

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

(11) 108366 A
7(51) A 61 K 47/48

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 108366
(22) Заявено на 17.11.2003
(24) Начало на действие
на патента от:

Приоритетни данни

(31) 01112227 (32) 18.05.2001 (33) EP

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 9 на 30.09.2004

(45) Отпечатано на

(46) Публикувано в бюлетин №
на

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(71) Заявител(и):
BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIO-
NAL GMBH, INGELHEIM AM RHEIN (DE)

(72) Изобретател(и):
Guenter Adolf, Wien
Karl-Heinz Heider, Stockerau
Erik Patzelt, Purkersdorf (AT)
Marlies Sproll, Gauting (DE)

(74) Представител по индустриална
собственост:
Георги Цветанов Перев, 1124 София,
ул. "Леонардо да Винчи" 3

(86) № и дата на РСТ заявка:
PCT/EP2002/005413, 16.05.2002

(87) № и дата на РСТ публикация:
WO2002/094325, 28.11.2002

(54) ИМУНОКОНЮГАТИ ОТ ЦИТОТОКСИЧНИ АНТИТЕЛА ЗА CD44

(57) Изобретението се отнася до конюгати на антитела с цитотоксични съединения, до фармацевтични състави, които ги съдържат, и до тяхното приложение при терапията на ракови заболявания. По-специално изобретението се отнася до конюгати на антитела, които са специфични за CD44 с маитансиноиди, за предпочитане с N²-деацетил-N² (3-меркапто-1-оксопропил)-маитансин (DM1).

37 претенции, 5 фигури

BG 108366 A

2641/03 – ГП

ИМУНОКОНЮГАТИ ОТ ЦИТОТОКСИЧНИ АНТИТЕЛА ЗА
CD 44

Изобретението се отнася до нови конюгати от антитела с цитотоксични съединения, фармацевтични състави включващи такива съединения и тяхното приложение в туморната терапия.

Многократно са правени опити за подобряване на ефикасността на антинеопластичните лекарствени препарати, чрез конюгиране на такива лекарствени препарати с антитела срещу тумор-асоциирани антигени, за да се повиши локалната концентрация на лекарствените препарати при доставянето им до тумора. Много от тези подходи имат ограничен успех и в литературата са обсъдени няколко причини, които да обяснят този недостатък. За противо-раковите лекарствени препарати, които действат стехиометрично, като например доксорубицин или метотрексат, са необходими относително високи вътреклетъчни концентрации за да се прояви желаната цитотоксичност. Счита се, че тези концентрации се постигат трудно с много антицяло-лекарствен препарат конюгати, поради (а) недостатъчната мощност на много общи противо-ракови лекарствени препарати, (б) ниската концентрация на прицелни антигени върху клетъчната повърхност (в) не-ефективната интернализация на комплексите антиген-антицяло в прицелната клетка, и (г) не-ефективното освобождаване на свободна форма лекарствен препарат от конюгата вътре в прицелната клетката (Chari et al., 1992).

Две от горе-споменатите пречки, а именно (а) и (г) се отнасят до работата на Chari и сътрудници (Chari et al, 1992; Liu et al., 1996; U.S. Patent No. 5,208,020). Те разработват конюгати от антитела, при които антитялото е свързано с маитансиноид, чрез дисулфидна връзка. Маитансините принадлежат към клас Ansa макролидни антибиотици, които са получени от *Nocardia* sp. Маитансинът анзамитоцин Р-3, получен чрез бактериална ферментация, се използва като прекурсорна молекула за производство на маитансиноида DM1. Маитансинът и производните действат като анти-митотични средства (инхибитори на туболиновата полимеризация), подобно на винкристин, но със значително по-висока мощност от винкрестина или другите установени хемотерапевтични средства (DM1 е токсичен за клетките *in vitro* при концентрация $\sim 10^{-10}$ M). За разлика от високата цитотоксичност на свободния маитансиноид, конюгатът на антитялото има токсичност, която е няколко пъти по-ниска върху антиген-негативните клетки в сравнение с антиген-позитивните клетки. Връзката чрез дисулфидно свързване, притежава предимството че тези мостове веднага се късат вътре в прицелните клетки от вътреклетъчния глутатион, като се освобождава високо токсичния свободен лекарствен препарат. Този подход е приложен на антитела срещу тумор-асоциирани антигени, например C242-DM1 конюгат (Liu et al., 1996; Lambert et al., 1998), и HuN901-DM1 (Chari et al., 2000). Приложението на тези конюгати, обаче е ограничено, поради ограничената експресия на съответните прицелни антигени. Например, антигенът разпознаван от N901 (CD56, N-CAM) предимно се експресира от тумори от невроендокринен произход, експресията

на C242 антигена (CanAg) е ограничена най-вече до тумори с произход от стомашно-чревния тракт.

Все още, обаче, има нужда да се подобри подхода, чрез намиране на подходящи тумор-асоциирани антитела с подходящ модел на антигенна експресия, с висока и специфична концентрации на клетъчната повърхност на антигена в прицелната тъкан, и ефективен процес на интернализация на антигенът, който е в комплекс с конюгатите от антитялото в клетките.

CD44 е белтък, който се експресира в няколко различни изоформи върху повърхността на много клетъчни типове. Най-малката изоформа стандартната CD44 (CD44s), която се експресира върху различни клетки, се счита че медира клетъчното прикрепване към компонентите на екстрацелуларния матрикс и може да пренася съпътстващ стимул при лимфоцитното и моноцитно активиране. От друга страна, експресията на сплайс варианти на CD44, които съдържат домена v6 (CD44v6) в извънклетъчната си област, е ограничена до определен набор от епителни клетки. Все още не е напълно изяснена ролята на CD44v6.

За CD44v6, както и за другите варианти на екзони (CD44v3, CD44v5, CD44v7/v8, CD44v10) е показано че е тумор-асоцииран антиген с благоприятен модел на експресия в човешките тумори и нормалните тъкани (Heider et al., 1995; Heider et al., 1996; Dall et al., 1996; Beham-Schmid et al., 1998; Tempfer et al., 1998; Wagner et al., 1998) и че може да бъде обект на терапевтични подходи и диагностика на базата на антитяло, по-специално при

радиоимунотерапия (RIT) на тумори (Verel et al., 2002; Stromer et al., 2000, WO 95/33771, WO 97/21104).

Предпоставка за ефективно убиване на туморни клетки, обаче, чрез конюгати на антитяло с маитансиноид, е същественото интернализиране на прицелният антиген. Налични са само много малко данни за интернализацията на CD44. Bazil и Horejsi съобщават, че подтискането на CD44 върху левкоцити, чрез стимулиране с PMA се причинява по-скоро чрез замаскиране на антигена, отколкото чрез интернализиране (Bazil et Horejsi, 1992). Маскирането на CD44 също се потвърждава от някои съобщения за разтворимия CD44 в серум от пациенти с тумори и нормални индивиди (Sliutz et al., 1995; Guo et al., 1994; Martin et al., 1997). В наскоро публикувана статия на Aguiar et al. се определя, че количеството на интернализиран CD44 върху матрикс-интактни хондроцити е приблизително 6% за 4 часа (Aguiar et al., 1999). Подобни ниски нива на интернализиран CD44v6 върху туморни клетки, са намерени при експерименти проведени чрез BIA. Всички тези данни взети заедно предполагат, че CD44 рецепторите са по-вероятно обект на маскиране, отколкото на интернализиране и следователно CD44 специфичните антитела не се считат за подходящи кандидати за подхода на маитансиноид конюгата. Това е подкрепено чрез анализи за *in vitro* клетъчна пролиферация, където Ab_{CD44v6}-DM1 показва само леко повишаване на цитотоксичността срещу антиген-представящите клетки, в сравнение с тези в които липсва антиген.

Сега, неочаквано е намерено, че CD44 специфичните конюгати на антитела с високо токсични лекарствени препарати,

17.11.03

получени чрез линкер който се къса при вътреклетъчни условия, са много ефективни туморни терапевтици *in vivo*.

Настоящото изобретение осигурява нови съединения, съставени от конюгати на молекули от CD44 специфични антитела и силно цитотоксични лекарствени препарати, свързани чрез линкер който се разгражда във вътреклетъчни условия.

По-специално, настоящето изобретение осигурява съединение с формула

$A(LB)_n$ Формула (I)

където

A е молекула на антитяло, което е специфично за CD44;

L е линкерна група;

B е съединение, което е токсично за клетки; и

n е десетично число с $n = 1$ до 10

Молекулата на антитялото **A** притежава свързваща специфичност за CD44, предимно за вариант на CD44.

Терминът "молекула на антитялото" обхваща пълните имуноглобулини, както те се получават от лимфоцитите, например присъстващи в кръвния серум, моноклонални антитела, секретирани от хибридомни клетъчни линии, полипептиди получени от рекомбинантна експресия в клетки гостоприемници, които притежават свързваща специфичност на имуноглобулините или моноклонални антитела, и молекули които са получени от такива имуноглобулини, моноклонални антитела или

полипептиди, чрез последваща обработка, докато все още те запазват тяхната свързваща специфичност. По-специално, терминът "молекула на антитяло" включва пълните имуноглобулини, съставени от две тежки вериги и две леки вериги, фрагменти на тези имуноглобулини, като Fab, Fab', или F(ab)₂ фрагментите (Kreitman et al., 1993), рекомбинантно получени полипептиди, такива като химерни, наподобяващи човешките или напълно човешки антитела (Breitling et Duebel, 1999; Shin et al., 1989; Gussow et Seemann, 1991, Winter et al., 1994, EP 0 239 400, EP 0519596; WO 90/07861 EP 0368684; EP 0438310; WO 9207075, WO 9222653, EP 0 680 040, EP 0 451 216), едно-верижни антитела (scFv, Johnson et Bird, 1991) и други подобни. Днес антителата могат също така да бъдат получени без имунизирание на лабораторно животно, например чрез phage display методи (Aujaime et al., 1997; US 5,885,793; US 5,969,108; US 6,300,064; US 6,248,516, US 6,291,158). Напълно човешките антитела могат да се получат, като се използват трансгенни мишки които носят функционални човешки Ig гени (EP 0 438 474; EP 0463 151; EP 0546 073). От гореизложените литературни справки, експертът знае как да получи тези типове молекули на антитела, като използва методите от предшестващото ниво на техниката, такива като автоматизирана пептидна и нуклеиновокиселинна синтеза, имунизирание на лабораторни животни, хибридомни техники, полимеразно-верижна реакция (PCR), технологии за експресия на вектори, култивиране на клетки гостоприемници и методи за пречистване на белтъци. По-нататък термините "антитяло" и "молекула на антитяло" се използват взаимозаменяемо.

“Специфично за CD44” означава, че молекулата на антитялото има специфичен свързващ афинитет за епитоп, присъстващ в CD44. В предпочитан вариант, молекулата на антитялото от изобретението има свързваща специфичност за аминокиселинна секвенция, кодирана от екзонен вариант v6 на човешкия ген за CD44. Секвенцията на екзонния вариант v6, също така и на други екзонни варианти са известни от предшестващото ниво на техниката (Screaton et al., 1992; Tolg et al., 1993; Hofmann et al., 1991). Предпочитана молекула на антитяло от изобретението специфично се свързва с пептиди или полипептиди, които имат или съдържат аминокиселинна секвенция SEQ ID NO: 1 от придружаващият списък на секвенциите, или алелен вариант на споменатата секвенция. За предпочитане е споменатата молекула на антитялото да има свързваща специфичност за епитоп от споменатата секвенция. Още по-добре е молекулата на антитялото да се свързва специфично с пептид, който има аминокиселинна секвенция SEQ ID NO: 2, даже най-добре да има аминокиселинна секвенция SEQ ID NO: 3. Такива молекули на антитяло могат да се получат лесно с методите, известни от нивото на техниката (WO 95/33771, WO 97/21104), например чрез имунизирание на лабораторни животни с химично синтезирани пептиди, които имат гореспоменатите секвенции, например свързани с хаптен, или имунизирани с рекомбинантно получен рекомбинантен белтък, включващ споменатите секвенции и проявата им, съгласно методите известни от нивото на техниката (Harlow 1988; Catty 1988; Koopman et al., 1993; Heider et al., 1993).

За предпочитане е молекула на антитяло, съгласно изобретението да е мишето моноклонално антитяло, с означение

VFF-18, което се получава от хибридомна клетъчна линия, която е депозирана на 07 Юни 1994 под номер за достъп DSM ACC2174 с DSM-Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Deutschland/Germany. Fab, Fab' или F(ab)₂ фрагментите на споменатото моноклонално антитяло VFF-18 са също така предпочитани. В друг предпочитан вариант, молекулата на антитялото е наподобяващо човешкото, рекомбинантно антитяло, където комплиментарните детерминиращи области (CDR's) на VFF-18 са присадени в съответните гени на човешката имуноглобулинова тежка и лека вериги.

Под “комплиментарно-детерминиращи области” на моноклоналното антитяло, трябва да се разбира тези аминокиселинни секвенции, включени в специфичното свързване на антигена, съгласно Kabat et al., 1991, във връзка с Chothia and Lesk, 1987.

В друг предпочитан вариант, подходящи рамкови остатъци на такова CDR-присадено антитяло са върнати обратно към мишите остатъци за да се промени свързващия афинитет. От методите отнасящи се до нивото на техниката, експертите знаят как да получат CDR's от VFF-18, като започват с гореспоменатата хибридома с номер за достъп DSM ACC2174, за да изберат и получат подходящи човешки имуноглобулинови гени, да присадят CDR's в тези гени, за да модифицират избраните остатъци за рамка, за да се експресира CDR-присаденото антитяло в подходящи клетки-гостоприемници, например клетки от яйчник на китайски хамстер (CHO) и за да анализират получените рекомбинантни антитела за свързващият им афинитет и

17.11.03

специфичност (виж например, литературните справки по-горе). В друг предпочитан вариант на изобретението, молекулата на антиятло е рекомбинантно антиятло, което има CDR's на антиятлото VFF-18. За предпочитане, такова рекомбинантно антиятло е антиятло, наподобяващо човешкото и е пълнен имуноглобулин, състоящ се от две пълни леки и две пълни тежки вериги. В друг предпочитан вариант от изобретението, молекулата на антиятлото е рекомбинантно антиятло, което има същия идиотип, както и антиятло VFF-18. В друг предпочитан вариант от изобретението, молекулата на антиятлото от изобретението е рекомбинантно антиятло, свързващо се със същия епитоп както и антиятлото VFF-18.

