственное средство), который является биоразлагаемым, биологически совместимым и показывает высокую загрузку лекарственного средства, а также специфически связывается с внеклеточной областью SLC34A2.

Конъюгаты NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство (такие как конъюгаты NaPi2b-нацеленное антитело-полимер-лекарственное средство) по изобретению включают антитело, специфически распознающее NaPi2b, также известный как натрий-зависимый белок-транспортер фосфата 2B. Антитела NaPi2b, используемые в конъюгатах, раскрытых здесь, способны к и пригодны для модуляции, блокировки, ингибирования, ослабления, противодействия, нейтрализации или другого вмешательства в отношении по меньшей мере одной биологической активности NaPi2b. Антитела, раскрытые здесь, также включают антитела, связывающиеся с растворимым NaPi2b.

Конъюгаты NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство по изобретению включают антитела, связывающиеся с эпитопом NaPi2b с равновесной константой диссоциации (K_d или K_d) ≤1 мкМ, например, ≤100 нМ, предпочтительно ≤10 нМ, и более предпочтительно ≤1 нМ. Например, антитела NaPi2b, используемые в конъюгатах антитело-лекарственное средство, раскрытых здесь, показывают K_d в диапазоне приблизительно от ≤1 нМ до приблизительно 1 пМ.

Конъюгаты NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство по изобретению могут включать антитела, служащие для модуляции, блокировки, ингибирования, ослабления, противодействия, нейтрализации или другого вмешательства в отношении функциональной активности NaPi2b. Функциональная активность NaPi2b включает, например, участие в абсорбции трансцелюллярного неорганического фосфата (Pi), таким образом способствуя поддержанию гомеостаза фосфата в организме. Например, антитела NaPi2b полностью или частично ингибируют функциональную активность NaPi2b путем частичной или полной модуляции, блокировки, ингибирования, ослабления, противодействия, нейтрализации или другого вмешательства в отношении абсорбции трансцелюллярного неорганического фосфата. Активность в отношении абсорбции трансцелюллярного неорганического фосфата оценивают с помощью любого известного в уровне техники способа детекции активности в отношении абсорбции трансцелюллярного неорганического фосфата, включая, но не ограничиваясь ей, детекцию уровней абсорбции трансцелюллярного неорганического фосфата в присутствии и в отсутствие антитела анти-NaPi2b, раскрытого здесь.

Антитела NaPi2b, используемые в конъюгатах антитело-лекарственное средство, раскрытых здесь, могут быть антителами, которые, как считается, полностью модулируют, блокируют, ингибируют, уменьшают, противодействуют, нейтрализуют или иначе вмешиваются в функциональную активность NaPi2b, когда уровень функциональной активности NaPi2b в присутствии антитела NaPi2b уменьшается по меньшей мере на 95%, например, на 96%, 97%, 98%, 99% или 100% по сравнению с уровнем функциональной активности NaPi2b в отсутствие связывания антителом NaPi2b, описанным здесь. Считается, что антитела NaPi2b частично модулируют, блокируют, ингибируют, уменьшают, противодействуют, нейтрализуют или иначе вмешиваются в функциональную активность NaPi2b, когда уровень активности NaPi2b в присутствии антитела NaPi2b уменьшается меньше чем на 95%, например, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% или 90% по сравнению с уровнем активности NaPi2b в отсутствие связывания антителом NaPi2b, описанным здесь.

Если не указано иное, научно-технические термины, использованные в связи с настоящим раскрытием, должны иметь значения, обычно понимаемые специалистом. Далее, если из контекста не следует иное, термины в единственном числе должны включать множественное число, и термины во множественном числе должны включать единственное число. В целом номенклатуры и методы, используемые в связи с клеточной культурой и культурой тканей, молекулярная биология и химия белков и олиго- или полинуклеотидов и гибридизация, описанные здесь, являются известными и обычно используются в данной области техники. Стандартные методы используются для рекомбинантного ДНК, синтеза олигонуклеотидов и культуры тканей и трансформации (например, электропорация, липофекция). Ферментатив-

ные реакции и методы очистки осуществляют согласно техническим требованиям производителя или как их обычно осуществляют в данной области техники, или как описано здесь. Известные методы и процедуры обычно проводят согласно стандартным способам, известным в данной области техники и как описано в различных общих и более специфических ссылках, процитированных и обсужденных по всему настоящему описанию, см., например, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y (1989)). Номенклатуры и лабораторные процедуры и методы, используемые в связи с аналитической химией, синтетической органической химией и лекарственной и фармацевтической химией, описанной здесь, являются известными и обычно используемыми в данной области техники. Стандартные методы используются для химических синтезов, химических анализов, фармацевтического получения, составления и доставки и лечения пациентов.

В соответствии с настоящим раскрытием, следующие термины, если не указано иное, имеют следующие значения:

В рамках изобретения, термины "NaPi2b" (также известный как натрий-зависимый белок транспорта фосфата 2B, SLC34A2, NaPiIIb, Npt2, Na(+)-зависимый котранспортер фосфата 2B; котранспортер натрия/фосфата 2B; котранспортер Na(+)/Pi 2B; NaPi3b; семейство носителей растворенного вещества 34 член 2), когда они используются в настоящем описании, относятся к человеческому NaPi2b (например, GenBank № доступа O95436,3) и включают любые варианты, изоформы и гомологи разновидностей NaPi2b, естественно экспрессирующиеся клетками, включая опухолевые клетки, или экспрессирующиеся на клетках, трансфицированных геном NaPi2b. Эти термины синонимичны и могут быть использованы взаимозаменяемо.

В рамках изобретения, термин "антитело NaPi2b" или "антитело анти-NaPi2b" обозначает антитело, специфически связывающееся с антигеном NaPi2b.

Когда он используется в контексте двух или более антител, термин "конкурирует с" или "перекрестно конкурирует с" указывает, что эти два или более антител конкурируют за связывание с NaPi2b, например, конкурируют за связывание с NaPi2b в любом известном в данной области техники тесте. Антитело "блокирует" или "перекрестно блокирует" связывание одного или более других антител с NaPi2b, если антитело конкурирует с одним или более других антител на 25% или более, причем 25%-74% представляет собой "частичную блокировку" и 75%-100% представляет собой "полную блокировку", что может быть определено с использованием любого известного в данной области техники теста. Для некоторых пар антител конкуренция или блокировка в любом известном в данной области техники тесте наблюдается только когда одно антитело нанесено на планшет, а другое используется для конкуренции, но не наоборот. Если не указано иное или если это не противоречит контексту, термины "конкурирует с", "перекрестно конкурирует с", "блокирует" или "перекрестно блокирует", когда они используются здесь, также охватывают такие пары антител.

В рамках изобретения, термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулина и иммунологически активным частям молекулы иммуноглобулина (Ig), т.е. к молекулам, содержащим связывающий участок антигена, специфически связывающийся (является иммунореактивным по отношению к нему) с антигеном. "Специфически связывается" или "является иммунореактивным", или "направленный к" означает, что антитело реагирует с одной или более антигенными детерминантами желаемого антигена и не реагирует с другими полипептидами или связывается с намного более низкой аффинностью (K_d>10^{-6}). Антитела включают, но не ограничены ими, поликлональные, моноклональные и химерные антитела.

Основная структурная единица антитела, как известно, включает тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, причем каждая из этих пар имеет одну "легкую" (приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (приблизительно 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи включает вариабельную область из приблизительно 100-110 или более аминокислот, прежде всего ответственных за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, прежде всего ответственную за эффекторную функцию. В целом, молекулы антитела, полученные от человека, относятся к одному из классов IgG, IgM, IgA, IgE и IgD, отличающихся от друг друга природой тяжелой цепи, присутствующей в молекуле. Некоторые классы имеют также подклассы, такие как IgG_1, igG_2 и другие. Кроме того, у человека легкая цепь может представлять собой каппа-цепь или лямбда-цепь.

Термин "моноклональное антитело" (mAb) или "композиция моноклонального антитела", в рамках изобретения, относится к популяции молекул антитела, содержащей только одну молекулярную разновидность молекулы антитела, состоящей из уникального генного продукта легкой цепи и уникального генного продукта тяжелой цепи. В частности, определяющие комплементарность области (CDRs) моноклонального антитела идентичны во всех молекулах популяции. Моноклональные антитела (mAbs) содержат антиген-связывающий участок, способный к иммунореактивности с определенным эпитопом антигена, характеризующийся уникальным связывающим сродством к нему.

В целом молекулы антитела, полученные от человека, относятся к одному из классов IgG, IgM, IgA, IgE и IgD, отличающихся от друг друга природой тяжелой цепи, присутствующей в молекуле. Некоторые классы имеют также подклассы, такие как IgG_1, igG_2 и другие. Кроме того, у человека легкая цепь может представлять собой каппа-цепь или лямбда-цепь.

Термин "антиген-связывающий участок" или "связывающая часть" относится к части молекулы иммуноглобулина, участвующей в связывании антигена. Связывающий участок антигена образован аминокислотными остатками вариабельной N-концевой ("V") области тяжелой ("H") и легкой ("L") цепи. Три сильно различающихся отрезка в вариабельных областях тяжелых и легких цепей, называемые "гипервариабельными участками", встраиваются между более консервативными фланкирующими отрезками, известными как "области рамки считывания" или "FRs". Таким образом, термин "FR" относится к аминокислотным последовательностям, естественно располагающимся между, и смежными с, гипервариабельными участками в иммуноглобулинах. В молекуле антитела три гипервариабельных участка легкой цепи и три гипервариабельных участка тяжелой цепи расположены друг относительно друга в трехмерном пространстве, образуя антиген-связывающую поверхность. Антиген-связывающая поверхность является комплементарной по отношению к трехмерной поверхности связанного антигена, и три гипервариабельных участка каждой из тяжелой и легкой цепей упоминаются как "определяющие комплементарность области" или "CDR". Принадлежность аминокислот к каждой области определяется в соответствии с определениями Rabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md (1987 and 1991)) или Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989).

В рамках изобретения, термин "эпитоп" включает любую белковую детерминанту, способную к специфическому связыванию с иммуноглобулином или его фрагментом, или Т-клеточным рецептором. Термин "эпитоп" включает любую белковую детерминанту, способную к специфическому связыванию с иммуноглобулином или Т-клеточным рецептором. Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров и обычно имеют специфические трехмерные структурные характристики, а также специфические характеристики заряда. Говорят, что антитело специфически связывается с антигеном, когда константа диссоциации составляет ≤1 мкМ; например, ≤100 нМ, предпочтительно ≤10 нМ и более предпочтительно ≤1 нМ.

В рамках изобретения, термины "иммунологическое связывание" и "иммунологические связывающие свойства" относятся к нековалентным взаимодействиям типа происходящих между молекулой иммуноглобулина и антигеном, в отношении которого иммуноглобулин является специфическим. Сила или аффинность иммунологических связывающих взаимодействий может быть выражена в терминах константы диссоциации (K_d) взаимодействия, где меньшая K_d означает большую аффинность. Иммунологические связывающие свойства выбранных полипептидов могут быть определены количественно с помощью способов, известных в данной области техники. Один такой способ подразумевает измерение скорости образования комплекса антиген-связывающий участок/антиген и диссоциации, причем эти скорости зависят от концентраций партнеров комплекса, аффинности взаимодействия и геометрических параметров, одинаково влияющих на скорость в обоих направлениях. Таким образом, и "на постоянной скорости" (K_{on}), и "вне постоянной скорости" (K_{off}) могут быть определены вычислением концентраций и фактическими скоростями ассоциации и диссоциации (см. Nature 361:186-87 (1993)). Отношение K_{off}/K_{on} позволяет не учитывать все параметры, не связанные с аффинностью, и равно константе диссоциации K_d (см., в целом, Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473). Говорят, что антитело согласно настоящему раскрытию специфически связывается с NaPi2b, когда равновесная константа диссоциации (K_d или K_D) составляет ≤1 мкМ, предпочтительно ≤100 нМ, более предпочтительно ≤10 нМ, и наиболее предпочтительно от ≤100 пМ до приблизительно 1 пМ, что может быть измерено такими тестами как тесты связывания меченого лиганда или подобные тесты, известные специалисту.

Термин "выделенный полинуклеотид" в рамках изобретения означает полинуклеотид геномного, кДНК или синтетического происхождения или их комбинацию, который на основании происхождения "выделенного полинуклеотида" (1) не ассоциирован со всем или частью полинуклеотида, в котором "выделенный полинуклеотид" находится в природе, (2) функционально связан с полинуклеотидом, с которым он не связан в природе, или (3) не встречается в природе как часть большей последовательности. Полинуклеотиды в соответствии с раскрытием включают молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие молекулы иммуноглобулина тяжелой цепи и их части, представленные в SEQ ID NOs: 1, 3, 14 и 16, и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие молекулы иммуноглобулина легкой цепи и их части, представленные в SEQ ID NOs: 2, 4, 15 и 17.

Термин "выделенный белок", упомянутый здесь, означает белок, просиходящий от кДНК, рекомбинантной РНК или синтетического происхождения, или их комбинации, который, на основании происхождения или источника происхождения "выделенного белка" (1) не ассоциирован с находящимися в природе белками, (2) не содержит других белков из того же источника, (3) экспрессируется клетками различных видов, или (4) не встречается в природе.

Термин "полипептид" используется здесь как родовой термин, относящийся к нативному белку, фрагментам или аналогам полипептидной последовательности. Следовательно, фрагменты и аналоги нативного белка являются разновидностями рода полипептида. Полипептиды в соответствии с раскрытием включают молекулы иммуноглобулина тяжелой цепи и их части, представленные в SEQ ID NOs: 1, 3,

14 и 16, и молекулы иммуноглобулина легкой цепи и их части, представленные в SEQ ID NOs: 2, 4, 15, и 17, а также молекулы антитела, образованные комбинациями, включающими молекулы иммуноглобулина тяжелой цепи с молекулами иммуноглобулина легкой цепи, такими как молекулами иммуноглобулина легкой каппа-цепи, и наоборот, а также их фрагменты и аналоги.

Термин "природный" в рамках изобретения применительно к объекту относится к тому факту, что этот объект может быть найден в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, присутствующая в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из источника в природе и которая не была преднамеренно изменена человеком в лаборатории или иначе является природной.

Термин "функционально связанный" в рамках изобретения относится к положениям компонентов, описанных так, которые находятся в отношении, обеспечивающем их функционирование намеченным образом. Контрольная последовательность, "функционально связанная" с кодирующей последовательностью, лигирована таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности достигается в условиях, совместимых с контрольными последовательностями.

Термин "контрольная последовательность" в рамках изобретения относится к полинуклеотидным последовательностям, которые необходимы для осуществления экспрессии и процессинга кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы. Природа таких контрольных последовательностей различается у прокариотов в зависимости от организма-хозяина, такие контрольные последовательности обычно включают промотор, участок связывания рибосомы и последовательность завершения транскрипции у эукариот, обычно такие контрольные последовательности включают промоторы и последовательность завершения транскрипции. Термин "контрольные последовательности" включает, как минимум, все компоненты, присутствие которых является существенным для экспрессии и процессинга, и может также включать дополнительные компоненты, присутствие которых является предпочтительным, например, лидерные последовательности и последовательности партнера по слиянию. Термин "полинуклеотид" в рамках изобретения обозначает полимерный из нуклеотидов, имеющий длину по меньшей мере 10 оснований, которые могут быть как рибонуклеотидами, так и дезоксирибонуклеотидами или модифицированной формой любого типа нуклеотида. Этот термин включает одноцепочечные и двухцепочечные формы ДНК.

Термин "олигонуклеотид", упомянутый здесь, включает натуральные и модифицированные нуклеотиды, соединенные натуральными и ненатуральными олигонуклеотидными связями. Олигонуклеотиды являются субпопуляцией полинуклеотидов, обычно имеющих длину 200 оснований или менее. Предпочтительно олигонуклеотиды имеют длину 10-60 оснований и наиболее предпочтительно 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20-40 оснований. Олигонуклеотиды являются обычно одноцепочечными, например, в случае зондов, хотя олигонуклеотиды могут быть двухцепочечными, например, для использования в конструировании генного мутанта. Олигонуклеотиды, раскрытые здесь, являются смысловыми или антисмысловыми олигонуклеотидами.

Термин "природные нуклеотиды", упомянутый здесь, включает дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды. Термин "модифицированные нуклеотиды", упомянутый здесь, включает нуклеотиды с модифицированными или замещенными сахаридными группами и т.п. Термин "олигонуклеотидные связи", упомянутый здесь, включает олигонуклеотидные связи, такие как фосфоротиоат, фосфородитиоат, фосфороселерлоат, фосфородиселеноат, фосфороанилотиоат, фосфораниладат, фосфороамидат и т.п., см., например, LaPlanche et al., Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al., J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein et al., Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988), Zon et al., Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al., Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al., патент США No. 5,151,510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990). Олигонуклеотид может при необходимости включать метку для детекции.

Следующие термины используются для описания отношений последовательности между двумя или более полинуклеотидными или аминокислотными последовательностями: "эталонная последовательность", "окно сравнения", "идентичность последовательности", "процент идентичности последовательности" и "идентичность по существу". "Эталонная последовательность" является определенной последовательностью, используемой в качестве основания для сравнения последовательности, эталонная последовательность может быть субпопуляцией более крупной последовательности, например, как сегмент полноразмерной кДНК или последовательности генов, приведенной в списке последовательностей, или может включать полную кДНК или последовательность генов. Обычно эталонная последовательность имеет длину по меньшей мере 18 нуклеотидов или 6 аминокислот, часто длину по меньшей мере 24 нуклеотида или 8 аминокислот, и часто длину по меньшей мере 48 нуклеотидов или 16 аминокислот. Так как два полинуклеотида или аминокислотных последовательности могут, каждый, (1) включать последовательность (т.е. часть полной полинуклеотидной или аминокислотной последовательности), которая подобна между этими двумя молекулами, и (2) может дополнительно включать последовательность, которая различается между этими двумя полинуклеотидами или аминокислотными последовательностями, сравнения последовательности между двумя (или более) молекулами, как правило, осуществляют путем сравнения последовательностей этих двух молекул по "окну сравнения", чтобы идентифицировать и

сравнить локальные области подобия последовательности. "Окно сравнения", в рамках изобретения, относится к концептуальному сегменту из по меньшей мере 18 смежных положений нуклеотидов или 6 аминокислот, причем полинуклеотидную последовательность или аминокислотную последовательность можно подвергнуть сравнению с эталонной последовательностью из по меньшей мере 18 смежных нуклеотидов или последовательностью из 6 аминокислот, и причем часть полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может включать вставки, делеции, замены и т.п (т.е. промежутки), составляющие 20 процентов или менее по сравнению с эталонной последовательностью (которая не включает вставок или делеций) для оптимального выравнивания этих двух последовательностей. Оптимальное выравнивание последовательностей для выравнивания окна сравнения может быть проведено согласно алгоритму локальной гомологии Smith and Waterman Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), алгоритму гомологии выравнивания Needleman and Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970), поиском способа подобия of Pearson and Lipman Proc. Natl. Acad. Sci (США) 85:2444 (1988), компьютеризированным внедрениям этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package Release 7,0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), Geneworks, или пакетам программ MacVector) или инспекцией, и может быть выбрано наилучшее выравнивание (т.е. приводящее к самому высокому проценту гомологии по окну сравнения), сгенерированное различными способами.

Термин "идентичность последовательности" означает, что две полинуклеотидные или аминокислотные последовательности идентичны (т.е. на основании нуклеотидов или остатков) по окну сравнения. Термин "процент идентичности последовательности" вычисляют путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей по окну сравнения, определения числа положений, в которых идентичное нуклеиновокислотное основание (например, A, T, C, G, U или I) или остаток находится в обеих последовательностях для получения числа совпадающих положений, деля число совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения (т.е. размер окна) и умножая результат на 100 для получения процента идентичности последовательности. Термины "идентичность по существу" в рамках изобретения обозначают характеристику полинуклеотидной или аминокислотной последовательности, причем полинуклеотид или аминокислота включают последовательность, имеющую по меньшей мере 85-процентную идентичность последовательности, предпочтительно по меньшей мере 90-процентную идентичность последовательности, чаще по меньшей мере 99-процентную идентичность последовательности по сравнению с эталонной последовательностью по окну сравнения из по меньшей мере 18 нуклеотидных (6 аминокислотных) положений, часто по окну из по меньшей мере 24-48 нуклеотидных (8-16 аминокислотных) положений, причем процент идентичности последовательности вычисляют путем сравнения эталонной последовательности с последовательностью, которая может включать делеции или вставки, который составляют 20 процентов или менее от эталонной последовательности по окну сравнения. Эталонная последовательность может быть разновидностью более крупной последовательности.

В рамках изобретения двадцать стандартных аминокислот и их аббревиатуры используют стандартным образом, см. Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Green, Eds., Sinauer Associates, Sunderland7 Mass (1991)). Стереоизомеры (например, D-аминокислоты) двадцати стандартных аминокислот, неприродные аминокислоты, такие как α,α-дизамещенные аминокислоты, N-алкиламинокислоты, молочная кислота и другие нетрадиционные аминокислоты могут также быть подходящими компонентами для полипептидов согласно настоящему раскрытию. Примеры нетрадиционных аминокислот включают: 4-гидроксипролин, γ-карбоксиглутамат, ε-N,N,N-триметиллизин, ε-N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, δ-N-метиларгинин и другие подобные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). В обозначениях полипептида, используемых здесь, левое направление является аминоконцевым направлением, и правое направление является карбоксиконцевым направлением, в соответствии со стандартным использованием и консенсусом.

Точно так же, если не указано иное, левый конец одноцепочечных полинуклеотидных последовательностей является 5'-концом, левое направление двухцепочечных полинуклеотидных последовательностей упоминается как направление 5'. Направление добавлений от 5' к 3' синтезирующихся транскриптов РНК упоминается как области последовательности направления транскрипции на цепи ДНК, имеющей ту же последовательность, как РНК, и которые представляют собой 5' к 5' концы транскрипта РНК, упоминаются как "апстрим-последовательности", области последовательности на цепи ДНК, имеющей ту же последовательность, как РНК, и которые представляют собой 3' к 3' концам транскрипта РНК, упоминаются как "даунстрим-последовательности".

Применительно к полипептидам термин "идентичность по существу" означает, что две пептидные последовательности, когда они оптимально выровнены, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с использованием штрафов за делецию по умолчанию, имеют по меньшей мере 80 процентов идентичности последовательности, предпочтительно по меньшей мере 90 процентов идентичности последовательности, более предпочтительно по меньшей мере 95 процентов идентичности последовательности и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99 процентов идентичности последовательности.

Предпочтительно, положения остатков, которые не идентичны, различаются консервативными

аминокислотными заменами.

Консервативные аминокислотные замены относятся к взаимозаменяемости остатков, имеющих подобные боковые цепи. Например, группа аминокислот, имеющих алифатические боковые цепи, представлена глицином, аланином, валином, лейцином и изолейцином; группа аминокислот, имеющих алифатически-гидроксильные боковые цепи, представлена серином и треонином; группа аминокислот, имеющих амидсодержащие боковые цепи, представлена аспарагином и глутамином; группа аминокислот, имеющих ароматические боковые цепи, представлена фенилаланином, тирозином и триптофаном; группа аминокислот, имеющих основные боковые цепи, представлена лизином, аргинином и гистидином; и группа аминокислот, имеющих серасодержащие боковые цепи, представлена цистеином и метионином. Предпочтительные консервативные группы аминокислотных замен являются следующими: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутаминовая кислота-аспарагиновая кислота и аспарагин-глутамин.

Как обсуждается здесь, незначительные изменения в аминокислотных последовательностях антител или молекул иммуноглобулина рассматриваются как охватываемые настоящим раскрытием, если эти изменения в аминокислотной последовательности поддерживают по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80%, 90%, 95%, и наиболее предпочтительно 99%. В частности, рассматриваются консервативные аминокислотные замены. Консервативные замены представляют собой такие, которые имеют место в семействе аминокислот, родственных по их боковым цепям. Генетически кодируемые аминокислоты обычно делятся на семейства: (1) кислыми аминокислотами являются аспартат, глутамат; (2) основными аминокислотами являются лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярными аминокислотами являются аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан, и (4) незаряженными полярными аминокислотами являются глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Гидрофильные аминокислоты включают аргинин, аспарагин, аспартат, глутамин, глутамат, гистидин, лизин, серин и треонин. Гидрофобные аминокислоты включают аланин, цистеин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан, тирозин и валин. Другие семейства аминокислот включают: (i) серин и треонин, которые являются алифатическим гидрокси-семейством; (ii) аспарагин и глутамин, которые являются амидсодержащим семейством; (iii) аланин, валин, лейцин и изолейцин, которые являются алифатическим семейством; и (iv) фенилаланин, триптофан и тирозин, которые являются ароматическим семейством. Например, обоснованно ожидать, что изолированная замена лейцина изолейцином или валином, аспартата глутаматом, треонина серином или подобная замена аминокислоты структурно родственной аминокислотой не будет иметь значительного эффекта на связывание или свойства конечной молекулы, особенно если замена не включает аминокислоты в месте рамки считывания. Может ли аминокислотная замена привести к функциональному пептиду, легко определяется путем тестирования специфической активности производного полипептида. Тесты подробно описаны здесь. Аналоги антител или молекул иммуноглобулина могут быть легко получены специалистом. Предпочтительные амино- и карбоксиконцы аналогов находятся около границ функциональных областей. Структурные и функциональные области могут быть идентифицированы для сравнения данных о нуклеотидной и/или аминокислотной последовательности с публичными или частными базами данных последовательностей. Предпочтительно, компьютеризированные способы сравнения используют для идентификации мотивов последовательности или предсказанных конформационных областей белка, имеющихся в других белках с известной структурой и/или функцией. Известны способы идентификации последовательностей белка, сворачивающихся в известную пространственную структуру; Bowie et al., Science 253:164 (1991). Таким образом, предшествующие примеры демонстрируют, что специалисту известны мотивы последовательности и структурные конформации, которые могут использоваться для определения структурных и функциональных областей в соответствии с раскрытием.

Предпочтительными аминокислотными заменами являются такие, которые: (1) уменьшают склонность к протеолизу, (2) уменьшают склонность к окислению, (3) изменяют аффинность связывания для формирования белковых комплексов, (4) изменяют аффинность связывания, и (4) придают или изменяют другие физико-химические или функциональные свойства таких аналогов. Аналоги могут включать различные мутеины последовательности, отличные от природной последовательности пептида. Например, единственные или множественные аминокислотные замены (предпочтительно консервативные аминокислотные замены) могут быть сделаны в природной последовательности (предпочтительно в части полипептида вне области(ей), формирующей межмолекулярные контакты). Консервативная аминокислотная замена не должна существенно изменять структурные характеристики родительской последовательности (например, аминокислота, используемая для замены, не должна иметь тенденцию ломать спираль в родительской последовательности или разрушать другие типы вторичной структуры, характеризующей родительскую последовательность). Примеры известных в области полипептидов вторичных и третичных структур описаны в Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y (1991)) и Thornton et at. Nature 354:105 (1991).

Термин "агент" используется здесь для обозначения химического соединения, смеси химических соединений, биологической макромолекулы или экстракта, сделанного из биологических материалов.

В рамках изобретения, термины "метка" или "меченный" относятся к инкорпорации поддающегося детекции маркера, например, инкорпорации меченной радиоактивным изотопом аминокислоты или присоединения к полипептиду биотинильных групп, которые могут быть обнаружены авидином (например, стрептавидином, содержащим флуоресцентный маркер или ферментативную активность, которая может быть обнаружена оптическими или калориметрическими способами). В определенных ситуациях метка или маркер могут также быть терапевтическими. Различные способы мечения полипептидов и гликопротеидов известны в данной области техники и могут использоваться. Примеры меток для полипептидов включают, но не ограничены ими, следующее: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{35}S, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{125}I, ^{131}I), флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, люминофор на основе комплексов лантанидов), ферментативные метки (например, пероксидаза хрена, п-галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминесцентные, биотинильные группы, предопределенные эпитопы полипептида, распознаваемые вторичным репортером (например, последовательности пары лейциновых застежек, связывающие участки для вторичных антител, металлосвязывающие области, эпитопные метки). В некоторых вариантах осуществления метки присоединены с помощью спейсеров различной длины для ослабления потенциального пространственного затруднения. Термин "фармацевтическое средство или лекарственное средство" в рамках изобретения относится к химическому соединению или композиции, способной индуцировать желаемый терапевтический эффект при введении должным образом пациенту.

Другие химические термины используются здесь согласно стандартному использованию в данной области техники, как иллюстрируется The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, Сан-Франциско (1985)).

В рамках изобретения "по существу чистый" означает, что данная разновидность является преобладающей разновидностью (т.е. в молярном отношении она изобилует в большей степени, чем какие-либо другие отдельные разновидности в композиции), и предпочтительно существенно очищенная фракция является композицией, в которой данная разновидность включает по меньшей мере приблизительно 50% (в молярном отношении) всех присутствующих макромолекулярных разновидностей.

Обычно по существу чистая композиция включает более чем приблизительно 80% всех макромолекулярных разновидностей, присутствующих в композиции, более предпочтительно, более чем приблизительно 85%, 90%, 95% и 99%. Наиболее предпочтительно данная разновидность очищена до по существу однородности (разновидности примеси не могут быть обнаружены в композиции стандартными способами обнаружения), причем композиция состоит по существу из единственной макромолекулярной разновидности.

Использование в следующем описании и в формуле изобретения форм единственного числа должно быть истолковано как охватывающее и единственное, и множественное число, если не указано иное или если это явно не противоречит контексту. Термины "включающий", "имеющий", "представляющий собой", как в "имеющий химическую формулу", и "содержащий" должны быть истолкованы как открытые термины (т.е. означающие "включая, но не ограничиваясь"), если не указано иное. Например, полимерные остовы определенной формулы включают все мономерные звенья, показанные в формуле, и могут также включать дополнительные мономерные звенья, не показанные в формуле. Дополнительно, каждый раз, когда "включающий" или другой открытый термин используется в варианте осуществления, следует понимать, что тот же вариант осуществления может быть заявлен более узко с использованием промежуточного термина "состоящий по существу из" или закрытого термина "состоящий из".

Термин "около", "приблизительно" или "примерно", когда он используется в связи с числовым обозначением, означает, что включены серия или диапазон значений. Например, "приблизительно X" включает диапазон значений, которые составляют ±20%, ±10%, ±5%, ±2%, ±1%, ±0,5%, ±0,2% или ±0,1% от X, где X представляет собой числовое обозначение. В одном варианте осуществления термин "приблизительно" относится к диапазону значений, которые являются на 5% большими или меньшими, чем указанное значение. В другом варианте осуществления термин "приблизительно" относится к диапазону значений, которые являются на 2% большими или меньшими, чем указанное значение. В другом варианте осуществления термин "приблизительно" относится к диапазону значений, которые являются на 1% большими или меньшими, чем указанное значение.

Указание диапазонов значений служит просто в качестве краткого способа индивидуального обращения к каждому отдельному значению, попадающему в этот диапазон, если не указано иное, и каждое отдельное значение включено в описание, как если бы оно было индивидуально указано здесь. Диапазон, используемый здесь, если не указано иное, включает две границы диапазона. Например, выражение "x является целым числом от 1 до 6" и "x является целым числом 1-6" означает "x равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6", т.е. термины "от X до y" и "диапазон от X до Y" включают X и y и целые числа между ними.

Все способы, описанные здесь, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если не указано иное или если это явно не противоречит контексту. Использование любого и всех примеров или языка примеров (например, "такое как") предназначено просто для лучшей иллюстрации раскрытия и не должно быть истолковано как ограничение объема притязаний, если явно не указано иное. Ни одна формулировка в описании не должна быть истолкована как указание на то, что какой-либо не заявленный

элемент важен для того, что заявлено.

