



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 47/6849 (2021.01); A61K 31/537 (2021.01); C07K 16/2803 (2021.01); A61P 35/00 (2021.01); A61P 35/02 (2021.01)

(21)(22) Заявка: 2018120696, 08.11.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
08.11.2016

Дата регистрации:
16.03.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
09.11.2015 US 62/252,985

(43) Дата публикации заявки: 11.12.2019 Бюл. № 35

(45) Опубликовано: 16.03.2021 Бюл. № 8

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 09.06.2018

(86) Заявка РСТ:
US 2016/060996 (08.11.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2017/083306 (18.05.2017)

Адрес для переписки:
109012, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
"Союзпатент"

(72) Автор(ы):

РАБУКА Дэвид (US),
МАКФАРЛАНД Джесси М. (US),
ДРЕЙК Пенелоуп М. (US),
БАРФИЛД Робин М. (US)

(73) Патентообладатель(и):

Р.П. ШЕРЕР ТЕКНОЛОДЖИЗ, ЛЛК (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2014/078566 A1, 22.05.2014. US
20150157736 A1, 11.06.2015. RU 2013137868 A,
20.02.2015.

(54) КОНЪЮГАТЫ АНТИ-CD22 АНТИТЕЛО-МАЙТАНСИН И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к конъюгату анти-
CD22 антитело-майтансин и фармацевтическим
композициям, включающим такой конъюгат,

которые предназначены для лечения карциномы,
саркомы, лейкемии или лимфомы. 3 н. и 23 з.п. ф-
лы, 26 ил., 2 табл., 5 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 47/68 (2017.01)*C07K 16/28* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)*A61P 35/02* (2006.01)*A61K 31/537* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 47/6849 (2021.01); *A61K 31/537* (2021.01); *C07K 16/2803* (2021.01); *A61P 35/00* (2021.01); *A61P 35/02* (2021.01)

(21)(22) Application: **2018120696, 08.11.2016**

(24) Effective date for property rights:
08.11.2016

Registration date:
16.03.2021

Priority:

(30) Convention priority:
09.11.2015 US 62/252,985

(43) Application published: **11.12.2019 Bull. № 35**(45) Date of publication: **16.03.2021 Bull. № 8**(85) Commencement of national phase: **09.06.2018**

(86) PCT application:
US 2016/060996 (08.11.2016)

(87) PCT publication:
WO 2017/083306 (18.05.2017)

Mail address:
109012, Moskva, ul. Ilinka, 5/2, OOO "Soyuzpatent"

(72) Inventor(s):

**RABUKA, David (US),
MCFARLAND, Jesse M. (US),
DRAKE, Penelope M. (US),
BARFIELD, Robyn M. (US)**

(73) Proprietor(s):

R.P. SCHERER TECHNOLOGIES, LLC (US)

(54) **ANTI-CD22 ANTIBODY-MAITANSIN CONJUGATES AND METHODS OF THEIR APPLICATION**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: the invention relates to an anti-CD22 antibody-maitansine conjugate and pharmaceutical compositions comprising such a conjugate for

carcinoma, sarcoma, leukemia or lymphoma treatment.

EFFECT: a new combination for carcinoma, sarcoma, leukemia or lymphoma treatment.

26 cl, 26 dwg, 2 tbl, 5 ex

Область техники, к которой относится изобретение

Область терапевтических конъюгатов белок-малая молекула значительно продвинулась вперед, предоставив ряд клинически полезных лекарственных препаратов с обещанием предоставить больше в ближайшие годы. Терапевтические средства, представляющие собой белок-конъюгат, могут обеспечить несколько преимуществ, благодаря, например, специфичности, множественности функций и относительно низкой нецелевой активности, что приводит к уменьшению побочных эффектов. Химическая модификация белков может расширить эти преимущества, сделав их более мощными, стабильными или мультимодальными.

Уровень техники

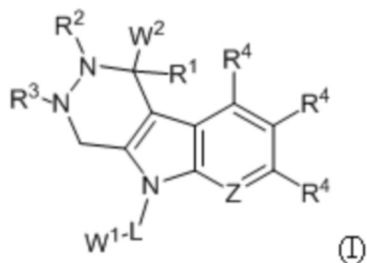
Для создания и управления посттрансляционными модификациями на белках обычно применяют ряд стандартных химических преобразований. Существует ряд способов, с помощью которых можно выборочно модифицировать боковые цепи определенных аминокислот. Например, боковые цепи карбоновой кислоты (аспартата и глутамата) можно сделать мишенями путем первоначальной активации водорастворимым карбодиимидным реагентом и последующей реакцией с амином. Аналогично, лизин можно сделать мишенью путем применения активированных сложных эфиров или изотиоцианатов, а цистеиновые тиолы можно сделать мишенями путем обработки малеимидами и α -галогенкарбонилем.

Получение белка в биологически активной, гомогенной форме представляет собой одно из существенных препятствий для создания терапевтического средства или реагента с химически измененным белком. Конъюгацию лекарственного средства или детектируемой метки с полипептидом может быть трудно контролировать, что приводит к гетерогенной смеси конъюгатов, которые различаются по количеству присоединенных молекул лекарственного средства и положением химического сопряжения. В некоторых случаях может быть желательно контролировать участок конъюгации и/или лекарственное средство или детектируемую метку, конъюгированную с полипептидом, применяя инструменты, принятые в органической химии для синтеза, направленного на образование точных и селективных химических связей на полипептиде.

Раскрытие изобретения

Настоящее раскрытие обеспечивает структуры конъюгата анти-CD22 антитело-майтансин. Раскрытие также охватывает способы получения таких конъюгатов, а также способы их применения.

Аспекты настоящего раскрытия включают конъюгат, который включает, по меньшей мере, один модифицированный аминокислотный остаток формулы (I):



в которой

Z представляет собой CR^4 или N;

R^1 выбирают из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и

замещенного гетероциклила;

R^2 и R^3 каждый независимо выбирают из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкоксильной группы, замещенной алкоксильной группы, аминогруппы, замещенной аминогруппы, карбоксила, карбоксилевого эфира, ацила, ацилоксильной группы, ацил-аминогруппы, аминокислоты, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиаалкоксильной группы, замещенного тиаалкоксильной группы, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила, или R^2 и R^3 необязательно циклически связаны с образованием 5 или 6-членного гетероциклила;

каждый R^4 независимо выбирают из водорода, галоген, алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкоксильной группы, замещенной алкоксильной группы, аминогруппы, замещенной аминогруппы, карбоксила, карбоксилевого эфира, ацила, ацилоксильной группы, ацил-аминогруппы, аминокислоты, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиаалкоксильной группы, замещенного тиаалкоксильной группы, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила;

L представляет собой линкер, включающий $-(T^1-V^1)_a-(T^2-V^2)_b-(T^3-V^3)_c-(T^4-V^4)_d-$, где a, b, c и d каждый независимо равен 0 или 1, где сумма a, b, c и d равна от 1 до 4;

T^1 , T^2 , T^3 и T^4 каждый независимо выбирают из (C_1-C_{12}) алкила, замещенного (C_1-C_{12}) алкила, $(EDA)_w$, $(PEG)_n$, $(AA)_p$, $-(CR^{13}OH)_h-$, пиперидин-4-амино-(4AP), ацетальной группы, гидразина, дисульфида и сложного эфира, где EDA представляет собой этилендиаминный фрагмент, PEG представляет собой полиэтиленгликоль или модифицированный полиэтиленгликоль и AA представляет собой аминокислотный остаток, в котором w представляет собой целое число от 1 до 20, n представляет собой целое число от 1 до 30, p представляет собой целое число от 1 до 20 и h представляет собой целое число от 1 до 12;

V^1 , V^2 , V^3 и V^4 каждый независимо выбирают из группа, состоящей из ковалентной связи, $-CO-$, $-NR^{15}-$, $-NR^{15}(CH_2)_q-$, $-NR^{15}(C_6H_4)-$, $-CONR^{15}-$, $-NR^{15}CO-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-O-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-SO_2-$, $-SO_2NR^{15}-$, $-NR^{15}SO_2-$ и $-P(O)OH-$, в которой q представляет собой целое число от 1 до 6;

каждый R^{13} независимо выбирают из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила;

каждый R^{15} независимо выбирают из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, карбоксила, карбоксилевого эфира, ацила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила;

W^1 представляет собой майтансиноид; и

W^2 представляет собой анти-CD22 антитело.

В некоторых воплощениях,

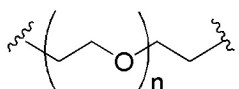
T^1 выбирают из (C_1-C_{12}) алкила и замещенного (C_1-C_{12}) алкила;

T^2 , T^3 и T^4 каждый независимо выбирают из $(EDA)_w$, $(PEG)_n$, (C_1-C_{12}) алкила,

замещенного (C_1-C_{12}) алкила, $(AA)_p$, $-(CR^{13}OH)_h$, пиперидин-4-амино-(4AP), ацетальной группы, гидразина и сложного эфира; и

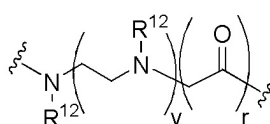
V^1 , V^2 , V^3 и V^4 каждый независимо выбирают из группа, состоящей из ковалентной связи, $-CO-$, $-NR^{15}-$, $-NR^{15}(CH_2)_q-$, $-NR^{15}(C_6H_4)-$, $-CONR^{15}-$, $-NR^{15}CO-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-O-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-SO_2-$, $-SO_2NR^{15}-$, $-NR^{15}SO_2-$ и $-P(O)OH-$;

в которой:

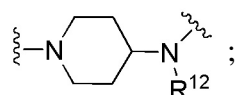
$(PEG)_n$ представляет собой , где n представляет собой целое число

от 1 до 30;

EDA представляет собой этилендиаминовый фрагмент, имеющий следующую

структуру: , где y представляет собой целое число от 1 до 6 и r

равно 0 или 1;

пиперидин-4-амино представляет собой ;

каждый R^{12} и R^{15} независимо выбирают из водорода, алкила, замещенного алкила, полиэтиленгликольного фрагмента, арила и замещенного арила, где любые две смежные R^{12} группы могут быть циклически связаны с образованием пиперазинильного кольца; и

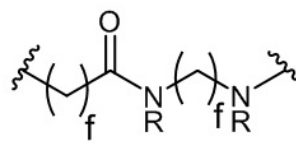
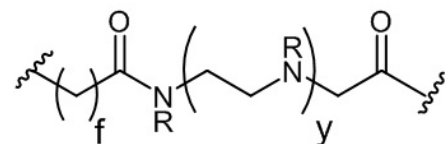
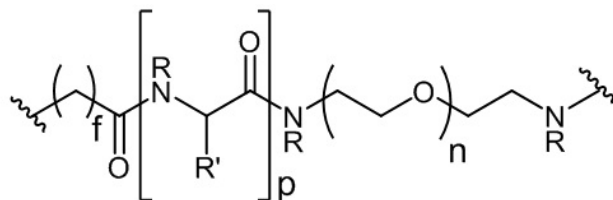
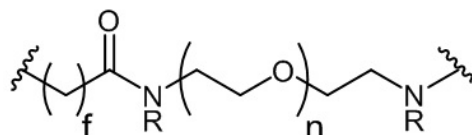
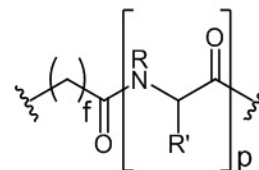
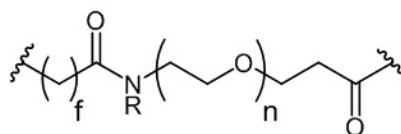
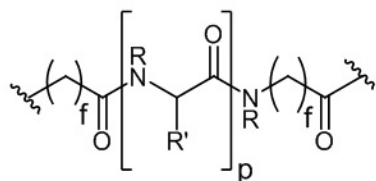
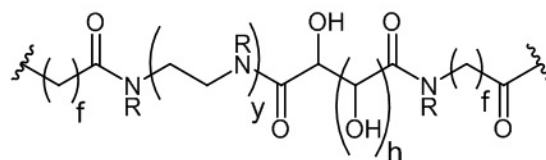
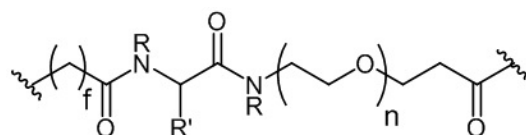
R^{13} выбирают из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила.

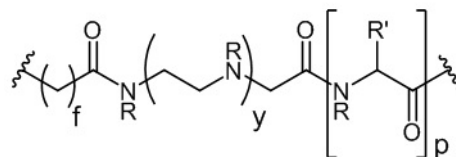
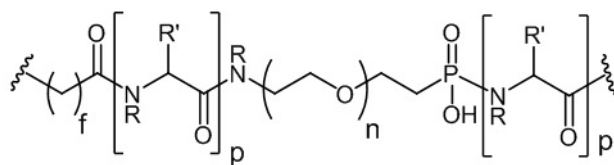
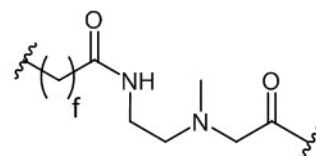
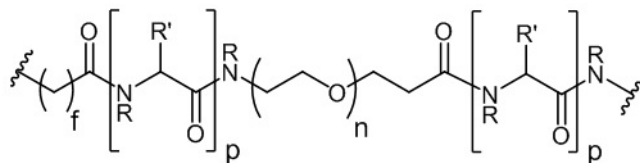
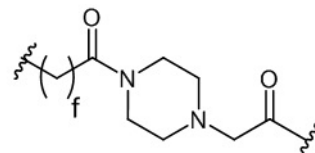
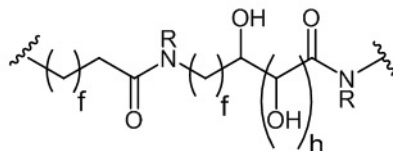
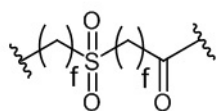
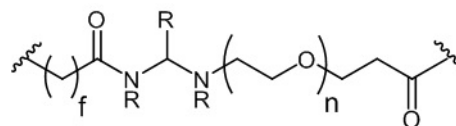
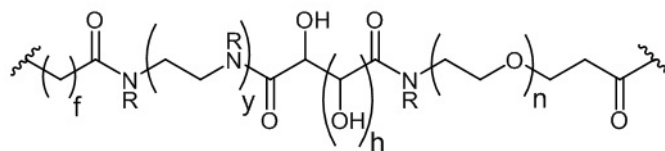
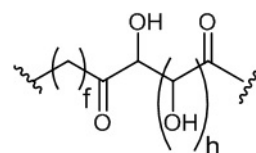
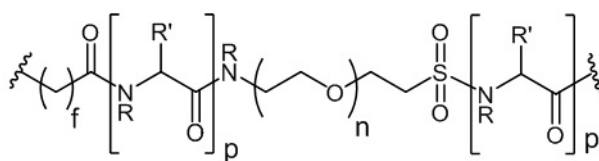
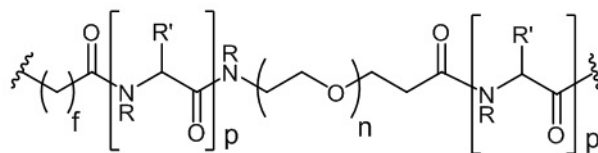
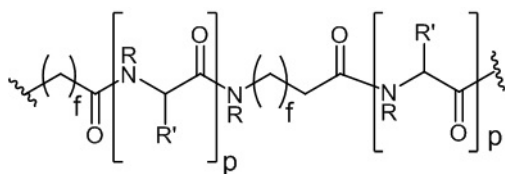
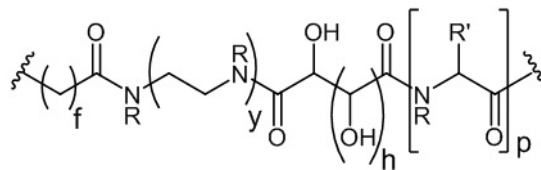
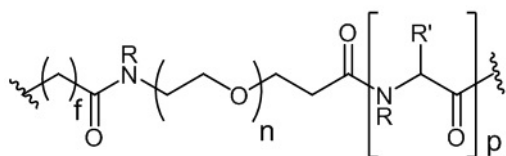
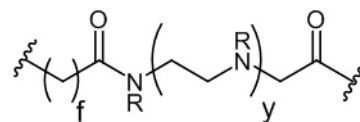
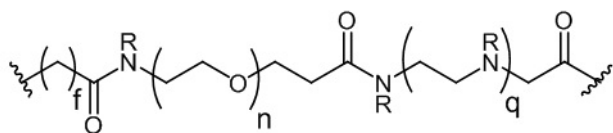
В некоторых воплощениях, T^1 , T^2 , T^3 и T^4 и V^1 , V^2 , V^3 и V^4 выбирают из следующей таблицы:

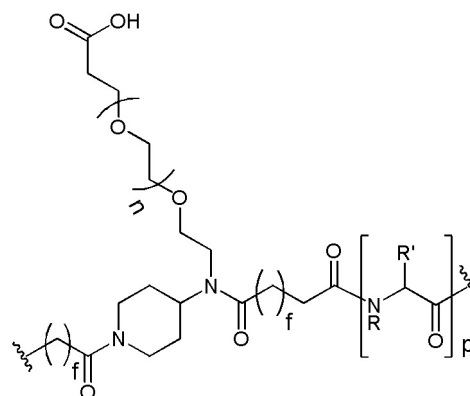
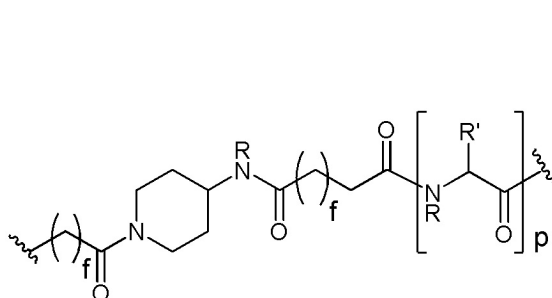
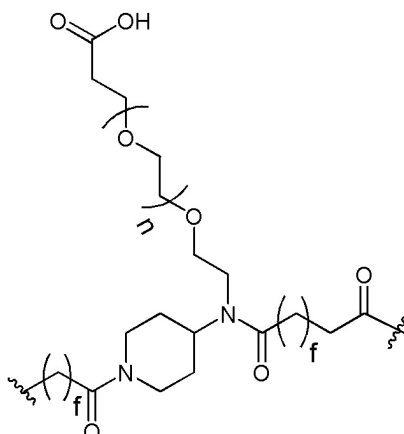
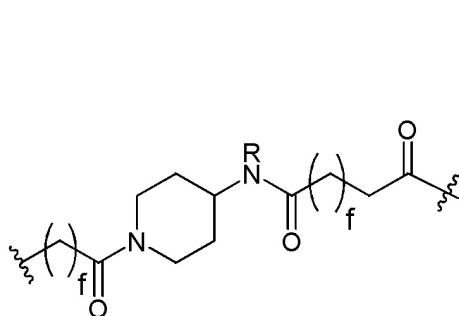
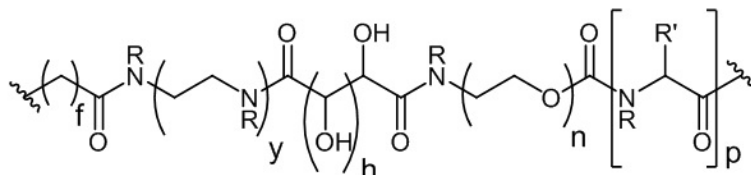
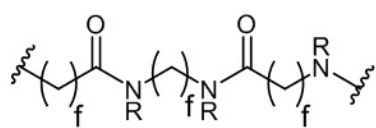
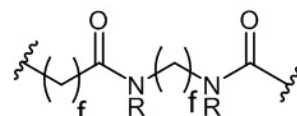
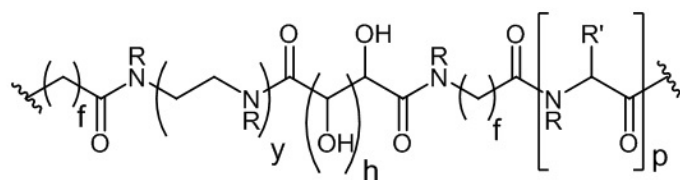
T^1	V^1	T^2	V^2	T^3	V^3	T^4	V^4
(C_1-C_{12}) алкил	$-CONR^{15}-$	$(PEG)_n$	$-CO-$	-	-	-	-
(C_1-C_{12}) алкил	$-CO-$	$(AA)_p$	$-NR^{15}-$	$(PEG)_n$	$-CO-$	-	-
(C_1-C_{12}) алкил	$-CO-$	$(AA)_p$	-	-	-	-	-
(C_1-C_{12}) алкил	$-CONR^{15}-$	$(PEG)_n$	$-NR^{15}-$	-	-	-	-
(C_1-C_{12}) алкил	$-CO-$	$(AA)_p$	$-NR^{15}-$	$(PEG)_n$	$-NR^{15}-$	-	-
(C_1-C_{12}) алкил	$-CO-$	$(EDA)_w$	$-CO-$	-	-	-	-
(C_1-C_{12}) алкил	$-CONR^{15}-$	(C_1-C_{12}) алкил	$-NR^{15}-$	-	-	-	-
(C_1-C_{12}) алкил	$-CONR^{15}-$	$(PEG)_n$	$-CO-$	$(EDA)_w$	-	-	-
(C_1-C_{12}) алкил	$-CO-$	$(EDA)_w$	-	-	-	-	-
(C_1-C_{12}) алкил	$-CO-$	$(EDA)_w$	$-CO-$	$(CR^{13}OH)_h$	$-CONR^{15}-$	(C_1-C_{12}) алкил	$-CO-$
(C_1-C_{12}) алкил	$-CO-$	$(AA)_p$	$-NR^{15}-$	(C_1-C_{12}) алкил	$-CO-$	-	-
(C_1-C_{12}) алкил	$-CONR^{15}-$	$(PEG)_n$	$-CO-$	$(AA)_p$	-	-	-

	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	(EDA) _w	-CO-	(CR ¹³ OH) _h	-CO-	(AA) _p	-
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	(AA) _p	-NR ¹⁵ -	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	(AA) _p	-
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	(AA) _p	-NR ¹⁵ -	(PEG) _n	-CO-	(AA) _p	-
5	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	(AA) _p	-NR ¹⁵ -	(PEG) _n	-SO ₂ -	(AA) _p	-
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	(EDA) _w	-CO-	(CR ¹³ OH) _h	-CONR ¹⁵ -	(PEG) _n	-CO-
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	(CR ¹³ OH) _h	-CO-	-	-	-	-
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CONR ¹⁵ -	замещенный (C ₁ -C ₁₂)алкил	-NR ¹⁵ -	(PEG) _n	-CO-	-	-
10	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-SO ₂ -	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	-	-	-	-
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CONR ¹⁵ -	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-	(CR ¹³ OH) _h	-CONR ¹⁵ -	-	-
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	(AA) _p	-NR ¹⁵ -	(PEG) _n	-CO-	(AA) _p	-NR ¹⁵ -
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	(AA) _p	-NR ¹⁵ -	(PEG) _n	-P(O)OH-	(AA) _p	-
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	(EDA) _w	-	(AA) _p	-	-	-
15	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CONR ¹⁵ -	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-NR ¹⁵ -	-	-CO-	-	-
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CONR ¹⁵ -	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-NR ¹⁵ -	-	-CO-	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-NR ¹⁵ -
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	4AP	-CO-	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	(AA) _p	-
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	4AP	-CO-	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	-	-

В некоторых воплощениях, L выбирают из одной из следующих структур:







в которой

каждый f независимо представляет собой 0 или целое число от 1 до 12;

каждый y независимо представляет собой 0 или целое число от 1 до 20;

каждый n независимо представляет собой 0 или целое число от 1 до 30;

каждый p независимо представляет собой 0 или целое число от 1 до 20;

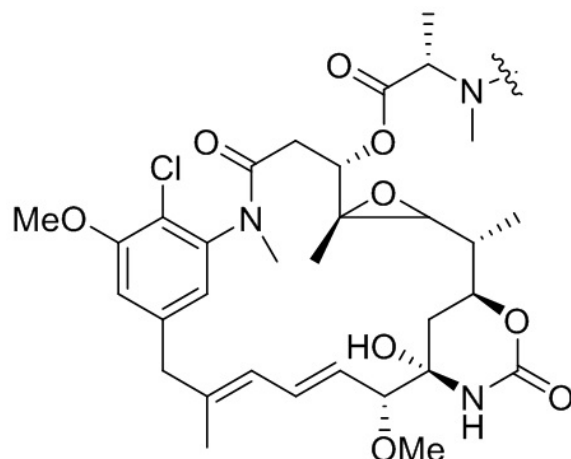
каждый h независимо представляет собой 0 или целое число от 1 до 12;

каждый R независимо представляет собой водород, алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, алкоксильную группу, замещенную алкоксильную группу, аминогруппу, замещенную аминогруппу, карбоксил, карбоксильный эфир, ацил, ацилоксильную группу, ацил-аминогруппу, аминоксил, алкиламид, замещенный алкиламид, сульфонил, тиаалкоксильную группу, замещенную тиаалкоксильную группу, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, гетероцикл и замещенный гетероцикл; и

каждый R' независимо представляет собой H, группу боковой цепи аминокислоты, алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил,

алкоксильную группу, замещенной алкоксильную группу, аминогруппу, замещенную
 аминогруппу, карбоксил, карбоксильный эфир, ацил, ацилоксильную группу, ацил-
 аминогруппу, аминоксил, алкиламид, замещенный алкиламид, сульфонил,
 тиаалкоксильную группу, замещенный тиаалкоксильную группу, арил, замещенный
 арил, гетероарил, замещенный гетероарил, циклоалкил, замещенный циклоалкил,
 гетероцикл и замещенный гетероцикл.

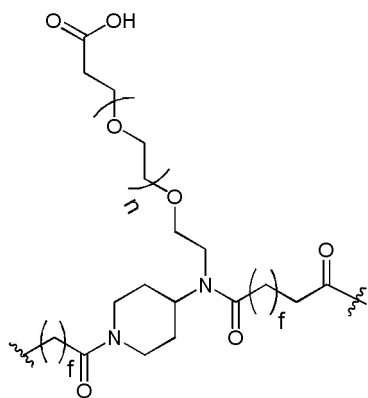
В некоторых воплощениях, майтансиноид представляет собой соединение, имеющее формулу:



в которой $\sim$ указывает на точку присоединения между майтансиноид и L.

В некоторых воплощениях, T^1 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил, V^1 представляет собой $-CO-$, T^2 представляет собой 4AP, V^2 представляет собой $-CO-$, T^3 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил, V^3 представляет собой $-CO-$, T^4 отсутствует и V^4 отсутствует.

В некоторых воплощениях, линкер, L, включает следующую структуру:



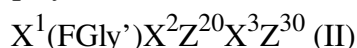
в которой

каждый f независимо представляет собой целое число от 1 до 12; и

n представляет собой целое число от 1 до 30.

В некоторых воплощениях, анти-CD22 антитело связывается с эпитопом между аминокислотами от 1 до 847, между аминокислотами 1-759, между аминокислотами 1-751, или между аминокислотами 1-670, в аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8A-8C.

В некоторых воплощениях, анти-CD22 антитело включает последовательность формулы (II):



в которой

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I);

Z^{20} представляет собой остаток или пролина, или аланина;

Z^{30} представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту;

X^1 может присутствовать или отсутствовать, и, если присутствует, то может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что, если последовательность находится на N-конце конъюгата, то X^1 присутствует; и

X^2 и X^3 каждый независимо представляет собой любую аминокислоту.

В некоторых воплощениях, последовательность представляет собой L(FGly')TPSR.

В некоторых воплощениях, Z^{30} выбирают из R, K, H, A, G, L, V, I и P; X^1 выбирают из L, M, S и V; и X^2 и X^3 каждый независимо выбирают из S, T, A, V, G и C.

В некоторых воплощениях, модифицированный аминокислотный остаток расположен на C-конце константной области тяжелой цепи анти-CD22 антитела.

В некоторых воплощениях, константная область тяжелой цепи включает последовательность формулы (II):

$X^1(\text{FGly}')X^2Z^{20}X^3Z^{30}$ (II)

в которой

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I);

Z^{20} представляет собой остаток или пролина, или аланина;

Z^{30} представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту;

X^1 может присутствовать или отсутствовать, и, если присутствует, то может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что, если последовательность находится на N-конце конъюгата, то X^1 присутствует; и

X^2 и X^3 каждый независимо представляет собой любую аминокислоту, и

в которой последовательность представляет собой C-конец к аминокислотной последовательности SLSLSPG.

В некоторых воплощениях, константная область тяжелой цепи включает последовательность SPGSL(FGly')TPSRGS.

В некоторых воплощениях, Z^{30} выбирают из R, K, H, A, G, L, V, I и P; X^1 выбирают из L, M, S и V; и X^2 и X^3 каждый независимо выбирают из S, T, A, V, G и C.

В некоторых воплощениях, модифицированный аминокислотный остаток расположен в константной области легкой цепи анти-CD22 антитела.

В некоторых воплощениях, константная область легкой цепи включает последовательность формулы (II):

$X^1(\text{FGly}')X^2Z^{20}X^3Z^{30}$ (II)

в которой

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I);

Z^{20} представляет собой остаток или пролина, или аланина;

Z^{30} представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту;

X^1 может присутствовать или отсутствовать, и, если присутствует, то может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что, если последовательность находится на N-конце конъюгата, то X^1 присутствует; и

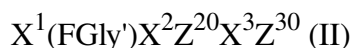
X^2 и X^3 каждый независимо представляет собой любую аминокислоту, и в которой последовательность представляет собой C-конец к последовательности KVDNAL, и/или представляет собой N-конец к последовательности QSGNSQ.

В некоторых воплощениях, константная область легкой цепи включает последовательность KVDNAL(FGly')TPSRQSGNSQ.

В некоторых воплощениях, Z^{30} выбирают из R, K, H, A, G, L, V, I и P; X^1 выбирают из L, M, S и V; и X^2 и X^3 каждый независимо выбирают из S, T, A, V, G и C.

В некоторых воплощениях, модифицированный аминокислотный остаток расположен в области CH1 тяжелой цепи анти-CD22 антитела.

В некоторых воплощениях, область CH1 тяжелой цепи включает последовательность формулы (II):



в которой

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы

(I);

Z^{20} представляет собой остаток или пролина, или аланина;

Z^{30} представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту;

X^1 может присутствовать или отсутствовать, и, если присутствует, то может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что, если последовательность находится на N-конце конъюгата, то X^1 присутствует; и

X^2 и X^3 каждый независимо представляет собой любую аминокислоту, и в которой последовательность представляет собой C-конец к аминокислотной последовательности SWNSGA и/или представляет собой N-конец к аминокислотной последовательности GVHTFP.

В некоторых воплощениях, область CH1 тяжелой цепи включает последовательность SWNSGAL(FGly')TPSRGVHTFP.

В некоторых воплощениях, Z^{30} выбирают из R, K, H, A, G, L, V, I и P; X^1 выбирают из L, M, S и V; и X^2 и X^3 каждый независимо выбирают из S, T, A, V, G и C.

В некоторых воплощениях, модифицированный аминокислотный остаток расположен в области CH2 тяжелой цепи анти-CD22 антитела.

В некоторых воплощениях, модифицированный аминокислотный остаток расположен в области CH3 тяжелой цепи анти-CD22 антитела.

Аспекты настоящего раскрытия включают фармацевтическую композицию, которая включает конъюгат, как описан в настоящем документе, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Аспекты настоящего раскрытия включают способ, где способ включает введение субъекту эффективного количества конъюгата, как описан в настоящем документе.

Аспекты настоящего раскрытия включают способ лечения рака у субъекта. Способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, которая включает конъюгат, как описан в настоящем документе, где введение эффективно для лечения рака у субъекта.

Аспекты настоящего раскрытия включают способ доставки лекарственного средства к целевому сайту у субъекта. Способ включает введение субъекту фармацевтической композиции, которая включает конъюгат, как описан в настоящем документе, где введение эффективно для высвобождения терапевтически эффективного количества лекарственного средства из конъюгата в целевом сайте у субъекта.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1, панель А, показывает последовательность распознавания генерирующего формилглицин фермента (FGE), встроенную в желаемое местоположение вдоль остова молекулы антитела с применением стандартных способов молекулярной биологии.

При экспрессии FGE, эндогенный для эукариотических клеток, катализирует преобразование Cys в пределах консенсусной последовательности в остаток формилглицина (FGly). Фиг. 1, панель В, показывает антитела, несущие альдегидные фрагменты (2 на антитело), реагирующие с линкером гидразин-изо-Пикте-Шпенглер (HIPS) и нагруженные для создания сайт-специфически конъюгированного ADC. Фиг. 1, панель С, показывает химические реакции с HIPS, которые протекают через образование промежуточного иона гидразония, с последующим внутримолекулярным алкилированием с нуклеофильным индолом для получения стабильной С-С связи.

Фиг. 2 показывает регистрацию элюции с колонки гидрофобного взаимодействия (HIC) альдегид-меченого анти-CD22 антитела, конъюгированного на С-конце (СТ) с майтансиновой нагрузкой, прикрепленной к линкеру HIPS-4AP, в соответствии с воплощениями настоящего раскрытия.

Фиг. 3 показывает регистрацию HIC-элюции альдегид-меченого анти-CD22 антитела, конъюгированного на С-конце (СТ) с майтансиновой нагрузкой, прикрепленной к линкеру HIPS-4AP, в соответствии с воплощениями настоящего раскрытия.

Фиг. 4 показывает регистрацию хроматографии с обращенной фазой (PLRP) альдегид-меченого анти-CD22 антитела, конъюгированного на С-конце (СТ) с майтансиновой нагрузкой, прикрепленной к линкеру HIPS-4AP, в соответствии с воплощениями настоящего раскрытия.

Фиг. 5 показывает график анализа аналитической гель-хроматографии (SEC) альдегид-меченого анти-CD22 антитела, конъюгированного на С-конце (СТ) с майтансиновой нагрузкой, прикрепленной к линкеру HIPS-4AP, в соответствии с воплощениями настоящего раскрытия.