В специално предпочитан вариант, молекулата на антиятлото А е антиятло, включващо леки вериги, които имат аминокиселинна секвенция SEQ ID NO: 4 и тежки вериги, които имат аминокиселинна секвенция SEQ ID NO: 6. Това антиятло се нарича BIWA4. То е вариант на VFF-18 на антиятло, наподобяващо човешките, споменато по-горе, което има комплиментарни детерминиращи области от мишото моноклонално антиятло VFF-18 в комплиментарната човешка рамка и константни човешки области. Ето защо това е антиятло с много ниска имуногенност в хора, което е благоприятна характеристика. Обаче, тъй като няма остатъците на миша рамка за да оптимизира антигенното свързване, то има изключително нисък антиген-свързващ афинитет както неговото родителско антиятло VFF-18, и затова не се счита за добър кандидат за терапевтичен лекарствен препарат. Неочаквано е намерено, че BIWA4, освен неговият слаб свързващ афинитет, има много

благоприятно био-разпространение и *in vivo* усвояване в туморите, което го прави по-добро от останалите версии на VFF-18, наподобяващи човешките антитела с по-висок свързващ афинитет (Verel et al), 2002. В друг предпочитан вариант, молекулата на антитялото А е антитяло, включващо леките вериги, притежаващи аминокиселинна секвенция SEQ ID NO: 8 и тежките вериги, притежаващи аминокиселинна секвенция SEQ ID NO: 6. Това антитяло има по-висок свързващ афинитет, отколкото BIWA 4 и се нарича BIWA 8.

Тези антитела могат да се получат както следва. Молекулите нуклеинови киселини, кодиращи леката верига и тежката верига могат да се синтезират химично и ензимно, чрез стандартни методи. Първо, подходящите олигонуклеотиди могат да се синтезират с методи известни от нивото на техниката (например, Gait, 1984), които могат да се използват за синтетично получаване на гена. Методите за създаване на синтетични гени от олигонуклеотиди са известни от нивото на техниката (например, Stemmer et al. 1995; Ye et al. 1992; Hayden et Mandecki 1988; Frank et al. 1987). За предпочитане е молекулите нуклеинови киселини, кодиращи леката и тежката вериги на BIWA4 да имат нуклеотидните последователности, съответно на SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 7. Тези секвенции включват секвенциите, кодиращи лидерните пептиди, които се разграждат от клетката-гостоприемник (SEQ ID NO: 5: първите 60 нуклеотида; SEQ ID NO:7: първите 57 нуклеотида). В друг вариант молекулите нуклеинови киселини, кодиращи леката и тежката вериги на молекулата на антитялото, съгласно изобретението имат нуклеотидни секвенции, съответно SEQ ID NO:9 и SEQ ID NO:7.

Тези молекули нуклеинови киселини, кодиращи тежката и лека вериги на антитялото, след това могат да бъдат клонирани в експресионен вектор (или двете вериги в една векторна молекула или всяка верига в отделна векторна молекула), който след това се въвежда в клетка-гостоприемник. Подходящите експресионни вектори, за експресия на имуноглобулини в прокариотни или еукариотни клетки-гостоприемници, както и методите за въвеждането в клетки гостоприемници са добре известни от нивото на техниката. Обикновено имуноглобулиновия ген в тях е във функционална връзка с подходящ промотор, такъв като например промотор от човешки цитомегаловирус (CMV), убиквитинов промотор от хамстер (WO 97/15664) или промотор на simian вирус (SV 40) локализирани upstream от Ig гена. За завършване на транскрипцията, може да се използва подходящо терминиращо/полиаденилирано място, като това на говеждия растежен хормон или на SV40. Обикновено, експресионният вектор, също така съдържа маркерни гени за селекция, такива като гените за дихидрофолат редуктаза (DHFR), глутамин синтетаза, аденозин деаминаза, аденилат деаминаза или гените за резистентност към неомицин, блеомицин или пуромицин. Много експресионни вектори са налични в търговската мрежа, като например Strategene, La Jolla, CA; Invitrogen Carlsbad, CA; Promega, Madison, WI или BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA. Например, за експресия могат да бъдат използвани експресионните вектори pAD-CMV1 (NCBI GenBank Accession No. A32111) или pAD-CMV19 (NCBI GenBank Accession No. A32110). Клетката-гостоприемник, за предпочитане е клетка-гостоприемник от бозайник, например COS, CHO, или BHK

клетка, по-добре клетка от яйчник на китайски хамстер (CHO), например CHO-DUKX (Urlab and Chasin, 1980), CHO-DG44 (Urlaub et al., 1983) или CHO-K1 (ATCC CCL-61). Клетката гостоприемник след това се култивира в подходяща хранителна среда при условия, подходящи за получаване на анти тялото и анти тялото след това се изолира от културата, съгласно стандартни методи. Методи за получаване на анти тела от рекомбинантна ДНК от рекомбинантна ДНК в клетки-гостоприемници и съответните експресионни вектори са добре известни от нивото на техниката (виж например, WO 94/11523, WO 97/9351, EP 0481790, EP 0 669 986).

За да се свърже молекулата на анти тялото А със съединението В, което е токсично за клетки, се използва свързваща група L. В най-простия случай, свързващата група L е химична връзка, за предпочитане ковалентна връзка, която се разгражда във вътреклетъчни условия. В един вариант от изобретението, връзката е между атом на сярата, присъстващ в молекулата на анти тялото, например в страничната верига на цистеинов остатък и друг атом на сяра, присъстващ в токсичното съединение. В друг вариант, линкерната група L се състои от един или повече атоми или химични групи. Подходящи свързващи групи са добре известни от нивото на техниката и включват дисулфидни групи, тиоестерни групи, киселинно лабилни групи, фотолабилни групи, пептидазно лабилни групи или естеразно лабилни групи. Предпочитани са дисулфидните и тиоестерните групи.

Конюгати на молекули на анти тела от изобретението и токсичното съединение могат да се образуват, като се използва

всяка една от понастоящем известните или по-късно развитите техники. Токсичното съединение може да се модифицира, така че да носи свободна аминокиселинна група и след това да се свърже с молекулата на антитялото чрез киселинно лабилен линкер или фотолабилен линкер. Токсичното съединение може да бъде кондензирано с пептид и след това свързано с молекулата на антитялото, за да се получи линкер, лабилен по отношение на пептидазите. Токсичното съединение може да се третира, така че да даде първична хидроксилна група, която може да е сукцинилирана и да е свързана с молекулата на антитялото, за да се получи конюгат, който може да се разгражда от вътреклетъчни естерази за да се освободи свободният лекарствен препарат. Още по-добре е токсичното съединение да се третира така че да се създаде свободна или защитена тиолова група и след това едно или повече дисулфидни или тиол-съдържащи токсични съединения, които са ковалентно свързани с молекулата на антитялото, чрез дисулфиден (дисулфидни) мост (мостове).

Например, молекулите на антитялото могат да се модифицират с омрежващи реагенти, такива като N-сукцинимидил 3-(2-пиридилитио)пропионат (SPDP), 4-сукцинимидил-оксикарбонил-алфа-метил-алфа -(2-пиридилитио)-толуен (SMPT), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилитио)-бутират (SDPB), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилитио)-пентаноат (SPP), N-сукцинимидил-5-(2-пиридилитио)-пентаноат, 2-иминотиолан, или ацетилсукцинов анхидрид, чрез известни методи. Виж, Carlsson et al, 1978; Blattler et al 1985; Lambert et al, 1983; Klotz et al, 1962; Liu et al, 1979; Blakey and Thorpe, 1988; Worrell et al, 1986. В предпочитан вариант, линкерната група е 4-тиопентаноат,

получена от SPP, или 5-тиопентаноат. Молекулата на антитялото съдържаща свободни или защитени тиолови групи, получена по този начин, след това реагира с дисулфид- или тиол- съдържащо токсично съединение, за да се получат конюгати. Конюгатите могат да се пречистят чрез HPLC или чрез гел филтрация.

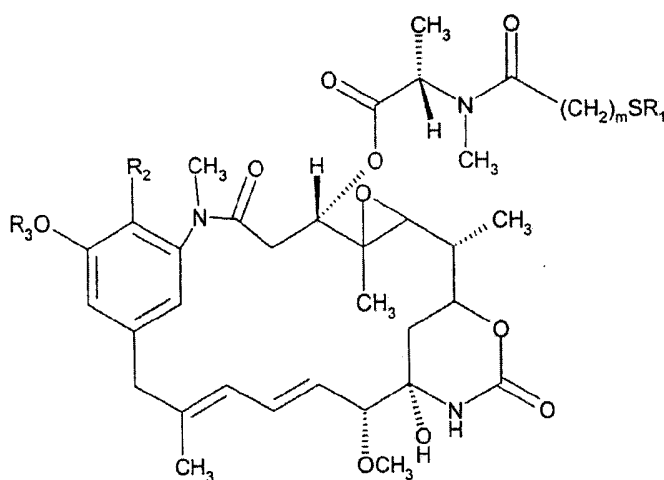
“Токсично” е съединение, което инхибира или предпазва функцията на клетките и/или причинява клетъчно разрушаване. Токсичните съединения, използвани за сдвояване могат да действат като цитостатици или цитотоксици и да водят до блокиране на клетъчния цикъл или до клетъчна смърт. Тези съединения могат да действат на различни етапи по време на клетъчния цикъл, например чрез намеса в синтеза на нуклеиновите киселини, инактивиране на нуклеиновите киселини или чрез свързване с тубулин.

В предпочитан вариант, съединението В което е токсично за клетките е маитансиноид, т.е. производно на маитансина (CAS 35846538). В предпочитан вариант, то е C-3 естер на маитансинола. Маитансиноидите, подходящи за свързване с антитела за прилагане в раковата терапия, включително и приготвянето на споменатите маитансиноиди и тяхното свързване с молекулите на антитялото, са описани от Chari и сътрудници (Chari et al., 1992; Liu et al., 1996; U.S. Patent No. 5,208,020). Тези маитансиноиди могат да се използват за настоящето изобретение. В предпочитан вариант, токсичното съединение е N²'-деацетил-N²'-(3-меркапто-1-оксопропил)-Маитансин (CAS Номер 139504-50-0), отнасящо се също до DM1. За предпочитане, споменатият маитансиноид е маитансинолно производно, свързано с молекулата на антитялото, чрез дисулфиден мост при позиция C-3

17.11.03

от маитансинола. В специално предпочитан вариант, конюгатът на антитялото/маитансиноида може да се получи от маитансиноид с формула

(Формула (II))



където

R_1 представлява H или SR_4 , където R_4 представлява метил, етил, линеен алкил, разклонен алкил, цикличен алкил, прост или заместен арил или хетероциклик;

R_2 представлява Cl или H;

R_3 представлява H или CH_3 ; и

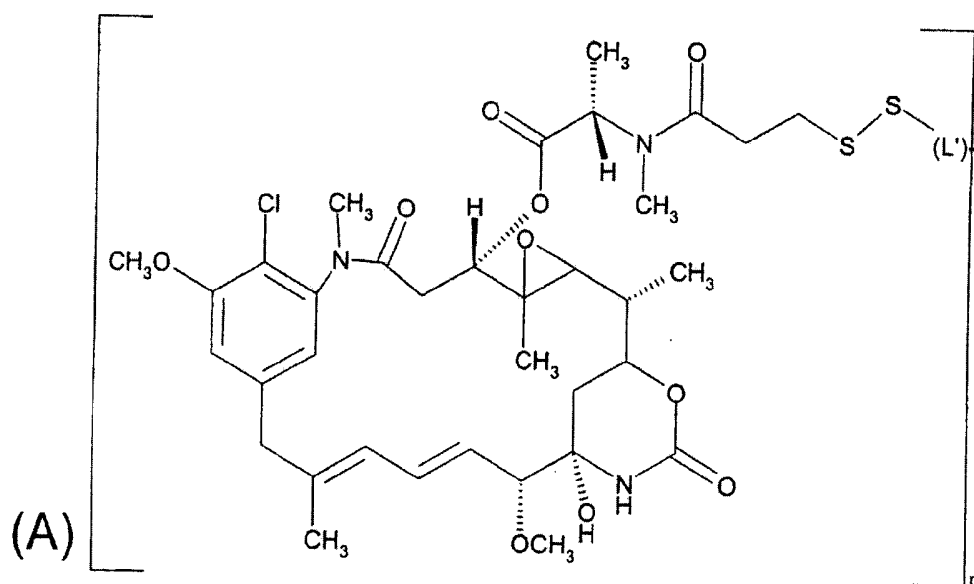
m представлява 1, 2 или 3.

За предпочитане, R_1 е H, CH_3 или SCH_3 , R_2 е Cl, R_3 е CH_3 и $m = 2$.

17.11.03

Съединението с $R_1 = H$, $R_2 = Cl$, $R_3 = CH_3$ и $m = 2$ е означено в литературата като DM1.

В предпочитан вариант, съединението от изобретението има формула



(Формула III)

където

A е молекула на антитяло, което е специфично за CD44, за предпочитане специфична за екзонен вариант v6, за предпочитане специфична за аминокиселинна секвенция SEQ ID NO: 3;

(L') е избрана линкерна група

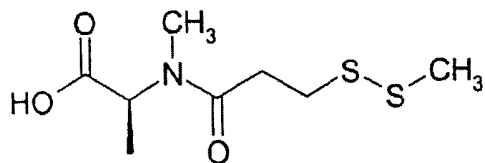
p е десетично число с $p = 1$ до 10

За предпочитане p е 3 до 4, още по-добре около 3.5.