"Биологически совместимый" в рамках изобретения предназначен для описания соединений, проявляющих минимальные деструктивные или организменные ответы в контакте с жидкостями организма или живыми клетками или тканями. Таким образом, биологически совместимая группа, в рамках изобретения, относится к алифатической, циклоалкильной, гетероалифатической, гетероциклоалкильной, арильной или гетероарильной группе, попадающей под определение слова биологически совместимое, как определено выше. Термин "Биологическая совместимость", в рамках изобретения, также означает, что соединения показывают минимальные взаимодействия с белками расознавания, например, природными антителами, клеточными белками, клетками и другими компонентами биологических систем, если такие взаимодействия не являются специфически желательными. Таким образом, вещества и функциональные группы, специфически предназначенные для индукции вышеупомянутых минимальных взаимодействий, например, лекарственные средства и пролекарства, считаются биологически совместимыми. Предпочтительно (за исключением соединений, которые должны быть цитотоксическими, таких как, например, противоопухолевые средства), соединения "биологически совместимы", если их добавление к нормальным клеткам in vitro в концентрациях, подобных желаемым системным концентрациям in vivo, приводят к меньшему чем или равном 1% некрозу клеток в течение времени, эквивалентного периоду полужизни соединения in vivo (например, промежуток времени, требуемый для удаления/клиренса 50% соединения, введенного in vivo), и их введение in vivo вызывает минимальное и с медицинской точки зрения приемлемое воспаление, реакцию инородного тела, иммунотоксичность, химическую токсичность и/или другие подобные неблагоприятные эффекты. В вышеупомянутом предложении термин "нормальные клетки" относится к клеткам, не предназначенным для того, чтобы быть разрушенными или иначе значительно затронутыми тестируемым соединением.

"Биоразлагаемый" в рамках изобретения, "биоразлагаемые" полимеры являются полимерами, которые подвержены биологической обработке in vivo. В рамках изобретения, "биоразлагаемые" соединения или группы представляют собой таковые, которые, при захвате клетками, могут быть разрушены лизосомальными или другими химическими механизмами или гидролизом на компоненты, которые клетки могут либо повторно использовать, либо избавляться от них без значительного токсического эффекта на клетки. Термин "биорасщепляемый" в рамках изобретения имеет то же значение, что и "биоразлагаемый". Фрагменты разложения предпочтительно вызывают минимальную органную или клеточную перегрузку или патологические процессы, вызванные такой перегрузкой или другими неблагоприятными эффектами in vivo, или не вызывают их вовсе. Примеры процессов биологического разложения включают ферментативный и неферментативный гидролиз, окисление и восстановление.

Подходящие условия для неферментативного гидролиза биоразлагаемых конъюгатов белок-полимер-лекарственное средство (или их компонентов, например, биоразлагаемого полимерного носителя и линкеров между носителем и антителом или молекулой лекарственного средства), описанных здесь, например, включают воздействие на биоразлагаемые конъюгаты воды при температуре и pH лизосомального внутриклеточного компартемента. Биологическое разложение некоторых конъюгатов белок-полимер-лекарственное средство (или их компонентов, например, биоразлагаемого полимерного носителя и линкеров между носителем и антителом или молекулой лекарственного средства) может также быть усилено экстрацеллюлярно, например, в низких областях pH тела животных, например, области воспаления, в близком соседстве с активированными макрофагами или другими клетками, высвобождающими факторы, облегчающие разложение. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления эффективный размер полимерного носителя при pH~7,5 заметно не изменяется в течение от 1 до 7 дней и остается в пределах 50% размера оригинального полимера в течение по меньшей мере нескольких недель. При pH~5, с другой стороны, полимерный носитель предпочтительно заметно разлагается в течение от 1 до 5 дней и полностью преобразовывается в низкомолекулярные фрагменты в течение временного интервала от двух недель до нескольких месяцев. Целостность полимера в таких тестах может быть измерена, например, с помощью эксклюзионной ВЭЖХ. Несмотря на то, что более быстрое разложение может быть в некоторых случаях предпочтительным, в целом может быть более желательно, чтобы полимер разлагался в клетках со скоростью, не превышающей скорость метаболизма или экскреции полимерных фрагментов клетками. В предпочтительных вариантах осуществления полимеры и побочные продукты биологического расщепления полимера являются биологически совместимыми.

"Малеимидоблокирующее соединение" в рамках изобретения относится к соединению, которое может реагировать с малеимидом для преобразования его в сукцинимид, и "защитная группа малеимидогруппы" относится к химической группе, присоединенной к сукцинимиду после превращения. В некоторых вариантах осуществления малеимидоблокирующее соединение является соединением, имеющим концевую тиоловую группу для реакции с малеимидом. В одном варианте осуществления малеимидоблокирующее соединение является цистеином, N-ацетил цистеином, сложным метиловым эфиром цистеина, N-метил цистеином, 2-меркаптоэтанолом, 3-меркаптопропановой кислотой, 2-меркаптоуксусной кислотой, меркаптометанолом (т.е. $HOCH_2SH$), бензилтиолом, в котором фенил замещен одним или более гидрофильными заместителями, или 3-аминопропан-1-тиолом.

"Гидрофильный": термин "гидрофильный", насколько он относится к заместителям, например, на

мономерных звеньях макромолекулы полимера или на защитной группе малеимидогруппы, делая из гидрофильными или водорастворимыми, по существу не отличается от общего значения этого термина в данной области техники и обозначает химические группы, содержащие ионизуемые, полярные или поляризуемые атомы, или которые иным образом могут быть сольватированы молекулами воды. Таким образом гидрофильная группа, в рамках изобретения, относится к алифатической, циклоалкильной, гетероалифатической, гетероциклоалкильной, арильной или гетероарильной группе, попадающей под определение слова гидрофильный, как определено выше. Примеры особых подходящих гидрофильных органических групп включают, без ограничения, алифатические или гетероалифатической группы, включающие цепочку атомов в диапазоне приблизительно от одного до двенадцати атомов, гидроксил, гидроксиалкил, амин, карбоксил, амид, карбоксильный сложный эфир, тиоэфир, альдегид, нитрил, изонитрил, нитрозо, гидроксиламин, меркаптоалкил, гетероцикл, карбаматы, карбоновые кислоты и их соли, сульфоновые кислоты и их соли, эфирами сульфоновой кислоты, фосфорные кислоты и их соли, сложными эфиры фосфата, эфиры полигликоля, полиамины, поликарбоксилаты, полиэфиры и политиоэфиры. В некоторых вариантах осуществления гидрофильные заместители включают карбоксильную группу (COOH), альдегидную группа (CHO), кетоновую группу (COC_{1-4} алкил), метилол (CH_2OH) или гликоль (например, $CHOH-CH_2OH$ или $CH-(CH_2OH)_2$), NH_2, F, циано, SO_3H, PO_3H и т.п.

Термин "гидрофильный", насколько он относится к полимерам, раскрытым здесь в целом, не отличается от использования этого термина в данной области техники и обозначает полимеры, включающие гидрофильные функциональные группы, как определено выше. В предпочтительном варианте осуществления гидрофильный полимер является водорастворимым полимером. Гидрофильность полимера может быть непосредственно измерена посредством определения энергии гидратации или определена посредством расследования между двумя жидкими фазами, или хроматографией на твердых фазах с известной гидрофобностью, таких как, например, C4 или C18.

"Полимерный носитель": термин полимерный носитель, в рамках изобретения, относится к полимеру или модифицированному полимеру, который подходит для ковалентного присоединения или может быть ковалентно присоединен к одной или более молекулам лекарственного средства с определенным линкером и/или одному или более PBRMs с определенным линкером.

"Физиологические условия": фраза "физиологические условия", в рамках изобретения, относится к диапазону химических (например, pH, ионная сила) и биохимических (например, концентрации фермента) условий, с которыми есть вероятность столкнуться во внеклеточных жидкостях живых тканей. Для большинства нормальных тканей физиологический pH составляет от приблизительно 7,0 до 7,4. Циркуляция плазмы крови и нормальной внутритканевой жидкости представляет типичные примеры нормальных физиологических условий.

"Лекарственное средство": в рамках изобретения термин "лекарственное средство" относится к соединению, которое биологически активно и обеспечивает желаемый физиологический эффект после введения пациенту (например, активный фармацевтический ингредиент).

"Агент антиангиогенеза" или "ингибитор ангиогенеза" относится к веществу с маленькой молекулярной массой, полинуклеотиду, полипептиду, выделенному белку, рекомбинантному белку, антителу или их конъюгатам или слитым белкам, которое прямо или косвенно ингибирует ангиогенез, васкулогенез или нежелательную сосудистую проницаемость. Ингибитор ангиогенеза включает агенты, связывающиеся с ангиогенным фактором или его рецептором и блокирующие их ангиогенную активность. Например, агент антиангиогенеза может быть антителом или другим антагонистом ангиогенного агента, таким как, включая, но не ограничиваясь ими, антитела к VEGF-A или к рецептору VEGF-A (например, рецептору KDR или рецептору Flt-1), VEGF-trap, анти-PDGFR ингибиторы, такие как Gleevec™ (иматиниб мезилат). Агенты антиангиогенеза также включают нативные ингибиторы ангиогенеза, например, ангиостатин, эндостатин, и т.п.

"Цитотоксический": в рамках изобретения термин "цитотоксический" означает вещество, токсичное для клеток или выбранной популяции клеток (например, раковых клеток). Токсический эффект может приводить к некрозу и/или лизису клеток. В некоторых случаях токсический эффект может быть сублетальным деструктивным эффектом на клетку, например, замедляющим или останавливающим рост клеток. Для достижения цитотоксического эффекта лекарственное средство или пролекарство могут быть выбраны, среди прочих, из группы, состоящей из разрушающего ДНК агента, разрушающего микротрубочки агента или цитотоксического белка или полипептида.

"Цитостатический": в рамках изобретения термин "цитостатический" относится к лекарственному средству или другому соединению, ингибирующему или останавливающему рост и/или размножение клеток.

"Малаая молекула": в рамках изобретения термин "малая молекула" относится к молекулам, природным или искусственно созданным (например, химическим синтезом), которые имеют относительно низкую молекулярную массу. Предпочтительные малые молекулы биологически активны в том, что они оказывают локальный или системный эффект у животных, предпочтительно млекопитающих, более предпочтительно человека. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления малая молекула является лекарственным средством, и малая молекула упоминается как "молекула лекарственного средства" или "лекарственное средство" или "тера-

певтическое средство". В некоторых вариантах осуществления молекула лекарственного средства имеет MW меньше чем или равную приблизительно 5 кДа. В других вариантах осуществления молекула лекарственного средства имеет MW меньше чем или равную приблизительно 1,5 кДа. В вариантах осуществления молекула лекарственного средства может быть выбрана из алкалоидов барвинка, ауристатинов, дуокармицинов, тубулизинов, ненатуральных соединений камптотецина, ингибиторов топоизомеразы, ДНК-связывающих лекарственных средств, ингибиторов киназы, ингибиторов МЕК, ингибиторов KSP, калихеамицинов, SN38, пирролобензодиазепинов и их аналогов. Предпочтительно, хотя не обязательно, лекарственное средство является таким, которое соответствующий государственный орган или структура, например, FDA уже считает безопасным и эффективным для использования. Например, лекарственные средства для использования у человека, перечисленные FDA под 21 C.F.R. 330,5, 331-361, и 440-460; лекарственные средства для ветеринарного использования, перечисленные FDA под 21 C.F.R. 500-589, которые включены здесь ссылкой, все считают подходящими для использования с гидрофильными полимерами по изобретению.

"Производное лекарственного средства" или "модифицированное лекарственное средство" и т.п., в рамках изобретения, относится к соединению, включающему молекулу лекарственного средства для доставки конъюгатом, раскрытым здесь, и функциональную группу, способную присоединять молекулу лекарственного средства к полимерному носителю.

"Активная форма" в рамках изобретения относится к форме соединения, демонстрирующей намеченную фармацевтическую эффективность in vivo или in vitro. В частности, когда молекула лекарственного средства для доставки конъюгатом, раскрытым здесь, высвобождается из конъюгата, активная форма может быть самим лекарственным средством или его производными, демонстрирующими намеченные терапевтические свойства.

Высвобождение лекарственного средства из конъюгата может быть достигнуто расщеплением биоразлагаемой связи линкера, присоединяющего лекарственное средство к полимерному носителю. Активные производные лекарственного средства, соответственно, могут включать часть линкера.

"PHF" относится к поли(1-гидроксиметилэтилен гидроксиметил-формалю).

В рамках изобретения термины "полимерное звено", "мономерное звено макромолекулы", "мономер", "мономерное звено", "звено" все относятся к повторяющейся структурной единице в полимере.

В рамках изобретения "молекулярная масса" или "MW" полимера или полимерного носителя/остова или полимерных конъюгатов относится к средней молекулярной массе немодифицированного полимера, если не указано иное.

"Ингибитор иммунных контрольных точек" или "агент, ингибирующий иммунные контрольные точки", или "агент, блокирующий иммунные контрольные точки", или "модулятор иммунных контрольных точек" в рамках изобретения относится к агенту, связывающемуся с белком, ингибирующим иммунные контрольные точки и блокирующему его активность, таким образом, позволяя иммунной системе распознавать опухолевые клетки и обеспечивая пролонгированный иммунотерапевтический ответ. Ингибирование может быть конкурентным или неконкурентным ингибированием, которое может быть стерическим или аллостерическим. В случаях, где белок иммунной контрольной точки является иммуностимулирующим белком, ингибитор иммунных контрольных точек промотирует активность иммуностимулирующего белка, например, путем связывания и активации иммуностимулирующего белка иммунной контрольной точки или путем ингибирования за счет препятствования, например, путем связывания или деактивации, иммуностимулирующего белка иммунной контрольной точки. Примером ингибитора иммунной контрольной точки является антитело к белку иммунной контрольной точки.

"Иммунные контрольные точки" в рамках изобретения относятся к ингибирующим путям иммунной системы, которые ответственны за поддержание аутотолерантности и модуляцию продолжительности и амплитуды физиологических иммунных ответов в периферических тканях для уменьшения коллатерального повреждения ткани. Иммунные контрольные точки регулируются белками иммунных контрольных точек.

"Белок иммунных контрольных точек", в рамках изобретения, относится к белку, как правило, рецептору (например, CTLA4 или PD-1) или лиганду (например, PD-L1), который регулирует или модулирует степень иммунного ответа. Белки иммунных контрольных точек могут быть ингибирующими или стимулирующими. В частности, белки иммунных контрольных точек ингибируют активацию иммунного ответа. Таким образом, ингибирование ингибирующего белка иммунной контрольной точки стимулирует или активирует иммунный ответ, такой как активация и пролиферация Т-клеток.

"Мишенью" ингибитора иммунных контрольных точек, в рамках изобретения, является белок иммунных контрольных точек, с которым ингибитор иммунных контрольных точек или агент, ингибирующий иммунные контрольные точки, связываются для блокирования активности. Как правило, ингибитор иммунных контрольных точек специфически связывается с мишенью. Например, мишенью рассматриваемого в качестве примера анти-CTLA4 антитела, называемого ипилимумаб, является CTLA4.

"Комбинированная терапия" в рамках изобретения относится к лечению, в котором пациенту дают два или более терапевтических средств, например, по меньшей мере два или по меньшей мере три терапевтических средства, для лечения единственного заболевания. Например, комбинированная терапия включает терапию конъюгатом NaPi2b-нацеливаемое антитело-лекарственное средство и ингибитор им-

мунных контрольных точек.

В рамках изобретения "совместное введение" или "введенный совместно" относится к введению по меньшей мере двух различных терапевтических средств достаточно близко по времени. Такое введение может быть осуществлено в любом порядке, включая одновременное введение, а также через временные интервалы от нескольких секунд до нескольких дней. Такое введение может также включать больше, чем единственное введение одного агента и/или независимо другого агента. Введение агентов может осуществлять одним и тем же или разными путями.

В рамках изобретения, "анти-CTLA4 антитело" относится к любому антителу, специфически связывающемуся с ассоциированным с цитотоксическим Т-лимфоцитом белком 4 (CTLA4) или его растворимым фрагментом и блокирующему связывание лигандов с CTLA4, таким образом приводя к конкурентному ингибированию CTLA4 и ингибированию CTLA4-опосредованного ингибирования активации Т-клеток. Следовательно, анти-CTLA4 антитела являются ингибиторами CTLA4. Ссылка на анти-CTLA4 антитела здесь включают полноразмерное антитело и его производные, такие как его антиген-связывающие фрагменты, специфически связывающиеся с CTLA4. Примеры анти-CTLA4 антител включают, но не ограничены ими, ипилимумаб или тремелимумаб или их производные или антиген-связывающий фрагмент.

В рамках изобретения антиген "белок, ассоциированный с цитотоксическим Т-лимофцитом 4" (CTLA4; также известный как CD 152) относится к ингибирующему рецептору суперсемейства иммуноглобулина, связываемому такими лигандами как CD80 (также называемым B7-1) и CD86 (также называемым B7-2). CTLA4 включает человеческие и нечеловеческие белки. В частности, антиген CTLA4 включает человеческий CTLA4, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10 (см., например, GenBank № доступа AAL07473,1).

В рамках изобретения "антитело анти-PD-1" относится к любому антителу, специфически связывающемуся с белком запрограммированной смерти клетки 1 (PD-1) или его растворимым фрагментом и блокирующему связывание лигандов с PD-1, таким образом приводя к конкурентному ингибированию PD-1 и ингибированию опосредованного PD-1 ингибирования активации Т-клеток. Следовательно, антител анти-PD-1 являются ингибиторами PD-1. Ссылка на антитела анти-PD-1 здесь включает полноразмерное антитело и его производные, такие как антиген-связывающие фрагменты, специфически связывающиеся с PD-1. Примеры антител анти-PD-1 включают, но не ограничены ими, ниволумаб, МК-3475, пидилизумаб или их производное или антиген-связывающий фрагмент.

В рамках изобретения антиген "белок запрограммированной смерти клетки 1" (PD-1) относится к ингибирующему рецептору, который является мембранным белком типа 1 и связывается такими лигандами как PD-L1 и PD-L2, которые являются членами семейства B7. PD-1 включает человеческие и нечеловеческие белки. В частности, антиген PD-1 включает человеческий PD-1, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 299 (см., например, UniProt № доступа Q15116,3). В рамках изобретения, антитело анти-PD-L1 относится к антителу, специфически связывающемуся с лигандом запрограммируемой смерти 1 (PD-L1) или его растворимым фрагментом и блокирующему связывания лиганда с PD-1, таким образом приводя к конкурентному ингибированию PD-1 и ингибированию опосредуемого PD-1 ингибирования активности Т-клеток. Следовательно, антител анти-PD-LI являются ингибиторами PD-1. Ссылка на антитела анти-PD-L1 здесь включает полноразмерное антитело и его производные, такие как антиген-связывающие фрагменты, специфически связывающиеся с PD-L1. Примеры антител анти-PD-L1 включают, но не ограничены ими, BMS-936559, MPDL3280A, MEDI4736 или их производное или антиген-связывающий фрагмент.

В рамках изобретения "режим дозирования" или "режим введения" относится к вводимому количеству агента, например, композиции, содержащей конъюгат NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство, и частоте введения. Режим введения зависит от заболевания или состояния, подвергаемого лечению, и таким образом, может варьировать.

В рамках изобретения, "частота" введения относится ко времени между последовательными введениями для лечения. Например, частота может исчисляться днями, неделями или месяцами. Например, частота может составлять несколько раз в неделю, например, два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю, пять раз в неделю, шесть раз в неделю или ежедневно. Частота также может составлять одну, две, три или четыре недели. Определенная частота зависит от конкретного подвергаемого лечению заболевания или состояния. Обычно частота составляет несколько раз в неделю, и обычно дважды в неделю.

В рамках изобретения, "цикл введения" относится к повторяемому графику режима введения фермента и/или второго агента, повторяющемуся в виде последовательных введений. Например, цикл введения может быть 28-дневным циклом с введением дважды в неделю в течение трех недель, сопровождаемым одной неделей прекращения введения.

В рамках изобретения, при ссылке на дозировку в расчете на мг/кг масы тела пациента, считают, что средний человек имеет массу тела приблизительно 70 кг-75 кг, например, 70 кг и площадь поверхности тела (BSA) 1,73 м. В рамках изобретения, улучшение в отношении симптомов определенного заболевания или нарушения в результате лечения, такого как введение фармацевтической композиции или дру-

гого терапевтического средства, относится к любому уменьшению, постоянному или временному, длящемуся или преходящему, в отношении симптомов или неблагоприятных эффектов состояния, такому как, например, сокращение неблагоприятных эффектов, связанных с или которые происходят в результате введения конъюгата NaPi2b-нацеливаемое антитело-лекарственное средство.

В рамках изобретения "лечение" или "лечить" описывает управление и заботу о пациенте в целях борьбы с заболеванием, состоянием или нарушением и включает введение конъюгата согласно раскрытию или его фармацевтической композиции для облегчения симптомов или осложнений заболевания, состояния или нарушения или устранения заболевания, состояния или нарушения.

В рамках изобретения, "предупреждение" или "профилактика" относится к сокращению риска развития заболевания или состояния, или сокращению или устранению начала симптомов или осложннений заболевания, состояния или нарушения.

Термин "эффективное количество" или "достаточное количество", насколько это относится к активному веществу, относится к количеству, необходимому для индукции желаемого биологического ответа. В рамках изобретения, "терапевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективная доза" относится к дозе или количеству агента, соединения, материала или композиции, содержащей соединение, которое яавляется по меньшей мере достаточным для оказания поддающегося обнаружению терапевтического эффекта. Эффект может быть обнаружен любым способом с помощью теста, известного в данной области техники. Точное эффективное количество для пациента зависит от массы тела, размера тела и состояния здоровья пациента; характера и масштабов состояния; и терапевтическое средства, выбранного для введения.

"Пациент" включает млекопитающих. Млекопитающее может представлять собой, например, любое млекопитающее, например, человека, примата, птицу, мышь, крысу, домашнюю птицу, собаку, кошку, корову, лошадь, козу, верблюда, овцу или свинью. Предпочтительно, млекопитающее является человеком.

В рамках изобретения, "форма разовой дозы" или "стандартная лекарственная форма" относятся к физически дискретным единицам, подходящим для человека и животных и упакованным индивидуально, как известно в данной области техники.

В рамках изобретения, формой разовой дозы именуется состав, сформированный как единственная доза.

В рамках изобретения "набор" относится к комбинации компонентов, таких как комбинация композиций, описанных здесь, и другого объекта для намеченной цели, включая, но не ограничиваясь этим, воссоздание, активацию и инструменты/устройства для доставки, введения, диагностики и оценки биологической активности или свойства. Наборы могут включать инструкции по использованию.

Настоящее раскрытие включает все изотопы атомов, встречающихся в соединениях по изобретению. Изотопы включают атомы, имеющие то же атомное число, но различные массовые числа. В качестве общего примера и без ограничения, изотопы водорода включают тритий и дейтерий. Изотопы углерода включают С-13 и С-14.

Настоящее раскрытие включает все изомеры соединения, относящиеся к и включающие оптические изомеры и таутомерные изомеры, где оптические изомеры включают энантиомеры и диастереомеры, хиральные изомеры и нехиральные изомеры, и оптические изомеры включают выделенные оптические изомеры, а также смеси оптических изомеров, включая рацемические и нерацемические смеси; где изомер может быть в выделенной форме или в смеси с одним или более другими изомерами.

Антитела NaPi2b.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство, раскрытые здесь, включают моноклональные антитела, специфически распознающие NaPi2b и имеющие способность ингибировать активность NaPi2b.

Примеры антител, используемых в конъюгатах антитело-лекарственное средство, раскрытых здесь, включают, например, антитела, упомянутые здесь как антитело XMT 1535 и/или антитело 10H1.11.4B. Эти антитела показывают специфичность в отношении человеческого NaPi2b, и, как было показано, ингибируют функциональную активность NaPi2b in vitro.

Каждое из моноклональных антител NaPi2b, описанных здесь, включает тяжелую цепь (HC), вариабельную область тяжелой цепи (VH), легкую цепь (LC) и вариабельную область легкой цепи (VL), как показано в аминокислотных и соответствующих последовательностях нуклеиновой кислоты, представленных ниже. Вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи для каждого антитела выделены цветом в аминокислотных последовательностях, показанных ниже. Определяющая комплементарность области (CDRs) тяжелой цепи и легкой цепи подчеркнуты в аминокислотных последовательностях, представленных ниже. Аминокислоты, охватывающие определяющие комплементарность области (CDRs) для антитела XMT 1535, являются такими, как определено E.A. Rabat et al. (см. Rabat, E.A., et al., Sequences of Protein of immunological interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office (1991)), и раскрыты в Патенте США 8,603,474, и аминокислоты, охватывающие CDRs для антитела 10H1.11.4B, являются такими, как определено в патенте США № 8,535,675.

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи XMT 1535 (вариабельная область тяжелой цепи

(SEQ ID NO: 3)+константная область тяжелой цепи IgG1 (SEQ ID NO: 11))

QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTGYNIHWVKQAPGQGLEWIGAIYPGNGDTS
YKQKFRGRATLTADTSTSTVYMELSSLRSEDSAVYYCARGETARATFAYWGQGTLVTVSSGAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPG* (SEQ ID NO: 1)

CDRH1: GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 5)

CDRH2: AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 6)

CDRH3: GETARATFAY (SEQ ID NO: 7)

Аминокислотная последовательность легкой цепи XMT 1535 (вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO: 4)+константная область легкой цепи (SEQ ID NO: 12))

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDIGNFLNWYQQKPGKTVKVLIYYTSSLYSGVP
SRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYSKLPLTFGQGTKLELKRRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 2)

CDRL1: SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 8)

CDRL2: YTSSLYS (SEQ ID NO: 9)

CDRL3: QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 10)

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи 10H1.11.4B (вариабельная область тяжелой цепи (SEQ ID NO: 16)+константная область тяжелой цепи IgG1 (SEQ ID NO: 13))

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSDFAMSWVRQAPGKGLEWVATIGRVAFHTY
YPDSMKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRGFDVGHFDFWGQGTLVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
LSLSPG* (SEQ ID NO: 14)

CDRH1: GFSFSDFAMS (SEQ ID NO: 18)

CDRH2: ATIGRVAFHTYYPDSMKG (SEQ ID NO: 19)

CDRH3: ARHRGFDVGHFDF (SEQ ID NO: 20)

Аминокислотная последовательность легкой цепи 10H1.11.4B (вариабельная область легкой цепи (SEQ ID NO: 17)+константная область легкой цепи (SEQ ID NO: 12))

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSETLVHSSGNTYLEWYQQKPGKAPKLLIYRVSNR
FSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSFNPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 15)

CDRL1: RSSETLVHSSGNTYLE (SEQ ID NO: 21)

CDRL2: RVSNRFS (SEQ ID NO: 22)

CDRL3: FQGSFNPLT (SEQ ID NO: 23)

Также в раскрытие включены антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, или которые перекрестно конкурируют за связывание с тем же эпитопом, как антитела, описанные здесь. Например, антитела, раскрытые здесь, специфически связываются с NaPi2b, причем антитело связывается с эпитопом, включающим один или более аминокислотных остатков на человеческом NaPi2b (например, GenBank № доступа 095436,3).

Антитела, раскрытые здесь, специфически связываются с эпитопом на полноразмерном человеческом NaPi2b, включающем аминокислотную последовательность:

1 MAPWPELGDA QPNPDKYLEG AAGQQPTAPD KSKETNKTDN TEAPVTKIEL
51 LPSYSTATLI DEPTEVDDPW NLPTLQDSGI KWSERDTKTK ILCFFQGIGR
101 LILLLGFLYF FVCSLDILSS AFQLVGGKMA GQFFSNSSIM SNPLLGLVIG
151 VLVTVLVQSS STSTSIVVSM VSSSLLTVRA AIPIIMGANI GTSITNTIVA
201 LMQVGDRSEF RRAFAGATVH DFFNWLSVLV LLPVEVATHY LEIITQLIVE
251 SFHFKNGEDA PDLLKVITKP FTKLIVQLDK KVISQIAMND EKAKNKSLVK
301 IWCKTFTNKT QINVTVPSTA NCTSPSLCWT DGIQNWTMKN VTYKENIAKC
351 КИФВНФЛЬП ДЛАВГТИЛЛИ LSLLVLCGCL IMIVKILGSV LKГQVATVIK
401 KTINTDFPFP FAWLTGYLAI LVGAGMTFIV QSSSVFTSAL TPLIGIGVIT
451 IERAYPLTLG SNIGTTTTAI LAALASPGNA LRSSLQIALC HFFFNISGIL
501 LWYPIPFTRL PIRMAKГLGN ISAKYRWFAV FYLIIFFFLI PLTVFGLSLA
551 GWRVLVGVGV PVVFIIILVL CLRLLQSRCP RVLPKKLQNW NFLPLWMRSL
601 KPWDAVVSKF TGCFQMRCCC CCRVCCRACC LLCDCPKCCR CSKCCEDLEE
651 AQEGQDVPVK APETFDNITI SREAQGEVPA SDSKTECTAL (SEQ ID NO: 24)

Антитела, раскрытые здесь, специфически связываются с эпитопом на внеклеточной области (ECD) человеческого NaPi2b.

Специалисту понятно, что возможно определить без дополнительного экспериментирования, имеет ли моноклональное антитело ту же специфичность, как моноклональное антитело, раскрытое здесь (например, XMT 1535, 10H1.11.4B) путем установления, препятствует ли первое связыванию второго с ес-

тественным партнеру связывания или другой молекулой, известной как связывающаяся с NaPi2b. Если тестируемое моноклональное антитело конкурирует с моноклональным антителом, раскрытым здесь, что выражается в уменьшении связывания моноклональным антителом, раскрытым здесь, то эти два моноклональных антитела связываются с тем же или близко родственным эпитопом.

Альтернативный метод для определения, имеет ли моноклональное антитело специфичность моноклонального антитела, раскрытого здесь, состоит в преинкубации моноклонального антитела, раскрытого здесь, с растворимым NaPi2b (в отношении которого оно является в целом реакционоспособным) и последующем добавлении тестируемого моноклонального антитела, чтобы определить, ингибируется ли способность тестируемого моноклонального антитела связываться с NaPi2b. Если тестируемое моноклональное антитело ингибируется, тогда, по всей вероятности, оно имеет ту же, или функционально эквивалентную, эпитопную специфичность, как моноклональное антитело, раскрытое здесь.

Скрининг моноклональных антител, раскрытых здесь, может также быть осуществлен, например, путем измерения NaPi2b-опосредованной активности и определения, в состоянии ли тестируемое моноклональное антитело модулировать, блокировать, ингибировать, уменьшать, противодействовать, нейтрализовывать или иначе препятствовать активности NaPi2b.

Антитела NaPi2b получают, например, с использованием различных процедур, известных в данной области техники, которые могут использоваться для продуцирования моноклональных антител, направленных к NaPi2b или к их производным, фрагментам, аналогам, гомологам или ортологам (см., например, Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow E, and Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Нью-Йорк, включенный в настоящее описание ссылкой). Полностью человеческие антитела являются молекулами антитела, в которых вся последовательность легкой цепи и тяжелой цепи, включая CDRs, происходит от генов человека. Такие антитела называют "человеческими антителами" или "полностью человеческими антителами". Человеческие моноклональные антитела получают, например, с помощью процедур, описанных в Примерах, приведенных ниже. Человеческие моноклональные антитела могут быть также получены при помощи метода триомы; метода человеческой B-клеточной гибридомы (см. Kozbor, et al., 1983 Immunol Today 4: 72); и метода гибридомы EBV для получения человеческих моноклональных антител (см. Cole, et al., 1985 In: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Человеческие моноклональные антитела могут быть использованы и могут быть получены при помощи человеческих гибридом (см. Cote, et al., 1983. Proc Natl Acad Sci USA 80: 2026-2030) или путем трансформации человеческих B-клеток вирусом Эпштейна-Барра in vitro (см. Cole, et al., 1985 In: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

Антитела очищают известными методами, такими как афинная хроматография, с использованием белка A или белка G, которые обеспечивают прежде всего фракцию IgG иммунной сыворотки. Впоследствии, или альтернативно, специфический антиген, который является мишенью искомого иммуноглобулина, или его эпитоп может быть иммобилизован на колонке для очистки иммуноспецифического антитела иммуноафинной хроматографией. Очистка иммуноглобулинов обсуждается, например, D. Wilkinson (The Scientist, опубликовано The Scientist, Inc., Филадельфия PA, изд. 14, № 8 (17 апреля 2000), с. 25-28).

