

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202492086 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.10.24

(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)
A61K 38/05 (2006.01)
A61K 31/437 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.02.17

(54) КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

(86) PCT/KR2022/002358

(72) Изобретатель:
Парк Санг Гиу, Ким Дзин-Окк (KR)

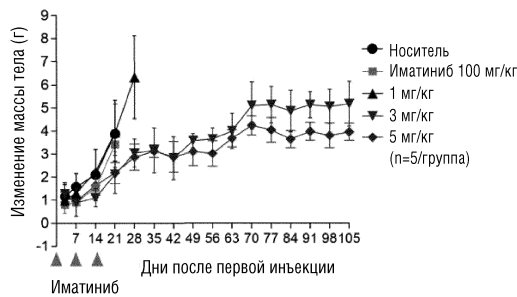
(87) WO 2023/157989 2023.08.24

(71) Заявитель:
НОВЕЛТИ НОБАЙЛИТИ ИНК. (KR)

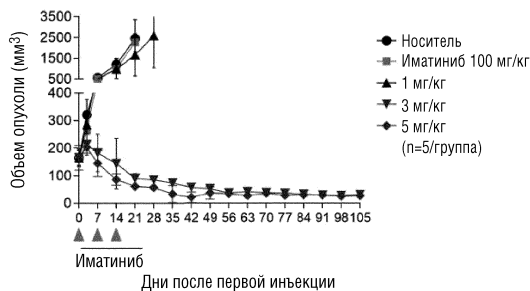
(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к нацеленному на с-Kit конъюгату антитело-лекарственное средство и его применению.

SCLC-H526 (004-2)



SCLC-H526 (004-2)



202492086

A1

202492086 A1

ИЗМЕНЕННОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581773EA/042

КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

Область техники

Настоящее изобретение относится к нацеленному на с-Kit конъюгату антитело-лекарственное средство и его применению.

Предпосылки создания изобретения

Связывание фактора стволовых клеток (SCF) с с-Kit (также известным как CD117) активирует несколько сигнальных путей, включая фосфоинозитид 3 киназу, фосфолипазу С-гамма, Src киназу, Янус-киназу-сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции (Yasuda A et al., *Dig Dis Sci* 52, 2292-2300. (2007); Sun J, Pedersen M & Ronnstrand L, *J Biol Chem* 284, 11039-11047. (2009)).

Предыдущие исследования показали, что экспрессия с-Kit с онкогенными мутациями дерегулируется или повышается при различных видах рака, что приводит к SCF-независимой активации с-Kit и пролиферации клеток. Сверхэкспрессия с-Kit индуцируется гипоксией, а также активацией различных факторов транскрипции, включая AP-2, ETS, SP1, MYB и MITF. В настоящее время в опухолях человека выявлено более 500 мутаций с-Kit (Sanger Institute Catalog of Somatic Mutations in Cancer, <https://cancer.sanger.ac.uk>). SCF-независимые спонтанно активирующие мутации с-Kit обнаружены примерно в 85%, 30%, 25%, 25% и 90% случаев гастроинтестинальной стромальной опухоли (GIST), острого миелоидного лейкоза, акральной меланомы, карциномы яичка и системной мастоцитомы (SM) (Lennartsson J & Ronnstrand L, *Physiol Rev* 92, 1619-1649. (2012)).

Эффективность малых молекул, таких как иматиниб, для уничтожения раковых стволовых клеток, несущих конститутивно активированные мутации с-Kit, ограничена в опухолевых клетках, несущих мутации в различных сайтах. Для преодоления лекарственной резистентности, индуцированной мутацией с-Kit, были разработаны различные малые молекулы, такие как дазатиниб, сунитиниб и акситиниб (Abbaspour Babaei M et al., *Drug Des Devel Ther* 10, 2443-2459. (2016)). Однако частота побочных реакций 3/4 степени у пациентов, получавших лечение этими малыми молекулами, выше, чем у пациентов, получавших лечение иматинибом, что ограничивает их эффективное применение при лечении рака (Kantarjian NM et al., *Blood* 119, 1123-1129. (2012)).

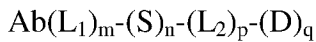
Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) позволяют доставлять высокоактивные цитотоксические средства, используя специфичность моноклонального антитела против раковых клеток. Недавно Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA) были одобрены различные ADC, нацеленные на CD30 (брентуксимаб ведотин), CD22 (инотузумаб озогамидин), CD79b (полатузумаб ведотин) и HER2 (трастузумаб эмтанзин и трастузумаб дерукстефан) (Leung D et al., *Antibodies (Basel)* 9, 2. (2020)). Поскольку эти ADC представляют собой лекарственные средства на основе антител, которые связываются с внеклеточным

доменом целевой молекулы, они не имеют мутаций, которые, главным образом, возникают в внутриклеточном домене, и имеют относительное преимущество, заключающееся в том, что их можно применять независимо от различных мутаций.

Подробное описание изобретения

Техническая проблема

Целью настоящего изобретения является обеспечение конъюгата антитело-лекарственное средство следующей формулы:



в формуле:

Ab представляет собой анти-c-Kit антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом c-Kit человека в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10;

L₁ представляет собой линкер, соединяющий Ab и S или Ab и L₂;

S представляет собой спейсер в форме, в которой полимер связан или не связан;

L₂ представляет собой расщепляемый линкер;

D представляет собой лекарственный компонент;

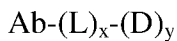
m представляет собой целое число от 0 до 8;

n представляет собой целое число от 0 до 8;

p представляет собой целое число от 1 до 8; и

q представляет собой целое число от 1 до 8.

Другой целью настоящего изобретения является обеспечение конъюгата антитело-лекарственное средство следующей формулы:



в формуле:

Ab представляет собой анти-c-Kit антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом c-Kit человека в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10;

L представляет собой линкер, включающий расщепляемый линкер;

D представляет собой лекарственный компонент;

x представляет собой целое число от 1 до 8; и

y представляет собой целое число от 1 до 8.

Другой целью настоящего изобретения является обеспечение композиции, включающей конъюгат антитело-лекарственное средство.

Другой целью настоящего изобретения является обеспечение способа профилактики или лечения рака, включающего введение фармацевтически эффективного количества композиции нуждающемуся в этом субъекту.

Другой целью настоящего изобретения является обеспечение применения композиции для использования в терапии.

Другой целью настоящего изобретения является обеспечение фармацевтической композиции для профилактики или лечения рака, включающей конъюгат антитело-

лекарственное средство.

Другой целью настоящего изобретения является обеспечение применения фармацевтической композиции для изготовления лекарственного средства.

Другой целью настоящего изобретения является обеспечение композиции для диагностики рака, включающей конъюгат антитело-лекарственное средство.

Другой целью настоящего изобретения является обеспечение способа предоставления информации для диагностики рака, включающего: обработку образца, выделенного из субъекта, конъюгатом антитело-лекарственное средство.

Другой целью настоящего изобретения является обеспечение способа получения конъюгата анти-c-Kit антитело-лекарственное средство, включающего: конъюгацию $(L_1)_m-(S)_n-(L_2)_p-(D)_q$ с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (Ab), которые специфически связываются с c-Kit человека:

в формуле:

L_1 представляет собой линкер, соединяющий Ab и S или Ab и L_2 ;

S представляет собой спейсер в форме, в которой полимер связан или не связан;

L_2 представляет собой расщепляемый линкер;

D представляет собой лекарственный компонент;

m представляет собой целое число от 0 до 8;

n представляет собой целое число от 0 до 8;

p представляет собой целое число от 1 до 8; и

q представляет собой целое число от 1 до 8.

Другой целью настоящего изобретения является обеспечение способа получения конъюгата анти-c-Kit антитело-лекарственное средство, включающего: конъюгацию компонента линкер (L)-лекарственное средство (D) с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, включающим CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 2, CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 3, CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 4, CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 5 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 6, где L представляет собой линкер, включающий расщепляемый линкер, и D представляет собой лекарственный компонент.

Другие цели и преимущества настоящего изобретения станут более очевидными из подробного описания изобретения, формулы изобретения и чертежей, которые следуют ниже.

Решение проблемы

Настоящее изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство и его применению. Настоящее изобретение демонстрирует, что рак можно контролировать, лечить, облегчить или уменьшить его тяжесть, или ингибировать рецидив рака путем введения конъюгата антитело-лекарственное средство, включающего, например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с c-Kit человека.

Для облегчения понимания настоящего изобретения определены некоторые

термины и фразы. Дополнительные определения представлены в подробном описании.

I. Определение

Используемый в настоящей заявке термин "около" используется для обозначения приблизительно, примерно, около или в пределах диапазона... Когда термин "около" используется с числовым диапазоном, он изменяет этот диапазон, расширяя границы выше и ниже представленного числового значения. Как правило, термин "около" может изменять числовое значение, например, в большую или меньшую сторону (выше или ниже), вплоть до изменения на 10 процентов, выше или ниже указанного значения.

Кроме того, "и/или" следует толковать как означающее, что каждый из двух указанных признаков или ингредиентов конкретно раскрывается либо в сочетании с другим, либо отдельно. Таким образом, термин "и/или", используемый в таких фразах, как "А и/или В" подразумевает включение "А и В", "А или В", "А" (отдельно) и "В" (отдельно). Аналогичным образом, термин "и/или", используемый в таких фразах, как "А, В и/или С" подразумевает включение аспектов А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно); и С (отдельно), соответственно.

Используемые в настоящей заявке термины "лечить", "лечащий" и "лечение" относятся к любому виду осуществляемого в отношении субъекта вмешательства или процесса или к введению активного агента субъекту с целью реверсирования, улучшения, облегчения, ингибирования или задержки прогрессирования, возникновения, тяжести или рецидива симптомов, осложнений, состояний или биохимических показателей, связанных с заболеванием. Лечение может быть направлено на субъекта с заболеванием или на субъекта без заболевания (например, профилактика).

Используемый в настоящей заявке термин "введение" относится к физическому введению субъекту терапевтического средства или композиции, включающей терапевтическое средство, с использованием любого из множества методов и систем доставки, известных специалистам в данной области. Различные пути введения для конъюгата антители-лекарственное средство, раскрытого в настоящей заявке, включают внутривенный, внутрибрюшинный, внутримышечный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. Используемый в настоящей заявке термин "парентеральное введение" обычно относится к способам введения, отличным от энтерального и местного введения, путем инъекции, включая, но не ограничиваясь этим, внутривенные, внутрибрюшинные, внутримышечные, внутриартериальные, интратекальные, внутрилимфатические, внутриочаговые, внутрикапсулярные, внутриорбитальные, внутрисердечные, внутрикожные, транстрахеальные, интратрахеальные, легочные, подкожные, субэпителиальные, внутрисуставные, субкапсулярные, субарахноидальные, интравентрикулярные, интравитреальные, эпидуральные и субстернальные инъекции и инфузии, а также электропорацию *in vivo*. Альтернативно, раскрытый в настоящей заявке конъюгат антители-лекарственное средство можно вводить парентеральным путем, таким как местный, эпителиальный или мукозальный пути введения, например, интраназальным,

пероральным, вагинальным, ректальным, сублингвальным или местным путем. Кроме того, введение можно осуществлять в течение длительного периода времени, например, один раз, несколько раз и/или более одного раза.

Используемый в настоящей заявке термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству лекарственного средства, которое эффективно, отдельно или в сочетании с другими терапевтическими средствами, "для лечения" заболевания или расстройства у субъекта или для снижения риска, потенциала, вероятности или возникновения заболевания или расстройства (например, рака). "Терапевтически эффективное количество" включает количество лекарственного средства или терапевтического средства, которое обеспечивает некоторое улучшение или пользу для субъекта, имеющего заболевание или расстройство (например, рак) или подверженного риску такого заболевания или расстройства. Таким образом, "терапевтически эффективное количество" представляет собой количество, которое снижает риск, потенциал, вероятность или возникновение заболевания или расстройства, или обеспечивает некоторое облегчение и смягчение, и/или уменьшает по меньшей мере один показатель (например, рак), и/или уменьшает по меньшей мере один клинический симптом заболевания или расстройства.

Используемый в настоящей заявке термин "рак" относится к широкой группе различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. "Рак" или "раковая ткань" может включать опухоль. Неконтролируемое деление и рост клеток приводит к образованию злокачественных опухолей, которые проникают в соседние ткани и могут также метастазировать в отдаленные части тела через лимфатическую систему или кровотоки. После метастазирования можно сказать, что дистальные опухоли "произошли из" премеастиатической опухоли. Например, опухоль, "происходящая из меланомы", относится к опухоли, которая является результатом метастатической меланомы. Поскольку отдаленная опухоль происходит из премеастиатической опухоли, фраза "происходит из" опухоли может также включать премеастиатическую опухоль, например, опухоль, происходящая из меланомы, может включать меланому.

Используемая в настоящей заявке фраза "ингибирует рост опухоли" включает любое измеримое снижение роста опухоли, например, ингибирование роста опухоли по меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 99% или вплоть до 100%.

Термины "эффективное количество", "фармацевтически эффективное количество" или "эффективная дозировка" определяются как количество, достаточное для достижения, или по меньшей мере частичного достижения, желаемого эффекта. "Терапевтически эффективное количество" или "терапевтически эффективная доза" лекарственного средства или терапевтического средства, при использовании отдельно или в комбинации с

другими терапевтическими средствами, относится к количеству лекарственного средства, которое способствует регрессии заболевания, о чем свидетельствует снижение тяжести симптомов заболевания, увеличение частоты и продолжительности периодов без симптомов заболевания или предотвращение инвалидности или травм, вызванных заболеванием. Терапевтически эффективное количество или эффективная доза лекарственного средства включает "профилактически эффективное количество" или "профилактически эффективную дозу", относящиеся к количеству лекарственного средства, которое ингибирует развитие или рецидив заболевания при введении отдельно или в комбинации с другими терапевтическими средствами субъекту, подверженному риску развития заболевания или рецидива заболевания. Эффективность терапевтического средства для содействия регрессии заболевания или для ингибирования развития или рецидива заболевания может быть оценена с использованием различных методов, известных специалистам в данной области, и может быть оценена, например, путем анализа активности средства у людей во время клинических испытаний, в системах моделей животных, прогнозирующих эффективность у людей, или в анализах *in vitro*.

В качестве примера, противораковое средство представляет собой лекарственное средство, которое способствует регрессии рака у субъекта. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество лекарственного средства способствует регрессии рака до тех пор, пока рак не будет устранен. "Способствовать регрессии рака" означает, что введение фармацевтически эффективного количества лекарственного средства, отдельно или в комбинации с противоопухолевым средством, приводит к уменьшению роста или размера опухоли, некрозу опухоли, уменьшению тяжести по меньшей мере одного симптома заболевания, увеличению частоты и продолжительности периодов без симптомов заболевания, предотвращению инвалидности или травм из-за заболевания или другому улучшению симптомов заболевания у пациента. Кроме того, термины "эффективный" и "эффективность" включают как фармакологическую эффективность, так и физиологическую безопасность в контексте лечения. Фармакологическая эффективность относится к эффективности лекарственного средства, которое может способствовать регрессии рака у пациента. Физиологическая безопасность относится к уровню токсичности или другим негативным физиологическим эффектам (побочным эффектам) на уровне клетки, органа и/или организма, которые возникают в результате введения лекарственного средства.

В качестве примера, в случае лечения опухолей, терапевтически эффективное количество или терапевтически эффективная доза лекарственного средства ингибирует рост клеток или рост опухоли по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 60% или по меньшей мере на около 80% по сравнению с субъектом, не получавшим лечения. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество или терапевтически эффективная доза лекарственного средства полностью ингибирует рост клеток или рост опухоли, т.е. ингибирует рост клеток или рост опухоли вплоть до 100%. Способность ингибитора

ингибировать рост опухоли можно оценить при помощи анализа, описанного ниже. Альтернативно, это свойство композиции можно оценить путем тестирования способности ингибитора ингибировать рост клеток, и такое ингибирование можно измерить *in vitro* с использованием анализов, известных специалистам в данной области. В других вариантах осуществления, раскрытых в настоящей заявке, можно наблюдать регрессию опухоли, которая может длиться по меньшей мере около 20 дней, по меньшей мере около 40 дней или по меньшей мере около 60 дней.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к диагностике рака у субъекта.

Используемый в настоящей заявке термин "диагностика" относится к способу, который можно использовать для определения или прогнозирования того, страдает ли пациент данным заболеванием или состоянием. Специалисты в данной области могут поставить диагноз на основе одного или нескольких диагностических маркеров (например, уровня экспрессии *c-Kit*), где наличие, отсутствие, количество или изменение количества диагностического маркера указывает на наличие, тяжесть или отсутствие состояния. В некоторых вариантах осуществления повышенная экспрессия *c-Kit* в биологическом образце, полученном от субъекта, указывает на опухоль. Термин "диагноз" не означает способность определить наличие или отсутствие конкретного заболевания со 100% точностью, или даже то, что определенное течение или исход более вероятно будет, чем не будет. Вместо этого специалисты в данной области понимают термин "диагноз" как повышенную вероятность того, что у субъекта присутствует определенное заболевание.

Термин "диагностический маркер" (например, экспрессия *c-Kit*) относится к веществу, которое может использоваться для отделения и диагностики опухолей от нормальных клеток, и включает органические биомолекулы, такие как полипептиды или нуклеиновые кислоты (например, мРНК), липиды, гликолипиды, гликопротеины и сахара (моносахариды, дисахариды, олигосахариды и т.д.), уровни которых увеличиваются или уменьшаются в опухолевых клетках. Диагностический маркер, раскрытый в настоящей заявке для рака, может быть белком, экспрессируемым из гена *c-Kit*, экспрессия которого повышается в опухолевых клетках.

Композиция для диагностики рака включает агент для измерения уровня экспрессии мРНК гена *c-Kit* или количества экспрессируемого белка. Эти агенты включают олигонуклеотид с последовательностью, комплементарной мРНК *c-Kit*, праймер или нуклеиновокислотный зонд, который специфически связывается с мРНК *c-Kit*, и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (далее именуемый анти-*c-Kit* антитело), которые специфически связываются с белком *c-Kit*, или конъюгат антитело-лекарственное средство, в котором анти-*c-Kit* антитело связано с лекарственным средством при помощи линкера.

Используемый в настоящей заявке термин "субъект" включает любого человека или отличное от человека животное. Термин "отличное от человека животное" включает

всех позвоночных, включая млекопитающих и не млекопитающих, таких как отличные от человека приматы, овцы, собаки, крупный рогатый скот, куры, амфибии, рептилии и т.п.

Термин "с-Kit" относится к классу III рецепторной тирозинкиназы (RTK) и также известен как рецептор для SCF.

"с-Kit" включает любой вариант или изоформу с-Kit, которые естественным образом экспрессируются клеткой. Таким образом, анти-с-Kit антитело или раскрытый в настоящей заявке конъюгат антитело-лекарственное средство могут перекрестно реагировать с различными изоформами того же вида (например, различными изоформами с-Kit человека) или могут перекрестно реагировать с с-Kit из вида, отличного от человека (например, с-Kit мыши). Альтернативно, анти-с-Kit антитело может быть специфичным для с-Kit человека и может не проявлять перекрестной реактивности с другими видами. с-Kit или любые его варианты и изоформы могут быть выделены из клеток или тканей, которые естественным образом их экспрессируют, или могут быть получены рекомбинантным путем. Последовательность доменов 1-3 (Q26 - D309) с-Kit человека, за исключением 25 аминокислот сигнального пептида, может представлять собой SEQ ID NO: 12.

Термин "антитело" является термином, обычно используемым в данной области техники, и может использоваться в настоящей заявке взаимозаменяемо, и относится к молекуле, которая имеет антигенсвязывающий сайт, специфически связывающийся с антигеном. В контексте настоящей заявки этот термин включает целое антитело и любой антигенсвязывающий фрагмент (т.е. "антигенсвязывающую часть") или одну его цепь. В одном варианте осуществления "антитело" относится к гликопротеину или его антигенсвязывающей части, включающему по меньшей мере две тяжелые (H) и две легкие (L) цепи, соединенные дисульфидными связями. В других вариантах осуществления "антитело" относится к одноцепочечному антителу, включающему один варибельный домен, такой как домен V_HH. Каждая тяжелая цепь состоит из варибельной области тяжелой цепи (сокращенно V_H) и константной области тяжелой цепи. В некоторых антителах природного происхождения константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов CH1, CH2 и CH3. В некоторых антителах природного происхождения каждая легкая цепь состоит из варибельной области легкой цепи (сокращенно V_L) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена CL.

Области V_H и V_L могут быть далее подразделены на гиперварибельные области, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, которые расположены от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Варибельные области тяжелых и легких цепей содержат связывающие домены, которые взаимодействуют с антигеном. Константная область антитела может опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент

классической системы комплемента (C1q).

Антитела могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA или IgY), любого типа (например, IgD, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 или IgA2), или любого подтипа (например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 у людей; и IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 у мышей) молекулы иммуноглобулина. Иммуноглобулины, такие как IgG1, существуют в нескольких аллотипах, которые отличаются друг от друга несколькими аминокислотами. Антитела, раскрытые в настоящей заявке, могут быть получены из любого из общеизвестных изотипов, типов, подтипов или аллотипов. В некоторых вариантах осуществления раскрытые в настоящей заявке антитела относятся к подтипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или любому их гибриду. В некоторых вариантах осуществления антитела относятся к подтипу IgG1 человека, или подтипу IgG2 человека, или подтипу IgG4 человека.

В качестве примера, "антитело" включает антитела природного происхождения и неприродного происхождения; моноклональные и поликлональные антитела; химерные и гуманизированные антитела; человеческие антитела и нечеловеческие, полностью синтетические антитела; одноцепочечные антитела; моноспецифические антитела; мультиспецифические антитела (включая биспецифические антитела); тетрамерные антитела, включающие две молекулы тяжелой и две молекулы легкой цепи; мономер легкой цепи антитела; мономер тяжелой цепи антитела; димер легкой цепи антитела; димер тяжелой цепи антитела; пару легкая цепь антитела-тяжелая цепь антитела; интратела; гетероконъюгированные антитела; моновалентные антитела; камелизированные антитела; аффитела; антиидиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-анти-Id антитела); однодоменное антитело (sdAb), включающее связывающую молекулу, состоящую из одного мономерного переменного домена антитела (например, домена VH или домена VL), в достаточной степени способного связываться с антигеном (Harmen M. M. and Haard H. J. *Appl Microbiol Biotechnol.* 77(1): 13-22 (2007)).

Используемый в настоящей заявке термин "антигенсвязывающая часть" антитела, т.е. "антигенсвязывающий фрагмент", относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые обладают способностью специфически связываться с антигеном (например, домен 2/3 c-Kit человека). Эти "фрагменты" могут составлять, например, от около 8 до около 1500 аминокислот в длину, соответственно от около 8 до около 745 аминокислот в длину, более предпочтительно от около 8 до около 300 аминокислот в длину, например от около 8 до около 200 аминокислот в длину, или от около 10 до около 50 или 100 аминокислот в длину. Было обнаружено, что антигенсвязывающая функция антитела может осуществляться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых терминами "антигенсвязывающая часть" или "антигенсвязывающий фрагмент" антитела, например раскрытого в настоящей заявке анти-c-Kit антитела, включают, но не ограничиваются этим: (i) Fab-фрагмент, который является моновалентным фрагментом, состоящим из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii)

F(ab')₂-фрагмент, который представляет собой двухвалентный фрагмент, включающий два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, который состоит из доменов VH и CH1; (iv) Fv-фрагмент, который состоит из доменов VL и VH одного плеча антитела, и дисульфид-связанный Fv (sdFv); (v) dAb-фрагмент, который состоит из домена VH (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546); и (vi) отдельную определяющую комплементарность область (CDR); или (vii) комбинацию двух или более отдельных CDR, которые могут быть необязательно соединены синтетическим линкером. Кроме того, хотя два домена, VL и VH, кодируются отдельными генами, их можно объединить при помощи синтетических линкеров и с использованием рекомбинантных методов, при этом области VL и VH спариваются, образуя одну белковую цепь, образуя моновалентную молекулу (называемую одноцепочечным Fv(scFv)) (см., например, Bird et al., (1988) Science 242:423-426; и Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также включены в термин "антигенсвязывающая часть" или "антигенсвязывающий фрагмент" антитела. Эти фрагменты антитела получают с использованием обычных методов, известных специалистам в данной области, и фрагменты проверяют на полезность таким же образом, как и интактные антитела. Антигенсвязывающая часть может быть получена методами рекомбинантной ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов.

Используемые в настоящей заявке термины "вариабельная область" или "вариабельный домен" обычно используются взаимозаменяемо в данной области. Вариабельная область обычно относится к части антитела, как правило, к части легкой цепи или тяжелой цепи, обычно около аминоконцевых 110-120 аминокислот в зрелой тяжелой цепи и около 90-115 аминокислот в зрелой легкой цепи, которые сильно отличаются по последовательности от антител и используются из-за связывания и специфичности конкретных антител в отношении их специфических антигенов. Вариабельность последовательности сосредоточена в областях, называемых определяющими комплементарность областями (CDR), в то время как более высококонсервативная область в вариабельном домене называется каркасной областью (FR).

Как полагают, CDR легкой и тяжелой цепей в первую очередь отвечают за взаимодействие антитела с антигеном и специфичность к антигену. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область представляет собой вариабельную область человека. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область включает CDR грызуна или мыши и каркасную область (FR) человека. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область представляет собой вариабельную область примата (например, отличного от человека примата). В некоторых вариантах осуществления вариабельная область включает CDR грызуна или мыши и каркасную область (FR) примата (например, отличного от человека примата).

Используемый в настоящей заявке термин "тяжелая цепь", при использовании в

отношении антитела, может относиться к любому из различных типов, например, альфа (α), дельта (δ), эpsilon (ϵ), гамма (γ) и мю (μ), на основании аминокислотной последовательности константных доменов, которые дают начало типам антител IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, включая подтипы IgG, такие как IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, соответственно.

Используемый в настоящей заявке термин "легкая цепь", при использовании в отношении антитела, может относиться к любому из различных типов, например, каппа (κ) и лямбда (λ), на основании аминокислотной последовательности константных доменов. Аминокислотная последовательность легкой цепи хорошо известна в данной области. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь представляет собой легкую цепь человека.

Термины "VL" и "домен VL" используются взаимозаменяемо и относятся к переменной области легкой цепи антитела.

Термины "VH" и "домен VH" используются взаимозаменяемо и относятся к переменной области тяжелой цепи антитела.

Используемые в настоящей заявке термины "константная область" и "константный домен" используются взаимозаменяемо и имеют свое обычное значение в данной области. Константный домен представляет собой часть антитела, например, карбоксиконцевую часть легкой и/или тяжелой цепи, которая непосредственно не участвует в связывании антитела с антигеном, но может проявлять различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc-рецепторами. Константные области молекул иммуноглобулина, как правило, имеют более консервативные аминокислотные последовательности, чем переменные домены иммуноглобулина.

"Fc-область" (область кристаллизуемого фрагмента) или "Fc-домен" или "Fc" относится к C-концевой области тяжелой цепи антитела, которая опосредует связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая связывание Fc-рецептора, расположенного на различных клетках иммунной системы (например, эффекторных клетках) и первого компонента классической системы комплемента (C1q). Таким образом, Fc-область включает константную область антитела, исключая первый иммуноглобулиновый домен константной области (например, CH1 или CL). В изотипах антител IgG, IgA и IgD Fc-область включает два идентичных фрагмента белка, полученных из второго (CH2) и третьего (CH3) константных доменов двух тяжелых цепей антитела. Fc-области IgM и IgE включают три константных домена тяжелой цепи (домены CH 2-4) в каждой полипептидной цепи. Для IgG Fc-область включает шарнир между иммуноглобулиновыми доменами C γ 2 и C γ 3 и между C γ 1 и C γ 2. Хотя границы Fc-области тяжелых цепей иммуноглобулина различаются, Fc-область тяжелой цепи IgG человека обычно определяется как простирающаяся от аминокислотного остатка в положении C226 или P230 (или аминокислоты между этими двумя аминокислотами) до карбокси-конца тяжелой цепи, где нумерация указана в соответствии с EU-индексом, как описано в Kabat. Домен CH2 Fc-области IgG человека простирается от аминокислоты 231 до аминокислоты 340, а домен CH3 расположен на C-концевой стороне домена CH1 в Fc-области, т.е. он

простирается от аминокислоты 341 до аминокислоты 447 IgG. Fc-область может представлять собой последовательность Fc природного происхождения, включая любой вариант аллотипа или вариант Fc (например, Fc неприродного происхождения). Кроме того, Fc относится к области в изолированном состоянии или относится к области, связанной с Fc-содержащим полипептидом, таким как "связывающий белок, содержащий Fc-область", также называемый "Fc-слитый белок" (например, антитело или иммуноадгезия).

"Шарнир", "шарнирный домен" или "шарнирная область" или "шарнирная область антитела" относится к домену константной области тяжелой цепи, который соединяет домен CH1 с доменом CH2 и включает верхнюю, среднюю и нижнюю части шарнира (Roux et al. *J. Immunol.* 1998 161:4083). Шарнир изменяет уровень гибкости между областью связывания и эффекторной областью антитела, а также обеспечивает сайт для межмолекулярных дисульфидных связей между двумя константными областями тяжелой цепи. Последовательности шарниров IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 дикого типа известны в данной области (см., например, Kabat EA et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Vidarsson G. et al., *Front Immunol.* 5:520 (опубликовано онлайн 20 октября 2014 г.)).

Используемый в настоящей заявке термин "изотип" относится к типу антитела (например, антитела IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE), кодируемому генами константной области тяжелой цепи.

Термин "аллотип" относится к варианту природного происхождения в пределах определенной изотипической группы, который отличается несколькими аминокислотами (см., например, Jefferis et al. (2009) *mAbs* 1:1). Представленное в настоящей заявке антитело может иметь любой аллотип. Аллотипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 известны в данной области (см., например, Kabat EA et al., (1991) (*ibid.*); Vidarsson G. et al., *Front Immunol.* 5:520 (опубликовано онлайн 20 октября 2014 г.); и Lefranc MP, *mAbs* 1:4, 1-7(2009)).

Термины "антитело, которое распознает антиген" и "антитело, специфическое в отношении антигена" используются взаимозаменяемо в настоящей заявке с термином "антитело, которое специфически связывается с антигеном".

Используемый в настоящей заявке термин "выделенное антитело" относится к антителу, которое по существу свободно от других антител с другой антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с c-Kit, по существу свободно от антитела, которое специфически связывается с антигеном, отличным от c-Kit). Однако выделенное антитело, которое специфически связывается с эпитопом c-Kit, может иметь перекрестную реактивность с другими белками c-Kit от других видов.

Термин "аффинность связывания" обычно относится к общей объединенной силе нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания на молекуле (например,

антителом) и ее связывающим партнером (например, антигеном). Если не указано иное, используемый в настоящей заявке термин "аффинность связывания" относится к истинной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами связывающейся пары (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к партнеру Y обычно может быть выражена константой диссоциации (K_d). Аффинность можно измерить и/или выразить различными способами, известными в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, равновесную константу диссоциации (K_D) и равновесную константу ассоциации (K_A). K_D рассчитывается из частного k_{off}/k_{on} и выражается как молярная концентрация (M), а K_A рассчитывается из частного k_{on}/k_{off} . Например, k_{on} относится к константе скорости ассоциации антитела с антигеном, а k_{off} , например, относится к константе скорости диссоциации антитела с антигеном. k_{on} и k_{off} можно определить методами, известными специалистам в данной области, такими как иммуноанализы (например, иммуноферментный анализ (ELISA)), BIACORE® или кинетические анализы исключения (KinExA®).

Используемые в настоящей заявке термины "специфически связывается", "специфически распознает", "специфическое связывание", "селективное связывание" и "селективно связывается" являются аналогичными терминами по отношению к антителу и являются терминами, относящимися к молекуле (например, антителу), которая связывается с антигеном (например, эпитопом или иммунным комплексом), при этом такое связывание понятно специалистам в данной области. Например, молекула, которая специфически связывается с антигеном, как определено, например, с использованием иммуноанализа BIACORE®, устройства KinExA® 3000 (Sapidyne Instruments, Boise, ID), или других анализов, известных в данной области, может, как правило, связывать другие пептиды или полипептиды с более низкой аффинностью.

Антитело специфически связывается со своим когнатным антигеном с высокой аффинностью, что отражено константой диссоциации, которая обычно составляет от 10^{-5} до 10^{-11} M или менее. Значение K_D , превышающее примерно 10^{-4} M, обычно считается показателем неспецифического связывания. Антитело, которое "специфически связывается" с антигеном, представляет собой антитело, которое связывается с высокой аффинностью с этим антигеном и с антигеном, который по существу идентичен этому антигену, и подразумевается, что K_D составляет 10^{-7} M или менее, предпочтительно 10^{-8} M или менее, более предпочтительно 10^{-9} M или менее, еще более предпочтительно 10^{-10} M или менее, или 10^{-11} M или менее, как определено, например, иммуноанализом (например, ELISA) с использованием определенного антигена или методом поверхностного плазмонного резонанса на устройстве BIACORE® 2000, и оно не связывается с неродственными антигенами с высокой аффинностью.

Используемый в настоящей заявке термин "антиген" относится к любому природному или синтетическому иммуногенному веществу, такому как белок, пептид или гаптен. Антигеном может быть с-Kit или его фрагмент.

Используемый в настоящей заявке термин "эпитоп" является обычным термином в

данной области и относится к локализованной области антигена, с которой антитело может специфически связываться. Эпитопом могут быть, например, смежные аминокислоты полипептида (линейный или непрерывный эпитоп), или эпитопом может быть, например, комбинация двух или более несмежных областей полипептида или полипептидов (конформационный, нелинейный, прерывистый или несмежный эпитоп). Эпитоп, образованный из смежных аминокислот, обычно, но не всегда, сохраняется при воздействии денатурирующих растворителей, а эпитоп, образованный третичной структурой, обычно теряется при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно содержит по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, или 20 аминокислот в уникальных пространственных конформациях. Методы для определения, связан или нет эпитоп данным антителом (т.е. картирование эпитопов), хорошо известны в данной области и включают, например, методы иммуноблоттинга и иммунопреципитации, где перекрывающиеся или смежные пептиды (например, домены с-Kit 2 и 3) тестируются на реактивность с данным антителом (например, анти-с-Kit антителом). Методы определения пространственной конформации эпитопа включают методы, известные в данной области техники, и методы, раскрытые в настоящей заявке, включая, например, рентгеновскую кристаллографию, двумерную ядерную магнитно-резонансную спектроскопию и HDX-MS (см., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

Термин "связывается с тем же эпитопом" в отношении двух или более антител означает, что антитела связываются с тем же сегментом аминокислотных остатков, как определено данным методом. Методы определения, связываются или нет антитела с "тем же эпитопом на с-Kit", что и антитело, представленное в настоящей заявке, включают, например, методы картирования эпитопов, такие как рентгеновский анализ кристаллов комплексов антиген:антитело, которые обеспечивают атомное разрешение эпитопа, и масс-спектрометрию с водород/дейтерий обменом (HDX-MS). Другой метод отслеживает связывание антитела с фрагментом антигена или мутировавшим вариантом антигена, где потеря связывания из-за модификаций аминокислотных остатков в последовательности антигена в первую очередь считается указанием на компонент эпитопа. Кроме того, можно также использовать вычислительные комбинаторные методы для картирования эпитопов. Эти методы основаны на способности представляющего интерес антитела аффинно выделять определенные короткие пептиды из комбинаторных библиотек пептидов фагового дисплея. Ожидается, что антитела с идентичными последовательностями VH и VL или идентичными последовательностями CDR1, 2 и 3 будут связываться с одним и тем же эпитопом.

Антитело, которое "перекрестно конкурирует с другим антителом за связывание с мишенью", относится к антителу, которое (частично или полностью) ингибирует связывание остальных антител с мишенью. Конкурируют ли два антитела друг с другом за связывание с мишенью, то есть ингибирует ли одно антитело связывание оставшегося антитела с мишенью и в какой степени, можно определить с использованием известного

конкурентного анализа. В некоторых вариантах осуществления антитело конкурирует с другим антителом за связывание с мишенью и ингибирует это связывание по меньшей мере на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или до 100%. Уровень ингибирования или конкуренции может различаться в зависимости от того, является ли антитело "блокирующим антителом" (т.е. конкурирующим антителом, которое было сначала инкубировано с мишенью). Конкурентный анализ можно осуществить, например, как представлено в E.d. Harlow and David Lane, *Cold Spring Harb Protoc*; 2006; doi:10.1101/pdb.prot4277, или как представлено в Chapter 11 of "Using Antibodies" by E.d. Harlow and David Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999). Конкурирующие антитела связываются с одним и тем же эпитопом, перекрывающимися эпитопами или соседними эпитопами (например, за счет пространственных затруднений).

Термин "эталонное антитело" или "стандартное антитело" относится к антителу, которое служит стандартом для анализа конкурирующих антител, связывающихся с одним и тем же эпитопом, перекрывающимися эпитопами или соседними эпитопами, и которое перекрестно конкурирует при связывании между конкурирующим антителом и эпитопом.

Другие анализы конкурентного связывания включают прямой или непрямой твердофазный радиоиммунный анализ (RIA), прямой или непрямой твердофазный иммуноферментный анализ (EIA), сэндвичевый конкурентный анализ (см., Stahl et al., *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); твердофазный прямой биотин-авидиновый EIA (см., Kirkland et al., *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); твердофазный анализ прямого мечения, твердофазный сэндвич-анализ прямого мечения (см., Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); твердофазный RIA прямого мечения с использованием I-125 метки (см., Morel et al., *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); твердофазный прямой биотин-авидиновый EIA (см., Cheung et al., *Virology* 176:546 (1990)); и RIA прямого мечения (см., Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)).

c-Kit включает IgG-подобные повторы, околочелювеческую область и пять внеклеточных доменов, состоящих из цитоплазматического киназного домена, включающего АТФ-связывающий (ТК1) и фосфотрансферазный (ТК2) домены, разделенные киназными вставками. При связывании с лигандом c-Kit активируется путем автофосфорилирования через лиганд-опосредованную димеризацию. В результате этого сигнальные медиаторы, включая Src, PI3K, STAT1 и JAK2, привлекаются для регуляции различных клеточно-специфических реакций, таких как пролиферация, выживание и подвижность. Кроме того, известно, что сверхэкспрессия RTK активируется спонтанно, индуцируя рост клеток лиганд-независимым образом. Сверхэкспрессия и активация c-Kit наблюдаются при различных видах рака, включая GBM, астроцитому, герминому и SCLC, и коррелируют с плохим прогнозом.

Антитело 2G4 представляет собой полностью человеческое анти-c-Kit антитело, которое связывается с доменом 2/3 c-Kit и блокирует SCF связывание, тем самым

демонстрируя эффект ингибирования с-Kit. Специфический с-Kit-связывающий сайт 2G4 был подтвержден с использованием модели докинга комплекса 2G4/с-Kit (J.-O. Kim et al., *International Journal of Biological Macromolecules* 159 (2020) 66-78), которая включена в настоящую заявку посредством ссылки.

Для того чтобы понять молекулярный механизм антитела 2G4, выполняли анализ молекулярного докинга на кристаллических структурах 2G4 Fab и с-Kit (PDB ID: 2E9W) с использованием программы HADDOCK/ZDOCK. Остатки 26-309 с-Kit (области D1-D3, SEQ ID NO: 12) использовали в расчетах докинга следующим образом.

Сначала были выполнены расчеты слепого докинга с использованием ZDOCK. Десять модельных структур с наивысшими оценками ZDOCK в целом указывают на то, что CDR область 2G4 Fab взаимодействует с D2 и D3 областями с-Kit (D113-D309; SEQ ID NO: 11). На основании модельной структуры комплекса 2G4 Fab:с-Kit, пять остатков (R122, Y125, R181, K203 и K205) были выбраны из области D2 с-Kit (SEQ ID NO: 9) и пять остатков (S240, S241, Y243, N260 и W262) были выбраны из области D3 с-Kit (SEQ ID NO: 10). Ожидалось, что выбранные остатки будут отвечать за связывание 2G4. Затем получали 10 мутантных белков с-Kit и аффинность связывания 2G4 сравнивали с диким типом и мутантными белками с-Kit с использованием ELISA (Фиг. 14a-14c). Результаты ELISA показали, что остатки R122, Y125, R181, K203, K205, S261 и H263 с-Kit являются важными для связывания с 2G4.

Второй расчет докинга выполняли с использованием HADDOCK. Ключевые остатки с-Kit, идентифицированные методом мутагенеза и ELISA, и все остатки, составляющие CDR 2G4, использовали в качестве ограничений. Модель докинга, рассчитанная HADDOCK, показала, что относительная ориентация и интерфейс связывания между 2G4 и с-Kit (т.е. CDR петля 2G4 и D2/D3 область с-Kit) были аналогичны таковым в модели, рассчитанной ZDOCK. В структурной модели комплекса 2G4 Fab:с-Kit с наивысшей оценкой было подтверждено, что тяжелая цепь 2G4 и D2-D3 область с-Kit были тесно связаны (Фиг. 14d). В частности, интерфейс связывания между 2G4 Fab и с-Kit в основном формируется электростатическими взаимодействиями между CDR тяжелой цепи 2G4 и D2 областью с-Kit. Было показано, что основные аминокислоты с-Kit, включая R122, R181, K203 и R205, взаимодействуют с отрицательно заряженными остатками 2G4 (D74H, E119H, D120H, E123H и D126H) (Фиг. 14e). Дополнительные взаимодействия между S261 и H263 области D3 с-Kit и остатками легкой цепи (D82L, Q118L, T119L) 2G4 также способствовали образованию комплекса (Фиг. 14e).

Путем вышеуказанного расчета докинга было доказано, что 2G4 связывается с R122, Y125, R181, K203, R205, S261 и H263 в области D2/3 с-Kit.

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает конъюгат антитело-лекарственное средство, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с с-Kit. В некоторых вариантах осуществления конъюгата антитело-лекарственное средство, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с доменами 1-3 с-Kit человека (SEQ ID NO: 12), более

конкретно с доменом 2/3 с-Kit человека (SEQ ID NO: 11), еще более конкретно с областью R122-R205 домена 2 с-Kit человека (SEQ ID NO: 9) и областью S240-H263 домена 3 (SEQ ID NO: 10), наиболее конкретно с эпитопами R122, Y125, R181, K203, R205, S261 и H263 домена 2/3 с-Kit человека.

Используемый в настоящей заявке термин "моноклональное антитело" относится к антителу, которое проявляет единственную специфичность связывания и аффинность к определенному эпитопу, или к композиции антител, в которой все антитела проявляют единственную специфичность связывания и аффинность к определенному эпитопу. Таким образом, термин "моноклональное антитело человека" относится к антителу или композиции антител, которое проявляет единственную специфичность связывания и имеет переменные и неопределяемые константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. В одном варианте осуществления человеческое моноклональное антитело продуцируется гибридомой, которая включает В-клетки, полученные от трансгенного животного, не являющегося человеком, например, трансгенной мыши с геномом, содержащим трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи, слитые с иммортализованными клетками.

Термин "рекомбинантное человеческое антитело" включает все человеческие антитела, полученные, экспрессированные, продуцируемые или выделенные рекомбинантными способами, такие как (a) антитело, выделенное у животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным для гена человеческого иммуноглобулина, или гибридома, полученная от него, (b) антитело, выделенное из клеток-хозяев, трансформированных для экспрессии антител, например из трансфектом, (c) антитело, выделенное из рекомбинантных, комбинаторных библиотек человеческих антител, и (d) антитело, полученное, экспрессированное, продуцируемое или выделенное любым другим способом, включающим сплайсинг последовательности гена человеческого иммуноглобулина с другой последовательностью ДНК. Эти рекомбинантные человеческие антитела кодируются генами зародышевой линии, но содержат переменные и константные области, использующие специфические последовательности иммуноглобулинов зародышевой линии человека, включая последующие перестройки и мутации, которые происходят, например, во время созревания антител. Как известно в данной области (см., например, Lonberg (2005) *Nature Biotech.* 23(9): 1117-1125), переменная область содержит антигенсвязывающий домен, кодируемый различными генами, которые перестраиваются для формирования антител, специфичных к чужеродным антигенам. В дополнение к перестройкам переменная область может быть дополнительно модифицирована множественными изменениями отдельных аминокислот (соматические мутации или гипермутации) для повышения аффинности антитела к чужеродным антигенам. Константная область изменится при последующем ответе на антиген (т.е. переключение изотипа). Таким образом, перестроенная и соматически мутировавшая молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептиды легкой и тяжелой цепи иммуноглобулина в ответ на антиген,

может не иметь идентичности последовательности с исходной молекулой нуклеиновой кислоты, но вместо этого будет в значительной степени идентичной или схожей (т.е. имеет идентичность по меньшей мере 80%).