Методи за приготвяне на такива мaitансиноиди са известни от нивото на техниката (виж по-специално US 5,208,020, Пример

17.11.03

1). Обикновено, в първия етап маитансиноидният С-3 естер анзамитоцин РЗ може да се получи, чрез бактериална ферментация от микроорганизми, принадлежащи към род *Nocardia* или *Actinosynnema*, например ATCC 31565, ATCC 31281 (US 4,356,265; US 4,450,234; WO 01/773 360). Анзамитоцин РЗ може да се екстрахира от култура, като се използват органични разтворители, такива като етил ацетат или толуен и по-нататък се пречистват чрез адсорбционна хроматография, като се използва например силика гел. След това той може да се редуцира до маитансинол, като се използва LiAlH_4 (US 4,360,462) или както е предложено наскоро, $\text{LiAl(OMe)}_3\text{H}$ или други хибриди на LiAl или NaAl (WO 02/16368). Маитансинолът след това може да се естерифицира в позиция С-3 с N-метил-L-аланин или N-метил-L-цистеинови производни за да се получи дисулфид-съдържащ маитансиноид (US 5,208,020; US 5,416,064; US 6,333,410), например като се използва дициклохексилкарбодиимид (DCC) и каталитични количества от цинков хлорид (US 4, 137, 230; US 4,260,609). В предпочитан вариант, маитансиноидът е естерифициран със съединението N-метил-N-(3-метилдитиопропаноил)-L-аланин с формула



за да се получи маитансиноид с Формула (II) с $R_1 = SR_4$, $R_4 = CH_3$, $R_2 = Cl$, $R_3 = CH_3$ и $m = 2$.

Свободната тиолова група след това може да се освободи, чрез разграждане на дисулфидната връзка с дитиотриетол (DTT) за да се получи например DM1.

При вътреклетъчното разграждане се освобождава свободното токсично съединение от $A(LB)_n$ конюгата. Свободният лекарствен препарат се освобождава от съединението $A(LB)_n$ което може да има формула $B-X$, където X е атом или химична група, която зависи от природата на реакцията на разграждане. За предпочитане X е водороден атом, като например когато линкерната група е проста ковалентна връзка между два атома, съдържащи сяра или хидроксилна група. Мястото на разграждане може също да бъде в линкерната група, ако линкерната група е химична група, водеща до разкъсване на свободен лекарствен препарат с формула $B-L''-X$ при разграждане, където X е атом или химична група, зависеща от природата на реакцията на разграждане. За предпочитане X е водороден атом или хидроксилна група.

В предпочитан вариант, съединението с формула (I) е по-малко токсично от токсичното съединение B , $B-X$ или $B-L''-X$ освободено при вътреклетъчното разграждане. Методите за анализирането на цитотоксичност *in vitro* са известни от нивото на техниката (Goldmacher et al., 1985; Goldmacher et al., 1986; виж също US 5,208,020, Пример 2). За предпочитане, съединението (I) е 10 пъти или над, още по добре 100 пъти или над, или най-добре даже 1000 пъти или над 1000 пъти по-малко токсично от това,

което се освобождава при разграждането на освободения лекарствен препарат.

За предпочитане молекулата на антитялото/маитансоидните конюгати са тези които се свързват чрез дисулфиден мост, както е дискутирано по-горе, които са способни да доставят маитансиноидните молекули. Такива клетъчно-свързани конюгати се приготвят чрез известни методи, такива като модифициране на моноклонални антитела със сукцинимидил пиридил-дителиопропионат (SPDP) или пентаноат (SPP) (Carlsson et al, 1978). Получената тилиопиридил група след това се замества чрез третиране с тиол-съдържащи маитансиноиди за да се получат дисулфидно свързани конюгати. От друга страна, в случая на арилдителиомаитансиноидите, получаването на конюгати на антитела е повлияно от директното заместване на арил-тиол на маитансиноида от сулфхидрилни групи, които са въведени предварително в молекулите на антитялото. Конюгатите съдържащи от 1 до 10 маитансиноидни лекарствени препарати, свързани чрез дисулфиден мост, могат веднага да се приготвят чрез същия метод. В този контекст се разбира че десетичното число n във формулата $A(LB)_n$ е средно аритметично число, тъй като не всички молекулни конюгати от даден препарат могат да имат идентично цяло число на LB остатъците, закачени към молекулата на антитялото.

По-специално, разтворът на дителиопиридил модифицираното антитяло при концентрация 1 mg/ml в 0.1 M калиево фосфатен буфер с pH 7.0, съдържащ 1 mM EDTA е третиран с тиол-съдържащ маитансиноид (1.25 моларен еквивалент/дителиопиридил група). Освобождаването на пиридин-2-тион от модифицираното

антитяло се следи спектрофотометрично при 343 nm и се извършва напълно след около 30 минути. Антитяло-маитансиноидният конюгат се пречиства и освобождава от не-реагиралия лекарствен препарат и други материали с ниско молекулно тегло чрез гел-филтрация през колона Sephadex G-25. Броят на маитансиноидните връзки за молекула антитяло може да се определи, чрез измерване на съотношението на абсорбциите при 252 nm и 280 nm. Средно от 1-10 от маитансиноидните молекули/молекули на антитялото, могат да се свържат чрез дисулфидни връзки чрез този метод.

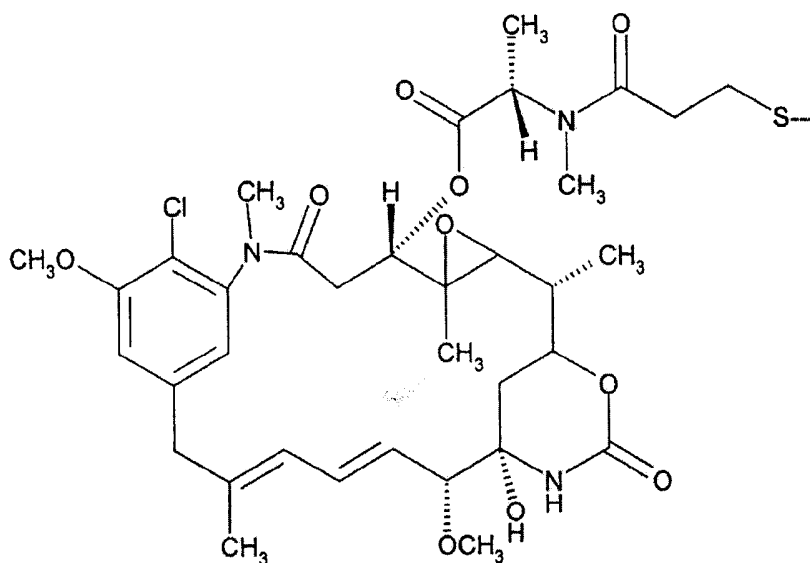
В следващ аспект, настоящето изобретение се отнася до конюгат на CD44v6 специфична молекула на антитяло и маитансиноид. Под "CD44v6 специфично" тук трябва да се разбира, че антитялото има специфичен афинитет на свързване с епитоп, който присъства в пептид, притежаващ аминокиселинна секвенция, кодирана от екзонен вариант v6 на CD44, предимно на човешки CD44. Предпочитаната молекула на антитяло от изобретението, се свързва специфично с пептиди или полипептиди, които притежават или съдържат аминокиселинна секвенция SEQ ID NO:1 от придружаващия списък на секвенциите или алелен вариант от споменатата секвенция. За предпочитане е споменатата молекула на антитялото да има свързваща специфичност за епитоп от споменатата секвенция. По-специално, молекулата на антитялото свързва специфично пептид, притежаващ аминокиселинна секвенция SEQ ID NO:2 и даже още по-добре, притежаващ аминокиселинна секвенция SEQ ID NO:3.

За предпочитане е, молекулата на антитялото в споменатият конюгат да е моноклоналното антитяло VFF-18 (DSM ACC 2174)

или рекомбинантно антитяло, притежаващо комплиментарни детерминиращи области (CDRs) на VFF-18. По-добре, споменатото антитяло да включва леки вериги, притежаващи аминокиселинна секвенция SEQ ID NO: 4 или от друга страна SEQ ID NO:8 и тежки вериги, притежаващи SEQ ID NO: 6.

Маитансиноидът за предпочитане е свързан с антитялото, чрез дисулфидна група и има формула.

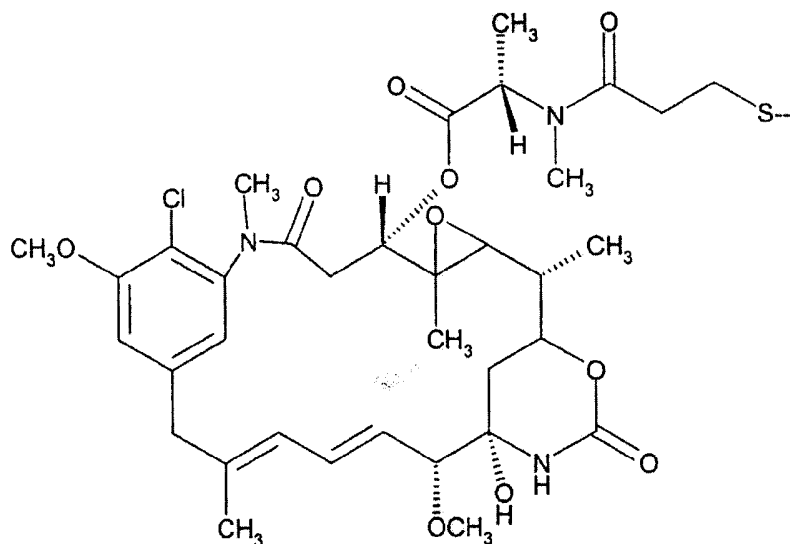
Формула (IV)



Където връзката с антитялото е чрез атом на сярата, показан във формула IV и чрез втори атом на сярата, присъстващ в молекулата на антитялото. За да се създаде такъв атом на сярата, необходим за свързването, молекула на антитяло може да се модифицира, чрез въвеждане на подходящ линкер, такъв като този

изложен по-горе. За предпочитане е маитансиноидът да е свързан с молекулата на антителято чрез $-S-CH_2CH_2-CO-$, $-S-CH_2CH_2CH_2CH_2-CO-$, или $-S-CH(CH_3)CH_2CH_2-CO-$ група. Атомът на сярата в такава линкерна група, образува дисулфиден мост с маитансиноидът, докато карбонилната функционална група може да се свърже с amino-функционалната група, присъстваща в страничната верига на аминокиселинния остатък от молекулата на антителято. По този начин, един или повече маитансиноидни остатъци могат да се свържат с молекулата на антителято. За предпочитане е с молекула на антителято да са свързани от 3 до 4 маитансиноидни остатъци.

Предимно предпочитан конюгат е този на CD44v6 специфичната молекула на антителято и маитансиноидът, където антителято включва леки вериги, притежаващи аминокиселинна секвенция SEQ ID NO:4 и тежки вериги, притежаващи секвенция SEQ ID NO:6, и където маитансиноидът има формула:



Формула (IV)

и е свързан с антитялото чрез дисулфидна връзка. За предпочитане е $-S-CH_2CH_2CH_2CH_2-CO$, или $-S-CH(CH_3)CH_2CH_2-CO-$ и броят на маитансиноидните остатъци на молекула антитяло да са от 3 до 4.

В следващ вариант, настоящето изобретение се отнася до метод за получаване на съединение с формула (I) включващ етапите на:

- (а) въвеждане на свободни или защитени тиолови групи в молекулата на антитялото, което е специфично за CD44;
- (б) взаимодействие на молекулата на антитялото от етап (а) със съединение, което е токсично за клетките, като споменатото съединение има една или повече дисулфидни или тиолови групи; и
- (в) събиране на получения конюгат.

За предпочитане е молекулата на антитялото да е специфична за CD44v6 и още по-добре, да е специфична за аминокиселинна секвенция SEQ ID NO: 3. Съединението, което е токсично за клетките е предимно маитансиноид, още по-добре с формула (II), най-добре с $R_1 = H$, $R_2 = Cl$, $R_3 = CH_3$ и $m = 2$. В друг предпочитан вариант антитялото включва леки вериги, притежаващи аминокиселинна секвенция SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:8 и тежки вериги, притежаващи аминокиселинна секвенция SEQ ID NO:6.

В предпочитани варианти на такъв метод се използват N-хидроксисукцинимиден естер на (2-пирил)-3-дитио пропаноева киселина (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)-пропионат), N-хидроксисукцинимиден естер на (2-пирил)-4-дитиопентаноевата

киселина (N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)-пентаноат, или N-хидроксисукцинимиден естер на (2-пирил)-5-дитиопентаноева киселина (N-сукцинимидил-5-(2-пиридилдитио)-пентаноат) за въвеждане на свободни или защитени тиолови групи в молекулата на анти тялото. Изобретението също така се отнася до съединения, получени чрез описания метод.

В следващ предпочитан вариант, настоящето изобретение се отнася до фармацевтичен състав, включващ съединение с формула (I), или описан конюгат, за предпочитане заедно с фармацевтично приемлив носител, ексципиент или разредител.

Подходящи фармацевтично приемливи носители, разредители и ексципиенти са добре известни и могат да се определят от тези които са специалисти от нивото на техниката, като препоръчани при клинични ситуации. Примери за подходящи носители, разтворители и/или ексципиенти включват: (1) фосфатен солеви буфер на Dulbecco с pH около 7.4, съдържащ около 1 mg/ml до 25 mg/ml човешки серумен албумин, (2) 0.9 % солеви разтвор (0.9 % w/v NaCl) и (3) 5 % (w/v) декстроза.

Още по-добре е молекулата на анти тялото, присъстваща във фармацевтичния състав да е моноклонално анти тяло VFF-18 или рекомбинантно анти тяло, което има CDR на анти тялото VFF-18, за предпочитане човешка рамка. В друг предпочитан вариант, анти тялото включва леките вериги, притежаващи аминокиселинна секвенция SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:8 и тежките вериги, притежаващи аминокиселинна секвенция SEQ ID NO: 6. За предпочитане, токсичното съединение е маитансиноид с формула (II).