Моноклональные антитела, которые модулируют, блокируют, ингибируют, уменьшают, противодействуют, нейтрализуют или иначе препятствуют активности NaPi2b, получают, например, путем иммунизации животного мембраносвязанным и/или растворимым NaPi2b, таким как, например, мышиный, крысиный или человеческий NaPi2b или его иммуногенный фрагмент, производное или вариант. Также животное иммунизируют клетками, трансфицированными вектором, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую NaPi2b, таким образом, что NaPi2b экспрессируется и связывается с поверхностью трансфицированных клеток. Также антитела получают путем скрининга библиотеки, содержащей антитело или последовательности антигенсвязывающей области для связывания с NaPi2b. Эту библиотеку получают, например, в бактериофаге как белок или пептид слияния с белком оболочки бактериофага, экспрессирующмся на поверхности собранных фаговых частиц, и кодирующими последовательностями ДНК, содержащимися в фаговых частицах (т.е. "библиотека фагового дисплея"). Гибридомы, являющиеся результатом слияний миелома/B-клетка, затем проверяют на реактивность к NaPi2b. Кроме того, антитела, выбранные из и в случае необходимости оптимизированные в библиотеках дисплея антитела дрожжей и системах представления библиотеки дрожжей, как описано в, например:

Blaise L, Wehnert A, Steukers MP, van den Beucken T, Hoogenboom HR, Hufton SE. Construction and diversification of yeast cell surface displayed libraries by yeast mating: application to the affinity maturation of Fab antibody fragments. Gene. 2004 Nov 24;342(2):211-8; Boder ET, Wittrup KD. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. Nat Biotechnol. 1997 Jun;15(6):553-7; Kuroda K, Ueda M. Cell surface engineering of yeast for applications in white biotechnology. Biotechnol Lett. 2011 Jan;33(1):1-9. doi: 10.1007/s10529-010-0403-9. Review; Lauer TM, Agrawal NJ, Chennamsetty N, Egodage K, Helk B, Trout BL. Developability index: a rapid in silico tool for the screening of antibody aggregation propensity. J Pharm Sci. 2012 Jan;101(1):102-15; Orcutt K.D. and Wittrup K.D. (2010), 207-233 doi: 10.1007/978-3-642-01144-3_15; Rakestraw JA, Aird D, Aha PM, Baynes BM, Lipovsek D. Secretion-and-capture cell-surface display for selection of target-binding proteins. Protein Eng Des Sel. 2011 Jun;24(6):525-30; US 8,258,082; US 6,300,064; US 6,696,248; US 6,165,718; US 6,500,644; US 6,291,158; US 6,291,159; US 6,096,551; US 6,368,805; US 6,500,644.

Примеры систем представления библиотеки дрожжей описаны в, например, WO2008118476; WO2009/036379; WO2010105256; и WO2012009568. В некоторых вариантах осуществления такие библиотеки дисплея антител дрожжей или системы представления библиотеки дрожжей разрабатывают для имитации или отражения разнообразия характеристик человеческого предиммунного спектра антител. В некоторых вариантах осуществления такое разнообразие библиотек дисплея антител дрожжей или разнообразие систем представления библиотеки дрожжей генерируют in silico. В некоторых вариантах осуществления такие библиотеки дисплея антитела дрожжей или системы представления библиотеки дрожжей включают дрожжевые клетки Saccharomyces, такие как клетки Saccharomyces cerevisiae. В некоторых вариантах осуществления такие библиотеки дисплея антител дрожжей или системы представления библиотеки дрожжей включают клетки Pichia.

Моноклональные антитела получают, например, с использованием способов гибридомы, таких как описанные Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975). В способе гибридомы мышь, хомяка или другое подходящее организменное животное, как правило, иммунизируют иммунизирующим агентом для индукции лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, специфически связывающиеся с иммунизирующим агентом. Также лимфоциты могут быть иммунизированы in vitro.

Иммунизирующий агент, как правило, включает белковый антиген, его фрагмент или белок слияния. Обычно либо используют лимфоциты периферической крови, если желаемы клетки человеческого происхождения, либо используют клетки селезенки или клетки лимфатического узла, если желаемы нечеловеческие млекопитающие источники. Лимфоциты затем сливают с иммортализованной клеточной линией с использованием подходящего фактора слияния, такого как полиэтиленгликоль, для формирования клеток гибридомы (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Иммортализованные клеточные линии являются обычно трансформированными клетками млекопитающих, в частности, миеломными клетками, происходящими от грызуна, крупного рогатого сокта и человека. Обычно, используют линии миеломных клеток крысы или мыши. Клетки гибридомы могут культивироваться в подходящей культуральной среде, предпочтительно содержащей одно или более веществ, тормозящих рост или выживание неслитых иммортализованных клеток. Например, если парентеральные клетки испытают недостаток в ферменте гипоксантин гуанин фосфорибозил трансферазе (HGPRT или HPRT), культуральная среда для гибридом, как правило, включает гипоксантин, аминоптерин и тимидин ("среда HAT"), которые предотвращают рост HGPRT-дефицитных клеток.

Предпочтительными иммортализованными клеточными линиями являются такие, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильные высокие уровни экспрессии антитела выбранными продуцирующими антитело клетками и чувствительны к среде, такой как среда HAT. Более предпочтительные иммортализованные клеточные линии являются мышиными линиями миеломы, которые могут быть получены, например, из Salk Institute Cell Distribution Center, Сан-Диего, Калифорния и American Type Culture Collection, Манассас, Вирджиния. Человеческие клеточные линии миеломы и клеточные линии мыши-человека гетеромиеломы также были описаны в отношении продукции моноклональных антител (см. Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., Нью-Йорк, (1987) стр. 51-63)).

Культуральная среда, в которой культивируют клетки гибридомы, может затем быть протестирована на присутствие моноклональных антител, направленных к антигену.

Предпочтительно, связывающую специфичность моноклональных антител, продуцируемых клетками гибридомы, определяют иммунопреципитацией или тестом связывания in vitro, таким как радиоиммуноанализ (RIA) или фермент-связанный иммуноабсорбентный тест (ELISA). Такие методы и тесты известны в данной области техники. Связывающая аффинность моноклонального антитела может, например, быть определена анализом Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980). Кроме того, в те-

рапевтических применениях моноклональных антител важно идентифицировать антитела, имеющие высокую степень специфичности и высокой аффинности связывания с антигеном-мишенью.

После того, как желаемые клетки гибридомы идентифицированы, клоны могут быть субклонированы процедурами предельного разведения и выращены стандартными методами (см. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Подходящие для этого культуральные среды включают, например, модифицированную по Далбекко среду Игла и среду RPMI-1640. Также клетки гибридомы могут быть выращены in vivo как асцит у млекопитающего.

Моноклональные антитела, секретированные субклонами, могут быть выделены или очищены от питательной среды или асцитной жидкости стандартными процедурами очистки иммуноглобулина, такими как, например, А-сефарозный белок, хроматография на гидроксиапатите, гель-электрофорез, диализ или афинная хроматография.

Моноклональные антитела могут также быть получены способами рекомбинантных ДНК, такими как описанные в патенте США № 4,816,567. ДНК, кодирующая моноклональные антитела, раскрытые здесь, может быть легко выделена и секвенирована с использованием стандартных процедур (например, при помощи олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генетическим кодом тяжелых и легких цепей мышиных антител). Клетки гибридомы, раскрытые здесь, служат предпочтительным источником такой ДНК. После выделения, ДНК может быть помещена в вектор экспрессии, затем трансфицирована в клетки-хозяева, такие как клетки COS обезьяны, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или миеломные клетки, в иных случаях не продуцирующие белок иммуноглобулин, для обеспечения синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. ДНК также может быть модифицирована, например, заменой человеческими последовательностями, кодирующими константные области тяжелой и легкой цепи, гомологичных мышиных последовательностей (см. патент США № 4,816,567; Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)) или путем ковалентного соединения с последовательностью, кодирующей иммуноглобулин, всей или части последовательности, кодирующей неиммуноглобулиновый полипептид. Таким неиммуноглобулиновым полипептидом можно заменить константные области антитела, раскрытого здесь, или можно заменить вариабельные области одного антиген-комбинирующего участка антитела, раскрытого здесь, для создания химерного двухвалентного антитела.

Моноклональные антитела, раскрытые здесь, включают полностью человеческие антитела или гуманизированные антитела. Эти антитела подходят для введения человеку, не вызывая у человека иммунный ответ против введенного иммуноглобулина.

Гуманизированное или полностью человеческое антитело NaPi2b получают, например, с помощью процедур, описанных в Примерах, приведенных ниже.

В других, альтернативных способах, антитело NaPi2b разрабатывают, например, с помощью способов дисплея бактериофага с использованием антител, содержащих только человеческие последовательности. Такие подходы известны в данной области техники, например, описаны в WO92/01047 и патенте США № 6,521,404, которые включены в настоящее описание посредством ссылок. В этом подходе комбинаторную библиотеку бактериофага, несущую случайные пары легких и тяжелых цепей, скринируют с использованием естественного или рекомбинантного источника NaPi2b. В другом подходе антитело NaPi2b может быть получено способом, в котором по меньшей мере одна стадия процесса включает иммунизацию трансгенного не являющегося человеком животного человеческим белком NaPi2b. В этом подходе некоторые эндогенные локусы тяжелые и/или каппа легкой цепи этого ксеногенного не являющегося человеком животного были отключены и неспособны к перегруппировке, требуемой для генерации генов, кодирующих иммуноглобулины в ответ на антиген. Кроме того, по меньшей мере один человеческий локус тяжелой цепи и по меньшей мере один человеческий локус легкой цепи были стабильно трансфицированы в животное. Таким образом, в ответ на введенный антиген, человеческие локусы подвергаются перегруппировке с образованием генов, кодирующих вариабельные области человека, иммуноспецифичные в отношении антигена. После иммунизации, поэтому, XenoMouse продуцирует В-клетки, секретирующие полностью человеческие иммуноглобулины.

В уровне техники известно множество методов, обеспечивающих получение ксеногенных не являющихся человеком животных. Например, см. патенты США № 6,075,181 и № 6,150,584, которые полностью включены в настоящее описание посредством ссылок. Эта общая стратегия была продемонстрирована в связи с генерацией первых штаммов XenoMouse™, как опубликовано в 1994; см. Green et al., Nature Genetics 7:13-21 (1994), который полностью включен в настоящее описание посредством ссылок, см. также патенты США № 6,162,963, 6,150,584, 6, 114,598, 6,075,181 и 5,939,598 и патенты Японии 3 068 180 B2, 3 068 506 B2 и 3 068 507 B2 и Европейский патент EP 0 4 63 151 B1, и Международные заявки на патент WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310, и члены этих семейств.

В дополнительном подходе другие использовали подход "минилокуса", в котором экзогенный локус Ig имитирован посредством включения частей (индивидуальные гены) из локуса Ig. Таким образом, один или несколько генов VH, один или несколько генов DH, один или несколько генов JH, константная область мю и вторая константная область (предпочтительно константная область гамма) формируют в конструкцию для вставки в организм животного, см., например, патенты США 5,545,806; 5,545,807; 5,591,669; 5,612,205; 5,625,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,643,763; 5,661,016; 5,721,367; 5,770,429; 5,789,215;

5,789,650; 5,814,318; 5,877; 397; 5,874,299; 6,023,010; и 6,255,458; и Европейский патент № 0 54 6 073 B1; и Международные заявки на патенты WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 и WO 98/24884, и члены этих семейтсв.

Генерация человеческих антител от мышей, которым, путем микрослияния клеток, были введены большие части хромосом или все хромосомы, была также продемонстрирована; см. Европейские заявки на патенты № 773288 и 843961.

Ответы человеческих антител против мыши (HAMA) привели промышленность к получению химерных или иначе гуманизированных антител. В то время как химерные антитела имеют человеческую константную область и иммунную варабельную область, ожидается, что будут наблюдаться некоторые ответы человеческих антител против химерных (HACA), особенно при хроническом или мультидозовом использовании антител. Таким образом, было бы желательно получить полностью человеческие антитела к NaPi2b, чтобы обойти или смягчить проблемы и/или эффекты ответов HAMA или HACA.

Продукция антител со сниженной иммуногенностью также достигается через методы гуманизации, химеризации и дисплея с использованием подходящих библиотек. Следует понимать, что мышиные антитела или антитела от других видов могут быть гуманизированы или приматизированы с использованием способов, известных в данной области техники, см., например Winter and Harris Immunol Today 14:43 46 (1993) и Wright et al. Crit, Reviews in Immunol. 12125-168 (1992). Антитело, представляющее интерес, может быть получено методами рекомбинантных ДНК для замены CH1, CH2, CH3, шарнирных областей и/или области рамки считывания соответствующей человеческой последовательностью (см. WO 92102190 и патенты США 5,530,101; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,792; 5,714,350; и 5,777,085). Кроме того, использование кДНК Ig для строительства генов гибридного иммуноглобулина известно в уровне техники (Liu et al., P.N.A.S. 84:3439 (1987) and J. Immunol. 139:3521 (1987)). мРНК выделяют из гибридомы или другой клетки, продуцирующей антитело, и используют для получения кДНК. кДНК, представляющая интерес, может быть амплифицирована полимеразной цепной реакцией с использованием специфических праймеров (патенты США № 4,683,195 и 4,683,202). Также библиотеку получают и скринируют для выделения представляющей интерес последовательности. Последовательность ДНК, кодирующая вариабельную область антитела, затем сливают с человеческими последовательностями константной области.

Последовательности человеческих генов константных областей могут быть найдены в Rabat et al. (1991) Sequences of Proteins of immunological Interest, N.I.H. публикации № 91-3242. Гены C-области человека легко доступны из известных клонов. Выбор изотипа будет диктоваться желаемыми эффекторными функциями, такие как фиксация комплемента или активность в отношении антитело-зависимой клеточной цитотоксичности. Предпочтительными изотипами являются IgG1, IgG3 и IgG4. Любая из человеческих константных областей легкой цепи, каппа или лямбда, может использоваться. Химерное гуманизированное антитело затем экспрессируют стандартными способами.

Далее, человеческие антитела или антитела от других видов могут быть сгенерированы через технологии типа дисплея, включая, без ограничения, дисплей бактериофага, ретровиральный дисплей, рибосомный дисплей, и другие способы, с использованием методов, известных в данной области техники, и полученные молекулы могут быть подвергнуты методам дополнительного созревания, такого как аффинное созреванию, как таковые известным в данной области техники. Wright et al. Crit, Reviews in Immunol. 12125-168 (1992), Hanes and Pluckthun PNAS USA 94:4937-4942 (1997) (ribosomal display), Parmley and Smith Gene 73:305-318 (1988) (phage display), Scott, TIBS, vol. 17:241-245 (1992), Cwirla et al. PNAS USA 87:6378-6382 (1990), Russel et al., Nucl. Acids Research 21:1081-1085 (1993), Hoganboom et al., Immunol. Reviews 130:43-68 (1992), Chiswell and McCafferty TIBTECH; 10:80-8A (1992), и патент США No. 5,733,743. Если технологии дисплея используют для продукции антител, которые не являются человеческими, такие антитела могут быть гуманизированы, как описано выше.

С использованием этих способов могут быть сгенерированы антитела к NaPi2b-экспрессирующим клеткам, растворимым формам NaPi2b, их эпитопам или пептидам, и их библиотеки экспрессии (см., например, патент США № 5,703,057), которые могут после этого быть скринированы, как описано выше, в отношении активностей, описанных здесь.

Антитела NaPi2b, раскрытые здесь, могут экспрессироваться вектором, содержащим сегмент ДНК, кодирующий одноцепочечное антитело, описанное выше.

Они могут включать векторы, липосомы, голую ДНК, ДНК с адъювантом, генную пушку, катетеры и т.д. Векторы включают химические конъюгаты, такие как описанный в WO93/64701, который имеет группу нацеливания (например, лиганда к клеточному поверхностному рецептору) и группу, связывающую нуклеиновую кислоту (например, полилизин), вирусный вектор (например, ДНК-или РНК-содержащий вирусный вектор), белки слияния, такие как описанный в PCT/US 95/02140 (WO95/22618), который является белком слияния, содержащим группу нацеливания (например, антитело, специфичное в отношении клетки-мишени) и группу, связывающую нуклеиновую кислоту (например, протамин), плазмиды, фаг и т.д. Векторы могут быть хромосомными, нехромосомными или синтетическими.

Предпочтительные векторы включают вирусные векторы, белки слияния и химические конъюгаты. Ретровирусные векторы включают вирусы лейкоза мышей Молоуни. ДНК-содержащие вирусные векто-

ры являются предпочтительными. Эти векторы включают поксвирусные векторы, такой как ортопокс- или авипоксвирусные векторы, векторы на основе вируса герпеса, такие как вектор на основе вирусов простого герпеса I (HSV) (см. Geller, A. I. et al., J. Neurochem, 64:487 (1995); Lim, F., et al., in DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A. I. et al., Proc Natl. Acad. Sci.: U.S.A. 90:7603 (1993); Geller, A. I., et al., Proc Natl. Acad. Sci USA 87:1149 (1990), аденовирусные векторы (см. LeGal LaSalle et al., Science, 259:988 (1993); Davidson, et al., Nat. Genet 3:219 (1993); Yang, et al., J. Virol. 69:2004 (1995) и аденоассоциированные вирусные векторы (см. Kaplitt, M. G. et al., Nat. Genet. 8:148 (1994).

Поксвирусные векторы вводят ген в цитоплазму клеток, авипоксвирусные векторы приводят только к краткосрочной экспрессии нуклеиновой кислоты. Аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы и векторы на основе вируса простого герпеса (HSV) являются предпочтительными для введения нуклеиновой кислоты в нервные клетки. Аденовирусный вектор приводит к более краткосрочной экспрессии (приблизительно 2 месяца), чем аденоассоциированный вирус (приблизительно 4 месяца), что, в свою очередь, короче, чем у векторов HSV. Конкретный выбор вектора будет зависеть от клетки-мишени и подвергаемого лечению состояния. Введение может быть осуществлено стандартными методами, например, инфекцией, трансфекцией, трансдукцией или трансформацией. Примеры способов переноса генов включают, например, голую ДНК, осаждение $CaPO_4$, декстран DEAE, электропорацию, слияние протопластов, липофекцию, микроинъекцию в клетку и вирусные векторы.

Вектор может использоваться для нацеливания по существу любой желаемой клетки-мишени. Например, стереотаксическая инъекция может использоваться для нацеливания векторов (например, аденовируса, HSV) на желаемую локацию. Кроме того, частицы могут быть доставлены интрацеребровентрикулярным (icv) вливанием с помощью мининасосной системы вливания, такой как SynchroMed Infusion System. Способ на основе объемного потока, который называют конвекцией, также оказался эффективным при доставке больших молекул в расширенные области мозга и может быть использован в доставке вектора к клетке-мишени (см. Bobo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:2076-2080 (1994); Morrison et al., Am. J. Physiol. 266:292-305 (1994)). Другие способы, которые могут использоваться, включают катетеры, внутривенную, парентеральную, внутрибрюшинную и подкожную инъекцию и пероральный или другие известные пути введения.

Эти векторы могут использоваться для экспрессии больших количеств антител, которые могут использоваться множеством путей. Например, для детекции присутствия NaPi2b в образце. Антитело может также использоваться для попытки связывания с и нарушения сигнального пути NaPi2b.

Конгьюгаты NaPi2b-нацеливаемого антитела.

Раскрытие также относится к иммуноконъюгатам, включающим антитело, конъюгированное с цитотоксическим агентом, таким как токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения или его фрагменты) или радиоактивный изотоп (т.е. радиоконъюгат).

Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые могут использоваться, включают А-цепь дифтерии, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, А-цепь экзотоксина (от Pseudomonas aeruginosa), А-цепь рицина, А-цепь абрина, А-цепь модецина, альфа-сарцин, белки Aleurites fordii, белки диантина, белки Phytolacca americana (PAPI, PAPII и PAPS), ингибитор Momordica charantia, курцин, кротин, ингибитор Saponaria officinalis, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены. Множество радионуклидов доступно для получения радиоконъюгированных антител. Примеры включают ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y и ^{186}Re.

Конъюгаты антитела и цитотоксического агента получают с помощью множества бифункциональных агентов сочетания с белком, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), иминотиолан (IT), бифункциональные производные сложных имиддоэфиров (таких как диметил адипимидат HCL), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидил суберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидо соединения (такие как бис(п-азидобензоил)-гександиамин), производные бисдиазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толилен-2,6-диизоцианат) и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, рициновый антитоксин может быть получен, как описано в Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987). Углерод-14-меченная 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилен триаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является примером хелатирующего агентом для конъюгации радионуклеотида с антителом (см. WO94/11026).

Специалисту понятно, что большое разнообразие возможных групп может быть соединено с полученными антителами, раскрытыми здесь (см., например, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, Нью-Йорк, (1989), все содержание которого включено в настоящее описание ссылкой).

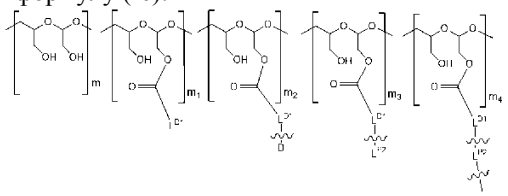
Соединение может быть осуществлено любой химической реакцией, которая связывает две молекулы, в то время как антитело и другая группа сохраняют их соответствующие активности. Это связывание может включать множество химических механизмов, например, ковалентное связывание, афинное связывание, интеркаляцию, координатное связывание и комплексообразование. Предпочтительным связы-

ванием является, однако, ковалентное связывание. Ковалентное связывание может быть осуществлено либо прямой конденсацией существующих боковых цепей, либо инкорпорацией внешних молекул, обеспечивающих мостиковую связь. Множество двух- или поливалентных связывающих агентов могут быть использованы в соединении молекул белка, таких как антитела согласно настоящему раскрытию, с другими молекулами. Например, репрезентативные связывающие агенты могут включать органические соединения, такие как тиоэфиры, цианамиды, сложные эфиры сукцинимида, диизоцианаты, глутаральдегид, диазобензолы и гексаметилендиамины. Этот список не является исчерпывающим перечнем различных классов связывающих агентов, известных в данной области техники, но является примером более обычных связывающих агентов (см. Killen and Lindstrom, Jour. Immun. 133:1335-2549 (1984); Jansen et al., Immunological Reviews 62:185-216 (1982); и Vitetta et al., Science 238:1098 (1987).

Предпочтительные линкеры описаны в литературе (см., например, Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44:201-208 (1984) где описано использование MBS (сложный эфир М-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимида). См. также патент США № 5,030,719, где описано использование галогензамещенного производного ацетил гидразида, соединенного с антителом посредством олигопептидного линкера. Особенно предпочтительные линкеры включают: (i) EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)цианамид гидрохлорид; (ii) SMPT (4-сукцинимидилоксиикарбониллокси-альфа-метил-альфа-(2-пиридил-дитио)-толуол (Pierce Chem. Co., Cat (21558G); (iii) SPDP (сукцинимидил-6[3-(2-пиридилдитио)пропионамидо]гексаноат (Pierce Chem. Co., Cat.# 21651G); (iv) сульфо-LC-SPDP (сульфосукцинимидил-6[3-(2-пиридилдитио)-пропионамид]гексаноат (Pierce Chem. Co. Cat.# 2165-G); и (v) сульфо-NHS (N-гидроксисульфо-сукцинимид: Pierce Chem. Co., Cat.# 24510), конъюгированный с EDC.

Линкеры, описанные выше, содержат компоненты, имеющие различные признаки, таким образом приводя к конъюгатам с различающимися физико-химическими свойствами. Например, сложные эфиры сульфо-NHS алкил карбоксилатов более стабильны, чем сложные эфиры сульфо-NHS ароматических карбоксилатов. Содержащие сложные эфиры NHS линкеры менее растворимы, чем сложные эфиры сульфо-NHS. Далее, линкер SMPT содержит пространственно затрудненную дисульфидную связь и может образовывать конъюгаты с увеличенной стабильностью. Дисульфидные связи, в целом, менее стабильны, чем другие связи, потому что дисульфидная связь расщепляется in vitro, приводя к менее доступному конъюгату. Сульфо-NHS, в частности, может улучшить стабильность карбодиимидных связей. Карбодиимидные связи (такие как EDC), при использовании в сочетании с сульфо-NHS, образуют сложные эфиры, которые более устойчивы к гидролизу, чем одна только реакция карбодиимидного сочетания.

В одном аспекте конъюгат, описанный здесь, включает выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело, специфически связывающееся с внеклеточной областью SLC34A2, связанного прямо или опосредованно с одним или более D-несущими полимерными остовами, независимо включающими поли-(1-гидроксиметилэтилен гидроксиметил-формаль) (PHF), имеющий молекулярную массу в пределах от приблизительно 2 кДа до приблизительно 40 кДа, причем каждый один или более D-несущих полимерных остовов независимо имеют формулу (Ic):



(Ic),

в которой каждый D, независимо, является терапевтическим или диагностическим средством;

L^{D1} является карбонилсодержащей группой;

каждый $—C(=O)-L^{D1}—\S$ в $—C(=O)-L^{D1}—\S-D$ независимо представляет собой первый линкер, содержащий биоразлагаемую связь так, что, когда связь разорвана, D высвобождается в активной форме для его намеченного терапевтического эффекта; и

$\S$ в $—C(=O)-L^{D1}—\S-D$ между L^{D1} и D обозначает прямое или опосредованное присоединение D к L^{D1};

каждый $—C(=O)-L^{D1}—\S-L^{P2}$ независимо представляет собой второй линкер, еще не связанный с выделенным антителом NaPi2b, в который L^{P2} является группой, содержащей функциональную группу, которая должна образовывать ковалентную связь с функциональной группой выделенного антитела, и $\S$ между L^{D1} и L^{P2} обозначает прямое или опосредованное присоединение L^{P2} к L^{D1}, и каждый второй линкер является отличными от каждого первого линкера;

каждый $—C(=O)-L^{D1}—\S-L^{P2}-\S—$ независимо представляет собой третий линкер, соединяющий каждый D-несущий полимерный остов с выделенным антителом, в котором концевой $\S$, присоединенный к L^{P2}, обозначает прямое или опосредованное присоединение L^{P2} к выделенному антителу после формирования ковалентной связи между функциональной группой L^{P2} и функциональной группой выделенного антитела; и каждый третий линкер является отличным от каждого первого линкера;

m является целым числом от 1 до приблизительно 300, m_1 является целым числом от 1 до приблизи-

тельно 140, m_2 является целым числом от 1 до приблизительно 40, m_3 является целым числом от 0 до приблизительно 18, m_4 является целым числом от 1 до приблизительно 10; количество m, m_1, m_2, m_3 и m_4 составляет от приблизительно 15 до приблизительно 300; и общее количество L^{P2}, присоединенных к выделенному антителу, составляет 10 или менее.

Конъюгат может включать один или больше следующих признаков.

Например, в формуле (Ic) m_1 является целым числом от 1 до приблизительно 120 (например, приблизительно 1-90), и/или m_3 является целым числом от 1 до приблизительно 10 (например, приблизительно 1-8).

Например, когда PHF в формуле (Ic) имеет молекулярную массу в пределах от приблизительно 6 кДа до приблизительно 20 кДа (т.е. число m, m_1, m_2, m_3, и m_4 находится в пределах от приблизительно 45 до приблизительно 150), m_2 является целым числом от 2 до приблизительно 20, m_3 является целым числом от 0 до приблизительно 9, m_4 является целым числом от 1 до приблизительно 10, и/или m_1 является целым числом от 1 до приблизительно 75 (например, m_1 составляет приблизительно 4-45).

Например, когда PHF в формуле (Ic) имеет молекулярную массу в пределах от приблизительно 8 кДа до приблизительно 15 кДа (т.е. число m, m_1, m_2, m_3, и m_4 находится в пределах от приблизительно 60 до приблизительно 110), m_2 является целым числом от 2 до приблизительно 15, m_3 является целым числом от 0 до приблизительно 7, m_4 является целым числом от 1 до приблизительно 10, и/или m_1 является целым числом от 1 до приблизительно 55 (например, m_1 составляет приблизительно 4-30).

Например, когда PHF в формуле (Ic) имеет молекулярную массу в пределах от приблизительно 2 кДа до приблизительно 20 кДа (т.е. число m, m_1, m_2, m_3, и m_4 находится в пределах от приблизительно 15 до приблизительно 150), m_2 является целым числом от 1 до приблизительно 20, m_3 является целым числом от 0 до приблизительно 10 (например, m_3 находится в пределах от 0 до приблизительно 9), m_4 является целым числом от 1 до приблизительно 8, и/или m_1 является целым числом от 1 до приблизительно 70, и общее число L^{P2}, связанных с выделенным антителом, составляет от приблизительно 2 до приблизительно 8 (например, приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

Например, когда PHF в формуле (Ic) имеет молекулярную массу в пределах от приблизительно 3 кДа до приблизительно 15 кДа (т.е. число m, m_1, m_2, $т_3$, и m4 находится в пределах от приблизительно 20 до приблизительно 110), m_2 является целым числом от 2 до приблизительно 15, m_3 является целым числом от 0 до приблизительно 8 (например, m_3 находится в пределах от 0 до приблизительно 7), m_4 является целым числом от 1 до приблизительно 8, и/или m_1 является целым числом от 2 до приблизительно 50, и общее число L^{P2}, связанных с выделенным антителом, составляет от приблизительно 2 до приблизительно 8 (например, приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

Например, когда PHF в формуле (Ic) имеет молекулярную массу в пределах от приблизительно 5 кДа до приблизительно 10 кДа, (т.е. число m, m_1, m_2, m_3 и m_4 составляет от приблизительно 40 до приблизительно 75), m_2 является целым числом от приблизительно 2 до приблизительно 10 (например, m_2 составляет приблизительно 3-10), m_3 является целым числом от 0 до приблизительно 5 (например, m_3 находится в пределах от 0 до приблизительно 4), m_4 является целым числом от 1 до приблизительно 8 (например, m_4 находится в пределах от 1 до приблизительно 5), и/или m_1 является целым числом от приблизительно 2 до приблизительно 35 (например, m_1 составляет приблизительно 5-35), и общее число L^{P2}, связанных с выделенным антителом, составляет от приблизительно 2 до приблизительно 8 (например, приблизительно 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

Например, когда PHF имеет молекулярную массу в пределах от 2 кДа до 40 кДа, (например, приблизительно 6-20 кДа или приблизительно 8-15 кДа, приблизительно 2-20 кДа или приблизительно 3-15 кДа, или приблизительно 5-10 кДа), число лекарственных средств на PHF (например, m_2) является целым числом от 1 до приблизительно 40 (например, приблизительно 1-20 или приблизительно 2-15, или приблизительно 3-10, или приблизительно 2-10). Эти остовы могут использоваться, например, для конъюгации выделенного антитела, имеющего молекулярную массу 40 кДа или более (например, 60 кДа или более; 80 кДа или более; 100 кДа или более; 120 кДа или более; 140 кДа или более; 160 кДа или более, 180 кДа или более, или 200 кДа или более, или приблизительно 40-200 кДа, 40-180 кДа, 40-140 кДа, 60-200 кДа, 60-180 кДа, 60-140 кДа, 80-200 кДа, 80-180 кДа, 80-140 кДа, 100-200 кДа, 100-180 кДа, 100-140 кДа или 140-150 кДа). В этом варианте осуществления отношение выделенного антитела к PHF составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:10, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:9, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:8, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:7, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:6, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:5, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:4, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:3, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:2, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:4, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:3, от приблизительно 1:3 до приблизительно 1:4, или от приблизительно 1:3 до приблизительно 1:5.