Фиг. 6А показывает график, показывающий *in vitro* потенциал против клеток WSU-DLCL2 (процент жизнеспособности против Log концентрации конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) (нМ)) для анти-CD22 ADCs, конъюгированных на С-конце (СТ) с майтансиновой нагрузкой, прикрепленной к линкеру HIPS-4AP, в соответствии с воплощениями настоящего раскрытия. Фиг. 6В показывает график *in vitro* потенциала против клеток Ramos (процент жизнеспособности против Log концентрации (нМ) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC)) для анти-CD22 ADCs, конъюгированных на С-конце (СТ) с майтансиновой нагрузкой, прикрепленной к линкеру HIPS-4AP, в соответствии с воплощениями настоящего раскрытия.

Фиг. 7 показывает график, демонстрирующий *in vivo* эффективность против модели ксенотрансплантата WSU-DLCL2 (средний объем опухоли (мм³) от дней) для анти-CD22 ADCs, конъюгированных на С-конце (СТ) с майтансиновой нагрузкой, прикрепленной к линкеру HIPS-4AP, в соответствии с воплощениями настоящего раскрытия.

Фиг. 8А-8С обеспечивают аминокислотные последовательности изоформ CD22 (сверху вниз: SEQ ID NOs://-//).

Фиг. 9А отображает карту сайта, показывающую возможные сайты модификации

для генерации меченного альдегидом полипептида Ig. Верхняя последовательность представляет собой аминокислотную последовательность консервативной области полипептида легкой цепи IgG1 (SEQ ID NO://) и показывает возможные сайты модификации в легкой цепи Ig; нижняя последовательность представляет собой аминокислотную последовательность консервативной области тяжелой цепи полипептида Ig (SEQ ID NO://; номер доступа в GenBank AAG00909) и показывает возможные сайты модификации в тяжелой цепи Ig. Нумерация тяжелых и легких цепей основана на полноразмерных тяжелых и легких цепях.

Фиг. 9В изображает выравнивание константных областей тяжелой цепи иммуноглобулина для IgG1 (SEQ ID NO://), IgG2 (SEQ ID NO://), IgG3 (SEQ ID NO://), IgG4 (SEQ ID NO://) и IgA (SEQ ID NO://), демонстрирующее участки модификации, в которых альдегидные метки могут быть обеспечены в тяжелой цепи иммуноглобулина. Нумерация тяжелых и легких цепей основана на полноразмерных тяжелых и легких цепях.

Фиг. 9С изображает выравнивание константных областей легкой цепи иммуноглобулина (SEQ ID NOS://), демонстрирующее участки модификации, в которых альдегидные метки могут быть обеспечены в легкой цепи иммуноглобулина.

Фиг. 10 показывает иллюстрации формата ELISA для обнаружения различных аналитов, в соответствии с воплощениями настоящего раскрытия.

Фиг. 11 - анти-CD22 ADC в соответствии с настоящим раскрытием было высоко мономерным, имело средний DAR, равный 1,8, и включало единственный тип легкой и тяжелой цепи. Анти-CD22 ADC анализировали с помощью гель-хроматографии для оценки процента мономера (99,2%) (фиг. 11, панель А) и с помощью хроматографии с гидрофобным взаимодействием (HIC; фиг. 11, панель В) и хроматографии с обращенной фазой (PLRP) (фиг. 11, панель С) для оценки отношения лекарственного средства к антителу (DAR), которое было равно 1,8.

Фиг. 12 - анти-CD22 ADC в соответствии с настоящим раскрытием связывалось с белком человеческих CD22 также хорошо, как и анти-CD22 антитело дикого типа. Конкурентный ELISA применяли для сравнения связывания анти-CD22 ADC с анти-CD22 антителом дикого типа (WT). Данные представлены как среднее $\pm$ S.D. (n = 4).

Фиг. 13 - анти-CD22 ADC в соответствии с настоящим раскрытием опосредует интернализацию CD22 аналогично анти-CD22 антителу дикого типа. Линии клеток NHL, Ramos, Granta-519 и WSU-DLCL2 применяли для сравнения интернализация CD22 клеточной поверхности, как опосредованной связыванием или с WT анти-CD22, или с CAT-02-106.

Фиг. 14 - анти-CD22 ADC в соответствии с настоящим раскрытием было в равной степени действенным как против родительских, так и против MDR1-экспрессирующих клеток опухоли NHL *in vitro*. Клетки Ramos и родительские клетки WSU-DLCL2 (WT) (фиг. 14, панель А и панель С) и варианты данных линий, которые были разработаны для экспрессии MDR1 (MDR1+, фиг. 14, панель В и панель D), применяли в качестве мишеней для *in vitro* исследований цитотоксичности активности анти-CD22 ADC. Свободный майтансин и α CD22 ADC, сделанное с антителом CAT-02, но конъюгированное с майтансином с помощью расщепляемого валин-цитруллинового линкера, применяли в качестве контролей. В дополнительном контрольном эксперименте, ингибитор MDR1, циклоспорин, добавляли к клеткам WT или MDR1+ WSU-DLCL2 (фиг. 14, панель Е и панель F). Данные представлены как среднее $\pm$ S.D. (n = 2).

Фиг. 15 - анти-CD22 ADC в соответствии с настоящим раскрытием не опосредовало

нецелевую цитотоксичность. Линию клеток опухоли желудка, NCI-N87, инкубировали *in vitro* в течение 5-ти дней в присутствии возрастающих концентраций анти-CD22 ADC. Затем, жизнеспособность клеток оценивали с помощью основанного на MTS способа. Данные представлены как среднее $\pm$ S.D. (n =2).

5 Фиг. 16 - анти-CD22, относящиеся к ADC, анти-HER2 конъюгированные с HIPS-4AP-майтансиновой линкерной нагрузкой, не индуцировали неспецифический цитолиз. *In vitro* исследования цитотоксичности проводили с помощью клеток HER2+ NCI-N87, клеток HER2- Ramos или совместного культивирования обеих клеток в качестве мишеней. Свободный мйтансин (2 нМ) и анти-HER2 конъюгированные с MMAE через
10 расщепляемый валин-цитруллиновый (vc) линкер (2 нМ нагрузка), применяли в качестве положительного контроля на неспецифический цитолиз. Анти-HER2 ADC вводили в нагрузку 2 нМ. Данные представлены как среднее $\pm$ S.D. (n =2).

Фиг. 17 - анти-CD22 ADC в соответствии с настоящим раскрытием было эффективно *in vivo* против WSU-DLCL2, полученных из NHL, и модели ксенотрансплантатов Ramos.
15 Самок мышей CB17 ICR SCID (8/группу), несущих ксенотрансплантаты WSU-DLCL2, обрабатывали только носителем или анти-CD22 ADC или в виде единственной дозы (фиг. 17, панель А) 10 мг/кг или (фиг. 17, панель В), или в виде многократных доз 10 мг/кг, доставляемых каждые четыре дня, в общей сложности четыре дозы (q4d x 4). Обработку инициировали, если в ходе исследования опухоли достигали среднего размера,
20 равного 118 или 262 мм³ с единственной дозой или в многодозовых исследованиях, соответственно (фиг. 17, панель С). Самок мышей CB17 ICR SCID (12/группу), несущих ксенотрансплантаты Ramos, обрабатывали только носителем, или 5 или 10 мг/кг CAT-02-106 q4d x 4. Введение доз начинали, когда опухоли достигали среднего размера,
25 равного 246 мм³. Данные представлены как среднее $\pm$ S.E.M.

Фиг. 18 - клетки Ramos и WSU-DLCL2 экспрессировали разные уровни CD22 клеточной поверхности. Клетки Ramos и WSU-DLCL2 инкубировали с меченным флуоресцеином анти-CD22 антителом и затем анализировали с помощью проточной цитометрии. Средняя интенсивность канала флуоресценции FL1 (детектирующего флуоресцеин) для
30 каждого типа клеток показана на графике.

Фиг. 19 - обработка анти-CD22 ADC в соответствии с настоящим раскрытием не влияла на массу тела мышей. Показана средняя масса тела мышей в исследованиях эффективности ксенотрансплантата. (фиг. 19, панель А) Исследование с единственной дозой WSU-DLCL2; (фиг. 19, панель В) исследование с многократной дозой WSU-DLCL2;
35 (фиг. 19, панель С) исследование Ramos. Планки погрешностей указывают S.D.

Фиг. 20 - анти-CD22 ADC в соответствии с настоящим раскрытием можно дозировать у крыс вплоть до 60 мг/кг с минимальными эффектами. Крысы Sprague-Dawley (5/группу) получали дозу CAT-02-106, равную 6, 20, 40, или 60 мг/кг, с последующим 12-дневным периодом наблюдения. (фиг. 20, панель А) Массу тела контролировали в указанные
40 моменты времени. (фиг. 20, панель В) Аланин-аминотрансферазу (ALT) и (фиг. 20, панель С) количество тромбоцитов оценивали на 5 и 12 дни после введения дозы. Данные представлены как среднее $\pm$ S.D.

Фиг. 21 - анти-CD22 ADC в соответствии с настоящим раскрытием связывали специфически с В-клетками яванского макака. Лимфоциты периферической крови яванского макака определяли в соответствии с их профилям прямого и бокового
45 рассеяния (верхняя левая). Клетки инкубировали или только с флуоресцеин-изотиоцианат (FITC)-конъюгированным стрептавидином (SA) (верхняя справа), или с биотинилированным анти-CD22 ADC, а затем с FITC SA. Совместная инкубация с антителами, распознающими Т-клетки (CD3, нижняя левая) или В-клетки (CD20, нижняя

правая), продемонстрировала специфичность связывания CAT-02-106 с популяцией В-клеток.

Фиг. 22 - анти-CD22 ADC в соответствии с настоящим раскрытием продемонстрировали специфическое взаимодействие с В-клетками в тканях человека и яванского макака. Анти-CD22 ADC связывались с богатыми В-клетками областями селезенки (верх). Ткани сердца были отрицательными на окрашивание (в середине). Секции легких были отрицательными, за исключением рассеянных лейкоцитов (снизу).

Фиг. 23 - яванские макаки не демонстрировали обнаруживаемых побочных эффектов с повторной дозой 60 мг/кг анти-CD22 ADC в соответствии с настоящим раскрытием. Яванским макакам (2/пол/группу) давали 10, 30, или 60 мг/кг анти-CD22 ADC раз в три недели, в общей сложности две дозы, с последующим 21-дневным периодом наблюдения. (Фиг. 23, панель А) аспартаттрансаминазу (AST), (фиг. 23, панель В)

аланинаминотрансферазу (ALT), (фиг. 23, панель С) тромбоциты и (фиг. 23, панель D) моноциты контролировали в указанное время. Данные представлены как среднее $\pm$ S.D.

Фиг. 24 (панель А и панель В) - обработка анти-CD22 ADC в соответствии с настоящим раскрытием снижала популяции периферических В-клеток у яванского макака. Мононуклеарные клетки периферической крови из яванских макаков, включенные в исследование токсичности, контролировали с помощью проточной цитометрии для определения отношения В-клеток (CD20+), Т-клеток (CD3+) и NK-клеток (CD20-/CD3-), наблюдаемых у животных перед введением дозы и на дни 7, 14, 28 и 35. Данные представлены как среднее $\pm$ S.D.

Фиг. 25 - анти-CD22 ADC в соответствии с настоящим раскрытием продемонстрировали очень высокую *in vivo* стабильность, как было показано в фармакокинетических исследованиях на крысах. Крысам Sprague-Dawley (3/группу) давали единственную *i.v.* болюсную дозу, равную 3 мг/кг анти-CD22 ADC. Образцы плазмы собирали в указанные моменты времени и анализировали (как показано на фиг. 10) на концентрацию общих антител, общих конъюгатов и общих ADC.

Фиг. 26 показывает таблицу 3: сводка средних ($\pm$ SD) фармакокинетических и токсикокинетических (ТК) параметров общих величин ADC у животных, получивших дозу анти-CD22 ADC в соответствии с воплощениями настоящего раскрытия.

Определения

Следующие термины имеют следующие значения, если не указано иное. Любые неопределенные термины имеют свои, принятые в данной области техники, значения.

«Алкил» относится к моновалентным насыщенным алифатическим гидрокарбильным группам, имеющим от 1 до 10 атомов углерода и, например, от 1 до 6 атомов углерода или от 1 до 5, или от 1 до 4, или от 1 до 3 атомов углерода. Данный термин включает, например, линейные и разветвленные гидрокарбильные группы, такие как метильная (CH₃-), этильная (CH₃CH₂-), *n*-пропильная (CH₃CH₂CH₂-), изопропильная ((CH₃)₂CH-), *n*-бутильная (CH₃CH₂CH₂CH₂-), изобутильная ((CH₃)₂CHCH₂-), втор-бутильная ((CH₃)(CH₃CH₂)CH-), трет-бутильная ((CH₃)₃C-), *n*-пентильная (CH₃CH₂CH₂CH₂CH₂-) и неопентильная ((CH₃)₃CCCH₂-).

Термин «замещенный алкил» относится к алкильной группе, как определена в настоящем документе, в которой один или несколько атомов углерода в алкильной цепи (за исключением C₁ атома углерода) были необязательно замещены гетероатомом, таким как -O-, -N-, -S-, -S(O)_n- (где *n* равно от 0 до 2), -NR- (где R представляет собой водород или алкил), и имеющими от 1 до 5 заместителей, которые выбирают из группы,

состоящей из алкоксильной, замещенной алкоксильной, циклоалкильной, замещенной циклоалкильной, циклоалкенильной, замещенной циклоалкенильной, ацильной, ациламино-, ацилоксильной, amino-, aminoацильной, aminoацилоксильной, оксиаминоацильной, азидо-, циано-, галогено-, гидроксильной, оксо-, тиокето-, карбоксильной, карбоксилалкильной, тиаорилоксильной, тiogетероарилоксильной, тiogетероциклооксильной, тиоловой, тиаалкоксильной, замещенной тиаалкоксильной, арильной, арилоксильной, гетероарильной, гетероарилоксильной, гетероциклильной, гетероциклооксильной, гидроксиамино-, алкоксиамино-, нитро-, -SO-алкильной, -SO-арильной, -SO-гетероарильной, -SO₂-алкильной, -SO₂-арильной, -SO₂-гетероарильной

группы и -NR^aR^b, в которой R^a и R^b могут быть одинаковыми или разными и выбираемыми из водорода, необязательно замещенной алкильной, циклоалкильной, алкенильной, циклоалкенильной, алкинильной, арильной, гетероарильной и гетероциклильной группы.

«Алкилен» относится к двухвалентным алифатическим гидрокарбильным группам, предпочтительно, имеющим от 1 до 6, и более предпочтительно, от 1 до 3 атомов углерода, которые представляют собой или прямые цепи, или разветвленные цепи, и которые, необязательно, прерываются одной или несколькими группами, которые выбирают из -O-, -NR¹⁰-, -NR¹⁰C(O)-, -C(O)NR¹⁰- и им подобных. Данный термин включает, например, метилен (-CH₂-), этилен (-CH₂CH₂-), н-пропилен (-CH₂CH₂CH₂-), изо-пропилен (-CH₂CH(CH₃)-), (-C(CH₃)₂CH₂CH₂-), (-C(CH₃)₂CH₂C(O)-), (-C(CH₃)₂CH₂C(O)NH-), (-CH(CH₃)CH₂-) и им подобные.

«Замещенный алкилен» относится к алкиленовой группе, имеющей от 1 до 3 водородов, замененных заместителями, как описано для атомов углерода в приведенном ниже определении «замещенный».

Термин «алкан» относится к алкильной группе и алкиленовой группе, как определены в настоящем документе.

Термин «алкиламиноалкильная», «алкиламиноалкенильная» и «алкиламиноалкинильная» относится к группам R'NHR'', где R' представляет собой алкильную группу, как определена в настоящем документе, и R'' представляет собой алкиленовую, алкениленовую или алкиниленовую группу, как определена в настоящем документе.

Термин «алкарил», или «аралкил», относится к группам -алкилен-арил и замещенный алкилен-арил, где алкилен, замещенный алкилен и арил определены в настоящем документе.

«Алкоксильная» относится к -O-алкильной группе, в которой алкил такой, как определен в настоящем документе. Алкоксильная группа включает, например, метоксильную, этоксильную, н-пропоксильную, изопропоксильную, н-бутоксильную, трет-бутоксильную, втор-бутоксильную, н-пентоксильную и им подобные. Термин «алкоксильная» также относится к группам алкенил-O-, циклоалкил-O-, циклоалкенил-O- и алкинил-O-, где алкенил, циклоалкил, циклоалкенил и алкинил такие, как определены в настоящем документе.

Термин «замещенная алкоксильная» относится к замещенным алкил-O-, замещенным алкенил-O-, замещенным циклоалкил-O-, замещенным циклоалкенил-O- и замещенным алкинил-O-группам, где замещенный алкил, замещенный алкенил, замещенный циклоалкил, замещенный циклоалкенил и замещенный алкинил такие, как определены в настоящем документе.

Термин «алкоксиамино-» относится к -NH-алкоксильной группе, в которой

алкоксильная группа определена в настоящем документе.

Термин «галогеналкоксильная» относится к алкил-О-группам, в которых один или несколько атомов водорода на алкильной группе замещены галогеновой группой и включают, например, такие группы, как трифторметоксильные и им подобные.

5 Термин «галогеналкильная» относится к замещенной алкильной группе, как описана выше, в которой один или несколько атомов водорода на алкильной группе замещены галогеновой группой. Примеры таких групп включают, без ограничений, фторалкильные группы, такие как трифторметильные, дифторметильные, трифторэтильные и им подобные.