Термин "человеческое" антитело (HuMAb) относится к антителу с переменными областями, в которых как каркасные, так и CDR области получены из последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека. Кроме того, если антитело содержит константную область, константная область также получена из последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека. Представленное в настоящей заявке антитело может содержать аминокислотные остатки, которые не кодируются последовательностью иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные в результате случайного или сайт-направленного мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*). Однако термин "человеческое антитело" не включает антитело, в котором последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, были привиты на человеческие каркасные последовательности. Термины "человеческое" антитело и "полностью человеческое" антитело используются как синонимы.

Термин "гуманизированное антитело" относится к антителу, в котором некоторые, большинство или все аминокислоты за пределами CDR доменов нечеловеческого антитела заменены соответствующими аминокислотами, происходящими из иммуноглобулина человека. В одном варианте осуществления гуманизированной формы антитела некоторые, большинство или все аминокислоты за пределами CDR доменов заменены аминокислотами из иммуноглобулина человека, и некоторые, большинство или все аминокислоты в пределах одной или нескольких CDR-областей остаются интактными. Добавления, делеции, вставки, замены или модификации аминокислот допускаются, если они не устраняют способность антитела связываться со специфическим антигеном. "Гуманизированное" антитело обладает антигенной специфичностью, аналогичной специфичности исходного антитела.

Термин "химерное антитело" относится к антителу, переменная область которого получена от одного вида, а константная область получена от другого вида, например, к антителу, переменная область которого получена из мышинового антитела, а константная область получена из человеческого антитела.

Используемый в настоящей заявке термин "перекрестно реагирует" относится к способности антитела, представленного в настоящей заявке, связываться с с-Kit от разных видов. Например, представленное в настоящей заявке антитело, которое связывается с с-Kit человека также может связываться с с-Kit от других видов (например, с-Kit мыши). Эту перекрестную реактивность можно измерить путем детекции специфической реактивности с очищенным антигеном в анализе связывания (например, SPR, ELISA) или путем детекции связывания или функционального взаимодействия с клетками, которые физиологически экспрессируют с-Kit. Методы определения перекрестной реактивности включают стандартные анализы связывания, раскрытые в настоящей заявке, такие как

метод поверхностного плазмонного резонанса (SPR) BIACORE® с использованием устройства BIACORE® 2000 SPR (Biacore AB, Uppsala, Sweden), или методы проточной цитометрии.

Термин "консервативная аминокислотная замена" относится к замене аминокислотного остатка на аминокислотный остаток, имеющий подобную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков со сходными боковыми цепями определены в данной области. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). В некоторых вариантах осуществления ожидаемый неэссенциальный аминокислотный остаток в анти-c-Kit антителе заменен другим аминокислотным остатком из того же семейства боковых цепей. Методы идентификации консервативных замен нуклеотидов и аминокислот, которые не нарушают связывание антигена, хорошо известны в данной области (см., например, Brummell et al., *Biochem.* 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi et al. *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); и Burks et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)).

Термин "существенная гомология" указывает на то, что два полипептида или их указанные последовательности идентичны при оптимальном выравнивании и сравнении, при этом по меньшей мере около 80% аминокислот, по меньшей мере около 90-95% или по меньшей мере около 98-99,5% аминокислот идентичны, а оставшиеся аминокислоты имеют соответствующую аминокислотную вставку или делецию.

Процент идентичности между двумя последовательностями представляет собой функцию числа идентичных положений, общих для последовательностей, с учетом числа гэпов и длины каждого гэта, которые должны быть введены для оптимального выравнивания двух последовательностей (т.е. $\% \text{ гомологии} = \frac{\# \text{ идентичных положений}}{\text{общее } \# \text{ положений}} \times 100$). Сравнение последовательностей и процент идентичности между двумя последовательностями можно определить с использованием математических алгоритмов, таких как описанные в неограничивающих примерах ниже.

Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с использованием алгоритма Нидлмана и Вунша (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)), интегрированного в программу GAP пакета программ GCG (доступного на <http://www.gcg.com>), который использует матрицу Blossum 62 или матрицу PAM250 и штраф за открытие гэта 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4, и штраф за удлинение гэта 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Последовательности нуклеиновых кислот и белков, представленные в настоящей заявке, можно использовать, например, в качестве "запрашиваемых последовательностей"

для выполнения поиска в общедоступных базах данных с целью идентификации родственных последовательностей. Эти поиски могут быть выполнены с использованием программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0) из Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Поиск нуклеотидов BLAST может быть выполнен с использованием программы NBLAST, оценка=100, длина слова=12, что приводит к нуклеотидным последовательностям, гомологичным молекулам нуклеиновых кислот, представленным в настоящей заявке. Поиск белков BLAST может быть выполнен с использованием программы XBLAST, оценка=50, длина слова=3, что приводит к аминокислотным последовательностям, гомологичным молекулам белков, представленным в настоящей заявке. Для получения выравниваний с гэпом для целей сравнения можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать переменные по умолчанию для каждой программы (например, XBLAST и NBLAST) (см., worldwideweb.ncbi.nlm.nih.gov).

Используемый в настоящей заявке термин "связанный" относится к ассоциации двух или более молекул. Связь может быть ковалентной или нековалентной. Связь также может быть генетической (т.е. рекомбинантно слитой) связью. Такие связи могут быть достигнуты с использованием различных признанных в данной области методов, таких как химическая конъюгация и продукция рекомбинантного белка.

Используемый в настоящей заявке термин "конъюгат антитело-лекарственное средство" относится к связыванию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с другим агентом, таким как противораковое средство, химиотерапевтическое средство, токсин, иммунотерапевтическое средство, зонд для визуализации, спектроскопический зонд и т.п. Эта связь может быть ковалентной связью или нековалентным взаимодействием, таким как взаимодействие посредством электростатических сил. Для образования конъюгата антитело-лекарственное средство можно использовать множество линкеров, известных в данной области. Кроме того, конъюгат антитело-лекарственное средство может быть представлен в форме слитого белка, который может быть экспрессирован из полинуклеотида, кодирующего конъюгат антитело-лекарственное средство. Используемый в настоящей заявке термин "слитый белок" относится к белку, полученному путем связывания двух или более генов или фрагментов генов, которые изначально кодируют отдельные белки (включая пептиды и полипептиды). Трансляция гибридного гена приводит к образованию одного белка с функциональными свойствами, полученными от каждого из исходных белков.

Используемый в настоящей заявке термин "спейсер" относится к веществу, которое служит для предотвращения агрегации конъюгата антитело-лекарственное средство в кровотоке и обеспечивает стабильность в кровотоке и целевые фармакокинетические свойства.

Используемый в настоящей заявке термин "линкер" представляет собой любой химический компонент, который может связывать антитело, фрагмент антитела

(например, антигенсвязывающий фрагмент) или функциональный эквивалент с другим компонентом, таким как лекарственный компонент. В условиях, когда соединение или антитело все еще активно, линкер может быть подвержен расщеплению, такому как расщепление под действием кислоты, расщепление под действием света, расщепление под действием пептидазы, расщепление под действием эстеразы и расщепление дисульфидной связи (расщепляемый линкер). Альтернативно, линкер может быть по существу устойчивым к расщеплению (например, стабильный линкер или нерасщепляемый линкер). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой прозаряженный линкер, гидрофильный линкер или линкер на основе дикарбоновой кислоты.

Термин "нерасщепляемый линкер" имеет относительно высокую стабильность в плазме и устойчив к протеолизу. После введения в клетку антитело должно расщепляться, чтобы высвободить лекарственное средство в форме комплекса с линкером, и этот комплекс обладает лекарственной активностью. Тиоэфирный линкер является типичным нерасщепляемым линкером, который позволяет высвободить лекарственное средство после того, как антитело неселективно расщепляется внутри клетки. Для Kadcyra® используется нерасщепляемая форма.

Термин "расщепляемый линкер" относится к линкеру, который может расщепляться в ответ на определенные факторы окружающей среды для высвобождения лекарственного средства в цитоплазму. Существует два типа расщепляемых форм: расщепляемая ферментом форма и нерасщепляемая ферментом форма.

Расщепляемая ферментом форма расщепляется такими ферментами, как катепсин В, β -глюкуронидаза, фосфатаза, пиропфосфатаза и сульфатаза. Пептидный линкер разрушается протеолитическими ферментами, а ингибиторы протеолитических ферментов присутствуют в плазме, что приводит к высокой стабильности плазмы. Катепсин В является типичным протеолитическим ферментом, используемым в конъюгатах антитело-лекарственное средство, и катепсин В присутствует на высоком уровне в опухолевой ткани, обеспечивая опухолевую селективность конъюгатов антитело-лекарственное средство. Пептидный линкер может быть в основном дипептидом, в котором две аминокислоты являются связанными. β -глюкуронидный линкер разрушается β -глюкуронидазой, гликолитическим ферментом, присутствующим в лизосомах. β -глюкуронидаза сверхэкспрессируется в некоторых опухолевых клетках, что придает ей опухолевую специфичность.

Нерасщепляемые ферментом формы включают кислотолабильный линкер и линкер окислительно-восстановительной реакции.

Кислотолабильный линкер представляет собой линкер с относительно низкой стабильностью, который был разработан в самом начале, но все еще используется. Типичным примером является гидразоновый линкер, который интернализуется в опухолевых клетках, а затем гидролизуется в слегка кислой среде эндосом или лизосом для высвобождения лекарственного средства.

Типичный линкер окислительно-восстановительной реакции представляет собой

дисульфидный линкер. После интернализации линкер разрушается в результате дисульфидного обмена или под действием восстанавливающих агентов, таких как глутатион, для высвобождения цитотоксических лекарственных средств. Концентрация глутатиона в гипоксических опухолевых клетках примерно в 1000 раз выше, чем в нормальных клетках, что обеспечивает селективность ADC к опухолевым клеткам.

Прозаряженный линкер получают из заряженных сшивающих реагентов, которые сохраняют заряд после включения в конъюгат антитело-лекарственное средство. Пример прозаряженного линкера можно найти в публикации патентной заявки США № 2009/0274713.

II. Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC)

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение обеспечивает конъюгат антитело-лекарственное средство следующей формулы 1:

<Формула 1>

$Ab-(L)_x-(D)_y$

в формуле:

Ab представляет собой анти-c-Kit антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с эпитопом c-Kit человека в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10;

L представляет собой линкер, включающий расщепляемый линкер;

D представляет собой лекарственный компонент;

x представляет собой целое число от 1 до 8; и

y представляет собой целое число от 1 до 8.

В некоторых вариантах осуществления Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с одним или несколькими из R122, Y125, R181, K203, R205, S261 и H263 в SEQ ID NO: 12. Предпочтительно Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с R122, Y125, R181, K203, R205, S261 и H263 в SEQ ID NO: 12. При этом, SEQ ID NO: 12 представляет собой последовательность доменов 1-3 (Q26 - D309) c-Kit человека, исключая 25 аминокислот сигнального пептида, а номер каждой аминокислоты представляет собой номер с включением 25 аминокислот сигнального пептида. Соответственно, например, R122 относится к 97-й аминокислоте последовательности SEQ ID NO: 12, Y125 относится к 100-й аминокислоте последовательности, и оставшиеся аминокислоты также могут быть интерпретированы таким же образом.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент перекрестно конкурирует за связывание с эпитопом c-Kit человека в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 с эталонным антителом, включающим CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 2, CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 3, CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 4, CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 5 и CDR3 легкой цепи SEQ ID

NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент перекрестно конкурирует за связывание с эпитопом с-Kit человека в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 с эталонным антителом, включающим переменный домен тяжелой цепи, представленный SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи, представленный SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 2, CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 3, CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 4, CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 5 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает переменный домен тяжелой цепи, представленный SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи, представленный SEQ ID NO: 8.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может иметь одну или две аминокислоты в CDR, которые модифицированы, удалены или заменены, но не ограничивается этим.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут сохранять идентичность по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% на всем протяжении переменной области тяжелой цепи или переменной области легкой цепи.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой моноклональное антитело, химерное антитело, гуманизованное антитело, человеческое сконструированное антитело, человеческое антитело, одноцепочечное антитело (scFv) или фрагмент антитела.

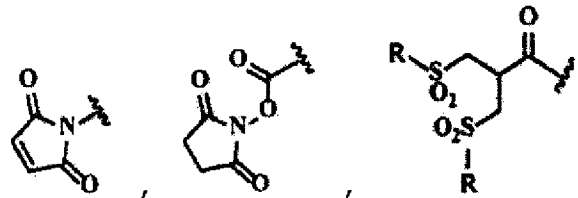
В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может иметь значение равновесной константы диссоциации K_D для с-Kit человека 10^{-11} М или менее, в частности, например, около $2,8237 (\pm 0,9) \times 10^{-12}$ М.

Расщепляемый линкер включает линкер, выбранный из группы, состоящей из линкеров валин-цитруллин-п-аминобензилкарбамоил (Val-Cit-PAB), аланин-фенилаланин-п-аминобензилкарбамоил (Ala-Phe-PAB), аланин-аланин-п-аминобензилкарбамоил (Ala-Ala-PAB), валин-аланин-п-аминобензилкарбамоил (Val-Ala-PAB), фенилаланин-лизин-п-аминобензилкарбамоил (Phe-Lys-PAB), аланин-аланин-глицин-п-аминобензилкарбамоил (Ala-Ala-Gly-PAB) и глицин-глицин-глицин-п-аминобензилкарбамоил (Gly-Gly-Gly-PAB), но не ограничивается этим.

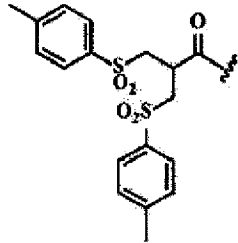
L может включать спейсер в форме, в которой полимер связан или не связан.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения L представляет собой линкер, включая линкер, полученный из сшивающего реагента, включающего

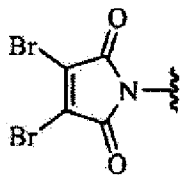
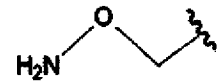
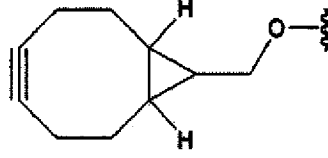
заместитель, выбранный из группы, состоящей



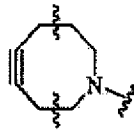
, (например,



),



и



. В одном варианте осуществления, когда


линкер получают с использованием сшивающего реагента, включающего заместитель



(например,

), например, линкер может включать

дисульфидный мостик, соединяющий два цистеиновый остатка, например, при использовании технологии ThioBridge[®] (Abzena).

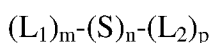
В представленной выше формуле волнистая линия () представляет собой сайт, где связывается другой линкер, или S, или D.

R может представлять собой водород, галоген, замещенный или незамещенный C₁-C₆ алкил, C₁-C₆ алкокси, C₁-C₄ галогеналкил, C₁-C₄ галогеналкокси, циано, нитро, фенил, толуол или галогенфенил.

В некоторых вариантах осуществления L представляет собой линкер, включающий спейсер в форме, в которой полимер связан или не связан.

В некоторых вариантах осуществления L включает структуру следующей формулы 2:

<Формула 2>



в формуле:

L₁ представляет собой линкер, соединяющий Ab и S или Ab и L₂;

S представляет собой спейсер в форме, в которой полимер связан или не связан;

L₂ представляет собой расщепляемый линкер;

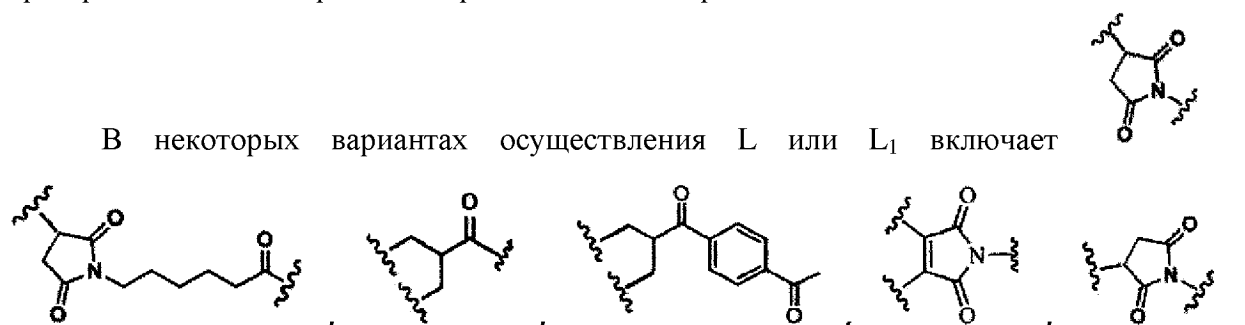
m представляет собой целое число от 0 до 8;

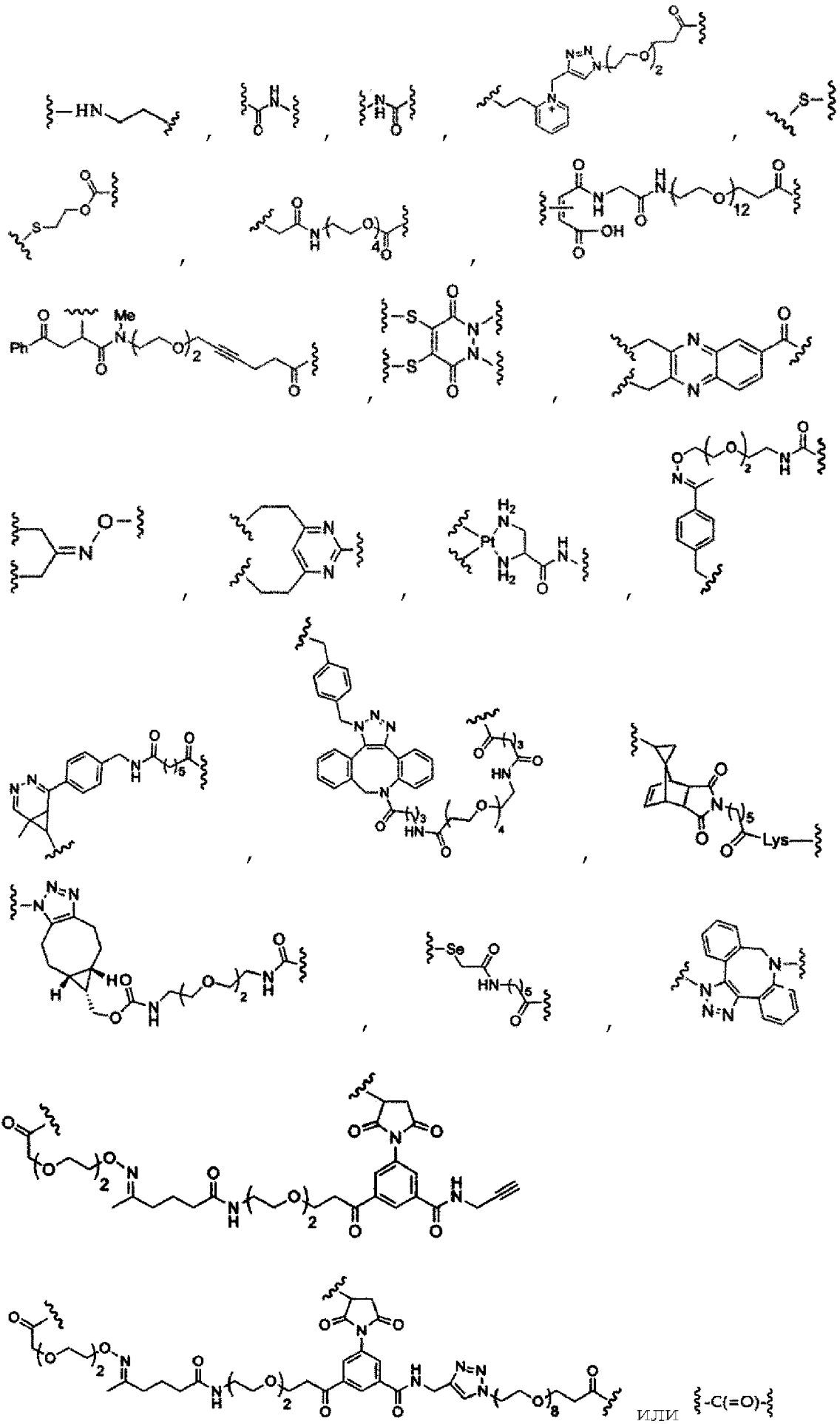
n представляет собой целое число от 0 до 8; и


r представляет собой целое число от 1 до 8.

В некоторых вариантах осуществления m имеет значение от 1 до 4, n имеет значение от 1 до 4 и r имеет значение от 1 до 4.

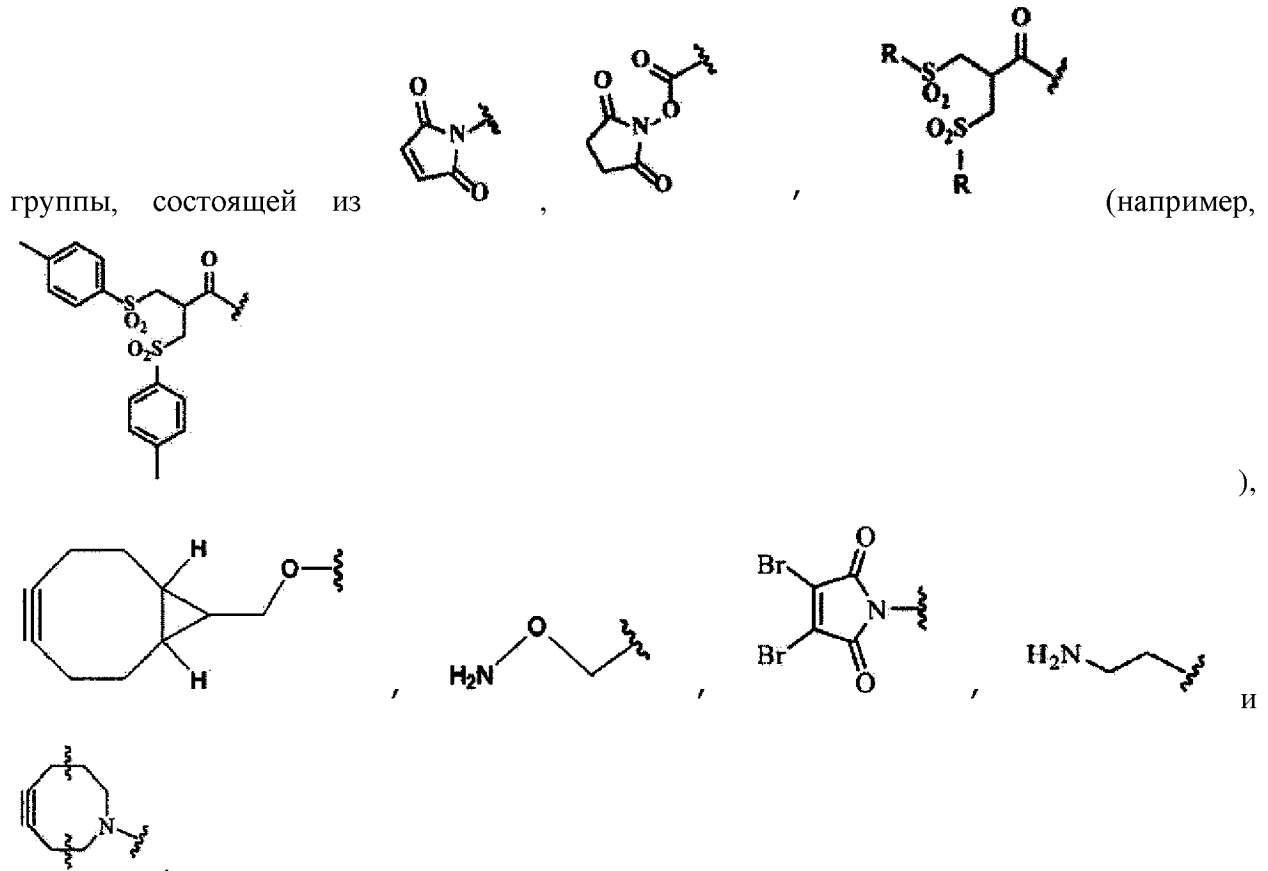
В некоторых вариантах осуществления L_1 включает линкер, выбранный из группы, состоящей из расщепляемого линкера, нерасщепляемого линкера, гидрофильного линкера, прозаряженного линкера и линкера на основе дикарбоновой кислоты.






В представленной выше формуле волнистая линия () представляет собой сайт, где связывается Ab или S, L₂ или D.

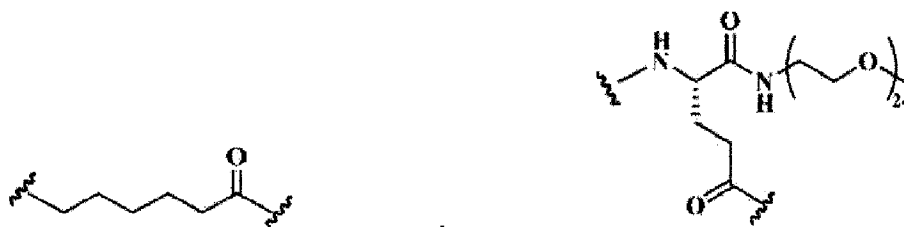
В некоторых вариантах осуществления L₁ представляет собой линкер включая линкер, полученный из сшивающего реагента, включающего заместитель, выбранный из

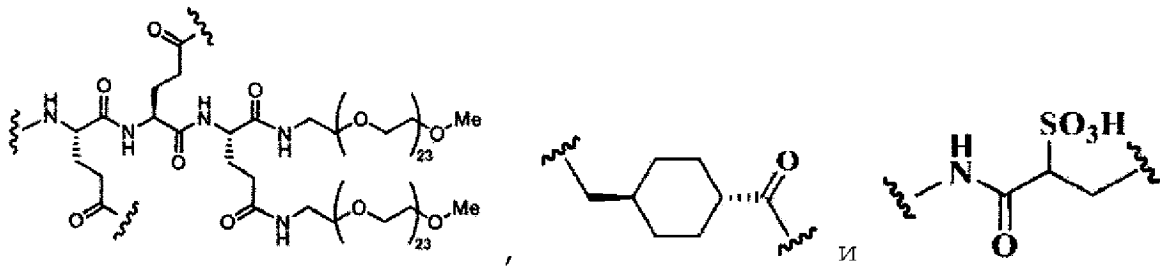


В представленной выше формуле, волнистая линия () представляет собой сайт, где связывается S.

R может представлять собой водород, галоген, замещенный или незамещенный C₁-C₆ алкил, C₁-C₆ алкокси, C₁-C₄ галогеналкил, C₁-C₄ галогеналкокси, циано, нитро, фенил, толуол или галогенфенил.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения S (спейсер) может быть выбран из группы, состоящей из





В представленной выше формуле волнистая линия (\sim) представляет собой сайт, где связывается L_1 или L_2 , и предпочтительно L_1 связывается с левой волнистой линией, а L_2 связывается с правой волнистой линией.

В некоторых вариантах осуществления S может представлять собой спейсер, включающий аспарат, глутамат или их комбинацию, в форме, в которой полимер связан или не связан.

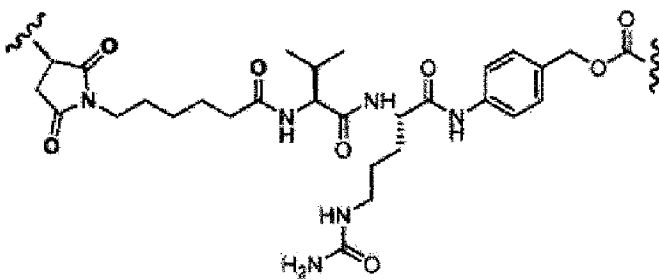
В качестве примера полимера можно использовать, но не ограничиваясь этим, полиалкилен, полиалкиленгликоль, поливинилпирролидон, полиакрилат, полиоксазолин, поливиниловый спирт, полиакриламид или полиметакриламид, сополимер НРМА, полиэфир, полиацеталь, поли(ортоэфир), поликарбонат, поли(иминокарбонат), полиамид, сополимер дивинилэфира-малеинового ангидрида или стирола-малеинового ангидрида, полисахарид или полиглутаминовую кислоту и т.д.

В некоторых вариантах осуществления полимер представляет собой полиэтилен или полиэтиленгликоль.

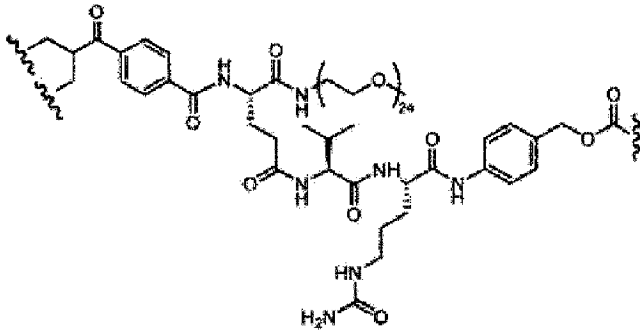
Полиэтиленгликоль может включать 10-30, например 24 этиленгликолевых звена ($-O-CH_2-CH_2-$).

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения L включает линкер, выбранный из группы, состоящей из следующих формул 3-5:

<Формула 3>

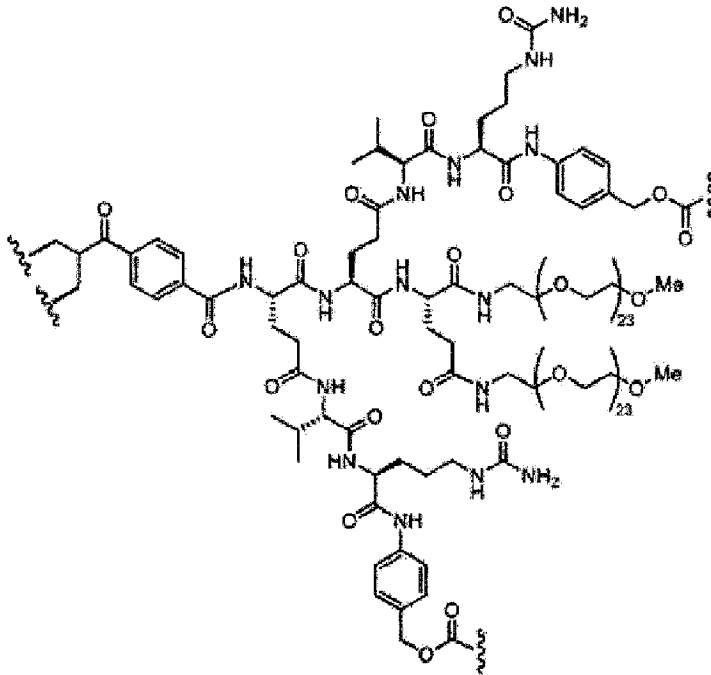



<Формула 4>



или

<Формула 5>



В представленной выше формуле, волнистая линия () представляет собой сайт, где связывается Ab или D, и предпочтительно Ab связывается с левой волнистой линией, а D связывается с правой волнистой линией.

D представляет собой лекарственный компонент и предпочтительно представляет собой компонент, выбранный из группы, состоящей из ингибитора V-АТФазы, промотора апоптоза, ингибитора Bcl2, ингибитора MCL1, ингибитора HSP90, ингибитора IAP, ингибитора mTog, ингибитора микротрубочек, ауристати́на, доластатина, майтанзиноида, MetAP (метионинаминопептидазы), ингибитора ядерного экспорта белка CRM1, ингибитора DPPIV, ингибитора протеасомы, ингибитора реакции переноса фосфорила в митохондриях, ингибитора синтеза белка, ингибитора киназы, ингибитора CDK2, ингибитора CDK9, ингибитора кинезина, ингибитора HDAC, повреждающего ДНК агента, алкилирующего ДНК агента, интеркалирующего ДНК агента, связующего малой бороздки ДНК и ингибитора DHFR.

Антитело, фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент) или функциональный эквивалент по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с

лекарственным компонентом, который модифицирует желаемый биологический ответ. Лекарственный компонент не следует рассматривать как ограниченный классическими химическими терапевтическими средствами. Например, лекарственный компонент может представлять собой белок, пептид или полипептид, который обладает желаемой биологической активностью. Такие белки могут включать, например, токсины, так как абрин, рицин А, экзотоксин *pseudomonas*, холерный токсин или дифтерийный токсин, белки, такие как фактор некроза опухоли, α -интерферон, β -интерферон, фактор роста нервов, тромбоцитарный фактор роста, активатор тканевого плазминогена, цитокин, апоптотическое средство, анти-ангиогенное средство или модификаторы биологического ответа, такие как лимфокин.

В некоторых вариантах осуществления антитело, фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент) или функциональный эквивалент по настоящему изобретению конъюгирован с лекарственным компонентом, таким как цитотоксин, лекарственное средство (например, иммуносупрессант) или радиотоксин. Примеры цитотоксинов также включают таксаны (см., например, международные патентные заявки (РСТ) №№ WO 01/38318 и РСТ/US03/02675), ДНК-алкилирующие средства (например, аналоги СС-1065), антрациклины, аналоги тубулизина, аналоги дуокармина, ауристин Е, ауристин F, майтанзиноилы и цитотоксические средства, включающие реактивный полиэтиленгликолевый компонент (см., например, литературу [Sasse et al., *J. Antibiot.* (Tokyo), 53, 879-85 (2000)], [Suzawa et al., *Bioorg. Med. Chem.*, 8, 2175-84 (2000)], [Ichimura et al., *J. Antibiot.* (Tokyo), 44, 1045-53 (1991)], [Francisco et al., *Blood* 2003 15;102(4):1458-65], патенты США №№ 5475092, 6340701, 6372738 и 6436931, патентную заявку США № 2001/0036923 А1, находящиеся на рассмотрении патентные заявки США с серийным номером 10/024290 и 10/116053 и международную патентную заявку (РСТ) № WO 01/49698), таксон, цитохалазин В, грамицидин D, этидий бромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, Т. колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрацендион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин, а также их аналоги или гомологи, но не ограничиваются этим.

Терапевтические средства также включают, например, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил декарбазин), алкилирующие средства (например, мехлорэтамин, тиотепа хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманнитол, стрептозотоцин, митомицин С и цис-дихлородиамины платины (II) (DDP) цисплатин, антрациклины (например, даунорубицин (ранее дауномицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (АМС)) и антимитотические средства (например, винкристин и винбластин) (см., например, Seattle Genetics US20090304721).

Другие примеры цитотоксинов, которые могут быть конъюгированы с антителом, фрагментом антитела (антигенсвязывающим фрагментом) или функциональным

эквивалентом по настоящему изобретению, включают дуокармицин, калихеамицин, майтанзин и ауристатин, а также их производные.

Способы конъюгации различных типов цитотоксинов, линкеров и терапевтических средств с антителами известны в данной области, и см., например, литературу [Saito et al., (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215]; [Trail et al., (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337]; [Payne, (2003) *Cancer Cell* 3:207-212]; [Allen, (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763]; [Pastan and Kreitman, (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091]; [Senter and Springer, (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264].

Антитело, фрагмент антитела (например, антигенсвязывающий фрагмент) или функциональный эквивалент по настоящему изобретению также могут быть конъюгированы с радиоизотопом для получения цитотоксических радиофармацевтических препаратов, называемых радиоиммуноконъюгатами. Примеры радиоизотопов, которые могут быть конъюгированы с антителами для диагностического или терапевтического использования, включают, но не ограничиваются этим, йод-131, индий-111, иттрий-90 и лютеций-177. Методы получения радиоиммуноконъюгатов установлены в данной области. Примеры радиоиммуноконъюгатов являются коммерчески доступными, включая Zevalin™ (IDEC Pharmaceuticals) и Vexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), и для получения радиоиммуноконъюгатов могут быть использованы аналогичные методы с использованием антител, раскрытых в настоящей заявке. В некоторых аспектах макроциклический хелатор представляет собой 1,4,7,10-тетраазациклододекан-N, N',N'',N'''-тетрауксусную кислоту (DOTA), которая может быть присоединена к антителу через линкерную молекулу. Такие линкерные молекулы общеизвестны в данной области и описаны в литературе [Denardo et al., (1998) *Clin Cancer Res.* 4(10):2483-90]; [Peterson et al., (1999) *Bioconjug. Chem.* 10(4):553-7]; и [Zimmerman et al., (1999) *Nucl. Med. Biol.* 26(8):943-50] (каждый включен посредством ссылки во всей полноте).

В некоторых вариантах осуществления D представляет собой компонент, являющийся ингибитором микротрубочек (MTI).

Ингибитор микротрубочек может включать, предпочтительно, лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из SN-38 ((4S)-4,11-диэтил-4,9-дигидрокси-1,4-дигидро-3H,14H-пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-3,14-диона), ауристатина, доластатина, монометилауристатина E (ММАЕ), монометилауристатина F (ММАF), монометилдоластатина 10 (ММАД) или их комбинации, но не ограничивается этим.

SN-38 предотвращает деление клеток, ингибируя ДНК-изомеразу I (ДНК-топоизомеразу I). Он менее активен по сравнению с ранее используемыми препаратами, поэтому у него меньше побочных эффектов, и его можно использовать для повышения эффективности конъюгата антитело-лекарство по сравнению с побочными эффектами за счет повышения DAR.

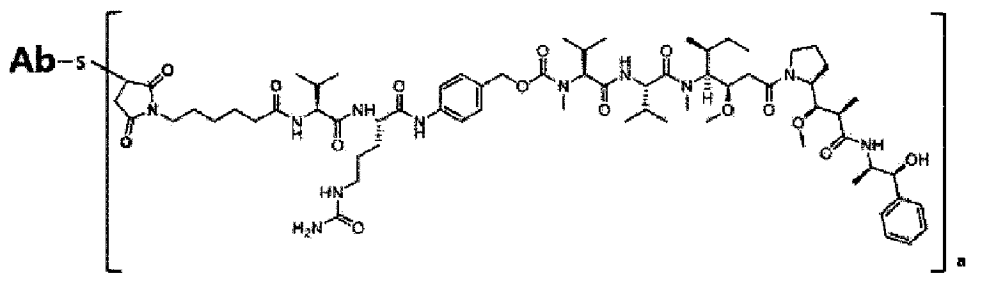
Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент предпочтительно связывается специфически с эпитопом домена 2/3 человеческого c-Kit, представленного SEQ ID NO:

11 (т.е. D113-D309), более предпочтительно связывается специфически с эпитопом домена 2 человеческого c-Kit, представленного SEQ ID NO: 9 (т.е. R122-R205) и/или домена 3 человеческого c-Kit, представленного SEQ ID NO: 10 (т.е. S240-H263), еще более предпочтительно связывается специфически одним или более аминокислотными остатками, выбранными из группы, состоящей из R122, Y125, R181, K203 и R205, в SEQ ID NO: 9, и/или одним или более аминокислотными остатками, выбранными из группы, состоящей из S261 и H263, в SEQ ID NO: 10.

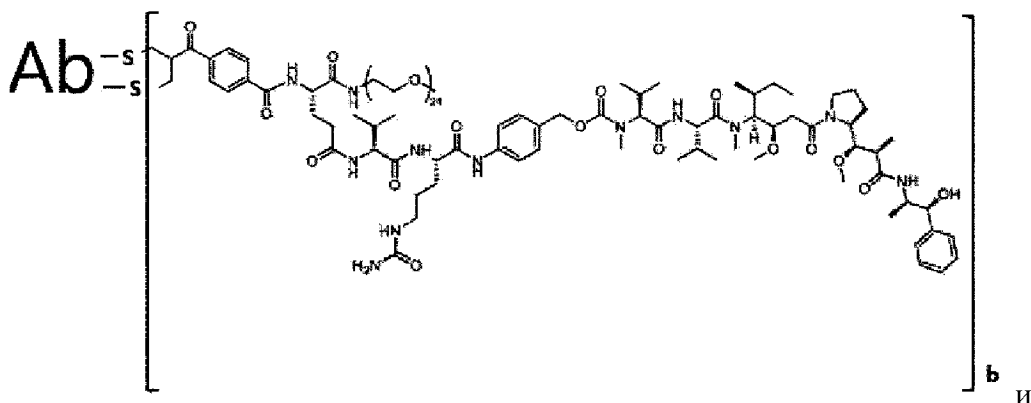
В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент перекрестно конкурирует за связывание с эпитопом домена 2/3 человеческого c-Kit в SEQ ID NO: 11 (т.е. D113-D309) с эталонным антителом, включающим переменный домен тяжелой цепи, представленный SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи, представленный SEQ ID NO: 8.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения конъюгат антитело-лекарственное средство выбран из группы, состоящей из следующих формул 6-8:

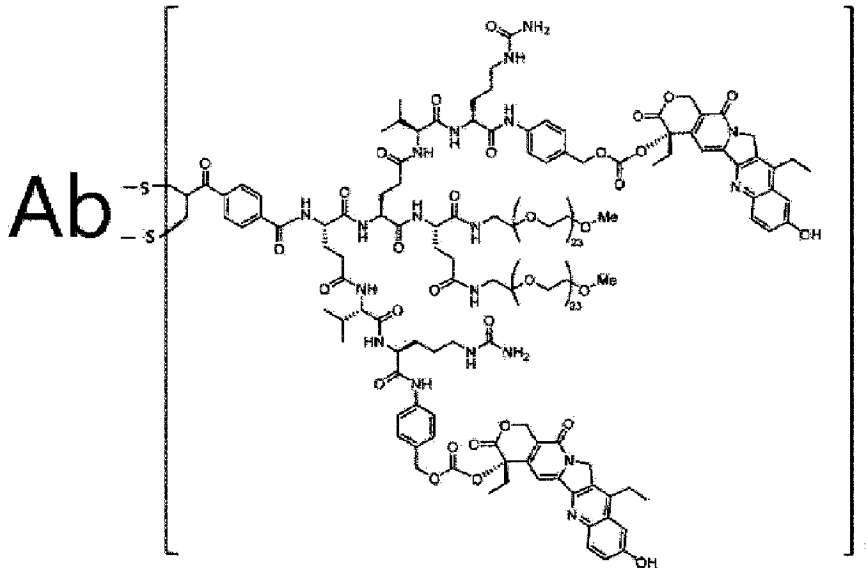
<Формула 6>



<Формула 7>



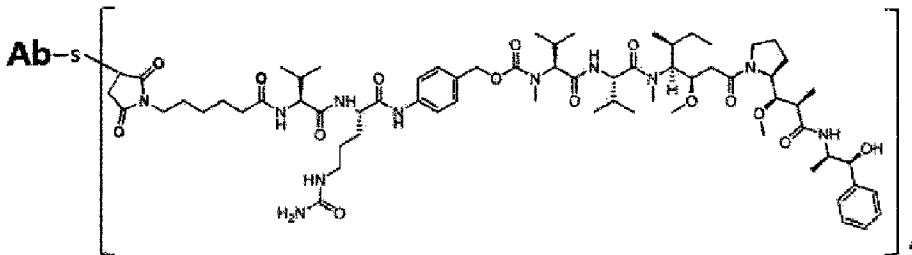
<Формула 8>



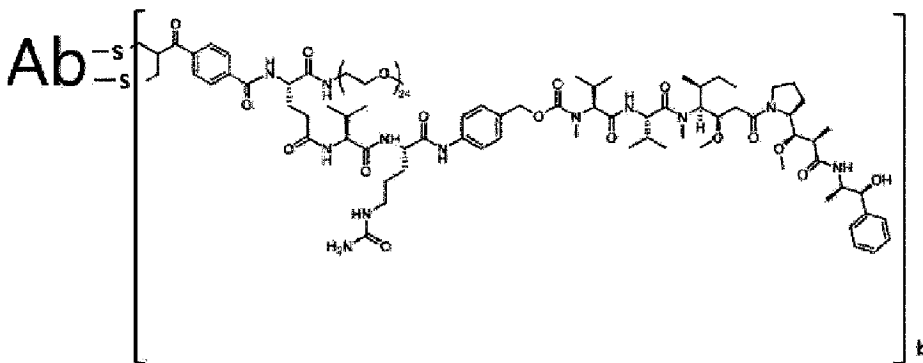
В формулах **a** представляет собой целое число от 1 до 8, каждый из **b** и **c** представляет собой целое число от 1 до 4.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение обеспечивает конъюгат антитело-лекарственное средство, выбранный из группы, состоящей из следующих формул 6-8:

<Формула 6>

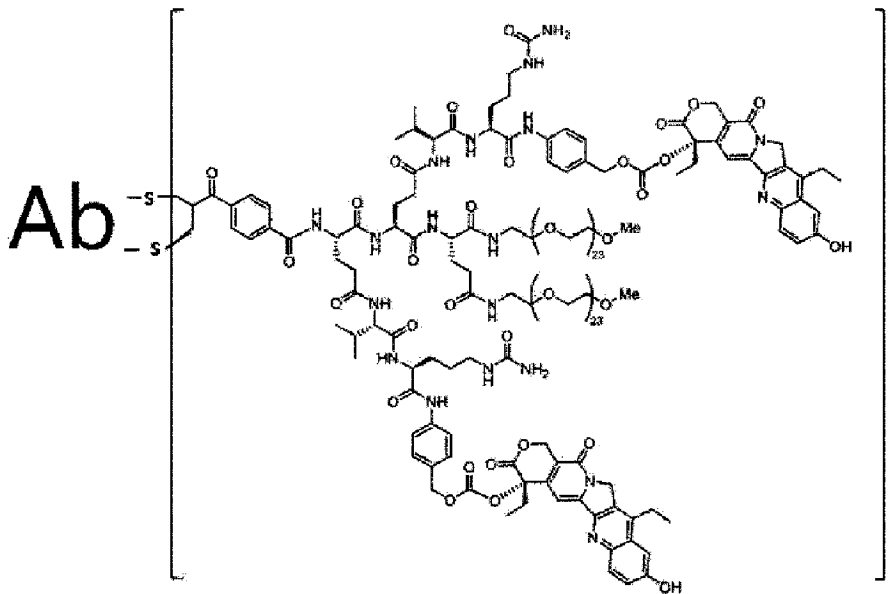


<Формула 7>



и

<Формула 8>



в формулах

Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 2, CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 3, CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 4, CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 5 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 6; и

a представляет собой целое число от 1 до 8, и каждый из b и c представляет собой целое число от 1 до 4.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру формулы 7, и b имеет значение 2.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру формулы 7, и b имеет значение 4.