Съединенията от изобретението може да се използват във всички видове приложения, където токсичното съединение трябва да се насочи към клетките, експресиращи CD 44, за предпочитане CD44v6 върху клетъчната повърхност.

Конюгатът може например да се прилага клинично *ex vivo* за да отстрани туморните клетки от костния мозък, преди автоложна трансплантация при лечение на рак. Лечението може да се провежда както следва. Костният мозък се събира от пациента или от друг индивид и след това се инкубира в среда, съдържаща серум, към която се добавя съединение с формула (I) съгласно изобретението, като концентрациите се движат от около 10 μM до 1 pM, за около 30 минути до около 48 часа, при около 37 градуса C. Точните условия за концентрация и време на инкубация (= доза), се определят лесно от специалистите от нивото на техниката. След инкубирането, клетките от костния мозък се промиват със среда, съдържаща серум и се връщат в пациента, чрез *i.v.* инфузия, съгласно известните методи. В случаите при които пациентът е подложен на друго лечение, такова като курс на аблативна химиотерапия или общо облъчване на тялото между времето от събиране на костния мозък и обратното връщане на третираните клетки, третираните костно-мозъчни клетки се съхраняват замразени в течен азот, като се използва стандартно медицинско оборудване.

В друг вариант, настоящето изобретение се отнася до метод за лечение на рак, който включва прилагане на фармацевтичен състав на пациент, както е описано преди това. По специално, този вариант от изобретението се отнася до метод за лечение на рак при пациент нуждаещ се от такова лечение, включващо прилагане на

пациента на терапевтично ефективно количество от съединение, както е описано по-горе, или фармацевтичен състав, както е описано по-горе. За предпочитане, ракът е с произход от карциномни сквамозни клетки (SCC) на главата и врата, SCC на езофагуса, SCC на белите дробове, SCC на кожата, от аденокарцином (AC) на гърдата, AC на белия дроб, SCC на шийката на матката, AC на панкреаса, AC на дебелото черво или AC на стомаха.

За клинично лечение на рак, съединението с формула (I) съгласно изобретението ще се прилага под формата на разтвори, които са анализирани за стерилност и за нива на ендотоксини. Примери за подходящи протоколи за прилагане на конюгата са следните. Конюгатите могат да се дават един път седмично от 1 до 6 седмици или като i.v. болус, или като продължителна инфузия за 5 дни. Болус дозите могат да се дават по 50 до 100 ml в нормален солеви разтвор към който са добавени от 5 до 10 ml човешки серумен албумин. Продължителни инфузии могат да се прилагат от 250 до 500 ml в нормален разтвор, към който се добавят от 25 до 50 ml човешки серумен албумин, през период от 24 часа. Дозите обикновено ще се прилагат от 10 mg до 400 mg/m² площ от телесната повърхност. Дозата, прилагана на пациент като еднократно приложение, трябва да бъде доста висока, за да е ефективна, но трябва да е под дозата лимитираща токсичността (DLT). Най-общо, достатъчно добра допустима доза под DLT ще се счита като максимално допустима доза (MTD). Експертът знае как да определи MTD (Lambert et al., 1998). При седмични приложения, може да се очаква MTD да е в областта от 100 до 200 mg/m². Съответно, интервалите между приложенията могат да

бъдат по-дълги, например от две до четири седмици, за предпочитане три седмици. В този случай може да се очаква MTD да е в областта от 200 до 300 mg/m². Съответно, приложението може да е като 5 дневни дози, последвано от прекъсване за няколко седмици, след което лечението може да бъде повторено. В този случай, може да се очаква, че прилагането на MTD може да бъде по-ниско от 100 mg/m². Например, могат да се прилагат конюгати като единична i.v. инфузия със скорост от 3 mg/min на всеки 21 дена. Прилагат се до 7 цикъла на лечение. Трябва да е ясно, че приложените дози могат да бъдат извън обхвата, даден по-горе, ако го изисква клиничното състояние. Например, ако е намерено че MTD е по-високо от посоченото, еднократното приложение може да бъде с по-висока доза от 400 mg/m² или седмичното може да бъде повече от 200 mg/m².

Обикновено, дозата, начинът на подаване, схемата на прилагане, повторението и времетраенето на лечението, ще зависят от природата на заболяването (тип, степен и етап на тумора и т.н.) и от пациента (физическо състояние, възраст, пол и т.н.) и ще се определят от медицинското лице, отговорно за лечението. Терапевтичното приложение съгласно изобретението, може да бъде с особено предимство освен за лечение на твърди тумори и като адювант при хирургична интервенция за лечение на минимално остатъчно заболяване.

В друг вариант изобретението се отнася до използването на съединение с формула (I), за приготвяне на фармацевтичен състав за лечението на рак. По-специално, молекулата на антитялото, присъстваща във фармацевтичния състав е моноклоналното VFF-18 или рекомбинантно антитяло, притежаващо CDR от антитялото

VFF-18, за предпочитане в човешка рамка. Най-предпочитано е молекула антитяло, включваща лека верига, притежаваща SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO:8 и тежка верига, притежаваща SEQ ID NO: 6. За предпочитане е, токсичното съединение да има формула (II). За предпочитане е ракът да е от сквамозни карциномни клетки (SCC) на главата и врата, SCC на езофагуса, SCC на белия дроб, SCC на кожата, аденокарцином (AC) на гърдата, AC на белите дробове, SCC на шийката на матката, AC на панкреаса, AC на дебелото черво, или AC на стомаха.

ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА

Aguiar DJ, Knudson W, and Knudson CB. Internalization of the hyaluronan receptor CD44 by chondrocytes. *Exp.Cell.Res.* 252: 292-302, 1999.

Aujame L, Geoffroy F, Sodoyer R. High affinity human antibodies by phage display. *Hum Antibodies* 8(4):155-68 (1997).

Bazil V and Horejsi V. Shedding of the CD44 adhesion molecule from leukocytes induced by anti-CD44 monoclonal antibody simulating the effect of a natural receptor ligand. *J Immunol* 149 (3):747-753, 1992.

Blattler et al, *Biochem.* 24: 1517-1524 (1985).

Breitling F, Duebel S: *Recombinant Antibodies*. John Wiley, New York 1999.

Carlsson et al, *Biochem. J.* 173: 723-737 (1978).

Catty D. *Antibodies*. Oxford IR Press 1988.

Chari RVJ, Martell BA, Gross JL, Cook SB, Shah SA, Blättler WA, McKenzie SJ, Goldmacher VS. Immunoconjugates containing novel maytansinoids: promising anticancer drugs. *Cancer Research* 52: 127-31, 1992.

Chari RVJ, Derr SM, Steeves RM, Widdison WC: Dose-response of the anti-tumor effect of HUN901-DM1 against human small cell lung cancer xenografts. *Proceedings of the American Association of Cancer Research* (2000) 41(April 1-5) Abs 4405.

Chothia and Lesk. *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987).

Frank et al. *Methods Enzymol.* 154: 221-249 (1984)

Gait, M.J., *Oligonucleotide Synthesis. A Practical Approach.* IRL Press, Oxford, UK (1984).

Goldmacher et al., *J Immunol* 135: 3648-3651, 1985.

Goldmacher et al., *J Cell Biol* 102: 1312-1319, 1986.

Güssow D, Seemann G. Humanization of monoclonal antibodies. *Methods Enzymol.* 203: 99-121 (1991)

Guo YJ, Liu G, Wang X, Jin D, Wu M, Ma J, and Sy MS. Potential use of soluble CD44 in serum as indicator of tumor burden and metastasis in patients with gastric or colon cancer. *Cancer Res* 54 (2): 422-426, 1994.

Harlow L D. *Antibodies.* Cold Spring Harbor Lab. 1988

Hayden et Mandecki. Gene synthesis by serial cloning of oligonucleotides. *DNA* 7(8): 571-7 (1988).

Heider, K.-H., Hofmann, M., Horst, E., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P., and Pals, S.T. A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J. Cell Biol.* 120: 227-233 (1993).

Heider KH, Mulder JWR, Ostermann E, Susani S, Patzelt E, Pals ST, Adolf GRA. Splice variants of the cell surface glycoprotein CD44 associated with metastatic tumor cells are expressed in normal tissues of humans and cynomolgus monkeys. *Eur. J. Cancer* 31A: 2385-2391, 1995.

Heider KH, Sproll M, Susani S, Patzelt E, Beaumier P, Ostermann O, Ahorn H, Adolf GRA. Characterization of a high affinity monoclonal antibody specific for CD44v6 as candidate for immunotherapy of squamous cell carcinomas. *Cancer Immunology Immunotherapy* 43: 245-253, 1996.

Hofmann, M., Rudy, W., Zöller, M., Tölg, C., Ponta, H., Herrlich P., and Günthert, U. CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res.* 51: 5292-5297 (1991).

Johnson S, Bird R E. Construction of single-chain derivatives of monoclonal antibodies and their production in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 203: 88-98 (1991).

Kabat E. A., Wu T. T., Perry H. M., Gottesman K. S. and Foeller C. Sequences of Proteins of Immunological Interest (5th Ed.). NIH Publication No. 91-3242. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Klotz et al, *Arch. Biochem. Biophys.* 96: 605 (1962).

Koopman, G., Heider, K.-H., Horts, E., Adolf, G. R., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P., Pals, S. T. Activated human lymphocytes and aggressive Non-Hodgkin's lymphomas express a homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44. *J. Exp. Med.* 177: 897-904 (1993).

Kreitman R J Hansen H J, Jones A L, FitzGerald D J P, Goldenberg D M, Pastan I. *Pseudomonas* exotoxin-based immunotoxins containing the antibody LL2 or LL2-Fab' induce regression of subcutaneous human B-cell lymphoma in mice. *Cancer Res.* 53: 819-825 (1993).

Lambert et al, *Biochem.* 22: 3913-3920 (1983).

Lambert JM, Derr SM, Cook S, Braman G, Widdison W, Chari RVJ. Pharmacokinetics, in vivo stability, and toxicity of the Tumor-activated prodrug, C242-DM1, a novel colorectal cancer agent. *Proceedings of the American Association of Cancer Research* (1998) 39: Abs 3550

Liu et al, *Biochem.* 18: 690 (1979), Blakey and Thorpe, *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals*, 1: 1-16 (1988).

Liu C, Tadayoni BM, Bourret LA, Mattocks KM, Derr SM, Widdison WC, Kedersha NL, Ariniello PD, Goldmacher VS, Lambert JM, Blättler WA, Chari RVJ. Eradication of large colon tumor xenografts by targeted delivery of maytansinoids. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8618-23, 1996.

Martin S, Jansen F, Bokelmann J, and Kolb H. Soluble CD44 splice variants in metastasizing human breast cancer. *Int J Cancer* 74 (4): 443-445, 1997.

Screaton, G.R., Bell, M.V., Jackson, D.G., Cornelis, F.B., Gerth, U., and Bell, J. I. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 12160-12164 (1992).

Shin S-U, Morrison S L. Production and properties of chimeric antibody molecules. *Methods Enzymol.* 178: 459-476 (1989).

Sliutz G, Tempfer C, Winkler S, Kohlberger P, Reinthaller A, and Kainz C. Immunohistochemical and serological evaluation of CD44 splice variants in human ovarian cancer. *Br.J.Cancer* 72: 1494-1497 (1995).

Stemmer et al. Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides, *Gene* 164(1): 49-53 (1995).

Stroomer JW, Roos JC, Sproll M, Quak JJ, Heider KH, Wilhelm BJ, Castelijns JA, Meyer R, Kwakkelstein MO, Snow GB, Adolf GR, van Dongen GA. Safety and biodistribution of 99mTechnetium-labeled anti-CD44v6 monoclonal antibody BIWA 1 in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res* 6 (8):3046-55, 2000

Tölg, C., Hofmann, M., Herrlich, P., and Ponta, H. Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acids. Res.* 21: 1225-1229 (1993).

Tolcher AW et al. SB-408075, a maytansinoid immunoconjugate directed to the C242 antigen: a phase I pharmacokinetic and biologic correlative study. Poster presented at 11th Symp. on new drugs in cancer therapy (Nov 7-10, 2000 in Amsterdam).

Urlaub and Chasin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77(7): 4216-20 (1980)

Urlaub et al., *Cell* 33: 405-412 (1983)

Verel I, Heider KH, Siegmund M, Ostermann E, Patzelt E, Sproll M, Snow GB, Adolf GR, van Dongen GMS. Tumor targeting properties of monoclonal antibodies with different affinity for target antigen CD44v6 in nude mice bearing head-and-neck cancer xenografts. *Int. J. Cancer* 99: 396-402 (2002).

Winter, G., Griffith, A. D., Hawkins, R. E., Hoogenboom, H. R. Making antibodies by phage display technology. *Ann. Rev. Immunol.* 12: 433-455 (1994).

Worrell et al, *Anti-Cancer Drug Design* 1: 179-184 (1986).

Ye et al. Gene synthesis and expression in *E. coli* for pump, a human matrix metalloproteinase. *Biochem Biophys Res Commun* 186(1):143-9 (1992).

ПРИМЕРИ ЗА ИЗПЪЛНЕНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

1. Материали и методи

1.1. In vitro анализ за клетъчна пролиферация

За определяне на клетъчната жизненост се използва Cell Titer 96 ® AQueous не-радиоактивен анализ за клетъчна пролиферация (Promega). Във всяка ямка на 96 ямкови плаки се залагат 5000 клетки в 90 µl среда без фенол ред. Клетките се оставят от 1 до 3 часа и след това се добавят серийни разреждания от имуноконюгата в 10 µl PBS. Клетки без имуноконюгат се използват като отрицателна контрола. Клетките се инкубират за 4 дена при 37° C в условия на влажност и 5 % CO₂ и след това се добавят 20 µl MTS/ PMS, съгласно изискванията на производителя. След допълнителна инкубация в продължение на 1 до 4 часа при 37 ° C се отчита абсорбцията при 490 nm, като се използва апарат за отчитане на ELISA плака. За всяка клетъчна линия са анализирани по три повторения. Изчислява се процента на фракцията от преживели клетки и IC50 стойността, като се използва GraphPad Prism ® (Version 3.0) софтуер.