10 Термин «алкилалкоксильная» относится к -алкилен-О-алкильным, алкилен-О-замещенным алкильным, замещенным алкилен-О-алкильным и замещенным алкилен-О-замещенным алкильным группам, в которых алкил, замещенный алкил, алкилен и замещенный алкилен такие, как определены в настоящем документе.

15 Термин «алкилтиоалкоксильная» относится к -алкилен-S-алкильной, алкилен-S-замещенной алкильной, замещенной алкилен-S-алкильной и замещенной алкилен-S-замещенной алкильной группе, в которой алкил, замещенный алкил, алкилен и замещенный алкилен такие, как определены в настоящем документе.

«Алкенил» относится к гидрокарбильным группам с линейной или разветвленной цепью, имеющим от 2 до 6 атомов углерода и, предпочтительно, от 2 до 4 атомов
20 углерода и имеющим, по меньшей мере, 1 и, предпочтительно, от 1 до 2 участков ненасыщенности двойной связи. Данный термин включает, например, би-винил, аллил и бут-3-ен-1-ил. В данный термин включены цис- и трансизомеры или смеси данных изомеров.

Термин «замещенный алкенил» относится к алкенильной группе, как определена в
25 настоящем документе, имеющей от 1 до 5 заместителей или от 1 до 3 заместителей, которые выбирают из алкоксильной, замещенной алкоксильной, циклоалкильной, замещенной циклоалкильной, циклоалкенильной, замещенной циклоалкенильной, ацильной, ациламино-, ацилоксильной, амино-, замещенной амино-, аминоксильной, аминоксильной, оксиаминоацильной, азидо-, циано-, галогено-, гидроксильной,
30 оксо-, тиокето-, карбоксильной, карбоксилалкильной, тиоарилоксильной, тиогетероарилоксильной, тиогетероциклооксильной, тиоловой, тиаалкоксильной, замещенной тиаалкоксильной, арильной, арилоксильной, гетероарильной, гетероарилоксильной, гетероциклильной, гетероциклооксильной, гидроксикамино-, алкоксиамино-, нитро-, -SO-алкильной, -SO-замещенной алкильной, -SO-арильной,
35 -SO-гетероарил, -SO₂-алкильной, -SO₂-замещенной алкильной, -SO₂-арильной и -SO₂-гетероарильной группы.

«Алкинил» относится к неразветвленным или разветвленным моновалентным гидрокарбильным группам, имеющим от 2 до 6 атомов углерода и, предпочтительно,
40 от 2 до 3 атомов углерода, и имеющим, по меньшей мере, 1 и, предпочтительно, от 1 до 2 сайты с ненасыщенностью тройной связи. Примеры таких алкинильных групп включают ацетиленовую (-C≡CH) и пропаргиловую (-CH₂C≡CH) группы.

Термин «замещенный алкинил» относится к алкинильной группе, как определена в настоящем документе, имеющей от 1 до 5 заместителей или от 1 до 3 заместителей,
45 которые выбирают из алкоксильной, замещенной алкоксильной, циклоалкильной, замещенной циклоалкильной, циклоалкенильной, замещенной циклоалкенильной, ацильной, ациламино-, ацилоксильной, амино-, замещенной амино-, аминоксильной, аминоксильной, оксиаминоацильной, азидо-, циано-, галогено-, гидроксильной,

оксо-, тиокето-, карбоксильной, карбоксилалкильной, тиаарилоксильной, тиогетероарилоксильной, тиогетероциклооксильной, тиоловой, тиоалкоксильной, замещенной тиоалкоксильной, арильной, арилоксильной, гетероарильной, гетероарилоксильной, гетероциклильной, гетероциклооксильной, гидроксиамино-, алкоксиамино-, нитро-, -SO-алкильной, -SO-замещенной алкильной, -SO-арильной, -SO-гетероарильной, -SO₂-алкильной, -SO₂-замещенной алкильной, -SO₂-арильной и -SO₂-гетероарильной группы.

«Алкинилоксильная» относится к -О-алкинильной группе, в которой алкинил такой, как определен в настоящем документе. Алкинилоксильная группа включает, например, этинилоксильную, пропинилоксильную и им подобные.

«Ацильная» относится к Н-С(О)-, алкил-С(О)-, замещенным алкил-С(О)-, алкенил-С(О)-, замещенным алкенил-С(О)-, алкинил-С(О)-, замещенным алкинил-С(О)-, циклоалкил-С(О)-, замещенным циклоалкил-С(О)-, циклоалкенил-С(О)-, замещенным циклоалкенил-С(О)-, арил-С(О)-, замещенным арил-С(О)-, гетероарил-С(О)-, замещенным гетероарил-С(О)-, гетероциклил-С(О)- и замещенным гетероциклил-С(О)-группам, в которых алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклил и замещенный гетероциклил такие, как определены в настоящем документе. Например, ацил включает «ацетильную» группу CH₃C(О)-.

«Ациламино-» относится к -NR²⁰C(О)алкильным, -NR²⁰C(О)замещенным алкильным, -NR²⁰C(О)циклоалкильным, -NR²⁰C(О)замещенным циклоалкильным, -NR²⁰C(О)циклоалкенильным, -NR²⁰C(О)замещенным циклоалкенильным, -NR²⁰C(О)алкенильным, -NR²⁰C(О)замещенным алкенильным, -NR²⁰C(О)алкинильным, -NR²⁰C(О)замещенным алкинильным, -NR²⁰C(О)арильным, -NR²⁰C(О)замещенным арильным, -NR²⁰C(О)гетероарильным, -NR²⁰C(О)замещенным гетероарильным, -NR²⁰C(О)гетероциклильным и -NR²⁰C(О)замещенным гетероциклильным группам, в которых R²⁰ представляет собой водород или алкил и в которой алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклил и замещенный гетероциклил такие, как определены в настоящем документе.

«Аминокарбонильная» или термин «аминоацильная» относится к группе -С(О)NR²¹R²², в которой R²¹ и R²² независимо выбирают из группы, состоящей из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, замещенного арила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, гетероарила, замещенного гетероарила, гетероциклила и замещенного гетероциклила и, где R²¹ и R²² необязательно соединены друг с другом атомом азота, связанного с ними с образованием гетероциклильной или замещенной гетероциклильной группы, и в которой алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклил и замещенный гетероциклил такие, как определены в настоящем документе.

«Аминокарбониламино» относится к группе $\text{-NR}^{21}\text{C(O)NR}^{22}\text{R}^{23}$, где R^{21} , R^{22} и R^{23} независимо выбирают из водорода, алкила, арила или циклоалкила, или где две R-группы соединены с образованием гетероциклической группы.

Термин «алкоксикарбониламино» относится к группе -NRC(O)OR , где каждый R независимо представляет собой водород, алкил, замещенный алкил, арил, гетероарил или гетероциклил, в которой алкил, замещенный алкил, арил, гетероарил и гетероциклил такие, как определены в настоящем документе.

Термин «ацилокси» относится к алкил- C(O)O- , замещенным алкил- C(O)O- , циклоалкил- C(O)O- , замещенным циклоалкил- C(O)O- , арил- C(O)O- , гетероарил- C(O)O- и гетероциклил- C(O)O- группам, в которых алкил, замещенный алкил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, арил, гетероарил и гетероциклил такие, как определены в настоящем документе.

«Аминосульфонильная» относится к группе $\text{-SO}_2\text{NR}^{21}\text{R}^{22}$, в которой R^{21} и R^{22} независимо выбирают из группы, состоящей из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, замещенного арила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, гетероарила, замещенного гетероарила, гетероциклила, замещенного гетероциклила, и где R^{21} и R^{22} необязательно соединены друг с другом атомом азота, связанного с ними с образованием гетероциклической или замещенной гетероциклической группы, и алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклил и замещенный гетероциклил такие, как определены в настоящем документе.

«Сульфониламино» относится к группе $\text{-NR}^{21}\text{SO}_2\text{R}^{22}$, в которой R^{21} и R^{22} независимо выбирают из группы, состоящей из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, замещенного арила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, гетероарила, замещенного гетероарила, гетероциклила и замещенного гетероциклила, и где R^{21} и R^{22} необязательно соединены друг с другом атомами, связанными с ними с образованием гетероциклической или замещенной гетероциклической группы, и в которой алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклил и замещенный гетероциклил такие, как определены в настоящем документе.

«Арил» или «ар» относятся к моновалентной ароматической карбоциклической группе от 6 до 18 атомов углерода, имеющей единственное кольцо (такое как присутствует в фенильной группе) или систему колец, имеющую несколько конденсированных колец (примеры таких систем ароматических колец включают нафтильную, антрильную и инданильную группу), конденсированные кольца могут быть или могут не быть ароматическими, при условии, что точка присоединения проходит через атом ароматического кольца. Данный термин включает, например, фенильную и нафтильную группы. Если иное не ограничено определением арильного заместителя, то такие арильные группы необязательно могут быть замещены от 1 до 5 заместителями или от 1 до 3 заместителями, которые выбирают из ацилокси-, гидроксид-, тиола, ацила, алкила, алкокси-, алкенила, алкинила, циклоалкила, циклоалкенила, замещенного алкил,

замещенного алкокси-, замещенного алкенила, замещенного алкинила, замещенного циклоалкила, замещенного циклоалкенила, amino-, замещенного amino-, aminoацила, ациламино-, алкарила, арила, арилокси-, азидо-, карбоксила, карбоксилалкила, циано-, галоген, нитро-, гетероарила, гетероарилокси-, гетероциклила, гетероциклоокси, 5 aminoацилокси, оксиациламино-, тиаалкокси, замещенного тиаалкокси, тиаарилокси, тиагетероарилокси, -SO-алкила, -SO-замещенного алкила, -SO-арила, -SO-гетероарила, -SO₂-алкила, -SO₂-замещенного алкила, -SO₂-арила, -SO₂-гетероарила и тригалогенметила.

«Арилокси» относится к -О-арильной группе, в которой арил такой, как определен 10 в настоящем документе, включая, например, феноксильную, нафтоксильную и им подобные группы, включая необязательно замещенные арильные группы, которые также определены в настоящем документе.

«Амино» относится к группе -NH₂.

Термин «замещенная amino-» относится к группе -NRR, где каждый R независимо 15 выбирают из группы, состоящей из водорода, алкила, замещенного алкила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, алкенила, замещенного алкенила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, гетероарила и гетероциклила, при условии, что, по меньшей мере, один R не представляет собой 20 водород.

Термин «азидо» относится к группе -N₃.

«Карбоксил», «карбокси» или «карбоксилат» относится к группе -CO₂H или ее солям.

«Карбоксильный эфир» или «карбоксиэфир» или термины «карбоксиалкил» или «карбоксилалкил» относятся к -C(O)O-алкильным, -C(O)O-замещенным алкильным, 25 -C(O)O-алкенильным, -C(O)O-замещенным алкенильным, -C(O)O-алкинильным, -C(O)O-замещенным алкинильным, -C(O)O-арильным, -C(O)O-замещенным арильным, -C(O)O-циклоалкильным, -C(O)O-замещенным циклоалкильным, -C(O)O-циклоалкенильным, -C(O)O-замещенным циклоалкенильным, -C(O)O-гетероарильным, -C(O)O-замещенным гетероарильным, -C(O)O-гетероциклильным и -C(O)O-замещенным гетероциклильным 30 группам, в которых алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклил и замещенный гетероциклил такие, как определены в настоящем документе.

«(Карбоксиэфир)окси» или «карбонат» относится к -C(O)O-алкильным, -C(O)O-замещенным алкильным, -C(O)O-алкенильным, -C(O)O-замещенным алкенильным, -C(O)O-алкинильным, -C(O)O-замещенным алкинильным, -C(O)O-арильным, -C(O)O-замещенным арильным, -C(O)O-циклоалкильным, -C(O)O-замещенным циклоалкильным, -C(O)O-циклоалкенильным, -C(O)O-замещенным циклоалкенильным, -C(O)O-гетероарильным, -C(O)O-замещенным гетероарильным, -C(O)O-гетероциклильным и 40 -C(O)O-замещенным гетероциклильным группам, в которых алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклил и замещенный гетероциклил такие, как определены в настоящем документе. 45

«Циано-» или «нитрильная» относится к группе -CN.

«Циклоалкильная» относится к циклическим алкильным группам от 3 до 10 атомов углерода, имеющим единственное кольцо или несколько колец, включая

конденсированные, мостиковые и спирокольцевые системы. Примеры подходящих циклоалкильных групп включают, например, адамантильные, циклопропильные, циклобутильные, циклопентильные, циклооктильные и им подобные. Такие циклоалкильные группы включают, например, кольцевые структуры с единственным

5 кольцом, такие как циклопропильная, циклобутильная, циклопентильная, циклооктильная и им подобные, или кольцевые структуры с несколькими кольцами, таким как адамантанильные и им подобные.

Термин «замещенная циклоалкильная» относится к циклоалкильным группам, имеющим от 1 до 5 заместители или от 1 до 3 заместителей, которые выбирают из

10 алкила, замещенного алкила, алкокси-, замещенной алкоксигруппы, циклоалкила, замещенного циклоалкила, циклоалкенила, замещенного циклоалкенила, ацила, ациламино-, ацилоксильной, amino-, замещенной amino-, aminoацильной, aminoацилоксильной, оксиаминоацильной, азидо-, циано-, галогеновой, гидроксильной, оксо-, тиокето-группы, карбоксила, карбоксилалкила, тиаорилоксильной,

15 тиогетероарилоксильной, тиогетероциклооксильной, тиоловой, тиаалкоксильной, замещенной тиаалкоксильной группы, арила, арилоксильной группы, гетероарила, гетероарилоксильной группы, гетероциклила, гетероциклооксильной, гидроксiamiно-, алкоксиамино-, нитро-группы, -SO-алкила, -SO-замещенного алкила, -SO-арила, -SO-гетероарила, -SO₂-алкила, -SO₂-замещенного алкила, -SO₂-арила и -SO₂-гетероарила.

«Циклоалкенильная» относится к неароматическим циклическим алкильным группам от 3 до 10 атомов углерода, имеющим единственное кольцо или несколько колец и имеющим, по меньшей мере, одну двойную связь и, предпочтительно, от 1 до 2 двойных связей.

Термин «замещенная циклоалкенильная» относится к циклоалкенильным группам, имеющим от 1 до 5 заместители или от 1 до 3 заместителей, которые выбирают из

25 алкоксильной, замещенной алкоксильной, циклоалкильной, замещенной циклоалкильной, циклоалкенильной, замещенной циклоалкенильной, ацильной, ациламино-, ацилоксильной, amino-, замещенной amino-, aminoацильной, aminoацилоксильной, оксиаминоацильной, азидо-, циано-, галоген, гидроксильной, кето-, тиокето, карбоксильной, карбоксилалкильной, тиаорилоксильной,

30 тиогетероарилоксильной, тиогетероциклооксильной, тиоловой, тиаалкоксильной, замещенной тиаалкоксильной, арильной, арилоксильной, гетероарильной, гетероарилоксильной, гетероциклильной, гетероциклооксильной, гидроксiamiно-, алкоксиамино-, нитро-, -SO-алкильной, -SO-замещенной алкильной, -SO-арильной, -SO-гетероарильной, -SO₂-алкильной, -SO₂-замещенной алкильной, -SO₂-арильной и -SO₂-гетероарильной.

«Циклоалкинильная» относится к неароматическим циклоалкильным группам от 5 до 10 атомов углерода, имеющим единственное кольцо или несколько колец и имеющим, по меньшей мере, одну тройную связь.

«Циклоалкоксильная» относится к -О-циклоалкильной группе.

«Циклоалкенилоксильная» относится к -О-циклоалкенильной группе.

«Галогено-» или «галоген» относится к фтору, хлору, бром и йоду.

«Гидроксильная» или «гидроксил» относится к группе -ОН.

«Гетероарильная» относится к ароматической группе от 1 до 15 атомов углерода, например, от 1 до 10 атомов углерода и 1 до 10 гетероатомов выбирают из группы, состоящей из кислорода, азота и серы в кольце. Такие гетероарильные группы могут иметь единственное кольцо (такое как пиридиныльное, имидазолильное или фурильное)

или множественные конденсированные кольца в системе колец (например, как в таких группах, как индолизинильная, хинолинильная, бензофуранильная, бензимидазолильная или бензотиенильная), в которых, по меньшей мере, одно кольцо в кольцевой системе представляет собой ароматическое кольцо. Для удовлетворения требований валентности, любые гетероатомы в таком гетероарильном кольце могут быть связаны или могут быть не связаны с Н или группой заместителя, например, алкильной группой или другим заместителем, как описан в настоящем документе. В некоторых воплощениях, атом (атомы) азот и/или сера кольца гетероарильной группы необязательно окислены для обеспечения N-оксида ($N \rightarrow O$), сульфинильных или сульфонильных фрагментов. Данный термин включает, например, пиридинильную, пирролильную, индолильную, тιοфенильную и фуранильную группы. Если иное не ограничено определением для гетероарильного заместителя, то такие гетероарильные группы могут необязательно быть замещенными от 1 до 5 заместителями или от 1 до 3 заместителями, которые выбирают из ацилоксильной, гидроксильной, тиольной, ацильной, алкильной, алкоксильной, алкенильной, алкинильной, циклоалкильной, циклоалкенильной, замещенной алкильной, замещенной алкоксильной, замещенной алкенильной, замещенной алкинильной, замещенной циклоалкильной, замещенной циклоалкенильной, amino-, замещенной amino-, aminoацильной, ациламино-, алкарильной, арильной, арилоксильной, азида, карбоксильной, карбоксилалкильной, циано-, галоген-, нитро-, гетероарильной, гетероарилоксильной, гетероциклильной, гетероциклооксильной, aminoацилоксильной, оксиациламино-, тιοалкоксильной, замещенной тιοалкоксильной, тιοарилоксильной, тιοгетероарилоксильной, -SO-алкильной, -SO-замещенной алкильной, -SO-арильной, -SO-гетероарильной, -SO₂-алкильной, -SO₂-замещенной алкильной, -SO₂-арильной и -SO₂-гетероарильной и тригалогенметильной группы.