III. Композиция

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение обеспечивает композицию, включающую конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемую соль.

В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию для профилактики или лечения рака.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение обеспечивает применение композиции для использования в терапии.

В некоторых вариантах осуществления применение направлено на лечение рака.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение обеспечивает применение фармацевтической композиции для изготовления лекарственного средства.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения настоящее изобретение обеспечивает способ профилактики или лечения рака, включающий введение композиции нуждающемуся в этом субъекту.

В настоящей заявке раскрыт способ для лечения опухоли (или рака) у субъекта, при этом способ включает субъекту введение конъюгата антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство специфически связывается с белком c-Kit и уменьшает активность c-Kit.

В некоторых вариантах осуществления способ, раскрытый в настоящей заявке, ингибирует и/или уменьшает рост опухоли у субъекта. В некоторых вариантах осуществления рост опухоли (например, объем или масса опухоли) уменьшается на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или вплоть до 100% по сравнению с контролем (например, соответствующим объемом или массой опухоли у субъекта, который не получал композицию, раскрытую в настоящей заявке, например конъюгат антитело-лекарственное средство). В некоторых вариантах осуществления способ, раскрытый в настоящей заявке, повышает средний уровень ингибирования роста опухоли (TGI) на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или вплоть до 100% по сравнению с контролем (например, соответствующей значению у субъекта, который не получал композицию, раскрытую в настоящей заявке, например конъюгат антитело-лекарственное средство). В некоторых вариантах осуществления введение композиции, раскрытой в настоящей заявке (например, конъюгата антитело-лекарственное средство), повышает средний уровень выживаемости на по меньшей мере 1 день, 2 дня, 3 дня, 4 дня, 5 дней, 6 дней или более по сравнению с контролем (например, соответствующим значением у субъекта, который не получал композицию, раскрытую в настоящей заявке, например конъюгат антитело-лекарственное средство).

В некоторых вариантах осуществления опухоли, которые можно лечить способом, раскрытым в настоящей заявке, происходят из раковых заболеваний, которые обычно реагируют на существующие противораковые средства, и раковых заболеваний, которые обычно не реагируют на существующие противораковые средства. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль или рак с гематологической злокачественностью (опухоль жидкой ткани).

Неограничивающие примеры рака, требующего лечения, включают плоскоклеточную карциному, мелкоклеточный рак легкого (SCLC), немелкоклеточный рак легкого, плоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), неплюскоклеточный NSCLC, рак желудочно-кишечного тракта, рак почки (например, светлоклеточную карциному), рак яичников, рак печени, колоректальный рак, рак эндометрия, рак почки (например, почечноклеточную карциному (RCC)), рак предстательной железы (например, гормонорефрактерную аденокарциному предстательной железы), рак щитовидной железы, рак поджелудочной железы, рак шейки

матки, рак желудка, рак мочевого пузыря, гепатоцеллюлярный рак, рак молочной железы, карциному толстой кишки и рак головы и шеи (или карциному), герминогенную опухоль, детскую саркому, назальные естественные киллеры, меланому (например, метастатическую злокачественную меланому, такую как кожная или внутриглазная злокачественная меланома), рак костей, рак кожи, рак матки, рак анальной области, тестикулярный рак, рак фаллопиевой трубы, рак эндометрия, рак шейки матки, рак влагалища, рак вульвы, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак толстой кишки, тучноклеточную опухоль, рак эндокринной системы, рак парашитовидной железы, рак надпочечника, саркому мягких тканей, рак уретры, рак половых органов, солидную опухоль у детей, рак мочеточника, рак почечной лоханки, ангиогенез опухолей, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпителиальный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, раковые заболевания, вызванные окружающей средой, в том числе вызванные асбестом, раковые заболевания, связанные с вирусами, или раковые заболевания вирусного происхождения (например, вирус папилломы человека (опухоли, связанные или вызванные HPV)), и гематологические злокачественные новообразования, происходящие из любой из двух основных линий клеток крови, т.е. миелоидных клеточных линий (которые продуцируют гранулоциты, эритроциты, тромбоциты, макрофаги и тучные клетки) или лимфоидных клеточных линий (которые продуцируют В, Т, НК и плазматические клетки), такие как все типы лейкоза, лимфомы и миеломы, например, острый, хронический, лимфоцитарный и/или миелоидный лейкоз, такой как острый лейкоз (ALL), острый миелоидный лейкоз (AML), хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL) и хронический миелоидный лейкоз (CML), недифференцированный AML (M0), миелобластный лейкоз (M1), миелобластный лейкоз (M2; с созреванием клеток), промиелоцитарный лейкоз (M3 или вариант M3 [M3V]), миеломоноцитарный лейкоз (M4 или вариант M4 с эозинофилией [M4E]), моноцитарный лейкоз (M5), эритролейкоз (M6), мегакариобластный лейкоз (M7), изолированная гранулоцитарная саркома и хлорома; лимфому, такую как лимфома Ходжкина (HL), неходжкинская лимфома (NHL), В-клеточные гематологические злокачественные новообразования, например В-клеточная лимфома, Т-клеточная лимфома, лимфоплазмоцитарная лимфома, моноцитарная В-клеточная лимфома, лимфома из лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой оболочкой (MALT), анапластическая (например, Ki 1+) крупноклеточная лимфома, Т-клеточная лимфома/лейкоз взрослых, лимфома из клеток мантийной зоны, ангиоиммунобластная Т-клеточная лимфома, сосудистая центральная лимфома, Т-клеточная лимфома кишечника, первичная медиастинальная В-клеточная лимфома, предшественник Т-лимфобластной лимфомы, Т-лимфобластный; и лимфому/лейкоз (T-Lbly/T-ALL), периферическую Т-клеточную лимфому, лимфобластную лимфому, посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание, истинную гистиоцитарную лимфому, первичную выпотную лимфому, В-клеточную лимфому, лимфобластную лимфому (LBL), гемопоэтические опухоли лимфоидной линии, острый лимфобластный лейкоз, диффузную В-клеточную крупноклеточную лимфому, лимфому Беркитта,

фолликулярную лимфому, диффузную гистиоцитарную лимфому (DHL), иммунобластную крупноклеточную лимфому, предшественник В-лимфобластной лимфомы, кожную Т-клеточную лимфому (CTLC) (также называемая грибовидным микозом или синдромом Сезари) и лимфоплазмочитарную лимфому (LPL) с макроглобулинемией Вальденстрема; миелому, такую как миелома IgG, миелома легких цепей, несекреторная миелома, бессимптомная множественная миелома (тлеющая миелома) (также называемая индолентной миеломой), солитарная плазмочитома и множественная миелома, хронический лимфолейкоз (CLL), пилочитарную лимфому; опухоли мезенхимального происхождения, включая гематопоэтические опухоли миелоидной линии, фибросаркому и рабдомиосаркому; семиномы, тератокарциномы, опухоли мезенхимального происхождения, включая фибросаркому, рабдомиосаркому и остеосаркому; и другие опухоли, включая меланому, пигментную ксеродерму, кератоакантому, семиному, фолликулярный рак щитовидной железы и тератокарциному, гематопоэтические опухоли лимфоидной линии, включая, но не ограничиваясь этим, Т-клетки и Т-клеточные новообразования, включая Т-клеточные расстройства, такие как Т-пролимфоцитарный лейкоз (Т-PLL), включая мелкоклеточный и церебральный клеточные типы; Т-клеточный крупнозернистый лимфоцитарный лейкоз (LGL); a/d Т-NHL гепатоспленическую лимфому; периферическую/посттимическую Т-клеточную лимфому (плеоморфный и иммунобластный подтипы); ангиоцентрическую (назальную) Т-клеточную лимфому; рак головы или шеи, рак почки, рак прямой кишки, рак щитовидной железы; острую миелоидную лимфому и любую их комбинацию.

Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения рак представляет собой один или несколько видов рака, выбранных из группы, состоящей из рака пищевода, рака желудка, GIST, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака легких, особенно SCLC, рака молочной железы, тучноклеточной опухоли и лейкоза, особенно AML.

В некоторых вариантах осуществления способ, раскрытый в настоящей заявке, может также использоваться для лечения метастатического рака, неоперабельного, рефрактерного рака (например, рака, который устойчив к традиционной терапии рака, например иммунотерапии, например терапии блокирующим PD-(L)1 антителом) и/или рецидивирующего рака. В некоторых вариантах осуществления способ, раскрытый в настоящей заявке, может использоваться для лечения рецидивирующего рака.

В некоторых вариантах осуществления способ, раскрытый в настоящей заявке, включает традиционную терапию рака, включая химиотерапию. Например, введение можно осуществлять в комбинации с иматинибом и другими ингибиторами пути c-KIT.

В некоторых вариантах осуществления способ, раскрытый в настоящей заявке, эффективно увеличивает период выживания субъекта (например, имеющего опухоль). Например, период выживания субъекта увеличивается на по меньшей мере примерно 1 месяц, по меньшей мере примерно 2 месяца, по меньшей мере примерно 3 месяца, по меньшей мере примерно 4 месяца, по меньшей мере примерно 5 месяцев, по меньшей

мере примерно 6 месяцев, по меньшей мере примерно 7 месяцев, по меньшей мере примерно 8 месяцев, по меньшей мере примерно 9 месяцев, по меньшей мере примерно 10 месяцев, по меньшей мере примерно 11 месяцев или по меньшей мере примерно 1 год или более по сравнению с контрольным субъектом (например, другим субъектом, не получавшим лечение композицией, раскрытой в настоящей заявке, например конъюгатом антитело-лекарственное средство). В другом варианте осуществления способ, раскрытый в настоящей заявке, увеличивает период выживания субъекта до уровня (примерно на 1 месяц больше, примерно на 2 месяца больше, примерно на 3 месяца больше, примерно на 4 месяца больше, примерно на 5 месяцев больше, примерно на 6 месяцев больше, примерно на 7 месяцев больше, примерно на 8 месяцев больше, примерно на 9 месяцев больше, примерно на 10 месяцев больше, примерно на 11 месяцев больше или примерно на 1 год больше), который больше периода выживания контрольного субъекта (например, другого субъекта, не получавшего лечение композицией, раскрытой в настоящей заявке, например конъюгатом антитело-лекарственное средство).

В некоторых вариантах осуществления способ по настоящему изобретению увеличивает время выживания субъекта без прогрессирования заболевания. Например, время выживания без прогрессирования заболевания у субъекта увеличивается на по меньшей мере примерно 1 месяц, по меньшей мере примерно 2 месяца, по меньшей мере примерно 3 месяца, по меньшей мере примерно 4 месяца, по меньшей мере примерно 5 месяцев, по меньшей мере примерно 6 месяцев, по меньшей мере примерно 7 месяцев, по меньшей мере примерно 8 месяцев, по меньшей мере примерно 9 месяцев, по меньшей мере примерно 10 месяцев, по меньшей мере примерно 11 месяцев или по меньшей мере примерно 1 год по сравнению с контрольным субъектом (например, другим субъектом, не получавшим лечение композицией, раскрытой в настоящей заявке, например конъюгатом антитело-лекарственное средство).

В некоторых вариантах осуществления способ, раскрытый в настоящей заявке, эффективно увеличивает частоту ответа в группе субъектов. Например, частота ответа в группе субъектов увеличивается на по меньшей мере около 2%, по меньшей мере около 3%, по меньшей мере около 4%, по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 99% или по меньшей мере около 100% по сравнению с контрольным субъектом (другим субъектом, не получавшим лечение композицией, раскрытой в настоящей заявке, например конъюгатом антитело-лекарственное средство).

В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению способом по изобретению, представляет собой отличное от человека животное, такое как крыса или

мышь. В некоторых вариантах осуществления субъект, подлежащий лечению способом по изобретению, представляет собой человека.

Настоящее изобретение также включает способ лечения рака у субъекта в комбинации с другими противораковыми средствами. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство, полезный в способе по настоящему изобретению, можно вводить в комбинированной терапии, то есть в комбинации по меньшей мере с одним другим противораковым средством и/или иммуномодулирующим средством, таким как стимулирующее (например, активирующее) Т-клетки средство. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство, полезный в способе по настоящему изобретению, можно вводить в комбинации с другими соединениями, лекарственными препаратами и/или средствами, используемыми при лечении рака. Такие соединения, лекарственные препараты и/или средства могут включать, например, химиотерапевтические средства, низкомолекулярные лекарственные средства или антитела, которые стимулируют иммунный ответ против рака. В некоторых вариантах осуществления раскрытый в настоящей заявке способ используют в комбинации со стандартными методами лечения (например, хирургией, облучением и химиотерапией). В других вариантах осуществления раскрытый в настоящей заявке способ используют в качестве поддерживающей терапии, например, терапии, предназначенной для предотвращения развития или рецидива опухоли.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство, раскрытый в настоящей заявке, можно использовать в комбинации с одним или несколькими дополнительными противораковыми средствами, включая иммунотерапию, химиотерапию, таргетную терапию, радиотерапию (лучевую терапию) или любую их комбинацию.

В настоящей заявке раскрыта композиция, включающая раскрытый в настоящей заявке конъюгат антитело-лекарственное средство с желаемой степенью чистоты в физиологически приемлемом носителе, эксципиенте или стабилизаторе (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Приемлемый носитель, эксципиент или стабилизатор нетоксичен для реципиента в используемой дозировке и концентрации и включает буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (например, октадецилдиметилбензиламмоний хлорид; гексаметоний хлорид; бензалконий хлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (менее примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулин; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как

натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN®, PLURONICS® или полиэтиленгликоль (PEG).

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает раскрытый в настоящей заявке конъюгат антитело-лекарственное средство в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает эффективное количество конъюгата антитело-лекарственное средство, раскрытого в настоящей заявке, и необязательно одного или более дополнительных профилактических или терапевтических средств в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство является единственным активным ингредиентом, включенным в фармацевтическую композицию. Фармацевтическая композиция, раскрытая в настоящей заявке, может быть полезной для уменьшения активности c-Kit и, таким образом, для лечения рака.

Фармацевтически приемлемые носители, используемые в парентеральных препаратах, включают водные носители, неводные носители, антибактериальные агенты, изотонические агенты, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие агенты, эмульгирующие агенты, секвестрирующие или хелатирующие агенты ионов металлов и другие фармацевтически приемлемые вещества. Примеры водных носителей включают хлорид натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, изотонический раствор декстрозы для инъекций, стерильную воду для инъекций, раствор Рингера с декстрозой и лактатом для инъекций. Неводные носители включают жирные масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло и арахисовое масло. Антибактериальные агенты в бактериостатической или фунгистатической концентрации могут быть добавлены в парентеральные препараты, упакованные в многодозовые контейнеры, включая фенол или крезол, ртуть-содержащие вещества, бензиловый спирт, хлорбутанол, метиловый и пропиловый эфир п-гидроксibenзойной кислоты, тимеросал, бензалконий хлорид и бензетоний хлорид. Изотонические агенты включают хлорид натрия и декстрозу. Буферы включают фосфат и цитрат. Антиоксиданты включают бисульфат натрия. Местные анестетики включают прокаин гидрохлорид. Суспендирующие и диспергирующие агенты включают натрий карбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу и поливинилпирролидон. Эмульгаторы включают полисорбат 80 (TWEEN® 80). Секвестрирующие или хелатирующие агенты для ионов металлов включают EDTA. Фармацевтические носители также включают этиловый спирт, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль для смешивающихся с водой носителей, а также гидроксид натрия, хлористоводородную кислоту, лимонную кислоту или молочную кислоту для регулирования pH.

Фармацевтическая композиция может быть сформулирована для соответствия любому пути введения субъекту. Конкретные примеры путей введения включают интраназальный, пероральный, парентеральный, интратекальный,

интрацеребровентрикулярный, легочный, подкожный или интравентрикулярный путь. Также предусматривается парентеральное введение, которое представляет собой подкожную, внутримышечную или внутривенную инъекцию. Инъекционные препараты могут быть получены в обычных формах, таких как жидкие растворы или суспензии, твердые формы, подходящие для получения раствора или суспензии в жидкости перед инъекцией, или эмульсии. Инъекционные препараты, растворы и эмульсии также содержат один или несколько эксципиентов. Подходящими эксципиентами являются, например, вода, физиологический раствор, декстроза, глицерин или этанол. Кроме того, при желании вводимая фармацевтическая композиция может также содержать небольшие количества нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие агенты или эмульгаторы, pH-буферные агенты, стабилизаторы, агенты, повышающие растворимость, и другие агенты, такие как ацетат натрия, сорбитан монолаурат, триэтаноламин олеат и циклодекстрин.

Препараты для парентерального введения конъюгата антитело-лекарственное средство включают стерильные готовые растворы для инъекций, стерильные сухие растворимые продукты, которые можно объединить с растворителем непосредственно перед использованием, включая таблетки для подкожных инъекций, такие как лиофилизированные порошки, стерильные готовые суспензии для инъекций, стерильные сухие нерастворимые продукты и стерильные эмульсии, которые можно объединить с носителем непосредственно перед использованием. Растворы могут быть водными или неводными.

Конъюгат антитело-лекарственное средство, раскрытый в настоящей заявке, или его фармацевтически приемлемая соль также могут быть сформулированы для нацеливания на определенные ткани, рецепторы или другие области тела субъекта, подлежащего лечению. Различные методы нацеливания известны рядовым специалистам в данной области. Такие методы нацеливания предполагаются для использования в композициях по настоящему изобретению. Неограничивающие примеры методов нацеливания см. в патентах США №№ 6316652, 6274552, 6271359, 6253872, 6139865, 6131570, 6120751, 6071495, 6060082, 6048736, 6039975, 6004534, 5985307, 5972366, 5900252, 5840674, 5759542 и 5709874. В некоторых вариантах осуществления раскрытый в настоящей заявке конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемую соль можно использовать для лечения рака.

Композиции, используемые для введения *in vivo*, могут быть стерилизованы. Например, их можно стерилизовать фильтрованием через стерильную фильтрационную мембрану.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящего изобретения обеспечивается композиция для диагностики рака, включающая конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемую соль.

IX. Набор

В настоящей заявке раскрыт набор, включающий один или более конъюгатов

антитело-лекарственное средство, раскрытых в настоящей заявке, или их фармацевтически приемлемых солей. В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке раскрыта фармацевтическая упаковка или набор, включающий один или более контейнеров, заполненных одним или несколькими из компонентов композиции, раскрытой в настоящей заявке, включающей один или более конъюгатов антитело-лекарственное средство, раскрытых в настоящей заявке, или их фармацевтически приемлемых солей и, необязательно, инструкции по применению. В некоторых вариантах осуществления набор содержит фармацевтическую композицию, раскрытую в настоящей заявке, и любое профилактическое или терапевтическое средство, раскрытое в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления набор раскрывается как композиция для диагностики рака, включающая композицию, раскрытую в настоящей заявке, и инструкции для способов детекции и/или диагностики.

В некоторых вариантах осуществления обеспечивается способ предоставления информации для диагностики рака, включающий: обработку образца, выделенного у субъекта, конъюгатом антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемой солью.

X. Способ получения

В настоящей заявке раскрыт способ получения одного или более конъюгатов анти-s-Kit антитело-лекарственное средство, раскрытых в настоящей заявке.

Конъюгат по настоящему изобретению можно получить любым способом, известным в данной области, таким как способы, описанные в патентах США №№ 7811572, 6411163, 7368565 и 8163888 и в публикациях патентных заявок США №№ 2011/0003969, 2011/0166319, 2012/0253021 и 2012/0259100. Полное содержание этих патентов и публикаций патентных заявок включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Кроме того, способы конъюгации различных типов цитотоксинов, линкеров и лекарственных средств с антителами известны в данной области, см., например, литературу (Saito et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215(2003); Trail et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337(2003); Payne, *Cancer Cell* 3:207-212(2003); Allen, *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763(2002); Pastan and Kreitman, *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091(2002); Senter and Springer, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264(2001)].

В некоторых вариантах осуществления способ получения включает: конъюгацию $(L_1)_m-(S)_n-(L_2)_p-(D)_q$ с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (Ab), которые специфически связываются с s-Kit человека:

в формуле:

L_1 представляет собой линкер, соединяющий Ab и S или Ab и L_2 ;

S представляет собой спейсер в форме, в которой полимер связан или не связан;

L_2 представляет собой расщепляемый линкер;

D представляет собой лекарственный компонент;

m представляет собой целое число от 0 до 8;

n представляет собой целое число от 0 до 8;
 p представляет собой целое число от 1 до 8; и
 q представляет собой целое число от 1 до 8.

Определения и соответствующие объяснения вышеуказанных терминов такие же, как описано в разделах I. Определение и II. Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC).

В некоторых вариантах осуществления способ получения представляет собой способ для получения конъюгата анти-c-Kit антитело-лекарственное средство, включающий: конъюгацию соединения линкер (L)-лекарственное средство (D) с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, включающим CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 2, CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 3, CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 4, CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 5 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 6, где L включает расщепляемый линкер.

В некоторых вариантах осуществления D представляет собой компонент, являющийся ингибитором микротрубочек.

В некоторых вариантах осуществления m имеет значение от 1 до 4, n имеет значение от 1 до 4, p имеет значение от 1 до 4 и q имеет значение от 1 до 8.

Эффекты изобретения

Отличительные признаки и преимущества настоящего изобретения являются следующими:

(i) Настоящее изобретение обеспечивает конъюгат антитело-лекарственное средство, включающий антитело, которое специфически связывается с c-Kit человека, расщепляемый линкер и компонент, представляющий собой ингибитор микротрубочек.

(ii) Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию для профилактики или лечения рака, включающую конъюгат антитело-лекарственное средство в качестве активного ингредиента.

(iii) Конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению обладает свойством индукции полной ремиссии за счет того, что он обладает сильной противораковой активностью против c-Kit-положительных и -отрицательных раковых клеточных линий и/или иматиниб-резистентных раковых клеточных линий.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 показывает способ для получения ADC с использованием расщепляемого линкера. Фиг. 1a показывает линкер-лекарственное средство, используемый в одном варианте осуществления, и Фиг. 1b схематически представляет способ получения для ThioBridge[®]-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u).

Фиг. 2 показывает результаты, полученные путем осуществления анализа жизнеспособности клеток *in vitro* для подтверждения эффективности ADC настоящего изобретения в c-Kit-положительных и -отрицательных раковых клеточных линиях.

Фиг. 3 показывает результаты, полученные путем подтверждения эффективности *in vivo* ADC настоящего изобретения против GIST у мышей (GIST T1 клетки) (Фиг. 3a

показывает результаты для PoC-DM1; Фиг. 3b показывает результаты для 003-1, 2G4 ThioBridge[®]-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) DAR 2; Фиг. 3c показывает результаты для 004-2, 2G4 ThioBridge[®]-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) DAR 4; и Фиг. 3d показывает результаты для 003-2, 2G4-МС-Val-Cit-PAB-MMAE).

Фиг. 4 показывает результаты, полученные путем подтверждения эффективности *in vivo* ADC настоящего изобретения против GIST у мышей (GIST-430/654 клетки). (Фиг. 4a показывает результаты для PoC-DM1; Фиг. 4b показывает результаты для 003-1, 2G4 ThioBridge[®]-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) DAR 2; Фиг. 4c показывает результаты для 004-2, 2G4 ThioBridge[®]-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) DAR 4; Фиг. 4d показывает результаты для 003-2, 2G4-МС-Val-Cit-PAB-MMAE; и Фиг. 4e показывает результаты для 007-1, 2G4-ThioBridge[®]-Glu-[(Val-Cit-PAB-SN-38)]2-Glu-[PEG(24u)]2).

Фиг. 5 показывает результаты, полученные путем подтверждения эффективности *in vivo* ADC настоящего изобретения против SCLC у мышей (SCLC-H526 клетки) (Фиг. 5a показывает результаты для PoC-DM1; Фиг. 5b показывает результаты для 003-1, 2G4 ThioBridge[®]-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) DAR 2; Фиг. 5c показывает результаты для 004-2, 2G4 ThioBridge[®]-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) DAR 4; и Фиг. 5d показывает результаты для 003-2, 2G4-МС-Val-Cit-PAB-MMAE).

Фиг. 6 показывает результаты, полученные путем подтверждения эффективности *in vivo* ADC настоящего изобретения против тучноклеточной опухоли у мышей (HMC 1.2 клетки).

Фиг. 7 показывает результаты, полученные путем подтверждения эффективности ADC настоящего изобретения после реинокуляции опухоли.

Фиг. 8 показывает результаты, полученные путем подтверждения эффективности *in vivo* ADC настоящего изобретения против AML у мышей (Kasumi-1 клетки).

Фиг. 9 показывает результаты, полученные путем подтверждения эффективности *in vivo* ADC настоящего изобретения против рака молочной железы у мышей (MDA-MB-468 клетки) (Фиг. 9a показывает результаты для PoC-DM1; Фиг. 9b показывает результаты для 003-1, 2G4 ThioBridge[®]-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) DAR 2; Фиг. 9c показывает результаты для 004-2, 2G4 ThioBridge[®]-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) DAR 4; и Фиг. 9d показывает результаты для 003-2, 2G4-МС-Val-Cit-PAB-MMAE).

Фиг. 10 показывает результаты анализа ADC настоящего изобретения против SCLC у мышей (SCLC-H526 клетки) после повторной провокации.

Фиг. 11 показывает результаты анализа ADC настоящего изобретения против тучноклеточной опухоли у мышей (HMC 1.2 клетки) после повторной провокации.

Фиг. 12 показывает результаты, полученные путем осуществления анализа *in vivo* на предтоксичность ADC настоящего изобретения при введении при высокой концентрации (10 мг/кг).

Фиг. 13 показывает результаты, полученные путем осуществления анализа *in vivo* на предтоксичность ADC настоящего изобретения при введении при более высокой концентрации (20/40/60 мг/кг) (Фиг. 13a показывает результаты для 2G4 антитела; Фиг.

13b показывает результаты для PoC-DM1; Фиг. 13c показывает результаты для 003-1, 2G4 ThioBridge[®]-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) DAR 2; и Фиг. 13d показывает результаты для 004-2, 2G4 ThioBridge[®]-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) DAR 4).

Фиг. 14 показывает модель докинга 2G4 Fab:c-Kit. (Фиг. 14a) представляет мутанты c-Kit. (Фиг. 14b и 14c) c-Kit дикого типа и мутантные белки очищали, серийно разводили и затем наносили на 96-луночный планшет. Связывание 2G4 исследовали методом ELISA. (Фиг. 14d) показывает структурную модель 2G4 Fab:c-Kit комплекса с наивысшей оценкой, рассчитанной по HADDOCK. Вариабельная (V) и константная (C) области тяжелой цепи (H) и вариабельная (V) и константная (C) области легкой цепи (L) 2G4 были обозначены как VH, CH1, VL и CL, соответственно. (Фиг. 14e) представление в виде полосок границы раздела между 2G4 и c-Kit. Остатки в D2 и D3 областях c-Kit указаны затененными полосами.

Способ осуществления изобретения

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно посредством примеров. Эти примеры представлены только для более подробной иллюстрации настоящего изобретения, и специалистам в данной области должно быть очевидно, что объем настоящего изобретения не ограничивается этими примерами согласно сути настоящего изобретения.

Пример

Пример получения

Пример получения 1. Конструирование анти-c-Kit антитела 2G4

Пример получения 1-1. Моделирование иммунизированной мыши

50 мкг (на мышь) рекомбинантного белка c-Kit (cat# PKSH030939), приобретенного у Elabscience, смешивали с равным объемом полного адьюванта Фрейнда (Sigma, USA) с получением эмульсии. Эмульсию, полученную как описано выше, вводили в брюшную полость шести самкам (возраст 7 недель) гуманизированных NSG мышей, смоделированным путем инъекции CD34+ клеток человека. Каждой мышши вводили 50 мкг антигена в общем объеме 500 мкл. По прошествии 1 и 2 недель эмульсию смешивали с неполным адьювантом Фрейнда (Sigma, USA) и антиген дополнительно вводили в брюшную полость мышшей.

Пример получения 1-2. Подтверждение продукции антител

Кровь собирали из глаз мышшей, иммунизированных с использованием вышеуказанного способа, помещали в 1,5-мл микроцентрифужную пробирку и затем центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 минут. Сыворотку отделяли и хранили при -20°C до осуществления эксперимента по подтверждению продукции антител. Осуществляли иммуноферментный анализ с использованием антигенного белка для подтверждения продукции антител и затем эмульсию смешивали с неполным адьювантом Фрейнда (Sigma, USA) и снова вводили антиген в брюшную полость мышшей за 3 дня до слияния клеток.

Пример получения 1-3. Получение гибридомы

После подтверждения продукции антител мышь умерщвляли. Спленоциты выделяли и сливали с клетками миеломы P3X63Ag 8.653 (ATCC CRL-1580) с получением гибридомы.

В частности, клетки мыши P3X63Ag 8.653 культивировали в культуральном планшете с использованием среды RPMI1640, дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой. Для осуществления слияния клеток клетки P3X63Ag 8.653 промывали два раза бессывороточной средой RPMI1640 (Hyclone, USA) и доводили до концентрации клеток 1×10^7 . Мышь умерщвляли цервикальной дислокацией, селезенку собирали, затем помещали в сетчатый контейнер (Sigma, USA) и клетки выделяли. Получали суспензию спленоцитов и затем суспензию промывали с использованием центрифугирования. Раствор спленоцитов подвергали обработке Tris-NH₄Cl (TRIS 20,6 г/л, NH₄Cl 8,3 г/л) для лизиса красных клеток крови. Полностью выделенные антитело-продуцирующие клетки центрифугировали при $400 \times g$ в течение 5 минут. Затем клетки промывали два раза в бессывороточной среде и ресуспендировали в 10 мл среды. Лимфоциты подсчитывали с использованием гемоцитометра и 1×10^8 лимфоцитов смешивали с 1×10^7 P3X63Ag 8.653 клеток (10:1) в бессывороточной среде.

После центрифугирования при $400 \times g$ в течение 5 минут добавляли по каплям 1 мл раствора с использованием 50% (M/V) полиэтиленгликоля 1500 (Sigma, USA), нагреваемого при 37°C, и смешивали в течение 1 минуты. Раствор смеси для слияния, полученный как описано выше, разбавляли бессывороточной RPMI1640 и центрифугировали при $400 \times g$ в течение 3 минут. Клетки суспендировали в 35 мл RPMI1640 селективной среде, дополненной 20% фетальной бычьей сывороткой и НАТ (100 мкМ гипоксантина, 0,4 мкМ аминоптерина, 16 мкМ тимидина). 100 мкл суспензии загружали в 96-луночный планшет, покрытый питающими клетками (макрофаги, выделенные из брюшной полости с использованием RPMI1640) за 1 день до этого, и культивировали при 37°C 5% CO₂. Через 5 дней НАТ среду заменяли через каждые 2-3 дня и клетки культивировали в течение 14 дней. Через 14 дней осуществляли вторичное культивирование путем замены среды средой RPMI1640, дополненной 20% фетальной бычьей сывороткой и НТ (среда с исключением 0,4 мкМ аминоптерина из НАТ).

Пример получения 1-4. Отбор и выделение антитело-продуцирующих слитых клеток

Супернатант раствора культуры слитых клеток, полученного как описано выше, собирали и осуществляли иммуноферментный анализ для определения, действительно ли были получены антитела специфические в отношении полученного антигена. Культуральный раствор слитых клеток, который показал соответствующую концентрацию, более чем в 4 раза превышающую концентрацию отрицательного контроля, отбирали, переносили в 24-луночный планшет и культивировали. Дополнительно, культуральный раствор разбавляли (предельное разведение), чтобы он включал 1 клетку на лунку в 96-луночном планшете, и культивировали и затем культуральный раствор извлекали и 96-луночный планшет покрывали 0,1 мкг белка c-Kit,

используемого в качестве антигена, на лунку. Затем осуществляли иммуноферментный анализ для конечного отбора слитых клеток, продуцирующих 15 моноклональных антител (1C6, 1H2, 1A6, AFA, 2B3, 2G4, 4G5, 4C4, 4C7, 4D7, 1E1, 2H6, 1G3, 1A3, 1D3).

Пример получения 1-5. Отбор анти-c-Kit антитела

SPR (поверхностный плазмонный резонанс) осуществляли для подтверждения способности отобранных антител связываться с c-Kit. С использованием SR7500DC (Reichert, USA) 20 мкг c-Kit человека (elabscience, PKSH030939), 20 мкг c-Kit мыши (SB, Lot# LC05DE2304) и 20 мкг c-Kit крысы (SB, Lot# LC06SE1787), которые использовали для конструирования антитела, были иммобилизованы на PEG (Reichert, USA) чипе. Затем пропускали растворы антител при различных концентрациях, а затем значение KD, которое представляет собой аффинность к c-Kit, анализировали с использованием программы Scrubber2. Значение KD рассчитывали путем деления kd на ka, и чем меньше это значение, тем больше способность связывания с мишенью.

Как результат, антитело 2G4 показало сильную аффинность в отношении c-Kit человека, с KD значением около $2,8237 (\pm 0,9) \times 10^{-12}$ М. Аффинность к человеческому белку была наивысшей, далее следовала аффинность к мышинному и крысиному белку.

Последовательности CDR выбранного антитела 2G4 показаны в Таблице 1 ниже:

Таблица 1

CDR	Последовательность	SEQ ID NO
H-CDR1	GFTFSRYG	SEQ ID NO: 1
H-CDR2	IWYDGTNK	SEQ ID NO: 2
H-CDR3	AREDWAEAFD M	SEQ ID NO: 3
L-CDR1	QSLHLSNGYN Y	SEQ ID NO: 4
L-CDR2	LGS	SEQ ID NO: 5
L-CDR3	MQALQTIT	SEQ ID NO: 6

Последовательности варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи антитела 2G4 показаны в Таблице 2 ниже:

Таблица 2

Варибельная область	Последовательность	SEQ ID NO
тяжелая цепь	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS	SEQ ID NO: 7
	RYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGTNKDY	
	TDSVRGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED	
	TAVYYCARED WAEAFDMWGQ GTTVTVSS	
легкая цепь	DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLI	SEQ ID NO: 8
	HSNGYNYLDW YLQKPGQSPQ LLIYLGSNRA	
	SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV	

YYCMQALQTI TFGQGTRLEI K

Пример получения 2. Получение "2G4-SMCC-DM1" (#POC-DM1)

Был получен 2G4-ADC (конъюгат антитело-лекарственное средство), включающий SMCC (*N*-сукцинимидил-4-(*N*-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат) в качестве нерасщепляемого линкера и DM1 (*N*(2')-деацетил-*N*(2')-(3-меркапто-1-оксопропил)-майтанзин) в качестве ингибитора микротрубочек. Конъюгацию соединения линкер-полезная нагрузка с 2G4 измеряли с использованием спектрофотометра в УФ и видимой областях спектра и отношение лекарственное средство:антитело (DAR) определяли методом ЖХ-МС.

В частности, 2G4 и человеческий IgG1 (Sino Biological) диализовали против буфера для конъюгации (0,1 М фосфата натрия и 0,15 М NaCl, pH 7,2) и конъюгировали с SMCC-DM1 (MedChemExpress) при молярном соотношении 1:5 или 1:10 в течение 1,5 часа при комнатной температуре. Осуществляли фракционирование для удаления несвязанного SMCC-DM1 и агрегированного 2G4-DM1. Фракции, содержащие антитела, объединяли и диализовали против буфера для формулирования (10 мМ сукцината натрия, 0,05% полисорбата 20 и 6% сахарозы; pH 5,0). Конъюгацию определяли путем исследования оптической плотности (OD) при 280 нм и 252 нм с использованием SPECTROstar Nano (BMG LABTECH). DAR определяли методом жидкостной хроматографии в тандеме с масс-спектрометрией (ЖХ-МС).

Для подтверждения конъюгации DM1 и 2G4, поскольку DM1 поглощает ультрафиолетовый свет при 252 нм, поглощение неконъюгированного 2G4 и ADC при 252 нм анализировали с использованием спектрофотометра в УФ и видимой областях спектра и сравнивали поглощение неконъюгированного 2G4 и 2G4-DM1. Поглощение 2G4-DM1 было выше, чем поглощение 2G4 при 252 нм. Результаты показали, что DM1 потенциально конъюгирован с 2G4.

С использованием масс-спектрометрии 2G4-DM1 было подтверждено, что он состоит из различных популяций, где количество молекул лекарственного средства составляет от 1 до 4 на антитело, а среднее значение DAR для 2G4-DM1 составляет 1,8.

Пример получения 3. Получение ADC с использованием расщепляемого линкера

Получали четыре типа ADC с использованием расщепляемых линкеров. В частности, ADC получали методом классической малеимидной конъюгации или ThioBridge® (технология конъюгации с перестройкой дисульфидных связей, Abzena, USA) для связывания MMAE и SN-38, и среднее значение DAR было в диапазоне между 2 и 8. ThioBridge® MMAE ADC со средним значением DAR 2 и 4 были получены вместе с малеимидными MMAE контрольными ADC со средним значением DAR 4. Среднее значение DAR ThioBridge® SN-38 ADC составляло 8. Расщепляемый катепсином мотив 'Val-Cit-PAB' был включен во все линкеры, чтобы обеспечить лизосомальное высвобождение полезной нагрузки (Фиг. 1а). В случае ThioBridge® SN-38 ADC, карбонатная связь, соединяющая SN-38 с линкером, чувствительна к гидролизу, что также

позволяет реализовать механизм высвобождения полезной нагрузки на основе pH. Принимая во внимание последующие биологические испытания, был получен ADC с высокой мономерной чистотой (>97%) в количестве 29-56 мг. Способ получения ThioBridge[®]-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) показан на Фиг. 1b.

Пример получения 3-1. Получение 2G4-МС-VC-PAB-MMAE

13,38 мг/мл mAb 2G4 в PBS Дульбекко, pH 7,4, 5 mM EDTA (5,232 мл; 70,0 мг; 470 нмоль; 1,0 эквивалент) разбавляли в PBS Дульбекко, pH 7,4, 5 mM EDTA (8,505 мл). К разбавленному раствору mAb 2G4 добавляли раствор 5 mM ТСЕР, растворенного в воде без эндотоксинов (263,4 мкл, 1317 нмоль, 2,8 эквивалента). Восстановление осуществляли в течение 2 часов при 40°C с конечной концентрацией антител 5,0 мг/мл.

Через 2 часа при 40°C смесь для восстановления разбавляли в PBS Дульбекко, pH 7,4, 5 mM EDTA (2,450 мл), охлаждали до 22°C, а затем дополнительно разбавляли DMF (177 мкл). Раствор 4,26 мг/мл (3,23 mM) МС-VC-PAB-MMAE в DMF получали путем растворения 3,95 мг (3,00 мкмоль) МС-VC-PAB-MMAE (MW=1317 г.моль⁻¹) в 927 мкл DMF. Раствор МС-VC-PAB-MMAE (873 мкл; 3,72 мг; 2823 нмоль; 6,0 экв.) в DMF добавляли к раствору восстановленного mAb 2G4 до конечной концентрации 6% DMF и конечной концентрации антител 4,0 мг/мл. Реакции конъюгации давали осуществиться в течение 1 часа при 22°C.

Через 1 час при 22°C реакционную смесь подвергали буферному обмену путем спин-фильтрации с использованием колонки Zebaspin (7 кДа MWCO; 10 мл), уравновешенной 20 mM гистидина, 50 mM NaCl, 5% сахарозы, pH 6,5, в соответствии с инструкциями изготовителя. Полученный образец конъюгата далее растирали в порошок и концентрировали до 7,13 мг/мл путем ультрафильтрации/диафильтрации с использованием центрифужного концентратора Vivaspin 20 (мембрана PES, 30 кДа MWCO), уравновешенного 20 mM гистидина, 50 mM NaCl, 5% сахарозы, pH 6,5. Концентрированный образец конъюгата (56,3 мг; 7,90 мл) стерильно фильтровали через мембранный фильтр PVDF с размером пор 0,22 мкм.

Полученный таким образом конъюгат антитело-лекарственное средство был обозначен как «2G4-МС-VC-PAB-MMAE», и конъюгат был охарактеризован методом НИС и SEC. Было выделено 56 мг ADC 2G4-МС-VC-PAB-MMAE с высоким содержанием мономеров (>98%, SEC) и средним значением DAR 4,2 (НИС) (далее указан как 003-2).

Пример получения 3-2. Получение 2G4-ThioBridge[®]-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) DAR 2

14,77 мг/мл mAb 2G4 в PBS Дульбекко, pH 7,4, 5 mM EDTA (2,180 мл; 32,2 мг; 216 нмоль; 1,0 эквивалент) разбавляли в PBS Дульбекко, pH 7,4, 5 mM EDTA (4,148 мл). Раствор 5 mM ТСЕР, растворенного в не содержащей эндотоксинов воде (112 мкл, 562 нмоль, 2,6 экв.), добавляли к разбавленному раствору mAb 2G4. Восстановление происходило в течение 2 часов при 40°C с получением конечной концентрации антитела 5,0 мг/мл.

Через 2 часа при 40°C смесь для восстановления разбавляли в PBS Дульбекко, pH

7,4, 5 mM EDTA (805 мкл), охлаждали до 22°C и затем снова разбавляли DMF (403 мкл). 4,52 мг/мл (1,61 mM) раствор ThioBridge®-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) в DMF получали путем растворения 2,15 мг (768 нмоль) ThioBridge®-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) (MW=2805,0 г.моль⁻¹) в 477 мкл DMF. Раствор ThioBridge®-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) (402 мкл; 1,82 мг; 648 нмоль; 3,0 экв.) в DMF добавляли к раствору восстановленного 2G4 до конечной концентрации 10% DMF и конечной концентрации антитела 4,0 мг/мл. Реакции конъюгации давали осуществиться в течение 18 часов при 22°C.

Через 18 часов при 22°C реакцию смесь подвергали буферному обмену путем спин-фильтрации с использованием колонки Zebaspin (7 лДа MWCO; 10 мл), уравновешенной 20 mM гистидина, 50 mM NaCl, 5% сахарозы, pH 6,5, в соответствии с инструкциями изготовителя. Полученный образец конъюгата далее растирали в порошок и концентрировали до 7,25 мг/мл путем ультрафильтрации/диафильтрации с использованием центрифужного концентратора Vivaspin 20 (PES мембрана, 30 кДа MWCO), уравновешенного 20 mM гистидина, 50 mM NaCl, 5% сахарозы, pH 6,5. Концентрированный образец конъюгата (29,7 мг; 4,10 мл) стерильно фильтровали через мембранный фильтр PVDF с размером пор 0,22 мкм.