1.2. Получаване на BIWI 1

Рекомбинантни антитела, наподобяващи човешките BIWA 4 и BIWA 8, които се свързват специфично с епитоп в SEQ ID NO: 1, се свързват с маитансиноид DM1, както е описано по-долу. Конюгатът на BIWA 4 с DM1 се означава като BIWI 1.

Получаване на стабилно трансфектирани клетъчни линии.

Гените, кодиращи леките и тежките вериги на BIWA 4, SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:7 се лигират в експресионен вектор рAD-CMV1 (WO92/01055; NCBI GenBank Номер за достъп A32111) или рAD-CMV19 (NCBI GenBank Номер за достъп A32110). Във второто анти тяло BIWA 8, леката верига се кодира от ген, който има SEQ ID NO:9, докато тежката верига е същата, като тази на BIWA 4. Стабилно трансфектираните клетъчни линии се получават чрез електропорация както следва. Използват се СНО DUX/57ss (dhfr негативни мутанти на клетки от яйчник на китайски хамстер, адаптирани като суспензионна култура в безсерумна среда). След трипсинизиране и инактивиране на трипсина с RPMI 10 (90 % RPMI 1640, 10 % топлинно инактивиран фетален телешки серум), клетките се промиват един път с RPMI-0 (RPMI 1640 без серум) и 1×10^7 клетки се ресуспендират в 0.8 ml RPMI-0. След добавянето на линеализирана ДНК (20 μ g на плазмид за котрансфекция на леката и тежка верига), клетките се електропорират, като се използва Hoefer Electroporator при следните условия: 1080 μ F, 320 V, 1000 msec, 1 пулс. Клетките се оставят за 5 минути и след това се разреждат до 12500 клетки/ml и 2500 клетки/ml в алфа-MEM 10d (90 % MEM алфа без рибонуклеозиди и без дезоксирибонуклеозиди (GIBCO BRL), 10 % топлинно инактивиран диализиран фетален телешки серум). Клетките се залагат в 96 ямкови микротитърни плаки (200 μ l/ямка, което отговаря съответно на 2500 и 500 клетки/ямка). Клоновете се

получават след 10 дена. Проследяват се само плаките с по 500 клетки/ямка (3-6 клона на ямка). След 14-15 дни, супернатантите от всяка ямка се анализират в к/γ ELISA. 53 клона се залагат в 12 ямкови плаки в алфа-MEM 10d. След 3-6 дена (в зависимост от конfluентността на клетките) супернатантите се анализират отново в к/γ ELISA (серийни разреждания) и се определя количеството, като се използва човешки IgG1 стандарт. Клетките се замразяват и се съхраняват в течен азот. IgG съдържанието на 53 клона е в обхвата от 12-417 ng/ml. Подбират се 10 клона с най-високи нива на експресия и се субклонират както следва: Клетките от всеки клон се залагат в 96 ямкови микротитърни плаки с плътност от 1 и 5 клетки/ямка по 100 μl/ямка в алфа-MEM 10d (1 плака за всеки клон и за всяка плътност). 8 дена по-късно супернатантите се разреждат 1:2 и 100 μl от това разреждане се анализират в к/γ ELISA и се определя количеството, като се използва BIWA 4 препарат като стандарт. 5 субклона от всеки клон се прехвърлят в 12 ямкови плаки. IgG съдържанието е в обхвата от 1.3 – 908 ng/ml. 14 клона с най-високи нива на експресия (384 – 908 ng/ml) се използват за амплификация с метотрексат, както следва: Първоначално клоновете се култивират в 25 cm² матраци, които съдържат алфа-MEM 10d с 20, 50 и 100 nM метотрексат. След размножаването на клоновете, супернатантите се анализират в к/γ ELISA. При последващите цикли на амплификация, концентрацията на метотрексата се повишава до 2000 nM. Първоначално, най-високото ниво на експресия е в обхвата от 10.5 – 14.8 μg/ml (клон А 31/100, 100 nM метотрексат). Последващата амплификация с концентрация на метотрексат 500 nM дава експресия от 19-20 μg/ml (А31/500).

Пречистване на антитялото.

Антитялото се пречиства от супернатантата на клетъчната култура, както следва. Супернатантата на тъканно клетъчната култура, съдържаща антитялото се нанася върху 5 ml протеин А сефарозна колона със скорост на потока 80-90 ml/час при 4°C. След промиване с 50 ml буфер за свързване (0.1 М натриев фосфат pH 7.5), Ig фракцията се елюира с буфер за елюиране (0.1 М глицин-HCl pH 2.7). Проследява се абсорбцията при 280 nm.

Модифициране на BIWA 4 с SPP за образуване на 4-SS-Py.

BIWA 4 се прилага в течна форма в концентрация от 5 mg/mL в PBS формулировка, съдържаща Tween 20. Преди свързването на DM1 I с Mab, Tween 20 се отстранява. Mab разтворът (40 mL) се разрежда 15 пъти с 25 mM MES буфер, pH 5.6, съдържащ 50 mM NaCl (MES буфер) и след това се нанася върху колона (12.5 mL) от Sepharose S, уравновесена с MES буфер (скорост на потока: 100 cm/час). Колоната се измива с 10 колонни обема от MES буфер. Антитялото се елюира с MES буфер, съдържащ 400 mM NaCl. Разтворът на антитялото се диализира срещу 50 mM калиево фосфатен буфер, pH 6.5, съдържащ 50 mM NaCl и 2 mM EDTA (Буфер А). BIWA 4 антитялото се модифицира като се използва SPP (N-хидрокси сукцинимид естер на (2-Пиридил)-5-дитиопентаноева киселина), за да се въведат дитиопиридил групи. MAб в Буфер А (185 mg, 8 mg/mL) се модифицира със 7-кратен моларен излишък от SPP в EtOH (5 %

v/v от MAb разтвора). Реакцията продължава 90 минути на стайна температура. След това реакционната смес се подлага на хроматография, чрез гел-филтрация, през Sephadex G 25F (2.6 x 31.5 cm колона, 167 mL) уравновесена с Буфер А. MAb-съдържащите фракции се събират и се определя степента на модификация чрез измерване на абсорбцията при 280 nm и промяната на абсорбцията при 343 nm, предизвикана от освобождаването на 2-меркаптопиридин при добавянето на DTT. Концентрацията на освободеният 2-меркаптопиридин се изчислява, като се използва $\epsilon_{343\text{nm}}$ от $8080 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, а концентрацията на MAb се изчислява, като се използва $\epsilon_{280\text{nm}}$ от $224,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, след като абсорбция при 280 nm се коригира поради участието на 2-меркаптопиридин. (2-меркаптопиридин $A_{280 \text{ nm}} = A_{343 \text{ nm}} \times 5100/8080$). Възстановяването на MAb е 99.6 % с 5.5 освободени 2-меркаптопиридинови групи, свързани за MAb молекула.

Конюгиране на BIWA 4 – SS – Py с DM1.

Гореописаното модифицирано MAb (184 mg) в Буфер А е конюгирано в концентрация 2.5 mg MAb/mL, като се използва 1.7-пъти моларен излишък от DM1 в сравнение с 2-меркаптопиридиновите групи, които се освобождават. DM1 се добавя в DMA (3 % v/v от разтвора на MAb) и реакционната смес се инкубира на стайна температура в продължение на 29 часа. Конюгатът след това се изолира, чрез хроматография с гел-филтрация върху колона от Sephacryl S 300 HR уравновесена в PBS (5 x 50 cm колона, 980 mL със скорост на потока 10 cm/час).

Конюгатът се елюира като единичен пик в позицията на мономерното MAb с малко количество от белтъка, елюиран по-рано. Фракциите се анализират за броят на DM1 молекулите, свързани към MAb молекула (Свързаните DM1 молекули се определят, чрез измерване на абсорбцията, както при 252 nm, така и при 280 nm). Въз основа на резултатите се събират фракциите представляващи 63-77 % от обема на колоната. Намерено е, че съотношението DM1/MAb в събрания разтвор е 3.1 и добивът на конюгирания BIWA 4 е 75 % въз основа на изходното MAb. Конюгатът BIWI 1 се оценява, чрез SDS-PAGE, която се провежда при не-редуциращи условия и е намерено, че е съставен предимно от мономерни видове (> 95 %) със минимално количество (< 5 %) от димерен конюгат.

Анализ на in vitro свързване на BIWI 1

Определя се свързването на BIWA 4 анитяло и BIWI 1, конюгирани с антиген-положителни FaDu клетки. Клетките ($1-2 \times 10^{-5}$) се инкубират в 96 ямкови плаки с вариращи концентрации от антитяло или се конюгират върху лед в продължение на 1 час. Пробата за анализ се промива от плаката и се добавя FITC-белязано анти-човешко IgG и инкубацията върху лед продължава на тъмно в продължение на 1 час. След промиване, клетките се фиксират с 1 % параформалдехид и се анализират в флуоресцентно активиран клетъчен сортер (FACS). BIWA 4 антитялото се свързва с ясно дефинирана K_d от 1×10^{-9} M, а BIWI 1 се свързва с ясно дефинирана K_d от 1.8×10^{-9} M. Следователно,

конюгирането с DM1 променя свързващият афинитет на антитялото само съвсем слабо, ако въобще има такова.

1.3. Ефективност на изследванията с голи мишки

In vivo анти-туморната ефективност на BIWI 1 се анализира в два модела на кръстосани присадки в голи мишки, като се прилагат антиген-положителни човешки тумори, които се различават по произход на тумора, степен и хомогенност на CD44v6 експресията: A431 (ATCC # CRL 1555; епидермоидна карцинома от вулва), FaDu (ATCC # HTB 43; сквамозна клетъчна карцинома от фарингс). Туморните клетъчни линии A431 и FaDu са получени от ATCC и са култивирани в RPMI 1640 среда, съдържаща 10 % фетален говежди серум и добавки. Мишките се разпределят случайно в следните групи за третиране (третиране/начален параметър на тумора, обем/тумор, обем обхват/брой на мишките):

A 431

Група 1	Контрола (PBS)/ $185 \pm 217 \text{ mm}^3/19 - 424 \text{ mm}^3/5$ мишки
Група 2	BIWA 4 (21 mg/kg/d)/ $133 \pm 115 \text{ mm}^3/42 - 302 \text{ mm}^3/ 5$ мишки
Група 3	BIWI 1 (2.1 mg/kg/d)/ $107 \pm 63 \text{ mm}^3/42 - 205 \text{ mm}^3/ 5$ мишки
Група 4	BIWI 1 (7 mg/kg/d)/ $132 \pm 73 \text{ mm}^3/42 - 205 \text{ mm}^3/ 5$ мишки

Група 5 BIWI 1 (21 mg/kg/d)/ $107 \pm 63 \text{ mm}^3/42 - 205 \text{ mm}^3/ 5$
мишки

FaDu

Група 1 Контрола (PBS)/ $142 \pm 82 \text{ mm}^3/34 - 268 \text{ mm}^3/ 8$ мишки

Група 2 BIWA 4 (21 mg/kg/d)/ $134 \pm 86 \text{ mm}^3/42 - 268 \text{ mm}^3/ 6$
мишки

Група 3 BIWI 1 (2.1 mg/kg/d)/ $149 \pm 96 \text{ mm}^3/50 - 268 \text{ mm}^3/ 6$
мишки

Група 4 BIWI 1 (7 mg/kg/d)/ $132 \pm 97 \text{ mm}^3/42 - 268 \text{ mm}^3/ 6$
мишки

Група 5 BIWI 1 (21 mg/kg/d)/ $129 \pm 74 \text{ mm}^3/50 - 231 \text{ mm}^3/ 6$
мишки

1×10^6 туморни клетки се трансплантират подкожно в десния хълбок на 6 седмични женски мишки NMRI-nu/nu мишки. Третирането започва, когато туморите достигнат среден размер от 107 до 185 mm^3 . Третирането се състои от i.v. инжекции с BIWI 1 давани в пет последователни дни, като се започва от ден 1. 3 различни дози от BIWI 1 се анализират паралелно: 2.1 mg/kg/d BIWI 1 съответстващ на $30 \text{ }\mu\text{g/kg/d DM1}$, 7 mg/kg/d BIWI 1 съответстващ на $100 \text{ }\mu\text{g/kg/d DM1}$, и 21 mg/kg/d BIWI 1 съответстващ на $300 \text{ }\mu\text{g/kg/d DM1}$. Контролните животни или не са третирани (PBS) или са третирани с не-конюгирано антитяло (контролно антитяло, 21 mg/kg/d). Туморният растеж се проследява чрез измерване на растежа на тумора. Туморният отговор се оценява като пълен отговор, когато туморът изчезне

напълно във всяко едно време след началото на лечението. Отговорът се оценява, като частичен отговор, когато туморният обем намалява след лечение, но след това отново започва растежа. Поносимостта на лечението се контролира, чрез измерване на теглото на мишката, по време на целия наблюдаван период.

2. Резултати и обсъждане

2.1. In vitro цитотоксичност на BIWI 1

In vitro цитотоксичността на BIWI 1 се оценява чрез използване на антиген-положителните клетъчни линии A431 и FaDu и антиген-отрицателната клетъчна линия A459. Клетките се излагат на различни концентрации от BIWI 1 в продължение на 4 дни, след това се оцветяват с MTS/ PMS и се анализират с ELISA апарат за отчитане на плаки. След това се изчисляват фракциите с жизнени клетки, като се използва GraphPad Prism[®] софтуерен пакет. Резултатите са показани на Фигура 1. BIWI 1 е ефективен при убиване на антиген-положителните A 431 клетки, с IC₅₀ от около 7.6×10^{-8} M и втора антиген-положителна клетъчна линия, FaDu с IC₅₀ от около 2.4×10^{-8} M. Антиген-отрицателната клетъчна линия A549 се повлиява от конюгата с IC₅₀ от около 1.3×10^{-7} M с фракция от преживели клетки от 50 % при най-високата анализирана концентрация на BIWI 1 (5×10^{-7} M). Тези резултати показват, че BIWI 1 е само малко по-цитотоксичен за антиген-позитивните клетки, в сравнение с антиген-негативните клетки in vitro. Показано е за сравнение, че друг DM1-антитяло конюгат е

поне 1000 пъти по-цитотоксичен за антиген-позитивни клетки, в сравнение с антиген-негативни клетки (Chari et al., 1992).