Например, когда PHF имеет молекулярную массу в пределах от 2 кДа до 40 кДа, (например, приблизительно 6-20 кДа или приблизительно 8-15 кДа, приблизительно 2-20 кДа или приблизительно 3-15 кДа, или приблизительно 5-10 кДа), число лекарственных средств на PHF (например, m_2) является целым числом от 1 до приблизительно 40 (например, приблизительно 1-20 или приблизительно 2-15, или приблизительно 3-10, или приблизительно 2-10). Эти остовы могут использоваться, например, для конъюга-

ции выделенного антитела, имеющего молекулярную массу от 140 кДа до 180 кДа или от 140 кДа до 150 кДа. В этом варианте осуществления отношение выделенного антитела к PHF составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:10, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:9, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:8, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:7, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:6, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:5, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:4, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:3, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:2, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:4, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:3, от приблизительно 1:3 до приблизительно 1:4, или от приблизительно 1:3 до приблизительно 1:5.

Антитело NaPi-2b в этом диапазоне молекулярной массы включают, но не ограничены ими, например, полные антитела, такие как IgG, IgM.

Например, когда PHF имеет молекулярную массу в пределах от 2 кДа до 40 кДа, число лекарственных средств на PHF (например, m_2) является целым числом от 1 до приблизительно 40 (например, приблизительно 1-20 или приблизительно 2-15, или приблизительно 3-10, или приблизительно 2-10). Эти остовы могут использоваться, например, для конъюгации выделенного антитела, имеющего молекулярную массу от 60 кДа до 120 кДа. В этом варианте осуществления отношение выделенного антитела к PHF составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:10, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:9, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:8, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:7, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:6, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:5, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:4, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:3, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:2, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:4, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:3, от приблизительно 1:3 до приблизительно 1:4, или от приблизительно 1:3 до приблизительно 1:5.

В некоторых вариантах осуществления D является терапевтическим средством. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство является малой молекулой, имеющей молекулярную массу ≤приблизительно 5 кДа, ≤приблизительно 4 кДа, ≤приблизительно 3 кДа, ≤приблизительно 1,5 кДа или ≤ приблизительно 1 кДа.

В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство имеет IC_{50} приблизительно менее 1 нМ.

В другом варианте осуществления терапевтическое средство имеет IC_{50} приблизительно более 1 нМ, например, терапевтическое средство имеет IC_{50} приблизительно от 1 до 50 нМ.

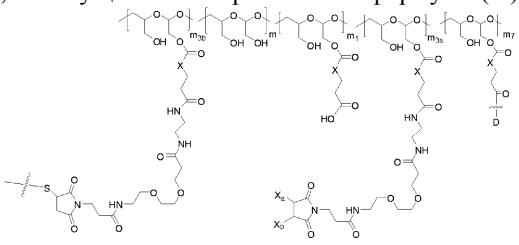
Некоторые терапевтические средства, имеющие IC_{50} более чем приблизительно 1 нМ (например, "менее сильнодействующие лекарственные средства"), являются неподходящими для конъюгации с антителом с использованием известных в данной области техники методов конъюгации. Без связи с теорией, такие терапевтические средства имеют потенциал, который недостаточен для использования в конъюгатах нацеливаемое антитело-лекарственное средство с помощью стандартных методов, поскольку достаточное число копий лекарственного средства (т.е. более 8) не может конъюгироваться с помощью известных в данной области техники методов без ухудшения фармакокинетических и физико-химических свойств конъюгата. Однако достаточно высокая нагрузка этих менее сильнодействующих лекарственных средств может быть достигнута с помощью стратегий конъюгации, описанных здесь, таким образом, приводя к высокой нагрузке терапевтического средства при сохранении желаемых фармакокинетических и физико-химических свойств. Таким образом, раскрытие также относится к конъюгату антитело-полимер-лекарственное средство, который включает выделенное антитело, PHF и по меньшей мере восемь групп терапевтического агента, где D представляет собой ауристатин, доластатин (например, доластатин 10 или доластатин 15), монометилауристатин E (MMAE), монометилауристатин F (MMAF), ауристатин F, AF HPA, монометил AF HPA, фенилендиамин (AFP).

Например, дуокармицин или его аналоги представляют собой дуокармицин A, дуокармицин B1, дуокармицин B2, дуокармицин C1, дуокармицин C2, дуокармицин D, дуокармицин SA, CC-1065, адозелезин, бизелезин или карзелезин.

Другие примеры D включают описанные, например, в патенте США № 8,815,226; и публикации заявки на патент США № 2015-0104407; содержание каждого из которых полностью включено в настоящее описание.

В некоторых вариантах осуществления число D-несущих полимерных остовов, которые могут быть конъюгированы с антителом, ограничено числом свободных остатков цистеина. В некоторых вариантах осуществления свободные остатки цистеина вводят в аминокислотную последовательность антитела способами, описанными здесь. Примеры конъюгатов, раскрытых здесь, могут включать антитела, имеющие 1, 2, 3 или 4 аминокислоты цистеина (Lyon, R. et al. (2012) Methods in Enzym. 502:123-138). В некоторых вариантах осуществления, один или более свободных остатков цистеина уже присутствуют в антителе, без использования инжиниринга, когда существующие свободные остатки цистеина могут использоваться для конъюгации антитела с D-несущим полимерным остовом. В некоторых вариантах осуществления антитело подвергают восстанавливающим условиям до конъюгации антитела для генерации одного или более свободных остатков цистеина.

В некоторых вариантах осуществления функциональную группу L^{P2}, которая должна образовать ковалентную связь с функциональной группой выделенного антитела (такой как функциональная группа или реакционоспособная группа на аминокислотном остатке антитела, например, функциональная группа на остатке цистеина или остатке лизина антитела), выбирают из -SR^p, -S-S-LG, и галогена, причем LG является уходящей группой, R^p обозначает H или защитную группу для серы, и один из X_a и X_b обозначает H, и другой обозначает водорастворимую защитную группу для малеимидогруппы, или X_a и X_b, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют двойную связь углерод-углерод. Например, функциональная группа L^{P2}, которая должна образовать ковалентную связь, является функциональной группой, не реагирующей с функциональной группой выделенного антитела, например, как функциональная группа L^{P2}, в которой один из X_a и X_b обозначает H, а другой обозначает водорастворимую защитную группу для малеимидогруппы, или X_a и X_b. В некоторых вариантах осуществления, в конъюгате, описанном здесь, D-несущий полимерный остов формулы (Ic) имеет формулу (Ie):



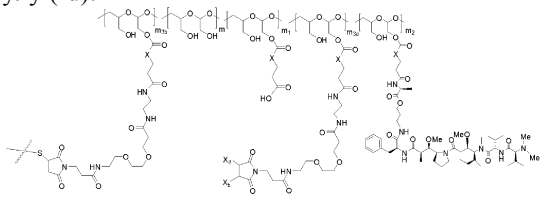
(Ie)

в которой, PHF имеет молекулярную массу в пределах от приблизительно 2 кДа до приблизительно 40 кДа;

каждый D независимо является терапевтическим средством, имеющим молекулярную массу ≤5 кДа, и между D и карбонильной группой обозначает прямое или опосредованное присоединение D к карбонильной группе, X обозначает CH_2, O или NH;

один из X_a и X_b обозначает H, и другой обозначает водорастворимую защитную группу для малеимидогруппы, или X_a и X_b, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют двойную связь углерод-углерод, m_1 является целым числом от 1 до приблизительно 140, m_7 является целым числом от 1 до приблизительно 40, и число m_1 и m_7 составляет от приблизительно 2 до приблизительно 180, m является целым числом от 1 до приблизительно 300, m_{3a} является целым числом от 0 до приблизительно 17, m_{3b} является целым числом от 1 до приблизительно 8, и число m_{3a} и m_{3b} составляет от 1 до 18, и число m, m_1, m_7, m_{3a} и m_{3b} составляет от приблизительно 15 до приблизительно 300.

В некоторых вариантах осуществления, в конъюгате, описанном здесь, D-несущий полимерный остов формулы (Ie) имеет формулу (Id):



(Id),

в которой один из X_a и X_b обозначает H, и другой обозначает водорастворимую защитную группу для малеимидогруппы, или X_a и X_b, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют двойную связь углерод-углерод;

m_{3a} является целым числом от 0 до приблизительно 17, m_{3b} является целым числом от 1 до приблизительно 8, и число m_{3a} и m_{3b} составляет от 1 до 18, и число m, m_1, m_2, m_{3a} и m_{3b} составляет от приблизительно 15 до приблизительно 300.

Например, отношение между m_2 и m_{3b} составляет более чем 1:1 и менее чем или равно 10:1.

Например, отношение между m_2 и m_{3b} составляет приблизительно 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1 или 2:1.

Например, отношение между m_2 и m_{3b} составляет от 2:1 до 8:1.

Например, отношение между m_2 и m_{3b} составляет приблизительно 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1 или 2:1.

Например, отношение между m_2 и m_{3b} составляет от 2:1 до 4:1.

Например, отношение между m_2 и m_{3b} составляет приблизительно 4:1, 3:1 или 2:1.

Например, отношение между m_2 и m_{3b} составляет приблизительно 3:1 и 5:1.

Например, отношение между m_2 и m_{3b} составляет приблизительно 3:1, 4:1 или 5:1.

Например, когда PHF в формуле (Id) имеет молекулярную массу в пределах от приблизительно 2 кДа до приблизительно 20 кДа, число m, m_1, m_2, m_{3a} и m_{3b} составляет от приблизительно 15 до приблизительно 150, m_1 является целым числом от 1 до приблизительно 70, m_2 является целым числом от 1 до

приблизительно 20, m_{3a} является целым числом от 0 до приблизительно 9, m_{3b} является целым числом от 1 до приблизительно 8, и отношение между PHF и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом является целым числом от 2 до приблизительно 8.

Например, когда PHF в формуле (Id) имеет молекулярную массу в пределах от приблизительно 3 кДа до приблизительно 15 кДа, число m, m_1, m_2, m_{3a} и m_{3b} составляет от приблизительно 20 до приблизительно 110, m_1 является целым числом от 2 до приблизительно 50, m_2 является целым числом от 2 до приблизительно 15, m_{3a} является целым числом от 0 до приблизительно 7, m_{3b} является целым числом от 1 до приблизительно 8, и отношение между PHF и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом является целым числом от 2 до приблизительно 8 (например, целым числом от 2 до приблизительно 6 или целым числом от 2 до приблизительно 4).

Например, когда PHF в формуле (Id) имеет молекулярную массу в пределах от приблизительно 5 кДа до приблизительно 10 кДа, число m, m_1, m_2, m_{3a} и m_{3b} составляет от приблизительно 40 до приблизительно 75, m_1 является целым числом от приблизительно 2 до приблизительно 35, m_2 является целым числом от приблизительно 2 до приблизительно 10, m_{3a} является целым числом от 0 до приблизительно 4, m_{3b} является целым числом от 1 до приблизительно 5, и отношение между PHF и выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом является целым числом от 2 до приблизительно 8 (например, целым числом от 2 до приблизительно 6 или целым числом от 2 до приблизительно 4).

Например, водорастворимые защитные группы для малеимидо являются группами, которые могут быть ковалентно присоединены к одному из двух атомов углерода олефина после реакции малеимидо группы с тиолсодержащим соединением формулы (II):

$$R_{90}\text{-}(CH_2)_d\text{-}SH \text{ (II)},$$

в которой R_{90} обозначает NHR_{91}, OH, $COOR_{93}$, $CH(NHR_{91})COOR_{93}$ или замещенную фенильную группу;

R_{93} обозначает водород или $C_{1\text{-}4}$ алкил;

R_{91} обозначает водород, CH_3 или CH_3CO и

d является целым числом от 1 до 3.

Например, водорастворимая защитная группа для малеимидо соединения формулы (II) может быть цистеином, N-ацетил цистеином, сложным метиловым эфиром цистеина, N-метилцистеином, 2-меркаптоэтанолом, 3-меркаптопропановой кислотой, 2-меркаптоуксусной кислотой, меркаптометанолом (т.е. $HOCH_2SH$), бензил тиолом, в котором фенил замещен одним или более гидрофильными заместителями, или 3-аминопропан-1-тиолом. Один или более гидрофильных заместителей на фениле включают OH, SH, метокси, этокси, COOH, CHO, $COC_{1\text{-}4}$ алкил, NH_2, F, циано, SO_3H, PO_3H и т.п.

Например, водорастворимая защитная группа для малеимидо представляет собой $\text{-S-}(CH_2)_d\text{-}R_{90}$, в которой R_{90} обозначает OH, COOH или $CH(NHR_{91})COOR_{93}$;

R_{93} обозначает водород или CH_3;

R_{91} обозначает водород или CH_3CO и

d равен 1 или 2.

Например, водорастворимая защитная группа для малеимидогруппы представляет собой $\text{-S-}CH_2\text{-}CH(NH_2)COOH$.

Например, когда PHF имеет молекулярную массу в пределах от 2 кДа до 40 кДа, (например, приблизительно 2-20 кДа, или приблизительно 3-15 кДа, или приблизительно 5-10 кДа), число лекарственных средств на PHF (например, m_2) является целым числом от 1 до приблизительно 40 (например, приблизительно 1-20 или приблизительно 2-15, или приблизительно 3-10, или приблизительно 2-10). Эти остовы могут использоваться, например, для конъюгации выделенного антитела, имеющего молекулярную массу 40 кДа или более (например, 60 кДа или более; 80 кДа или более; или 100 кДа или более; 120 кДа или более; 140 кДа или более; 160 кДа или более, 180 кДа или более, или 200 кДа или более, или приблизительно 40-200 кДа, 40-180 кДа, 40-140 кДа, 60-200 кДа, 60-180 кДа, 60-140 кДа, 80-200 кДа, 80-180 кДа, 80-140 кДа, 100-200 кДа, 100-180 кДа, 100-140 кДа или 140-150 кДа). В этом варианте осуществления отношение выделенного антитела к PHF составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:10, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:9, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:8, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:7, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:6, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:5, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:4, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:3, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:2, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:8, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:6, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:5, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:4, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:3, от приблизительно 1:3 до приблизительно 1:4 или от приблизительно 1:3 до приблизительно 1:5.

Например, когда PHF имеет молекулярную массу в пределах от 2 кДа до 40 кДа, (например, приблизительно 2-20 кДа, или приблизительно 3-15 кДа, или приблизительно 5-10 кДа), число лекарственных средств на PHF (например, m_2) является целым числом от 1 до приблизительно 40 (например, приблизительно 1-20 или приблизительно 2-15, или приблизительно 3-10, или приблизительно 2-10). Эти остовы могут использоваться, например, для конъюгации выделенного антитела, имеющего молекулярную массу от 140 кДа до 180 кДа или от 140 кДа до 150 кДа. В этом варианте осуществления отношение

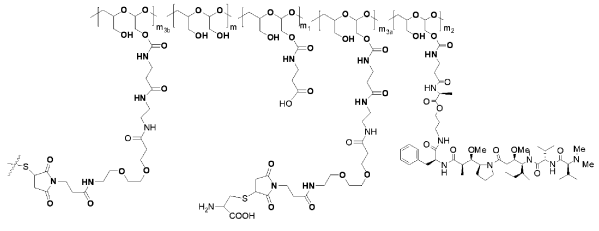
выделенного антитела к PHF составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:10, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:9, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:8, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:7, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:6, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:5, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:4, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:3, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:2, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:8, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:6, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:5, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:4, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:3, от приблизительно 1:3 до приблизительно 1:4 или от приблизительно 1:3 до приблизительно 1:5.

Выделенные антитела в этом диапазоне молекулярной массы включают, но не ограничены ими, например, полные антитела, такие как IgG, IgM.

Например, когда PHF имеет молекулярную массу в пределах от 2 кДа до 40 кДа (например, приблизительно 2-20 кДа или приблизительно 3-15 кДа, или приблизительно 5-10 кДа), число лекарственных средств на PHF (например, m_2) является целым числом от 1 до приблизительно 40, (например, приблизительно 1-20 или приблизительно 2-15, или приблизительно 3-10 или 2-10). Эти остовы могут использоваться, например, для конъюгации выделенного антитела, имеющего молекулярную массу от 60 кДа до 120 кДа. В этом варианте осуществления отношение выделенного антитела к PHF составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:10, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:9, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:8, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:7, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:6, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:5, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:4, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:3, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:2, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:8, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:6, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:5, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:4, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:3, от приблизительно 1:3 до приблизительно 1:4 или от приблизительно 1:3 до приблизительно 1:5.

Например, когда PHF имеет молекулярную массу в пределах от 2 кДа до 40 кДа, (например, приблизительно 2-20 кДа, или приблизительно 3-15 кДа, или приблизительно 5-10 кДа), число лекарственных средств на PHF (например, m_2) является целым числом от 1 до приблизительно 40 (например, приблизительно 1-20 или приблизительно 2-15, или приблизительно 3-10 или 2-10). Эти остовы могут использоваться, например, для конъюгации выделенного антитела, имеющего молекулярную массу от 40 кДа до 80 кДа. В этом варианте осуществления отношение выделенного антитела к PHF составляет от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:10, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:9, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:8, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:7, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:6, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:5, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:4, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:3, от приблизительно 1:1 до приблизительно 1:2, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:8, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:6, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:5, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:4, от приблизительно 1:2 до приблизительно 1:3, от приблизительно 1:3 до приблизительно 1:4 или от приблизительно 1:3 до приблизительно 1:5.

В некоторых вариантах осуществления, в конъюгате, описанном здесь, D-несущий полимерный остов формулы (Ie) имеет формулу (If), причем полимер представляет собой PHF, имеющий молекулярную массу в пределах от приблизительно 2 кДа до приблизительно 40 кДа:



(If)

в которой m является целым числом от 1 до приблизительно 300,

m_1 является целым числом от 1 до приблизительно 140,

m_2 является целым числом от 1 до приблизительно 40,

m_{3a} является целым числом от 0 до приблизительно 17,

m_{3b} является целым числом от 1 до приблизительно 8;

число m_{3a} и m_{3b} варьирует от 1 до приблизительно 18;

число m, m_1, m_2, m_{3a} и m_{3b} составляет от приблизительно 15 до приблизительно 300;

концевой $-S-$ обозначает присоединение одного или более полимерных остовов к выделенному антителу, специфически связывающемуся с внеклеточной областью SLC34A2, включающему (i) вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 1 (CDRH1), включающий аминокислотную последовательность GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 5); вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 2 (CDRH2), включающий аминокислотную последо-

вательность AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 6); вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 3 (CDRH3), включающий аминокислотную последовательность GETARATFAY (SEQ ID NO: 7); вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 1 (CDRL1), включающий аминокислотную последовательность SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 8); вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 2 (CDRL2), включающий аминокислотную последовательность YTSSLYS (SEQ ID NO: 9); и вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 3 (CDRL3), включающий аминокислотную последовательность QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 10) или (ii) CDRH1, включающий аминокислотную последовательность GFSFSDFAMS (SEQ ID NO: 18); CDRH2, включающий аминокислотную последовательность ATIGRVAFHTYYPDSMKГ (SEQ ID NO: 19); CDRH3, включающий аминокислотную последовательность ARHRGFDVGHFDF (SEQ ID NO: 20); CDRL1, включающий аминокислотную последовательность RSSETLVHSSGNTYLE (SEQ ID NO: 21); CDRL2, включающий аминокислотную последовательность RVSNRFS (SEQ ID NO: 22); и CDRL3, включающий аминокислотную последовательность FQGSFNPLT (SEQ ID NO: 23); и отношение между PHF и антителом составляет 10 или менее.

В некоторых вариантах осуществления выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело специфически связывается с SLC34A2 и включает (i) CDRH1, включающий аминокислотную последовательность GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 5); CDRH2, включающий аминокислотную последовательность AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 6); CDRH3, включающий аминокислотную последовательность GETARATFAY (SEQ ID NO: 7); CDRL1, включающий аминокислотную последовательность SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 8); CDRL2, включающий аминокислотную последовательность YTSSLYS (SEQ ID NO: 9); и CDRL3, включающий аминокислотную последовательность QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 10).

В некоторых вариантах осуществления выделенное NaPi2b-нацеливаемое антитело специфически связывается с SLC34A2 и включает CDRH1, включающий аминокислотную последовательность GFSFSDFAMS (SEQ ID NO: 18); CDRH2, включающий аминокислотную последовательность ATIGRVAFHTYYPDSMKГ (SEQ ID NO: 19); CDRH3, включающий аминокислотную последовательность ARHRGFDVGHFDF (SEQ ID NO: 20); CDRL1, включающий аминокислотную последовательность RSSETLVHSSGNTYLE (SEQ ID NO: 21); CDRL2, включающий аминокислотную последовательность RVSNRFS (SEQ ID NO: 22); и CDRL3, включающий аминокислотную последовательность FQGSFNPLT (SEQ ID NO: 23).

Остовы формулы (If) могут включать один или больше следующих признаков.

Когда PHF в формуле (If) имеет молекулярную массу в пределах от приблизительно 2 кДа до приблизительно 20 кДа, число m, m_1, m_2, m_{3a} и m_{3b} составляет от приблизительно 15 до приблизительно 150, m_1 является целым числом от 1 до приблизительно 70, m_2 является целым числом от 1 до приблизительно 20, m_{3a} является целым числом от 0 до приблизительно 9, m_{3b} является целым числом от 1 до приблизительно 8, сумма m_{3a} и m_{3b} составляет от 1 до приблизительно 10, и отношение между PHF и антителом является целым числом от 2 до приблизительно 8.

Когда PHF в формуле (If) имеет молекулярную массу в пределах от приблизительно 3 кДа до приблизительно 15 кДа, число m, m_1, m_2, m_{3a} и m_{3b} составляет от приблизительно 20 до приблизительно 110, m_1 является целым числом от 2 до приблизительно 50, m_2 является целым числом от 2 до приблизительно 15, m_{3a} является целым числом от 0 до приблизительно 7, m_{3b} является целым числом от 1 до приблизительно 8, сумма m_{3a} и m_{3b} составляет от 1 до приблизительно 8; и отношение между PHF и антителом является целым числом от 2 до приблизительно 8 (например, от приблизительно 2 до приблизительно 6 или от приблизительно 2 до приблизительно 4).

Когда PHF в формуле (If) имеет молекулярную массу в пределах от приблизительно 5 кДа до приблизительно 10 кДа, число m, m_1, m_2, m_{3a} и m_{3b} составляет от приблизительно 40 до приблизительно 75, m_1 является целым числом от приблизительно 2 до приблизительно 35, m_2 является целым числом от приблизительно 2 до приблизительно 10, m_{3a} является целым числом от 0 до приблизительно 4, m_{3b} является целым числом от 1 до приблизительно 5, сумма m_{3a} и m_{3b} составляет от 1 до приблизительно 5; и отношение между PHF и антителом является целым числом от 2 до приблизительно 8 (например, от приблизительно 2 до приблизительно 6 или от приблизительно 2 до приблизительно 4).

В некоторых вариантах осуществления отношение между ауристатин F гидроксипропил амидом ("AF HPA") и антителом может составлять приблизительно 30:1, 29:1, 28:1, 27:1, 26:1, 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 или 6:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение между AF HPA и антителом может составлять приблизительно 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 или 6:1.

В других вариантах осуществления отношение между AF HPA и антителом может составлять приблизительно 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 или 6:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение между AF HPA и антителом может составлять приблизительно 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1 или 10:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение между AF и антителом может составлять при-

близительно 15:1, 14:1, 13:1, 12:1 или 11:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение между AF HPA и антителом может составлять приблизительно 15:1, 14:1, 13:1 или 12:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение между PHF и антителом может составлять приблизительно 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 или 1:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение между PHF и антителом может составлять приблизительно 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1 или 2:1.

В других вариантах осуществления отношение между PHF и антителом может составлять приблизительно 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 или 1:1.

В других вариантах осуществления отношение между PHF и антителом может составлять приблизительно 6:1, 5:1, 4:1, 3:1 или 2:1.

В других вариантах осуществления отношение между PHF и антителом может составлять приблизительно 6:1, 5:1, 4:1 или 3:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение между PHF и антителом может составлять приблизительно 5:1, 4:1 или 3:1.

В некоторых вариантах осуществления отношение между PHF и антителом может составлять приблизительно 4:1, 3:1 или 2:1.

Другими вариантами конъюгатов антитело-полимер-лекарственное средство являются описанные, например, в патенте США № 8,815,226; и публикации заявки на патент США № 2015-0104407; содержание каждого из которых полностью включено в настоящее описание.

Это раскрытие также относится к производному лекарственного средства, модифицированному так, что оно может непосредственно конъюгироваться с антителом в отсутствие полимерного носителя, и к соответствующим конъюгатам антитело-лекарственное средств.

В некоторых вариантах осуществления конъюгаты NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство включают антитело, конъюгированное, т.е. ковалентно присоединенное к группе лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления антитело ковалентно присоединено к группе лекарственного средства через линкер, например, неполимерный линкер.

"D" (например, группа лекарственного средства) конъюгатов NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство (ADC) может включать любое соединение, звено или группу, имеющую цитотоксический или цитостатический эффект, как определено здесь. В некоторых вариантах осуществления конъюгат NaPi2b-нацеленное антитело-лекарственное средство (ADC) включает NaPi2b-нацеливаемое антитело (Ab), нацеливаемое на опухолевую клетку, D (например, группу лекарственного средства) и линкерную группу (L), которая присоединяет Ab к D. В некоторых вариантах осуществления антитело присоединено к линкерной группе (L) через один или несколько аминокислотных остатков, таких как лизин и/или цистеин.

В некоторых вариантах осуществления ADC имеет формулу (Ig):

$$Ab-(L-D)_p \quad (Ig),$$

где p=от 1 до приблизительно 20.

В некоторых вариантах осуществления число групп лекарственного средства, которые могут конъюгироваться с антителом, ограничено числом свободных остатков цистеина. В некоторых вариантах осуществления свободные остатки цистеина вводят в аминокислотную последовательность антитела способами, описанными здесь. Примеры ADC формулы Ig включают, но не ограничены ими, антитела, имеющие 1, 2, 3 или 4 аминокислоты цистеина (Lyon, R. et al. (2012) Methods in Enzym. 502:123-138). В некоторых вариантах осуществления, один или более свободных остатков цистеина уже присутствуют в антителе, без использования инжиниринга, когда существующие свободные остатки цистеина могут использоваться для конъюгации антитела к лекарственному средству. В некоторых вариантах осуществления антитело подвергают восстанавливающим условиям до конъюгации антитела для генерации одного или более свободных остатков цистеина.

В некоторых вариантах осуществления "Линкер" (L) является бифункциональной или многофункциональной группой, которая может использоваться для соединения одного или более D (например, группы лекарственного средства) с антителом (Ab) для формирования конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) формулы Ig. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) могут быть получены с использованием линкера, имеющего реакционоспособные функциональные группы для ковалентного присоединения к лекарственному средству и антителу. Например, в некоторых вариантах осуществления, цистеин тиол антитела (Ab) может образовывать связь с реакционоспособной функциональной группой линкера или промежуточного соединения лекарственное средство-линкер для создания ADC.

В одном аспекте линкер имеет функциональную группу, которая способна к реакции со свободным цистеином, присутствующим на антителе, для создания ковалентной связи. Неограничивающие примеры таких реакционоспособных функциональных групп включает малеимид, галогенацетамиды, α-галогенацетил, активированные сложные эфиры, такие как сложные эфиры сукцинимида, сложные эфиры 4-нитрофенила, сложные эфиры пентафторфенила, сложные эфиры тетрафторфенила, ангидриды,

хлорангидриды кислоты, сульфонил хлориды, изоцианаты и изотиоцианаты. См., например, способ конъюгации на странице 766 Klussman, et al. (2004), Bioconjugate Chemistry 15 (4):765-773, и приведенные там Примеры.

В некоторых вариантах осуществления линкер имеет функциональную группу, которая способна к реакции с электрофильной группой, присутствующей на антителе. Примеры таких электрофильных групп включают, но не ограничены ими, альдегидные и кетонные карбонильные группы. В некоторых вариантах осуществления гетероатом реакционоспособной функциональной группы линкера может реагировать с электрофильной группой на антителе и создавать ковалентную связь с единицей антитела. Неограничивающие примеры таких реакционоспособных функциональных групп включают, но не ограничены ими, гидразид, оксим, амино, гидразин, тиосемикарбазон, гидразин карбоксилат и арилгидразид.

Линкер может включать один или более компонентов линкера. Примеры компоненты линкера включают 6-малеимидокапроил ("MC"), малеимидопропаноил ("MP"), валин-цитруллин ("val-cit" или "vc"), аланин-фенилаланин ("ala-phe"), п-аминобензилоксикарбониллокси ("PAB"), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноат ("SPP") и 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат ("MCC"). Различные компоненты линкера известны в уровне техники, некоторые из них описаны ниже.

Линкер может быть "расщепляемым линкером", облегчающим высвобождение лекарственного средства. Среди неограничивающих примеров расщепляемых линкеров можно назвать кислотнолабильные линкеры (например, включая гидразон), чувствительные к протеазе (например, чувствительные к пептидазе) линкеры, фотолабильные линкеры или дисульфид-содержащие линкеры (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992); U.S. Pat. No. 5,208,020).

В некоторых вариантах осуществления линкер имеет следующую формулу (IIg):

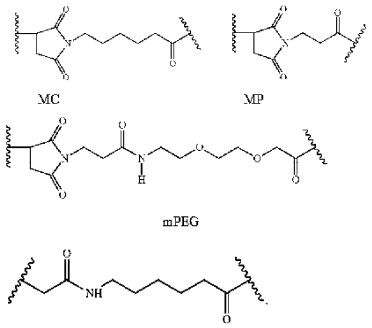
$$-A_a-W_w-Y_y \quad (IIg)$$

в которой A является "удлиняющей единицей" и a является целым числом от 0 до 1;

W является "единицей аминокислоты", и w является целым числом от 0 до 12;

Y является "единицей спейсера", и y является целым числом 0, 1 или 2. ADC, включающий линкер формулы (IIg), имеет формулу I (A) : Ab-(Aa-Ww-Yy-D)p, в которой Ab, D и p имеют значения, определенные выше для формулы (Ig). Примеры таких линкеров описаны в патенте США № 7498298, полностью включенном в настоящее описание ссылкой.

В некоторых вариантах осуществления компонент линкера включает "удлиняющую единицу" (A), которая связывает антитело с другим компонентом линкера или с группой лекарственного средства. Неограничивающие примеры удлиняющих единиц показаны ниже (в которых волнистая линия указывает места ковалентного присоединения к антителу, лекарственному средству или дополнительным компонентам линкера):

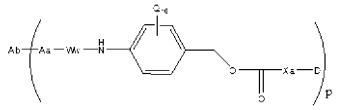


В некоторых вариантах осуществления компонент линкера включает "единицу аминокислоты" (W). В некоторых таких вариантах осуществления единица аминокислоты допускает расщепления линкера протеазой, таким образом облегчая высвобождение лекарственного средства из иммуноконъюгата после экспозиции к действию внутриклеточных протеаз, таких как лизосомальные ферменты (Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784). Примеры единиц аминокислоты включают, но не ограничены ими, дипептиды, трипептиды, тетрапептиды и пентапептиды. Примеры дипептидов включают, но не ограничены ими, валин-цитруллин (vc или val-cit), аланин-фенилаланин (AF или ala-phe); фенилаланин-лизин (fk или phe-lys); фенилаланин-гомолизин (phe-homolys); и N-метил-валин-цитруллин (Me-val-cit). Примеры трипептидов включают, но не ограничены ими, глицин-валин-цитруллин (gly-val-cit) и глицин-глицин-глицин (gly-gly-gly). Единица аминокислоты может включать природные аминокислотные остатки и/или минорные аминокислоты, и/или неприродные аналоги аминокислот, такие как цитруллин. Единицы аминокислоты могут быть разработаны и оптимизированы для ферментативного расщепления определенным ферментом, например, опухольассоциированной протеазой, катепсином B, C и D или плазминпротеазой.

Как правило, линкеры пептидного типа могут быть получены путем формирования пептидной связи между двумя или более аминокислотами и/или фрагментами пептида. Такие пептидные связи могут быть получены, например, согласно способу синтеза в жидкой фазе (например, E. Schrider and K. Lubke (1965) "The Peptides", volume 1, pp. 76-136, Academic Press).