Конъюгат антитело-лекарственное средство, полученный таким образом, был обозначен как "2G4-ThioBridge®-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) DAR 2", и конъюгат был охарактеризован методом HIC и SEC. Было выделено 30 мг 2G4-ThioBridge®-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) DAR2 ADC с высоким содержанием мономеров (>97%, SEC) и средним значением DAR 2.0 (HIC) (далее указан как 003-1).

Пример получения 3-3. Получение 2G4-ThioBridge®-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) DAR 4

20,71 мг/мл mAb 2G4 в PBS Дульбекко, pH 7,4, 5 mM EDTA (5,794 мл, 120 мг, 806 нмоль, 1,0 экв.) разбавляли в PBS Дульбекко, pH 7,4, 5 mM EDTA (17 мл). Раствор 5 mM TCEP, растворенного в не содержащей эндотоксинов воде (967,2 мкл, 4836 нмоль, 6,0 экв.) добавляли к разбавленному раствору mAb 2G4. Восстановление происходило в течение 1 часа при 40°C с получением конечной концентрации антитела 5,0 мг/мл.

Через 1 час при 40°C смесь для восстановления разбавляли в пропиленгликоле (6,40 мл) и охлаждали до 22°C. Раствор 8,48 мг/мл (3,02 mM) ThioBridge®-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) в DMF получали путем растворения 20,60 мг (7345 нмоль) ThioBridge®-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) (MW=2805,0 г.моль⁻¹) в 2430 мкл DMF. Раствор ThioBridge®-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) (1600 мкл; 13,57 мг; 4836 нмоль; 6,0 экв.) в DMF добавляли к раствору восстановленного 2G4 до конечной концентрации 5% DMF, 20% пропиленгликоля и конечной концентрации антитела 3,8 мг/мл. Реакции конъюгации давали осуществиться в течение 18 часов при 22°C.

Через 18 часов при 22°C реакцию смесь разбавляли в 4 M хлорида натрия, 50 mM фосфата натрия pH 7,0 (32,0 мл). Разбавленную реакцию смесь загружали в 10-мл колонку Proteus FliQ, содержащую смолу HIC ToyoPearl® Фенил-650S, уравновешенную

буфером А (буфер, содержащий 2,0 М хлорида натрия, 50 мМ фосфата натрия, pH 7,0). Элюирование осуществляли в буфере В (50 мМ фосфата натрия, 20% изопропанола, pH 7,0) с постоянным потоком 1,5 мл/мин и с 200 мл градиентом от 0 до 100%. Фракции анализировали методом HIC и SEC и объединяли на основании содержания (>90%) четырех DAR. Объединенные фракции подвергали буферному обмену и концентрировали до 7,93 мг/мл путем ультрафильтрации/диализации с использованием центрифужного концентратора Vivaspin 20 (PES мембрана, 30 кДа MWCO), уравновешенного 20 мМ гистидина, 50 мМ NaCl, 5% сахарозы, pH 6,5. Концентрированный образец конъюгата (47,4 мг; 5,98 мл) стерильно фильтровали через мембранный фильтр PVDF с размером пор 0,22 мкм.

Конъюгат антитело-лекарственное средство, полученный таким образом, был обозначен как "2G4-ThioBridge[®]-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) DAR 4 конъюгат", и конъюгат был охарактеризован методом HIC и SEC. Было выделено 47 мг 2G4-ThioBridge[®]-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) DAR4 ADC с высоким содержанием мономеров (>98%, SEC) и средним значением DAR 4,0 (HIC) (далее указан как 004-2).

Пример получения 3-4. Получение 2G4-ThioBridge[®] -Glu-[(Val-Cit-PAB-SN-38)]2-Glu-[PEG(24u)]2

18,71 мг/мл mAb 2G4 в PBS Дульбекко, pH 7,4, 5 мМ EDTA (3,474 мл, 65,0 мг, 437 нмоль, 1,0 экв.) разбавляли в PBS Дульбекко, pH 7,4, 5 мМ EDTA (9,00 мл). Раствор 5 мМ TCEP, растворенного в не содержащей эндотоксинов воде (524,0 мкл; 2620 нмоль, 6,0 экв.) добавляли к разбавленному раствору mAb 2G4. Восстановление происходило в течение 1 часа при 40°C с получением конечной концентрации антитела 5,0 мг/мл.

Через 1 час при 40°C смесь для восстановления разбавляли в пропиленгликоле (3,71 мл), охлаждали до 22°C и затем снова разбавляли DMF (655 мкл). Раствор 10,0 мг/мл (2,18 мМ) ThioBridge[®]-Glu-[(Val-Cit-PAB-SN-38)]2-Glu-[PEG(24u)]2 в DMF получали путем растворения 14,09 мг (3072 нмоль) ThioBridge[®]-Glu-[(Val-Cit-PAB-SN-38)]2-Glu-[PEG(24u)]2 (MW=4588,0 г.моль⁻¹) в 1409 мкл DMF. Раствор (1202 мкл; 12,02 мг; 2620 нмоль; 6,0 экв.) ThioBridge[®]-Glu-[(Val-Cit-PAB-SN-38)]2-Glu-[PEG(24u)]2 в DMF добавляли к раствору восстановленного 2G4 до конечной концентрации 10% DMF, 20% пропиленгликоля и конечной концентрации антитела 3,5 мг/мл. Реакции конъюгации давали осуществиться в течение 18 часов при 22°C.

Через 18 часов при 22°C реакционную смесь разбавляли в 4 М хлорида натрия, 50 мМ фосфата натрия pH 7,0 (18,6 мл). Разбавленную реакционную смесь загружали в колонку Proteus FliQ 10 мл, содержащую смолу HIC ToyoPearl[®] Фенил-650S, уравновешенную буфером А (буфер, содержащий 2,0 М хлорида натрия, 50 мМ фосфата натрия, pH 7,0). Элюирование осуществляли в буфере В (50 мМ фосфата натрия, 20% изопропанола, pH 7,0) с постоянным потоком 1,5 мл/мин и 200 мл градиентом от 0 до 100%. Фракции анализировали методом HIC и SEC и объединяли на основании содержания (>80%) четырех DAR. Объединенные фракции подвергали буферному обмену и концентрировали до 4,01 мг/мл путем ультрафильтрации/диализации с

использованием центрифужного концентратора Vivaspin 20 (PES мембрана, 30 кДа MWCO), уравновешенного 20 mM гистидина, 50 mM NaCl, 5% сахарозы, pH 6,5. Концентрированный образец конъюгата (29,0 мг; 7,22 мл) стерильно фильтровали через мембранный фильтр PVDF с размером пор 0,22 мкм.

Конъюгат антитело-лекарственное средство, полученный таким образом, был обозначен как "2G4-ThioBridge[®]-Glu-[(Val-Cit-PAB-SN-38)]₂-Glu-[PEG(24u)]₂ конъюгат", и конъюгат был охарактеризован методом ЖХ-МС и SEC. Было выделено 29 мг 2G4-ThioBridge[®]-Glu-[(Val-Cit-PAB-SN-38)]₂-Glu-[PEG(24u)]₂ с высоким содержанием мономеров (>98%, SEC) и средним значением DAR 7,4 (ЖХ-МС) (далее указан как 007-1).

Метод анализа

(1) ЖХ-МС анализ

Анализ ЖХ-МС осуществляли с использованием колонки POROSHELL 300SB C3 (2,1 × 12,5 мм, 5 мкм), соединенной с масс-спектрометром Waters XEVO G2S TOF и системой Waters Acquity H Class UPLC. Подвижной фазой был буфер А (0,1% муравьиной кислоты в воде). Градиент (2,5 мин 10% В, 10-80% градиент В 3,5 мин) применяли с использованием буфера В (ацетонитрил, 0,1% муравьиной кислоты) со скоростью потока 0,4 мл/мин. Колонку поддерживали при 60°C на протяжении всего анализа. После восстановления анализировали ADC с малеимидом (10 mM DTT, 1 час при 40°C). Все ADC анализировали после разбавления до 0,2 мг/мл. Для анализа вводили 10 мкл раствора ADC. Среднее значение DAR рассчитывали как средневзвешенное значение наблюдаемых видов DAR на основании интенсивности сигнала (SI) основной гликоформы в деконволюционном спектре m/z для невосстановленных образцов и интенсивности сигнала для легкой цепи (LSI) и тяжелой цепи (HSI) для восстановленных образцов:

$$\begin{aligned} \text{Среднее значение DAR}_{\text{невосстановленный образец}} &= \frac{\sum_{i=0}^n SI_i \times i}{\sum_{i=0}^n SI_i} \\ \text{Среднее значение DAR}_{\text{восстановленный образец}} &= 2 \times \frac{\sum_{i=0}^n LSI_i \times i}{\sum_{i=0}^n LSI_i} + 2 \times \frac{\sum_{i=0}^n HSI_i \times i}{\sum_{i=0}^n HSI_i} \end{aligned}$$

(2) SEC анализ

Аналитическую SEC осуществляли с использованием колонки ACQUITY UPLC VEN SEC (4,6 мм × 15 см, 200 Å, 1,7 мкм) и защитной колонки (4,6 мм × 3 см), соединенной с системой Dionex Ultimate 3000 UPLC. Подвижная фаза представляла собой 0,2 М калий-фосфатного буфера, pH 6,8, 0,2 М хлорида калия и 15% (об/об) изопропанола. Скорость потока поддерживалась постоянной на уровне 0,35 мл/мин. Колонку поддерживали при 30°C на протяжении всего анализа. Анализ осуществляли с 10-мин изократическим элюированием с УФ-детекцией при 248 нм, 280 нм и 365 нм. Для анализа вводили 10 мкг ADC. Процент высокомолекулярных (HWM) видов рассчитывали путем сравнения площади пика, соответствующей видам HWM при 280 нм, с общей площадью пика, соответствующей как видам HWM, так и мономерным видам при 280 нм. Наличие

свободных связанных с реагентом видов оценивали путем сравнения хроматографических следов образца ADC и образца буфера в области низкомолекулярных видов хроматограммы для значений времени удерживания более 6 мин при длине волны, соответствующей максимуму поглощения полезной нагрузки ($\lambda=248$ нм для MMAE, $\lambda=365$ нм для SN-38).

(3) НИС анализ

Аналитическую НИС осуществляли с использованием колонки TOSOH Bioscience TSKgel Butyl-NPR (4,6 мм × 3,5 см, 2,5 мкм), соединенной с системой Dionex Ultimate 3000 UPLC. Подвижной фазой был буфер А: 1,5 М сульфата аммония, 50 мМ фосфата натрия, рН 7,0. Для элюирования связанных видов применялся линейный градиент (0-100% В за 10,5 мин) с использованием буфера В (20% изопропанола, 50 мМ фосфата натрия, рН 7,0) при скорости потока 1,35 мл/мин. Колонку поддерживали при °С на протяжении всего анализа. Анализ осуществляли с УФ-детекцией при 280 нм. Для каждого анализа вводили 10 мкг ADC. Процент (i) каждого вида DAR рассчитывали путем сравнения площади пика каждого назначенного пика с общей площадью пика. Среднее значение DAR рассчитывали как средневзвешенное значение наблюдаемых видов DAR на основании площади пика под кривой (AUC_i), а среднюю молекулярную массу ADC рассчитывали на основе вкладов DAR и массы линкера-полезной нагрузки следующим образом:

$$\text{Среднее значение DAR} = \frac{\sum_{i=0}^n AUC_i \times i}{\sum_{i=0}^n AUC_i}$$

$$MW_{ADC} = MW_{mAb} + DAR \times MW_{LP}$$

Пример

Пример 1. Анализ жизнеспособности клеток in vitro

Для подтверждения эффективности ADC, показанных в Таблице 3, в с-Kit-положительных и -отрицательных раковых клеточных линиях осуществляли анализ жизнеспособности клеток in vitro.

Клетки инокулировали в 96-луночные черные планшеты для культивирования клеток (Greiner Bio-One, Kremsmuenster, Austria) и количество клеток сканировали с использованием устройства Celigo Imaging Cytometer. Девять точек концентрации ADC подготавливали путем 5- или 10-кратных серийных разведений с начальной концентрацией 40 или 200 мкг/мл. Через 3-5 дней обработки клетки окрашивали флуоресцентным красителем Calcein-AM (1 мкг/мл) или Hoechst 33342 (8 мкМ). Лунки сканировали и анализировали с использованием Celigo Imaging Cytometer для подсчета жизнеспособных клеток. Жизнеспособность клеток была графически отображена с помощью программного обеспечения Graph Pad Prism, и были рассчитаны значения полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC50) (Таблица 4).

Таблица 3

Название	Количество посеянных клеток	Макс. конц.	Кратность разведения	Время инкубации
GIST-T1	5X10 ³ /лунка	40 мкг/мл	10	3 дня
GIST-430/654	5X10 ³ /лунка	40 мкг/мл	10	4 дня
MDA-MB-468	4X10 ³ /лунка	200 мкг/мл	5	3 дня
NCI-H526	7X10 ³ /лунка	200 мкг/мл	5	5 дней
HMC1.2	5X10 ³ /лунка	200 мкг/мл	5	4 дня
Kasumi-1	2X10 ⁴ /лунка	200 мкг/мл	5	4 дня

Таблица 4

ADC	Код партии	IC50 (мкг/мл)			
		GIST-T1	GIST-430/654	HMC1.2	MDA-MB-468
2G4-SMCC-DM1	POC-DM1	0,00451	0,0033	0,1636	1,246
2G4-MC-Val-Cit-PAB-MMAE	NOVN-1574-JN003-2	0,00367	0,0058	0,005	6,256
2G4-ThioBridge [®] -Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) DAR 2	NOVN-1614-JN003-1	0,00745	0,0097	0,0097	44,92
2G4-ThioBridge [®] -Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) DAR 4	NOVN-1574-JN004-2	0,00314	0,0051	0,0054	25,84
2G4-ThioBridge [®] -Glu-[(Val-Cit-PAB-SN-38)]2-Glu-[PEG(24u)]2	NOVN-1574-JN007-1	0,0589	0,0546	0,095	0,168

Как показано на Фиг. 2, можно видеть, что ADC-группа показывает статистически значимую эффективность по сравнению с контролем.

Пример 2. Эффективность против GIST у мышей in vivo (GIST T1 клетки)

Для оценки эффективности ADC веществ против GIST был проведен эксперимент. Использовали модель ксенотрансплантата клеток GIST-T1 (с-Kit-мутантные и чувствительные к иматинибу; регистрационный номер: CVCL_4976; сайт мутации с-Kit - Экзон11 V560-L576).

4-недельным самкам мышей CB-17 SCID с иммунодефицитом (Charles River Laboratories Japan, Inc.) давали акклиматизироваться в условиях SPF (отсутствие специфических патогенов) в течение 12 дней перед использованием в эксперименте. Клетки GIST-T1 (5×10⁶/100 мкл/животное/бессывороточная среда DMEM/с высоким содержанием глюкозы) в 50% Matrigel (Corning, 354248, NY, USA) трансплантировали подкожно 6-недельным мышам. Общий объем инъекции, содержащей суспендированные клетки, составлял 200 мкл.

Мыши со средним объемом опухоли около 190 мм³ на 21-й день после трансплантации были включены в исследование (день 0). Мыши были случайным образом распределены в одну из шести групп (n=5/группа), а затем мышам вводили носитель ADC (5 мл/кг, внутривенно в хвост), каждое ADC вещество (0,5, 1,5 или 3,0 мг/кг, внутривенно в хвост), иматиниб (100 мг/кг, перорально) и ADC вещество (3,0 мг/кг, внутривенно в хвост) + иматиниб (100 мг/кг, перорально) (Таблица 5). В качестве носителя ADC, буфер для PoC-DM1 представлял собой смесь 10 мМ сукцината натрия, 6% сахарозы и 0,05% Tween20 (pH 5,0), а буфер для остальных представлял собой смесь 20 мМ гистидина (Merck, 104352), 50 мМ хлорида натрия (Sigma, S3014), 5% сахарозы (Sigma, S0389) (pH 6,5) и 0,22 мкМ фильтра (Merck S2GPU11RE). Индивидуальные дозы рассчитывались на основе массы тела животного, зафиксированной непосредственно перед введением, с объемом дозы 5 мл/кг массы тела.

Таблица 5

№	Субъект	Интервал, путь
1	Контроль (носитель, ADC буфер)	D0, D10, D20 (три раза), в/в
2	Иматиниб 100 мг/кг	D0 - D29 (ежедневно в течение 30 дней), п/о
3	ADC 0,5 мг/кг	D0, D10, D20 (три раза), в/в
4	ADC 1,5 мг/кг	D0, D10, D20 (три раза), в/в
5	ADC 3,0 мг/кг	D0, D10, D20 (три раза), в/в
6	ADC 3,0 мг/кг+Иматиниб 100 мг/кг	ADC : D0, D10, D20 (три раза), в/в Иматиниб : D0 - D29 (ежедневно в течение 30 дней), п/о

Введение ADC веществ показаны в Таблице 6:

Таблица 6

Группа исследования #	ADC
#PoC-DM1	2G4-SMCC-DM1
#003-1	2G4-ThioBridge [®] -Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) DAR 2
#004-2	2G4-ThioBridge [®] -Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) DAR 4
#003-2	2G4-MC-Val-Cit-PAB-MMAE

Всех животных наблюдали раз в день для определения смертности, общего состояния и клинических признаков (время, начало, тяжесть и восстановление). Объем опухоли и массу тела измеряли два раза в неделю. Для измерения объема опухоли длину, ширину и толщину измеряли с использованием штангенциркуля.

Результаты показаны на Фиг. 3а - 3д.

В течение периода испытания до умерщвления никаких аномальных симптомов не было обнаружено ни в одной из групп, за исключением группы введения иматиниба 100 мг/кг. В группе введения иматиниба 100 мг/кг 1 животное умерло в день 91.

Никакого снижения массы тела или увеличения массы тела на 10% или более не наблюдали в течение 56 дней в группе введения иматиниба 100 мг/кг и в группе введения исследуемого ADC (0,5 мг/кг, 1,5 мг/кг, 3,0 мг/кг, 3,0 мг/кг+иматиниб 100 мг/кг) по сравнению с контролем (носитель). После этого никакого быстрого снижения массы тела или быстрого увеличения массы тела не наблюдали ни в одной из групп. Это говорит о том, что все из ADC веществ по настоящему изобретению являются высокобезопасными.

На день 56 в группе введения иматиниба 100 мг/кг рост опухоли ингибировался по сравнению с контролем (носитель), тогда как все группы введения исследуемого ADC при 3,0 мг/кг показали более сильный эффект ингибирования роста опухоли. В частности, было обнаружено, что в группе введения исследуемого ADC 2G4 ThioBridge[®]-Glu-(Val-Cit-PAВ-ММАЕ)-PEG(24u) (#003-1 и #004-2) имел место существенный эффект ингибирования роста опухоли даже при 1,5 мг/кг.

Хотя иматиниб, используемый отдельно, ингибировал опухоль, опухоль рецидивировала после прекращения лечения. К удивлению, лечение каждым ADC при 3 мг/кг в комбинации с иматинибом индуцировало полную ремиссию опухоли без возобновления роста в течение вплоть до 105 или 112 дней даже после прекращения введения иматиниба.

Как результат измерения массы опухоли после умерщвления, группа введения иматиниба 100 мг/кг показала уменьшение на около 59% по сравнению с контролем (носитель), тогда как все группы введения исследуемого ADC при 1,5 мг/кг или более (за исключением группы #PoC-DM1 1,5 мг/кг) показали более высокую способность к уменьшению (Таблица 7). В частности, группа введения исследуемого ADC 2G4 ThioBridge[®]-Glu-(Val-Cit-PAВ-ММАЕ)-PEG(24u) (#003-1 и #004-2) показала существенную эффективность ингибирования роста опухоли даже при 1,5 мг/кг. Когда каждый ADC при 3 мг/кг вводили в комбинации с иматинибом, большинство опухолей исчезало.

Таблица 7

(уменьшение, %)	#PoC-DM1	#003-1	#004-2	#003-2
0,5 мг/кг	0,7%	32,0%	40,6%	45,4%
1,5 мг/кг	20,3%	85,0%	98,1%	61,5%
3,0 мг/кг	70,0%	89,8%	99,2%	93,8%
3,0 мг/кг+иматиниб 100 мг/кг	98,6%	98,8%	99,2%	94,7%

Приведенные выше результаты подтверждают, что группа введения ADC показала статистически значимую эффективность по сравнению с контролем.

Пример 3: Эффективность против GIST у мышей in vivo (GIST-430/654 клетки)

В частности, для оценки эффективности ADC веществ против GIST, резистентных к иматинибу, также был проведен эксперимент. Использовали модель ксенотрансплантата клеток GIST-430/654 (иматиниб-резистентные, Экзон 11 V560-L576+Экзон 13 V654A).

5-недельным самкам мышей NOG (NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO) с иммунодефицитом (CIEA Japan, Inc.) давали акклиматизироваться в условиях SPF (отсутствие специфических патогенов) в течение 12 дней перед использованием в эксперименте. Клетки GIST-430/654 (5 X 10⁶/100 мкл/животное/бессывороточная среда IMDM) в 50% Matrigel (Corning, 354248, NY, USA) вводили подкожно 6-недельным мышам. Общий объем инъекции, содержащей суспендированные клетки, составлял 200 мкл.

Мыши были включены в это исследование на 21-й день после трансплантации, а средний объем опухоли составлял около 180 мм³ (день 0). Мышей случайным образом распределяли в одну из пяти групп (n=5/группа), а затем мышам вводили носитель ADC (5 мл/кг, в/в в хвост), каждое ADC вещество (1, 3 или 5 мг/кг, в/в в хвост) и иматиниб (100 мг/кг, п/о) (Таблица 8). В качестве носителя ADC, буфер для PoC-DM1 представлял собой смесь 10 мМ сукцината натрия, 6% сахарозы и 0,05% Tween20 (pH 5,0), а буфер для остальных представлял собой смесь 20 мМ гистидина (Merck, 104352), 50 мМ NaCl (Sigma, S3014), 5% сахарозы (Sigma, S0389) (pH 6,5) и 0,22 мкМ фильтра (Merck, S2GPU11RE). Индивидуальные дозы рассчитывались на основании массы тела животного, зафиксированной непосредственно перед введением, с объемом дозы 5 мл/кг массы тела.

Таблица 8

№	Субъект	Интервал, путь
1	Контроль (носитель, ADC буфер)	D0, D7, D14 (три раза), в/в
2	Иматиниб 100 мг/кг	D0 - D29 (ежедневно в течение 30 дней), п/о
3	ADC 1 мг/кг	D0, D7, D14 (три раза), в/в
4	ADC 3 мг/кг	D0, D7, D14 (три раза), в/в
5	ADC 5 мг/кг	D0, D7, D14 (три раза), в/в

ADC вещества показаны в Таблица 9 ниже:

Таблица 9

Группа исследования #	ADC
#PoC-DM1	2G4-SMCC-DM1
#003-1	2G4-ThioBridge [®] -Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) DAR 2
#004-2	2G4-ThioBridge [®] -Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) DAR 4
#003-2	2G4-MC-Val-Cit-PAB-MMAE
#007-1	2G4-ThioBridge [®] -Glu-[(Val-Cit-PAB-SN-38)] ₂ -Glu-[PEG(24u)] ₂

Даты умерщвления для каждой группы были следующими:

- Носитель и иматиниб 100 мг/кг: умерщвляли в день 49.
- Все группы ADC (за исключением 007-1): умерщвляли в день 63.
- #007-1 группа: умерщвляли в день 42 (#007-1 группу умерщвляли до контрольной группы (носитель), поэтому никакого сравнения не осуществляли).

Всех животных наблюдали раз в день для определения смертности, общего состояния и клинических признаков (время, начало, тяжесть и восстановление). Объем опухоли и массу тела измеряли два раза в неделю. Для измерения объема опухоли длину, ширину и толщину измеряли с использованием штангенциркуля.

Результаты показаны на Фиг. 4а - 4е.

В течение периода испытания до умерщвления никакой неблагоприятной реакции на лекарственное средство не наблюдали ни в одной из групп.

Никакого снижения массы тела или увеличения массы тела на 10% или более не наблюдали в течение 49 дней в группе введения иматиниба 100 мг/кг и в группе введения исследуемого ADC (1 мг/кг, 3 мг/кг и 5 мг/кг) по сравнению с контролем (носитель). После этого никакого быстрого снижения массы тела или быстрого увеличения массы тела не наблюдали ни в одной из групп. Это говорит о том, что все из ADC веществ настоящего изобретения являются высокобезопасными.

На день 49 группа введения иматиниба 100 мг/кг показала небольшое ингибирование роста опухоли по сравнению с контролем (носитель), тогда как группы исследования ADC все показали более сильный эффект ингибирования роста опухоли (за исключением #007-1 1 мг/кг). В частности, было подтверждено, что группа исследования ADC 2G4 ThioBridge[®]-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) (#003-1 и #004-2) имела существенный эффект ингибирования роста опухоли при 3 или 5 мг/кг, и опухоль оставалась почти на том же уровне даже после прекращения лечения.

Как результат измерения массы опухоли после умерщвления, все группы исследования (за исключением #007-1; умерщвленной до контрольной группы) показали значительно большее уменьшение по сравнению с контролем (носитель) (см., Таблицу 10 ниже). В частности, было обнаружено, что группа исследования ADC 2G4 ThioBridge[®]-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) (#003-1 и #004-2) имела существенный эффект ингибирования роста опухоли.

Таблица 10

(уменьшение, %)	#PoC-DM1	#003-1	#004-2	#003-2
3 мг/кг	23,9	49,1	78,0	34,2
5 мг/кг	17,6	67,3	87,4	70,2

Приведенные выше результаты подтверждают, что группа введения ADC показала статистически значимую эффективность по сравнению с контролем.

Пример 4: Эффективность против SCLC у мышей *in vivo* (SCLC-H526 клетки)

Для оценки эффективности ADC веществ против SCLC был проведен эксперимент. Использовали модель ксенотрансплантата SCLC-H526 (NCI-H526, стадия E, карцинома; вариант мелкоклеточного рака легких, сверхэкспрессия c-Kit).

Анализ осуществляли так же, как в Примере 2, за исключением того, что использовали клетки SCLC-H526 (2 X 10⁶/100 мкл/животное/бессывороточная среда RPMI-1640) в 50% Matrigel (Corning, 354248, NY, USA). Мыши были включены в это

исследование на 13-й день после трансплантации, а средний объем опухоли составлял около 165 мм³ (день 0); иматиниб вводили перорально в течение 22 дней с D0 по D21. Группы исследования: #PoC-DM1, #003-1, #004-2 и #003-2.

Результаты показаны на Фиг. 5a - 5d.

В течение периода испытания до умерщвления никакой неблагоприятной реакции на лекарственное средство не наблюдали ни в одной из групп.

Никакого снижения массы тела или увеличения массы тела на 10% или более не наблюдали в течение 21 дня в группе введения иматиниба 100 мг/кг и в группе введения исследуемого ADC (1 мг/кг, 3 мг/кг и 5 мг/кг) по сравнению с контролем (носитель). После этого никакого быстрого снижения массы тела или быстрого увеличения массы тела не наблюдали ни в одной из групп. Это говорит о том, что все из ADC веществ настоящего изобретения являются высокобезопасными.

На день 21 группа введения иматиниба 100 мг/кг показала небольшое ингибирование роста опухоли по сравнению с контролем (носитель), тогда как группа введения исследуемого ADC при 3 или 5 мг/кг показала более сильный эффект ингибирования роста опухоли (за исключением #007-1 1 мг/кг). В частности, к удивлению, лечение в группе #004-2 3 мг/кг и группе #004-2 5 мг/кг индуцировало полную ремиссию опухоли без возобновления роста даже после прекращения введения в течение вплоть до 105 дней.

Как результат измерения массы опухоли после умерщвления, все группы исследования (за исключением #007-1; умерщвленной до контрольной группы) показали значительно большее уменьшение по сравнению с контролем (носитель) (см., Таблицу 11 ниже). В частности, было обнаружено, что группа введения исследуемого ADC 2G4 ThioBridge[®]-Glu-(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) (#004-2) имела существенный эффект ингибирования роста опухоли.

Таблица 11

(уменьшение, %)	#PoC-DM1	#003-1	#004-2	#003-2
5 мг/кг	73,8	60,0	99,5	53,7

Приведенные выше результаты подтверждают, что группа введения ADC показала статистически значимую эффективность по сравнению с контролем.

Пример 5: Эффективность против тучноклеточной опухоли у мышей *in vivo* (НМС 1.2 клетки)

Для оценки эффективности NN3201 (2G4-ThioBridge[®]-Glu(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) DAR 4; #004-2) против тучноклеточной опухоли был проведен эксперимент. Использовали модель ксенотрансплантата НМС 1.2 (мутация с-Kit и резистентность к иматинибу; Экзон11 (V560G) + Экзон17 (D816V)).

4-недельным самкам мышей CB-17 SCID с иммунодефицитом (Janvier France, Inc.) давали акклиматизироваться в условиях SPF (без специфических патогенов) в течение 18 дней перед использованием их в эксперименте. Клетки НМС-1.2 в 50% Matrigel (Corning,

354248, NY, USA) вводили подкожно 6-недельным мышам (1 X 10⁶/100 мкл/животное/бессывороточная среда IMDM). Общий объем инъекции, содержащей суспендированные клетки, составлял 200 мкл.

Мыши были включены в это исследование в день 11 после трансплантации, а средний объем опухоли составлял около 175,4 мм³ (день 0). Мышей случайным образом распределяли в одну из групп (n=6/группа) и затем мышам вводили носитель ADC (5 мл/кг, в/в в хвост), 2G4 (5 мг/кг, в/в в хвост), #PoC-DM1 (5 мг/кг, в/в в хвост), NN3201 (1, 3 или 5 мг/кг, в/в в хвост) и иматиниб (100 мг/кг, п/о). В качестве носителя ADC использовали смесь 20 мМ гистидина (Merck, 104352), 50 мМ NaCl (Sigma, S3014), 5% сахарозы (Sigma, S0389) (pH 6,5) и 0,22 мкм фильтра (Merck, S2GPU11RE). Индивидуальные дозы рассчитывали на основании массы тела животного, зафиксированной непосредственно перед введением, с объемом дозы 5 мл/кг массы тела. Внутривенные инъекции вводили три раза в D0, D7 и D14, а иматиниб вводили перорально в течение 18 дней с D0 по D17.

Результаты показаны на Фиг. 6.

В течение периода испытания ни в одной из групп не наблюдали никакой неблагоприятной реакции на лекарственное средство.

Никакого снижения массы тела или увеличения массы тела на 10% или более не наблюдали в течение 17 дней в группе введения иматиниба 100 мг/кг и в группе введения испытываемого средства по сравнению с контролем (носитель). После этого никакого быстрого снижения массы тела или быстрого увеличения массы тела не наблюдали ни в одной из групп. Это говорит о том, что все из ADC веществ настоящего изобретения являются высокобезопасными.

На день 17 группа введения иматиниба 100 мг/кг показала небольшое ингибирование роста опухоли, тогда как группа введения исследуемого ADC показала более сильный эффект ингибирования роста опухоли по сравнению с контролем (носитель).

В день 77 опухоли повторно инокулировали. В день 95 значение TGI (ингибирование роста опухоли) составило 71,0% в #NN3201 1 мг/кг (ре-) инокулированной группе, 79,0% в #NN3201 3 мг/кг (ре-) инокулированной группе и 74,8% в #NN3201 5 мг/кг (ре-) инокулированной группе по сравнению с контрольной (первично-) инокулированной группой. Кроме того, #PoC-DM1 5 мг/кг (ре-) инокулированная группа показала ингибирование опухоли 46,2% (Фиг. 7).

Приведенные выше результаты подтверждают, что группа введения ADC показала статистически значимую эффективность по сравнению с контролем.

Пример 6: Эффективность против AML у мышей in vivo (Kasumi-1 клетки)

Этот эксперимент был проведен для оценки эффективности NN3201 (2G4 ThioBridge[®] -Glu(Val-Cit-PAB-MMAE)-PEG(24u) DAR 4) против AML. Использовали модель ксенотрансплантата Kasumi-1 (с-Kit-мутантные и частично чувствительные к иматинибу; Экзон17 (N822K)).

Эксперимент осуществляли таким же способом, как в Примере 5, за исключением того, что использовали клетки Kasumi-1 ($3 \times 10^6/100$ мкл/животное/бессывороточная среда RPMI1640) в 50% Matrigel (Corning, 354248, NY, USA). Мыши были включены в это исследование в день 29 после трансплантации, а средний объем опухоли составлял около 170 мм^3 (день 0).

Результаты показаны на Фиг. 8.

В течение периода испытания ни в одной из групп не наблюдали никакой неблагоприятной реакции на лекарственное средство.

Никакого снижения массы тела или увеличения массы тела на 10% или более не наблюдали в течение 17 дней в группе введения иматиниба 100 мг/кг и в группе введения испытываемого средства по сравнению с контролем (носитель). После этого никакого быстрого снижения массы тела или быстрого увеличения массы тела не наблюдали ни в одной из групп. Это говорит о том, что все из ADC веществ настоящего изобретения являются высокобезопасными.

На день 17 группа введения иматиниба 100 мг/кг показала небольшое ингибирование роста опухоли по сравнению с контролем (носитель), тогда как группа PoC-DM1 показала слабый ингибирующий эффект. Было обнаружено, что группа NN3201 имела более сильный эффект ингибирования роста опухоли.

Приведенные выше результаты подтверждают, что группа введения ADC показала статистически значимую эффективность по сравнению с контролем.

Пример 7: Эффективность против рака молочной железы у мышей in vivo (MDA-MB-468 клетки)

Для оценки эффективности ADC вещества против рака молочной железы был проведен эксперимент. В этом эксперименте использовали модель ксенотрансплантата MDA-MB-468 (c-Kit, Отрицательные).

Эксперимент осуществляли таким же способом, как в Примере 5, за исключением того, что использовали клетки MDA-MB-468 ($5 \times 10^6/100$ мкл/животное/бессывороточная среда DMEM) в 50% Matrigel (Corning, 354248, NY, USA). Мыши были включены в это исследование в день 21 после трансплантации, а средний объем опухоли составлял около 167 мм^3 (день 0).

Результаты показаны на Фиг. 9a - 9d.

В течение периода испытания до умерщвления ни в одной из групп не наблюдали никакой неблагоприятной реакции на лекарственное средство.

Никакого снижения массы тела или увеличения массы тела на 10% или более не наблюдали в течение 49 дней в группе введения иматиниба 100 мг/кг и в группе введения исследуемого ADC (1 мг/кг, 3 мг/кг и 5 мг/кг) по сравнению с контролем (носитель). После этого никакого быстрого снижения массы тела или быстрого увеличения массы тела не наблюдали ни в одной из групп. Это говорит о том, что все из ADC веществ настоящего изобретения являются высокобезопасными.

На день 49 #PoC-DM1 не показал никакой противоопухолевой активности в

ксенотрансплантатах, трансплантированных с MDA-MB-468 клетками, в которых отсутствовала экспрессия с-Kit, по сравнению с контролем (носитель); при этом было обнаружено, что #003-1, #004-2 и #003-2 имели более сильный эффект ингибирования роста опухоли при всех дозах. В частности, было обнаружено, что в группе обработки #004-2 при 5 мг/кг существенно ингибировался рост опухоли.

Как результат измерения массы опухоли после умерщвления, опухоли уменьшались в #003-1, #004-2, #003-2 по сравнению с контролем (носитель) (см., Таблицу 12 ниже). В частности, было обнаружено, что группа #004-2 имела существенный эффект ингибирования роста опухоли.

Таблица 12

(уменьшение, %)	#003-1	#004-2	#003-2
5 мг/кг	41,2	84,6	62,0

Исходя из результатов MDA-MB-468, интересно отметить, что ADC с использованием 2G4, расщепляемого линкера и MMAE имел дозозависимую эффективность в модели ксенотрансплантата на основе с-Kit-отрицательных клеток, тогда как ADC с использованием нерасщепляемого линкера не имел. Приведенные выше результаты дают основание предположить, что ADC, включающий 2G4, расщепляемый линкер и MMAE, может быть идеальным партнером, даже когда он нацелен не на с-Kit.

Пример 8: Эффективность против SCLC у мышей in vivo (SCLC-H526 клетки) - анализ повторной провокации

Чтобы определить, было ли лечение NN3201 эффективным даже после повторной инокуляции опухоли, был проведен анализ повторной провокации опухоли. Анализ осуществляли таким же образом, как в Примере 3, за исключением того, что экспериментальной группой была только группа #004-2 при 3 мг/кг и 5 мг/кг. Повторную провокацию опухоли осуществляли во время полной ремиссии опухоли (день 63). В контрольной когорте (квадраты) использовали животных того же возраста, что и контрольные животные, которым была сделана первая инокуляция опухоли на 63-й день без первоначальной трансплантации опухоли на правом боку. Для анализа ксенотрансплантата клетки SCLC-H526 ($2 \times 10^6/100$ мкл/животное/бессывороточная среда RPMI-1640) в 50% Matrigel (Corning, 354248, NY, USA) вводили мышам SCID C.B-17 п/к (подкожно, левый бок).

Результаты показаны на Фиг. 10.

При повторной провокации опухоли группы #004-2 при 3 мг/кг и 5 мг/кг показали дозозависимую эффективность без дополнительных инъекций ADC, тогда как контроль показал рост опухоли.

Пример 9: Эффективность против тучноклеточной опухоли у мышей in vivo (HMC 1.2 клетки) - анализ повторной провокации

Чтобы определить, было ли лечение NN3201 эффективным даже после повторной инокуляции опухоли, был проведен анализ повторной провокации опухоли.

В то время, когда была подтверждена полная ремиссия опухоли в Примере 4 (день 77), был проведен анализ повторной провокации опухоли в группе NN3201 (1, 3 или 5 мг/кг, внутривенно в хвост). Авторы настоящего изобретения включили PoC DM1 ADC, чтобы понять различия между DM1 и MMAE в качестве полезной нагрузки с точки зрения иммуногенной гибели клеток (ICD). В качестве контроля использовали животных того же возраста. Для анализа ксенотрансплантата клетки HMC-1.2 ($1 \times 10^6/100$ мкл/животное/бессывороточная среда IMDM) в 50% Matrigel (Corning, 354248, NY, USA) вводили мышам C.B-17 SCID п/к (подкожно, левый бок). Результаты показаны на Фиг. 11.

В анализе повторной провокации опухоли группа NN3201 показала дозозависимую эффективность без дополнительных инъекций ADC, тогда как контроль показал рост опухоли. Группа PoC-DM1 показала более низкое ингибирование роста опухоли, чем NN3201, и это указывает на то, что NN3201 имел более сильный эффект, чем PoC-DM1.

Пример 10: Анализ на предтоксичность in vivo (10 мг/кг)

Был проведен эксперимент по оценке токсичности ADC веществ путем исследования изменений массы тела в течение двух недель, когда мышам Balb/c осуществляли введение один раз в/в при высокой концентрации.

7-недельным самкам мышей BALB/c (Dae Han Bio Link) давали акклиматизироваться в условиях SPF (отсутствие специфических патогенов) перед использованием в эксперименте. Мыши были случайным образом распределены в одну из шести групп (n=3/группа), а затем мышам вводили носитель ADC (5 мл/кг, внутривенно в хвост) или каждое ADC вещество (10 мг/кг, внутривенно в хвост). В качестве носителя ADC, буфер представлял собой смесь 20 мМ гистидина (Merck, 104352), 50 мМ NaCl (Sigma, S3014), 5% сахарозы (Sigma, S0389) (pH 6,5) и 0,22 мкМ фильтра (Merck, S2GPU11RE). Индивидуальные дозы рассчитывались на основании массы тела животного, зафиксированной непосредственно перед введением, с объемом дозы 5 мл/кг массы тела (Таблица 13).

Таблица 13

Группа. (NN3201-Abzena ADC) #003-1, #004-2, #003-2		Количество животных	Объем
1	Контроль (носитель, Abzena-ADC буфер)	3	5 мл/кг
2	#003-1 10 мг/кг	3	
3	#004-2 10 мг/кг	3	
4	#003-2 10 мг/кг	3	

Всех животных наблюдали раз в день для определения смертности, общего состояния и клинических признаков (время, начало, тяжесть и восстановление). Всех животных ежедневно взвешивали с момента распределения по группам. Животных умерщвляли на 14-й день.

После завершения эксперимента животных подвергали эвтаназии (поскольку при

эвтаназии с использованием респираторных анестетиков или CO₂-камеры может возникнуть застой в легких, цервикальная дислокация была выполнена как можно быстрее, чтобы минимизировать боль), и было проведено вскрытие для подтверждения наличия симптомов застоя в легких. Ткань (легкое) хранилась в 10% нейтральном забуференном формалине (NBF).

Результаты показаны на Фиг. 12.

В течение периода испытания ни в одной группе не наблюдалось побочных реакций на лекарственное средство.

В течение периода испытания ни в одной группе не наблюдалось симптомов отклонений массы тела (5% или более), таких как быстрое снижение массы тела или быстрое увеличение массы тела из-за введения препарата.

В конце эксперимента (день 14) масса тела увеличилась на 0,43 г (2,10%) в группе #003-1 10 мг/кг и на 0,63 г (3,00%) в группе #004-2 10 мг/кг по сравнению с днем введения (день 0). Масса тела в группе введения #003-2 10 мг/кг снизилась на 0,27 г (1,29%) в конце эксперимента (день 14) по сравнению с днем введения (день 0).

Ни в одной из групп не наблюдалось симптомов застоя в легочной ткани.

Пример 11: Анализ на предтоксичность in vivo (20/40/60 мг/кг)

Был проведен эксперимент для оценки токсичности ADC вещества путем исследования изменений массы тела в течение двух недель, когда мышам Balb/c осуществляли введение один раз в/в при высокой концентрации.

Анализ осуществляли таким же способом, как в Примере 10, за исключением того, что группы были определены следующим образом (Таблица 14).

Таблица 14

Группа	Количество животных	Объем
Контроль (без обработки)	3	-
Контроль (носитель, ADC буфер)	3	5 мл/кг
#003-1 20, 40 или 60 мг/кг	3	
#004-2 20, 40 или 60 мг/кг	3	

Результаты показаны на Фиг. 13а - 13d.

В течение периода испытания не наблюдали никакой неблагоприятной реакции на лекарственное средство ни в одной из групп.

В течение периода испытания ни в одной из групп не наблюдалось симптомов отклонений массы тела (5% или более), таких как быстрое снижение массы тела или быстрое увеличение массы тела из-за введения препарата. В первый день после введения (день 0) наблюдали снижение массы тела на 0,63 г (3,23%) в группе #PoC-DM1 40 мг/кг и на 0,70 г (3,57%) в группе #PoC-DM1 60 мг/кг. Однако масса тела восстанавливалась.

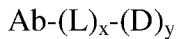
Хотя выше были описаны варианты осуществления настоящего изобретения, специалисты в данной области смогут модифицировать и изменять настоящее изобретение различными способами, добавляя, изменяя, удаляя или добавляя компоненты

и т.д., без отступления от сущности настоящего изобретения, изложенной в патентной формуле, и это также будет включено в объем патентной защиты настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат антитело-лекарственное средство следующей формулы 1:

<Формула 1>



в формуле:

Ab представляет собой анти-c-Kit антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом c-Kit человека в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10;

L представляет собой линкер, включающий расщепляемый линкер;

D представляет собой лекарственный компонент;

x представляет собой целое число от 1 до 8; и

y представляет собой целое число от 1 до 8.

2. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, где Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с одним или несколькими из R122, Y125, R181, K203, R205, S261 и H263 в SEQ ID NO: 12.

3. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент перекрестно конкурирует за связывание с эпитопом c-Kit человека в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 с эталонным антителом, включающим CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 2, CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 3, CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 4, CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 5 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 6.

4. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 2, CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 3, CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 4, CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 5 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 6.

5. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает переменный домен тяжелой цепи, представленный SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи, представленный SEQ ID NO: 8.

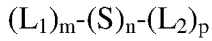
6. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.3 или 5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет одну или две аминокислоты в CDR, которые модифицированы, делетированы или заменены.

7. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-6, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент сохраняет по меньшей мере 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичность на всем протяжении переменного домена тяжелой цепи или переменного домена легкой цепи.

8. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, где L представляет собой линкер, включающий спейсер в форме, в которой полимер связан или не связан.

9. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, где линкер L имеет структуру следующей формулы 2:

<Формула 2>



в формуле:

L_1 представляет собой линкер, соединяющий Ab и S или Ab и L_2 ;

S представляет собой спейсер в форме, в которой полимер связан или не связан;

L_2 представляет собой расщепляемый линкер;

m представляет собой целое число от 0 до 8;

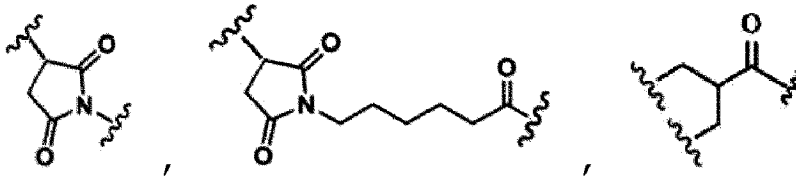
n представляет собой целое число от 0 до 8; и

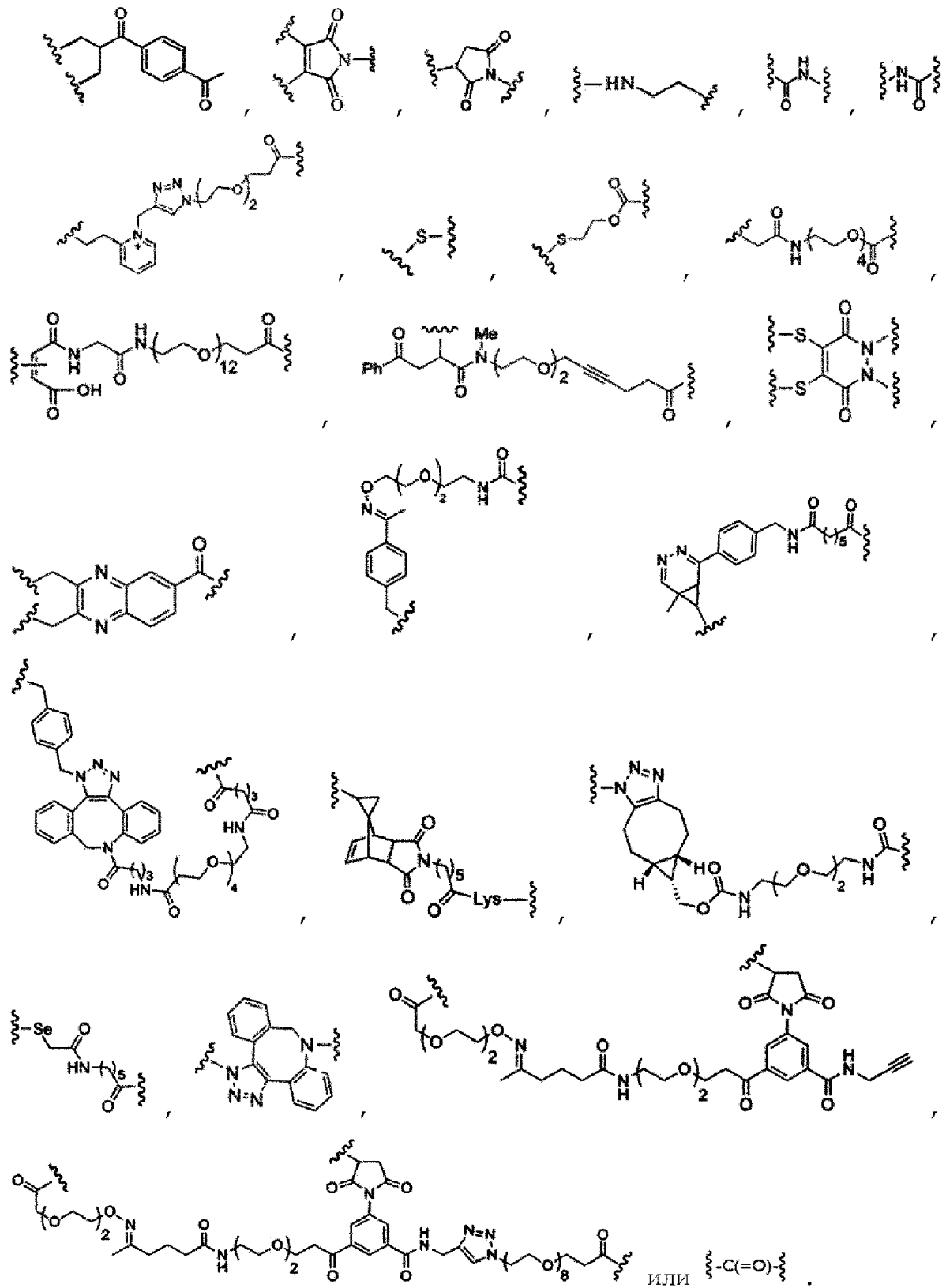
p представляет собой целое число от 1 до 8.

10. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.9, где m имеет значение от 1 до 4, n имеет значение от 1 до 4 и p имеет значение от 1 до 4.

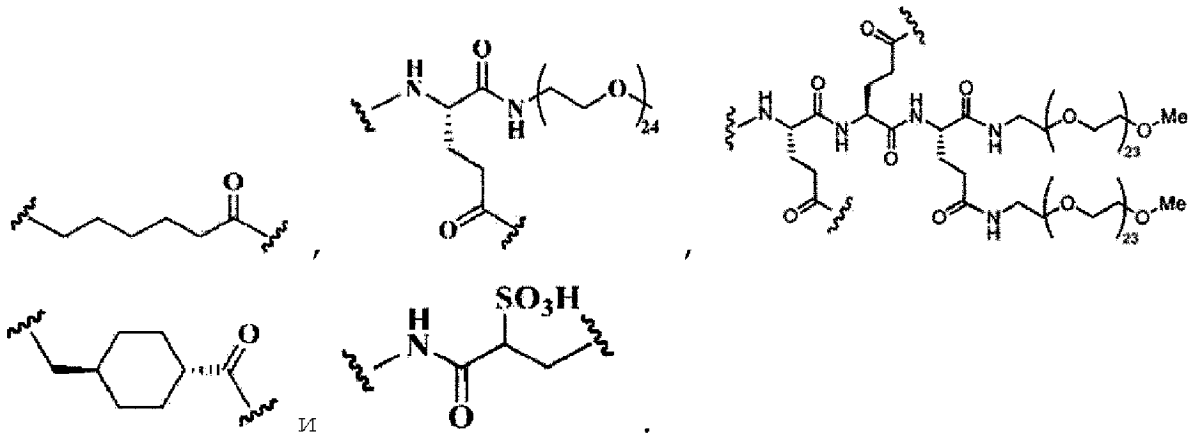
11. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.9, где L_1 включает линкер, выбранный из группы, состоящей из расщепляемого линкера, нерасщепляемого линкера, гидрофильного линкера, прозаряженного линкера и линкера на основе дикарбоновой кислоты.

12. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1 или 9, где L или L_1 включает





13. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.9, где S включает спейсер, выбранный из группы, состоящей из

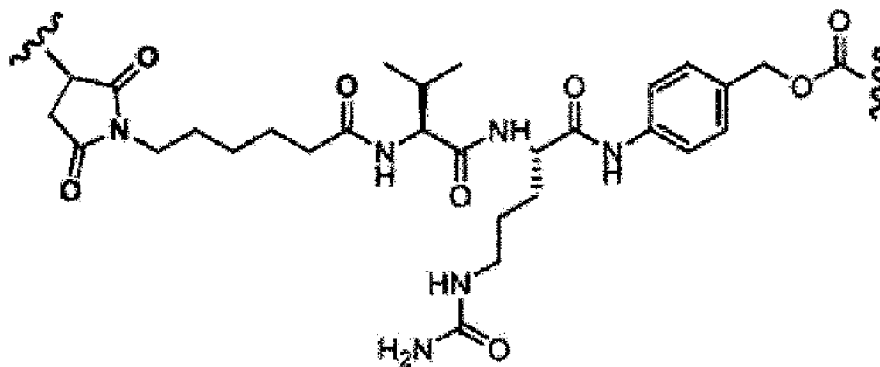


14. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.9, где S представляет собой спейсер, включающий аспартат, глутамат или их комбинацию в форме, в которой полимер связан или не связан.

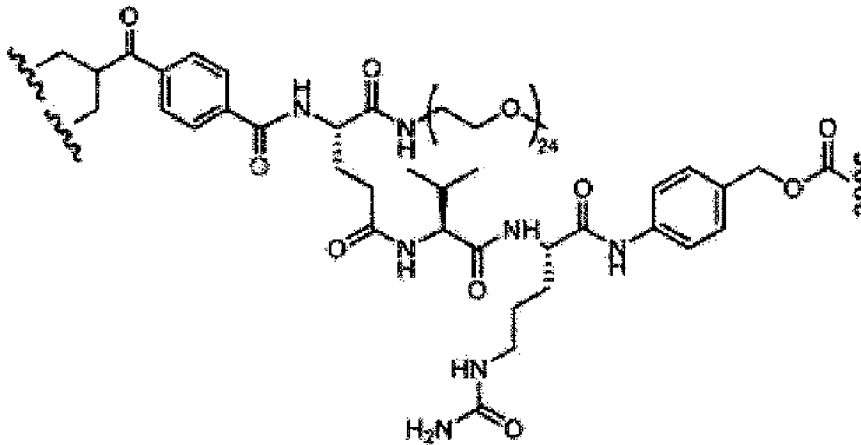
15. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.9, где полимер представляет собой полиалкилен, полиалкиленгликоль, поливинилпирролидон, полиакрилат, полиоксазолин, поливиниловый спирт, полиакриламид или полиметакриламид, сополимер НРМА, полиэфир, полиацеталь, поли(ортоэфир), поликарбонат, поли(иминокарбонат), полиамид, сополимер дивинилэфира-малеинового ангидрида или стирола-малеинового ангидрида, полисахарид или полиглутаминовую кислоту.

16. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.9, где L₂ включает линкер, выбранный из группы, состоящей из линкеров валин-цитруллин-п-аминобензилкарбамоил (Val-Cit-PAB), аланин-фенилаланин-п-аминобензилкарбамоил (Ala-Phe-PAB), аланин-аланин-п-аминобензилкарбамоил (Ala-Ala-PAB), валин-аланин-п-аминобензилкарбамоил (Val-Ala-PAB), фенилаланин-лизин-п-аминобензилкарбамоил (Phe-Lys-PAB), аланин-аланин-глицин-п-аминобензилкарбамоил (Ala-Ala-Gly-PAB) и глицин-глицин-глицин-п-аминобензилкарбамоил (Gly-Gly-Gly-PAB).

17. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, где линкер (L) включает линкер, выбранный из группы, состоящей из следующих формул 3-5.

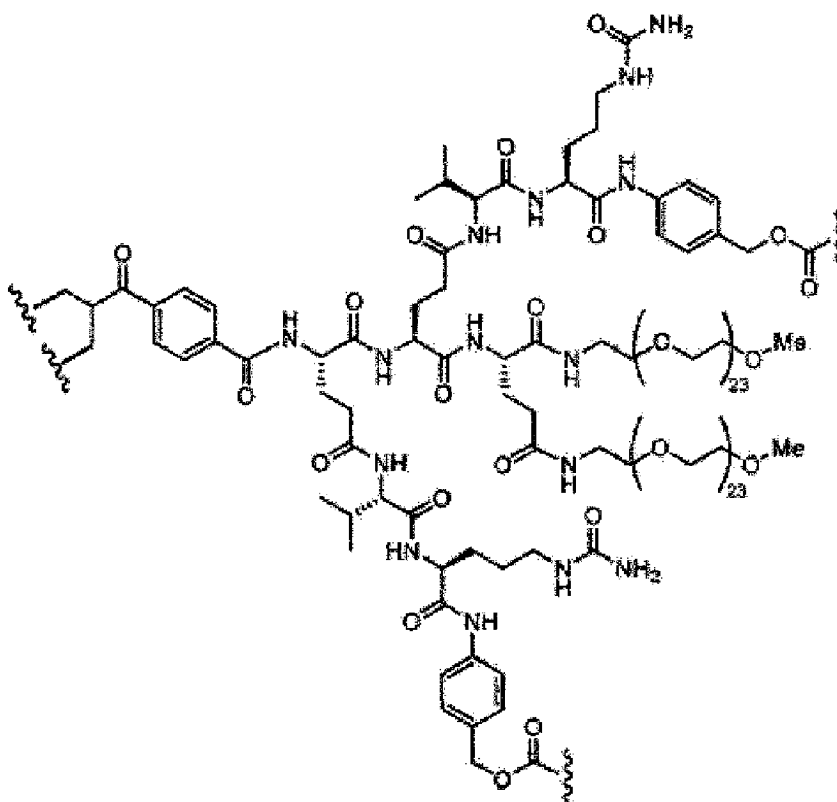


<Формула 3>.



или

<Формула 4>



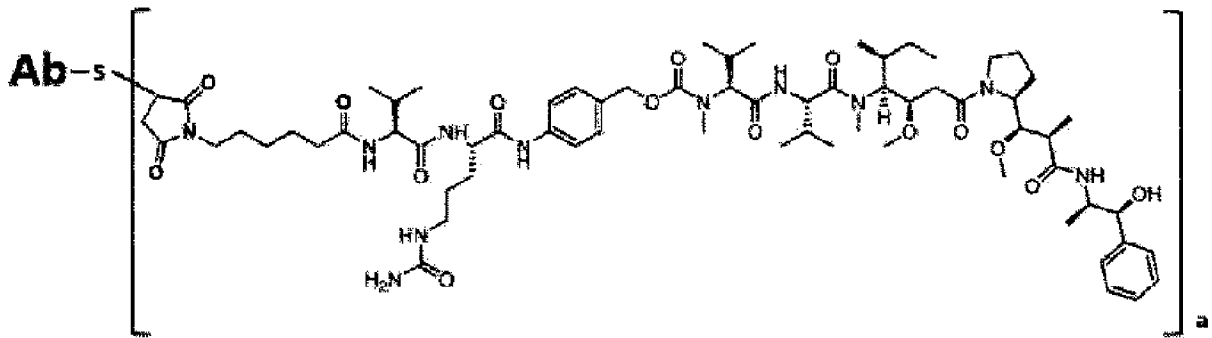
<Формула 5>.

18. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, где лекарственный компонент (D) выбран из группы, состоящей из ингибитора V-АТФазы, промотора апоптоза, ингибитора Bcl2, ингибитора MCL1, ингибитора HSP90, ингибитора IAP, ингибитора mTog, ингибитора микротрубочек, ауристатина, доластатина, майтанзиноида, MetAP (метионинаминопептидазы), ингибитора ядерного экспорта белка CRM1, ингибитора DPPIV, ингибитора протеасомы, ингибитора реакции переноса фосфорила в митохондриях, ингибитора синтеза белка, ингибитора киназы, ингибитора CDK2, ингибитора CDK9, ингибитора кинезина, ингибитора HDAC, повреждающего ДНК агента, алкилирующего ДНК агента, интеркалирующего ДНК агента, связующего малой бороздки ДНК и ингибитора DHFR.

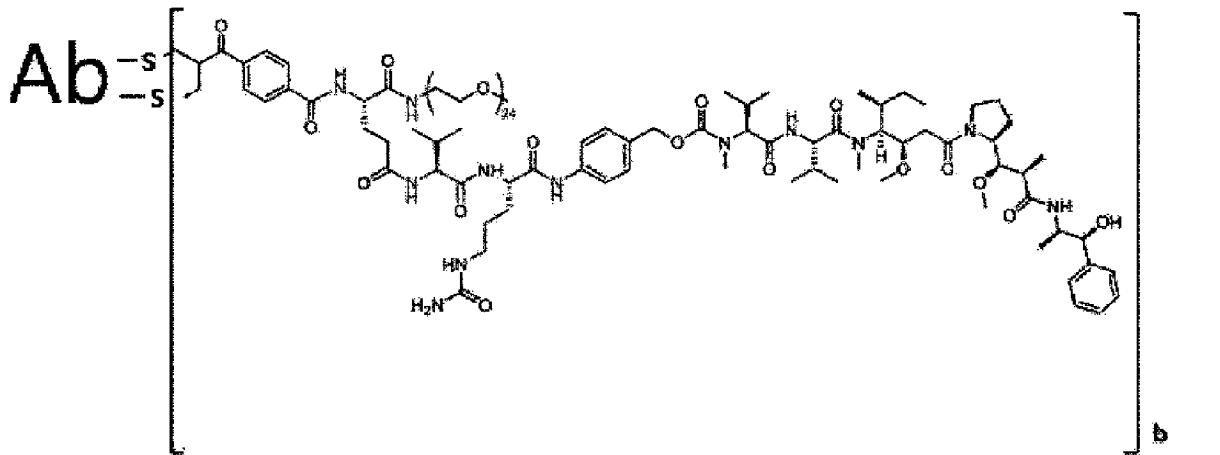
19. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.18, где лекарственный компонент (D) представляет собой компонент, являющийся ингибитором микротрубочек (MTI).

20. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.19, где лекарственный компонент (D) включает лекарственное средство, выбранное из группы, состоящей из SN-38 ((4S)-4,11-диэтил-4,9-дигидрокси-1,4-дигидро-3*H*,14*H*-пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-*b*]хинолин-3,14-дион), ауристатина, доластатина, монометилауристатина E (MMAE), монометилауристатина F (MMAF), монометилдоластатина 10 (MMAD) или их комбинации.

21. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, где конъюгат антитело-лекарственное средство выбран из группы, состоящей из следующих формул 6-8:

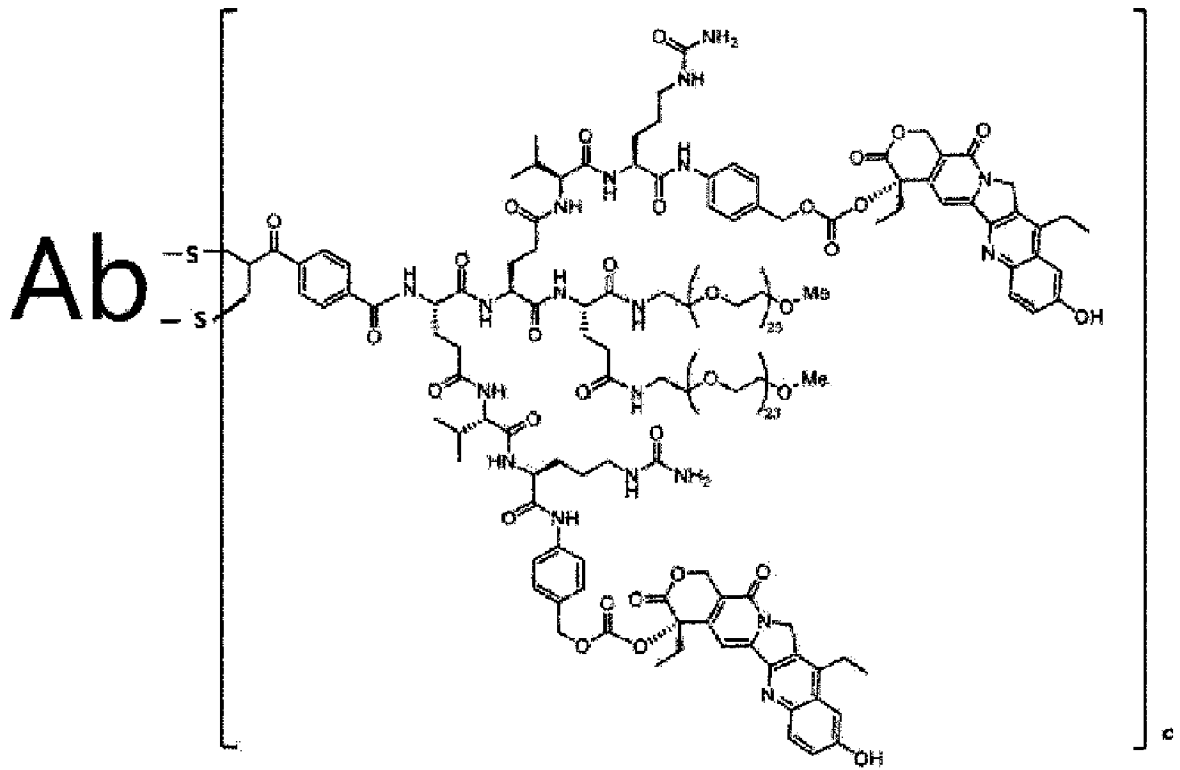


<Формула 6>,



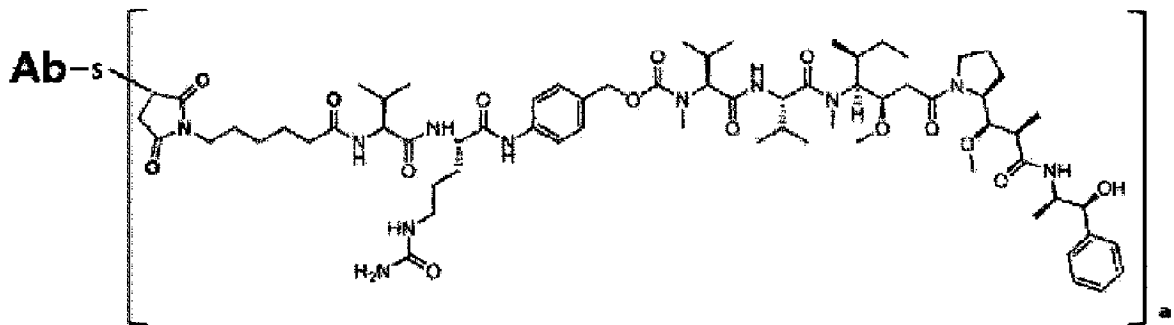
и

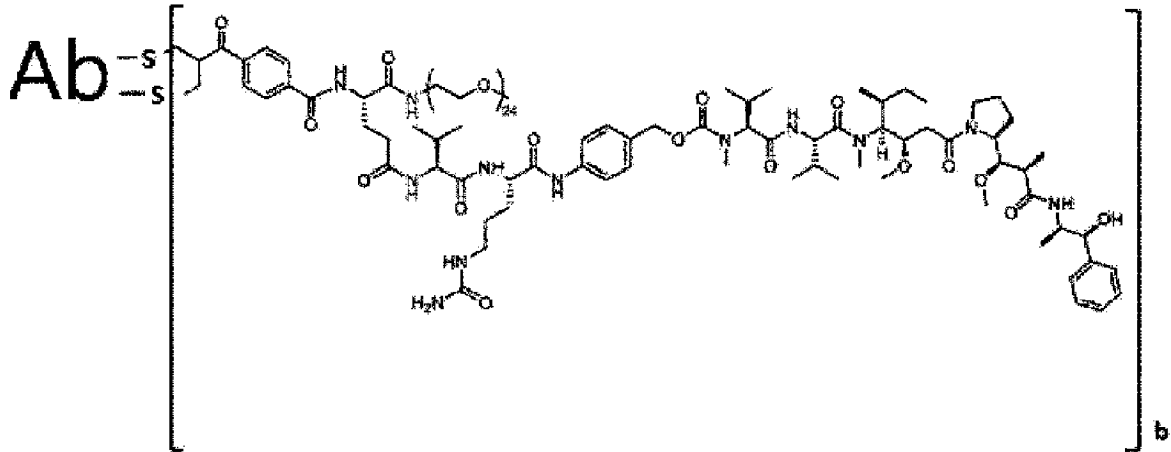
<Формула 7>



в формулах а представляет собой целое число от 1 до 8, и каждый из b и с представляет собой целое число от 1 до 4.

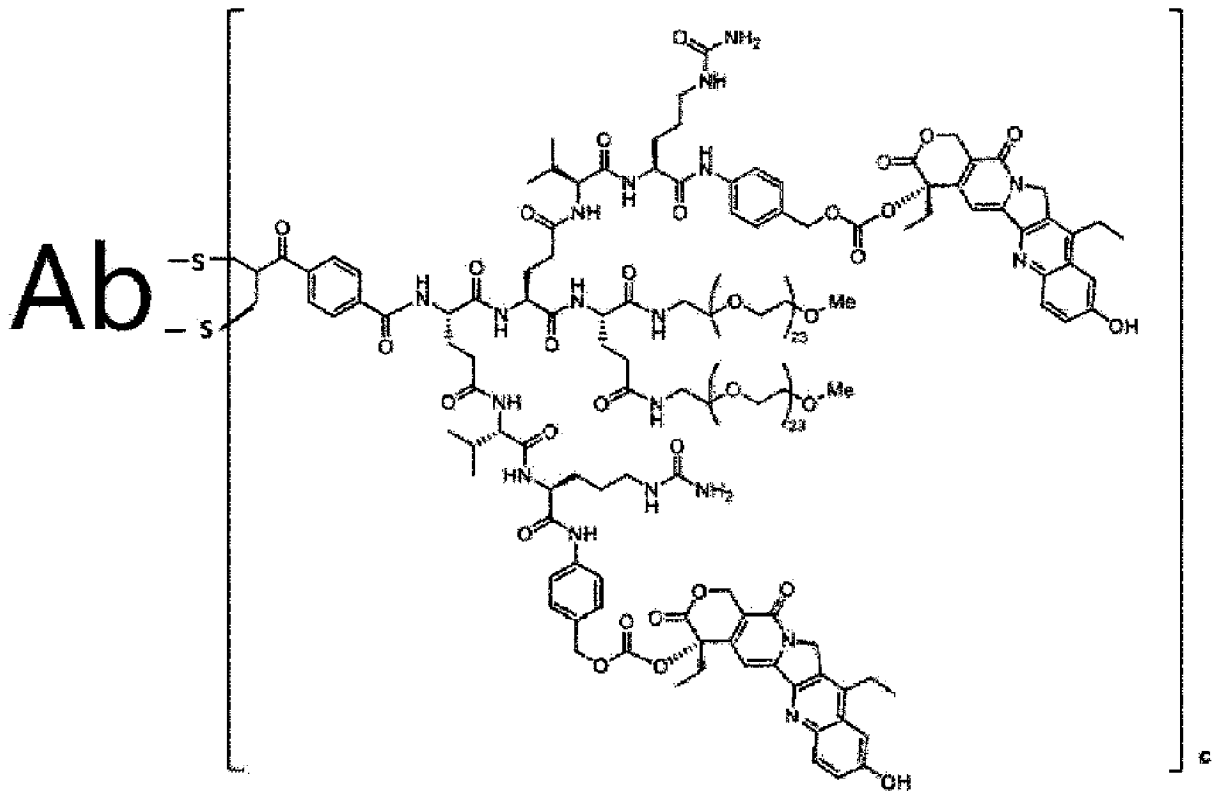
22. Конъюгат антитело-лекарственное средство, выбранный из группы, состоящей из следующих формул 6-8:





И

<Формула 7>



<Формула 8>.

в формулах:

Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий CDR1 тяжелой цепи SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи SEQ ID NO: 2, CDR3 тяжелой цепи SEQ ID NO: 3, CDR1 легкой цепи SEQ ID NO: 4, CDR2 легкой цепи SEQ ID NO: 5 и CDR3 легкой цепи SEQ ID NO: 6; и

a представляет собой целое число от 1 до 8, и каждый из b и c представляет собой целое число от 1 до 4.

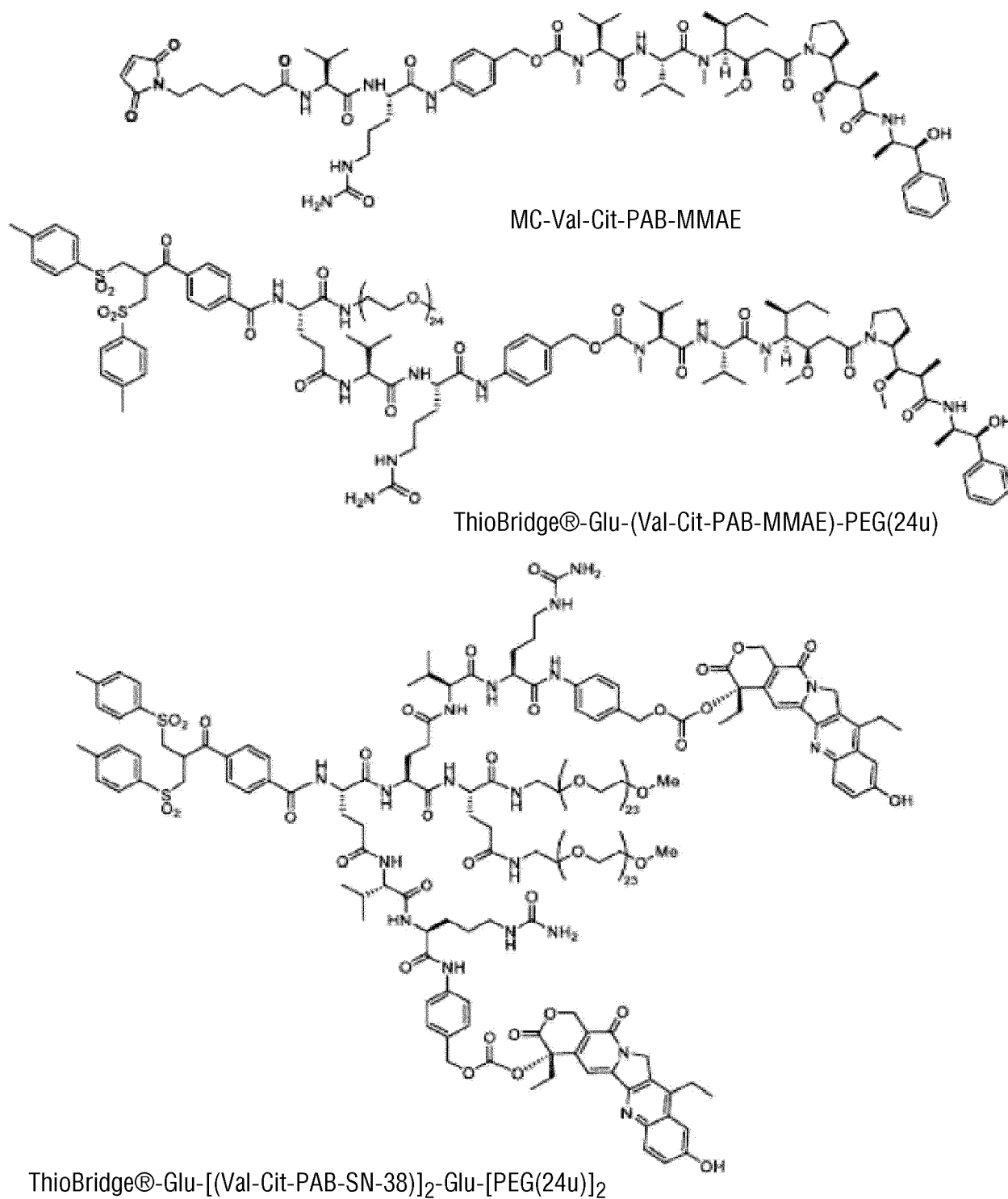
23. Фармацевтическая композиция для профилактики или лечения рака, включающая конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1 или 22.

24. Способ профилактики или лечения рака, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту композиции, включающей фармацевтически эффективное количество конъюгата антитело-лекарственное средство по п.1 или 22.

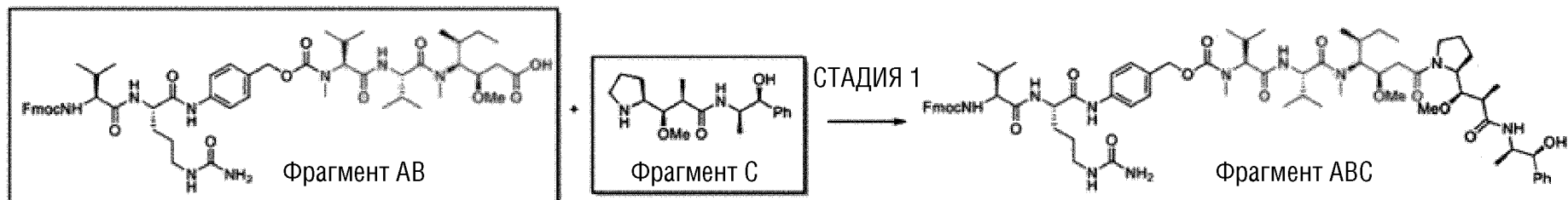
25. Применение конъюгата антитело-лекарственное средство по п.1 для использования в терапии.

По доверенности

ФИГ.1а



ФИГ.1b



СТАДИЯ 2

ThioBridge реагент: 250 г

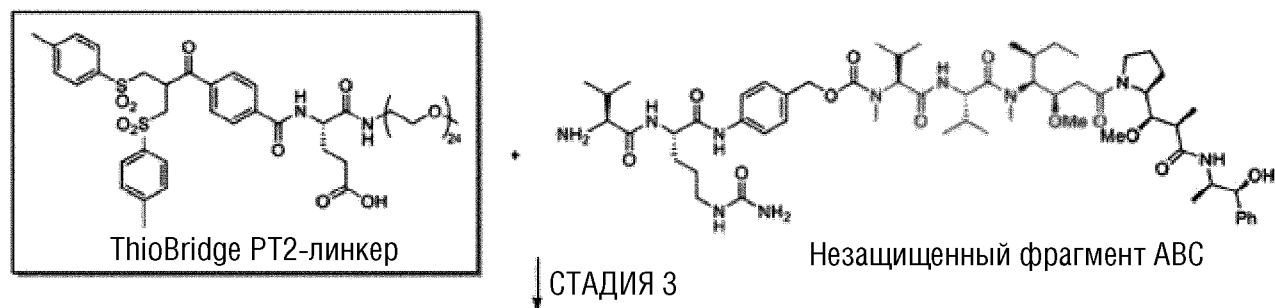
ThioBridge линкер: 343.5 г

Фрагмент А: 165.0 г

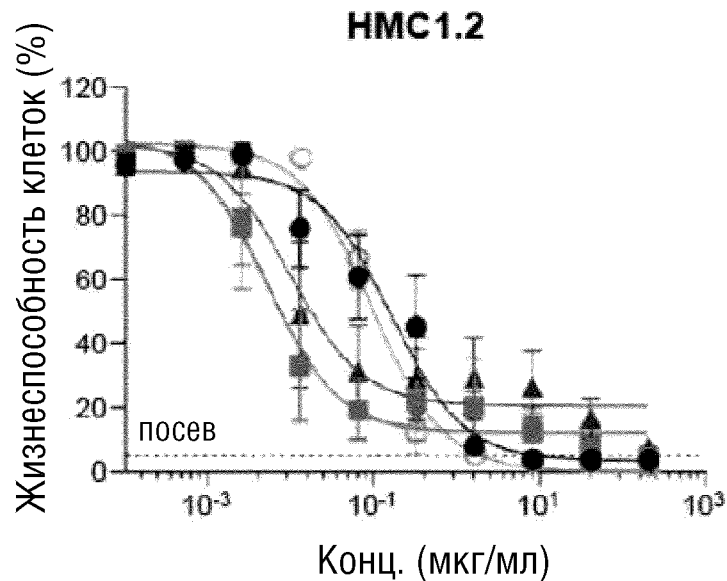
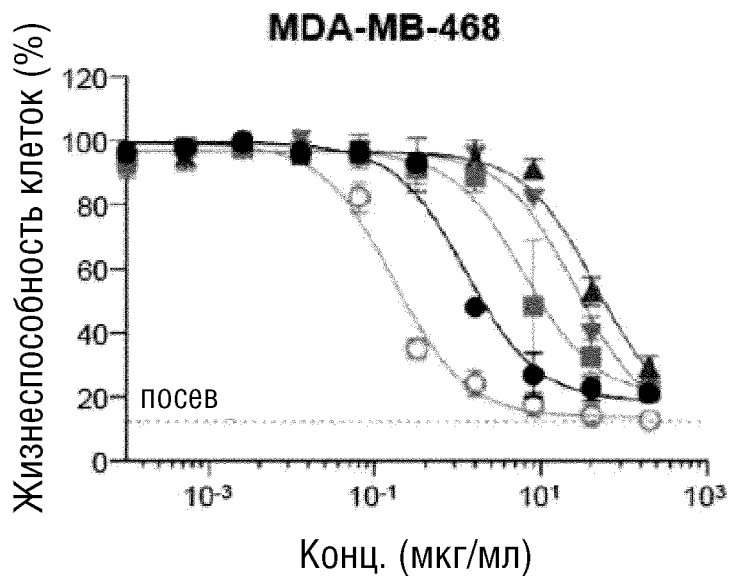
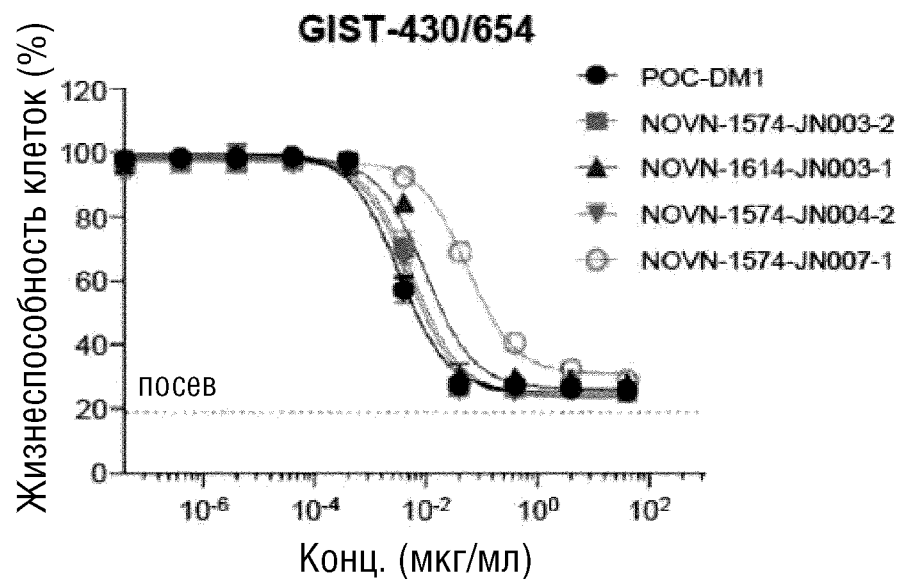
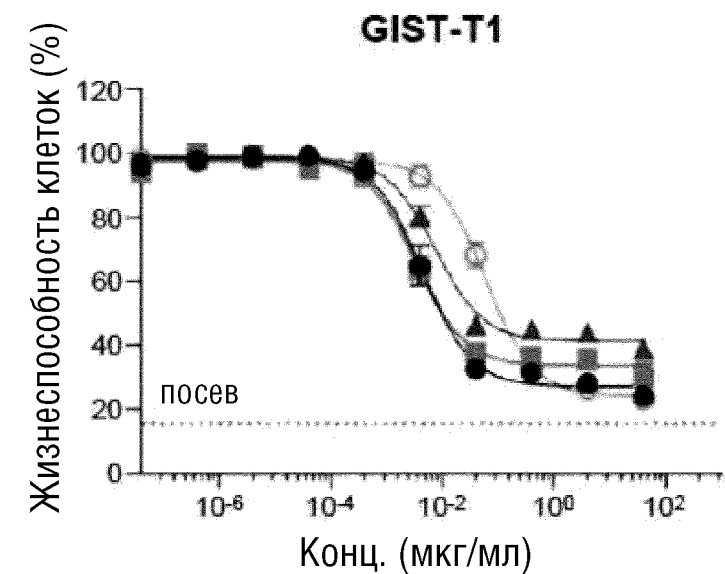
Фрагмент В: 304.5 г

Фрагмент С: 111.2 г

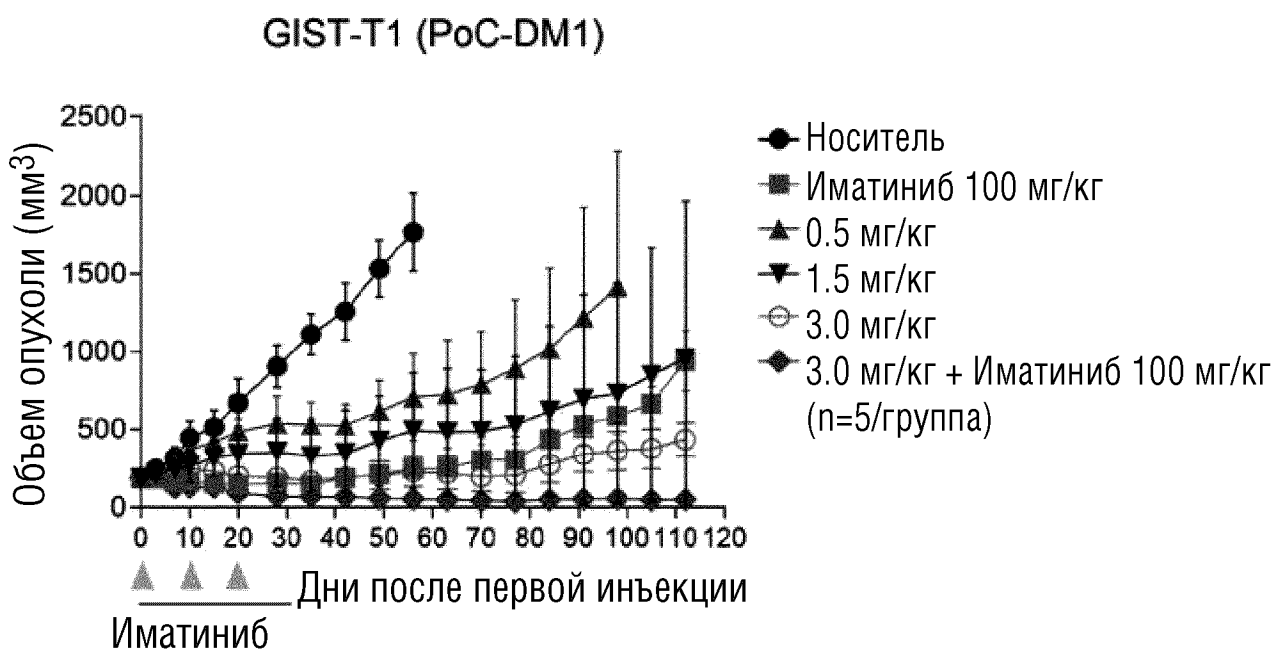
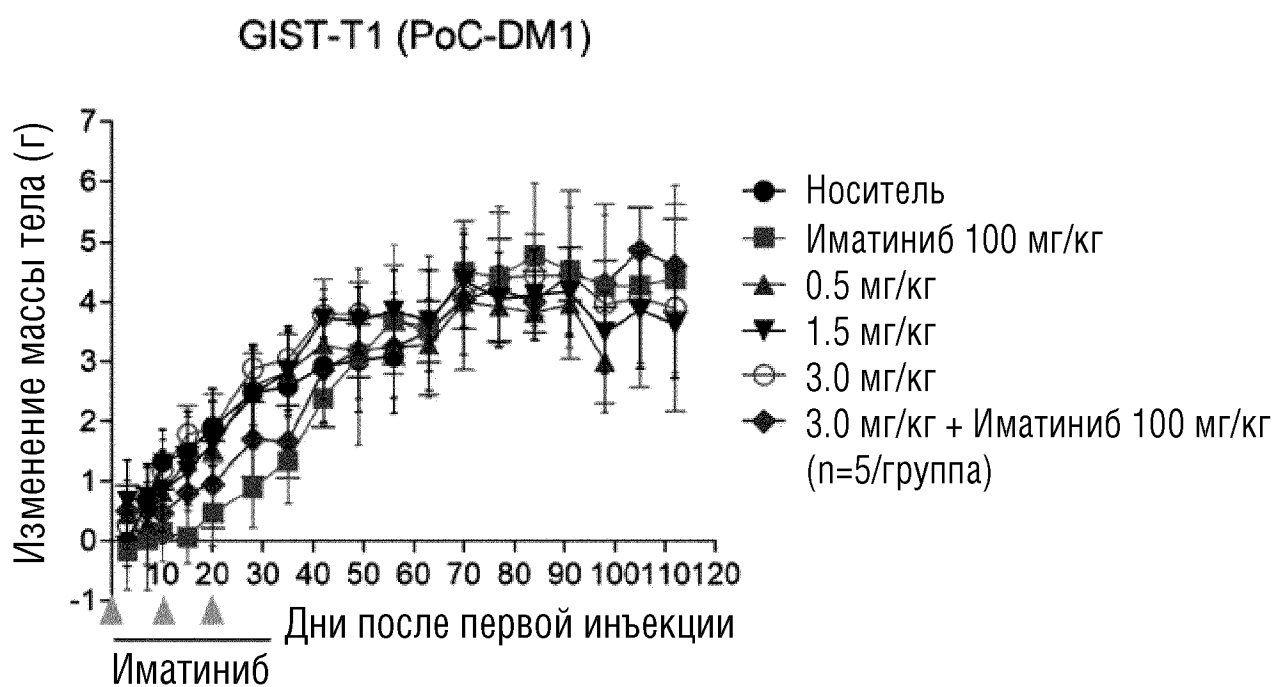
Фрагмент АВ: 250.0 г