2.2. Ефективност при A431 кръстосано-присаден модел на голи мишки

Групи от 5 мишки се третират съответно с 2.1 mg/kg/d BIWI 1, 7 mg/kg/d BIWI 1, 21 mg/kg/d BIWI 1 и 21 mg/kg/d контролно антитяло. Средният размер на тумора в началото на третирането е съответно $185 \pm 217 \text{ mm}^3$ (PBS), $133 \pm 115 \text{ mm}^3$ (контролно антитяло), $107 \pm 63 \text{ mm}^3$ (21 mg/kg/d BIWI 1), $132 \pm 73 \text{ mm}^3$ (7 mg/kg/d BIWI 1), и $107 \pm 63 \text{ mm}^3$ (2.1 mg/kg/d BIWI 1). На Фигура 2 е показан средният обем на тумор за всяка група по време на периода на наблюдение. Туморите третирани с контролно антитяло показват сходен растеж по подобие на не-третираните тумори, времето за удвояване на туморния обем е приблизително 5 дена. При животни, третирани или със 7 mg/kg/d BIWI 1 или с 21 mg/kg/d BIWI 1 всички тумори отговарят напълно и изчезват около ден 17. До края на наблюдавания период (ден 134) не се наблюдава отново растеж на тумора. Туморите, третирани с 2.1 mg/kg/d отговарят напълно в 3/5 случая на не-туморния възстановяем растеж до 134 ден. Останалите 2 тумора, показват частичен отговор, но в крайна сметка започват да растат отново. Тези резултати показват, че BIWI 1 индуцира дозо-зависим анти-туморен отговор в A431 кръстосано-присаден модел на голи мишки със завършени продължителни отговори от 2.1 mg/kg/d BIWI 1 до 21 mg/kg/d BIWI 1. Не-конюгираното контролно антитяло не показва противотуморен ефект.

Виж фигура 2.

2.3. Ефективност при FaDu кръстосано-присаден модел на ГОЛИ МИШКИ

Групи от 6 мишки се третират съответно с 2.1 mg/kg/d BIWI 1, 7 mg/kg/d BIWI 1, 21 mg/kg/d BIWI 1 и 21 mg/kg/d контролно антитяло. Средният размер на тумора в началото на третирането е съответно 142 +/- 82 mm³ (PBS), 134 +/- 86 mm³ (контролно антитяло), 129 +/- 74 mm³ (21 mg/kg/d BIWI 1), 132 +/- 97 mm³ (7 mg/kg/d BIWI 1), и 149 +/- 96 mm³ (2.1 mg/kg/d BIWI 1). На Фигура 3 е показан средният обем на тумор за всяка група по време на периода на наблюдение. Туморите третирани с контролно антитяло и с 2.1 mg/kg/d BIWI 1 показват сходен растеж по подобие на не-третираните тумори, времето за удвояване на туморния обем е приблизително 5 дена. При животни, третирани със 21 mg/kg/d BIWI 1 всички тумори отговарят напълно и изчезват около ден 24. До края на наблюдавания период (ден 107) не се наблюдава отново растеж на тумора. 1/6 от туморите, третирани със 7 mg/kg/d BIWI 1 отговарят напълно, а 3/6 от туморите показват частични отговори. Останалите 2 тумора растат по подобен начин в сравнение с не-третираната контрола. Тези резултати показват, че BIWI 1 индуцира дозо-зависим анти-туморен отговор в FaDu кръстосано-присаден модел на голи мишки със завършени продължителни отговори от 7 mg/kg/d BIWI 1 до 21 mg/kg/d BIWI 1. Не-конюгираното контролно антитяло не показва против-туморен ефект.

Виж Фигура 3.

2.4. Поносимост в голи мишки

Поносимостта на лечението с BIWI 1 се определя, чрез контролиране на теглото на мишките по време на цялото времетраене на експеримента в двата модела. Наблюдаваната средна максимална загуба на тегло за група е 5 % във FaDu кръстосано-присаден модел мишки, третирани с 21 mg/kg/d BIWI 1 (Фигура 4). Загубата на тегло започва от третия ден на третирането и продължава до 10 ден, след което животните увеличават теглото и имат подобно поведение, подобно на контролните животни. Във всички други дозирани групи, загубата на тегло е сходна с контролната, която получава PBS. Средната загуба на тегло от 5 % или по-малко от всички третирани групи, показва добра поносимост на лечението с BIWI 1 при дадените дози в голи мишки. Тъй като BIWI 1 не реагира кръстосано с мишия BIWI 1 CD44v6, само антиген-независимите ефекти, такива като токсичност, причинена от свободен DM1 може да бъде контролирана в този експеримент.

3. In vivo анти-туморна ефективност в MDA – MB 453

3.1. Материали и методи

In vivo анти-туморната ефективност на BIWI 1 се анализира в кръстосано-присаден модел на голи мишки, като се прилага антиген-позитивен човешки тумор MDA-MB 453 (ATCC # HTB

131; карцином на гърдата). Клетките се получават от ATCC и се култивират в RPMI 1640 среда, съдържаща 10 % фетален телешки серум и добавки. 1×10^6 туморни клетки се трансплантират подкожно в десния хълбок на женски 6 месечни NMRI-nu/nu мишки. Туморите, служещи за експеримент на туморна терапия, се поддържат чрез пасажирание на туморни фрагменти. Лечението започва, когато туморите достигнат среден размер от 188 до 246 mm³. Лечението се състои от i.v. инжекции на BIWI 1, който се подава ежеседмично за 4 седмици. Паралелно са анализирани 3 различни дози от BIWI 1: 6.25 mg/kg BIWI 1 съответстваща на 100 µg/kg DM 1, 12.5 mg/kg BIWI 1 съответстваща на 200 µg/kg DM 1 и 25 mg/kg BIWI 1 съответстваща на 400 µg/kg DM 1. PBS третирани животни служат като контрола за туморния растеж. Туморният растеж се следи чрез измерване на размера на тумора. Туморният отговор се оценява като пълен отговор, когато туморът изчезне напълно в което и да е време след началото на лечението.

3.2. Резултати и обсъждане

Групи от 6 мишки се третират съответно с 6.25 mg/kg BIWI 1, 12.5 mg/kg BIWI 1 и 25 mg/kg BIWI 1 веднъж седмично за 4 седмици. Средният размер на тумора в началото на третирането е съответно 246 +/- 79 mm³ (PBS), 216 +/- 85 mm³ (6.25 mg/kg BIWI 1), 188 +/- 79 mm³ (12.5 mg/kg BIWI 1) и 207 +/- 96 mm³ (25 mg/kg BIWI 1). Средният обем на тумор за всяка група по време на периода на наблюдение е показан на Фигура 5. Времето за удвояване на началния обем на тумора на контролните тумори е приблизително 5 дена. При животни, третирани с 25 mg/kg BIWI 1,

всички тумори отговарят напълно и изчезват около ден 22 след началото на третирането. До края на наблюдавания период (ден 64) не се наблюдава отново растеж на тумора. Туморите, третирани с 12.5 mg/kg или с 6.25 mg/kg отговарят напълно в 5/6 от случаите във всяка дозирана група и 4 животни от всяка група остават без тумори до края на експеримента. Тези резултати показват, че BIWI 1 индуцира отлични туморни отговори в MDA-MB 453 кръстосано-присаден модел мишки, когато се подава един път седмично за период от 4 седмици с пълни и продължителни отговори от 6.25 mg/kg BIWI 1 до 25 mg/kg BIWI 1.

ФИГУРИ

Фигура 1: In vitro цитотоксичност на BIWI 1. Използват се антиген-позитивните клетъчни линии A431 и FaDu, както и антиген-негативната клетъчна линия A549.

Фигура 2: Ефективност на BIWI 1 третирането при кръстосано-присаден модел на голи мишки с A431 тумори. Показани са средните обеми на туморите за група със стандартните отклонения, посочени са третираните групи. Стрелката показва началото на лечението (ден 1).

Фигура 3: Ефективност на третирането с BIWI 1 при кръстосано-присаден модел на голи мишки с FaDu тумори. Показани са средните обеми на туморите за група, със стандартните отклонения, посочени са третираните групи. Стрелката показва началото на лечението (ден 1).

Фигура 4: Поносимост на третирането с BIWI 1. Показана е промяната в средното телесно тегло на всички групи в 2 изследвани модела. Ден : начало на лечението.

Фигура 5: Ефективност на третирането с BIWI 1 в кръстосано-присаден модел на голи мишки със MS-MDA-MB 453 тумори. Показани са средните обеми на туморите за група, със стандартните отклонения, посочени са третираните групи. Стрелките показват дните на третиране.

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Съединение с формула

$A(LB)_n$ където

A е молекула на антитяло която е специфична за CD44;

L е линкерна група;

B е съединение, което е токсично за клетки; и

n е десетично число с $n = 1$ до 10

2. Съединението, съгласно Претенция 1 където спомената линкерна група има химична връзка, способна да се разгражда вътре в клетката.

3. Съединението, съгласно Претенция 2, където споменатата химична връзка е дисулфидна връзка.

4. Съединението, съгласно Претенции от 1 до 3, където молекулата на антитялото е специфична за екзона v6 на човешки CD44.

5. Съединението, съгласно Претенции от 1 до 4, където молекулата на антитялото е специфична за епитоп от аминокиселинната последователност на SEQ ID NO: 3.

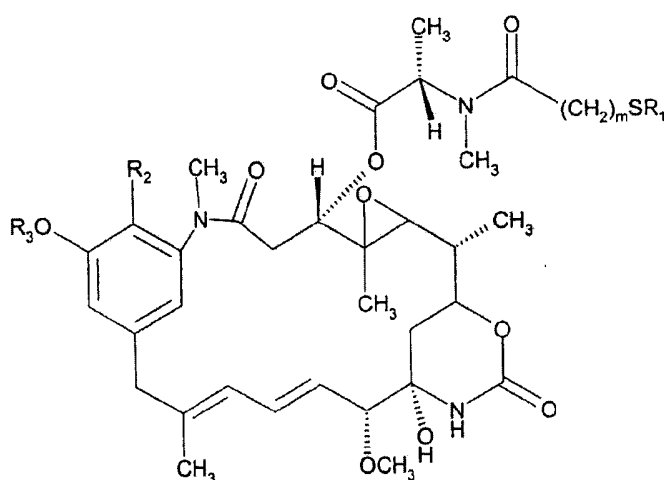
6. Съединението, съгласно Претенции от 1 до 5, където молекулата на антитялото е моноклоналното антитяло VFF-18 (DSM ACC2174) или рекомбинантно антитяло, което има комплиментарно детерминиращи области (CDRs) на VFF-18.

7. Съединението, съгласно Претенции от 1 до 6, където молекулата на антитялото включва леки вериги, които имат аминокиселинна последователност SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO:

8 и тежки вериги, които имат аминокиселинна последователност SEQ ID NO: 6.

8. Съединението, съгласно Претенции от 1 до 7, където токсичното съединение **В** е маитансиноид.

9. Съединението, съгласно Претенция 8, където маитансиноидът има формула



(Формула (II))

където

R_1 представлява H или SR_4 , където R_4 представлява метил, етил, линеен алкил, разклонен алкил, цикличен алкил, прост или заместен арил, или хетероциклик;

R_2 представлява Cl или H;

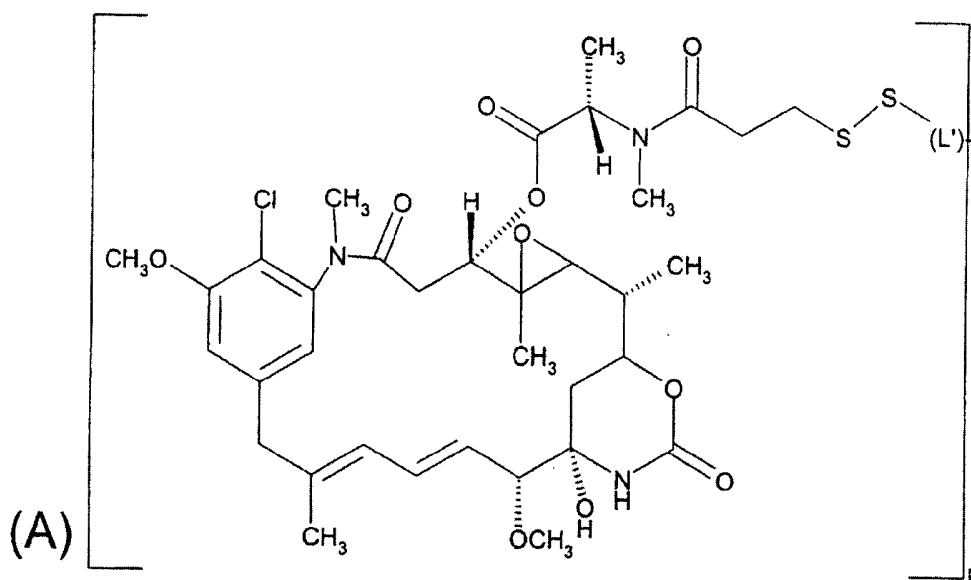
R_3 представлява H или CH_3 ; и

m представлява 1, 2, или 3.

17.11.03

10. Съединението, съгласно Претенция 9, където R_1 е H или CH_3 , R_2 е Cl, R_3 е CH_3 , и $m = 2$

11. Съединението, съгласно Претенции от 1 до 10 с формула



(Формула (III))

където

A е молекула на антитяло, която е специфична за CD44,

(L') е линкерна група по избор

p е десетично число с $p = 1$ до 10

12. Съединението, съгласно Претенции от 1 до 11 където p е от 3 до 4.