Термин «гетероаралкил» относится к алкилен-гетероарильным группам, где алкилен и гетероарил определены в настоящем документе. Данный термин включает, например, пиридилметильные, пиридилэтильные, индолилметильные и им подобные группы.

«Гетероарилоксильная» относится к -O-гетероарильной группе.

«Гетероцикл», «гетероциклильная», «гетероциклоалкильная» и «гетероциклил» относятся к насыщенным или ненасыщенным группам, имеющим единственное кольцо или несколько конденсированных колец, включая конденсированные, мостиковые и спиро- кольцевые системы и имеющим от 3 до 20 атомов кольца, включая от 1 до 10 гетероатомов. Данные атомы кольца выбирают из азота, серы или кислорода, где в конденсированных кольцевых системах, одно или несколько колец могут представлять собой циклоалкил, арил или гетероарил, при условии, что точка присоединения проходит через неароматическое кольцо. В некоторых воплощениях, атом(атомы) азота и/или сера гетероциклильной группы необязательно окисляют для обеспечения N-оксида, -S(O)-, или -SO₂-фрагментов. Для удовлетворения требований валентности, любой из гетероатомов в таких гетероциклильных кольцах может быть связан или могут быть не связан с Н или одной группой или несколькими группами заместителей, например, с алкильной группой или другим заместителем, как описан в настоящем документе.

Примеры гетероциклов и гетероариллов включают, без ограничений, азецидин, пиррол, имидазол, пиразол, пиридин, пиразин, пиримидин, пиридазин, индолизин, изоиндол, индол, дигидроиндол, индазол, пурин, хинолизин, изохинолин, хинолин, фталазин, нафтилпиридин, хиноксалин, хиназолин, цинолин, птеридин, карбазол, карболин, фенантридин, акридин, фенантролин, изотиазол, феназин, изоксазол, феноксазин, фенотиазин, имидазолидин, имидазолин, пиперидина, пиперазин, индолин, фталимид,

1,2,3,4- тетрагидроизохинолина, 4,5,6,7-тетрагидробензо[b]тиофен, тиазол, тиазолидин, тиофен, бензо[b]тиофен, морфолинил, тиоморфолинил (также называемый тиаморфолинил), 1,1-диоксотииоморфолинил, пиперидинил, пирролидин, тетрагидрофуранил и им подобные.

Если иное не ограничено определением для гетероциклического заместителя, такие гетероциклические группы могут быть необязательно замещены от 1 до 5, или от 1 до 3 заместителей, которые выбирают из алкоксильной, замещенной алкоксильной, циклоалкильной, замещенной циклоалкильной, циклоалкенильной, замещенной циклоалкенильной, ацильной, ациламино-, ацилоксильной, амино-, замещенной амино-, аминацильной, аминацилоксильной, оксиминоацильной, азидо-, циано-, галогено-, гидроксильной, оксо-, тиокето-, карбоксильной, карбоксилалкил, тиоарилоксильной, тиогетероарилоксильной, тиогетероциклооксильной, тиоловой, тиоалкоксильной, замещенной тиоалкоксильной, арильной, арилоксильной, гетероарильной, гетероарилоксильной, гетероциклической, гетероциклооксильной, гидроксиамино-, алкоксиамино-, нитро-, -SO-алкильной, -SO-замещенной алкильной, -SO-арильной, -SO-гетероарильной, -SO₂-алкильной, -SO₂-замещенной алкильной, -SO₂-арильной, -SO₂-гетероарильной и конденсированной гетероциклической группой.

«Гетероциклооксильная» относится к -О-гетероциклической группе.

Термин «гетероциклилтио» относится к гетероциклил-S-группе.

Термин «гетероциклен» относится к дирадикальной группе, образованной из гетероцикла, как определен в настоящем документе.

Термин «гидроксиамино» относится к группе -NHOH.

«Нитро» относится к группе -NO₂.

«Оксо» относится к атому (=O).

«Сульфонильная» относится к SO₂-алкильной, SO₂-замещенной алкильной, SO₂-алкенильной, SO₂-замещенной алкенильной, SO₂-циклоалкильной, SO₂-замещенной циклоалкильной, SO₂-циклоалкенильной, SO₂-замещенной циклоалкенильной, SO₂-арильной, SO₂-замещенной арильной, SO₂-гетероарильной, SO₂-замещенной гетероарильной, SO₂-гетероциклической и SO₂-замещенной гетероциклической группе, в которой алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклил и замещенный гетероциклил такие, как определены в настоящем документе. Сульфонил включает, например, метил-SO₂-, фенил-SO₂- и 4-метилфенил-SO₂-.

«Сульфонилоксильная» относится к -OSO₂-алкильной, OSO₂-замещенной алкильной, OSO₂-алкенильной, OSO₂-замещенной алкенильной, OSO₂-циклоалкильной, OSO₂-замещенной циклоалкильной, OSO₂-циклоалкенильной, OSO₂-замещенной циклоалкенильной, OSO₂-арильной, OSO₂-замещенной арильной, OSO₂-гетероарильной, OSO₂-замещенной гетероарильной, OSO₂-гетероциклической и OSO₂ замещенной гетероциклической группе, в которой алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, циклоалкенил, замещенный циклоалкенил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, гетероциклил и замещенный гетероциклил такие, как определены в настоящем документе.

Термин «аминокарбонилоксильная» относится к группе $-\text{OC}(\text{O})\text{NRR}$, где каждый R независимо представляет собой водород, алкил, замещенный алкил, арил, гетероарил, или гетероциклил, в которой алкил, замещенный алкил, арил, гетероарил и гетероциклил такие, как определены в настоящем документе.

5 «Тиольная» относится к группе $-\text{SH}$.

«Тиоксо» или термин «тиокето» относится к атому $(=\text{S})$.

«Алкилтиольная» или термин «тиоалкоксильная» относится к группе $-\text{S}$ -алкил, в которой алкил такой, как определен в настоящем документе. В некоторых воплощениях, сера может быть окислена до $-\text{S}(\text{O})-$. Сульфоксид может существовать в виде одного или нескольких стереоизомеров.

10 Термин «замещенный тиоалкоксильная» относится к $-\text{S}$ -замещенной алкильной группе.

Термин «тиоарилоксильная» относится к группе арил- $-\text{S}-$, в которой арильная группа такая, как определена в настоящем документе, включая необязательно замещенные арильные группы, также определенные в настоящем документе.

Термин «тиогетероарилоксильная» относится к группе гетероарил- $-\text{S}-$, в которой гетероарильная группа такая, как определена в настоящем документе, включая необязательно замещенные арильные группы, которые также определены в настоящем документе.

20 Термин «тиогетероциклооксильная» относится к группе гетероциклил- $-\text{S}-$, в которой гетероциклильная группа такая, как определена в настоящем документе, включая необязательно замещенные гетероциклильные группы, которые также определены в настоящем документе.

В дополнении к раскрытию настоящего документа, термин «замещенный», при применении для изменения указанной группы или радикала, также может означать, что один или несколько атомов водорода указанной группы или радикала каждый, независимо друг от друга, заменены теми же или отличными группами заместителей, как определены ниже.

В дополнении к группам, раскрытым по отношению к индивидуальным терминам в данном документе, группы заместителей для замены одного или нескольких водородов (любох двух водородов на единственном углероде могут быть замещены $=\text{O}$, $=\text{NR}^{70}$, $=\text{N}-\text{OR}^{70}$, $=\text{N}_2$ или $=\text{S}$) на насыщенных атомах углерода в указанной группе или радикале, представляют собой, если не указано иное, $-\text{R}^{60}$, галоген, $=\text{O}$, $-\text{OR}^{70}$, $-\text{SR}^{70}$, $-\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$, тригалогенметил, $-\text{CN}$, $-\text{OCN}$, $-\text{SCN}$, $-\text{NO}$, $-\text{NO}_2$, $=\text{N}_2$, $-\text{N}_3$, $-\text{SO}_2\text{R}^{70}$, $-\text{SO}_2\text{O}^-\text{M}^+$, $-\text{SO}_2\text{OR}^{70}$, $-\text{OSO}_2\text{R}^{70}$, $-\text{OSO}_2\text{O}^-\text{M}^+$, $-\text{OSO}_2\text{OR}^{70}$, $-\text{P}(\text{O})(\text{O}^-)_2(\text{M}^+)_2$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{70})\text{O}^-\text{M}^+$, $-\text{P}(\text{O})(\text{OR}^{70})_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}^{70}$, $-\text{C}(\text{S})\text{R}^{70}$, $-\text{C}(\text{NR}^{70})\text{R}^{70}$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}^-\text{M}^+$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^{70}$, $-\text{C}(\text{S})\text{OR}^{70}$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$, $-\text{C}(\text{NR}^{70})\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^{70}$, $-\text{OC}(\text{S})\text{R}^{70}$, $-\text{OC}(\text{O})\text{O}^-\text{M}^+$, $-\text{OC}(\text{O})\text{OR}^{70}$, $-\text{OC}(\text{S})\text{OR}^{70}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{O})\text{R}^{70}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{S})\text{R}^{70}$, $-\text{NR}^{70}\text{CO}_2^-\text{M}^+$, $-\text{NR}^{70}\text{CO}_2\text{R}^{70}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{S})\text{OR}^{70}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{O})\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$, $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{NR}^{70})\text{R}^{70}$ и $-\text{NR}^{70}\text{C}(\text{NR}^{70})\text{NR}^{80}\text{R}^{80}$, где R^{60} выбирают из группы, состоящей из необязательно замещенного алкила, циклоалкила, гетероалкила, гетероциклоалкилалкила, циклоалкилалкила, арила, арилалкила, гетероарила и гетероариалалкила, каждый R^{70} независимо представляет собой водород или R^{60} ; каждый R^{80} независимо представляет собой R^{70} или альтернативно, два R^{80} , вместе с атомом азота, к которому они присоединены, формируют 5-, 6- или 7-членный гетероциклоалкил,

который может необязательно включать от 1 до 4 таких же или отличных дополнительных гетероатомов, которые выбирают из группы, состоящей из O, N и S, из которых N может иметь -H или C₁-C₃-алкильные замещения; и каждый M⁺ представляет собой противоион с чистым единственным положительный заряд. Каждый M⁺ может независимо представлять собой, например, ион щелочного металла, такой как K⁺, Na⁺, Li⁺; ион аммония, такой как ⁺N(R⁶⁰)₄; или ион щелочноземельного металла, такой как [Ca²⁺]_{0,5}, [Mg²⁺]_{0,5} или [Ba²⁺]_{0,5} («нижний индекс 0,5 означает, что один из противоионов для таких двухвалентных щелочноземельных ионов может представлять собой ионизированную форму соединения по изобретению и другой типичный противоион, такой как хлорид, или два ионизированных соединения, описанных в настоящем документе, могут служить в качестве противоионов для такие двухвалентных ионов щелочноземельных металлов или двукратно ионизированное соединение по изобретению может служить в качестве противоиона для таких двухвалентные ионы щелочноземельных металлов). В качестве конкретных примеров, -NR⁸⁰R⁸⁰ предназначен для включения -NH₂, -NH-алкила, N-пирролидинила, N-пиперазинила, 4N-метил-пиперазин-1-ила и N-морфолинила.

В дополнении к раскрытию настоящего документа, группы заместителей для водородов на ненасыщенных атомах углерода в «замещенном» алкене, алкине, ариле и гетероариле представляют собой, если не указано иное, -R⁶⁰, галоген, -O⁻M⁺, -OR⁷⁰, -SR⁷⁰, -S⁻M⁺, -NR⁸⁰R⁸⁰, тригалогенметил, -CF₃, -CN, -OCN, -SCN, -NO, -NO₂, -N₃, -SO₂R⁷⁰, -SO₃⁻M⁺, -SO₃R⁷⁰, -OSO₂R⁷⁰, -OSO₃⁻M⁺, -OSO₃R⁷⁰, -PO₃⁻²(M⁺)₂, -P(O)(OR⁷⁰)O⁻M⁺, -P(O)(OR⁷⁰)₂, -C(O)R⁷⁰, -C(S)R⁷⁰, -C(NR⁷⁰)R⁷⁰, -CO₂⁻M⁺, -CO₂R⁷⁰, -C(S)OR⁷⁰, -C(O)NR⁸⁰R⁸⁰, -C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰, -OC(O)R⁷⁰, -OC(S)R⁷⁰, -OCO₂⁻M⁺, -OCO₂R⁷⁰, -OC(S)OR⁷⁰, -NR⁷⁰C(O)R⁷⁰, -NR⁷⁰C(S)R⁷⁰, -NR⁷⁰CO₂⁻M⁺, -NR⁷⁰CO₂R⁷⁰, -NR⁷⁰C(S)OR⁷⁰, -NR⁷⁰C(O)NR⁸⁰R⁸⁰, -NR⁷⁰C(NR⁷⁰)R⁷⁰ и -NR⁷⁰C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰, где R⁶⁰, R⁷⁰, R⁸⁰ и M⁺ такие, как определены выше, при условии, что в случае замещенного алкена или алкина, заместители не представляют собой -O⁻M⁺, -OR⁷⁰, -SR⁷⁰ или -S⁻M⁺.

В дополнении к группам, раскрытым по отношению к индивидуальным терминам в данном документе, группы заместителей для водородов на атомах азота в «замещенном» гетероалкильных и циклогетероалкильных группах представляют собой, если не указано иное, -R⁶⁰, -O⁻M⁺, -OR⁷⁰, -SR⁷⁰, -S⁻M⁺, -NR⁸⁰R⁸⁰, тригалогенметил, -CF₃, -CN, -NO, -NO₂, -S(O)₂R⁷⁰, -S(O)₂O⁻M⁺, -S(O)₂OR⁷⁰, -OS(O)₂R⁷⁰, -OS(O)₂O⁻M⁺, -OS(O)₂OR⁷⁰, -P(O)(O⁻)₂(M⁺)₂, -P(O)(OR⁷⁰)O⁻M⁺, -P(O)(OR⁷⁰)(OR⁷⁰), -C(O)R⁷⁰, -C(S)R⁷⁰, -C(NR⁷⁰)R⁷⁰, -C(O)OR⁷⁰, -C(S)OR⁷⁰, -C(O)NR⁸⁰R⁸⁰, -C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰, -OC(O)R⁷⁰, -OC(S)R⁷⁰, -OC(O)OR⁷⁰, -OC(S)OR⁷⁰, -NR⁷⁰C(O)R⁷⁰, -NR⁷⁰C(S)R⁷⁰, -NR⁷⁰C(O)OR⁷⁰, -NR⁷⁰C(S)OR⁷⁰, -NR⁷⁰C(O)NR⁸⁰R⁸⁰, -NR⁷⁰C(NR⁷⁰)R⁷⁰ и -NR⁷⁰C(NR⁷⁰)NR⁸⁰R⁸⁰, где R⁶⁰, R⁷⁰, R⁸⁰ и M⁺ такие, как определены выше.

В дополнении к раскрытию настоящего документа, в конкретном воплощении, группа, которая замещена, имеет 1, 2, 3, или 4 заместителя, 1, 2 или 3 заместителя, 1 или

2 заместителя или 1 заместитель.

Понятно, что во всех определенных выше замещенных группах, полимеры, появившиеся путем определения заместителей с последующими заместителями для них самих (например, замещенный арил, имеющим замещенную арильную группу в качестве заместителя, который сам замещен замещенной арильной группой, которая дополнительно замещена замещенной арильной группой, и т.д.), не предназначены для включения в настоящий документ. В таких случаях, максимальное число таких заместителей равно трем. Например, последовательные замены замещенных арильных групп, конкретно рассматриваемые настоящим документом, ограничены следующим:

Если не указано иное, номенклатуру заместителей, которые явно не определены в настоящем документе, получают путем наименования терминальной части функциональной группы, а затем соседней функциональной группы по направлению к точке присоединения. Например, заместитель «арилалкилоксикарбонил» относится к группе (арил)-(алкил)-О-С(О)-.

Что касается любой из групп, раскрытых в настоящем документе, которые содержат один или несколько заместителей, понятно, конечно, что такие группы не содержат никаких замен или моделей замещения, которые стерически непрактичны и/или синтетически неосуществимы. Кроме того, целевые соединения включают все стереохимические изомеры, возникающие при замещении этих соединений.