В некоторых вариантах осуществления компонент линкера включает единицу "спейсера", связывающую антитело с группой лекарственного средства, либо непосредственно, либо через удлиняющую единицу и/или единицу аминокислоты. Единица спейсера может быть "саморасщепляющейся" или "несаморасщепляющейся". "Несаморасщепляющаяся" единица спейсера представляет собой такую, в которой часть или вся единица спейсера остаются связанными с группой лекарственного средства после расщепления ADC. Примеры несаморасщепляющихся единиц спейсера включают, но не ограничены ими, глициновую единицу спейсера и глицин-глициновую единицу спейсера. В некоторых вариантах осуществления ферментативное расщепление ADC, содержащего глицин-глициновую единицу спейсера, ассоциированной с опухолевой клеткой протеазой приводит к высвобождению группы глицин-глицин-лекарственное средство от остатка ADC. В некоторых таких вариантах осуществления группу глицин-глицин-лекарственное средство подвергают стадии гидролиза в опухолевой клетке, таким образом отщепляя глицин-глициновую единицу спейсера от группы лекарственного средства.

"Саморасщепляющаяся" единица спейсера обеспечивает высвобождение группы лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления единица спейсера линкера включает п-аминобензильную единицу. В некоторых таких вариантах осуществления п-аминобензиловый спирт присоединен к единице аминокислоты через амидную связь, и карбамат, метилкарбамат или карбонат образуется между бензиловым спиртом и лекарственным средством (Hamann et al. (2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15:1087-1103). В некоторых вариантах осуществления единица спейсера включает п-аминобензилоксикарбонилокси (PAB). В некоторых вариантах осуществления ADC, включающий саморасщепляющийся линкер, имеет структуру:



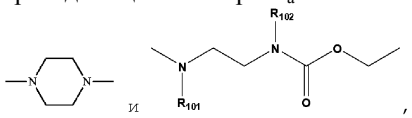
в которой Q обозначает -C_1-C_8 алкил, -O-(C_1-C_8 алкил), галоген, нитро или циано;

n_6 является целым числом от 0 до 4;

X_a может быть одной или более дополнительными единицами спейсера или может отсутствовать и

p является целым числом от 1 до приблизительно 20.

В некоторых вариантах осуществления p является целым числом от 1 до 10, от 1 до 7, от 1 до 5 или от 1 до 4. Неограничивающие примеры единицы спейсера X_a включают:

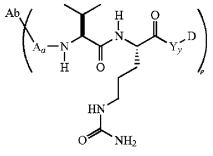


в которой R_{101} и R_{102} независимо выбраны из H и C_1-C_6 алкила. В некоторых вариантах осуществления R_{101} и R_{102} обозначают, каждй, -CH_3.

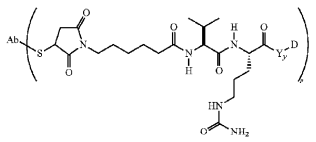
Другие примеры саморасщепляющихся спейсеров включают, но не ограничены ими, ароматические соединения, которые в электронном отношении подобны группе PAB, такие как производные 2-аминоимидазол-5-метанола (патент США № 7,375,078; Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) и орто- или пара-аминобензилацетали. В некоторых вариантах осуществления могут использоваться спейсеры, которые подвергаются циклизации после гидролиза амидной связи, такие как замещенные и незамещенные амиды 4-аминомасляной кислоты (Rodrigues et al. (1995) Chemistry Biology 2:223), соответствующим образом замещенные бицикло[2.2.1] и бицикло[2.2.2]кольцевые системы (Storm et al. (1972) J. Mer. Chem. Soc. 94:5815) и амиды 2-аминофенилпропионовой кислоты (Amsberry, et al. (1990) J. Org. Chem. 55:5867). Связь лекарственного средства с а-углеродом глицинового остатка является другим примером саморасщепляющегося спейсера, который может быть использован в ADC (Kingsbury et al. (1984) J. Med. Chem. 27:1447).

В некоторых вариантах осуществления линкер L может быть линкером дендритного типа для ковалентного присоединения более чем одной группы лекарственного средства к антителу посредством ветвления, многофункциональной группой линкера (Sun et al. (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al. (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768). Дендритные линкеры могут увеличить молярное отношение лекарственного средства к антителу, т.е. загрузку, которая относится к потенциалу ADC. Таким образом, когда антитело имеет только одну реакционоспособную цистеинтиоловую группу, множество групп лекарственного средства может быть присоединено через дендритный линкер.

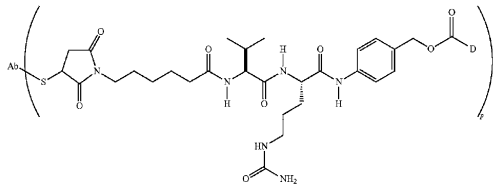
Неограничивающие примеры линкеров показаны ниже для ADCs формулы (Ig):



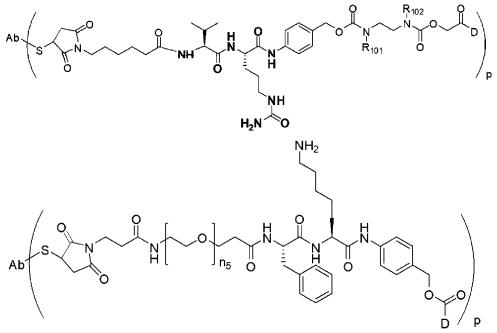
Val-cit



MC-val-cit



MC-val-cit-PAB



Phe-Lys-PAB-Ab

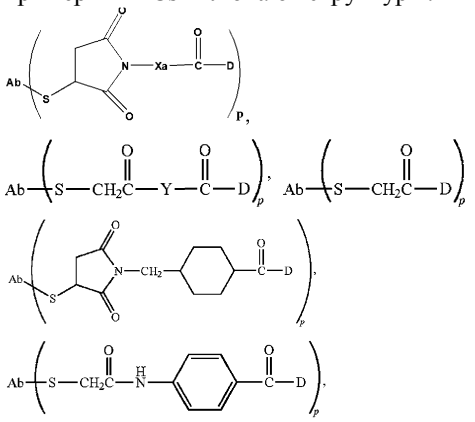
где R_{101} и R_{102} независимо выбраны из H и C_1-C_6 алкила;

n_5 является целым числом от 0 до 12.

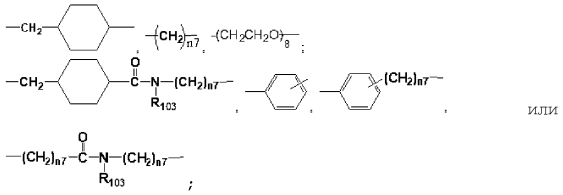
В некоторых вариантах осуществления n является целым числом от 2 до 10. В некоторых вариантах осуществления n является целым числом от 4 до 8.

В некоторых вариантах осуществления R_{101} и R_{102} обозначают, каждый, $-CH_3$.

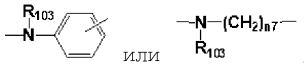
Другие неограничивающие примеры ADCs включают структуры:



в которых X_a обозначает:



Y обозначает:

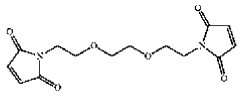


каждый R_{103} независимо обозначает H или C_1-C_6 алкил; и n7 является целым числом от 1 до 12.

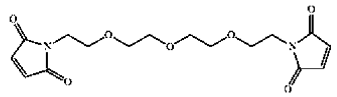
В некоторых вариантах осуществления линкер замещен группами, модулирующими растворимость и/или реакционоспособность. В качестве неограничивающего примера, заряженный заместитель, такой как сульфонат ($-SO_3-$) или аммоний, может увеличить водорастворимость реактива линкера и облегчить реакцию сцепления линкерного реагента с антителом и/или группой лекарственного средства, или облегчить реакцию сочетания Ab-L (промежуточное соединение антитело-линкер) с D или D-L (промежуточ-

ное соединение лекарственное средство-линкер) с Ab, в зависимости от пути синтеза, используемого для получения ADC. В некоторых вариантах осуществления часть линкера соединяется с антителом, и часть линкера соединяется с лекарственным средством, и затем Ab-(часть линкера)[a] соединяется к лекарственное средство-(часть линкера)[b] с формированием ADC формулы Ig.

Соединения, явно раскрытые здесь, включают, но не ограничены им, ADC, полученный со следующими линкерными реагентами: бис-малеимидо-триоксиэтилен гликоль (BMPEO), сложный эфир N-(β-малеимидопропилокси)-N-гидрокси сукцинимида (BMPS), сложный эфир N-(s-малеимидокапроилокси)сукцинимида (EMCS), сложный эфир N-[γ-малеимидобутирилокси]сукцинимида (GMBS), 1,6-гексан-бис-винилсульфон (HBVS), сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбокси-(6-амидокапроат) (LC-SMCC), сложный эфир м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимида (MBS), гидразид 4-(4-N-малеимидофенил)масляной кислоты (MPBH), сукцинимидил 3-(бромацетамидо)пропионат (SBAP), сукцинимидил йодайетат (SIA), сукцинимидил (4-йодацетил)аминобензоат (SIAB), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноат (SPP), сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), сукцинимидил 4- (р-малеимидофенил) бутират (SMPB), сукцинимидил 6-[(β-малеимидопропионамидо)гексаноат] (SMPH), иминотиолан (IT), сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC и сульфо-SMPB и сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат (SVSB), и включая бис-малеимидные реактивы: дитиобисмалеимидоэтан (DTME), 1,4-бисмалеимидобутан (BMB), 1,4-бисмалеимидил-2,3-дигидроксибутан (BMDB), бисмалеимидогексан (BMH), бисмалеимидоэтан (BMOE), BM(ПЭГ)$_2$ (показанный ниже) и BM(ПЭГ)$_3$ (показанный ниже); бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметил адипимидат HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидил суберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат), и бис-активные соединения фтора (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). В некоторых вариантах осуществления реактивы бис-малеимида обеспечивают присоединение тиоловой группы цистеина в антителе к тиолсодержащей группе лекарственного средства, линкеру или промежуточному соединению линкер-лекарственное средство. Другие функциональные группы, которые являются реакционоспособными с тиоловыми группами, включают, но не ограничены ими, йодацетамид, бромацетамид, винил пиридин, дисульфид, пиридил дисульфид, изоцианат и изотиоцианат.



BM(ПЭГ)$_2$



Некоторые пригодные линкерные реагенты могут быть получены из различных коммерческих источников, таких как Pierce Biotechnology, Inc (Рокфорд, Иллинойс), Molecular Biosciences Inc (Булдер, Колорадо), или синтезированы в соответствии с процедурами, описанными в данной области техники; например, в Toki et al. (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872; Dubowchik, et al. (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60; Walker, M. A (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355; Frisch et al. (1996) Bioconjugate Chem. 7:180-186; U.S. Pat. No. 6,214,345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583 и WO 04/032828.

Углерод-14-меченная 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилен триаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является примером хелатирующего агента для конъюгации радионуклеотида с антителом. См., например, WO 94/11026.

Способы получения конгьюгатов полимер-NaPi2b-нацеливаемое антитело.

В некоторых вариантах осуществления конъюгаты формируют в несколько стадий. Эти стадии включают (1) модификацию полимера так, чтобы он содержало функциональную группу, которая может реагировать с функциональной группой лекарственного средства или его производного; (2) реакцию модифицированного полимера с лекарственным средством или его производным так, чтобы лекарственное средство связывалось с полимером; (3) модификацию конъюгата полимер-лекарственное средство так, чтобы полимер содержал функциональную группу, которая может реагировать с функциональной группой выделенного NaPi2b-нацеливаемого антитела или его производного; и (4) реакцию модифицированного конъюгата полимер-лекарственное средство с NaPi2b-нацеливаемым антителом для формирования конъюгата, раскрытого здесь. Стадия (3) может быть опущена, если модифицированный полимер, полученный на стадии (1), содержит функциональную группу, которая может реагировать с функциональной группой антитела.

В другом варианте осуществления конъюгаты формируют в несколько стадий: (1) модификация полимера так, чтобы он содержал функциональную группу, которая может реагировать с функциональной

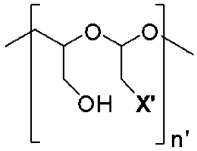
группой первого лекарственного средства или его производного; (2) реакция модифицированного полимера с первым лекарственным средством или его производным так, чтобы первое лекарственное средство связывалось с полимером; (3) модификация конъюгата полимер-лекарственное средство так, чтобы он содержал отличную функциональную группу, которая может реагировать с функциональной группой второго лекарственного средства или его производного (4) реакция модифицированного конъюгата полимер-лекарственное средство со вторым лекарственным средством или его производным так, чтобы второе лекарственное средство связывалось с конъюгатом полимер-лекарственное средство; (5) модификация конъюгата полимер-лекарственное средство, содержащего 2 различных лекарственных средства, так, чтобы полимер содержал функциональную группу, которая может реагировать с функциональной группой NaPi2b-нацеливаемого антитела; и (6) реакция модифицированного конъюгата полимер-лекарственное средство со стадии (5) с выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом или его производным для формирования конъюгата, раскрытого здесь. Стадии (5) и (6) могут быть повторены, если 2 различных выделенных NaPi2b-нацеливаемых антитела или их производных должны конъюгировать для формирования конъюгата полимер-лекарственное средство, включающего два разных лекарственных средств и два различных антитела.

В еще одном варианте осуществления конъюгаты формируют в несколько стадий. Эти стадии включают (1) модификацию полимера так, чтобы он содержал функциональную группу, которая может реагировать с функциональной группой лекарственного средства или его производного; (2) дальнейшую модификацию полимера так, чтобы он также содержал функциональную группу, которая может реагировать с функциональной группой NaPi2b-нацеливаемого антитела; (3) реакцию модифицированного полимера с лекарственным средством или его производным так, чтобы лекарственное средство связывалось с полимером; и (4) реакцию модифицированного конъюгата полимер-лекарственное средство с NaPi2b-нацеливаемым антителом для формирования конъюгата, раскрытого здесь. Последовательность стадий (1) и (2) или стадий (3) и (4) может быть обратной. Далее, одна из стадий (1) или (2) может быть опущена, если модифицированный полимер содержит функциональную группу, которая может реагировать как с функциональной группой лекарственного средства или его производного, так и с функциональной группой NaPi2b-нацеливаемого антитела.

В другом варианте осуществления конъюгаты формируют в несколько стадий: (1) модификация полимера так, чтобы он содержал функциональную группу, которая может реагировать с функциональной группой первого лекарственного средства или его производного; (2) дальнейшая модификация полимера так, чтобы он содержал функциональную группу, которая может реагировать с функциональной группой NaPi2b-нацеливаемого антитела; (3) реакция модифицированного полимера с первым лекарственным средством или его производным так, чтобы первое лекарственное средство связывалось с полимером; (4) модификация конъюгата полимер-лекарственное средство так, чтобы он содержал отличную функциональную группу, которая может реагировать с функциональной группой второго лекарственного средства или его производного (5) реакция модифицированного конъюгата полимер-лекарственное средство со вторым лекарственным средством или его производным так, чтобы второе лекарственное средство связывалось с конъюгатом полимер-лекарственное средство; (6) реакция модифицированного конъюгата полимер-лекарственное средство, содержащего 2 различных лекарственных средства, так, чтобы полимер с выделенным NaPi2b-нацеливаемым антителом или его производным с формированием конъюгата, раскрытого здесь. Стадия (6) может быть повторена, если 2 разных выделенных антитела или их производных должны конъюгировать для формирования конъюгата полимер-лекарственное средство, включающего два разных лекарственных средства и два разных антитела. Стадия (4) может быть осуществлена после стадии (1) так, чтобы модифицированный полимер содержал две разных функциональных группы, которые могут реагировать с двумя разными лекарственными средствами или их производными. В этом варианте осуществления модифицированный полимер, содержащий две разные функциональные группы, которые могут реагировать с двумя разными лекарственными средствами или их производными так, чтобы он содержал функциональную группу, которая может реагировать с функциональной группой антитела, может быть дополнительно модифицирован; до реакции модифицированного полимера либо с двумя разными лекарственными средствами (стадия (3) и стадия (5), либо с антителом (стадия (6).

В некоторых вариантах осуществления конъюгаты, раскрытые здесь, находят применения в биомедицинских областях, таких как доставка лекарственных средств и инжиниринг ткани, и полимерный носитель является биологически совместимым и биоразлагаемым. В некоторых вариантах осуществления носитель является растворимым полимером, наночастицей, гелем, липосомой, мицеллой, шовным материалом, имплантатом и т.д. В некоторых вариантах осуществления термин "растворимый полимер" охватывает биоразлагаемый биологически совместимый полимер, такой как полиаль (например, гидрофильный полиацеталь или поликеталь). В некоторых других вариантах осуществления носитель является полностью синтетическим, полусинтетическим или натуральным полимером. В некоторых других вариантах осуществления носитель является гидрофильным. Примеры подходящего полимерного носителя для получения конъюгатов, раскрытых здесь, описаны в патенте США № 8,815,226, содержание которого полностью включено в настоящее описание посредством ссылок.

В одном варианте осуществления полимерный носитель включает звенья формулы (IV):



(IV),

в которой X' обозначает заместитель для гидроксильной группы полимерного каркаса. Как показано в формуле (IV) и других формулах, описанных здесь, каждое полиацетальное звено имеет единственную гидроксильную группу, присоединенную к группе глицерина этого звена, и группу X', присоединенную к гликольальдегидной группе этого звена. Только для удобства следует понимать, что полимер, имеющий звенья формулы (IV) и других формул, описанных здесь, может содержать случайное распределение звеньев, имеющих группы X' (или другой заместитель, такой как линкер, включающий малеимидное окончание), присоединенные к гликольальдегидной группе этих звеньев, и тех, которые имеют единственную группу X' (или другой заместитель, такой как линкер, включающий малеимидное окончание), присоединенную к глицериновой группе этих звеньев, а также звеньев, имеющих две группы X' (или другие заместители, такие как линкер, включающий малеимидное окончание), одна из которых присоединена к гликольальдегидной группе, а другая присоединена к глицериновой группе этих звеньев.

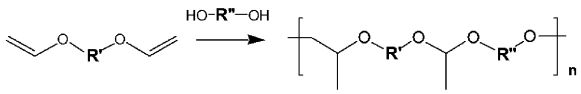
В одном варианте осуществления биоразлагаемые биологически совместимые полиали, подходящие для осуществления настоящего раскрытия, имеют молекулярную массу от приблизительно 2 до приблизительно 40 кДа, от приблизительно 6 до приблизительно 20 кДа, или от приблизительно 8 до приблизительно 15 кДа). Например, биоразлагаемый биологически совместимый полиаль, используемый для полимерных остовов или конъюгатов, раскрытых здесь, представляет собой PHF, имеющий молекулярную массу от приблизительно 2 до приблизительно 40 кДа (например, приблизительно 2-20 кДа, 3-15 кДа или 5-10 кДа.)

Способы получения полимерных носителей (например, биологически совместимых, биоразлагаемых полимерных носителей), подходящих для конъюгации с модификаторами, известны в данной области техники. Например, руководство по синтезу может быть найдено в патентах США 5,811,510; 5,863,990; 5,958,398; 7,838,619; 7,790,150; и 8,685,383. Специалисту известно, как адаптировать эти способы для создания полимерных носителей для использования в практике настоящего раскрытия.

В одном варианте осуществления способ формирования биоразлагаемых биологически совместимых полиальных конъюгатов согласно настоящему раскрытию включает способ, которым подходящий полисахарид комбинируют с эффективным количеством гликоль-специфичного окислителя для формирования промежуточного альдегидного соединения. Промежуточное альдегидное соединение, которое само является полиалем, может затем быть восстановлено до соответствующего полиола, сукцинилировано и подвергнуто сочетанию с одним или более подходящими модификаторами для формирования биоразлагаемого биологически совместимого полиального конъюгата, включающего сукцинамид-содержащие связи.

В другом предпочтительном варианте осуществления полностью синтетические биоразлагаемые биологически совместимые полиали для использования в настоящем раскрытии могут быть получены путем реакции подходящего инициатора с подходящим соединением-предшественником.

Например, полностью синтетические полиали могут быть получены конденсацией виниловых эфиров с защищенными замещенными диолами. Другие способы, такие как полимеризация с раскрытием кольца, могут использоваться, причем эффективность способа может зависеть от степени замещения и размеров защитных групп.



Специалисту будет понятно, что системы растворителей, катализаторы и другие факторы могут быть оптимизированы для получения высокомолекулярных продуктов.

В некоторых вариантах осуществления носитель представляет собой PHF.

В вариантах осуществления полимерный носитель представляет собой PHF, имеющий индекс полидисперсности (PDI) ≤1,5, например, <1,4, <1,3, <1,2 или <1,1.

Например, для конъюгации выделенного NaPi2b-нацеливаемого антитела, имеющего молекулярную массу от 40 кДа до 200 кДа, полимерный носитель остовов является полиацеталем, например, PHF, имеющим молекулярную массу (т.е. MW немодифицированного PHF) в пределах от приблизительно 2 кДа до приблизительно 40 кДа (например, приблизительно 2-20 кДа или приблизительно 3-15 кДа, или приблизительно 5-10 кДа).

Например, для конъюгации антитела, имеющего молекулярную массу от 40 кДа до 80 кДа, полимерный носитель остовов, раскрытых здесь, является полиацеталем, например, PHF, имеющим молекулярную массу (т.е. MW немодифицированного PHF) в пределах от приблизительно 2 кДа до приблизи-

тельно 40 кДа (например, приблизительно 2-20 кДа или приблизительно 3-15 кДа, или приблизительно 5-10 кДа). Например, PHF имеет молекулярную массу приблизительно 5 кДа, 6 кДа, 7 кДа, 8 кДа, 9 кДа, 10 кДа, 11 кДа, 12 кДа, 13 кДа, 14 кДа или 15 кДа.

Например, для конъюгации антитела, имеющего молекулярную массу от 60 кДа до 120 кДа, полимерный носитель остовов, раскрытых здесь, является полиацеталем, например, PHF, имеющим молекулярную массу (т.е. MW немодифицированного PHF) в пределах от приблизительно 2 кДа до приблизительно 40 кДа (например, приблизительно 2-20 кДа или приблизительно 3-15 кДа, или приблизительно 5-10 кДа). Например, PHF имеет молекулярную массу приблизительно 5 кДа, 6 кДа, 7 кДа, 8 кДа, 9 кДа, 10 кДа, 11 кДа, 12 кДа, 13 кДа, 14 кДа или 15 кДа.

Например, для конъюгации антитела, имеющего молекулярную массу от 140 кДа до 180 кДа или от 140 кДа до 150 кДа, полимерный носитель остовов, раскрытых здесь, является полиацеталем, например, PHF, имеющим молекулярную массу (т.е. MW немодифицированного PHF) в пределах от приблизительно 2 кДа до приблизительно 40 кДа (например, приблизительно 2-20 кДа или приблизительно 3-15 кДа, или приблизительно 5-10 кДа). Например, PHF имеет молекулярную массу приблизительно 5 кДа, 6 кДа, 7 кДа, 8 кДа, 9 кДа, 10 кДа, 11 кДа, 12 кДа, 13 кДа, 14 кДа или 15 кДа.

Антитело в этом диапазоне молекулярной массы включает, но не ограничено ими, например, полноразмерные антитела, такие как IgG, IgM.

Биоразлагаемые биологически совместимые конъюгаты, раскрытые здесь, могут быть получены так, чтобы соответствовать желаемым требованиям в отношении биоразлагаемости и гидрофильности. Например, в физиологических условиях может быть достигнут баланс между биоразлагаемостью и стабильностью. Например, известно, что молекулы с молекулярными массами вне определенного порога (обычно, выше 40-100 кДа, в зависимости от физической формы молекулы) не экскретируются через почки, как малые молекулы, и могут быть выведены из организма только посредством захвата клетками и разложения во внутриклеточных компартементах, прежде всего лизосомах. Это наблюдение иллюстрирует, как функционально стабильные, но все же биоразлагаемые материалы могут быть разработаны путем коррекции их стабильности в обычных физиологических условиях (pH 7,5±0,5) и при лизосомальном pH (pH около 5). Например, известно, что гидролиз групп ацеталя и кеталя катализируется кислотами, поэтому полиали будут в целом менее стабильны в кислой лизосомальной среде, чем, например, в плазме крови. Можно спроектировать тест для сравнения профиля разложения полимеров при, например, pH 5 и pH 7,5 при 37°C в водных средах и таким образом определить ожидаемый баланс стабильности полимера в нормальной физиологической среде и в "пищеварительном" лизосомальном компартементе после захвата клетками. Целостность полимера в таких тестах может быть измерена, например, эксклюзионной ВЭЖХ. Специалист может выбрать другие подходящие способы для изучения различных фрагментов подвергнутых разложению конъюгатов, раскрытых здесь.

Во многих случаях будет предпочтительно, что при pH 7,5 эффективный размер полимера не изменяется поддающимся обнаружению образом в течение от 1 до 7 дней и остается в пределах 50% от первоначального в течение по меньшей мере нескольких недель. При pH 5, с другой стороны, полимер должен предпочтительно поддающимся обнаружению образом разлагаться в течение от 1 до 5 дней и полностью превратиться в низкомолекулярные фрагменты в течение от двух недель до нескольких месяцев. Несмотря на то, что более быстрое разложение может быть в некоторых случаях предпочтительным, в целом может быть более желательно, чтобы полимер разлагался в клетках со скоростью, не превышающей скорость метаболизма или экскреции полимерных фрагментов клетками. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления ожидается, что конъюгаты согласно настоящему раскрытию будут биоразлагаемы, в частности, после захвата клетками и относительно "инертными" в отношении биологических систем. Продукты разложения носителя предпочтительно являются незаряженными и не сдвигают в значительной степени pH среды. Предлагается, что изобилие спиртовых групп может обеспечить низкий процент распознавания полимера клеточными рецепторами, в частности, фагоцитов.

Полимерные каркасы согласно настоящему раскрытию обычно содержат немного, если таковые вообще имеются, антигенных детерминант (характерных, например, для некоторых полисахаридов и полипептидов) и обычно не включают жесткие конструкции, способные к участию во взаимодействиях типа "ключ-замок" in vivo, если последние не желательны. Таким образом, растворимые, поперечно-сшитые и твердые конъюгаты, раскрытые здесь, имеют предсказанную низкую токсичность и биоадгезивность, делающие их подходящими для нескольких биомедицинских применений.

В некоторых вариантах осуществления настоящего раскрытия биоразлагаемые биологически совместимые конъюгаты могут образовывать линейные или разветвленные структуры. Например, биоразлагаемые биологически совместимые полиальные конъюгаты согласно настоящему раскрытию могут быть хиральными (оптически активными). В случае необходимости, биоразлагаемые биологически совместимые полиальные конъюгаты согласно настоящему раскрытию могут быть скалемическими.

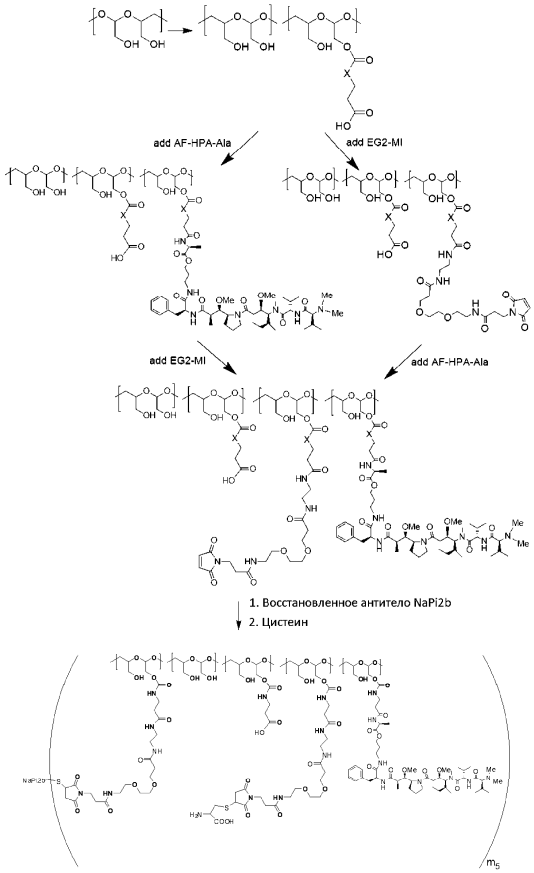
В некоторых вариантах осуществления конъюгаты, раскрытые здесь, являются водорастворимыми. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты, раскрытые здесь, являются водонерастворимыми. В некоторых вариантах осуществления конъюгат по изобретению находится в твердой форме. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты, раскрытые здесь, являются коллоидами. В некоторых вариантах

осуществления конъюгаты, раскрытые здесь, находятся в форме частиц. В некоторых вариантах осуществления конъюгаты, раскрытые здесь, находятся в форме геля.

Схема 1, ниже, демонстрирует синтетическую схему создания полимерных остовов лекарственного средства, раскрытых здесь. В одном варианте осуществления конъюгаты формируют в несколько стадий: (1) полимер, PHF, модифицируют так, чтобы он содержал группу COOH (например, -C(O)-X-$(CH_2)_2$-COOH); (2) полимер затем дополнительно модифицируют так, чтобы он содержал малеимидогруппу (например, EG2-MI), которая может реагировать с функциональной группой PBRM; (3) модифицированный полимер, содержащий две различных функциональных группы, вводят в реакцию с функциональной группой лекарственного средства или его производного (например, AF-HPA-Ala) с формированием конъюгата полимер-лекарственное средство; (4) дисульфидные связи PBRM восстанавливают; (5) восстановленный PBRM затем вводят в реакцию с конъюгатом полимер-лекарственное средство для формирования конъюгата белок-полимер-лекарственное средство; и (6) остающиеся малеимидо-группы в случае необходимости вводят в реакцию с малеимидо-блокирующим соединением (например, цистеином).

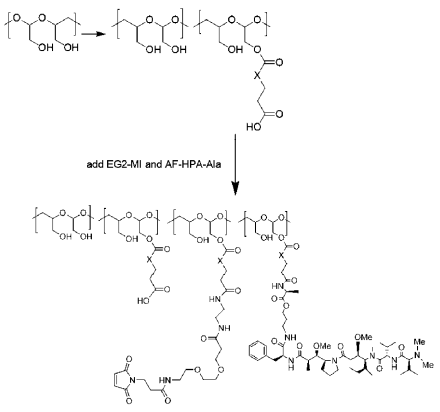
В другом варианте осуществления порядок стадий (2) и (3) может быть обратным, как изображено в правой части на схеме 1, ниже.

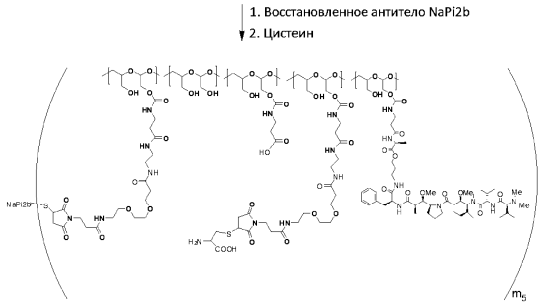
Схема 1



В еще одном варианте осуществления стадии (2) и (3) выше выполняют одновременно, как изображено на схеме 2, ниже.

Схема 2





Использование конгьюгатов NaPi2b-нацеливаемое антитело-лекарственное средство.

Следует понимать, что введение терапевтических средств в соответствии с раскрытием осуществляют с подходящими носителями, эксципиентами и другими агентами, включенными в составы для обеспечения улучшенного переноса, доставки, переносимости и т.п. Множество подходящих составов может быть найдено в формуляре, известном всем специалистам в области фармацевтической химии: Remington's Pharmaceutical Sciences (15th ed., Mack Publishing Company, Истон, Пенсильвания (1975)), особенно Глава 87, Blaug, Seymour. Эти составы включают, например, порошки, пасты, мази, желе, воски, масла, липиды, липид- (катионный или анионный) содержащие везикулы (такие как Lipofectin™), конъюгаты ДНК, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии типа "масло в воде" и эмульсии типа "вода в масле", эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли с различными молекулярными массами), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. Любая из вышеописанных смесей может быть подходящей для лечения и способов лечения в соответствии с настоящим раскрытием, при условии, что активный ингредиент в составе не инактивирован составом, и состав физиологически совместим и переносим с этим путем введения. См. также Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein Pharmaceuticals." Int. J. Pharm. 203 (1-2):1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." J Pharm Sci. 89(8):967-78 (2000), Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998) и приведенные в них цитаты для получения дополнительной информации относительно с составов, эксципиентов и носителей, известных специалистам в области фармацевтической химии.