13. Конюгат на молекула на антитяло специфична за CD44v6 и мaitансиноид.

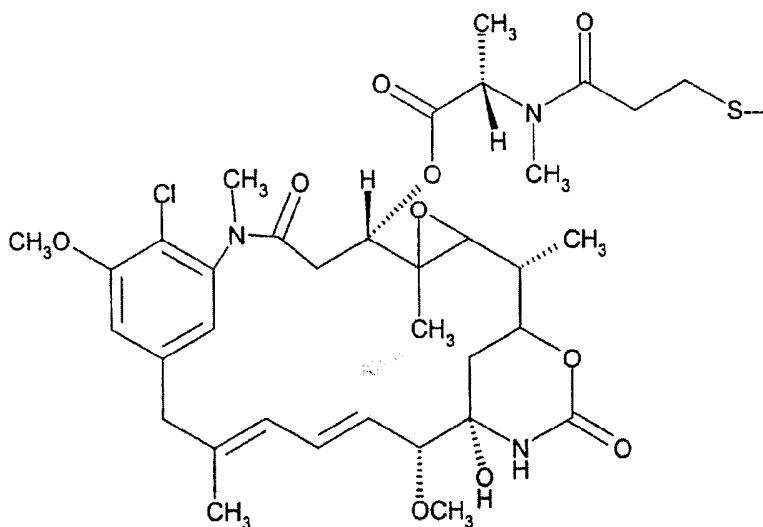
14. Конюгатът, съгласно Претенция 13, където молекулата на анти тяло е специфична за епитоп от аминокиселинна секвенция SEQ ID NO:3.

15. Конюгат, съгласно Претенция 14, където молекулата на анти тялото е моноклонално анти тяло VFF-18 (DSM ACC2174) или рекомбинантно анти тяло, имащо комплиментарно детерминиращи области (CDRs) от VFF-18.

16. Конюгатът, съгласно всяка една от Претенции от 13 до 15, където споменатата молекула на анти тялото включва леки вериги, притежаващи аминокиселинна секвенция SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO: 8 и тежки вериги, притежаващи аминокиселинна секвенция SEQ ID NO: 6.

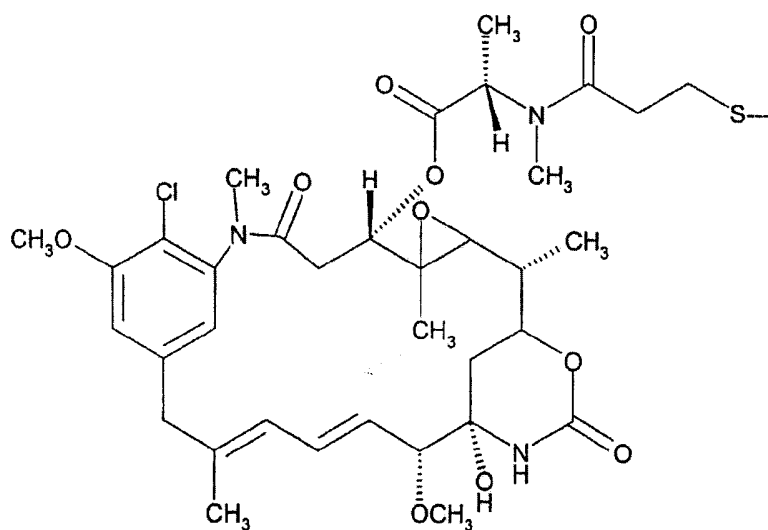
17. Конюгатът, съгласно всяка една от Претенции от 13 до 16, където мaitансиноидът е свързан с молекулата на анти тялото, чрез дисулфидна група.

18. Конюгатът съгласно всяка една от Претенции от 13 до 17, където мaitансиноидът има формула



Формула (IV)

19. Конюгатът на молекулата на антитяло специфично за CD44v6 и мaitансиноид, където антитялото включва леки вериги, които имат аминокиселинната последователност SEQ ID NO:4 и тежки вериги, които имат аминокиселинната последователност на секвенция SEQ ID NO: 6 и където мaitансиноидът има формулата



Формула (IV)

и е свързан с антитялото чрез дисулфидна връзка.

20. Конюгатът, съгласно всяка една от Претенции от 13 до 19, където един или повече мaitансиноидни остатъци са свързани с молекула на антитялото.

21. Конюгатът, съгласно Претенция 20, където от 3 до 4 мaitансиноидни остатъци са свързани за молекулата на антитялото.

22. Конюгатът, съгласно всяка една от Претенции от 13 до 21, където мaitансиноидът е свързан с молекулата на антитялото

чрез $-S-CH_2CH_2-CO-$, $-S-CH_2CH_2CH_2CH_2-CO-$, или $-S-CH(CH_3)CH_2CH_2-CO-$ група.

23. Метод за получаване на съединение **A(LB)_n**, съгласно Претенции от 1 до 12, или конюгат съгласно Претенции от 13 до 22, характеризиращ се с това че включва етапите:

(а) въвеждане на една или повече свободни или защитени тиолови групи в молекула на анти тяло, която е специфична за CD44;

(б) взаимодействие на молекулата на анти тялото от етап (а) със съединение, което е токсично за клетките, като споменатото съединение има една или повече дисулфидни или тиолови групи; и

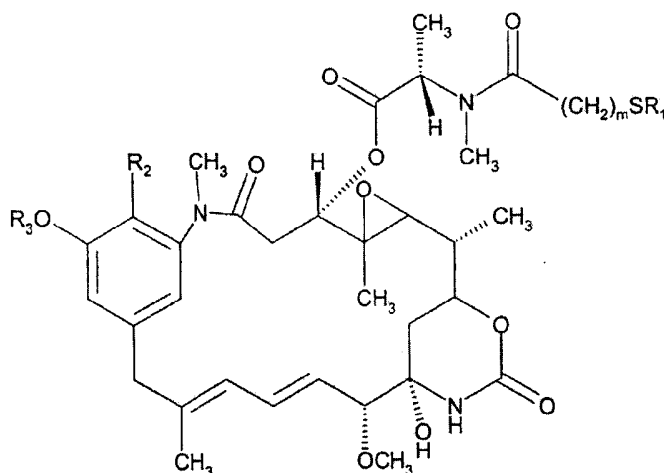
(в) събиране на полученият конюгат

24. Методът, съгласно Претенция 23, характеризиращ се с това че молекулата на анти тялото е специфична за CD44v6.

25. Методът, съгласно Претенция 24, характеризиращ се с това, че молекулата на анти тялото е специфична за епитоп от SEQ ID NO: 3.

26. Методът, съгласно всяка една от Претенции от 23 до 25, характеризиращ се с това, че токсичното съединение е маитансиноид.

27. Методът, съгласно Претенция 26, характеризиращ се с това, че маитансиноидът има формула



Формула II

където

R_1 представлява H или SR_4 , където R_4 представлява метил, етил, линеен алкил, разклонен алкил, цикличен алкил, прост или заместен арил или хетероциклик;

R_2 представлява Cl или H;

R_3 представлява H или CH_3 ; и

m представлява 1, 2 или 3.

28. Методът, съгласно Претенция 27, характеризиращ се с това, че R_1 е H или CH_3 , R_2 е Cl, R_3 е CH_3 и $m = 2$.

29. Методът, съгласно всяка една от Претенции от 23 до 28, характеризиращ се с това че N-хидроксисукцинимид естер на (2-пиридил)-3-дитиопропаноевата киселина, N-хидроксисукцинимид естер на (2-пиридил)-4-дитиопентаноевата киселина, или N-хидроксисукцинимид естер на (2-пиридил)-5-дитиопентаноевата киселина се използва за да се въведат свободни или защитени тиолови групи в молекулата на антиялото.

30. Съединение, получено чрез метод, характеризиращ се съгласно всяка една от Претенции от 23 до 29.

31. Фармацевтичен състав, характеризиращ се с това, че включва съединение с формула $A(LB)_n$, съгласно всяка една от Претенции от 1 до 12, или 30, или конюгат, съгласно Претенции от 13 до 22, и фармацевтично приемлив носител, разредител или ексципиент.

32. Използване на съединение $A(LB)_n$, съгласно Претенции от 1 до 12, или 30, или конюгат съгласно Претенции от 13 до 22, за приготвяне на фармацевтичен състав за лечение на рак.

33. Използване, съгласно Претенция 32, където ракът е сквамозна клетъчна карцинома на главата и врата, сквамозна клетъчна карцинома на езофагуса, сквамозна клетъчна карцинома на белия дроб, сквамозна клетъчна карцинома на кожата, сквамозна клетъчна карцинома на шийката на матката, аденокарцинома на гърдите, аденокарцинома на белия дроб, аденокарцинома на панкреаса, аденокарцинома на дебелото черво или аденокарцинома на стомаха.

34. Използване на съединение $A(LB)_n$, съгласно Претенции от 1 до 12 или 30, или на конюгат, съгласно Претенции от 13 до 22, или фармацевтичен състав, съгласно Претенция 31, за лечение на рак.

35. Използването, съгласно Претенция 34, където ракът е сквамозна клетъчна карцинома на главата и врата, сквамозна клетъчна карцинома на езофагуса, сквамозна клетъчна карцинома на белия дроб, сквамозна клетъчна карцинома на кожата, сквамозна клетъчна карцинома на шийката на матката, аденокарцинома на гърдите, аденокарцинома на белия дроб,

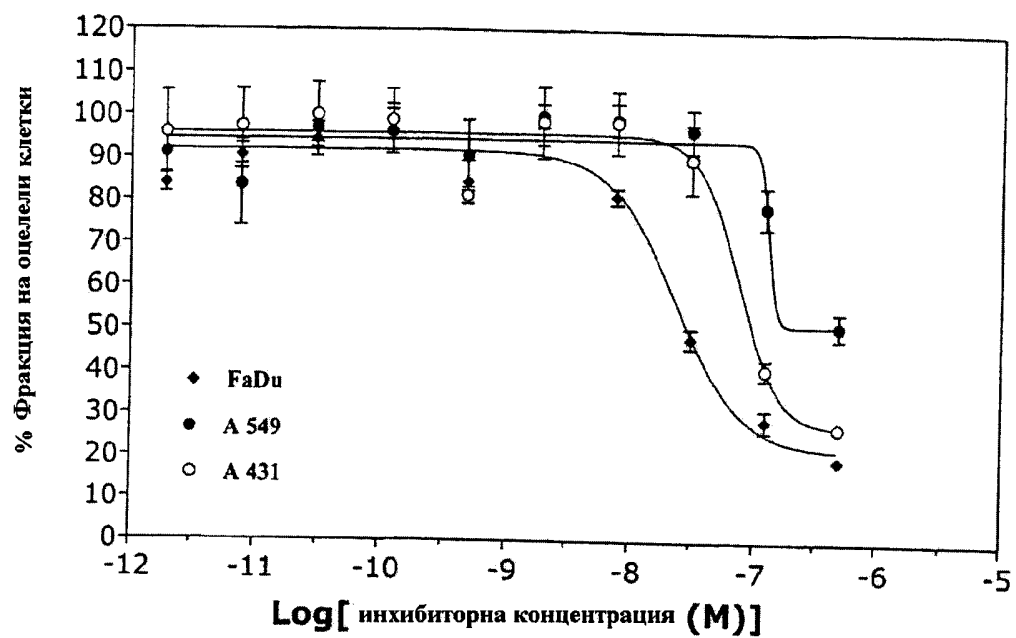
аденокарцинома на панкреаса, аденокарцинома на дебелото черво или аденокарцинома на стомаха.

36. Използване, съгласно всяка една от Претенции от 1 до 12, или 30 или на конюгат съгласно Претенции от 13 до 22 или фармацевтичен състав, съгласно Претенция 31, за лечение на рак в пациент, който се нуждае от него, включващо прилагане на пациента на терапевтично ефективно количество от съединението **A(LB)_n**.

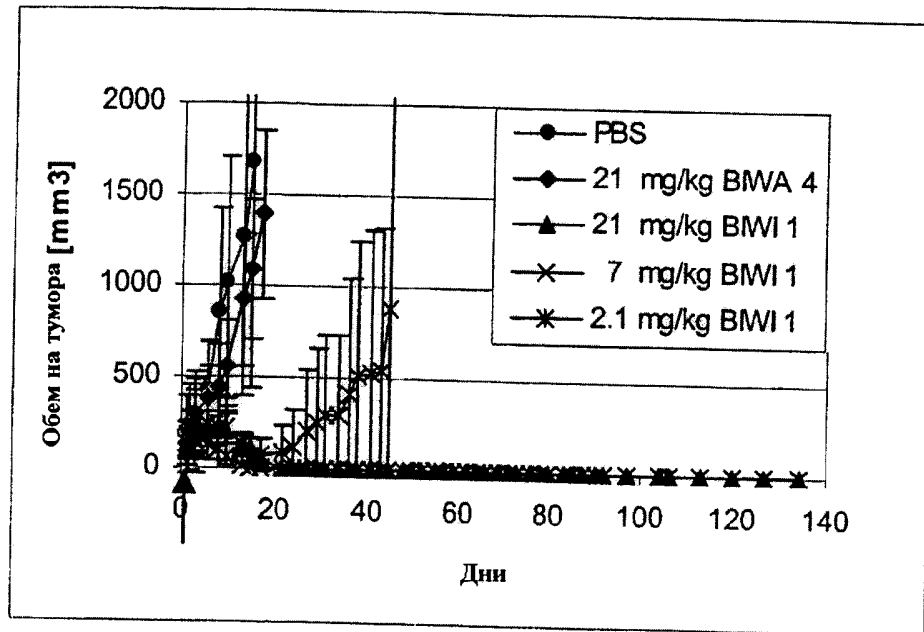
37. Използването, съгласно Претенция 36, където ракът е сквамозна клетъчна карцинома на главата и врата, сквамозна клетъчна карцинома на езофагуса, сквамозна клетъчна карцинома на белия дроб, сквамозна клетъчна карцинома на кожата, сквамозна клетъчна карцинома на шийката на матката, аденокарцинома на гърдите, аденокарцинома на белия дроб, аденокарцинома на панкреаса, аденокарцинома на дебелото черво или аденокарцинома на стомаха.