Термин «фармацевтически приемлемая соль» означает соль, приемлемую для введения пациенту, такому как млекопитающее (соли с противоионами, имеющие приемлемую безопасность для млекопитающего при данном режиме дозирования). Такие соли могут быть полученных из фармацевтически приемлемых неорганических или органических оснований и из фармацевтически приемлемых неорганических или органических кислот. «Фармацевтически приемлемая соль» относится к фармацевтически приемлемым солям соединения, такие соли получают из множества органических и неорганических противоионов, хорошо известных в данной области техники, и включают, только в качестве примера, натрий, калий, кальций, магний, аммоний, тетраалкиламмония и им подобные; и когда молекула содержит основную функциональную группу, то соли органических или неорганических кислот, таких как гидрохлорид, гидробромид, формиат, тартрат, безилат, мезилат, ацетат, малеат, оксалат и им подобные.

Термин «его соль» означает соединение, при образовании которого протон кислоты был заменен катионом, таким как катион металла или органический катион и им подобными, где применимо, соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль, хотя этого не требуется для соли промежуточных соединений, которые не предназначены для введения пациенту. Например, соли соединений настоящего изобретения включают те, в которых соединение протонируется неорганической или органической кислотой с образованием катиона с сопряженным основанием неорганической или органической кислоты в качестве анионного компонента соли.

«Сольват» относится к комплексу, образованному комбинацией молекул растворителя с молекулами или с ионами растворенного вещества. Растворитель может представлять собой органическое соединение, неорганическое соединение или смесь обоих. Некоторые примеры растворителей включают, без ограничений, метанол, N,N-диметилформамид, тетрагидрофуран, диметилсульфоксид и воду. Если растворитель представляет собой воду, то образовавшийся сольват представляет собой гидрат.

«Стереизомер» и «стереоизомеры» относятся к соединениям, которые имеют одинаковые связи между атомами, но различное расположение атомов в пространстве.

Стереоизомеры включают цис-транс изомеры, E и Z изомеры, энантиомеры и диастереомеры.

«Таутомер» относится к альтернативным формам молекул, которые отличаются только электронным связыванием атомов и/или положением протона, такие как енол-кето и имин-енаминовые таутомеры или таутомерные формы гетероарильных групп, содержащих -N=C(H)-NH- кольцевое расположение атомов, такое как пиразолы, имидазолы, бензимидазолы, триазолы и тетразолы. Специалисту в данной области техники будет понятно, что возможны другие таутомерные кольцевые расположения атомов.

Понятно, что термин «или его соль или сольват или стереоизомер» предназначен для включения всех перестановок солей, сольватов и стереоизомеров, таких как сольват фармацевтически приемлемой соли стереоизомера соединения изобретения.

«Фармацевтически эффективное количество» и «терапевтически эффективное количество» относятся к количеству соединения, достаточному для лечения определенного расстройства или заболевания или одного или нескольких его симптомов и/или для предотвращения возникновения заболевания или расстройства. В отношении опухолегенных пролиферативных расстройств, фармацевтически или терапевтически эффективное количество включает количество, достаточное, среди прочего, для уменьшения опухоли или снижение скорости роста опухоли.

Термин «пациент» относится к субъектам, относящимся и не относящимся к человеку, особенно, к млекопитающим.

Термин «лечение» или «терапия» как применен в настоящем документе, означает лечение или терапию заболевания или состояния здоровья у пациента, такого как млекопитающее (в особенности, человек), которое включает: (a) предотвращение возникновения заболевания или состояния здоровья, такое как профилактическое лечение субъекта; (b) снижение интенсивности заболевания или состояния здоровья, такое как устранение или регрессию заболевания или состояния здоровья у пациента; (c) подавление заболевания или состояния здоровья, например, путем замедления или остановки развития заболевания или состояния здоровья у пациента; или (d) облегчение симптома заболевания или состояния здоровья у пациента.

Термины «полипептид», «пептид» и «белок», применяемые взаимозаменяемо в настоящем документе, относятся к полимерам аминокислот любой длины. Если специально не указано иное, «полипептид», «пептид» и «белок» могут включать генетически кодируемые и генетически не кодируемые аминокислоты, химически или биохимически модифицированные или производные аминокислот и полипептиды, имеющие модифицированные пептидные остовы молекул. Термин включает слитые белки, включая, без ограничений, белки слитые с гетерологичной аминокислотной последовательностью, слитые с гетерологичной и гомологичной лидерными последовательностями, белки которые содержат, по меньшей мере, один N-концевой остаток метионина (например, для облегчения продукции в рекомбинантной бактериальной клетке-хозяине); иммунологически меченые белки; и им подобные.

Термины «нативная аминокислотная последовательность» или «родительская аминокислотная последовательность», применяемые взаимозаменяемо в настоящем документе, относятся к аминокислотной последовательности полипептида до модификации для включения модифицированного аминокислотного остатка.

Термины «аналог аминокислоты», «аминокислота не природного происхождения» и им подобные могут применяться взаимозаменяемо и включают подобные аминокислотам соединения, которые по структуре и/или общей форме похожи на одну

или несколько аминокислот, обычно обнаруживаемых в природных белках (например, Ala или A, Cys или C, Asp или D, Glu или E, Phe или F, Gly или G, His или H, Ile или I, Lys или K, Leu или L, Met или M, Asn или N, Pro или P, Gln или Q, Arg или R, Ser или S, Thr или T, Val или V, Trp или W, Tyr или Y). Аналоги аминокислот также включают природные аминокислоты с модифицированными боковыми цепями или остовами молекул. Аналоги аминокислот также включают аналоги аминокислот с той же стереохимией, что и в природной D-форме, а также L-форму аналогов аминокислот. В некоторых случаях, аналоги аминокислот обладают структурами остова молекулы, и/или структурами боковой цепи одной или нескольких природных аминокислот, различие (различия) заключено(заключены) в одной или нескольких модифицированных группах в молекуле. Такая модификация может включать, без ограничений, замену атома (такого как N) родственным атомом (таким как S), добавление группы (такой как метил или гидроксил и т.п.) или атома (такого как Cl или Br и т.п.), удаление группы, замена ковалентной связи (одиночной связи двойной связью и т.п.), или их комбинации. Например, аналоги аминокислот могут включать α -гидроксикислоты и α -аминокислоты и им подобные.

Термины «аминокислотная боковая цепь» или «боковая цепь аминокислоты» и им подобные могут быть применены для отнесения к заместителю, прикрепленному к α -углероду аминокислотного остатка, включая природные аминокислоты, неприродные аминокислоты и аналоги аминокислот. Боковая цепь аминокислоты также может включать боковую цепь аминокислоты, как описано в контексте модифицированных аминокислот, и/или конъюгаты, описанные в настоящем документе.

Термин «углевод» и ему подобные могут быть применены для отнесения к единицам мономеров и/или к полимерам моносахаридов, дисахаридов, олигосахаридов и полисахаридов. Термин сахар может быть применен для отнесения к меньшим углеводам, таким как моносахариды, дисахариды. Термин «производное углевода» включает соединения, где одна или несколько функциональных групп представляющего интерес углевода замещены (заменены любым удобным заместителем), модифицированы (превращены в другую группу с помощью любых подходящих химических приемов) или отсутствуют (например, удалены или заменены H). Множество углеводов и производных углеводов доступно и могут быть адаптированы для применения в соединениях и конъюгатах настоящего изобретения.

Термин «антитело» применяют в самом широком смысле, и он включает моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела и мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), гуманизированные антитела, одноцепочечные антитела, химерные антитела, фрагменты антител (например, Fab-фрагменты) и им подобные. Антитело способно к связыванию целевого антигена (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York). Целевой антиген может иметь один или несколько сайтов связывания, также называемых эпитопами, которые узнают области, определяющие комплементарность (CDRs), образованные одной или несколькими вариабельными областями антитела.

Термин «природное антитело» относится к антителу, в котором тяжелые и легкие цепи антитела были созданы и спарены иммунной системой многоклеточных организмов. Селезенка, лимфатические узлы, костный мозг и сыворотка крови представляют собой примеры тканей, которые продуцируют природные антитела. Например, антитела, продуцируемые антитело-продуцирующими клетками, изолированные из первого животного, иммунизированного антигеном, представляют собой природные антитела.

Термин «гуманизированные антитела» или «гуманизированный иммуноглобулин» относится к нечеловеческому (например, мышинному или кроличьему) антителу, содержащему одну или несколько аминокислот (в каркасной области, в константной области или в CDR, например), которые замещены соответственно расположенной аминокислотой из антитела человека. В общем, гуманизированные антитела вызывают снижение иммунного ответа у человека-хозяина, по сравнению с негуманизированной версией того же антитела. Антитела могут быть гуманизированы с помощью множества методик, известных в данной области техники, включая, например, CDR-пересадку (EP 239400; публикация PCT WO 91/09967; патенты США №№5225539; 5530101; и 5585089), рекомбинацию поверхностных остатков или изменение поверхности варибельного домена (EP 592,106; EP 519,596; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. et al., PNAS 91:969-973 (1994)), и перестановку цепей (патент США №5565332). В некоторых воплощениях, замены в каркасной области идентифицируют путем моделирования взаимодействий остатков CDR и каркасной области для идентификации остатков каркасной области, важных для связывания антигена, и путем сравнения последовательности для идентификации необычных остатков каркасной области в определенных положениях (смотри, например, патент США №5,585,089; Riechmann et al., Nature 332:323 (1988)). Дополнительные способы гуманизации антител, рассматриваемые для применения в настоящем изобретении, описаны в патентах США №№5750078; 5502167; 5705154; 5770403; 5698417; 5693493; 5558864; 4935496; и 4816567 и в публикациях PCT WO 98/45331 и WO 98/45332. В конкретных воплощениях, кроличье антитело изобретения может быть гуманизировано в соответствии со способами, изложенными в US 20040086979 и US 20050033031. Соответственно, описанные выше антитела могут быть гуманизированы с помощью способов, которые хорошо известны в данной области техники.

Термин «химерные антитела» относятся к антителам, гены легкой и тяжелой цепи которых были построены, как правило, генно-инженерными способами, из генов варибельной и константной области антитела, принадлежащих к разным видам. Например, варибельные сегменты генов из моноклонального антитела мыши могут быть соединены с постоянными сегментами человека, таким как гамма 1 и гамма 3. Пример терапевтического химерного антитела представляет собой гибридный белок, составленный из варибельного или антиген-связывающего домена из антитела мыши и константного или эффекторного домена из антитела человека, хотя домены из других видов млекопитающих могут быть применены.

Полипептид иммуноглобулина варибельной области легкой и тяжелой цепи иммуноглобулина состоит из каркасной области (FR), прерываемой тремя гиперварибельными областями, также называемыми «определяющие комплементарность области» или «CDRs». Протяженность каркасной области и CDRs была определена (смотри, «Sequences of Proteins of Immunological Interest», E. Kabat et al., U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Каркасные области антитела, которые представляют собой объединенные каркасные области составляющей легкой и тяжелой цепей, служат для позиционирования и для выравнивания CDRs. CDRs в первую очередь ответственны за связывание с эпитопом антигена.

На протяжении всего настоящего раскрытия, нумерация остатков в тяжелой цепи иммуноглобулина и в легкой цепи иммуноглобулина была такая же как в работе Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), специально включенной в настоящий документ

путем отсылки.

«Родительский полипептид Ig» представляет собой полипептид, включающий аминокислотную последовательность, которая лишена альдегид-меченой константной области, как описано в настоящем документе. Родительский полипептид может включать нативную последовательность константной области, или может включать константную область с уже существующими модификациями аминокислотной последовательности (такими как вставки, делеции и/или замены).

В контексте полипептида Ig, термин «константная область» хорошо понятен в данной области техники и относится к С-концевой области тяжелой цепи Ig или легкой цепи Ig. Константная область тяжелой цепи Ig включает домены CH1, CH2 и CH3 (и домены CH4, где тяжелая цепь представляет собой μ - или ϵ -тяжелую цепь). В тяжелой цепи нативного Ig, домены CH1, CH2, CH3 (и, если присутствует, CH4) начинаются сразу же после (С-конец к) варибельной (VH) области тяжелой цепи, и каждый из них состоит из от примерно 100 аминокислот до примерно 130 аминокислот в длину. В легкой цепи нативного Ig, константная область начинается сразу же после (С-конец) варибельной (VL) области легкой цепи и равна примерно от 100 аминокислот до 120 аминокислот в длину.

Как применен в настоящем документе, термин «CDR» или «область, определяющая комплементарность» предназначен для обозначения несмежных антигенсвязывающих центров, найденных в пределах варибельной области обоих полипептидов тяжелой и легкой цепи. CDRs были описаны в работах Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991); Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); и MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), где определения включают перекрывающиеся или подмножества аминокислотных остатков, при сравнении против друг друга. Тем не менее, применение любого определения, относящегося к CDR антителу или привитому антителу или его вариантам, предназначено для нахождения в пределах объема термина, как определен и применен в настоящем документе. Аминокислотные остатки, которые охватывают CDRs, как определены в каждой из указанных выше цитируемых ссылок, перечислены в приведенной ниже таблице 1 в качестве сравнения.

Таблица 1. Определения CDR

	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96

¹ Нумерация остатков следует номенклатуре Kabat et al., supra

² Нумерация остатков следует номенклатуре Chothia et al., supra

³ Нумерация остатков следует номенклатуре MacCallum et al., supra

Термин «генетически кодируемый», как применен в отношении аминокислотной последовательности полипептида, пептида или белка, означает, что аминокислотная последовательность состоит из аминокислотных остатков, которые способны к образованию путем транскрипции и трансляции нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность, где транскрипция и/или трансляция может иметь

место в клетке или в бесклеточной *in vitro* системе транскрипции/трансляции.

Термин «контрольные последовательности» относится к последовательностям ДНК, которые облегчают экспрессию функционально связанной кодирующей последовательности в конкретной системе экспрессии, например, в клетке
 5 млекопитающих, в бактериальной клетке, в бесклеточном синтезе и т.п. Контрольные последовательности, которые подходят для прокариотической системы, например, включают промотор, необязательно, последовательность оператора и сайт связывания рибосомы. Системы эукариотической клетки могут применять промоторы, сигналы полиаденилирования и энхансеры.

10 Нуклеиновая кислота «функционально связана», если она помещена в функциональные взаимоотношения с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, ДНК для пре-последовательности или секреторного лидера функционально связаны с ДНК для полипептида, если его экспрессировали как пребелок, который участвует в секреции полипептида; промотор или энхансер функционально
 15 связан с кодирующей последовательностью, если это влияет на транскрипцию последовательности; или сайт связывания рибосом функционально связан с кодирующей последовательностью, если он расположен так, чтобы облегчить инициирование трансляции. В общем, «функционально связан» означает, что последовательности ДНК связываясь, представляют собой смежные последовательности и, в случае секреторного
 20 лидера, смежные последовательности и последовательности в рамке считывания. Связывание осуществляется путем лигирования или посредством реакций амплификации. Синтетические олигонуклеотидные адаптеры или линкеры могут быть применены для связывания последовательностей в соответствии с обычной практикой.

Термин «экспрессионная кассета», как применен в настоящем документе, относится
 25 к сегменту нуклеиновой кислоты, обычно ДНК, который может быть вставлен в нуклеиновую кислоту (например, с применением сайтов рестрикции, совместимых с лигированием, в представляющую интерес конструкцию или путем гомологичной рекомбинации в представляющую интерес конструкцию или в геном клетки-хозяина). В общем, сегмент нуклеиновой кислоты включает полинуклеотид, который кодирует
 30 представляющий интерес полипептид и кассету и сайты рестрикции, предназначенные для облегчения вставки кассеты в правильную рамку считывания для транскрипции и трансляции. Экспрессионные кассеты также могут включать элементы, которые облегчают экспрессию полинуклеотида, кодирующего представляющий интерес полипептид в клетке-хозяине. Данные элементы могут включать, без ограничений:
 35 промотор, минимальный промотор, энхансер, элемент отклика, последовательность терминатора, последовательность полиаденилирования и им подобные.

Как применен в настоящем документе термин «изолированный» предназначен для описания представляющего интерес соединения, который находится в среде, отличной от той, в которая соединение встречается в природе. «Изолированный» предназначен
 40 для включения соединения, которое находится в образцах, существенно обогащенных представляющим интерес соединением, и/или в которых представляющее интерес соединение частично или существенно очищено.

Как применен в настоящем документе, термин «существенно очищенный» относится к соединению, которые извлекают из природного окружения и которое, по меньшей
 45 мере, на 60% свободно, по меньшей мере, на 75% свободно, по меньшей мере, на 80% свободно, по меньшей мере, на 85% свободно, по меньшей мере, на 90% свободно, по меньшей мере, на 95% свободно, по меньшей мере, на 98% свободно, или более чем на 98% свободно, от других компонентов, с которыми оно связано в природе.

Термин «физиологические условия» предназначен для охвата условий, совместимых с живыми клетками, например, преимущественно водные условия, температура, pH, соленость и т.п., которые совместимы с живыми клетками.

Термин «реагирующий партнер» означает молекулу или молекулярный фрагмент, который специфически реагирует с другим реагирующим партнером для получения продукта реакции. Типичные реагирующие партнеры включают цистеин или серин мотива сульфатазы и формилглицин-генерирующий фермент (FGE), которые реагируют в мотиве с образованием продукта реакции, преобразованной метки альдегида, содержащей вместо цистеина или серина формилглицин (FGly). Другие типичные реагирующие партнеры включают альдегидный остаток fGly преобразованной метки альдегида (например, реакционноспособную альдегидную группу) и «взаимодействующий с альдегидом реагирующий партнер», который включает взаимодействующую с альдегидом группу и представляющий интерес фрагмент и который реагирует с образованием продукта реакции, меченого модифицированным альдегидом полипептида, имеющего представляющего интерес фрагмент, конъюгированный с модифицированным полипептидом через модифицированный остаток fGly.