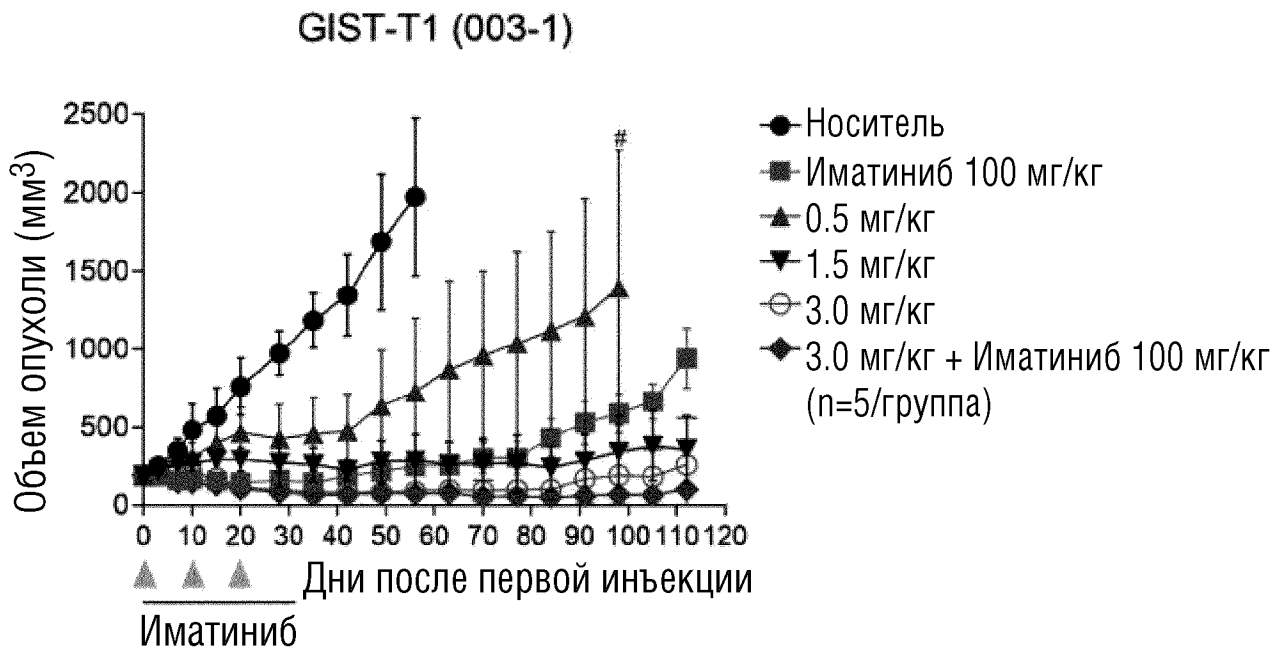
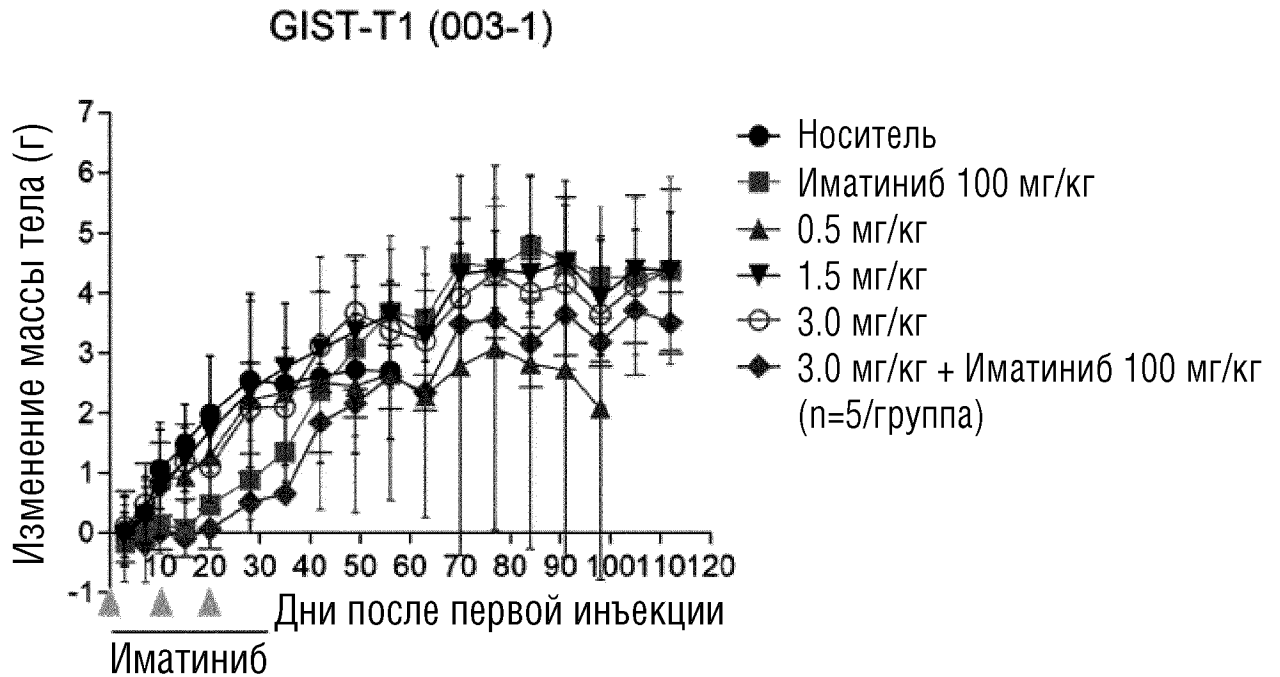
ФИГ.2



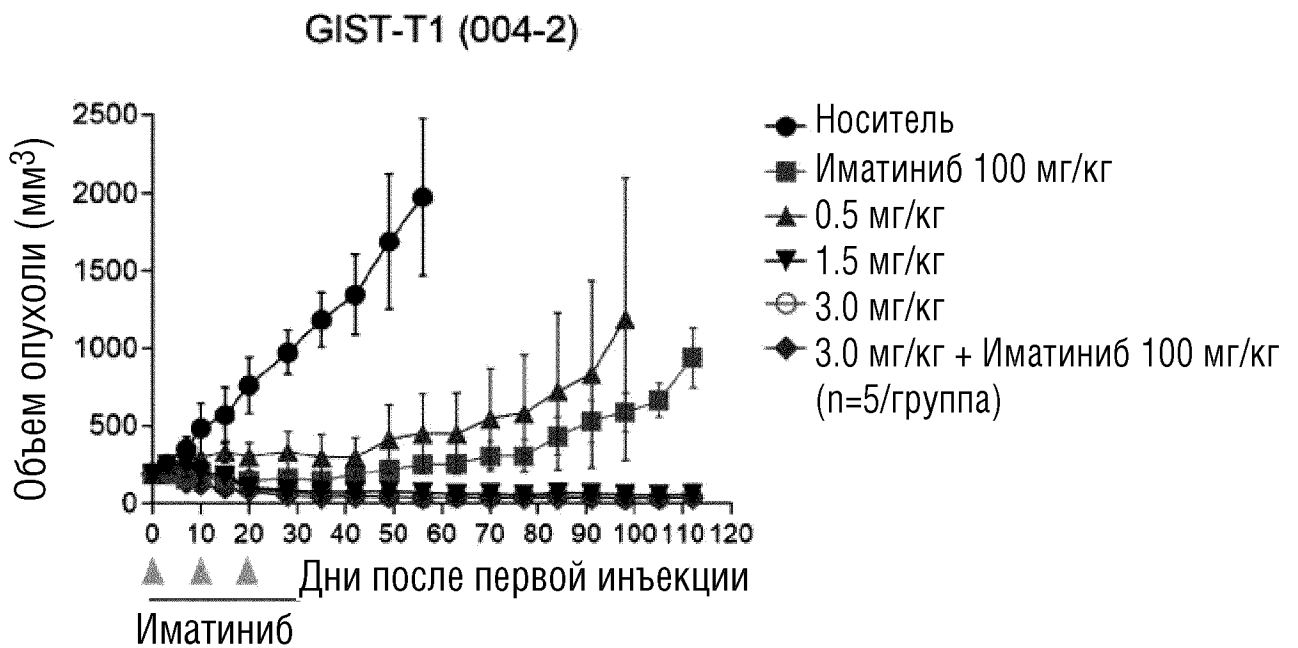
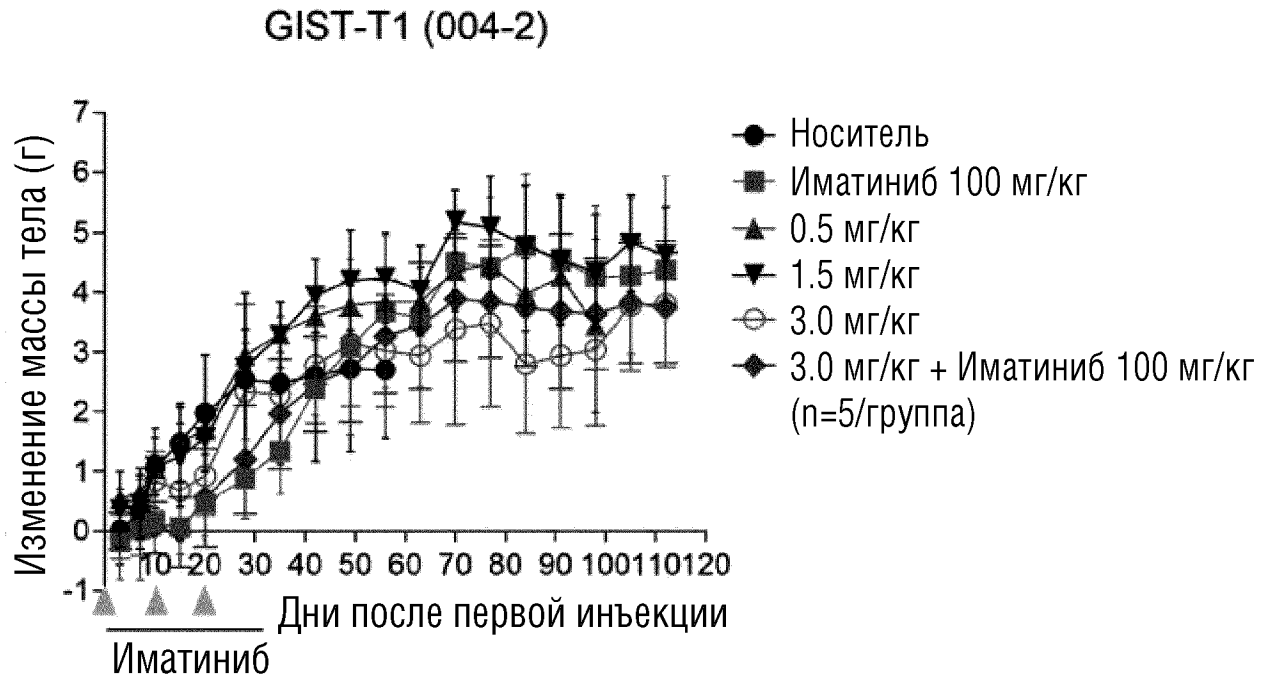
ФИГ.3а



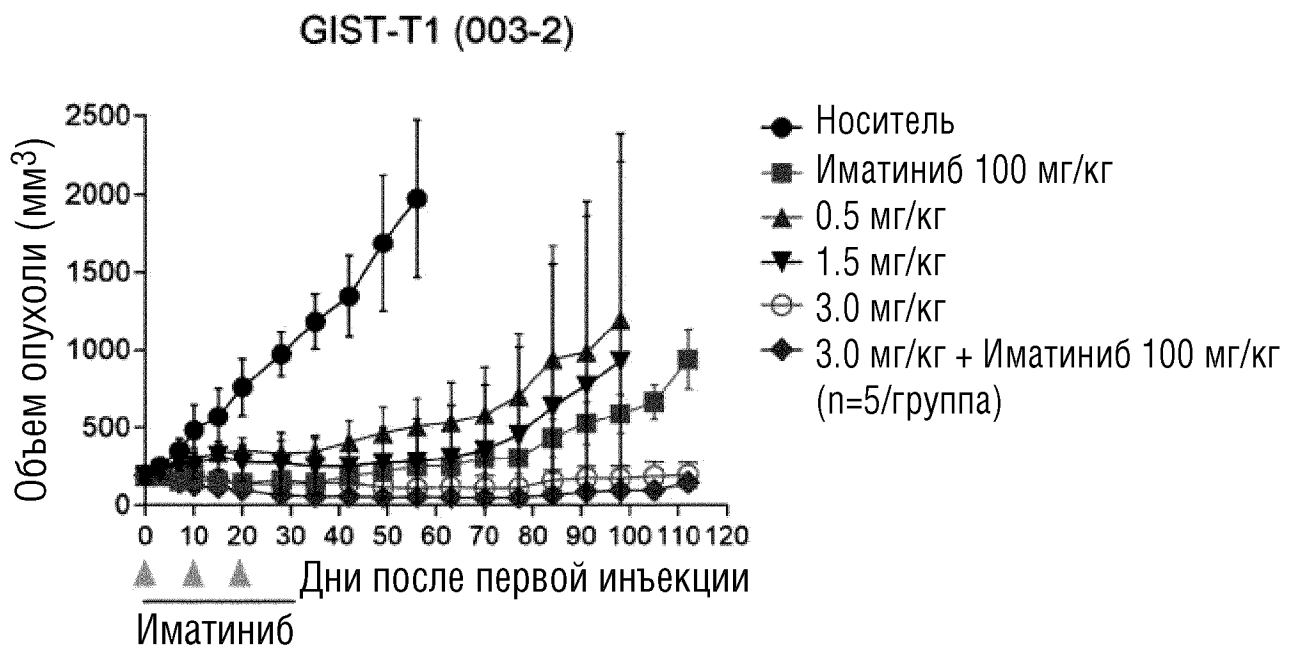
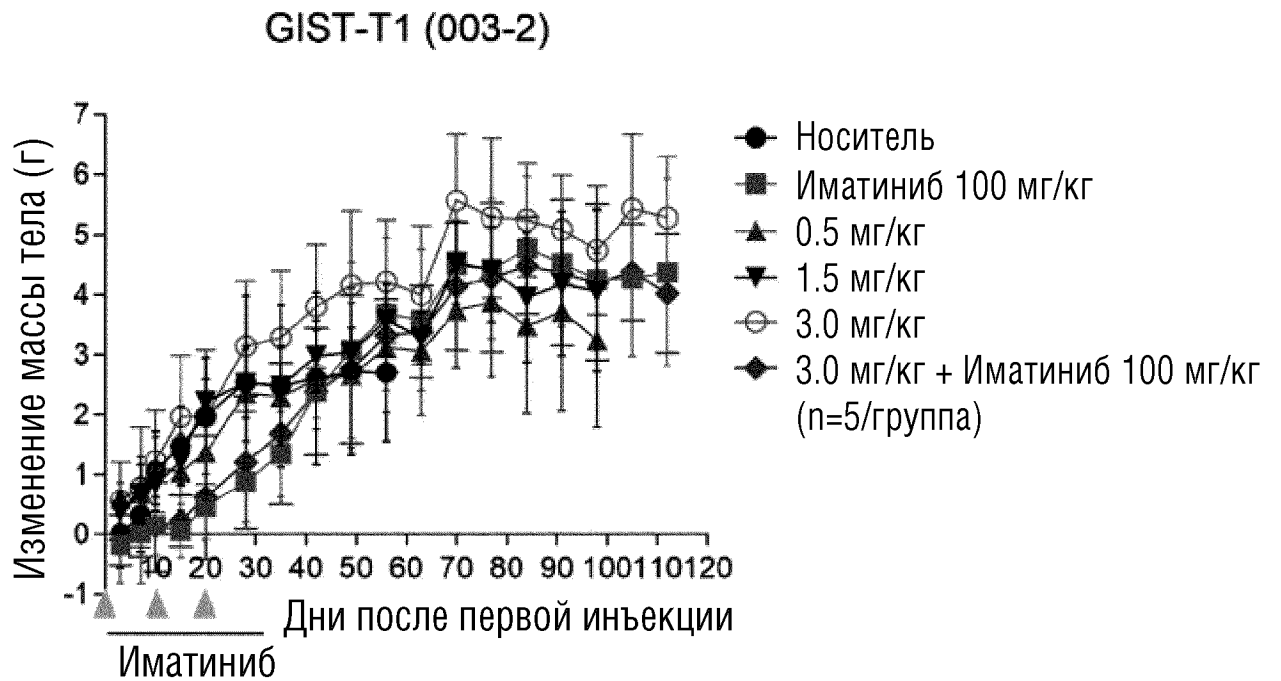
ФИГ.3b



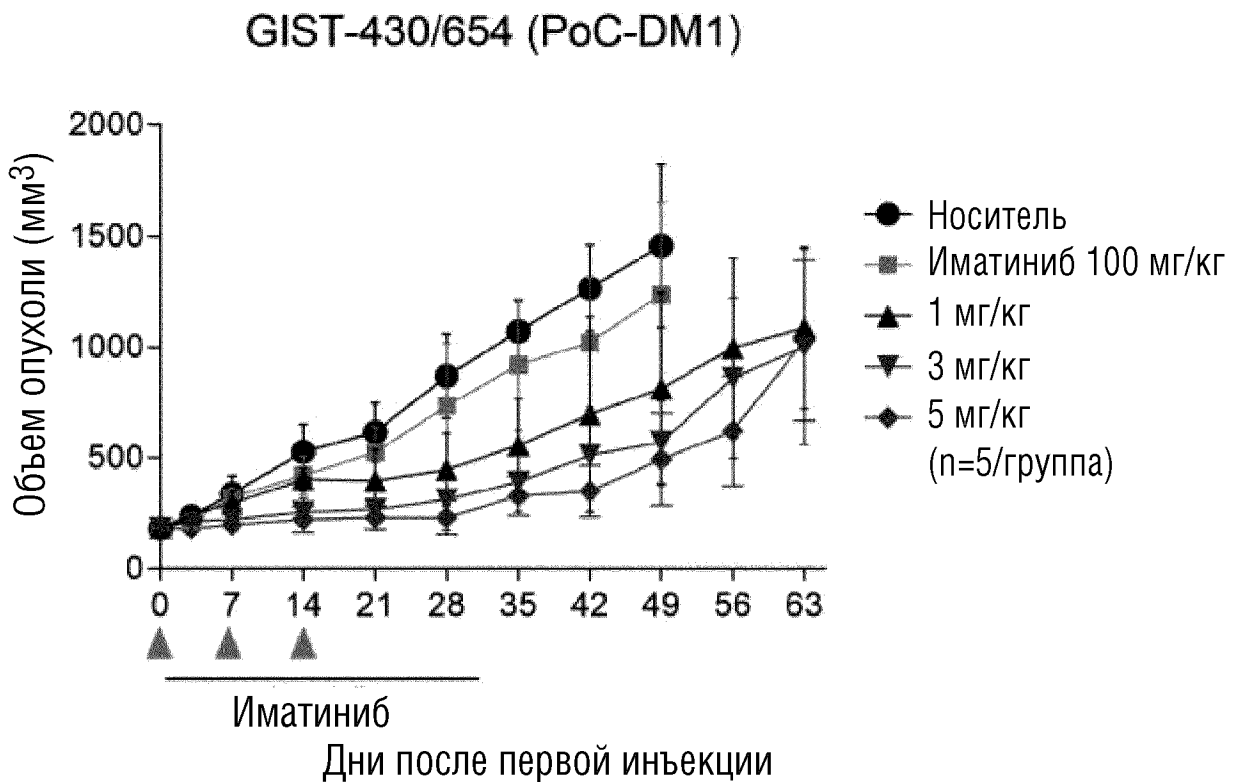
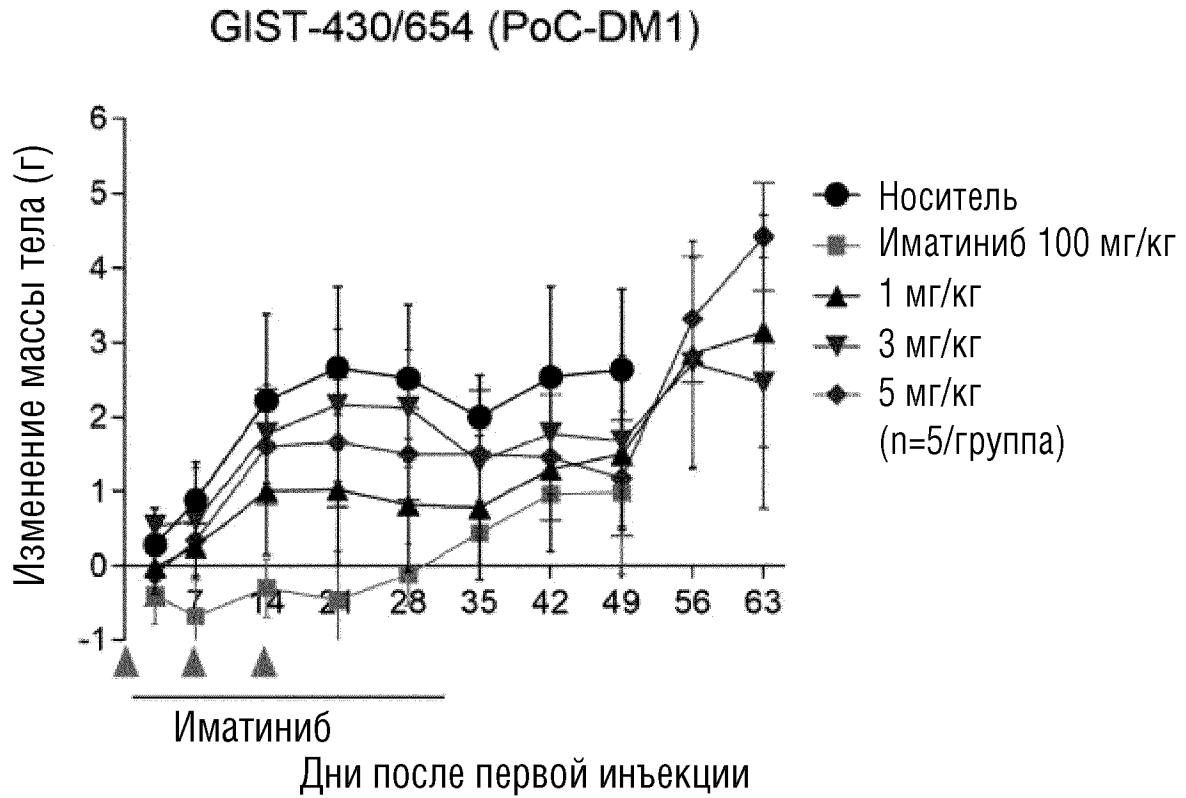
ФИГ.3с



ФИГ.3d

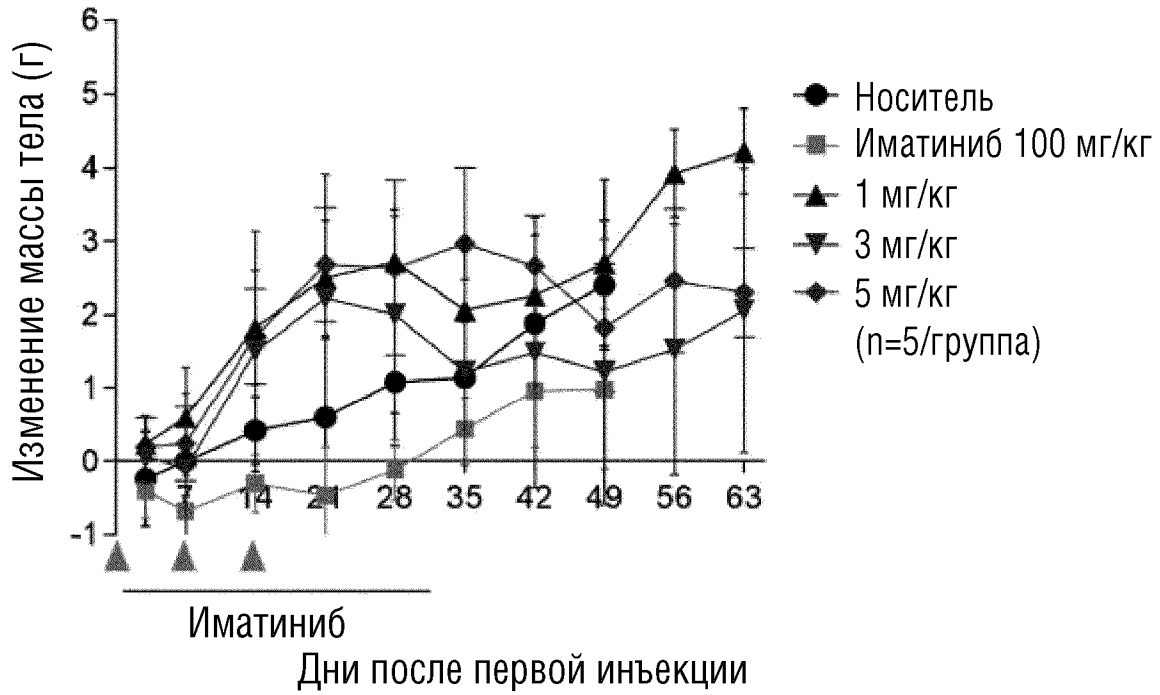


ФИГ.4а

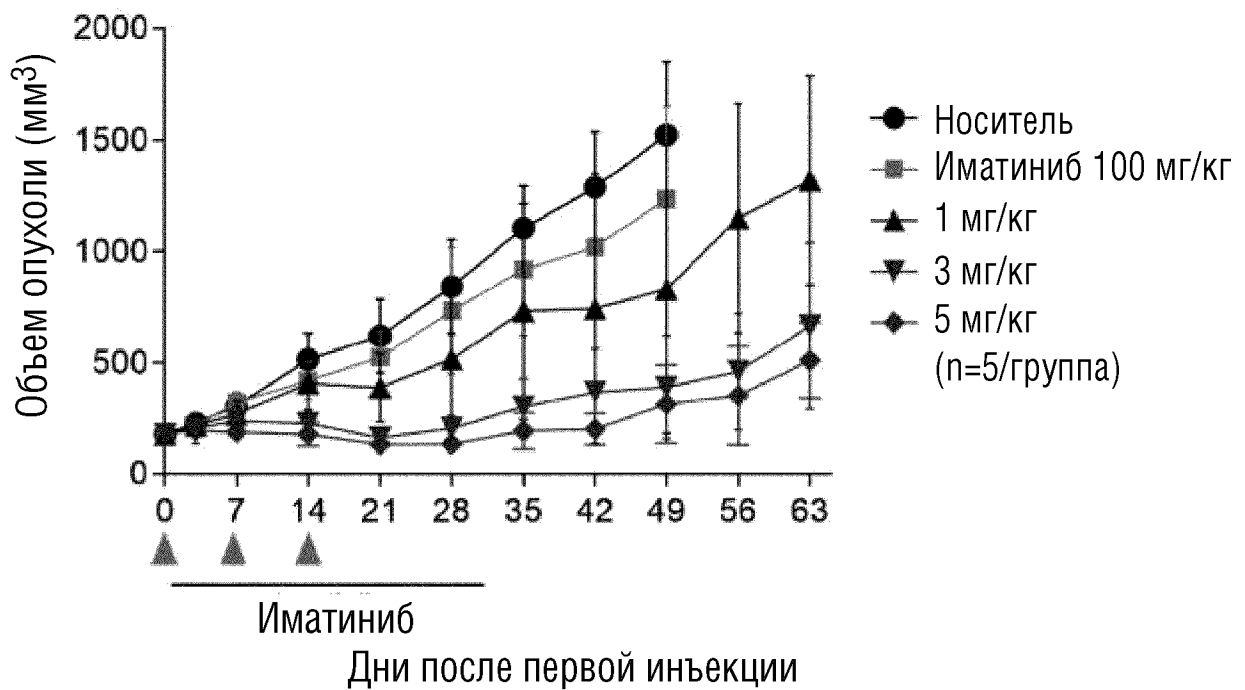


ФИГ.4b

GIST-430/654 (003-1)

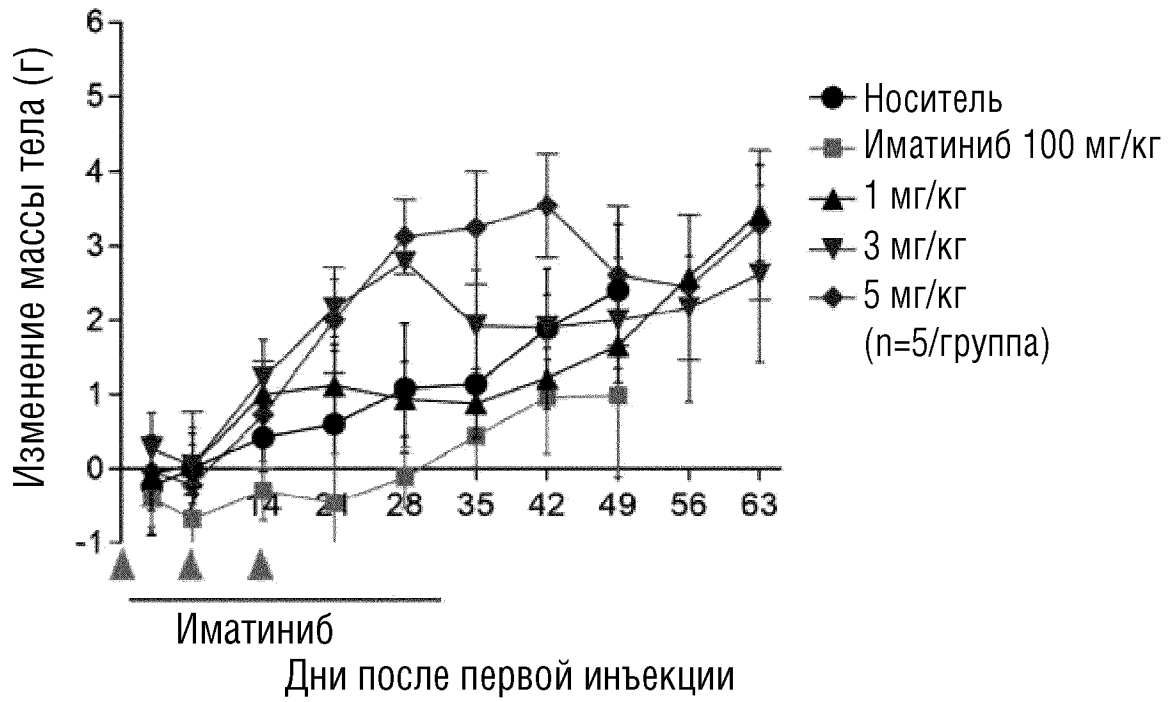


GIST-430/654 (003-1)

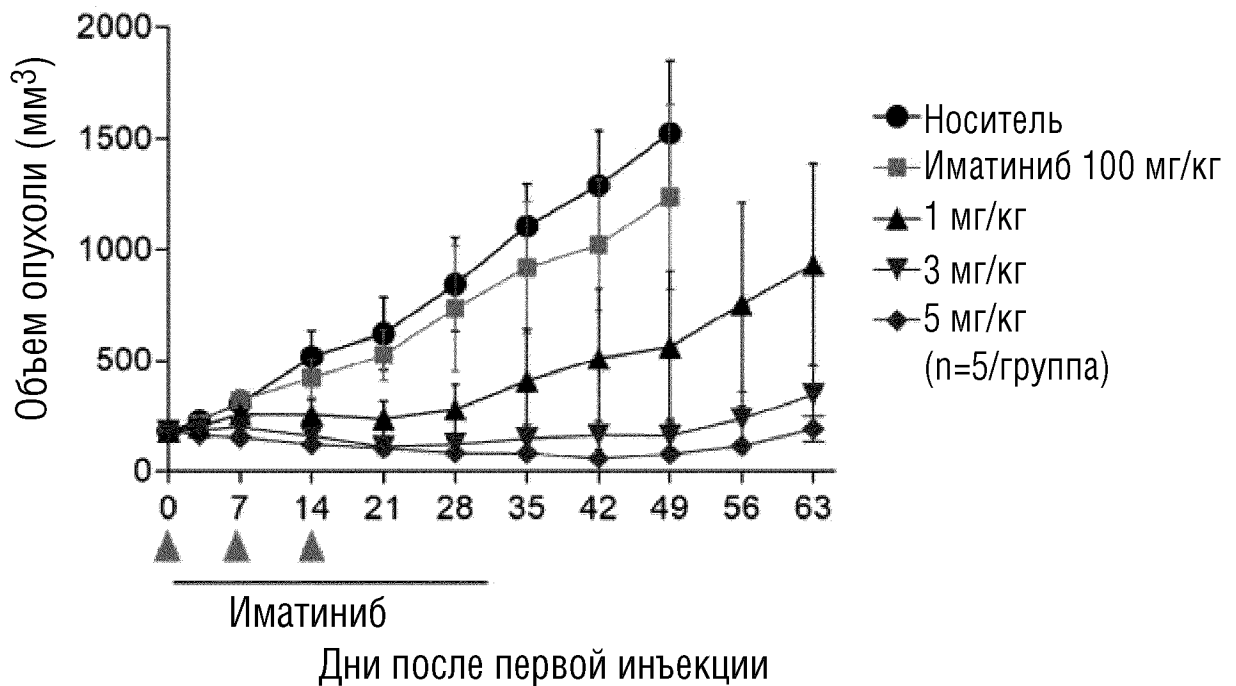


ФИГ.4с

GIST-430/654 (004-2)

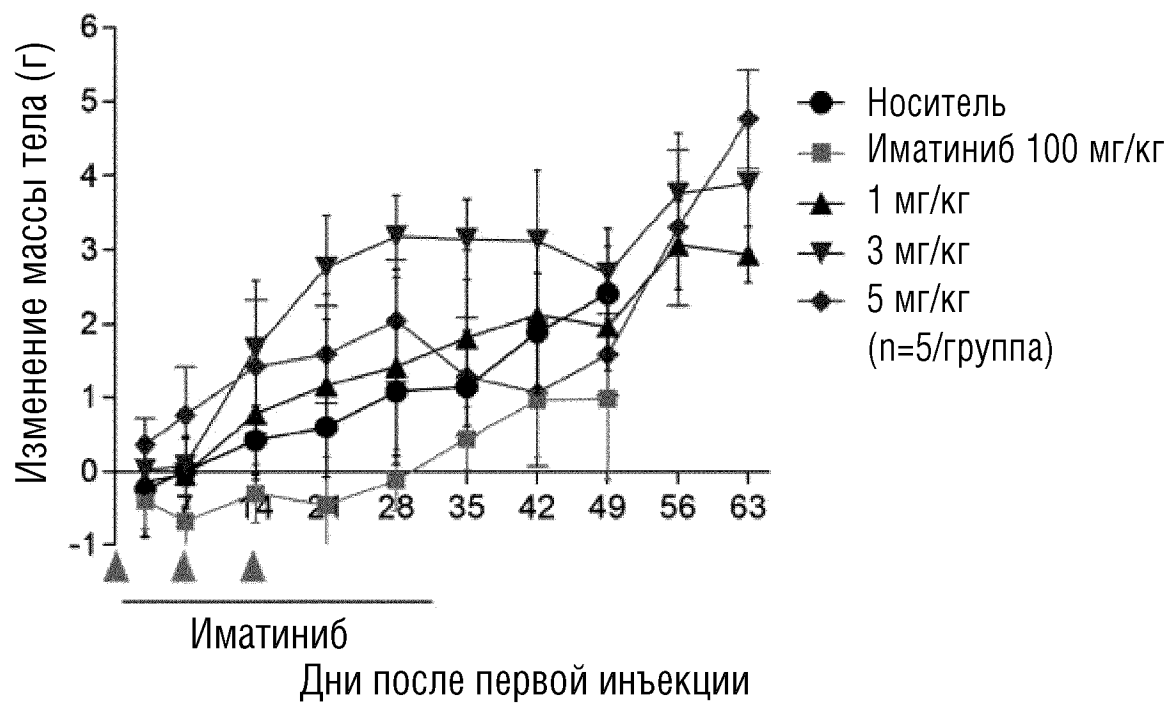


GIST-430/654 (004-2)

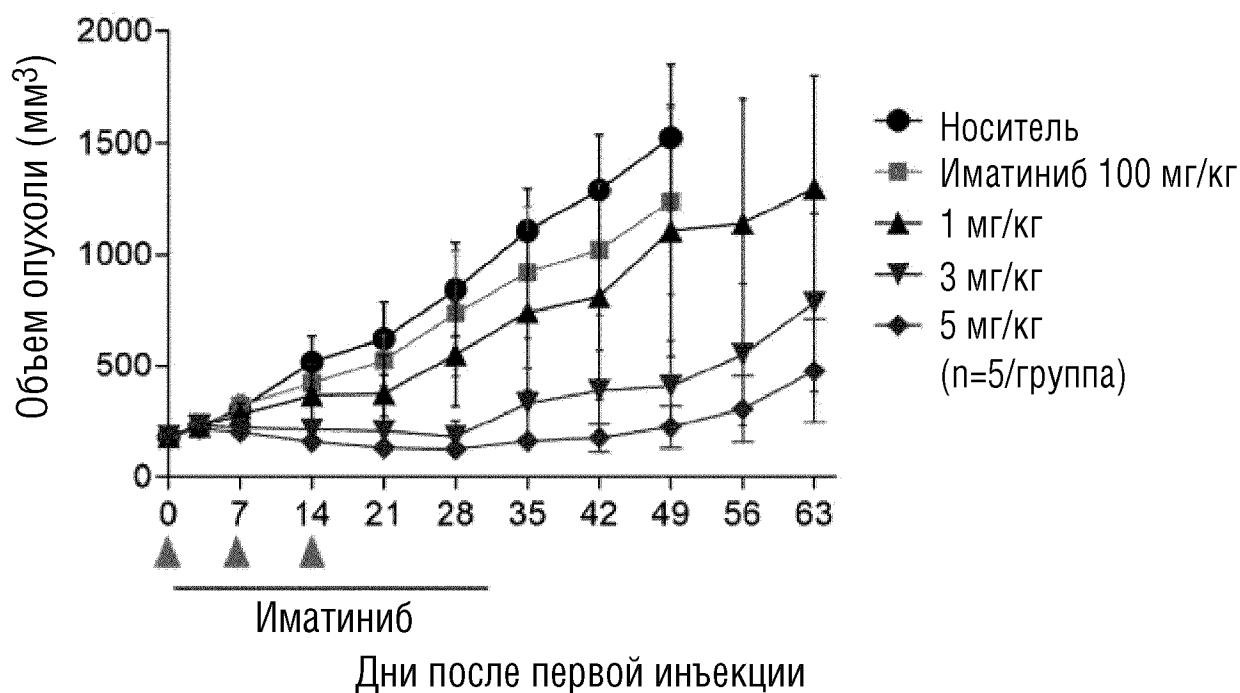


ФИГ.4d

GIST-430/654 (003-2)

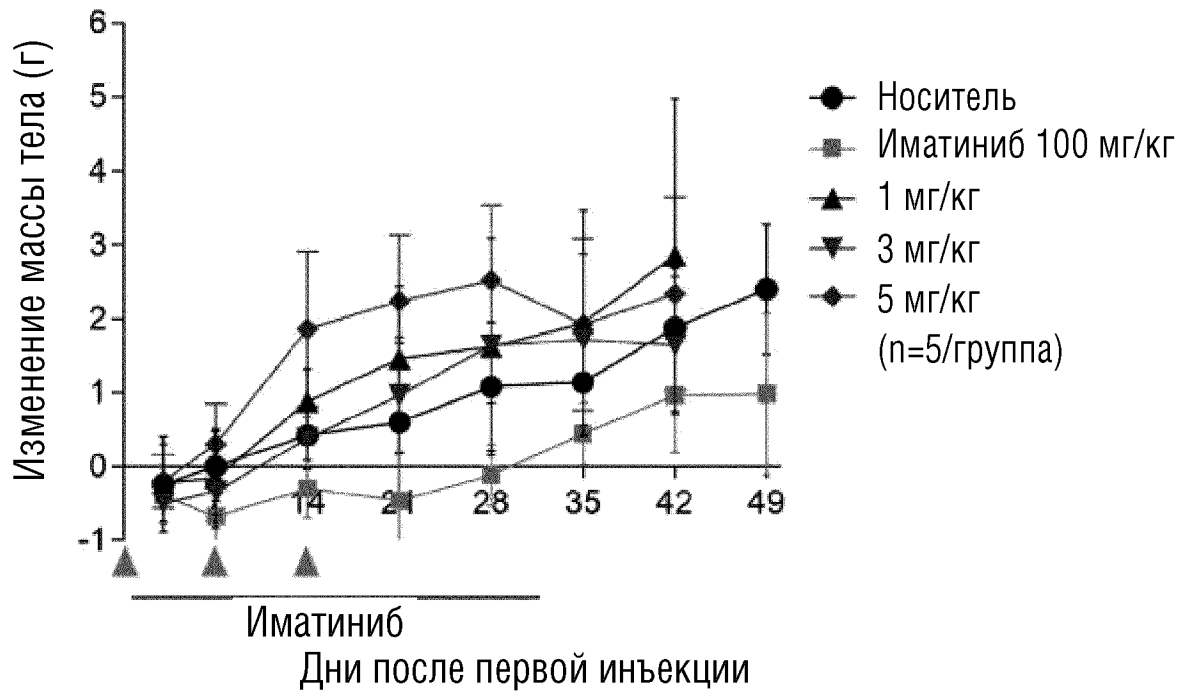


GIST-430/654 (003-2)