17.11.03

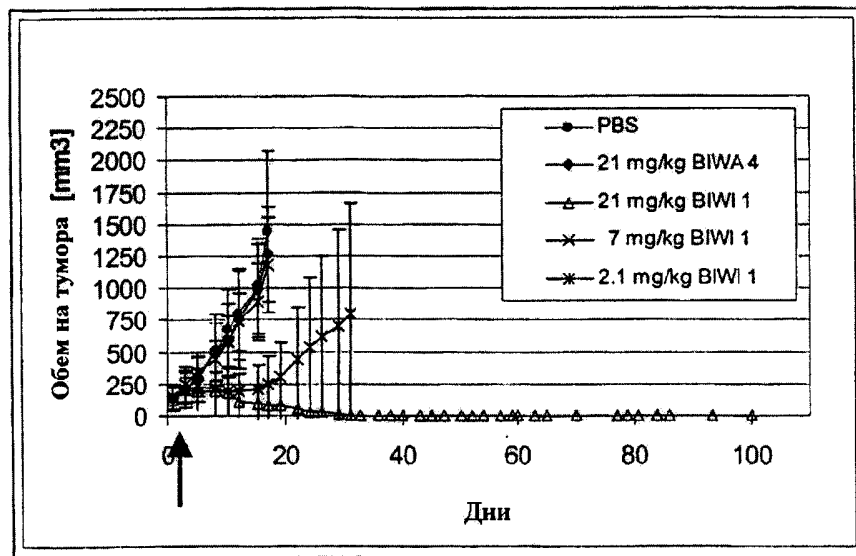
BIWI 1



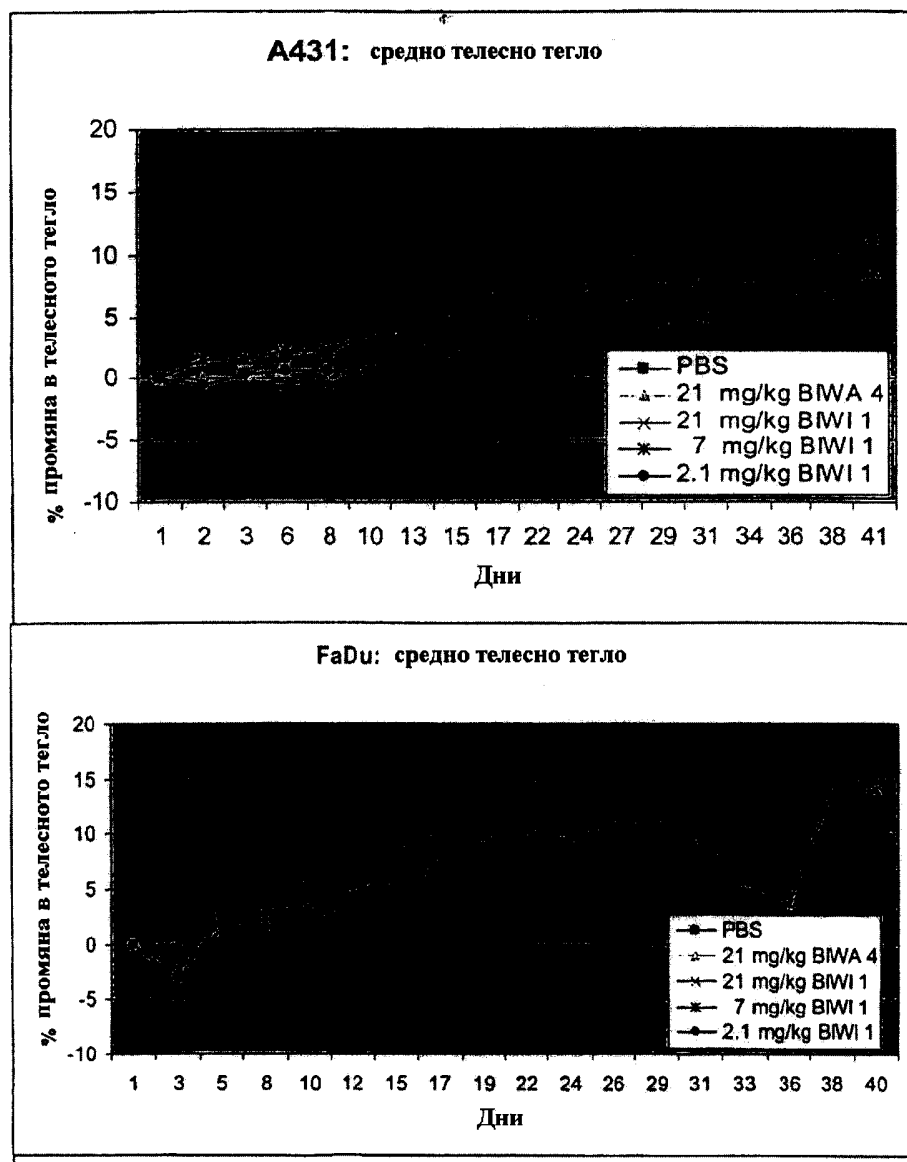
Фигура 1



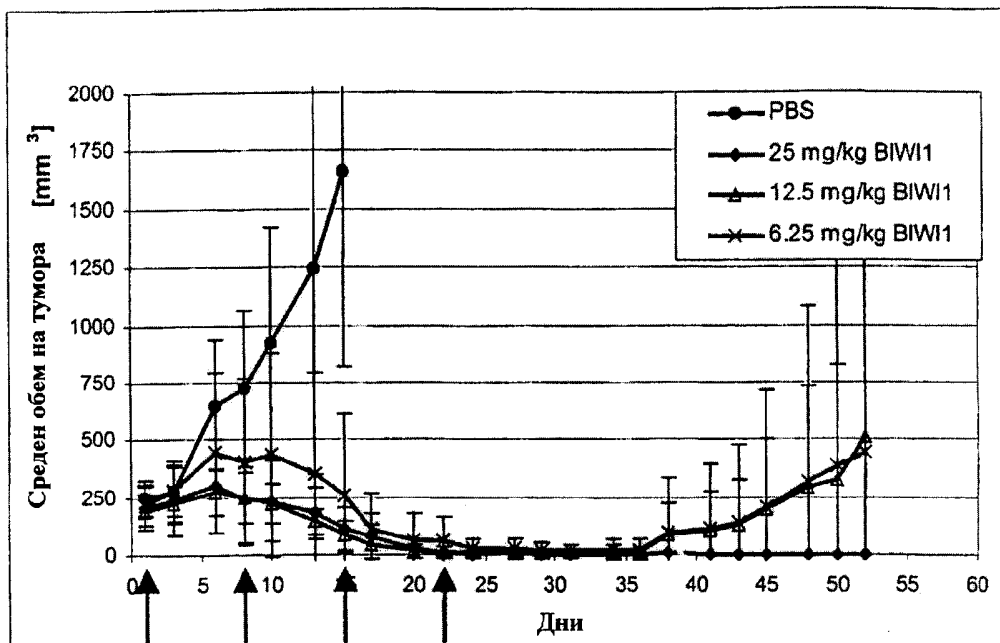
Фигура 2



Фигура 3



Фигура 4



Фигура 5

СПИСЪК НА СЕКВЕНЦИИТЕ

<110> Boehringer Ingelheim

5 <120> ИМУНОКОНЮГАТИ ОТ ЦИТОТОКСИЧНИ АНТИТЕЛА ЗА CD 44

<130>

<140>

10 <141>

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<223> Описание на изкуствена секвенция : Човешки CD44 Екзон v6 SEQ ID
NO: 1

<400> 1

25 Gln Ala Thr Pro Ser Ser Thr Thr Glu Glu Thr Ala Thr Gln Lys Glu
1 5 10 15

Gln Trp Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg Gln Thr Pro Arg
20 25 30

30

Glu Asp Ser His Ser Thr Thr Gly Thr Ala
35 40

35 <210> 2

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40 <223> Описание на изкуствена секвенция : SEQ ID NO: 2

<400> 2

Gln Trp Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg Gln Thr
1 5 10

45

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

50 <213> Homo sapiens

<223> Описание на изкуствена секвенция : SEQ ID NO: 3

<400> 3

55 Trp Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg
1 5 10

17.11.03

<210> 4

<211> 213

<212> PRT

<213> Изкуствена секвенция

<220>

<223> Описание на изкуствена секвенция: Лека верига на BIWA 4

мишо антитяло, наподобяващо SEQ ID NO: 4

10 <400> 4

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Asn Tyr Ile
 15 20 25 30

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

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 5

<211> 702

<212> ДНК

<213> Изкуствена секвенция

17.11.03

<220>

<223> Описание на изкуствена секвенция: Лека верига на BIWA 4

мишо антиляло, наподобяващо SEQ ID NO: 5

5 <400> 5

```

atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctgctct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaattgttc tcaccagtc tccagcaacc ctgtctctgt ctccagggga gagggccacc 120
ctgtcctgca gtgccagctc aagtataaat tacatatact ggtaccagca gaagccagga 180
caggctccta gactcttgat ttatctcaca tccaacctgg cttctggagt ccctgcgcgc 240
10 ttcagtggca gtgggtctgg aaccgacttc actctcacia tcagcagcct ggagcctgaa 300
gattttgccc tttattactg cctgcagtggt agtagtaacc cgctcacatt cgggtggtggg 360
accaaggtgg agattaaacg tacgggtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 420
gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 480
agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 540
15 agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 600
agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 660
agctcgcccc tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ga 702

```

20 <210> 6

<211> 444

<212> PRT

<213> Изкуствена секвенция

25 <220>

<223> Описание на изкуствена секвенция: Тежка верига на BIWA 4

мишо антиляло, наподобяващо SEQ ID NO: 6

<400> 6

```

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

```

17.11.03

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 165 170 175
 5 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 180 185 190
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 195 200 205
 10 Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 210 215 220
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 15 225 230 235 240
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 245 250 255
 20 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 260 265 270
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 275 280 285
 25 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 290 295 300
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 30 305 310 315 320
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 325 330 335
 35 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 340 345 350
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 355 360 365
 40 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 45 385 390 395 400
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 405 410 415
 50 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 420 425 430
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440
 55

<210> 7

<211> 1392

17.11.03

<212> ДНК

<213> Изкуствена секвенция

<220>

5 <223> Описание на изкуствена секвенция: Тежка верига на BIWA 4

мишо антитяло, наподобяващо SEQ ID NO: 7

<400> 7

```

10 atggagtttg ggctgagctg gcttttttctt gtggctatatt taaaaggtgt ccagtgtgaa 60
   gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgaagcctg gagggtcctt aagactctcc 120
   tgtgcagcct ctggattcac ttccagtagc tatgacatgt cttgggttcg ccaggctccg 180
   gggaaggggc tggagtgggt ctcaaccatt agtagtggtg gtagttacac ctactatcta 240
   gacagtataa agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaactc cctgtacctg 300
   caaatgaaca gtctgagggc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcaag acagggggtg 360
15 gactactggg gtcgaggaac cttagtcacc gtctcctcag ctagcaccaa gggcccatcg 420
   gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc 480
   ctgggtcaagg actacttccc cgaaccgggtg acgggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc 540
   agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc 600
   gtgggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac 660
20 aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca aatcttgtga caaaactcac 720
   acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtcct cctcttcccc 780
   ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg 840
   gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 900
   cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 960
25 gtcttcaccg tctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagt caaggtctcc 1020
   aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1080
   gaaccacagg tgtacacct gcccccattc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1140
   ctgacctgcc tgggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200
   gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1260
30 ttctcttaca gcaagctcac cgtggacaag agcagggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320
   tgctccgtga tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1380
   ccgggtaaat ga 1392

```

35

<210> 8

<211> 213

<212> PRT

<213> Изкуствена секвенция

40

<220>

<223> Описание на изкуствена секвенция: Лека верига на BIWA 8

мишо антитяло, наподобяващо SEQ ID NO: 8

45 <400> 8

```

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

```

50

```

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Asn Tyr Ile
                20                      25                      30

```

```

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

```

55

```

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
  50                      55                      60

```

```

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

```

6/6 17.1103

65 70 75 80

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

5 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

10 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

15 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

20 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

25 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

30

<210> 9
<211> 702
<212> ДНК
<213> Изкуствена секвенция

35

<220>
<223> Описание на изкуствена секвенция: Лека верига на BIWA 8
мишо антигено, наподобяващо SEQ ID NO: 9

40

<400> 9

atggaagccc	cagctcagct	tctcttctct	ctgctgctct	ggctcccaga	taccaccgga	60
gaaattgttc	tcacccagtc	tcacgcaacc	ctgtctctgt	ctccagggga	gagggccacc	120
ctgtcctgca	gtgccagctc	aagtataaat	tacatatact	ggctccagca	gaagccagga	180
caggctccta	gaatcttgat	ttatctcaca	tccaacctgg	cttctggagt	ccctgcgcgc	240
ttcagtggca	gtgggtctgg	aaccgacttc	actctcacia	tcagcagcct	ggagcctgaa	300
gattttgccg	tttattactg	cctgcagtgg	agtagtaacc	cgctcacatt	cggtgggtggg	360
accaaggtgg	agattaaacg	tacgggtggc	gcaccatctg	tcttcatctt	cccgccatct	420
gatgagcagt	tgaaatctgg	aactgcctct	gttggtgtgc	tgtgaataa	cttctatccc	480
agagaggcca	aagtacagtg	gaaggtggat	aacgcccctc	aatcgggtaa	ctcccaggag	540
agtgtcacag	agcaggacag	caaggacagc	acctacagcc	tcagcagcac	cctgacgctg	600
agcaaagcag	actacgagaa	acacaaagtc	tacgcctgcg	aagtcaccca	tcagggcctg	660
agctcgcccc	tcacaaagag	cttcaacagg	ggagagtgtt	ga		702