«N-конец» относится к терминальному аминокислотному остатку полипептида, имеющему свободную аминогруппу, данная аминогруппа на не-N-концевых аминокислотных остатках, как правило, образует часть ковалентного скелета полипептида.

«С-конец» относится к терминальному аминокислотному остатку полипептида, имеющему свободную карбоксильную группу, данная карбоксильная группа на не-С-концевых аминокислотных остатках, как правило, образует часть ковалентного скелета полипептида.

Термин «внутренний сайт», как применен в отсылке к полипептиду или к аминокислотной последовательности полипептида, означает область полипептида, которая находится не на N-конце или не на С-конце.

До того, как настоящее изобретение будет описано далее, следует понимать, что данное изобретение не ограничено конкретными описанными воплощениями, как таковые они могут, конечно, варьировать. Также следует понимать, что терминология, примененная в настоящем документе, предназначена для описания только конкретных воплощений и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

В тех случаях, когда предоставлен диапазон значений, понятно, что каждое промежуточное значение, до десятой доли единицы нижнего предела, если контекст явно не диктует иное, между верхним и нижним пределом этого диапазона и любое другое заявленное или промежуточное значение в указанном диапазоне, охватывается настоящим изобретением. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут быть независимо включены в меньшие диапазоны и также охватываются настоящим изобретением, с учетом любого конкретного исключенного предела в указанном диапазоне. Если заявленный диапазон включает один или оба предела, в изобретение также включены диапазоны, исключающие один или оба из указанных включенных пределов.

Понятно, что некоторые признаки изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных воплощений, также могут быть представлены в комбинации с единственным воплощением. Наоборот, различные признаки изобретения, которые, для краткости, описаны в контексте единственного воплощения, также могут быть

представлены по отдельности или в любой подходящей субкомбинации. Все комбинации воплощений, относящихся к изобретению, специфически охвачены настоящим изобретением и раскрыты в настоящем документе, как если бы каждая и все комбинации были индивидуально и явно раскрыты, до такой степени, что такие комбинации охватывают предмет изобретения, который, например, представляет собой соединения, которые представляют собой стабильные соединения (т.е. соединения, которые могут быть получены, изолированы, охарактеризованы и проверены на биологическую активность). Кроме того, все субкомбинации различных воплощений и их элементы (например, элементы химической группы, перечисленные в воплощениях, описывающих такие переменные) также специфически охвачены настоящим изобретением и раскрыты в настоящем документе, как если бы каждая и все такие субкомбинации были индивидуально и явно раскрыты в настоящем документе.

Если не указано иное, все технические и научные термины, примененные в настоящем документе, имеют такое же значение, как обычно понимается обычным специалистом в области техники, к которому относится это изобретение. Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем документе, также могут быть применены в практике или тестировании настоящего изобретения, теперь будут описаны предпочтительные способы и материалы. Все упомянутые публикации в настоящем документе включены в настоящий документ путем отсылки для раскрытия и описания способов и/или материалов, в связи с которыми эти публикации были процитированы.

Следует отметить, что как применены в настоящем документе и в прилагаемой формуле изобретения, единственные формы «a», «an» и «the» включают множественное число, если контекст явно не диктует иное. Кроме того, следует отметить, что могут быть разработаны требования для исключения любого необязательного элемента. Таким образом, это утверждение предназначено служить в качестве предшествующей основы для применения такой исключительной терминологии как «исключительно», «только» и им подобных в связи с перечислением заявленных элементов или применением «отрицательного» ограничения.

Понятно, что некоторые признаки изобретения, которые для ясности описаны в контексте отдельных воплощений, также могут быть обеспечены в комбинации в единственном воплощении. Наоборот, различные признаки изобретения, которые, для краткости, описаны в контексте единственного воплощения, также могут быть обеспечены по отдельности или в любой подходящей субкомбинации.

Обсуждаемые в настоящем документе публикации предназначены исключительно для их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничего в настоящем документе не должно быть истолковано как допущение того, что настоящее изобретение не имеет права переуступить такие публикации в силу предшествующего изобретения. Кроме того, даты предоставленных публикации могут отличаться от фактических дат публикации, которые может потребоваться независимо подтвердить.

Осуществление изобретения

Настоящее раскрытие обеспечивает конъюгат следующей структуры: анти-CD22 антители-майтансин. Раскрытие также охватывает способы получения таких конъюгатов, а также способы их применения. Воплощения каждого подробно описаны в приведенных ниже разделах.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство

Настоящее раскрытие обеспечивает конъюгаты, например, конъюгаты антитело-лекарственное средство. Термин «конъюгат» означает, что первый фрагмент (например,

антитело) стабильно связан со вторым фрагментом (например, лекарственным средством). Например, конъюгат майтансина включает майтансин (например, фрагмент активного агента майтансина), стабильно связанный с другим фрагментом (например, с антителом). Термин «стабильно связанный» означает, что фрагмент связан с другим фрагментом или структурой в стандартных условиях. В некоторых воплощениях, первый и второй фрагменты связаны друг с другом одной или несколькими ковалентными связями.

В некоторых воплощениях, конъюгат представляет собой конъюгат полипептида, который включает полипептид, конъюгированный со вторым фрагментом. В некоторых воплощениях, фрагмент, конъюгированный с полипептидом, может быть любым из множества представляющих интерес фрагментов, таких как, без ограничений, детектируемая метка, лекарственное средство, водорастворимый полимер, или фрагмент для иммобилизации полипептида в мембране или на поверхности. В некоторых воплощениях, конъюгат представляет собой конъюгат майтансина, где полипептид конъюгирован с майтансином или фрагментом активного агента майтансина. «Майтансин», «фрагмент майтансина», «фрагмент активного агента майтансина» и «майтансиноид» относятся к майтансину и его аналогам и производным и к фармацевтически активным фрагментам майтансина и/или его частей. Майтансин, конъюгированный с полипептидом, может быть любым из множества фрагментов майтансиноида, таких как, без ограничений, майтансин и его аналоги и производные, как описаны в настоящем документе.

Представляющий интерес фрагмент может быть конъюгирован с полипептидом в любом желаемом сайте полипептида. Таким образом, настоящее раскрытие обеспечивает, например, модифицированный полипептид, имеющий фрагмент, конъюгированный в сайте или рядом с С-концом полипептида. Другие примеры включают модифицированный полипептид, имеющий фрагмент, конъюгированный в положении или рядом с N-концом полипептида. Примеры также включают модифицированный полипептид, имеющий фрагмент, конъюгированный в положении между С-концом и N-концом полипептида (например, на внутреннем сайте полипептида). Также возможны комбинации приведенного выше, в которых модифицированный полипептид конъюгирован с двумя или несколькими фрагментами.

В некоторых воплощениях, конъюгат настоящего раскрытия включает майтансин, конъюгированный с аминокислотным остатком полипептида на α -углероде аминокислотного остатка. Иначе говоря, конъюгат майтансина включает полипептид, в котором боковые цепи одного или нескольких аминокислотных остатков в полипептиде были модифицированы для прикрепления к майтансину (например, прикрепления к майтансину через линкер, как описано в настоящем документе). Например, конъюгат майтансина включает полипептид, где α -углерод одного или нескольких аминокислотных остатков в полипептиде был модифицирован для прикрепления к майтансину (например, прикрепления к майтансину через линкер, как описано в настоящем документе).

Воплощения настоящего раскрытия включают конъюгаты, где полипептид конъюгирован с одним или несколькими фрагментами, например, с 2 фрагментами, 3 фрагментами, 4 фрагментами, 5 фрагментами, 6 фрагментами, 7 фрагментами, 8 фрагментами, 9 фрагментами или 10 или более фрагментами. Фрагменты могут быть конъюгированы с полипептидом в одном или нескольких сайтах в полипептиде. Например, один или несколько фрагментов могут быть конъюгированы с единственным аминокислотным остатком полипептида. В некоторых случаях, один фрагмент

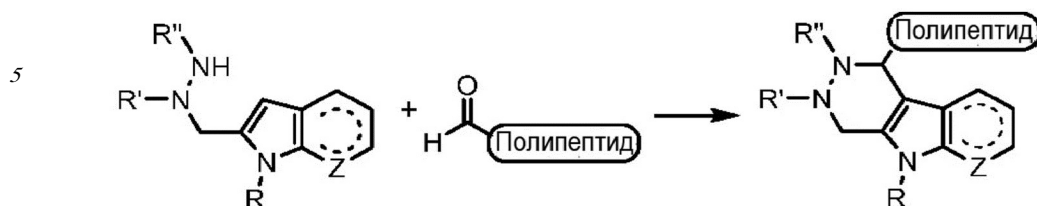
конъюгирован с аминокислотным остатком полипептида. В других воплощениях, два фрагмента могут быть конъюгированы с одним и тем же аминокислотным остатком полипептида. В других воплощениях, первый фрагмент конъюгирован с первым аминокислотным остатком полипептида и второй фрагмент конъюгирован со вторым аминокислотным остатком полипептида. Комбинации приведенного выше также возможны, например, если полипептид конъюгирован с первым фрагментом на первом аминокислотном остатке и конъюгирован с двумя другими фрагментами на втором аминокислотном остатке. Другие комбинации также возможны, такие как, без ограничений, полипептид конъюгирован с первым и вторым фрагментом на первом аминокислотном остатке и конъюгирован с третьим и четвертым фрагментом на втором аминокислотном остатке и т.п.

Один или несколько аминокислотных остатков полипептида, который конъюгирован с одним или несколькими фрагментами, может представлять собой природные аминокислоты, неприродные аминокислоты или их комбинации. Например, конъюгат может включать фрагмент, конъюгированный с природным аминокислотным остатком полипептида. В других случаях, конъюгат может включать фрагмент, конъюгированный с неприродным аминокислотным остатком полипептида. Один или несколько фрагментов могут быть конъюгированы с полипептидом на единственном природном или неприродном аминокислотном остатке, как описано выше. Один или несколько природных или неприродных аминокислотных остатков в полипептиде могут быть конъюгированы с фрагментом или фрагментами, как описаны в настоящем документе. Например, каждый из двух (или более) аминокислотных остатков (например, природные или неприродные аминокислотные остатки) в полипептиде может быть конъюгирован с одним или двумя фрагментами, так что множество сайтов в полипептиде будет модифицировано.

Как описан в настоящем документе, полипептид может быть конъюгирован с одним или несколькими фрагментами. В некоторых воплощениях, представляющий интерес фрагмент представляет собой химическое соединение, такое как лекарственное средство или детектируемая метка. Например, лекарственное средство (например, майтансин) может быть конъюгировано с полипептидом, или в других воплощениях, детектируемая метка может быть конъюгирована с полипептидом. Таким образом, например, воплощения настоящего раскрытия включают, без ограничений, следующее: конъюгат полипептида и лекарственного средства; конъюгат полипептида и детектируемой метки; конъюгат двух или нескольких лекарственных средств и полипептида; конъюгат двух или нескольких детектируемых меток и полипептидов; и им подобные.

В некоторых воплощениях, полипептид и представляющий интерес фрагмент конъюгированы через сопрягающий фрагмент. Например, каждый из полипептида и представляющего интерес фрагмента могут быть связаны (например, ковалентно связаны) с сопрягающим фрагментом, таким образом, непрямо связывая полипептид и представляющий интерес фрагмент (например, лекарственное средство, такое как майтансин) вместе через сопрягающий фрагмент. В некоторых случаях, сопрягающий фрагмент включает соединение гидразинил-индолил или гидразинил-пирроло-пиридинила, или производное соединения гидразинил-индолила или гидразинил-пирроло-пиридинила. Например, общая схема для представляющего интерес сопрягающего фрагмента (например, майтансина) с полипептидом через сопрягающий фрагмент гидразинил-индолил или гидразинил-пирроло-пиридинил показана на приведенной ниже общей схеме реакции. Сопрягающий фрагмент гидразинил-индолил и гидразинил-пирроло-пиридинил также обозначают в настоящем документе как сопрягающий

фрагмент гидразино-изо-Пикте-Шпенглер (HIPS) и сопрягающий фрагмент аза-гидразино-изо-Пикте-Шпенглер (azaHIPS), соответственно.



В приведенной выше схеме реакции, R представляет собой представляющий интерес фрагмент (например, майтансин), который конъюгирован с полипептидом. Как показано на приведенной выше схеме реакции, полипептид, который включает остаток 2-формилглицина (fGly) реагирует с лекарственным средством (например, с майтансином), который был модифицирован для включения сопрягающего фрагмента (например, сопрягающий фрагмент гидразинил-индолила или гидразинил-пирроло-пиридирила) для получения конъюгата полипептида, прикрепленного к сопрягающему фрагменту, таким образом, соединяя майтансин с полипептидом через сопрягающий фрагмент.

Как описан в настоящем документе, фрагмент может быть любым из множества фрагментов, таким как, без ограничений, химическое соединение, таким как детектируемая метка или лекарственное средство (например, а майтансиноид). R' и R'' каждый независимо могут быть любым желаемым заместителем, таким как, без ограничений, водород, алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, алкоксильная группа, замещенная алкоксильная группа, аминогруппа, замещенная аминогруппа, карбоксил, карбоксильный эфир, ацил, ацилоксильная группа, ациламино-группа, аминоксил, алкиламид, замещенный алкиламид, сульфонил, тиаалкоксильная группа, замещенная тиаалкоксильная группа, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, гетероцикл и замещенный гетероцикл. Z может представлять собой CR¹¹, NR¹², N, O или S, где R¹¹ и R¹² каждый независимо выбирают из любого из заместителей, описанных для приведенной выше R' и R''.

Другие гидразинил-индолил или гидразинил-пирроло-пиридинил сопрягающие фрагменты также возможны, как показано на конъюгатах и соединениях, описанных в настоящем документе. Например, гидразинил-индолил или гидразинил-пирроло-пиридинил сопрягающие фрагменты могут быть модифицированы для прикрепления (например, ковалентного прикрепления) к линкеру. Как таковые, воплощения настоящего раскрытия включают гидразинил-индолил или гидразинил-пирроло-пиридинил сопрягающий фрагмент, прикрепленный к лекарственному средству (например, к майтансину) через линкер. Различные воплощения линкера, который может сопрягать гидразинил-индолил или гидразинил-пирроло-пиридинил сопрягающий фрагмент с лекарственным средством (например, с майтансином) подробно описаны в настоящем документе.

В некоторых воплощениях, полипептид может быть конъюгирован с представляющим интерес фрагментом, где полипептид модифицируют перед конъюгацией с представляющим интерес фрагментом. Модификация полипептида может давать модифицированный полипептид, который содержит одну или несколько реакционноспособных групп, подходящих для конъюгации с представляющим интерес фрагментом. В некоторых случаях, полипептид может быть модифицирован в одном или нескольких аминокислотных остатках для обеспечения одной или нескольких

реакционноспособных групп, подходящих для конъюгации с представляющим интерес фрагментом (например, с фрагментом, который включает сопрягающий фрагмент, такой как гидразинил-индолил или гидразинил-пирроло-пиридинил сопрягающий фрагмент, как описана выше). Например, полипептид может быть модифицирован для

5 включения реакционноспособной альдегидной группы (например, реакционноспособного альдегида). Реакционноспособный альдегид может быть включен в «альдегидную метку» или «ald-tag», которая как применено в настоящем документе относится к аминокислотной последовательности, полученной из мотива сульфатазы (например, L(C/S)TPSR), который был преобразован под действием формилглицин-

10 генерирующего фермента (FGE) для содержания 2-формилглицинового остатка (обозначенного в настоящем документе как «FGly»). Остаток FGly созданный под действием FGE также может быть обозначен как «формилглицин». Иными словами, термин «альдегидная метка» применяют в настоящем документе по отношению к аминокислотной последовательности, которая включает «преобразованный» мотив

15 сульфатазы (т.е. мотив сульфатазы, в котором остаток цистеина или серина был преобразован в FGly под действием FGE, например, L(FGly)TPSR). Преобразованный мотив сульфатазы может быть получен из аминокислотной последовательности, которая включает «непреобразованный» мотив сульфатазы (т.е., мотив сульфатазы, в котором остаток цистеин или серин не были преобразованы в FGly под действием FGE, но могут

20 быть преобразованы, например, непреобразованный мотив сульфатазы с последовательностью: L(C/S)TPSR). Термин «преобразование», как применен в контексте действия формилглицин-генерирующего фермента (FGE) на мотив сульфатазы, относится к биохимической модификации остатка цистеина или серина в мотиве сульфатазы в остаток формилглицина (FGly) (например, Cys в FGly, или Ser в FGly). Дополнительные

25 аспекты альдегидных меток и их применения в сайт-специфической модификации белков описаны в патенте США №7985783 и патенте США №8729232, раскрытия каждого из которых включены в настоящий документ путем отсылки.