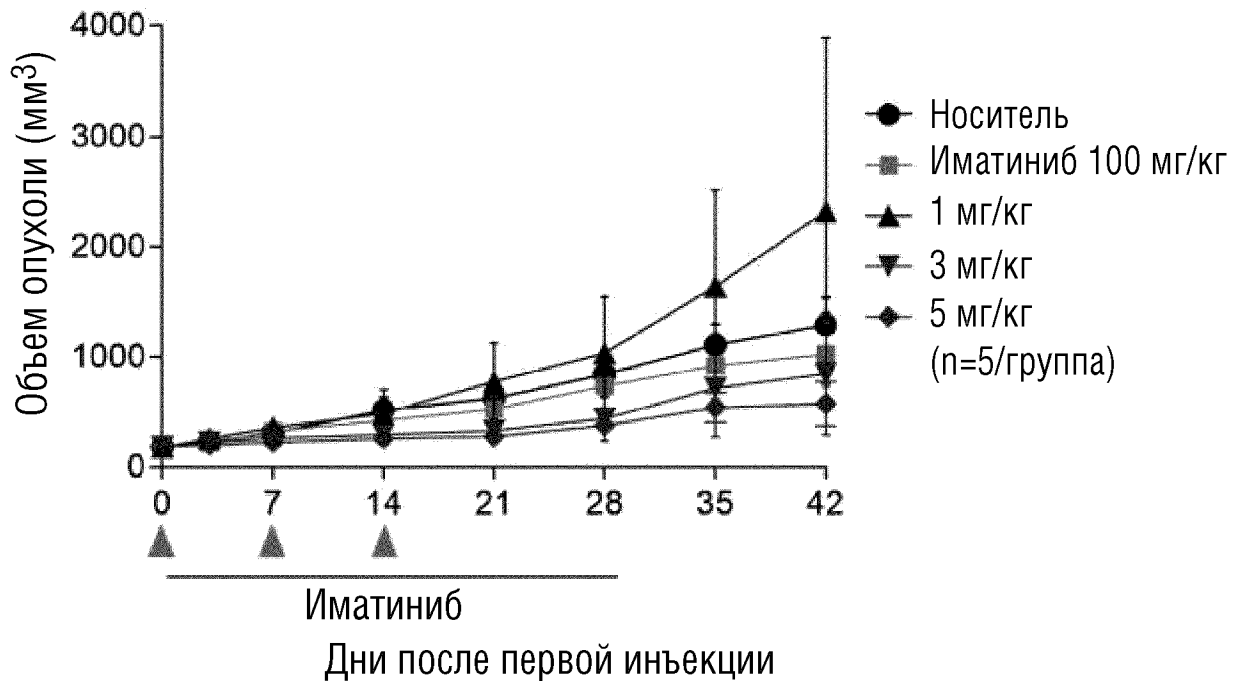


ФИГ.4е

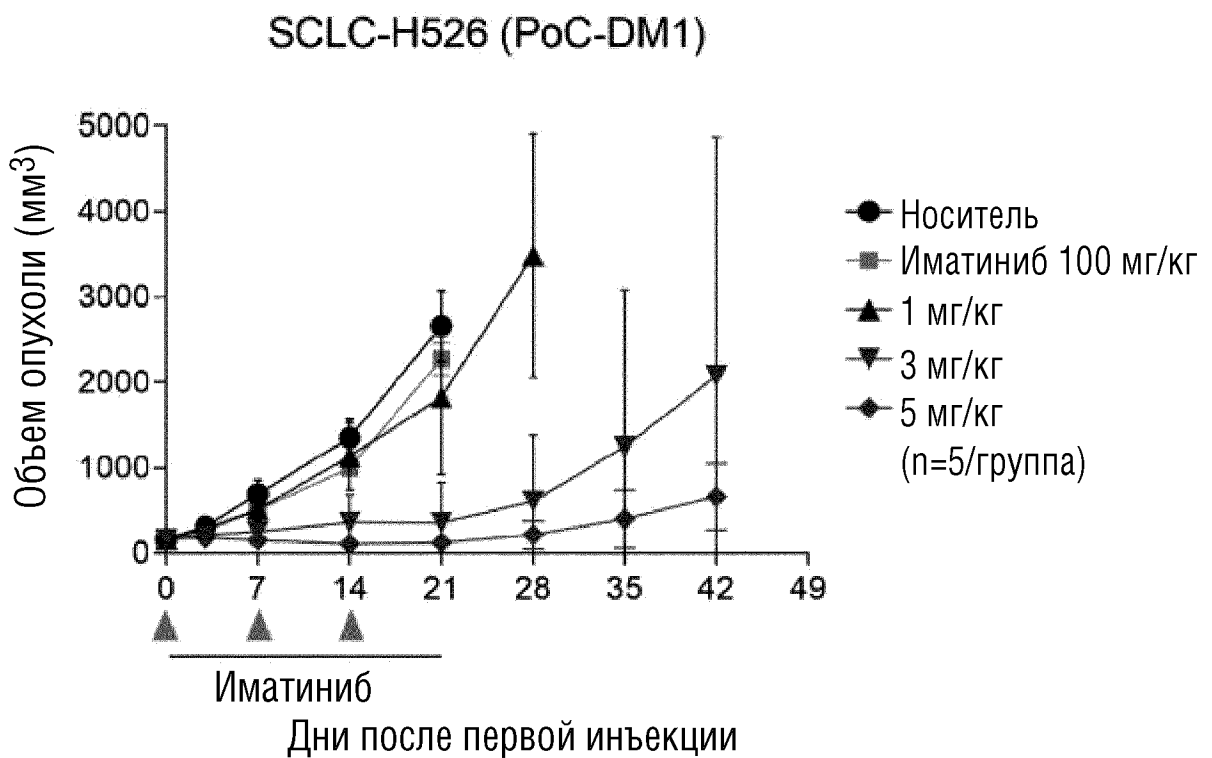
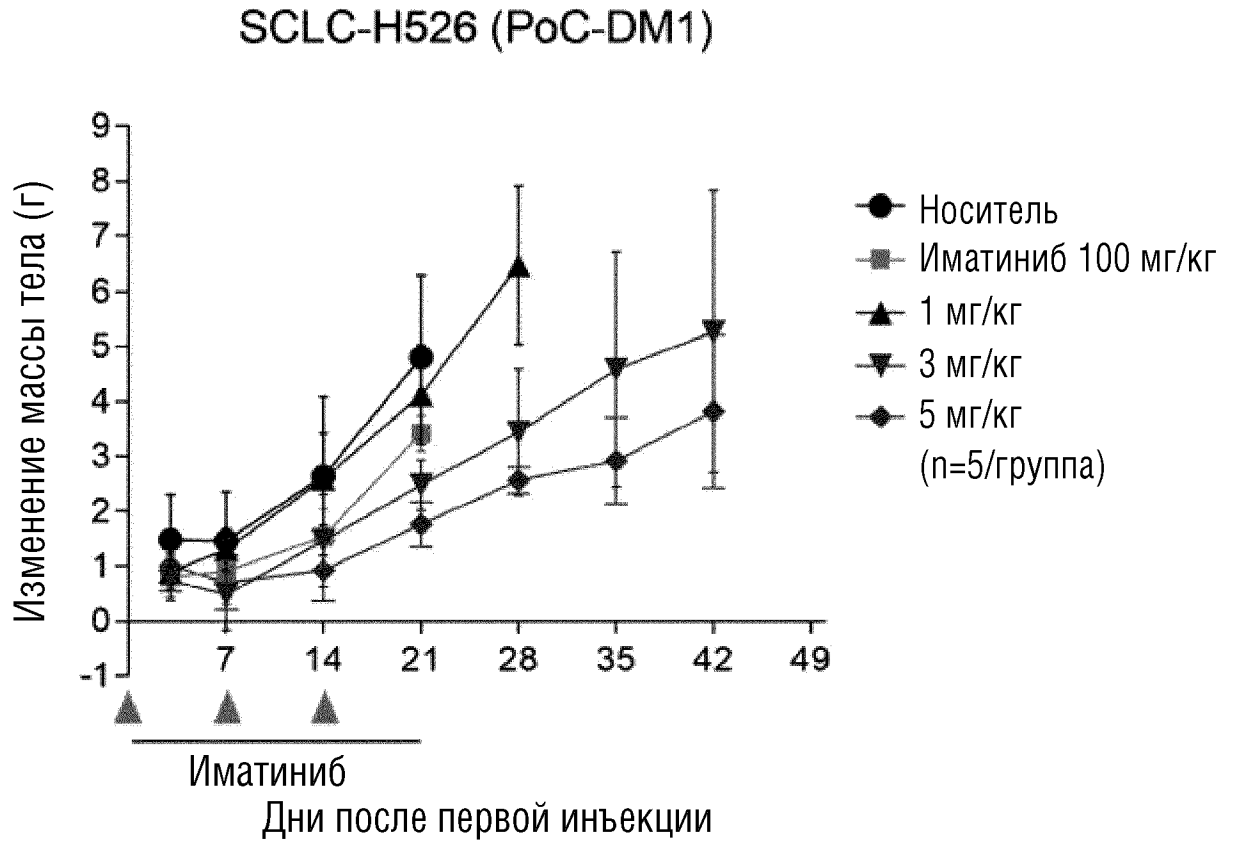
GIST-430/654 (007-1)



GIST-430/654 (007-1)

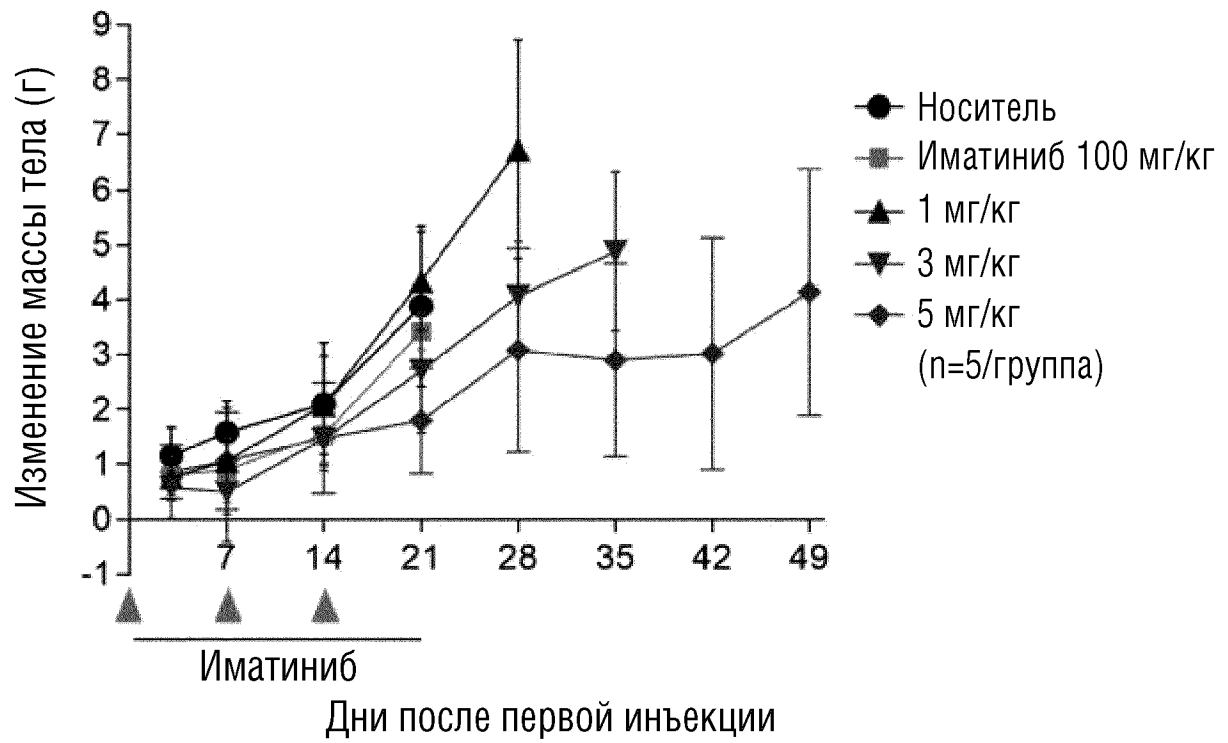


ФИГ.5а



ФИГ.5b

SCLC-H526 (003-1)

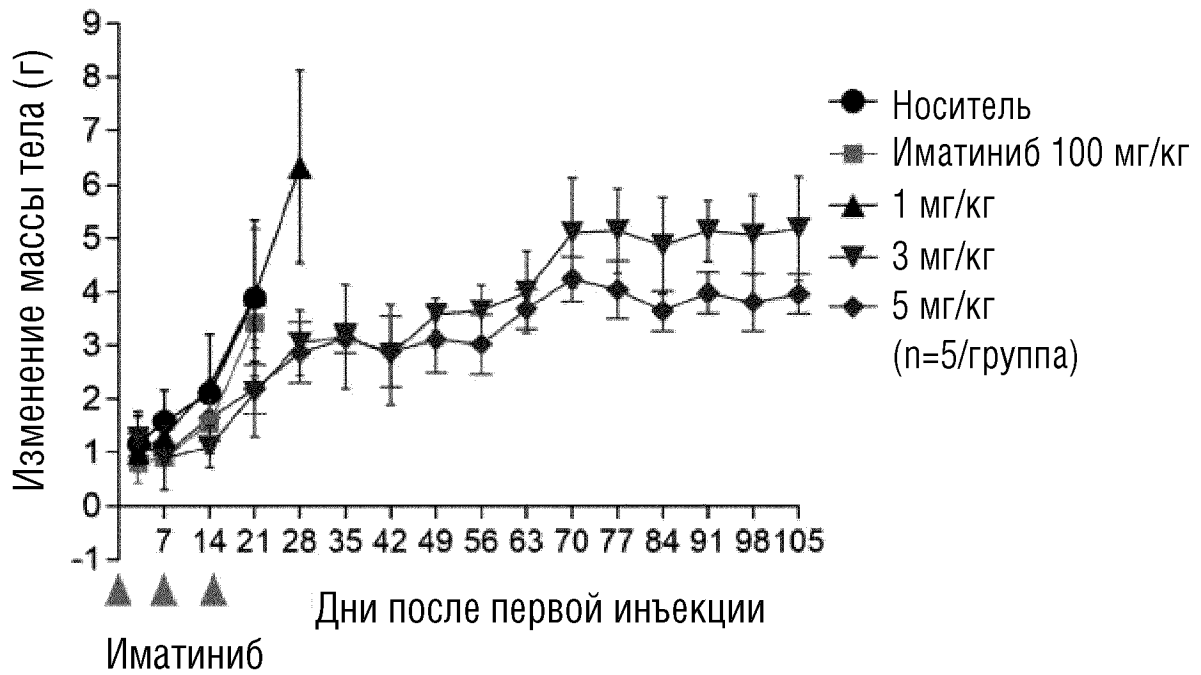


SCLC-H526 (003-1)

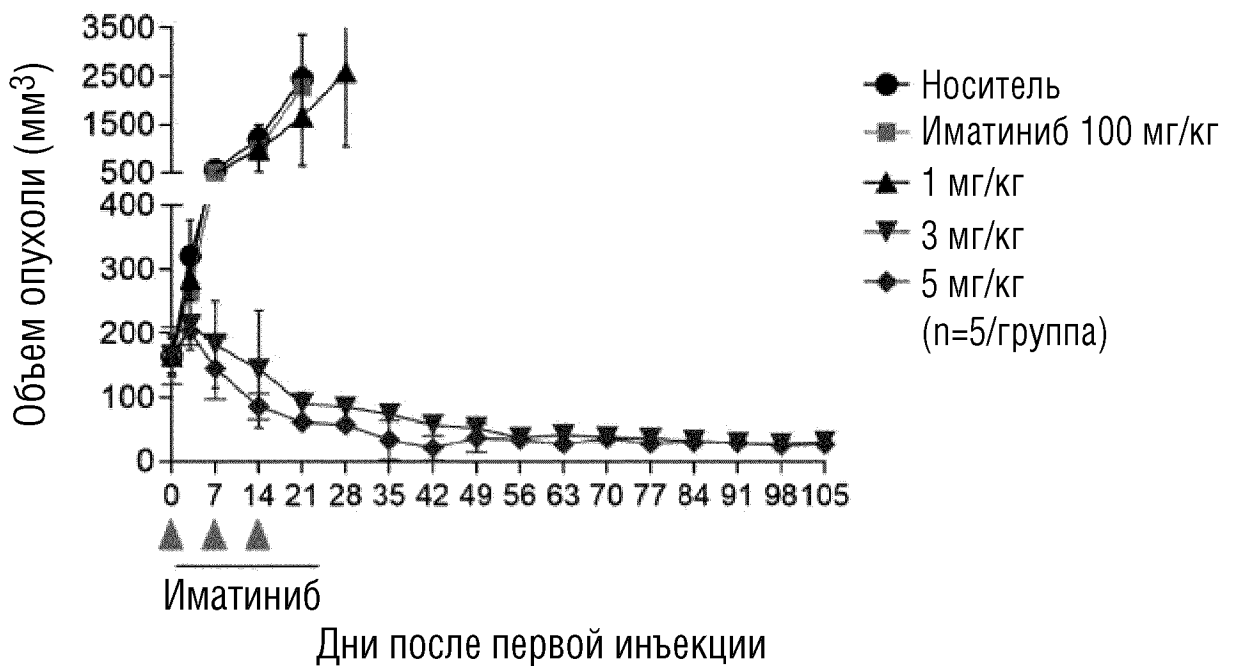


ФИГ.5с

SCLC-H526 (004-2)

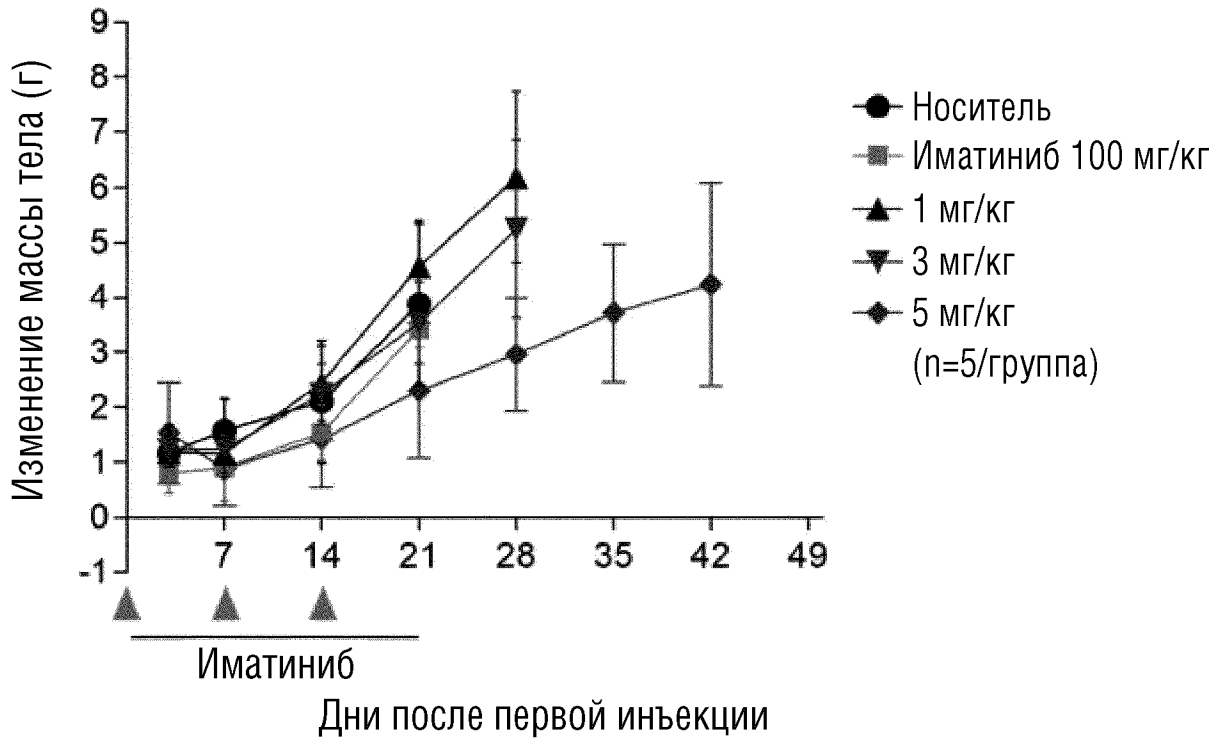


SCLC-H526 (004-2)

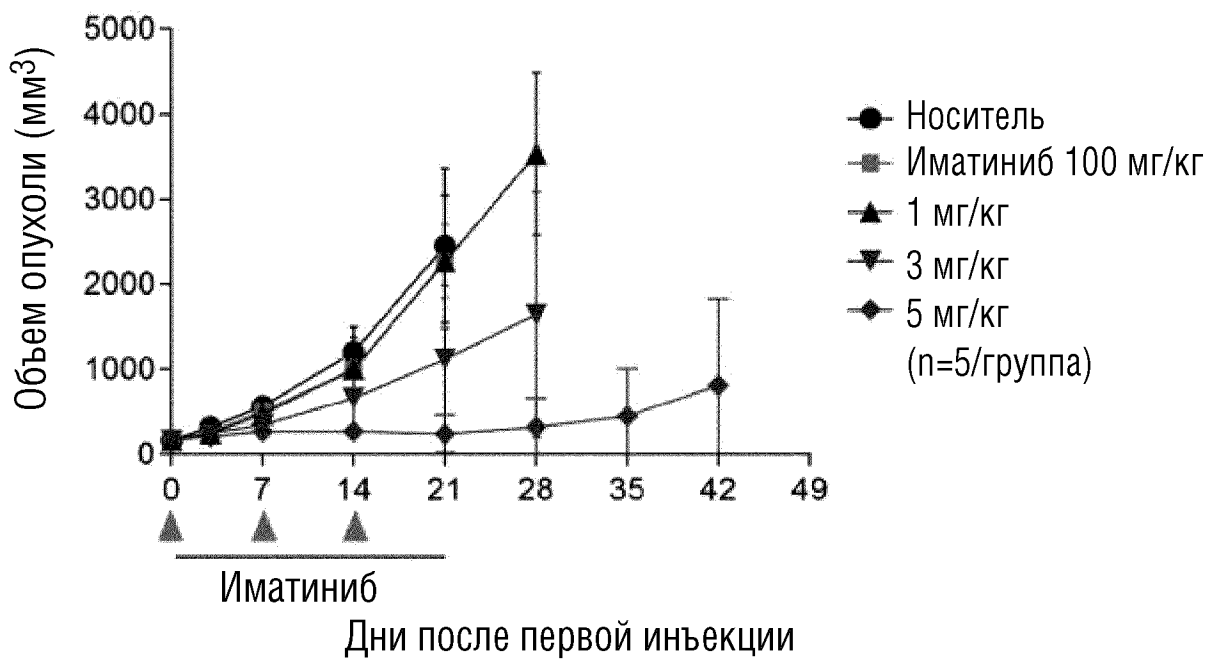


ФИГ.5d

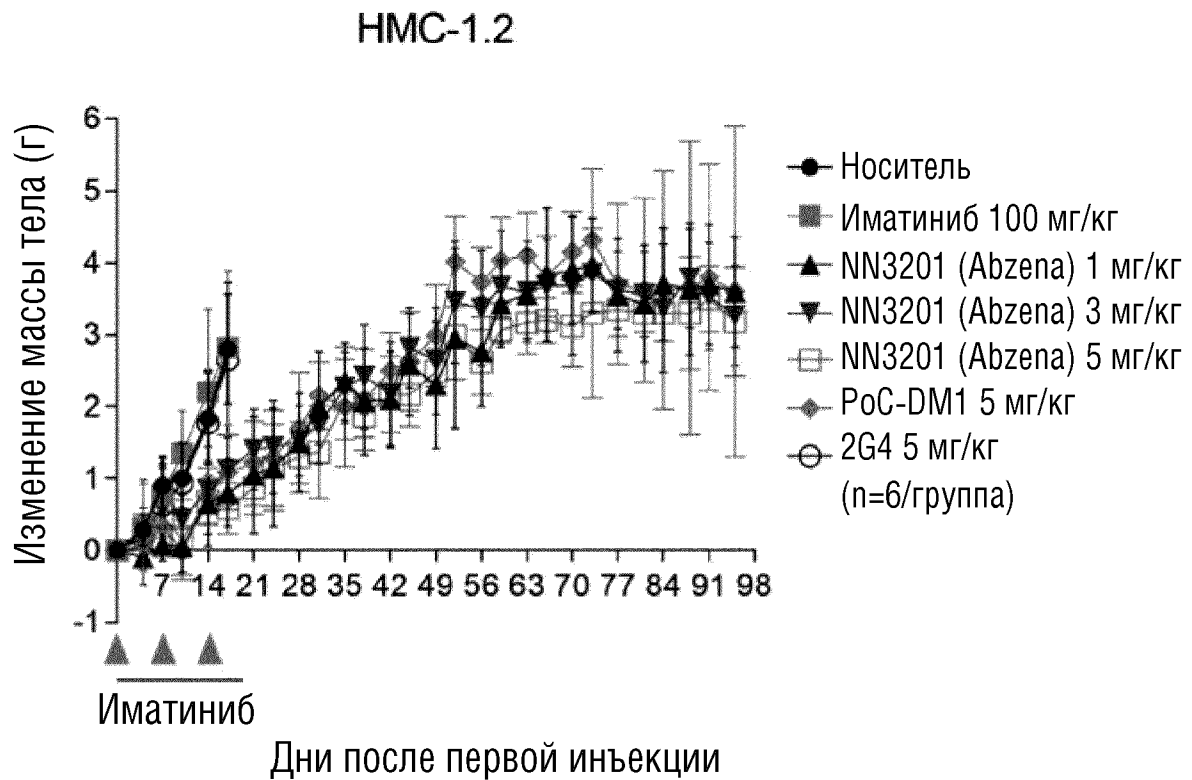
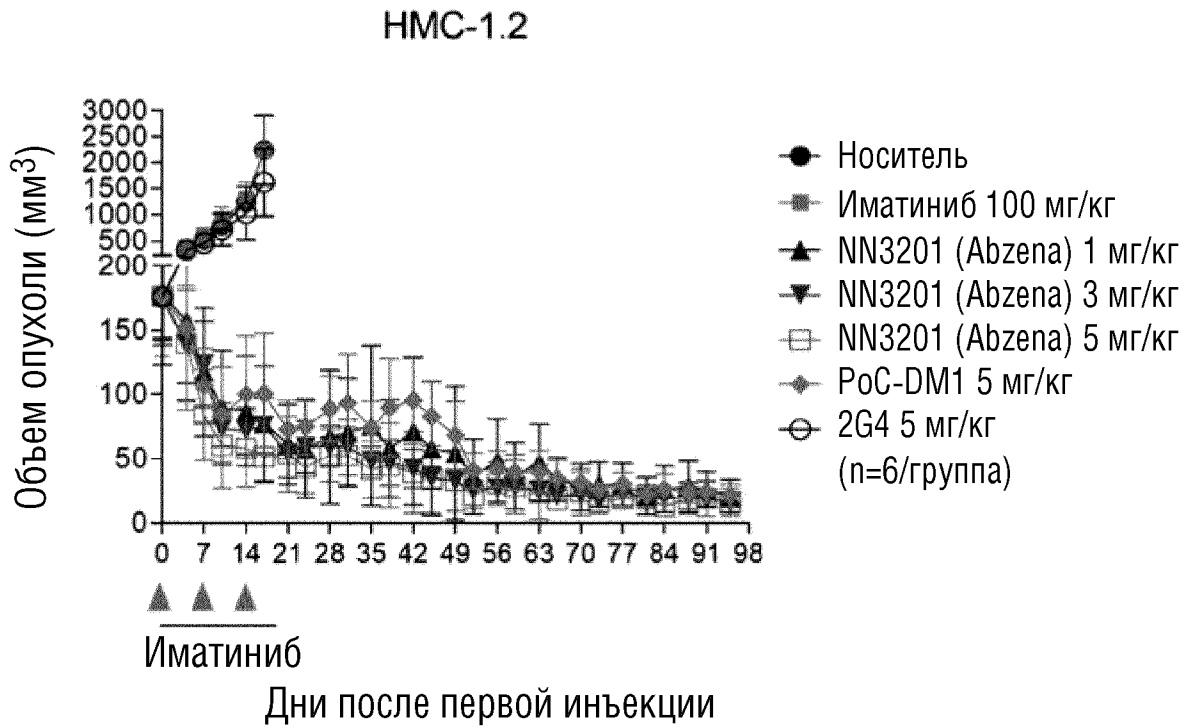
SCLC-H526 (003-2)



SCLC-H526 (003-2)

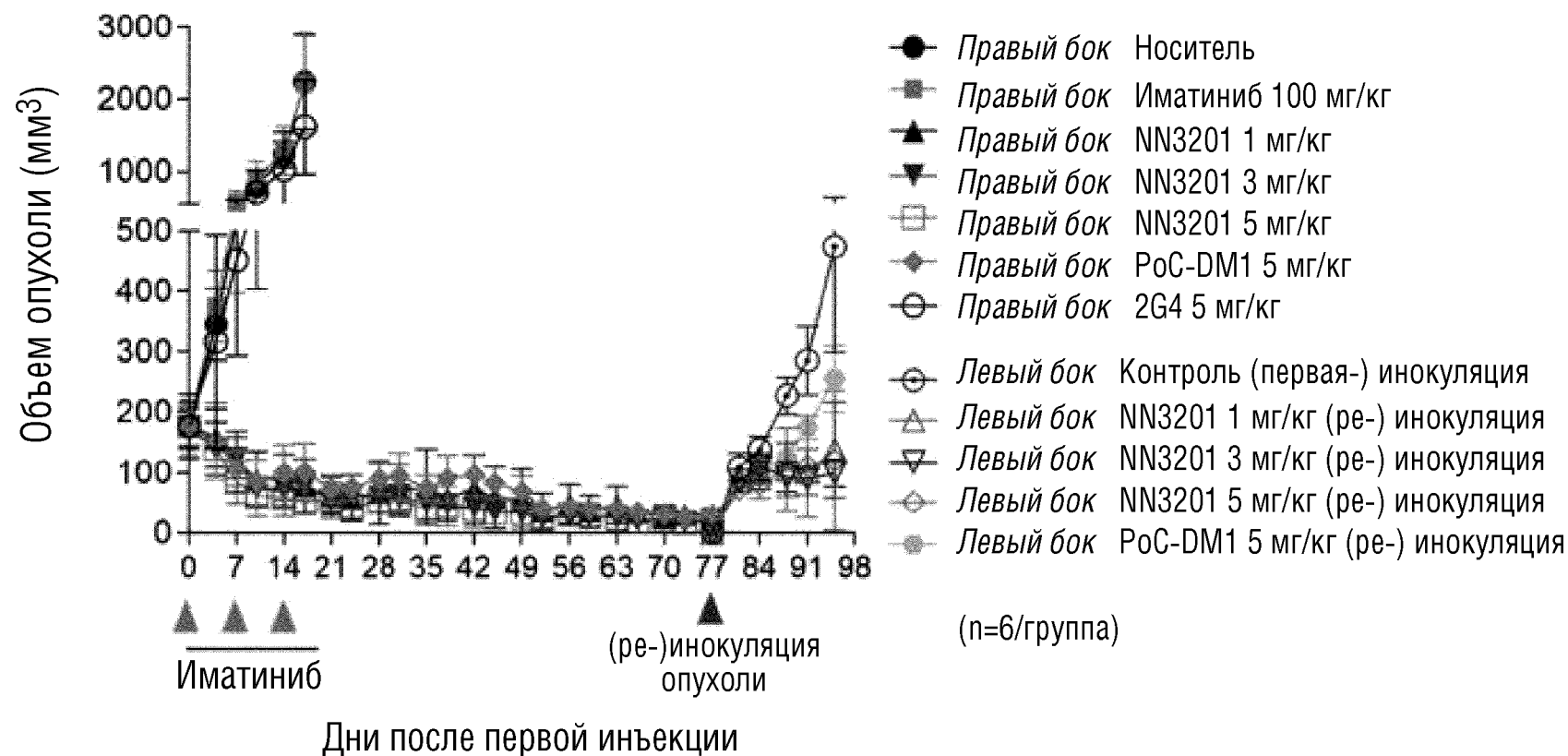


ФИГ.6



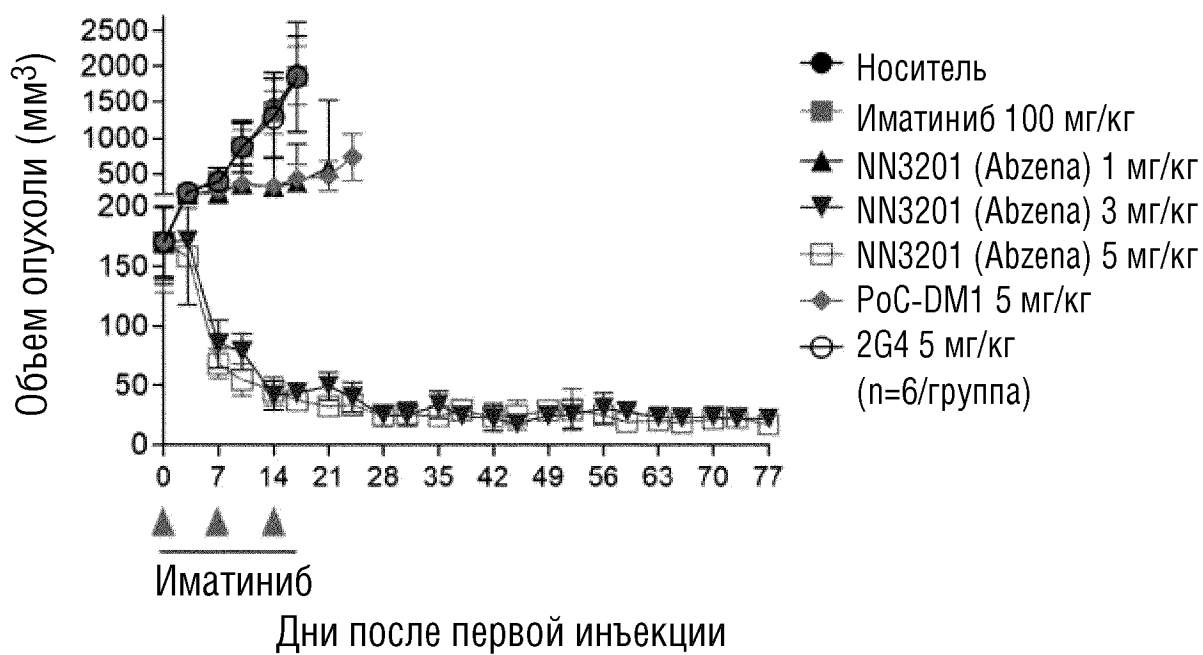
ФИГ.7

НМС-1.2

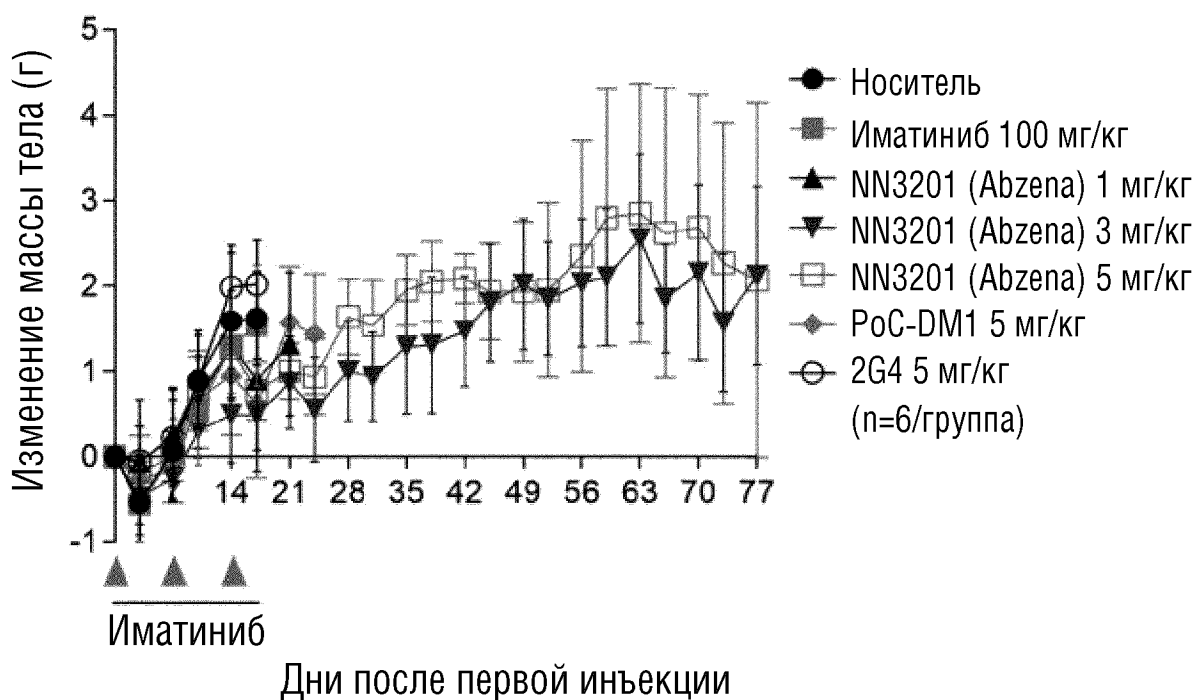


ФИГ.8

Kasumi-1

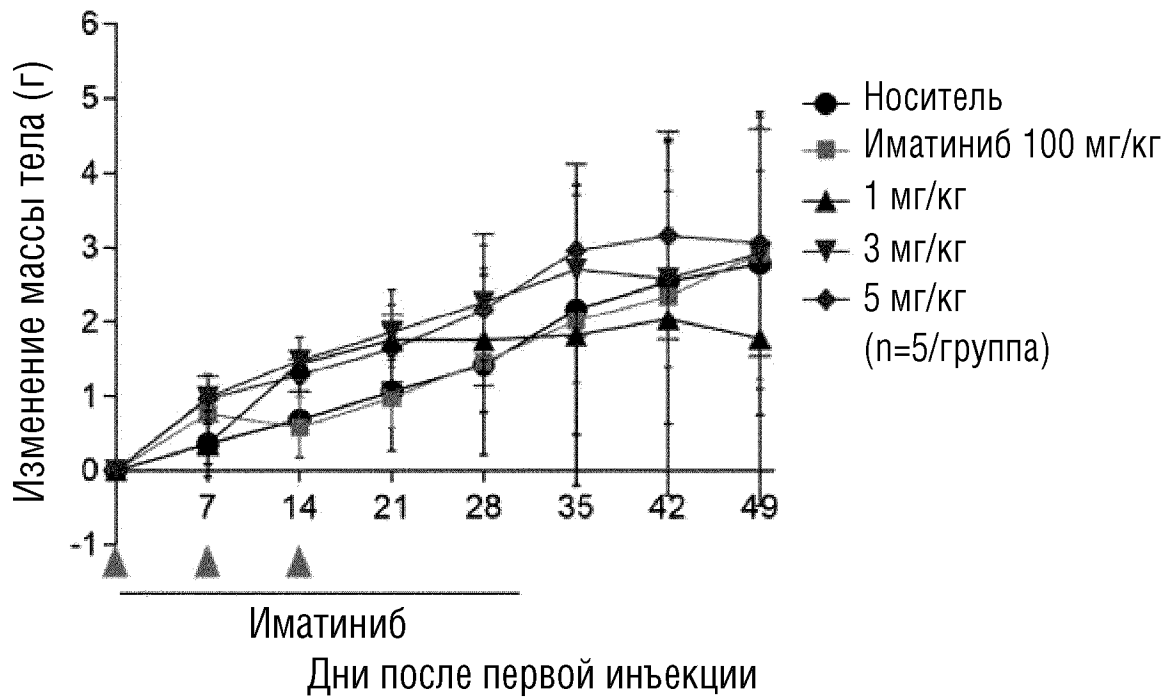


Kasumi-1

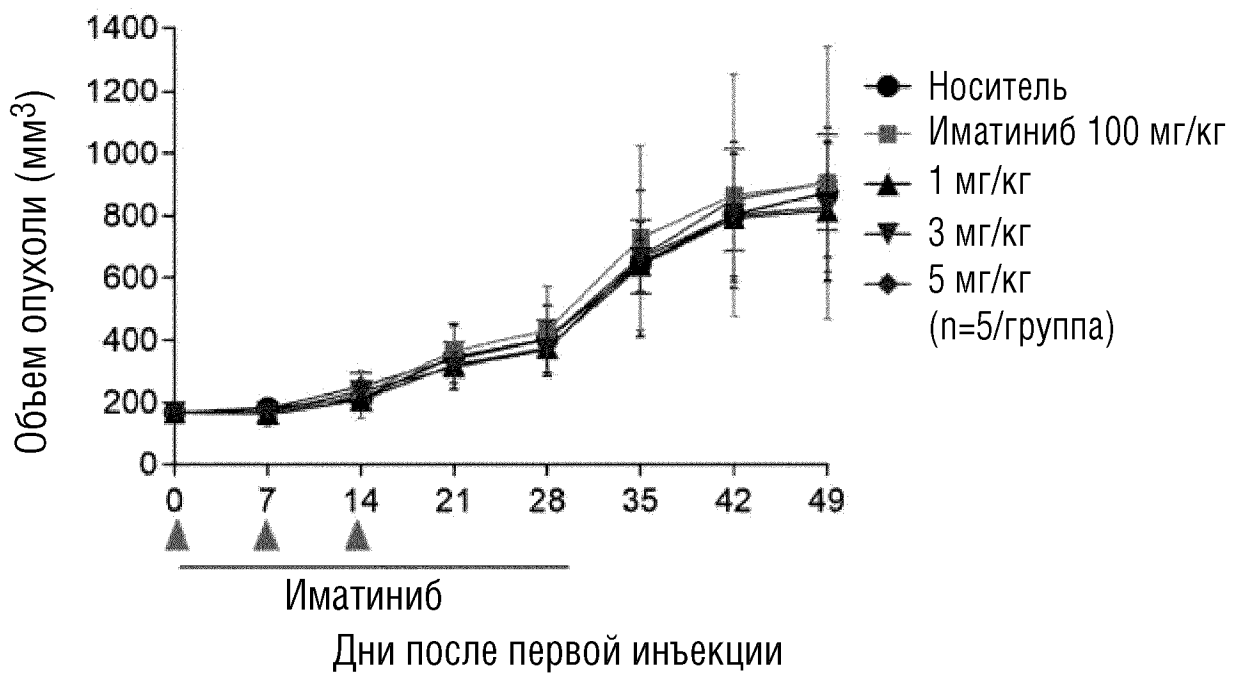


ФИГ.9а

MDA-MB-468 (PoC-DM1)

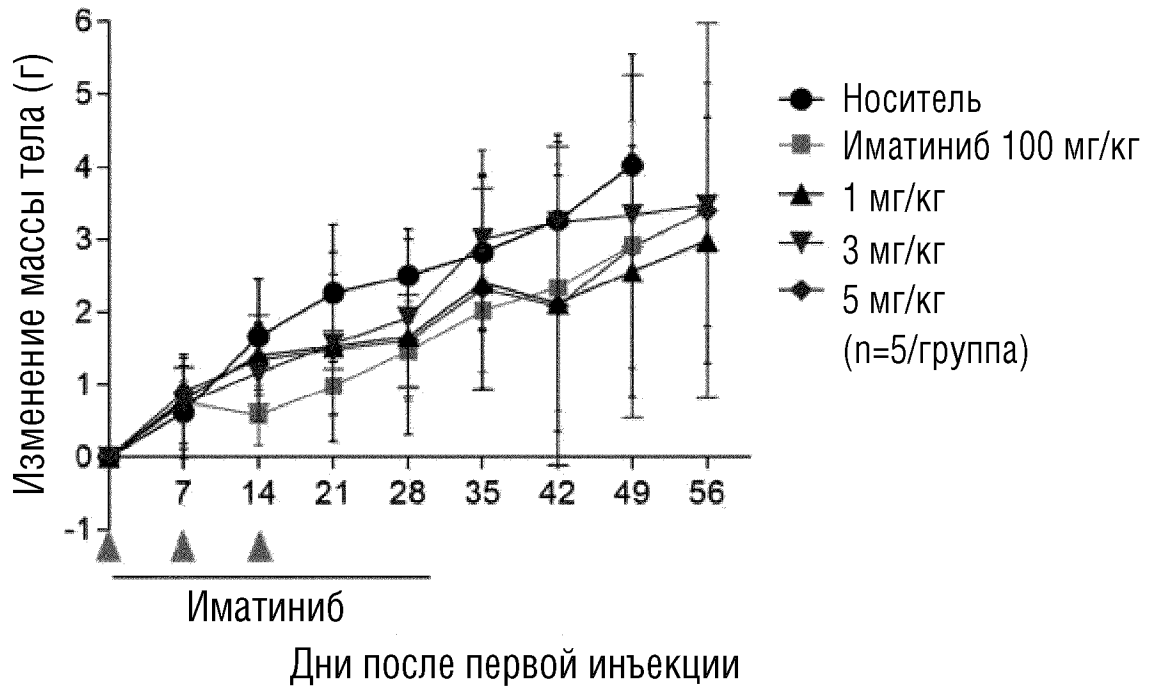


MDA-MB-468 (PoC-DM1)

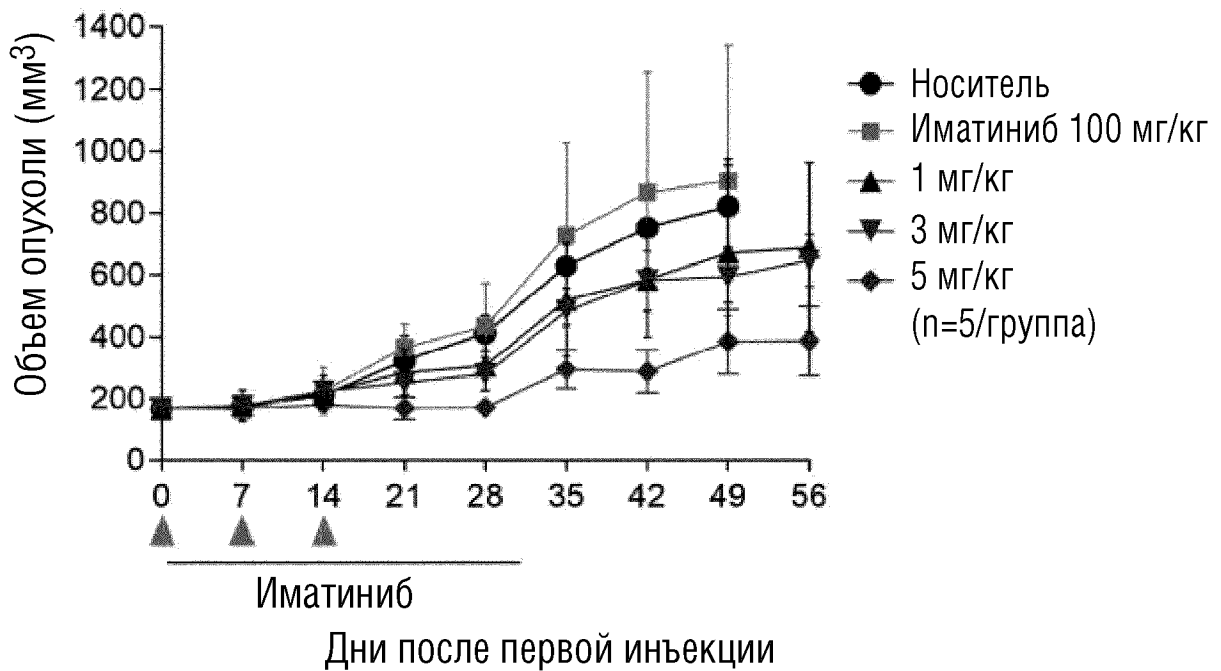


ФИГ.9b

MDA-MB-468 (003-1)