В одном варианте осуществления конъюгаты антитела NaPi2b, раскрытые здесь, могут использоваться в качестве терапевтических средств. Такие средства обычно используют для диагностики, прогнозирования, мониторинга, лечения, облегчения, профилактики и/или задержки прогрессии заболевания или патологии, связанной с, например, аберрантной активностью и/или экспрессией NaPi2b у пациента. Терапевтический режим осуществляют путем идентификации пациента, например, пациента-человека, страдающего (или имеющего риск его развития) заболеванием или нарушением, связанным с аберрантной активностью и/или экспрессией NaPi2b, например, раком, с помощью стандартных методов. Препарат конъюгата антитела NaPi2b, предпочтительно имеющего высокую специфичность и высокую аффинность к его антигену-мишени, вводят пациенту, и он обычно оказывает эффект вследствие своего связывания с мишенью. Введение конъюгата может подавлять или ингибировать, или препятствовать сигнальной функции мишени. Введение конъюгата может подавлять или ингибировать, или препятствовать связыванию мишени с эндогенным лигандом, с которым она связывается в естественных условиях. Например, конъюгат может связываться с мишенью и модулировать, блокировать, ингибировать, уменьшать, противодействовать, нейтрализовывать или иначе препятсвовать активности и/или экспрессии NaPi2b.

Заболевания или нарушения, связанные с аберрантной активностью и/или экспрессией NaPi2b, включают, но не ограничены им, рак. Целевой рак может быть раком яичника, таким как эпителиальный рак яичника, раком щитовидной железы, раком ободочной и прямой кишки, раком легких, немелкоклеточным раком легких (NSCLC) таким как неплоскоклеточный NSCLC, раком молочной железы, раком почек и раком слюнных протоков.

В другом аспекте заболевания или нарушения являются раком, выбранным из группы, состоящей из немелкоклеточного рака легких (NSCLC), такого как неплоскоклеточный NSCLC, и рака яичника, такого как эпителиальный рак яичника. Обычно облегчение или лечение заболевания или нарушения включают уменьшение одного или более симптомов или медицинских проблем, связанных с заболеванием или нарушением. Например, в случае рака, терапевтически эффективное количество конъюгата или его фармацевтической композиции может достигать одного из или комбинации следующего: сокращение количества раковых клеток; уменьшение размера опухоли; ингибирование (т.е. уменьшение в некоторой степени и/или остановка) инфильтрация раковых клеток в периферические органы; ингибирование метастазирования опухоли; ингибирование, в некоторой степени, роста опухоли; и/или облегчение, в некоторой степени, одного или более симптомов, связанных с раком. В некоторых вариантах осуществления композиция, раскрытая здесь, может использоваться для предотвращения начала или повторного возникновения заболевания или нарушения у пациента.

Терапевтически эффективное количество конъюгата антитела NaPi2b, раскрытого здесь, обычно относится к количеству, необходимому для достижения терапевтической цели. Как отмечено выше, это может быть связывающим взаимодействием между антителом и его антигеном-мишенью, в некоторых случаях, препятствующим функционированию мишени. Количество, необходимое для введения, кроме того, зависит от аффинности связывания антитела с его специфическим антигеном и также зависит от скорости, с которой введенное антитело выводится из свободного объема пациента, которому оно введено. Режим введения, в котором используют конъюгаты, раскрытые здесь, также выбирают в соответствии со множеством других факторов, включая тип, вид, возраст, массу тела, пол и заболевание пациента; серьезность состояния, подвергаемого лечению; путь введения; почечная и печеночная функция пациента; и конкретный используемый конъюгат. Обычно врач или ветеринар могут легко определить и предписать эффективное количество конъюгата, необходимое для предотвращения, противостояния или остановки прогресса состояния. Общие диапазоны для терапевтически эффективного введения конъюгата антитела NaPi2b, раскрытого здесь, могут составлять, в качестве неограничивающего примера, от 0,1 мг/кг массы тела до приблизительно 50 мг/кг массы тела, от 0,1 мг/кг массы тела до приблизительно 100 мг/кг массы тела или от 0,1 мг/кг массы тела до приблизительно 150 мг/кг массы тела. Диапазоны, раскрытые здесь, выражают как количество, введенное на основе массы тела пациента, и специалист может легко перевести его в количество, введенное на площадь поверхности тела пациента. Например, 1 мг/кг массы тела для взрослого человека эквивалентен приблизительно 37 мг/м^2 и 1 мг/кг массы тела для ребенка эквивалентен приблизительно 25 мг/м^2.

Обычная частота введения может составлять, например, от двух раз в день до одного раза в месяц (например, один раз в день, один раз в неделю; один раз в две недели; один раз в 3 недели или один раз в месяц). Например, конъюгаты 1535 XMT или 10H1.11.4B, раскрытые здесь, могут быть введены (например, как единственная доза один раз в неделю, каждые 2 недели, каждые 3 недели или один раз в месяц) в количестве от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг (например, 0,2 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,67 мг/кг, 0,8 мг/кг, 1 мг/кг, 1,2 5 мг/кг, 1,67 мг/кг, 2 мг/кг, 2,5 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг, 10 мг/кг, 11 мг/кг, 12 мг/кг, 13 мг/кг, 14 мг/кг, 15 мг/кг, 16 мг/кг, 17 мг/кг, 18 мг/кг, 19 мг/кг или 20 мг/кг). Например, конъюгаты 1535 XMT или 10H1.11.4B, раскрытые здесь, могут быть введены (например, как единственная доза один раз в неделю, каждые 2 недели, каждые 3 недели или один раз в месяц) в количестве от приблизительно 0,1 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг (например, 0,2 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,67 мг/кг, 0,8 мг/кг, 1 мг/кг, 1,25 мг/кг, 1,67 мг/кг, 2 мг/кг, 2,5 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг, 10 мг/кг, 11 мг/кг, 12 мг/кг, 13 мг/кг, 14 мг/кг, 15 мг/кг, 16 мг/кг, 17 мг/кг, 18 мг/кг, 19 мг/кг или 20 мг/кг) для лечения NaPi2b-экспрессирующего рака яичника или NaPi2b-экспрессирующего рака NSCLC.

Эффективность лечения определяется в ассоциации с любым известным способом диагностики или лечения определенного NaPi2b-связанного нарушения. Облегчение одного или более симптомов NaPi2b-связанного нарушения указывает, что антитело приносит клиническую пользу.

Способы скрининга антител, обладающих желаемой специфичностью, включают, но не ограничены ими, фермент-связанный иммуносорбентный тест (ELISA) и другие иммунологически опосредованные методы, известные в данной области техники.

Терапевтическое введение и составы конгьюгатов NaPi2b-нацеливаемое антитело-лекарственное средство.

Конъюгаты, раскрытые здесь (также упомянутые здесь как "активные соединения"), могут быть включены в фармацевтические композиции, подходящие для введения. Принципы и соображения, вовлеченные в получение таких композиций, а также руководство в выборе компонентов приведены, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences: The Science And Practice Of Pharmacy 19th ed (Alfonso R. Gennaro, et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; и Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

Такие композиции, как правило, включают антитело и/или его конъюгаты и фармацевтически приемлемый носитель.

В рамках изобретения фраза "фармацевтически приемлемый" относится к соединениям, материалам, композициям, носителям и/или лекарственным формам, которые являются, в рамках здравого медицинского суждения, подходящими для использования в контакте с тканями человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, соразмерными с обоснованным отношением преимущество/риск.

В рамках изобретения термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие абсорбцию агенты и т.п., совместимые с фармацевтическим введением. Подходящие носители описаны в новом издании Remington's Pharmaceutical Sciences, стандартном справочнике в данной области, включенным в настоящее описание ссылкой. Предпочтительные примеры таких носителей или разбавителей включают, но не ограничены ими, воду, солевой раствор, растворы Рингера, раствор декстрозы и 5%-ный человеческий сывороточный альбумин. Липосомы и неводные носители, такие как

нелетучие масла, могут также использоваться. Использование таких сред и агентов для фармацевтически активных веществ известно в данной области техники. Кроме того, если только какие-либо стандартные среды или агенты не являются несовместимыми с активным соединением, их использование в композициях также рассматривается.

Составы, которые используются для введения in vivo, должны быть стерильными. Это легко достигается фильтрацией через мембраны для стерилизующей фильтрации.

Фармацевтическую композицию, раскрытую здесь, составляют так, чтобы она была совместимой с ее намеченным путем введения. Примеры путей введения включают парентеральный, например, внутривенное, кожное, подкожное, пероральное (например, ингаляцией), чрескожное (т.е. топическое), трансмукозальное и ректальное введение. Растворы или суспензии, используемые для парентерального, кожного или подкожного введения, могут включать следующие компоненты: стерильный разбавитель, такой как вода для инъекции, физиологический раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, пропиленгликоль или другие синтетические растворители; антибактериальные средства, такие как бензиловый спирт или метилпарабен; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA); буферы, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для регулирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. pH может быть отрегулирован с помощью кислот или оснований, таких как соляная кислота или гидроксид натрия. Парентеральный препарат может находиться в ампулах, шприцах для одноразового применения или многодозовых сделанных из стекла или пластмассы ампулах.

В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция находится в нерасфасованной форме или в стандартной лекарственной форме. Стандартная лекарственная форма является любой из множества форм, включая, например, капсулу, в/в мешок, таблетку, единственный насос на аэрозольном ингаляторе или ампулу. Количество активного ингредиента (например, конъюгата, раскрытого здесь) в разовой дозе композиции является эффективным количеством и варьирует в зависимости от конкретного лечения. Специалисту будет понятно, что иногда необходимо сделать обычные изменения дозировки в зависимости от возраста и состояния пациента. Дозировка также зависит от пути введения.

Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (если вещество является водорастворимым) или дисперсии и стерильные порошки для экстемпорального приготовления стерильных инъецируемых растворов или дисперсий. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, Cremophor EL™ (BASF, Парсиппани, Нью-Джерси) или фосфатный буферизованный солевой раствор (PBS). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой до такой степени, чтобы ее можно было просто вводить шпрецем. Она должна быть стабильной в условиях изготовления и хранения и должна быть сохранена против загрязнения микроорганизмами, такими как бактерии и грибы. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Надлежащая текучесть может сохраняться, например, при помощи покрывающего агента, такого как лецитин, поддержанием требуемого размера частиц в случае дисперсии и при помощи сурфактантов. Профилактика действия микроорганизмов может быть достигнута различными антибактериальными и противогрибковыми веществами, например, парабенами, хлорбутанолом, фенолом, аскорбиновой кислотой, тимеросалом и т.п. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию изотонические вещества, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъецируемых композиций может быть обеспечена включением в композицию агента, задерживающего абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

Стерильные инъецируемые растворы могут быть получены путем включения активного соединения в необходимом количестве в подходящем растворителе с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, если требуется, с последующей стерилизующей фильтрацией. Обычно дисперсию получают путем включения активного соединения в стерильный носитель, содержащий основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъецируемых растворов способы получения представляют собой вакуумную сушку и сушку сублимацией, дающие порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желаемый ингредиент из ранее стерильно отфильтрованного раствора.

Пероральные композиции обычно включают инертный разбавитель или съедобный носитель. Они могут находиться в желатиновых капсулах или прессованы в таблетки. В целях перорального терапевтического введения активное соединение может включаться с эксципиентами и использоваться в форме таблеток, пастилок или капсул. Пероральные композиции могут также быть получены с использованием жидкого носителя для использования в качестве жидкости для полоскания рта, причем соединение в жидком носителе вводят перорально и полощут и сплевывают или глотают. Фармацевтически совместимые связующие и/или адъюванты могут быть включены как часть композиции. Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и т.п. могут содержать любой из следующих ингредиентов или соединения аналогичного характера: связующее, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагакант или желатин; эксципиент, такой как крахмал или лактоза, разрыхлитель, такой как альгиновая кислота, Primogel или кукурузный

крахмал; лубрикант, такой как стеарат магния или Sterotes; глидант, такой как коллоидный диоксид кремния; подсластитель, такой как сахароза или сахарин; или ароматизатор, такой как мята перечная, метилсалицилат или апельсиновая приправа.

Для введения ингаляцией соединения поставляются в форме аэрозольного спрея из герметичного контейнера или диспенсера, содержащего подходящий пропеллент, например, газ, такой как углекислый газ, или небулайзера.

Системное введение может также быть осуществлено трансмукозальными или трансдермальными средствами. Для трансмукозального или чрескожного введения в составе используют пенетранты, адекватные для барьера, через который требуется проникнуть. Такие пенетранты являются известными в данной области техники и включают, например, для трансмукозального введения, детергенты, соли желчных кислот и производные фусидовой кислоты. Трансмукозальное введение может быть осуществлено с помощью назальных спреев или суппозиториев. Для чрескожного введения активные соединения составляют в мази, бальзамы, гели или кремы, как известно в данной области техники.

Соединения могут также быть получены в форме суппозиториев (например, со стандартной основой для суппозиториев, такой как масло какао и другие глицериды) или удерживающих клизм для ректальной доставки.

В одном варианте осуществления активные соединения получают с носителями, которые защищают соединение от быстрого выведения из организма, такими как составы замедленного/контролируемого высвобождения, включая имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Могут использоваться биоразлагаемые биологически совместимые полимеры, такие как этилен винилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиорто-эфиры и полимолочная кислота. Способы получения таких составов известны специалисту.

Например, активные ингредиенты могут быть заключены в микрокапсулы, получаемые, например, методами коацервации или поверхностной полимеризации, например, микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатина и микрокапсулы из поли-(метилметакрилата), соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственных средств (например, липосома, белковых микросферах, микроэмульсиях, наночастицах и нанокапсулах) или в макроэмульсиях.

Могут быть получены препараты замедленного высвобождения. Подходящие примеры препаратов замедленного высвобождения включают полупроницаемые матриксы твердых гидрофобных полимеров, содержащих антитело, которые находятся в форме формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриксов длительного высвобождения включают полиэфиры, гидрогели (например, поли-(2-гидроксиэтилметакрилат), или поли-виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3,773,919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ-этил-L-глутамата, неразлагаемый этилен-винилацетат, разлагаемые сополимеры гликолевой кислоты и молочной кислоты, такие как DEPOT LUPRON™ (инъецируемые микросферы, составленные из сополимера гликолевой кислоты и молочной кислоты и лейпролид ацетата), и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту. Хотя полимеры, такие как этилен-винилацетат и молочная кислота-гликолевая кислота обеспечивают высвобождению молекул в течение более 100 дней, некоторые гидрогели высвобождают белки в течение более коротких интервалов времени.

Материалы могут также быть получены коммерчески от Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Липосомальные суспензии (включая липосомы, нацеливаемые на инфицированные клетки с моноклональными антителами к вирусным антигенам) могут также использоваться в качестве фармацевтически приемлемых носителей. Они могут быть получены согласно способам, известным специалисту в данной области техники, например, как описано в патенте США № 4,522,811.

Особенно предпочтительно составлять пероральные или парентеральные композиции в стандартной лекарственной форме для простоты введения и однородности дозировки. Стандартная лекарственная форма в рамках изобретения относится к физически дискретным единицам, пригодным для использования вкачестве разовых доз для получающего лечение пациента; причем каждая форма содержит предопределенное количество активного соединения, вычисленное как оказывающее желаемый терапевтический эффект, в комбинации с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация для стандартных лекарственных форм, раскрытых здесь, диктуется и непосредственно зависит от уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который будет достигнут, и ограничений, присущих составлению такого активного соединения для лечения человека.

Фармацевтические композиции могут быть включены в контейнер, пакет или диспенсер вместе с инструкциями по введению.

Состав может также содержать более одного активного соединения в случае необходимости для конкретного подвергаемого лечению показания, предпочтительно с дополнительными активностями, не оказывающими негативное влияние друг на друга. Также, или кроме того, композиция может включать агент, улучшающий ее функцию, такой как, например, цитотоксический агент, цитокин, химиотерапевтический агент или подавляющий рост агент. Такие молекулы соответственно присутствуют в комбинации в количествох, которые являются эффективными для предназначенной цели.

В одном варианте осуществления активные соединения вводят в рамках комбинированной терапии, т.е. комбинируют с другими агентами, например, терапевтическими агентами, которые являются пригодными для лечения патологических состояний или нарушений, таких как различные формы рака, аутоиммунные нарушения и воспалительные заболевания. Термин "в комбинации" в этом контексте означает, что агенты дают по существу в одно время, либо одновременно, либо последовательно. Если их дают последовательно, в начале введения второго соединения первое из двух соединений является предпочтительно все еще поддающимся обнаружению в эффективных концентрациях в месте лечения.

Например, комбинированная терапия может включать один или несколько конъюгатов, раскрытых здесь, составленных совместно с и/или использованных совместно с одним или более дополнительных антител, например, антителом NaPi2b, которое может быть тем же, что и антитело, использованное для формирования конъюгата, или другим антителом.

Например, комбинированная терапия может включать один или более терапевтических средств и/или адъювантов. В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство является ингибитором, представляющим собой малую молекулу, другим терапевтическим средством на основе антител, полипептидом или терапевтическим средством на основе пептида, терапевтическим средством на основе нуклеиновой кислоты и/или другим биопрепаратом.

В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое средство является цитотоксическим агентом, химиотерапевтическим агентом, подавляющим рост агентом, ингибитором ангиогенеза, ингибитором PARP (поли-(АДФ)рибоза-полимеразы), алкилирующим агентом, антиметаболитом, агентом, препятствующим образованию микротрубочек, ингибитором топоизомеразы, цитотоксическим антибиотиком, любым другим агентом, разрушающим нуклеиновую кислоту, или ингибитором иммунных контрольных точек. В одном варианте осуществления терапевтический агент, используемый в лечении рака, включает, но не ограничен ими, платиновое соединение (например, цисплатин или карбоплатин); таксан (например, паклитаксел или доцетаксел); ингибитор топоизомеразы (например, иринотекан или топотекан); антрациклин (например, доксорубицин (ADRIAMYCIN®) или липосомальный доксорубицин (DOXIL®)); антиметаболит (например, гемцитабин, пеметрексед); циклофосфамид; винорелбин (NAVELBINE®); гексаметилмеламин; ифосфамид; этопозид; ингибитор ангиогенеза (например, Бевацизумаб (Avastin®)), талидомид, TNP-470, тромбоцитарный фактор 4, интерферон или эндостатин); ингибитор PARP (например, Олапариб (Lynparza™)); ингибитор иммунных контрольных точек, такой как, например, моноклональное антитело, нацеливаемое либо на PD-1, либо на PD-L ((Пембролизумаб (Keytruda®), атезолизумаб (MPDL3280A) или Ниволумаб (Opdivo®)) или CTA-4 (Ипилимумаб (Yervoy®), ингибитор киназы (например, сорафениб или эрлотиниб), ингибитор протеасомы (например, бортезомиб или карфилзомиб), иммуномодулирующий агент (например, леналидомид или IL-2), радиационный агент, ингибитор ALK (например, кризотиниб (Xalkori), церитиниб (Zykadia), алектиниб (Alecensa), далантерцепт (ACE-041), бригатиниб (AP26113), энтректиниб (NMS-E628), PF-06463922 TSR-011, CEP-37440 и X-396) и/или их биоаналог и/или их комбинации. Другие подходящие агенты включают агент, который рассматривают как медицинский стандарт, и/или химиотерапевтический агент, известный в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является ингибитором CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является антителом к CTLA-4. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является моноклональным антителом к CTLA-4. В других вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является человеческим или гуманизированным антителом к CTLA-4. В одном варианте осуществления анти-CTLA-4 антитело блокирует связывание CTLA-4 с CD80 (B7-1) и/или CD86 (B7-2), экспрессируемыми на антигенпредставляющих клетках. Примеры антител к CTLA-4 включают, но не ограничены ими, анти-CTLA-4 антитело Bristol Meyers Squibb ипилимумаб (также известный как Yervoy®, MDX-010, BMS-734016 и MDX-101); антитело анти-CTLA4, клон 9H10 от Millipore; тремелимумаб Pfizer (CP-675,206, тицилимумаб); и антитело анти-CTLA4 клон BNI3 от Abeam.

В некоторых вариантах осуществления анти-CTLA-4 антитело является анти-CTLA-4 антителом, раскрытым в любой из следующих патентных публикаций (включенных в настоящее описание посредством ссылок): WO 2001014424; WO 2004035607; US2005/0201994; EP 1212422 B1; WO2003086459; WO2012120125; WO2000037504; WO2009100140; WO200609649; WO2005092380; WO2007123737; WO2006029219; WO20100979597; WO200612168; и WO1997020574. Дополнительные антитела CTLA-4 описаны в патентах США № 5,811,097, 5,855,887, 6,051,227, and 6,984,720; в публикациях PCT WO 01/14424 и WO 00/37504; и в публикациях США № 2002/0039581 и 2002/086014; и/или патенте США № 5,977,318, 6,682,736, 7,109,003 и 7,132,281, включенных в настоящее описание ссылкой). В некоторых вариантах осуществления анти-CTLA-4 антитело является, например, таковым, раскрытым в: WO 98/42752; патентах США № 6,682,736 и 6,207,156; Hurwitz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(17): 10067-10071 (1998); Camacho et al., J. Clin. Oncol., 22(145): Abstract No. 2505 (2004) (antibody CP-675206); Mokyr et al., Cancer Res., 58:5301-5304 (1998) (включенных в настоящее описание ссылкой).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CTLA-4 является лигандом CTLA-4, как раскрыто в WO1996040915.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор CTLA-4 является ингибитором нуклеиновой кислоты, экспрессирующей CTLA-4. Например, молекулы анти-CTLA4 РНКi могут принимать форму молекул, описанных Mello и Fire в публикациях PCT WO 1999/032 619 и WO 2001/029058; публикациях США № 2003/0051263, 2003/0055020, 2003/0056235, 2004/265839, 2005/0100913, 2006/0024798, 2008/0050342, 2008/0081373, 2008/0248576 и 2008/055443; и/или патентах США № 6,506,559, 7,282,564, 7,538,095, и 7,560,438 (включенных в настоящее описание ссылкой). В некоторых случаях молекулы анти-CTLA4 РНКi принимают форму двухцепочечных молекул РНКi, описанных Tuschl в европейском патенте EP 1309726 (включенном в настоящее описание ссылкой). В некоторых случаях молекулы анти-CTLA4 РНКi принимают форму двухцепочечных молекул РНКi, описанных Tuschl в патентах США № 7,056,704 и 7,078,196 (включенных в настоящее описание ссылкой). В некоторых вариантах осуществления ингибитор CTLA4 является аптамером, описанным в публикации PCT № WO2004081021.

Кроме того, молекулы анти-CTLA4 РНКi согласно настоящему раскрытию могут принимать форму молекул РНК, описанных Crooke в патентах США № 5,898,031, 6,107,094, 7,432,249 и 7,432,250, и европейском патенте EP 0928290 (включенных в настоящее описание ссылкой).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является ингибитором PD-L1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является антителом к PD-L1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является моноклональным антителом к PD-L1. В других или дополнительных вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является человеческим или гуманизированным антителом к PD-L1. В одном варианте осуществления ингибитор иммунных контрольных точек уменьшает экспрессию или активность одного или более белков иммунных контрольных точек, таких как PD-L1. В другом варианте осуществления ингибитор иммунных контрольных точек уменьшает взаимодействие между PD-1 и PD-L1. Примеры ингибиторов иммунных контрольных точек включают антитела (например, антитело анти-PD-L1), молекулы РНКi (например, анти-PD-L1 РНКi), антисмысловые молекулы (например, антисмысловую РНК анти-PD-L1), доминантно-негативные белки (например, доминантно-негативный белок PD-L1) и ингибиторы, представляющие собой малые молекулы. Антитела включают моноклональные антитела, гуманизированные антитела, деиммунизированные антитела и белки слияния Ig. Пример антитела анти-PD-L1 включает клон EH12. Примеры антител к PD-L1 включают: MPDL3280A Genentech (RG7446); антитело PD-L1 против мыши клон 10F.9G2 (Cat #BE0101) от BioXcell; моноклональное антитело анти-PD-L1 MDX-1105 (BMS-936559) и BMS-935559 от Bristol-Meyer's Squibb; MSB0010718C; анти-PD-L1 мыши клон 29E.2A3; и MEDI4736 AstraZeneca. В некоторых вариантах осуществления антитело анти-PD-L1 является антителом анти-PD-L1, раскрытым в любой из следующих патентных публикаций (включенных в настоящее описание посредством ссылок): WO2013079174; CN101104640; WO2010036959; WO2013056716; WO2007005874; WO2010089411; WO2010077634; WO2004004771; WO2006133396; WO201309906; US 20140294898; WO2013181634 или WO2012145493.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 является ингибитором нуклеиновой кислоты, экспрессирующей PD-L1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 раскрыт в одной из следующих патентных публикаций (включенных в настоящее описание ссылкой): WO2011127180 или WO2011000841. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 является рапамицином.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является ингибитором PD-L2. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является антителом к PD-L2. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является моноклональным антителом к PD-L2. В других или дополнительных вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является человеческим или гуманизированным антителом к PD-L2. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек уменьшает экспрессию или активность одного или более белков иммунных контрольных точек, таких как PD-L2. В других вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек уменьшает взаимодействие между PD-1 и PD-L2. Примеры ингибиторов иммунных контрольных точек включают антитела (например, антитело анти-PD-L2), молекулы РНКi (например, анти-PD-L2 РНКi), антисмысловые молекулы (например, антисмысловую РНК анти-PD-L2), доминантно-негативные белки (например, доминантно-негативный белок PD-L2) и ингибиторы, представляющие собой малые молекулы. Антитела включают моноклональные антитела, гуманизированные антитела, деиммунизированные антитела и белки слияния Ig.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L2 представляет собой AMP-224 GlaxoSmithKline (Amplimmune). В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L2 представляет собой rHIgM12B7.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является ингибитором PD-L1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является антителом к PD-1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является моноклональным антителом к PD-1. В других вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является человеческим или гуманизированным антителом к PD-1. Например, ингиби-

торы биологической активности PD-1 (или его лигандов), раскрытые в патентах США 7,02 9,67 4; 6,808,710; или заявках на патенты США: 20050250106 и 20050159351, могут использоваться в комбинациях по изобретению. Примеры антител к PD-1 включают: антитело PD-1 против мыши клон J43 (Cat #BE0033-2) от BioXcell; антитело PD-1 против мыши клон RMP1-14 (Cat #BE0146) от BioXcell; антитело анти-PD-1 мыши клон EH12; антитело PD-1 против мыши Merck (Keytruda®, пембролизумаб, ламбролизумаб, h409A1 1); и антитело AnaptysBio анти-PD-1, известное как ANB011; антитело MDX-1106 (ONO-4538); человеческое моноклональное антитело IgG4 Bristol-Myers Squibb ниволумаб (Opdivo®, BMS-936558, MDX1106); AMP 514 AstraZeneca и AMP 224 и Пидилизумаб (CT-011 или hBAT-1), CureTech Ltd.

Дополнительные примеры антител анти-PD-1 описаны Goldberg et al., Blood 1 10(1): 186-192 (2007), Thompson et al., Clin. Cancer Res. 13(6): 1757-1761 (2007), и Korman et al., Международная Заявка № PCT/JP2006/309606 (публикация WO 2006/121168 A1, каждый из которых явным образом включен в настоящее описание посредством ссылок. В некоторых вариантах осуществления антитело анти-PD-1 является антителом анти-PD-1, раскрытым в любой из следующих патентных публикаций (включенных в настоящее описание посредством ссылок): WO014557; WO2011110604; WO2008156712; US2012023752; WO2011110621; WO2004072286; WO2004056875; WO20100036959; WO2010029434; W0201213548; WO2002078731; WO2012145493; WO2010089411; WO2001014557; WO2013022091; WO2013019906; WO2003011911; US20140294898; и WO2010001617.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 является белком, связывающим PD-1, как раскрыто в WO200914335 (включенном в настоящее описание посредством ссылок).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 является ингибитором пептидомиметика PD-1, как раскрыто в WO2013132317 (включенном в настоящее описание посредством ссылок).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 является PD-1 mAb против мыши: клон J43, BioXCell (Уэст-Лебанон, N.H.).

В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 является белком PD-L1, белком PD-L2 или фрагментами, а также антителом MDX-1106 (ONO-4538), протестированным в клинических исследованиях в отношении лечения некоторых злокачественных образований (Brahmer et al., J Clin Oncol. 2010 28(19): 3167-75, Epub 2010 Jun. 1). Другие блокирующие антитела могут быть легко идентифицированы и получены специалистом на основе известной области взаимодействия между PD-1 и PD-L1/PD-L2, как обсуждено выше. Например, пептид, соответствующий области IgV PD-1 или PD-L1/PD-L2 (или части этой области), может использоваться в качестве антигена для получения блокирующих антител с помощью способов, известных в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является ингибитором IDO1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является малой молекулой против IDO1. Примеры малых молекул против IDO1 включают: INCB024360 Incyte, NSC 721782 (также известный как 1-метил-D-триптофан) и F001287 Bristol Meyers Squibb.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является ингибитором LAG3 (CD223). В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является антителом к LAG3. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является моноклональным антителом к LAG3. В других или дополнительных вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является человеческим или гуманизированным антителом к LAG3. В дополнительных вариантах осуществления антитело к LAG3 блокирует взаимодействие LAG3 с молекулами класса II главного комплекса гистосовместимости (MHC). Примеры антител к LAG3 включают: антитело анти-Lag-3 клон eBioC9B7W (C9B7W) от eBioscience; антитело анти-Lag3 LS-B2237 от LifeSpan Biosciences; IMP321 (ImmuFact) от Immutep; антитело анти-Lag3 BMS-986016; и химерное антитело LAG 3 A9H12. В некоторых вариантах осуществления анти-LAG3 антитело является анти-LAG3 антителом, раскрытым в любой из следующих патентных публикаций (включенных в настоящее описание посредством ссылок): WO2010019570; WO2008132601; или WO2004078928.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является антителом к TIM3 (также известному как HAVCR2). В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является моноклональным антителом к TIM3. В других или дополнительных вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является человеческим или гуманизированным антителом к TIM3. В дополнительных вариантах осуществления антитело к TIM3 блокирует взаимодействие TIM3 с галектином-9 (Gal9). В некоторых вариантах осуществления анти-TIM3 антитело является анти-TIM3 антителом, раскрытым в любой из следующих патентных публикаций (включенных в настоящее описание посредством ссылок): WO2013006490; WO201155607; WO2011159877; или WO200117057. В другом варианте осуществления ингибитор TIM3 является ингибитором TIM3, раскрытым в WO200905262 3.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является антителом к B7-H3. В одном варианте осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является MGA271.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является антителом к MR. В одном варианте осуществления ингибитором иммунных контрольных точек является Лирилумаб (IPH2101). В некоторых вариантах осуществления антитело к MR блокирует взаимодействие KIR с HLA.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является антителом к CD137 (также известному как 4-1BB или TNFRSF9). В одном варианте осуществления ингибитором иммунных контрольных точек является урелумаб (BMS-663513, Bristol-Myers Squibb), PF-05082566 (анти-4-1BB, PF-2566, Pfizer) или XmAb-5592 (Xencor). В одном варианте осуществления антитело анти-CD137 является антителом, раскрытым в заявке на патент США US2005/0095244; антителом, раскрытым в выданном патенте США № 7,288,638 (таким как 20H4.9-IgG4 [1007 или BMS-663513] или 20H4.9-IgG1 [BMS-663031]); антителом, раскрытым в выданном патенте США № 6,887,673 [4E9 или BMS-554271]; антителом, раскрытым в выданном патенте США № 7,214,493; антителом, раскрытым в выданном патенте США № 6,303,121; антителом, раскрытым в выданном патенте США № 6,569,997; антителом, раскрытым в выданном патенте США № 6,905,685; антителом, раскрытым в выданном патенте США № 6,355,476; антителом, раскрытым в выданном патенте США № 6,362,325 [1D8 или BMS-469492; 3H3 или BMS-469497; или 3E1]; антителом, раскрытым в выданном патенте США № 6,974,863 (таким как 53A2); или антителом, раскрытым в выданном патенте США № 6,210,669 (таким как 1D8, 3B8 или 3E1). В другом варианте осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является таким как раскрыто в WO 2014036412. В другом варианте осуществления антитело к CD137 блокирует взаимодействие CD137 с CD137L.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является антителом к PS. В одном варианте осуществления ингибитором иммунных контрольных точек является бавитуксимаб.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является антителом к CD52. В одном варианте осуществления ингибитором иммунных контрольных точек является алемтузумаб.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является антителом к CD30. В одном варианте осуществления ингибитором иммунных контрольных точек является брентуксимаб ведотин. В другом варианте осуществления антитело к CD30 блокирует взаимодействие CD30 с CD30L.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является антителом к CD33. В одном варианте осуществления ингибитором иммунных контрольных точек является гемтузумаб озогамицин.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является антителом к CD20. В одном варианте осуществления ингибитором иммунных контрольных точек является ибритумомаб тиуксетан. В другом варианте осуществления ингибитором иммунных контрольных точек является офатумумаб. В другом варианте осуществления ингибитором иммунных контрольных точек является ритуксимаб. В другом варианте осуществления ингибитором иммунных контрольных точек является тозитумомаб.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является антителом к CD27 (также известному как TNFRSF7). В одном варианте осуществления ингибитором иммунных контрольных точек является CDX-1127 (Celldex Therapeutics). В другом варианте осуществления антитело к CD27 блокирует взаимодействие CD27 с CD70.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является антителом к OX40 (также известному как TNFRSF4 или CD134). В одном варианте осуществления ингибитором иммунных контрольных точек является анти-OX40 IgG мыши. В другом варианте осуществления антитело к OX40 блокирует взаимодействие OX40 с OX40L.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является антителом к глюкокортикоид-индуцируемому рецептору фактора некроза опухоли (GITR). В одном варианте осуществления ингибитором иммунных контрольных точек является TRX518 (GITR, Inc.). В другом варианте осуществления антитело к GITR блокирует взаимодействие GITR с GITRL.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является антителом к индуцибельному Т-клеточному костимулятору (ICOS, также известному как CD278). В одном варианте осуществления ингибитором иммунных контрольных точек является MEDI570 (Medlmmune, LLC) или AMG557 (Amgen). В другом варианте осуществления антитело к ICOS блокирует взаимодействие ICOS с ICOSL и/или B7-H2.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек является ингибитором к BTLA (CD272), CD160, 2B4, LAIR1, TIGHT, LIGHT, DR3, CD226, CD2 или SLAM. Как описано здесь в другом месте, ингибитор иммунных контрольных точек может быть одним или более из числа связывающих белков, антител (или их фрагментов или вариантов), которые связываются с молекулами иммунных контрольных точек, нуклеиновыми кислотами, понижающими экспрессию молекул иммунных контрольных точек или любых других молекул, связывающихся с молекулами иммунных контроль-

ных точек (т.е. малые органические молекулы, пептидомиметики, аптамеры и т.д.). В некоторых случаях ингибитором BTLA (CD272) является HVEM. В некоторых случаях ингибитором CD160 является HVEM. В некоторых случаях ингибитором 2B4 является CD48. В некоторых случаях ингибитор LAIR1 является коллагеном. В некоторых случаях ингибитором TIGHT является CD112, CD113 или CD155. В некоторых случаях ингибитором CD28 является CD80 или CD86. В некоторых случаях ингибитором LIGHT является HVEM. В некоторых случаях ингибитором DR3 является TL1A. В некоторых случаях ингибитором CD226 является CD155 или CD112. В некоторых случаях ингибитором CD2 является CD48 или CD58. В некоторых случаях SLAM является самоингибирующим, и ингибитором SLAM является SLAM.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек ингибирует белок контрольной точки, который включает, но не ограничен ими, CTLA4 (антиген цитотоксического Т-лимфоцита 4, также известный как CD152), PD-L1 (лиганд 1 программируемой клеточной смерти 1, также известный как CD274), белок программируемой клеточной смерти PDL2 2), PD-1 (белок программируемой клеточной смерти 1, также известный как CD279), семейство лигандов B-7 (B7-H1, B7-H3, B7-H4) BTLA (аттенуатор B и Т-лимфоцитов, также известный как CD272), HVEM, TIM3 (Т-клеточный мембранный белок 3), GAL9, LAG 3 (ген активации лимфоцитов 3; CD223), VISTA, KIR (рецептор киллерного иммуноглобулина), 2B4 (также известный как CD244), CD160, CGEN-15049, CHK1 (киназа контрольной точки 1), CHK2 (киназа контрольной точки 2), A2aR (аденозиновый рецептор A2a), CD2, CD27, CD28, CD30, CD40, CD70, CD80, CD86, CD137, CD226, CD276, DR3, GITR, HAVCR2, HVEM, IDO1 (индоламин 2,3-диоксигеназа 1), IDO2 (индоламин 2,3-диоксигеназа 2), ICOS (индуцибельный Т-клеточный костимулятор), LAIR1, LIGHT (также известный как TNFSF14, член семейства TNF), MARCO (рецептор макрофага с коллагеновой структурой), OX40 (также известный как суперсемейство рецептора фактора некроза опухоли, член 4, TNFRSF4 и CD134) и его лиганд OX40L (CD252), SLAM, TIGHT, VTCN1 или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек взаимодействует с лигандом белка контрольной точки, включающим CTLA-4, PDL1, PDL2, PD1, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, A2aR, B-7 семейный лиганд, CD2, CD27, CD28, CD30, CD40, CD70, CD80, CD86, CD137, CD226, CD276, DR3, GITR, HAVCR2, HVEM, IDO1, IDO2, ICOS (индуцибельный Т-клеточный костимулятор), LAIR1, LIGHT, MAPKO (рецептор макрофага с коллагеновой структурой), OX40, SLAM, TIGHT, VTCN1 или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек ингибирует белок контрольной точки, включающий CTLA-4, PDL1, PD1 или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек ингибирует белок контрольной точки, включающий CTLA-4 и PD1 или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунных контрольных точек включает пембролизумаб (MK 3475), ниволумаб (BMS-936558), пидилизумаб (CT 011), AMP 224, MDX-1 105, дурвалумаб (MEDI4736), MPDL3280A, BMS-936559, IPH2101, TSR-042, TSR-022, ипилимумаб, лирилумаб, атезолизумаб, авелумаб, тремелимумаб или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления ингибитором иммунных контрольных точек является ниволумаб (BMS-936558), ипилимумаб, пембролизумаб, атезолизумаб, тремелимумаб, дурвалумаб, авелумаб или их комбинация.

В некоторых вариантах осуществления ингибитором иммунных контрольных точек является пембролизумаб.

Диагностические и профилактические составы.

Конъюгаты антитела NaPi2b, раскрытые здесь, используются в диагностических и профилактических составах. В одном варианте осуществления конъюгат антитела NaPi2b, раскрытый здесь, вводят пациентам, подвергающимся риску развития одного или более вышеупомянутых заболеваний, таких как, например, без ограничения, рак. Предрасположенность пациента или органа к одному или болуе вышеупомянутых показаний может быть определена с помощью генотипических, серологических или биохимических маркеров.

В другом варианте осуществления раскрытия конъюгат антитела NaPi2b, раскрытый здесь, вводят людям, у которых диагностировано клиническое показание, связанное с одним или более вышеупомянутых заболеваний, таких как, например, без ограничения, рак. После диагностики конъюгат антитела NaPi2b, раскрытый здесь, вводят, чтобы смягчить или обратить эффекты клинического показания, связанного с одним или более вышеупомянутых заболеваний.

В другом варианте осуществления раскрытия, способ идентификации пациента с раком яичника, поддающимся лечению конъюгатами, раскрытыми здесь, включает измерение статуса некоторых характеристик в образце опухоли, полученном от пациента, и идентификацию пациента для лечения на основе статуса некоторых характеристик в образце опухоли.

В другом варианте осуществления раскрытия, способ идентификации пациента с NSCLC, поддающимся лечению конъюгатами, раскрытыми здесь, включает измерение статуса некоторых характеристик в образце опухоли, полученном от пациента, и идентификацию пациента для лечения на основе статуса некоторых характеристик в образце опухоли.

Антитела, раскрытые здесь, также могут быть использованы в детекции NaPi2b в образцах пациента и соответственно могут быть использованы в качестве диагностических средств. Например, антитела NaPi2b, раскрытые здесь, используются в тестах in vitro, например, ELISA, для детекции уровней NaPi2b в образце пациента.

В одном варианте осуществления антитело NaPi2b, раскрытое здесь, иммобилизируют на твердой подложке (например, лунке(ах) планшета для микротитрования). Иммобилизованное антитело служит иммобилизованным антителом для любого NaPi2b, который может присутствовать в тестируемом образце. До контакта с иммобилизованным антителом с образцом пациента твердую подложку ополаскивают и обрабатывают блокирующим агентом, таким как молочный белок или альбумин, для предотвращения неспецифической адсорбции аналита.

Затем лунку обрабатывают тестируемым образцом, предположительно содержащим антиген, или раствором, содержащим стандартное количество антигена. Такой образец, например, образец сыворотки от пациента, у которого подозревается наличие уровней циркулирующего антигена, который считается диагностическим для патологии. После ополаскивания тестируемого образца или стандарта, твердую подложку обрабатывают поддающимся детекции образом меченным вторым антителом. Меченное второе антитело служит детектирующим антителом. Уровень поддающейся детекции метки измеряют, и концентрацию антигена NaPi2b в тестируемом образце определяют для сравнения со стандартной кривой, построенной на основе стандартных образцов.

Следует понимать, что на основе результатов, полученных с использованием антител NaPi2b, раскрытых здесь, в диагностическом тесте in vitro возможно определить стадию заболевания у пациента на основе уровней экспрессии антигена NaPi2b. Для данного заболевания образцы крови забирают от пациентов, у которых диагностированы различные стадии прогрессии заболевания, и/или которые находятся в различных пунктах терапевтического лечения заболевания. Используя популяцию образцов, обеспечивающих статистически значимые результаты для каждой стадии прогрессии или терапии, определяют ряд концентраций антигена, который можно считать характерным для каждой стадии.

Все публикации и патентные документы, процитированные здесь, включены в настоящее описание ссылкой, как если бы каждая такая публикация или документ были специфически и индивидуально обозначены как включенные в настоящее описание ссылкой. Цитата публикаций и патентных документов не предназначена как допуск, что любая или любой из них составляет релевантный уровень техники, и при этом это не составляет допуска относительно содержания или даты. Хотя настоящее раскрытие описано посредством письменного описания, специалисту понятно, что раскрытие может практиковаться во множестве вариантов осуществления и что предшествующее описание и примеры, приведенные ниже, представлены только в целях иллюстрации и не ограничивают следующую далее формулу изобретения.

Примеры

Следующие рабочие примеры иллюстрируют линкеры, молекулы лекарственного средства и PBRM и способы их получения. Они не предназначены для ограничения, и специалисту будет понятно, что могут быть использованы другие реагенты или способы.

Аббревиатуры.

Следующие аббревиатуры используются в следующих реакционных схемах и примерах синтеза. Этот список не является исчерпывающим перечнем аббревиатур, используемых в заявке, поскольку другие стандартные аббревиатуры, понятные специалисту в области органического синтеза, могут также использоваться в схемах синтеза и примерах.

AF-HPA - Ауристатин F-гидроксипропиламид,

FBS - эмбриональная бычья сыворотка,

MMAE - монометил ауристатин E,

NaPi2b - котранспортер фосфата натрия типа II,

NSCLC - немелкоклеточный рак легких.

Общая информация.

CDRs были идентифицированы согласно схеме нумерации Kabat.

Ингибирование роста опухоли (%TGI) было определено как процентная разница в средних объемах опухоли (MTVs) между группами, получающими лечение, и контрольными группами.

Эффективность лечения была определена от частоты и амплитуда регресса размера опухоли, наблюдаемого во время исследования. Лечение может вызывать частичный регресс (PR) или полный регресс (CR) опухоли у животного. В реакции PR объем опухоли составлял 50% или менее от ее объема в день 1 для трех периодических измерений в течение исследования и был равным или больше, чем 13,5 $мм^3$ для одного или более этих трех измерений. В реакции CR объем опухоли был меньше чем 13,5 $мм^3$ для трех периодических измерений в течение исследования. Животное с реакцией CR по завершении исследования было дополнительно классифицировано как выжившее без опухоли (TFS). Животных проверяли для реакций регресса.

AF-HPA получали способом, подобным описанному в патенте США 8,685,383, пример 48.

Антитело анти-NaPi2b (XMT-1535) получали с использованием SEQ ID NO: 38 и SEQ ID NO: 39 из патента США 8,603,474B2.

Антитело анти-NaPi2b (10H1.11.4B) получали с использованием SEQ ID NO: 80 и SEQ ID NO: 81 из патента США 8,535,675B2.

Очистку ВЭЖХ проводили на полупрепаративной колонке Phenomenex Gemini 5 мкм 110 Å, 250×10 мм, 5 мкм.

SEC осуществляли на колонке Tosoh Biosciences TSK gel G4000 (7,8 мм×30 см, 10 мкм) или Superose 12 (GE Healthcare).

WCX осуществляли на колонке ProPac WCX-10 (94 мм× 250 мм) (ThermoFisher).

Каждый раз, когда это было возможно, содержание лекарственного средства в конъюгатах было определено спектрофотометрическим способом, в противном случае LC/MS или ^{1}H-ЯМР проводили для количественного определения содержания лекарственного средства.

Содержание белка в конъюгате белок-полимер-лекарственное средство определяли спектрофотометрическим способом при 280 нм или с помощью ELISA.

Молекулярные массы полимерных конъюгатов (представленные в виде кажущихся средневесовых молекулярных масс или пиковых молекулярных масс) определяли с помощью SEC либо с полисахаридным, либо с белковым со стандартами молекулярной массы. Более конкретно, для конъюгатов полимера или полимера и лекарственного средства использовался полисахаридный стандарт молекулярных масс, и для конъюгатов белок-полимер-лекарственное средство используются белковые стандарты. Если специфически не обозначено, указанная молекулярная масса полимерного носителя является средневесовой молекулярной массой PHF; и для конъюгата полимер-лекарственное средство и конъюгата белок-полимер-лекарственное средство молекулярная масса представляет собой пиковую молекулярную массу. Конъюгаты NaPi2b-нацеленное антитело-полимер-лекарственное средство имеют пиковую молекулярную массу от приблизительно 170 кДа до приблизительно 250 кДа. Синтезированные/измеренные полимеры и полимерные конъюгаты, как правило, имеют полидисперсность ≤1,5.

Конъюгаты NaPi2b-нацеленное антитело-полимер-лекарственное средство отделяли от остатка не прореагировавших конъюгатов полимер-лекарственное средство (препаративная-WCX ВЭЖХ). Если необходимо, дополнительная очистка эксклюзионной хроматографией проводилась для удаления любых агрегированных конъюгатов NaPi2b-нацеленное антитело-полимер-лекарственное средство. В целом конъюгаты полимер-лекарственное средство-антитело NaPi2b, как правило, содержат <5% (вес./вес.) агрегированной фракции, как определено SEC; <0,5% (вес./вес, например, <0,1% вес./вес.) свободного (неконъюгированного) лекарственного средства, как определено RP ВЭЖХ или LC-MS/MS; <1% (вес./вес.) свободного конъюгата полимер-лекарственное средство, как определено RP ВЭЖХ и <2% (вес./вес, например, <1% вес./вес.) неконъюгированного NaPi2b, как определено HIC ВЭЖХ и/или WCX ВЭЖХ. Уменьшенные или частично уменьшенные антитела получали с помощью процедур, описанных в литературе, см., например, Francisco et al., Blood 102 (4): 1458-1465 (2003). Все концентрации лекарственного средства (конъюгированного и неконъюгированного) определяли LC-MS/MS.

Для определения фармакокинетики конъюгатов NaPi2b-нацеленное антитело-полимер-лекарственное средство были разработаны тесты для измерения плазменной концентрации конъюгата NaPi2b антитело-PHF-AF-HPA (т.е. конъюгата AF-HPA) и концентрации высвобожденного неконъюгированного AF-HPA и AF (свободные лекарственные средства). Для определения плазменной концентрации свободных лекарственных средств окисленный образец плазмы обрабатывали ацетонитрилом для осаждения белков плазмы крови, и конъюгат антитело-лекарственное средство и ацетонитрил-содержащий супернатант анализировали в отношении свободных лекарственных средств с помощью LC-MS/MS. Для определения концентрации конъюгата AF-HPA окисленный образец плазмы подвергали гидролизу в щелочной среде с последующим окислением и осаждением белка ацетонитрилом. Ацетонитрил-содержащий супернатант, содержащий высвобожденный AF-HPA и AF, анализировали с помощью LC-MS/MS. Стандартные кривые для свободных лекарственных средств и конъюгата AF-HPA в плазме были линейными по рядам концентраций 1-3000 нг/мл и 10-20000 нг/мл, соответственно. Общую концентрацию NaPi2b определяли с помощью ELISA.

Общие процедуры.

Общая процедура A. Конъюгация полимера с линкером или лекарственным средством.

В целом конъюгацию полимера (PHF-BA или PHF-GA) с аминсодержащим линкером, таким как, например, EG2-малеимид, или аминсодержащим линкером-лекарственным средством, таким как, например, AF-HPA-Ala, HPA-Ala, проводят в воде или смеси органический растворитель/вода 10-90% в присутствии активирующего вещества, такого как, например, EDC.HCl. Типичные органические растворители включают, но не ограничены ими, смешивающиеся с водой растворители, такие как, например, DMSO, DMF, DMA, NMP, пропиленгликоль и ACN. Для ускорения соединения добавляют коактиватор, такой как, например, NHS. Полимер сначала смешивают с аминосодержащим соединением с последующим добавлением коактиватора (NHS) и затем добавлением активатора (EDC.HCl). Реакцию проводят при 0-10°C, pH от 4,5 до 7,5 в течение от 1 ч до 24 ч при температуре среды. Полученный конъюгированный с полимером продукт очищают диафильтрацией или SEC. Продукт концентрируют до 2-50 мг/мл, pH доводят до значения от 4,5 до 6,5 для поддержания стабильности лекарственное средство-

полимерный линкер, и конъюгат хранят замороженным при температуре от -20 до -80°C до дальнейшего использования.

Конъюгация полимера с аминсодержащим линкером или лекарственным средством может быть проведена последовательно в любом порядке или одновременно.

Общая процедура B. Частичное селективное восстановление белка (антитело NaPi2b).

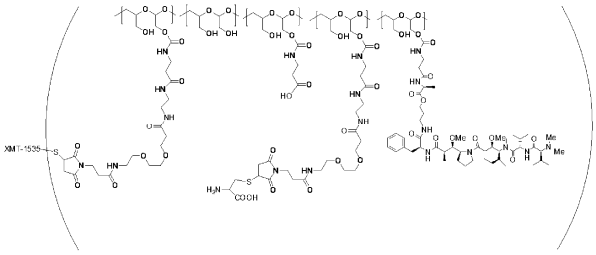
Частичное селективное восстановление дисульфидных групп внутри цепи или непарного дисульфида в соответствующем антителе NaPi2b до конъюгации с конъюгатом полимер-лекарственное средство достигается при помощи восстанавливающего агента, такого как, например, TCEP, DTT или β-меркаптоэтанол. Когда восстановление осуществляют с избытком восстанавливающего агента, восстанавливающий агент удаляют до конъюгации диафильтрацией или SEC. Степень превращения дисульфидных групп NaPi2b в реактционоспособные сульфгидрильные группы зависит от стехиометрии NaPi2b, восстанавливающего агента, pH, температуры и/или продолжительности реакции. Когда некоторые, но не все, дисульфидные группы в PBRM восстановлены, восстановленный PBRM является частично восстановленным NaPi2b.

Общая процедура C. Конъюгация частично восстановленного NaPi2b-нацеливаемого антитела с конъюгатом полимер-лекарственное средство.

Конъюгацию частично восстановленного NaPi2b-нацеливаемого антитела с конъюгатом полимер-лекарственное средство проводят в нейтральных или слабоосновных условиях (pH 6,5-8,5) при концентрациях антитела 1-10 мг/мл и концентрациях конъюгата полимер-лекарственное средство 0,5-10 мг/мл. Конъюгат полимер-лекарственное средство, как правило, используют в 1-5-кратном избытке относительно желаемой стехиометрии конъюгата белок-полимер-лекарственное средство. Когда антитело конъюгируется с малеимидогруппой конъюгата полимер-лекарственное средство, конъюгацию в случае необходимости завершают добавлением водорастворимого малеимидо-блокирующего соединения, такого как, например, N-ацетил цистеин, сложный метиловый эфир цистеина, N-метил цистеин, 2-меркаптоэтанол, 3-меркаптопропановая кислота, 2-меркаптоуксусная кислота, меркаптометанол (т.е. $HOCH_2SH$), бензил тиол и т.п.

Полученный конъюгат NaPi2b-нацеленное антитело-полимер-лекарственное средство, как правило, очищают диафильтрацией для удаления любого неконъюгированного конъюгата полимер-лекарственное средство, неконъюгированного лекарственного средства и примесей малых молекул. Альтернативно или дополнительно, подходящие хроматографические процедуры разделения, такие как, например, эксклюзионная хроматография, хроматография гидрофобного взаимодействия, такая как ионная хроматография, например, хроматография WCX; хроматография с обратной фазой, гидроксиапатитовая хроматография, афинная хроматография или их комбинация, могут использоваться для очистки конъюгата NaPi2b-нацеленное антитело-полимер-лекарственное средство. Полученный очищенный конъюгат NaPi2b-полимер-лекарственное средство, как правило, составляют в буфере при pH 5,0-6,5.

Пример 1. Синтез XMT-1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala)))



Конъюгаты XMT-1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))) были получены с использованием процедуры, описанной в публикации заявки на патент США US-2015-0104407-A1. В табл. I даны детали конъюгатов антитело-полимер-лекарственное средство.

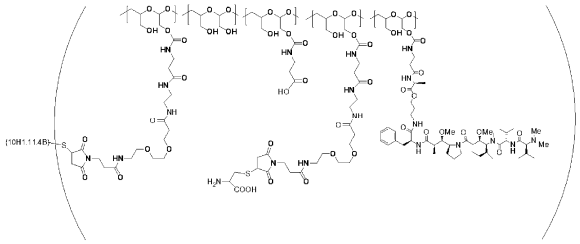
Таблица I

Пример No.	DAR (отношение лекарственное средство:антитело)
1A	От приблизительно 8:1 до приблизительно 12:1
1B	От приблизительно 10:1 до приблизительно 14:1
1C	От приблизительно 11:1 до приблизительно 15:1

Конъюгаты XMT-1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))) имеют пиковую молекулярную массу от приблизительно 180 кДа до приблизительно 250 кДа. Синтезированные/измеренные полимер и полимерные конъюгаты, как правило, имеют полидисперсность ≤1,5. Конъюгаты полимер-лекарственное средство (т.е. несущая лекарственное средство полимерная цепь, присоединенная к антителу), содержали от приблизительно 25 мол.% до приблизительно 35 мол.% бета-аланина, от приблизительно 7,0 мол.% до

приблизительно 10 мол.% AF-HPA-Ala и от приблизительно 1,5 мол.% до приблизительно 4 мол.% EG2-MI.

Пример 2. Синтез (10H1.11.4B)-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala)))



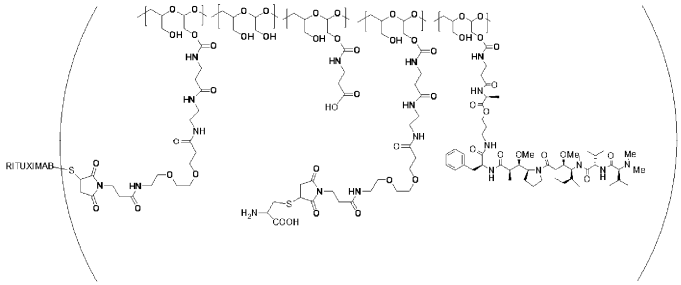
Конъюгаты (10:11.1.4B)-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))) (несвязывающий контроль) были получены с использованием процедуры, описанной в публикации заявки на патент США US-2015-0104407-A1. В табл. II даны детали конъюгатов антитело-полимер-лекарственное средство.

Таблица II

Пример No.	DAR (отношение лекарственное средство:антитело)
2A	От приблизительно 10:1 до приблизительно 14:1
2B	От приблизительно 14:1 до приблизительно 19:1
2C	От приблизительно 9:1 до приблизительно 13:1

Конъюгаты (10H1.11.4B)-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))) имели пиковую молекулярную массу от приблизительно 170 кДа до приблизительно 230 кДа. Синтезированные/измеренные полимер и полимерные конъюгаты, как правило, имеют полидисперсность ≤1,5. Конъюгаты полимер-лекарственное средство (т.е. несущая лекарственное средство полимерная цепь, присоединенная к антителу), содержали от приблизительно 25 мол.% до приблизительно 35 мол.% бета-аланина, от приблизительно 7 мол.% до приблизительно 10 мол.% AF-HPA-Ala и от приблизительно 1,5 мол.% до приблизительно 4 мол.% EG2-MI.

Пример 3. Синтез ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala)))



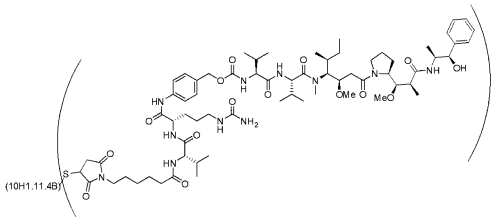
Конъюгаты ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))) (несвязывающий контроль) были получены с использованием процедуры, описанной в публикации заявки на патент США US-2015-0104407-A1. В табл. III даны детали конъюгатов антитело-полимер-лекарственное средство.

Таблица III

Пример No.	DAR (отношение лекарственное средство:антитело)
3A	От приблизительно 15:1 до приблизительно 21:1
3B	От приблизительно 14:1 до приблизительно 19:1

Конъюгаты ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))) имели пиковую молекулярную массу от приблизительно 17 0 кДа до приблизительно 230 кДа. Синтезированные/измеренные полимер и полимерные конъюгаты, как правило, имеют полидисперсность ≤1,5. Конъюгаты полимер-лекарственное средство (т.е. несущая лекарственное средство полимерная цепь, присоединенная к антителу), содержали от приблизительно 25 мол.% до приблизительно 35 мол.% бета-аланину, от приблизительно 7 мол.% до приблизительно 10 мол.% AF-HPA-Ala и от приблизительно 1,5% до приблизительно 4 мол.% EG2-MI.

Пример 4. Синтез (10H1.11.4B)-(MC-VC-PABA-MMAE)



Конъюгаты (10H1.11.4B)-(малеимид-VC-PABA-MMAE) были получены с использованием процедуры, описанной в Doronina et al., Nature biotechnology, 21: 778-784 (2003). В табл. IV даны детали конъюгатов антитело-лекарственное средство.

Таблица IV

Пример No.	DAR (отношение лекарственное средство:антитело)
4A	4:1
4B	3:1

Пример 5. Тестирование конъюгатов NaPi2b-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))) в отношении цитотоксичности.

Пример 1A, XMT-1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))); пример 2C, (10H1.11.4B)-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))); пример 3A, Ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))) и AF-HPA или пример 1C, XMT-1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))); пример 2C, (10H1.11.4B)-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))); пример 3B, ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))); и AF-HPA оценивали на их антипролиферативные свойства на опухолевых клеточных линиях in vitro с использованием Cell Titer-Glo (Promega Corp). OVCAR3 (клеточная линия аденокарциномы яичника, не амплифицированная, ATCC, Cat. # HTB-161) культивировали в среде RPMI с 20%-ным FBS. TOV-21G (человеческая клеточная линия аденокарциномы яичника, не амплифицированная, ATCC, Cat.# CRL-11730) культивировали в 1:1 смеси среды MCDB 105, содержащей конечную концентрацию 1,5 г/л бикарбоната натрия, и среды 199, содержащей конечную концентрацию 2,2 г/л бикарбоната натрия с 15%-ным FBS. IGROV1 (клеточная линия аденокарциномы яичника, не амплифицированная) культивировали в среде RPMI с 10%-ным FBS. HCC-4006 (человеческая клеточная линия рака легкого, не амплифицированная, ATCC, Cat. # ATCC® CRL-2871™) культивировали в среде RPMI с 10%-ным FBS.

Для теста на цитотоксичность клетки высевали в плотности 5000 клеток за лунку в 96-луночные планшеты и оставляли для присоединения во время ночной инкубации при 37°C в присутствии 5% CO_2. Затем среды заменяли новыми средами, содержащими ряд конъюгатов примеров 1A, 2C, 3A или AF-HPA (от 100 нМ до 0,1 пМ) или примеров 1C, 2C, 3B или AF-HPA (от 100 нМ до 0,1 пМ), и клетки инкубировали в течение 72 ч или 6 дней при 37°C в присутствии 5% CO_2. Выживание клеток измеряли с помощью CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Мадисон, Висконсин), как описано в инструкциях к набору. Жизнеспособность клеток нормализовывали к необработанной контрольной группе и выражали в процентах. Значения выстраивали, и значения IC_{50} вычисляли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (Сан-Диего, Калифорния) с использованием подходящего алгоритма кривой доза-эффект с 4 параметрами, изменяемым наклоном. В табл. VA и VB даны иллюстративные результаты для цитотоксичности конъюгатов и AF-HPA.

Таблица VA

Опухолевая клеточная линия	Число рецепторов NaPi2b/клетка	Пример 1A (нМ)	Пример 2C (нМ)	Пример 3A (нМ)	AF-HPA[1] (нМ)
OVCAR-3	~32000	0,002	0,014	0,26	4,18
IGROV1	~35000	~5,0	10,62	53,04	28,61
TOV-21G	~10000	0,04	2,03	2,76	2,07
HCC-4006	~52000	0,13	2,96	1,83	0,68

Таблица VB

Опухолевая клеточная линия	Число рецепторов NaPi2b/клетка	Пример 1C (нМ)	Пример 2C (нМ)	Пример 3B (нМ)	AF-HPA[1] (нМ)
OVCAR-3	~32000	0,01	0,11	1,13	1,34
IGROV1	~35000	0,38	2,73	37,3	25,94
TOV-21G	~10000	6,68	41,54	39,68	12,70
HCC-4006	~52000	0,35	3,17	5,29	7,83

1=Эквивалент полезной нагрузки.

Как показано в табл. VA и VB, конъюгаты антитело-полимер-лекарственное средство XMT-1535

являются более мощными, чем конъюгаты антитело-полимер-лекарственное средство (10H1.11.4B) или конъюгаты антитело-полимер-лекарственное средство с Ритуксимабом во всех протестированных клеточных линиях.

Пример 6. Ответ роста опухоли на введение конъюгатов NaPi2b-нацеленное антитело-полимер-лекарственное средство.

Самкам мышей CB-17 SCID подкожно имплантировали фрагменты OVCAR-3 (n=10 для каждой группы) или немелкоклеточного рака легкого (n=10 для каждой группы). Тестируемые соединения или носитель вводили в/в в виде единственной дозы в день 1 или как обозначено. Размер опухоли измеряли в моменты времени, указанные на фиг. 1-3, используя цифровые штангенциркули. Объем опухоли вычисляли и использовали для определения задержки роста опухоли. Мышей умерщвляли, когда опухоли достигли размера 1000 мм^3. Объемы опухоли представлены как средние ±SEM для каждой группы.