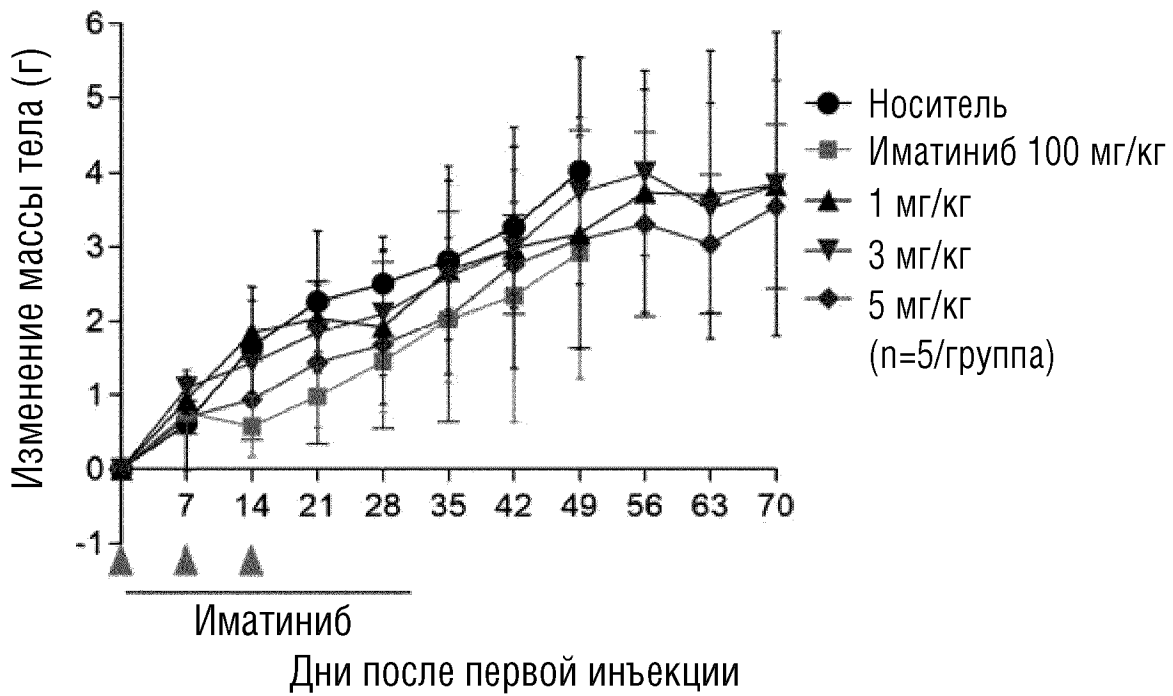


MDA-MB-468 (003-1)

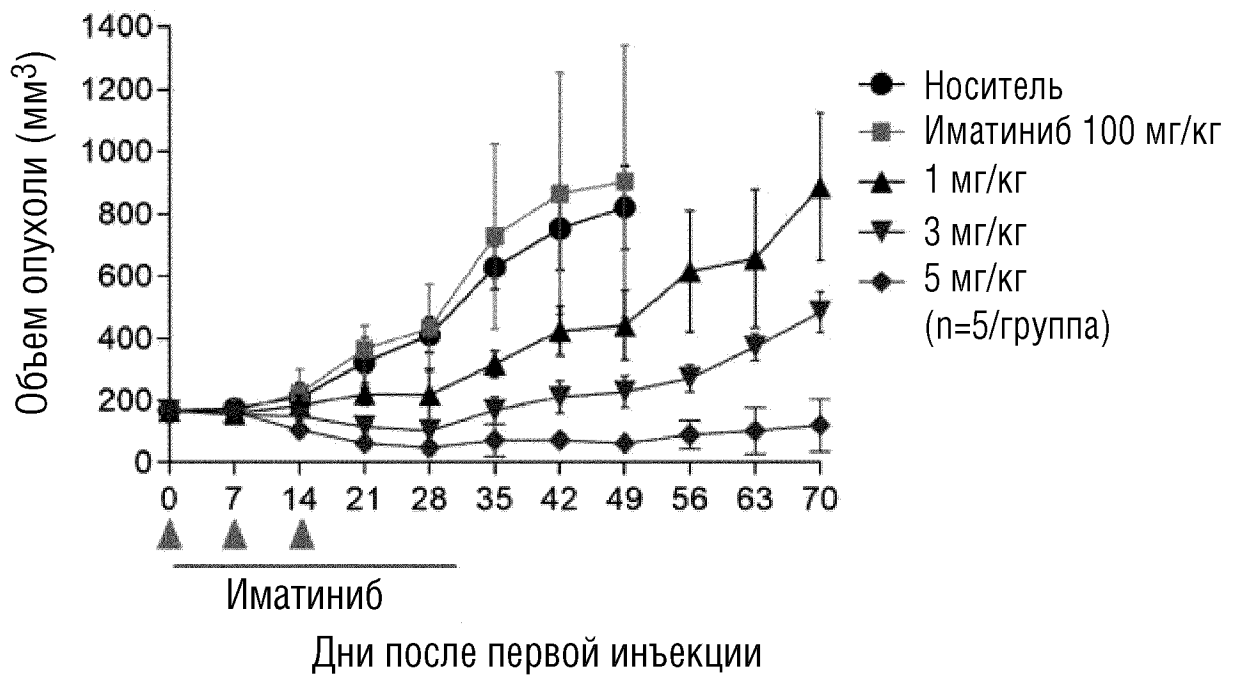


ФИГ.9с

MDA-MB-468 (004-2)

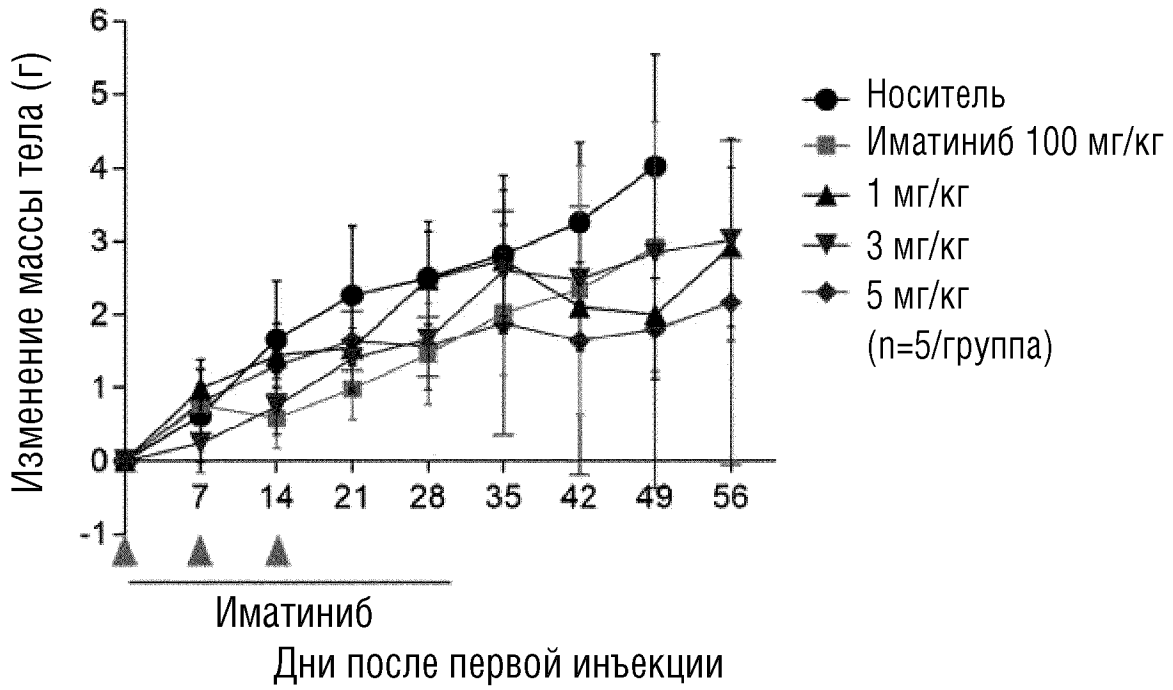


MDA-MB-468 (004-2)

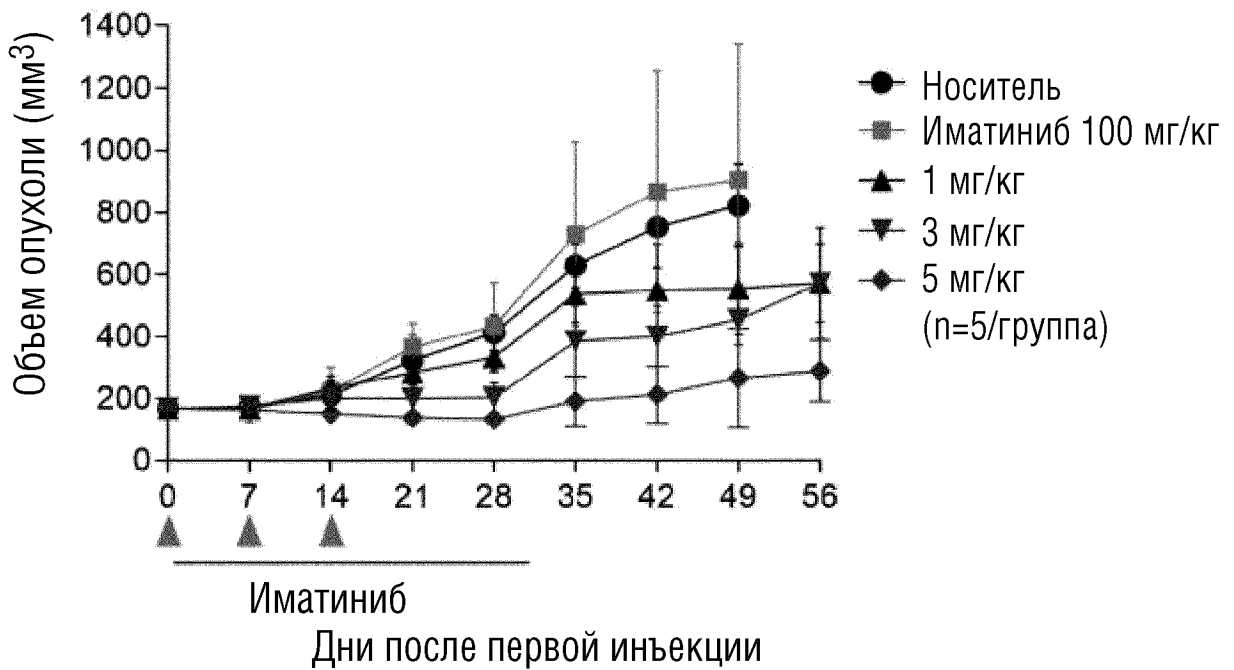


ФИГ.9d

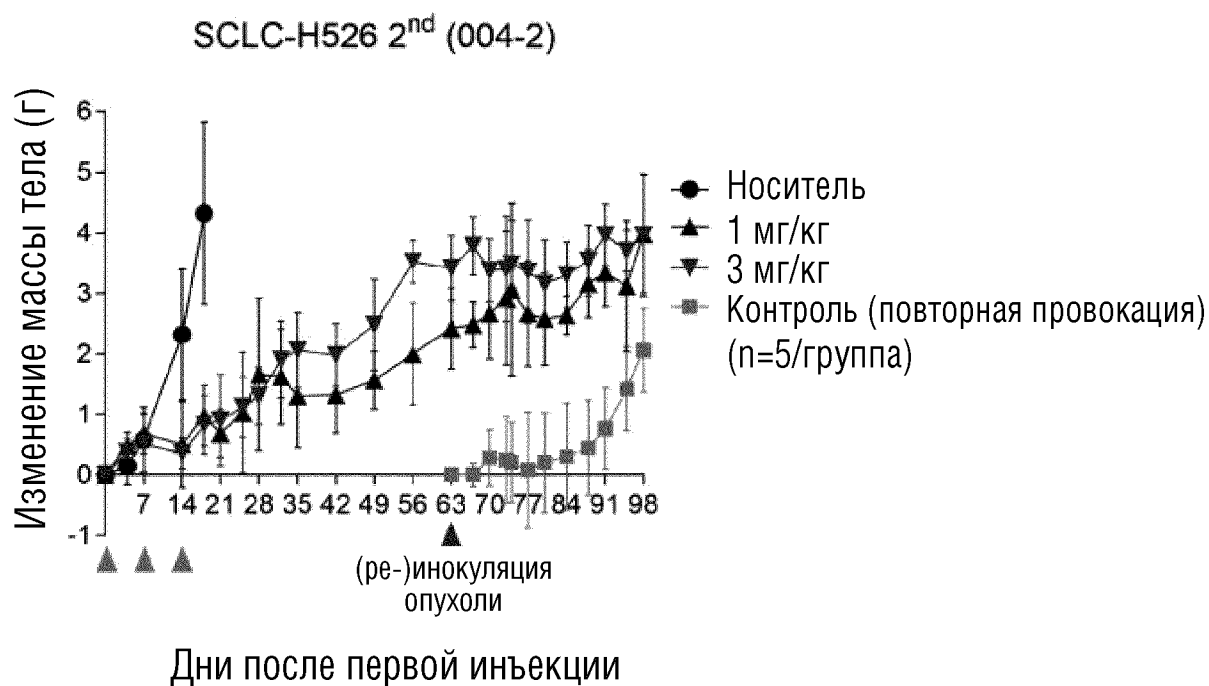
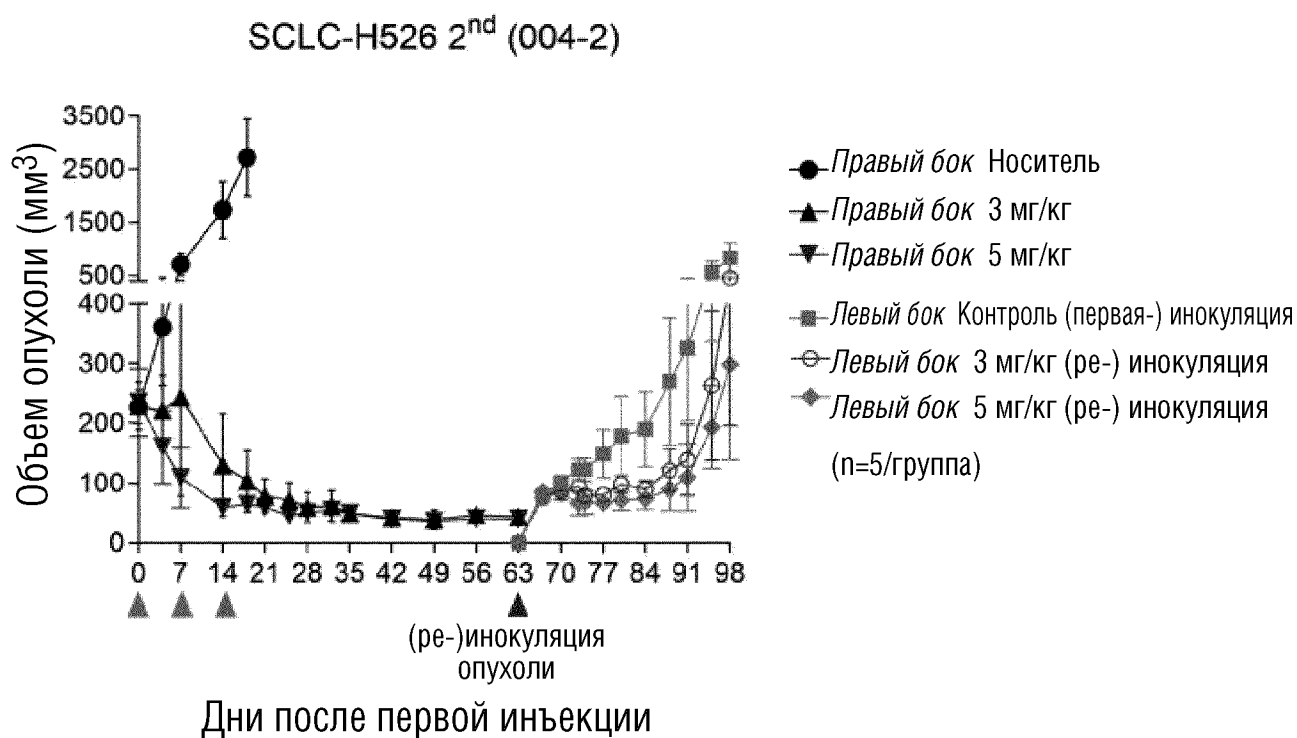
MDA-MB-468 (003-2)



MDA-MB-468 (003-2)

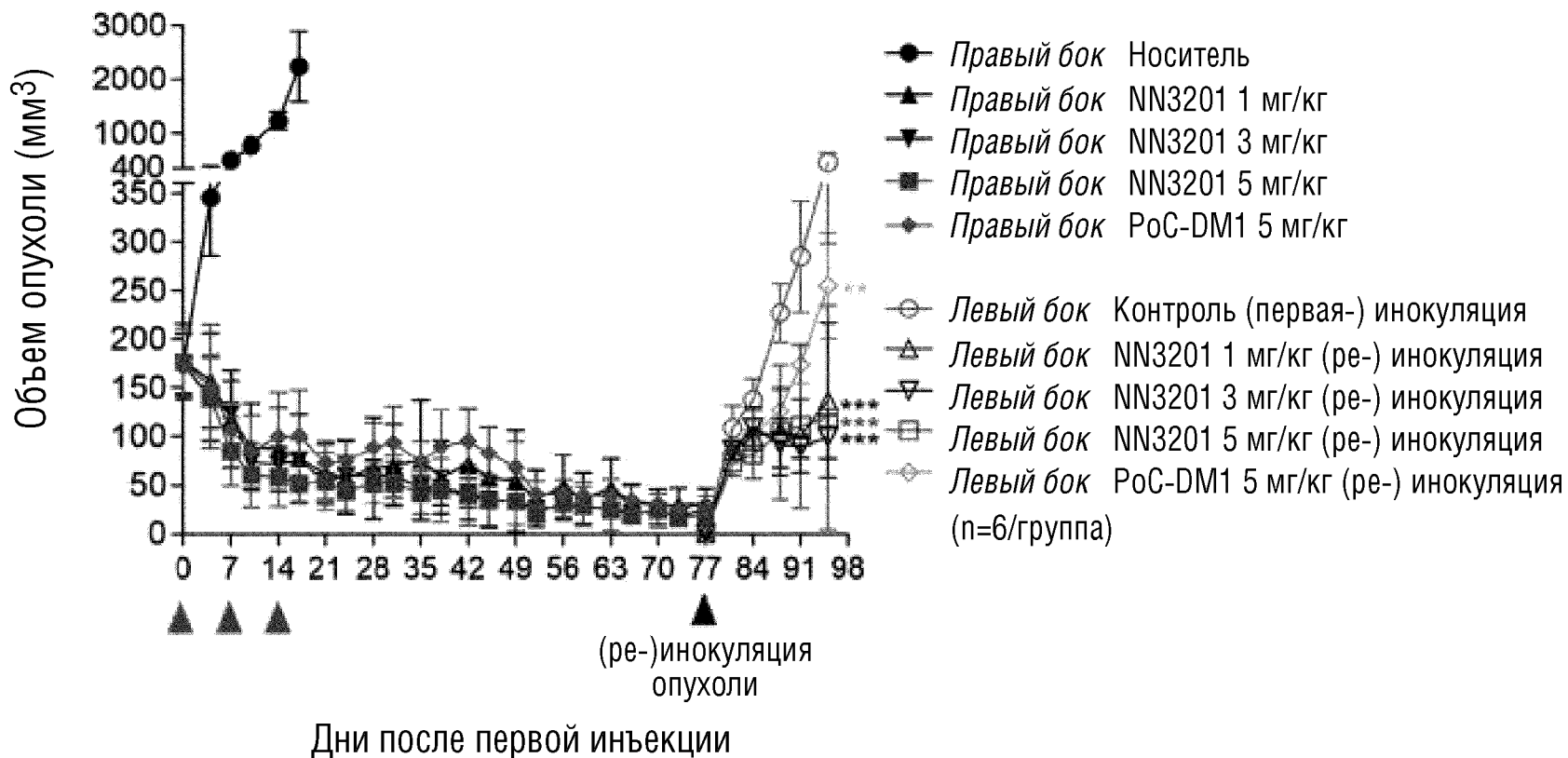


ФИГ.10

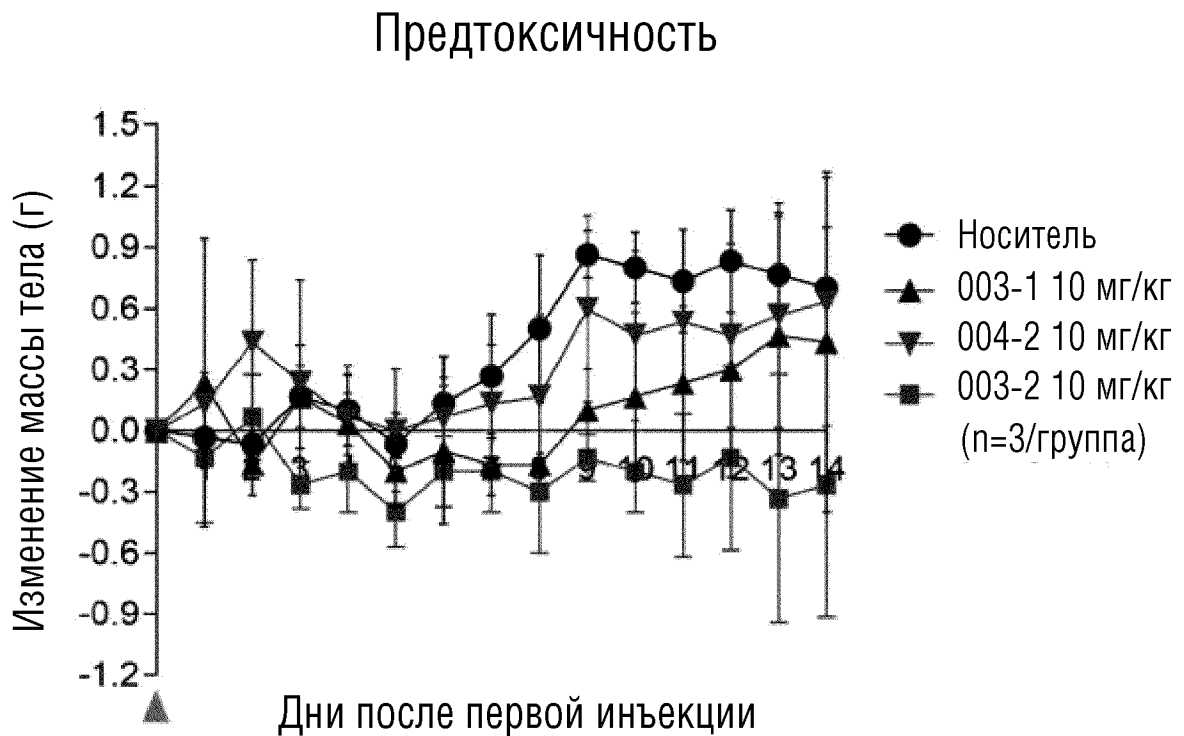
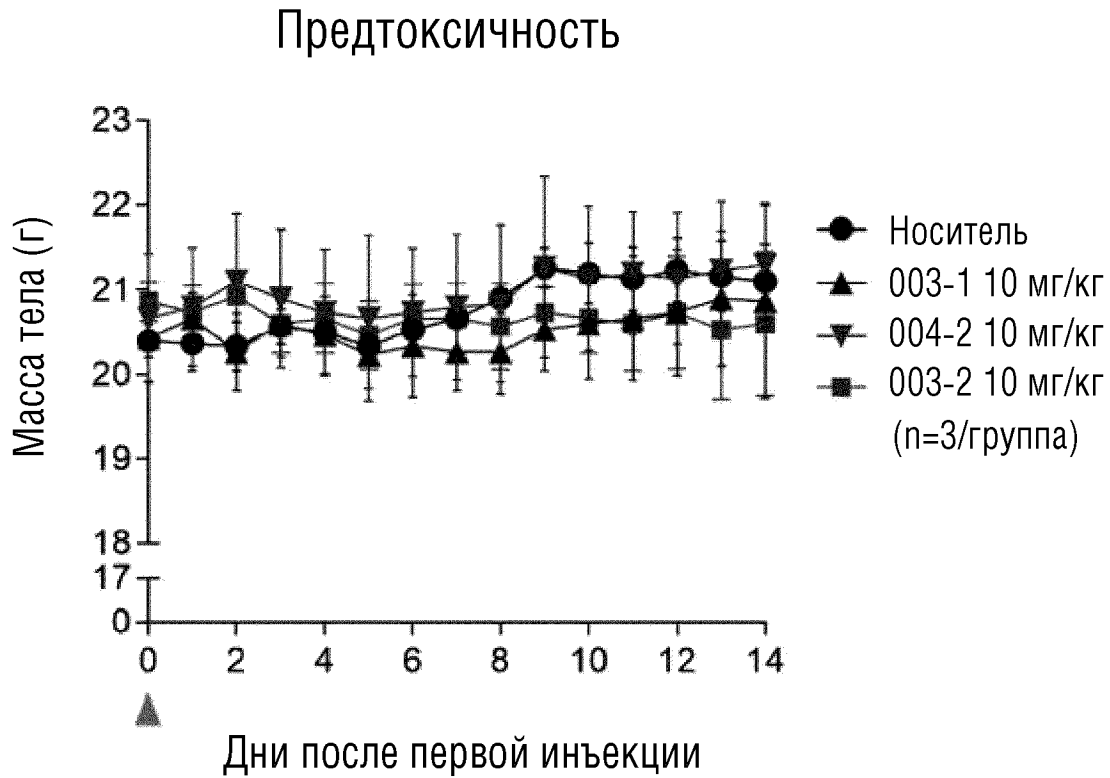


ФИГ.11

НМС-1.2

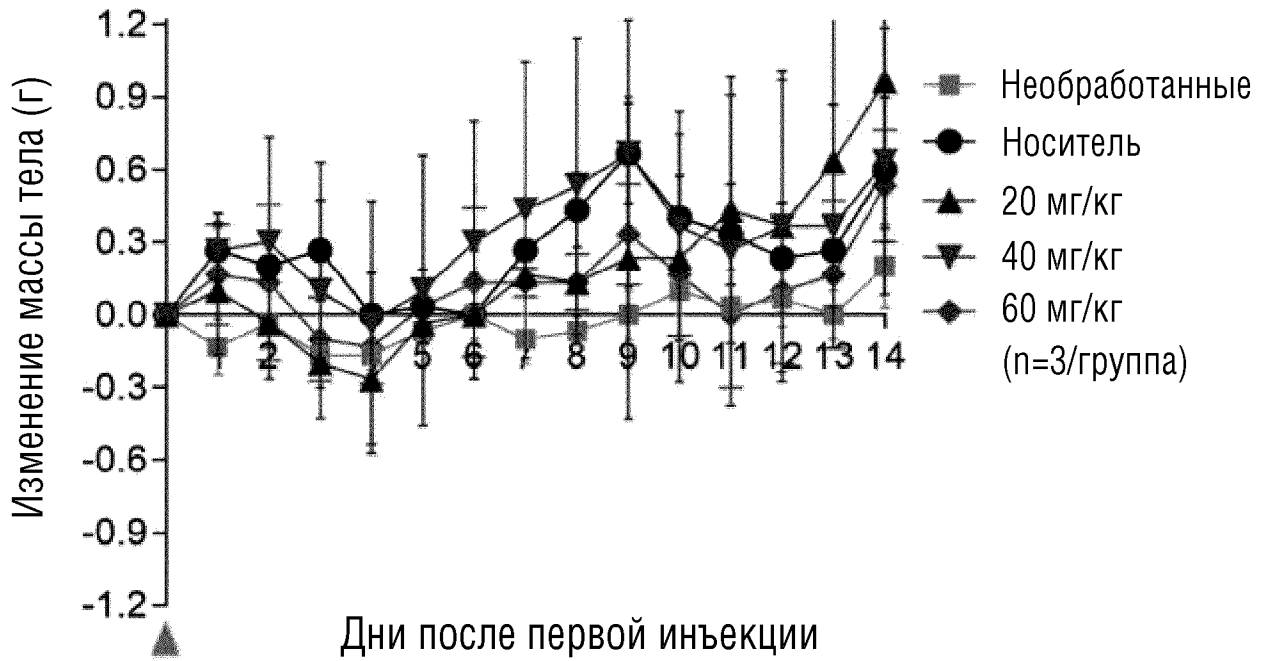


ФИГ.12



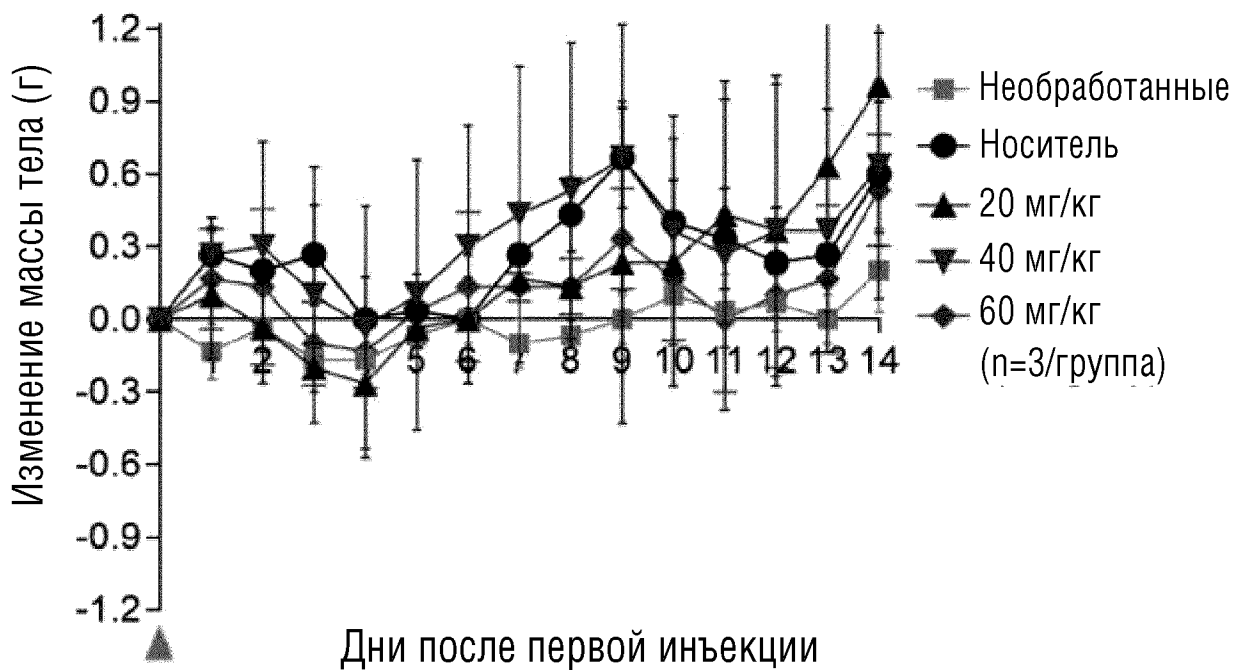
ФИГ.13а

Предтоксичность (2G4)



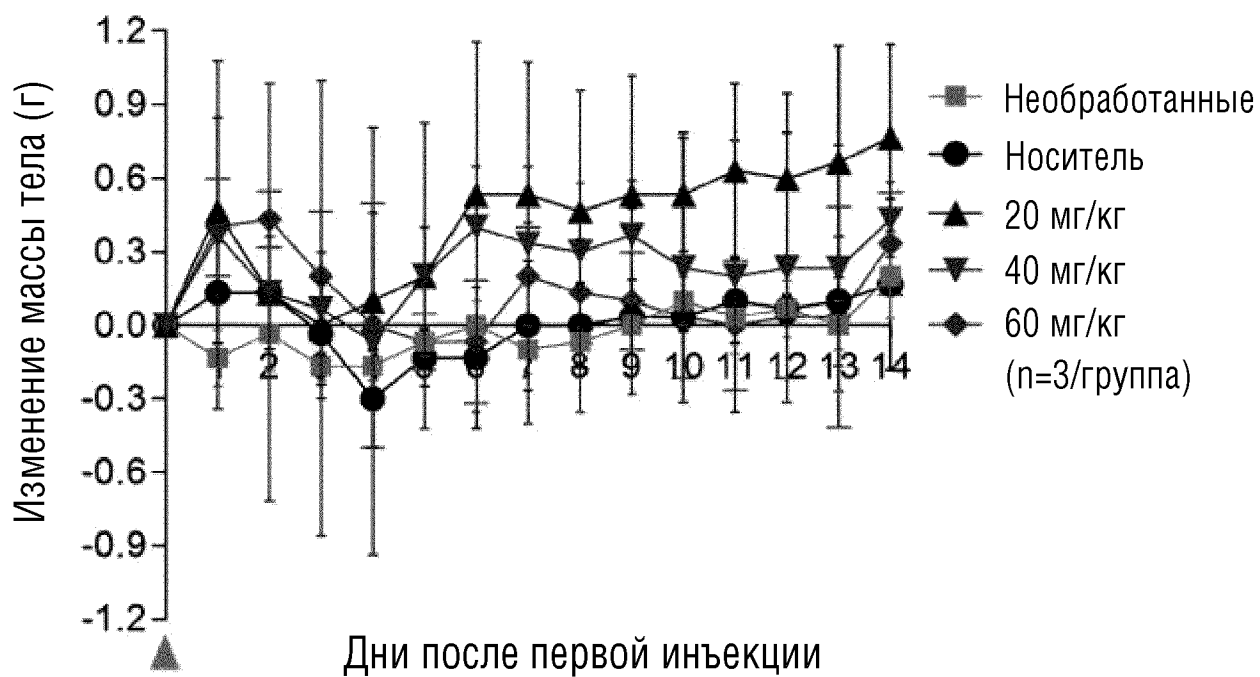
ФИГ.13б

Предтоксичность (2G4)



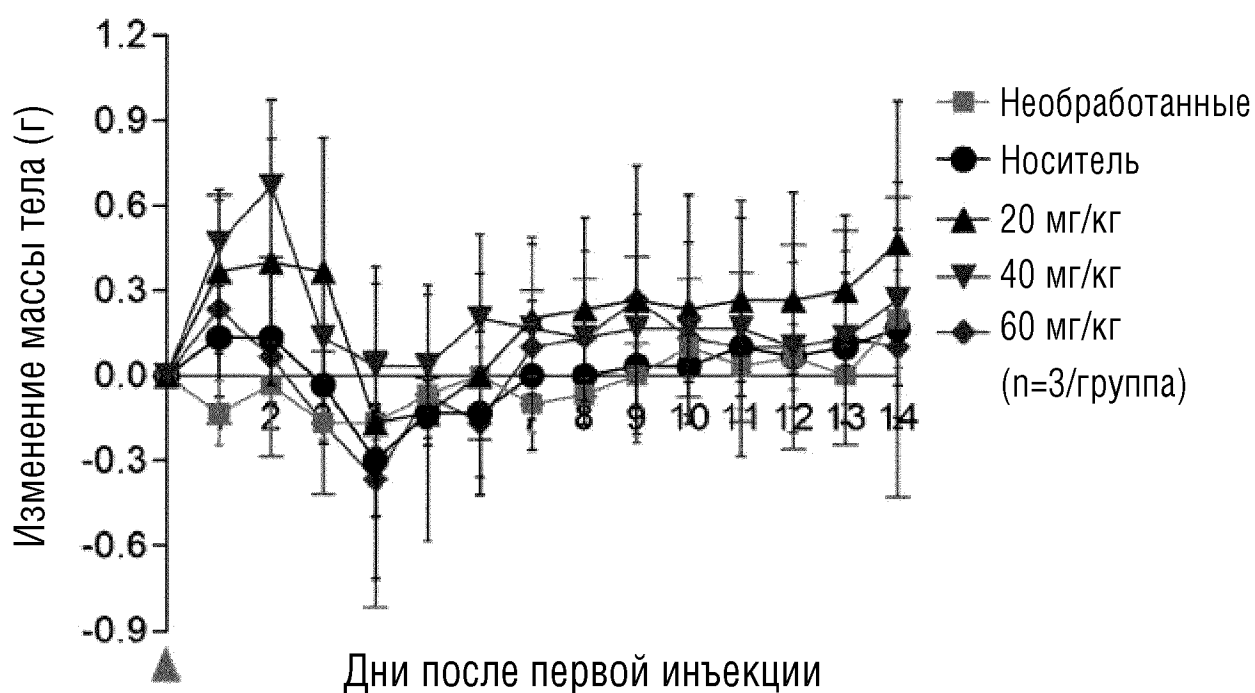
ФИГ.13с

Предтоксичность (003-1)



ФИГ.13d

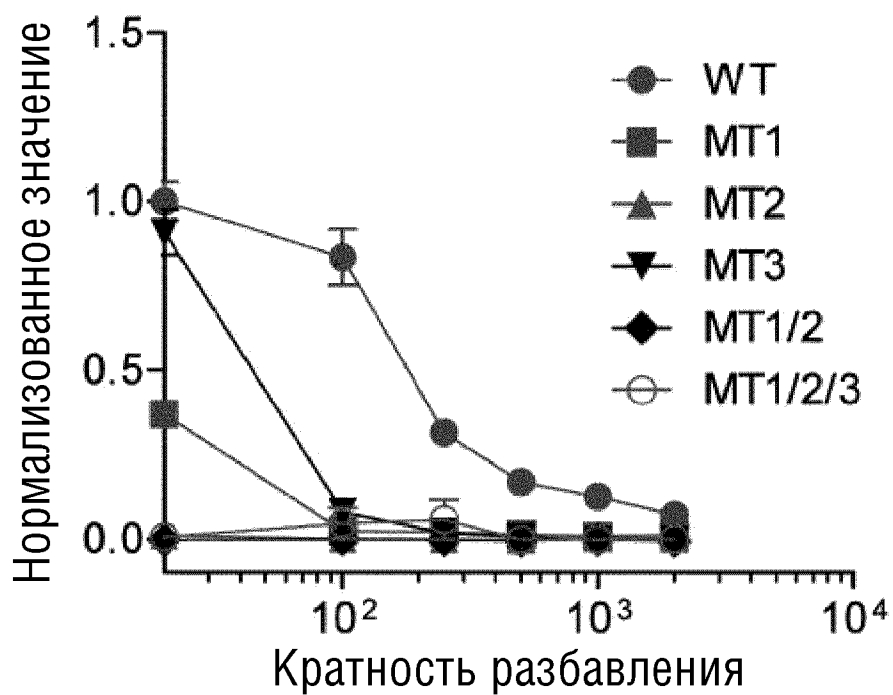
Предтоксичность (004-2)



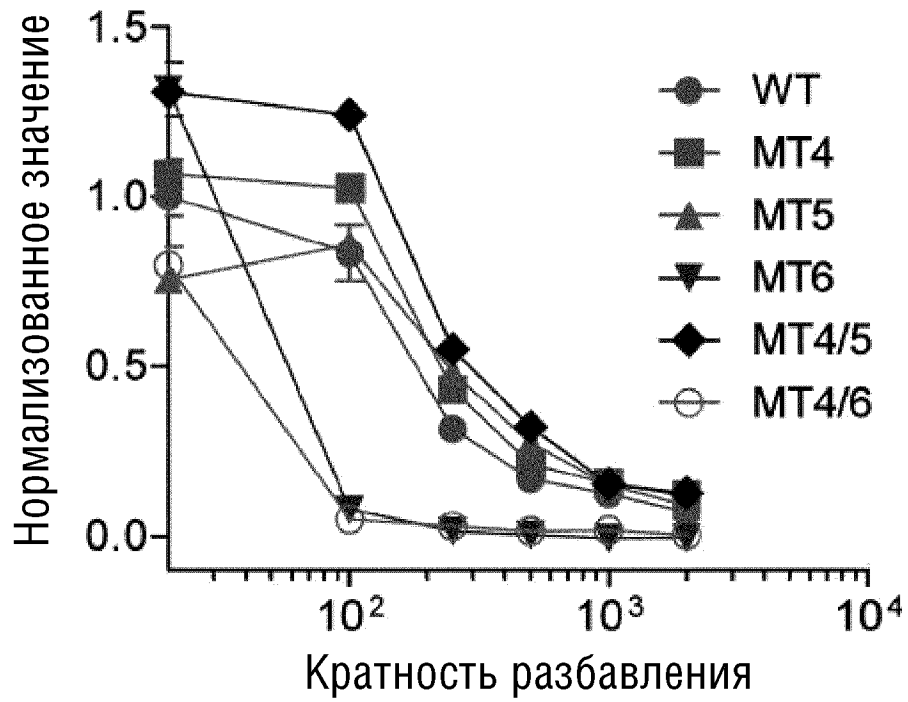
ФИГ.14а

Название	Мутация	Домен
MT1	R122A/Y125A	c-kit D2
MT2	R181A	
MT3	K203A/R205A	
MT1/2	R122A/Y125A/R181A	
MT1/2/3	R122A/Y125A/R181A/K203A/R205A	
MT4	S240A/S241A/Y243A	c-kit D3
MT5	N260A/W262A	
MT6	S261A/H263A	
MT4/5	S240A/S241A/Y243A/N260A/W262A	
MT4/6	S240A/S241A/Y243A/S261A/H263A	

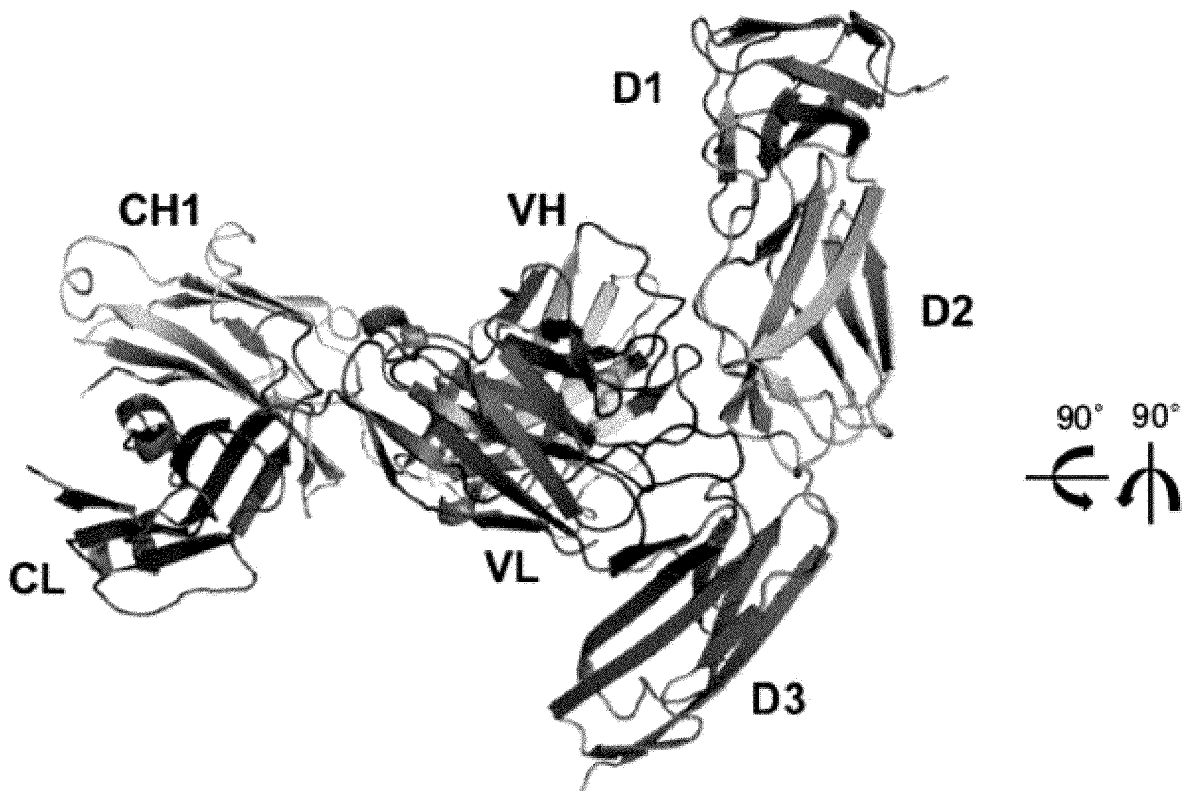
ФИГ.14b



ФИГ.14с



ФИГ.14d



ФИГ.14е