На фиг. 1 представлены результаты для канцерогенного эффекта у мышей, которым подкожно имплантировали фрагменты опухоли OVCAR-3 (n=10 для каждой группы) после в/в введения носителя; XMT-1535; пример 3A, ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))); пример 4A ((10H1.11.4B) - (MC-VC-PABA-MMAE)); пример 2C (10H1.11.4B)-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))) или пример 1B, XMT 1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))), каждого в количестве 3 мг/кг (эквивалент дозы 0,21 мг/кг полезной нагрузки ауристатин) в виде единственной дозы в день 1. Носитель, XMT-1535; конъюгаты примера 3A и пример 4A все показали увеличение объема опухоли, ни одно из лечений не показало хотя бы частичного регресса. Конъюгаты примера 2C и примера 1B, каждый, показали уменьшение объема опухоли. Конъюгат примера 2C имел единственный ответ в виде частичного регресса, в то время как конъюгат примера 1B имел 70%-ные регрессы, состоящие из 4 частичных регрессов и 3 полных регрессов. Медиана времени до результата (TTE) составляла 57 дней, соответствуя 118%-ный задержке роста опухоли (TGD) (30,9 дня). В День 23 результаты в виде ингибирования роста опухоли (TGI) составили 95%. Это статистически отличалось от контроля ($P<0,001$, анализ Манна-Уитни) и было выше 60% потенциального порога терапиевтической активности.

На фиг. 2 представлены результаты для канцерогенного эффекта у мышей, которым подкожно имплантировали фрагменты опухоли OVCAR-3 (n=10 для каждой группы) после в/в введения носителя; пример 3B, ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))) в дозе 3 мг/кг, вводимый еженедельно в течение 3 недель; пример 4B ((10H1.11.4B)-(MC-VC-PABA-MMAE)) в дозе 3 мг/кг, вводимый еженедельно в течение 3 недель; пример 1C, XMT 1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))) в дозе 3 мг/кг в виде единственной дозы в день 1 или в дозе 3 мг/кг, вводимой еженедельно в течение 3 недель; или пример 1C, XMT 1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))) в дозе 5 мг/кг (эквивалент дозы 0,36 мг/кг полезной нагрузки ауристатин) в виде единственной дозы в день 1. Носитель и конъюгаты примера 3B и примера 4B все показали увеличение объема опухоли, ни одно из лечений не показало хотя бы частичного регресса. Для конъюгата примера 4B ингибирование роста опухоли (TGI) в день 22 отличалось статистически от контроля ($P<0,001$, анализ Манна-Уитни) и составляло 63% - немного выше 60%-ного потенциального порога терапевтической активности. Конъюгат примера 1B был самым активным в этом исследовании во всех дозах лечения, производя к регрессу на 80-100%. Для этого конъюгата в день 22 результат TGI отличался статистически от контроля ($P<0,001$, анализ Манна-Уитни) и составлял 96-97%.

На фиг. 3 представлены результаты для канцерогенного эффекта на модели полученного от пациента ксенотрансплантата (CTG-0860) мутанта немелкоклеточного рака легких KRAS (n=10 для каждой группы) после в/в введения носителя; пример 3B, ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))); пример 4B ((10H1.11.4B)-(MC-VC-PABA-MMAE)); или пример 1C, XMT 1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))), каждый в дозе 3 мг/кг, вводимой еженедельно в течение 3 недель. Носитель; конъюгаты примера 3B и примера 4B, каждый, показали увеличение объема опухоли. Сравнение в день 17 объемов опухоли показало, что объем опухоли примера 1C был значительно ниже, чем в контрольной группе с носителем ($p\leq0,05$). Анализ данных со дня 0 ко дню 17 показал, что группа примера 1C в дозе 3 мг/кг имела значительно более низкий объем опухоли по сравнению с контрольной группой носителя ($p\leq0,01$). Было 2 PRs в группе примера 1C в дозе 3 мг/кг. Не было смертельных случаев ни в одной из групп во время исследования.

На фиг. 4 приведены результаты для канцерогенного эффекта на модели полученного от пациента ксенотрансплантата (CTG-0852) немелкоклеточного рака легких (n=8 для каждой группы) после в/в введения носителя; пример 3B, ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))); пример 4B ((10H1.11.4B) - (MC-VC-PABA-MMAE)); пример 1C, XMT 1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))), каждый в дозе 3 мг/кг, вводимой еженедельно в течение 3 недель, или пример 1C, XMT 1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))), в дозе 5 мг/кг в виде единственной дозы в день 1. Анализ данных со дня 0 ко дню 62 показал, что у всех групп был значительно более низкий объем опухоли по сравнению с контрольной группой носителя ($p\leq0,01$ или $p\leq0,0001$). Было 3 PRs в группе примера 4B в дозе 3 мг/кг. Было 7 PRs в группе примера 1C в дозе 5 мг/кг и 5 PRs, 1 CR и 2 TFS в группе примера 1C в дозе 3 мг/кг. Никаких PRs, CRs или TFS в группе примера 3B в дозе 3 мг/кг. Не было смертельных случа-

ев ни в одной из групп во время исследования.

На фиг. 5 приведены результаты для канцерогенного эффекта на модели полученного от пациента ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легких (ST1906, мутация BRAF K601E) (n=6 для каждой группы) после в/в введения носителя; и пример 1C, XMT 1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))), в дозе 3 мг/кг или 6 мг/кг, вводимой еженедельно в течение 3 недель. Носитель показал увеличение объема опухоли, в то время как конъюгат примера 1C показал сильную протовоопухолевую активность. Шесть из шести показали TFS в день 60 после лечения конъюгатом примера 1C.

На фиг. 7 приведены результаты для канцерогенного эффекта на модели полученного от пациента ксенотрансплантата (CTG-0178) немелкоклеточного рака легких (n=8 для каждой группы) после в/в введения носителя; пример 3B, ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))); пример 4B ((10H1.11.4B)-(MC-VC-PABA-MMAE)); или пример 1C, XMT 1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))), каждый в дозе 3 мг/кг, вводимой еженедельно в течение 3 недель, или пример 1C, XMT 1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))) в дозе 5 мг/кг в виде единственной дозы. Носитель; конъюгаты примера 3B и примера 4B, каждый, показали увеличение объема опухоли. Конъюгат примера 1C при 5 мг/кг и 3 мг/кг значительно более низкий рост опухоли по сравнению с контрольной группой носителя ($p \leq 0,05$). Не было смертельных случаев ни в одной из групп во время исследования.

На фиг. 8 приведены результаты для канцерогенного эффекта на модели полученного от пациента ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легких (ST1437, EGFR дикий тип, Alk мутация дикого типа) (n=6 для каждой группы) после в/в введения носителя; и пример 1C, XMT 1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))), в дозе 3 мг/кг или 6 мг/кг, вводимой еженедельно в течение 3 недель. Носитель показал увеличение объема опухоли, в то время как конъюгат примера 1C показал противоопухолевую активность. Один из шести показал TFS в день 60 после лечения конъюгатом примера 1C.

На фиг. 9 приведены результаты для канцерогенного эффекта на модели полученного от пациента ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легких (ST742, транслокация EMLK-Alk) (n=6 для каждой группы) после в/в введения носителя; и пример 1C, XMT 1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))) в дозе 3 мг/кг или 6 мг/кг, вводимой еженедельно в течение 3 недель. Носитель показал увеличение объема опухоли, в то время как конъюгат примера 1C показал противоопухолевую активность. Пять из шести показали TFS в день 60 после лечения конъюгатом примера 1C.

На фиг. 10 приведены результаты для канцерогенного эффекта на модели полученного от пациента ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легких (ST1243, амплификация EGFR, амплификация KIT, делеция CDKN2A) (n=6 для каждой группы) после в/в введения носителя; и пример 1C, XMT 1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))) в дозе 3 мг/кг или 6 мг/кг, вводимой еженедельно в течение 3 недель. Носитель показал увеличение объема опухоли, в то время как конъюгат примера 1C показал противоопухолевую активность.

Пример 7. Аффинность связывания с клетками конъюгатов XMT-1535 и NaPi2b-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))) с использованием проточной цитометрии.

Связывание поверхности клеток примера 1C, XMT 1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))) и анти-NaPi2B антитела XMT 1535 с экспрессирующими антиген клетками оценивали проточной цитометрией. Клетки TOV-21G или OVCAR3 выращивали в течение ночи до приблизительно 90% слияния культур в средах, затем высвобождали с поверхности планшета обработкой Трипсином-EDTA (Gibco-Thermo-Fisher-Scientific, США). Отдельные клетки промывали один раз ледяными средами, содержащими 6%-ную козью сыворотку и повторно суспендировали в тех же средах. Аликвоты по 50000 клеток вносили в лунки 96-луночного планшета V-образным дном и инкубировали с рядом концентраций тестируемых соединений (0,23-500 нм) в 100 мкл среды (1:1 смесь MCDB105 (1,5 г/л бикарбоната натрия) и среды 199 (2,2 г/л бикарбоната натрия плюс 15%-ный FBS)) с 6%-ный козьей сывороткой на льду в течение 3 ч. Клетки затем промывали один раз ледяным PBS и повторно суспендировали в 150 мкл среды с 2%-ный козьей сывороткой и 6 мкг/мл вторичного флуоресцентно меченного антитела, Alexa Fluor® 647, меченного IgG козы к человеку (Life Technologies, Cat# A-21445) в течение 1 ч на льду. Клетки промывали один раз ледяным PBS и суспендировали в 150 мкл ледяного PBS с 1%-ным параформальдегидом. Количество флуоресценции, связавшейся на клетку, определяли, разгоняя 5000 клеток для каждого лечения на проточном цитометре MACSQuant (Miltenyi Biotec, Бергиш-Гладбах, Германия). Среднее значение флуоресценции для каждого лечения изображали в виде графика, и константу связывания, K_d, вычисляли для каждого тестируемого соединения программным обеспечением GraphPad Prism с нелинейной регрессией, используя односайтовую модель специфического связывания.

Таблица VI

Тестируемое соединение	K_D (нМ) TOV-21G	K_D (нМ) OVCAR3
XMT 1535	2,46	6,59
Пример 1C	3,97	3,84

Как показано в табл. VI, голое антитело XMT-1535 и конъюгат XMT-1535-антитело-полимер-лекарственное средство имеют подобные аффинности связывания для тестируемой клеточной линии.

Пример 8. Токсикологическое и фармакокинетическое исследование на приматах.

Исследование токсичности единственной дозы проводили у обезьян cynomolgus с примером 1C, XMT-1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))). Конъюгат вводили группам из 2 животных/пол в дозах 0 мг/кг (группа 1), 1,25 мг/кг (1074 мкг/м^2 эквивалент полезной нагрузки ауристатина; группа 2), 2,5 мг/кг (2147 мкг/м^2 эквивалент полезной нагрузки ауристатина; группа 3) или 5 мг/кг (или 4294 мкг/м^2 эквивалент полезной нагрузки ауристатина; Группа 4) как единственное в/в вливание. Кровь собирали для анализа гематологии, коагуляции и химии сыворотки от всех групп в дни -7, 3, 8, 15 и 22. Образцы крови также собирали перед введением дозы, через 10 мин, 1, 6, 24, 48, 72, 96 и 168 ч после окончания в/в вливаний, и в дни 15 и 22 для определения фармакокинетики.

Конъюгат примера 1C хорошо переносился у обезьян cynomolgus при введении в дозе до 5 мг/кг (т.е. 4294 мкг/м^2 эквивалент полезной нагрузки ауристатина), без наблюдаемой мишень-опосредованной токсичности и ограниченными неблагоприятными эффектами. Не было никакого признака токсичности в отношении костного мозга. Не наблюдалось морбидности в группах 2, 3 и 4. Результаты исследования показаны в табл. VII, ниже.

Таблица VII

	Конечное вскрытие			Вскрытие после выздоровления		
Орган	1,25 мг/кг	2,5 мг/кг	5 мг/кг	1,25 мг/кг	2,5 мг/кг	5 мг/кг
Костный мозг	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Печень*	Отсутствует	Отсутствует	Минимальный апоптоз гепатоцитов (1 самка)	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Семенники	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Легкое	Отсутствует	Отсутствует	Минимальная смешанная инфильтрация воспалительных клеток (1 самец)	Отсутствует	Отсутствует	Минимальная смешанная инфильтрация воспалительных клеток (1 самец)
Мочевой пузырь	Отсутствует	Отсутствует	Минимальный апопотоз в слизистой; случайные митотические фигуры (1 самце)	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Желудок	Минимальная инфильтрация нейтрофилов в слизистую (1 самка)	Отсутствует	Мягкое очаговое изъязвление (1 самец)	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Слепая кишка	Отсутствует	Мягкое очаговое изъязвление (1 самка)	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует

* Минимальная гипертрофия клеток Купфера со случайными митотическими фигурами была замечена у всех животных, получавших тестируемое соединение, при конечном вскрытии и вскрытии после выздоровления (отсутствие обнаруженных побочных эффектов).

Одно животное во всех группах подверглось неблагоприятным изменениям, затрагивающим желудочно-кишечный тракт, что показало конечное вскрытие. У выздоровевших животных были обнаружены связанные с тестируемым соединением признаки (один в каждой ткани) в печени (группы 2-4), селезенке (группы 3 и 4) и легком (группа 4), но ни один из них не считался неблагоприятным. Было временное увеличение количества нейтрофилов и моноцитоз в сочетании с увеличенными концентрациями глобулина, уменьшенными уровнями альбумина и уменьшенным отношением альбумина к глобулину. Кроме того, наблюдались увеличенные уровни креатинкиназы (CK) и аспартатаминотрансферазы (AST). Ни одна из обнаруженных альтераций не сохранилась в течение периода восстановления. Не было миелосуппрессии и нейтропении. Кроме того, не было никаких существенных нарушений при вскрытии и не было потери массы тела. На основе эффективности и этого токсикологического исследования на приматах терапевтический индекс для конъюгата Примера 1C, XMT-1535-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))), составлял приблизительно 6.

Образцы крови анализировали LC-MS/MS для определения концентрации общего AF-HPA и ELISA для определения общей концентрации антитела в каждый момент времени. Фиг. 6A и 6B показывают плазменную фармакокинетику для общего количества антитела и общего количества лекарственного

средства, соответственно, у обезьян cynomolgus после введения единственной дозы конъюгата примера 1C в количестве 1,25 мг/кг (1074 мкг/м^2 эквивалент полезной нагрузки ауристатина; группа 2), 2,5 мг/кг (2147 мкг/м^2 эквивалент полезной нагрузки ауристатина; группа 3) или 5 мг/кг (или 4294 мкг/м^2 эквивалент полезной нагрузки ауристатина; группа 4). Табл. VIII дает рассчитанную $AUC_{0-504\ ч}$ и полужизни для общего антитела и общего AF-HPA. Свободные лекарственные средства (т.е. неконъюгированный AF и неконъюгированный AF-HPA) не были обнаружены (LLOQ способа MS/MS LC составлял 1 нг/мл).

Таблица VIII

Экспонирование в палзме $AUC_{0-504\ ч}$ Нормализованная доза (мкг•ч/мл/мг/кг)		Период полужизни в плазме $T_{1/2}$, Средний диапазон доз (Дни)		
Общее антитело	Общее лекарственное средство	Общее антитело	Общее лекарственное средство	Высвобождение лекарственного средства
1407±99	157±13	8,8±0,7	5,2±0,2	11,6±0,9

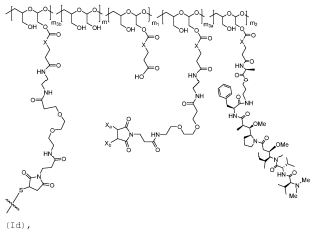
Конъюгат XMT-1535-полимер-лекарственное средство имел период полужизни ~9 дней с $AUC_{0-504\ ч}$ ~1,4 мг·ч/мл/мг/кг. Общий AF-HPA имел период полужизни ~5 дней с $AUC_{0-504\ ч}$ ~157 мкг·ч/мл/мг/кг. Конъюгат демонстрировал хорошую стабильность в плазме с минимальной детекцией или отсутствием свободных лекарственных средств.

Другие варианты осуществления.

Хотя изобретение было описано в сочетании с подробным описанием, предшествующее описание предназначено для иллюстрации, но не для ограничения объема изобретения, определяемого объемом приложенной формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации находятся в рамках следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат для облегчения симптома рака у пациента, включающий выделенное антитело, специфически связывающееся с внеклеточной областью SLC34A2, и один или более полимерных остовов, связанных с выделенным антителом, в котором каждый один или более полимерных остовов независимо имеет формулу (Id)



(Id),

в которой остов включает поли-(1-гидроксиметилэтиленгидроксиметил-формаль) (PHF), имеющий молекулярную массу в пределах от 2 до 40 кДа;

m является целым числом от 1 до 300;

m_1 является целым числом от 1 до 140;

m_2 является целым числом от 1 до 40;

m_{3a} является целым числом от 0 до 17;

m_{3b} является целым числом от 1 до 8;

сумма m, m_1, m_2, m_{3a} и m_{3b} варьирует от 15 до 300 и

соотношение между PHF и выделенным антителом составляет 10 или меньше;

концевая $-S-$ обозначает прямое присоединение одного или более полимерных остовов к выделенному антителу;

один из X_a и X_b представляет собой H, а другой представляет собой водорастворимую защитную группу для малеимидогруппы, или X_a и X_b, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют двойную связь углерод-углерод;

X представляет собой CH_2, O или NH и

в котором выделенное антитело, специфически связывающееся с внеклеточной областью SLC34A2, включает вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 1 (CDRH1), включающий аминокислотную последовательность GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 5), вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 2 (CDRH2), включающий аминокислотную последовательность AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 6), вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 3 (CDRH3), включающий аминокислотную последовательность GETARATFAY (SEQ ID NO: 7), вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 1 (CDRL1), включающий аминокислотную последовательность SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 8), вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 2

(CDRL2), включающий аминокислотную последовательность YTSSLYS (SEQ ID NO: 9), вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 3 (CDRL3), включающий аминокислотную последовательность QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 10).

2. Конъюгат по п.1, в котором выделенное антитело, специфически связывающееся с внеклеточной областью SLC34A2, включает вариабельную последовательность тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и вариабельную последовательность легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

3. Конъюгат по любому из пп.1 и 2, в котором выделенное антитело, специфически связывающееся с внеклеточной областью SLC34A2, включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

4. Конъюгат по любому из пп.1-3, в котором выделенное антитело, специфически связывающееся с внеклеточной областью SLC34A2, является моноклональным антителом.

5. Конъюгат по любому из пп.1-4, в котором выделенное антитело, специфически связывающееся с внеклеточной областью SLC34A2, является кроличьим, мышиным, химерным, гуманизированным или полностью человеческим моноклональным антителом.

6. Конъюгат по любому из пп.1-5, в котором выделенное антитело, специфически связывающееся с внеклеточной областью SLC34A2, представляет собой изотип IgG.

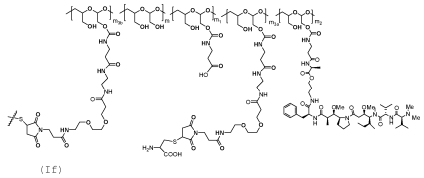
7. Конъюгат по любому из пп.1-6, в котором выделенное антитело, специфически связывающееся с внеклеточной областью SLC34A2, представляет собой изотип IgG1.

8. Конъюгат по любому из пп.1-7, в котором сумма m, m_1, m_2, m_{3a} и m_{3b} составляет от 15 до 150, m_1 является целым числом от 1 до 70, m_2 является целым числом от 1 до 20, m_{3a} является целым числом от 0 до 9, m_{3b} является целым числом от 1 до 8, PHF имеет молекулярную массу в пределах от 2 до 20 кДа, и соотношение между PHF и выделенным антителом представляет собой целое число от 2 до 8.

9. Конъюгат по любому из пп.1-8, в котором сумма m, m_1, m_2, m_{3a} и m_{3b} составляет от 20 до 110, m_1 является целым числом от 2 до 50, m_2 является целым числом от 2 до 15, m_{3a} является целым числом от 0 до 7, m_{3b} является целым числом от 1 до 8, PHF имеет молекулярную массу в пределах от 3 до 15 кДа, и соотношение между PHF и выделенным антителом представляет собой целое число от 2 до 6.

10. Конъюгат по любому из пп.1-9, в котором сумма m, m_1, m_2, m_3 и m_4 составляет от 40 до 75, m_1 является целым числом от 2 до 35, m_2 является целым числом от 2 до 10, m_{3a} является целым числом от 0 до 4, m_{3b} является целым числом от 1 до 5, PHF имеет молекулярную массу в пределах от 5 до 10 кДа, и соотношение между PHF и выделенным антителом представляет собой целое число от 2 до 4.

11. Конъюгат по п.1, в котором каждый один или более полимерных остовов независимо имеет формулу (If)



(If)

в которой m является целым числом от 1 до 300;

m_1 является целым числом от 1 до 140;

m_2 является целым числом от 1 до 40;

m_{3a} является целым числом от 0 до 17,

m_{3b} является целым числом от 1 до 8;

сумма m_{3a} и m_{3b} варьирует от 1 до 18 и

сумма m, m_1, m_2, m_{3a} и m_{3b} варьирует от 15 до 300;

концевой обозначает присоединение одного или более полимерных остовов к выделенному антителу, специфически связывающемуся с SLC34A2, причем выделенное антитело, специфически связывающееся с SLC34A2, является выделенным антителом, включающим вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 1 (CDRL1), включающий аминокислотную последовательность SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 8); вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 2 (CDRL2), включающий аминокислотную последовательность YTSSLYS (SEQ ID NO: 9); вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 3 (CDRL3), включающий аминокислотную последовательность QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 10); вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 1 (CDRH1), включающий аминокислотную последовательность GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 5); вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 2 (CDRH2), включающий аминокислотную последовательность AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 6); и вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 3 (CDRH3), включающий аминокислотную последовательность GETARATFAY (SEQ ID NO: 7); и

отношение между PHF и антителом равно 10 или меньше.

12. Конъюгат по п.11, в котором PHF в формуле (If) имеет молекулярную массу в пределах от 2 до 20 кДа, сумма m, m_1, m_2, m_{3a} и m_{3b} составляет от 15 до 150, m_1 является целым числом от 1 до 70, m_2 является целым числом от 1 до 20, m_{3a} является целым числом от 0 до 9, m_{3b} является целым числом от 1 до 8, сумма m_{3a} и m_{3b} составляет от 1 до 10, и отношение между PHF и выделенным антителом, специфически связывающимся с SLC34A2, является целым числом от 2 до 8.

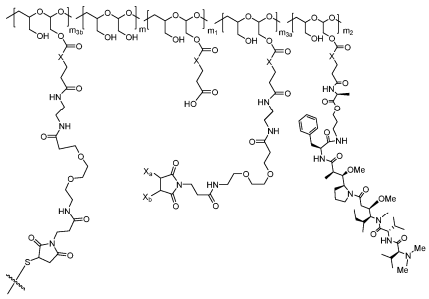
13. Конъюгат по п.11 или 12, в котором PHF в формуле (If) имеет молекулярную массу в пределах от 3 до 15 кДа, сумма m, m_1, m_2, m_{3a} и m_{3b} составляет от 20 до 110, m_1 является целым числом от 2 до 50, m_2 является целым числом от 2 до 15, m_{3a} является целым числом от 0 до 7, m_{3b} является целым числом от 1 до 8, сумма m_{3a} и m_{3b} составляет от 1 до 8, и отношение между PHF и выделенным антителом, специфически связывающимся с SLC34A2, является целым числом от 2 до 8.

14. Конъюгат по любому из пп.11-13, в котором PHF в формуле (If) имеет молекулярную массу в пределах от 5 до 10 кДа, сумма m, m_1, m_2, m_{3a} и m_{3b} составляет от 40 до 75, m_1 является целым числом от 2 до 35, m_2 является целым числом от 2 до 10, m_{3a} является целым числом от 0 до 4, m_{3b} является целым числом от 1 до 5, сумма m_{3a} и m_{3b} составляет от 1 до 5, и отношение между PHF и выделенным анти-антителом, специфически связывающимся с SLC34A2, является целым числом от 2 до 8.

15. Конъюгат по любому из пп.11-14, в котором PHF в формуле (If) имеет молекулярную массу в пределах от 5 до 10 кДа, сумма m, m_1, m_2, m_{3a} и m_{3b} составляет от 40 до 75, m_1 является целым числом от 2 до 35, m_2 является целым числом от 2 до 10, m_{3a} является целым числом от 0 до 4, m_{3b} является целым числом от 1 до 5, сумма m_{3a} и m_{3b} составляет от 1 до 5, и отношение между PHF и выделенным антителом, специфически связывающимся с SLC34A2, является целым числом от 2 до 6.

16. Фармацевтическая композиция, включающая конъюгат по любому из пп.1-15 и фармацевтически приемлемый носитель.

17. Способ получения конъюгата по п.1, включающий введение выделенного антитела, специфически связывающегося с SLC34A2, в реакцию с полимерным остовом формулы (Id), таким образом, что формируется конъюгат



(Id),

в котором m является целым числом от 1 до 300;

m_1 является целым числом от 1 до 140;

m_2 является целым числом от 1 до 40;

m_{3a} является целым числом от 0 до 17;

m_{3b} является целым числом от 1 до 8 и

сумма m, m_1, m_2 и m_{3a} и m_{3b} варьирует от 15 до 300;

концевая $-S-$ обозначает прямое присоединение одного или более полимерных остовов к выделенному антителу;

один из X_a и X_b представляет собой H, а другой представляет собой водорастворимую защитную группу для малеимидогруппы, или X_a и X_b, вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют двойную связь углерод-углерод; и

X представляет собой CH_2, O или NH.

18. Способ облегчения симптома рака у пациента, включающий введение пациенту конъюгата по любому из пп.1-15 в количестве, достаточном для облегчения симптома рака.

19. Способ по п.18, в котором пациент является человеком.

20. Способ по п.18 или 19, в котором рак выбран из группы, состоящей из рака яичника, рака щитовидной железы, рака ободочной и прямой кишки, рака легких, немелкоклеточного рака легких (NSCLC), рака молочной железы, рака почек и рака слюнного протока.

21. Способ по любому из пп.18-20, в котором рак выбран из группы, состоящей из немелкоклеточного рака легких (NSCLC) и рака яичника.

22. Способ по п.21, в котором немелкоклеточный рак легких является неплоскоклеточным немелкоклеточным раком легких.

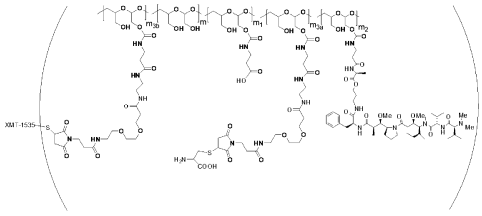
23. Способ по п.21, в котором рак яичника является эпителиальным раком яичника.

24. Способ по любому из пп.18-23, дополнительно включающий введение пациенту терапевтического средства.

25. Способ по любому из пп.18-24, в котором пациент имеет один или более видов рака яичника, выбранного из рецидивного рака яичника, чувствительного к платине рака яичника, рефрактерного к платине рака яичника и резистентного к платине рака яичника.

26. Способ по любому из пп.18-25, в котором пациент имеет прогрессирующий рак яичника и не получал предшествующей химиотерапии для лечения рака.

27. Конъюгат для облегчения симптома рака у пациента, имеющий формулу



где конъюгат включает полимерный остов, включающий поли-(1-гидроксиметил-этиленгидроксиметил-формаль) (PHF), где PHF имеет молекулярную массу в пределах от 5 до 10 кДа;

m является целым числом от 1 до 75;

m_1 является целым числом от 2 до 35;

m_2 является целым числом от 2 до 10;

m_{3a} является целым числом от 0 до 4;

m_{3b} является целым числом от 1 до 5;

сумма m, m_1, m_2, m_{3a} и m_{3b} варьирует от 40 до 75;

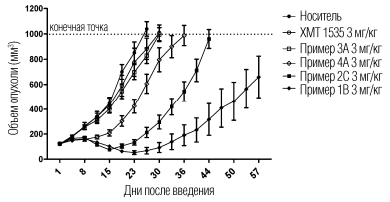
XMT-1535 содержит вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 1 (CDRL1), включающий аминокислотную последовательность SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 8), вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 2 (CDRL2), включающий аминокислотную последовательность YTSSLYS (SEQ ID NO: 9), вариабельный участок определяющей комплементарность области легкой цепи 3 (CDRL3), включающий аминокислотную последовательность QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 10); вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 1 (CDRH1), включающий аминокислотную последовательность GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 5), вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 2 (CDRH2), включающий аминокислотную последовательность AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 6), вариабельный участок определяющей комплементарность области тяжелой цепи 3 (CDRH3), включающий аминокислотную последовательность GETARATFAY (SEQ ID NO: 7); и

где соотношение между PHF и XMT-1535 представляет собой целое число от 2 до 6.

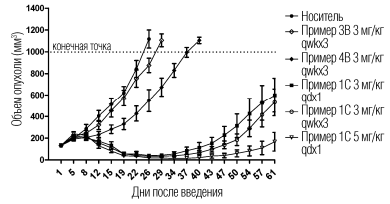
28. Конъюгат по п.27, в котором соотношение между m_2 и XMT-1535 составляет от 16:1 до 10:1.

29. Конъюгат по п.27, в котором соотношение между m_2 и XMT-1535 составляет от 20:1 до 6:1.

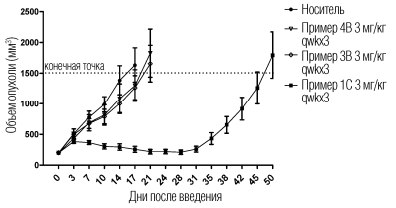
30. Конъюгат по п.27, в котором соотношение между m_2 и XMT-1535 составляет от 12:1 до 8:1.



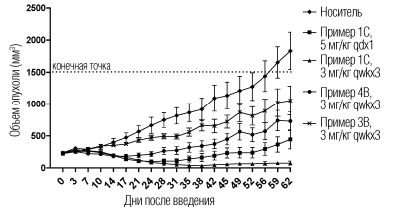
Фиг. 1



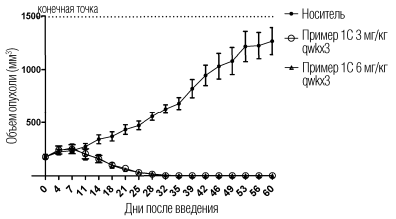
Фиг. 2



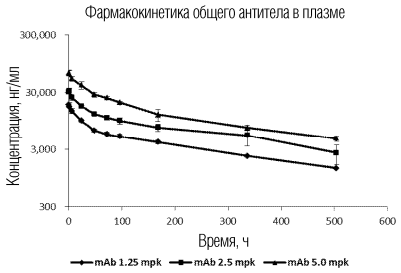
Фиг. 3



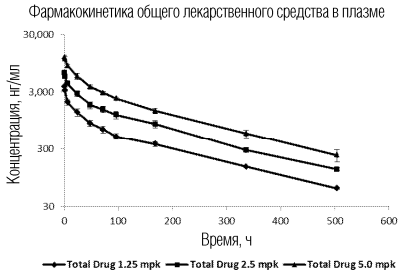
Фиг. 4



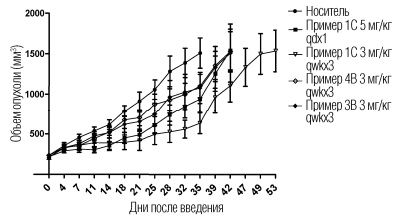
Фиг. 5



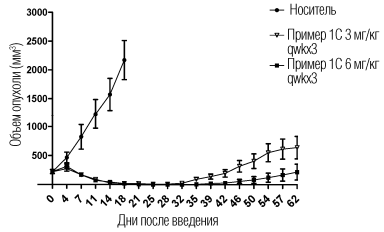
Фиг. 6A



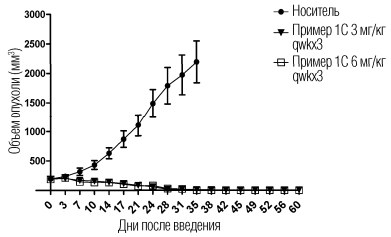
Фиг. 6B



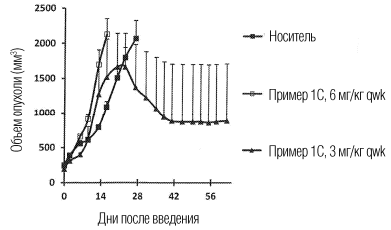
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10