В некоторых случаях, модифицированный полипептид, содержащий остаток Fgly, может быть конъюгирован с представляющим интерес фрагментом в реакции FGly с

30 соединением (например, с соединением, содержащим гидразинил-индолил или гидразинил-пирроло-пиридинил сопрягающий фрагмент, как описано выше). Например, FGly-содержащий полипептид может контактировать с реакционноспособным лекарственным средством, содержащим партнера, в условиях, подходящих для обеспечения конъюгации лекарственного средства с полипептидом. В некоторых

35 случаях, реакционноспособное лекарственное средство, содержащее партнера, может включать гидразинил-индолил или гидразинил-пирроло-пиридинил сопрягающий фрагмент, как описан выше. Например, майтансин может быть модифицирован для включения гидразинил-индолил или гидразинил-пирроло-пиридинил сопрягающего

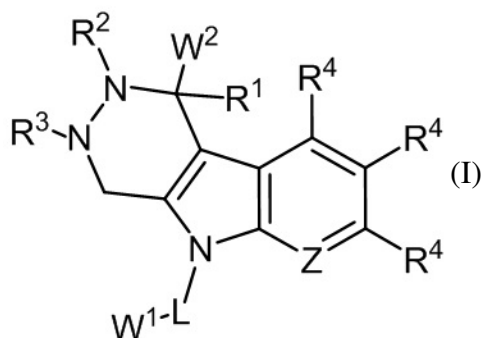
40 фрагмента. В некоторых случаях, майтансин прикреплен к гидразинил-индолилу или гидразинил-пирроло-пиридилилу, например, ковалентно прикреплен к гидразинил-индолилу или гидразинил-пирроло-пиридилилу через линкер, как подробно описано в настоящем документе.

В некоторых воплощениях, конъюгат настоящего раскрытия включает полипептид (например, антитело, такое как анти-CD22 антитело), имеющий, по меньшей мере, один

45 модифицированный аминокислотный остаток. Модифицированный аминокислотный остаток полипептида может быть сопряжен с лекарственным средством (например, майтансином), содержащим гидразинил-индолил или гидразинил-пирроло-пиридинил сопрягающий фрагмент, как описан выше. В некоторых воплощениях,

модифицированный аминокислотный остаток полипептида (например, анти-CD22 антитело) может быть получен из остатка цистеина или серина, которые были преобразованы в остаток FGly, как описано выше. В некоторых воплощениях, остаток FGly конъюгирован с лекарственным средством, содержащим гидразинил-индолил или гидразинил-пирроло-пиридирил сопрягающий фрагмент, как описан выше, для обеспечения конъюгата настоящего раскрытия, где лекарственное средство конъюгировано с полипептидом через гидразинил-индолил или гидразинил-пирроло-пиридирил сопрягающий фрагмент. Как применен в настоящем документе, термин FGly' относится к модифицированному аминокислотному остатку полипептида (например, анти-CD22 антителу), который сопряжен с представляющим интерес фрагментом (например, лекарственным средством, таким как майтансиноид).

В некоторых воплощениях, конъюгат включает, по меньшей мере, один модифицированный аминокислотный остаток формулы (I), описанный в настоящем документе. Например, конъюгат может включать, по меньшей мере, один модифицированный аминокислотный остаток с боковой цепью формулы (I):



в которой

Z представляет собой CR⁴ или N;

R¹ выбирают из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила;

R² и R³ каждый независимо выбирают из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкоксильной группы, замещенной алкоксильной группы, аминогруппы, замещенной аминогруппы, карбоксила, карбоксильного эфира, ацила, ацилоксильной группы, ацил-аминогруппы, аминоксила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиаалкоксильной группы, замещенной тиаалкоксильной группы, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила, или R² и R³ необязательно циклически связаны с образованием 5- или 6-членного гетероциклила;

каждый R⁴ независимо выбирают из водорода, галогена, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкоксильной группы, замещенной алкоксильной группы, аминогруппы, замещенной аминогруппы, карбоксила, карбоксильного эфира, ацила, ацилоксильной группы, ацил-аминогруппы, аминоксила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиаалкоксильной группы, замещенной тиаалкоксильной группы, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила;

L представляет собой линкер, включающий $-(T^1-V^1)_a-(T^2-V^2)_b-(T^3-V^3)_c-(T^4-V^4)_d-$, где каждый из a, b, c и d независимо равен 0 или 1, где сумма a, b, c и d равна от 1 до 4;

T^1 , T^2 , T^3 и T^4 каждый независимо выбирают из (C_1-C_{12}) алкила, замещенного

(C_1-C_{12})алкила, $(EDA)_w$, $(PEG)_n$, $(AA)_p$, $-(CR^{13}OH)_h-$, пиперидин-4-амино-(4AP), ацетальной группы, гидразина, дисульфида и сложного эфира, где EDA представляет собой этилендиаминовый фрагмент, PEG представляет собой полиэтиленгликоль или модифицированный полиэтиленгликоль и AA представляет собой аминокислотный остаток, в котором w представляет собой целое число от 1 до 20, n представляет собой целое число от 1 до 30, p представляет собой целое число от 1 до 20 и h представляет собой целое число от 1 до 12;

V^1 , V^2 , V^3 и V^4 каждый независимо выбирают из группы, состоящей из ковалентной связи, $-CO-$, $-NR^{15}-$, $-NR^{15}(CH_2)_q-$, $-NR^{15}(C_6H_4)-$, $-CONR^{15}-$, $-NR^{15}CO-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-O-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-SO_2-$, $-SO_2NR^{15}-$, $-NR^{15}SO_2-$ и $-P(O)OH-$, в которой q представляет собой целое число от 1 до 6;

каждый R^{13} независимо выбирают из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила;

каждый R^{15} независимо выбирают из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, карбоксила, карбоксилевого эфира, ацила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила;

W^1 представляет собой майтансиноид; и

W^2 представляет собой анти-CD22 антитело.

В некоторых воплощениях, Z представляет собой CR^4 или N. В некоторых воплощениях, Z представляет собой CR^4 . В некоторых воплощениях, Z представляет собой N.

В некоторых воплощениях, R^1 выбирают из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила. В некоторых воплощениях, R^1 представляет собой водород. В некоторых воплощениях, R^1 представляет собой алкил или замещенный алкил, такой как C_{1-6} -алкил или замещенный C_{1-6} -алкил, или C_{1-4} -алкил или замещенный C_{1-4} -алкил, или C_{1-3} -алкил или замещенный C_{1-3} -алкил. В некоторых воплощениях, R^1 представляет собой алкенил или замещенный как C_{2-6} алкенил или C_{2-6} замещенный алкенил, или C_{2-4} алкенил или C_{2-4} замещенный алкенил, или C_{2-3} алкенил или C_{2-3} замещенный алкенил. В некоторых воплощениях, R^1 представляет собой алкинил или замещенный алкинил, такой как C_{2-6} алкенил или C_{2-6} замещенный алкенил, или C_{2-4} алкенил или C_{2-4} замещенный алкенил, или C_{2-3} алкенил или C_{2-3} замещенный алкенил. В некоторых воплощениях, R^1 представляет собой арил или

замещенный арил, такой как C_{5-8} -арил или C_{5-8} замещенный арил, такой как C_5 арил или C_5 замещенный арил, или C_6 арил или C_6 замещенный арил. В некоторых

воплощениях, R^1 представляет собой гетероарил или замещенный гетероарил, такой как C_{5-8} гетероарил или C_{5-8} замещенный гетероарил, такой как C_5 гетероарил или C_5 замещенный гетероарил, или C_6 гетероарил или C_6 замещенный гетероарил. В некоторых

воплощениях, R^1 представляет собой циклоалкил или замещенный циклоалкил, такой как C_{3-8} -циклоалкил или C_{3-8} замещенный циклоалкил, такой как C_{3-6} -циклоалкил или замещенный C_{3-6} -циклоалкил, или C_{3-5} -циклоалкил или замещенный C_{3-5} -циклоалкил.

В некоторых воплощениях, R^1 представляет собой гетероциклил или замещенный гетероциклил, такой как C_{3-8} -гетероциклил или замещенный C_{3-8} -гетероциклил, такой как C_{3-6} -гетероциклил или замещенный C_{3-6} -гетероциклил, или C_{3-5} -гетероциклил или замещенный C_{3-5} -гетероциклил.

В некоторых воплощениях, R^2 и R^3 каждый независимо выбирают из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкоксильной группы, замещенной алкоксильной группы, аминогруппы, замещенной аминогруппы, карбоксила, карбоксильного эфира, ацила, ацилоксильной группы, ацил-аминогруппы, аминокислоты, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиоалкоксильной группы, замещенной тиоалкоксильной группы, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероцикла и замещенного гетероцикла, или R^2 и R^3 необязательно циклически связаны с образованием 5 или 6-членного гетероцикла.

В некоторых воплощениях, R^2 выбирают из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкоксильной группы, замещенной алкоксильной группы, аминогруппы, замещенной аминогруппы, карбоксила, карбоксильного эфира, ацила, ацилоксильной группы, ацил-аминогруппы, аминоксила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиоалкоксильной группы, замещенной тиоалкоксильной группы, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероцикла и замещенного гетероцикла. В некоторых воплощениях, R^2 представляет собой водород.

В некоторых воплощениях, R^2 представляет собой алкил или замещенный алкил, такой как C_{1-6} -алкил или замещенный C_{1-6} -алкил, или C_{1-4} -алкил или замещенный C_{1-4} -алкил,

или C₁₋₃-алкил или замещенный C₁₋₃-алкил. В некоторых воплощениях, R² представляет собой алкенил или замещенный алкенил, такой как C₂₋₆-алкенил или замещенный C₂₋₆-алкенил, или C₂₋₄-алкенил или замещенный C₂₋₄-алкенил, или C₂₋₃-алкенил или

замещенный C₂₋₃-алкинил. В некоторых воплощениях, R² представляет собой алкинил или замещенный алкинил. В некоторых воплощениях, R² представляет собой

алкоксигруппу или замещенную алкоксигруппу. В некоторых воплощениях, R^2 представляет собой аминогруппу или замещенную аминогруппу. В некоторых

воплощениях, R² представляет собой карбоксил или карбоксильный эфир. В некоторых воплощениях, R² представляет собой ацил или ацилокси группу. В некоторых

воплощениях, R^2 представляет собой ациламиногруппу или аминоксил. В некоторых
 воплощениях, R^2 представляет собой алкиламид или замещенный алкиламид. В
 некоторых воплощениях, R^2 представляет собой сульфонил. В некоторых воплощениях,
 5 R^2 представляет собой тиоалкоксигруппу или замещенную тиоалкоксигруппу. В
 некоторых воплощениях, R^2 представляет собой арил или замещенный арил, такой как
 C_{5-8} -арил или замещенный C_{5-8} -арил, такой как C_5 -арил или замещенный C_5 -арил, или
 10 C_6 -арил или замещенный C_6 -арил. В некоторых воплощениях, R^2 представляет собой
 гетероарил или замещенный гетероарил, такой как C_{5-8} -гетероарил или замещенный
 C_{5-8} -гетероарил, такой как C_5 -гетероарил или замещенный C_5 -гетероарил, или
 15 C_6 -гетероарил или C_6 -замещенный гетероарил. В некоторых воплощениях, R^2
 представляет собой циклоалкил или замещенный циклоалкил, такой как C_{3-8} -циклоалкил
 или замещенный C_{3-8} -циклоалкил, такой как C_{3-6} -циклоалкил или замещенный
 C_{3-6} -циклоалкил, или C_{3-5} -циклоалкил или замещенный C_{3-5} -циклоалкил. В некоторых
 20 воплощениях, R^2 представляет собой гетероцикл или замещенный гетероцикл,
 такой как C_{3-6} -гетероцикл или замещенный C_{3-6} -гетероцикл, или C_{3-5} -гетероцикл
 или замещенный C_{3-5} -гетероцикл.

В некоторых воплощениях, R^3 выбирают из водорода, алкила, замещенного алкила,
 алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкоксильной
 25 группы, замещенной алкоксильной группы, аминоксил, замещенной аминоксил, карбоксила,
 карбоксильного эфира, ацила, ацилоксильной группы, ацил-аминогруппы,
 аминоксила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиоалкоксильной
 группы, замещенной тиоалкоксильной группы, арила, замещенного арила, гетероарила,
 замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероцикла и
 30 замещенного гетероцикла. В некоторых воплощениях, R^3 представляет собой водород.
 В некоторых воплощениях, R^3 представляет собой алкил или замещенный алкил, такой
 как C_{1-6} -алкил или замещенный C_{1-6} -алкил, или C_{1-4} -алкил или замещенный C_{1-4} -алкил,
 или C_{1-3} -алкил или замещенный C_{1-3} -алкил. В некоторых воплощениях, R^3 представляет
 35 собой алкенил или замещенный алкенил, такой как C_{2-6} -алкенил или замещенный
 C_{2-6} -алкенил, или C_{2-4} -алкенил или замещенный C_{2-4} -алкенил, или C_{2-3} -алкенил или
 замещенный C_{2-3} -алкенил. В некоторых воплощениях, R^3 представляет собой алкинил
 или замещенный алкинил. В некоторых воплощениях, R^3 представляет собой
 40 алкоксигруппу или замещенную алкоксигруппу. В некоторых воплощениях, R^3
 представляет собой аминоксил или замещенную аминоксил. В некоторых
 воплощениях, R^3 представляет собой карбоксил или карбоксильный эфир. В некоторых
 воплощениях, R^3 представляет собой ацил или ацилоксигруппу. В некоторых
 45 воплощениях, R^3 представляет собой ациламиногруппу или аминоксил. В некоторых
 воплощениях, R^3 представляет собой алкиламид или замещенный алкиламид. В
 некоторых воплощениях, R^3 представляет собой сульфонил. В некоторых воплощениях,

R^3 представляет собой тиоалкоксигруппу или замещенную тиоалкоксигруппу. В некоторых воплощениях, R^3 представляет собой арил или замещенный арил, такой как C_{5-8} -арил или замещенный C_{5-8} -арил, такой как C_5 -арил или замещенный C_5 -арил, или C_6 -арил или замещенный C_6 -арил. В некоторых воплощениях, R^3 представляет собой гетероарил или замещенный гетероарил, такой как C_{5-8} -гетероарил или замещенный C_{5-8} -гетероарил, такой как C_5 -гетероарил или замещенный C_5 -гетероарил, или C_6 -гетероарил или замещенный C_6 -гетероарил. В некоторых воплощениях, R^3 представляет собой циклоалкил или замещенный циклоалкил, такой как C_{3-8} -циклоалкил или замещенный C_{3-8} -циклоалкил, такой как C_{3-6} -циклоалкил или замещенный C_{3-6} -циклоалкил, или C_{3-5} -циклоалкил или замещенный C_{3-5} -циклоалкил. В некоторых воплощениях, R^3 представляет собой гетероциклил или замещенный гетероциклил, такой как C_{3-8} -гетероциклил или замещенный C_{3-8} -гетероциклил, такой как C_{3-6} -гетероциклил или замещенный C_{3-6} -гетероциклил, или C_{3-5} -гетероциклил или замещенный C_{3-5} -гетероциклил.

В некоторых воплощениях, R^2 и R^3 необязательно циклически связаны с образованием 5- или 6-членного гетероцикла. В некоторых воплощениях, R^2 и R^3 циклически соединены с образованием 5- или 6-членного гетероцикла. В некоторых воплощениях, R^2 и R^3 циклически соединены с образованием 5-членного гетероцикла. В некоторых воплощениях, R^2 и R^3 циклически соединены с образованием 6-членного гетероцикла.

В некоторых воплощениях, каждый R^4 независимо выбирают из водорода, галогена, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкоксильной группы, замещенной алкоксильной группы, аминогруппы, замещенной аминогруппы, карбоксила, карбоксилового эфира, ацила, ацилоксильной группы, ацил-аминогруппы, аминоксила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиоалкоксильной группы, замещенной тиоалкоксильной группы, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероцикла и замещенного гетероцикла.

Различные возможности для каждого R^4 подробно описаны следующим образом. В некоторых воплощениях, R^4 представляет собой водород. В некоторых воплощениях, каждый R^4 представляет собой водород. В некоторых воплощениях, R^4 представляет собой галоген, такой как F, Cl, Br или I. В некоторых воплощениях, R^4 представляет собой F. В некоторых воплощениях, R^4 представляет собой Cl. В некоторых воплощениях, R^4 представляет собой Br. В некоторых воплощениях, R^4 представляет собой I. В некоторых воплощениях, R^4 представляет собой алкил или замещенный алкил, такой как C_{1-6} -алкил или замещенный C_{1-6} -алкил, или C_{1-4} -алкил или замещенный C_{1-4} -алкил, или C_{1-3} -алкил или замещенный C_{1-3} -алкил. В некоторых воплощениях, R^4 представляет собой алкенил или замещенный алкенил, такой как C_{2-6} -алкенил или замещенный C_{2-6} -алкенил, или C_{2-4} -алкенил или замещенный C_{2-4} -алкенил, или C_{2-3} -алкенил или замещенный C_{2-3} -алкенил.

алкенил или замещенный C₂₋₃-алкенил. В некоторых воплощениях, R⁴ представляет собой алкинил или замещенный алкинил. В некоторых воплощениях, R⁴ представляет собой алкоксигруппу или замещенную алкоксигруппу. В некоторых воплощениях, R⁴ представляет собой аминогруппу или замещенную аминогруппу. В некоторых воплощениях, R⁴ представляет собой карбоксил или карбоксиловый эфир. В некоторых воплощениях, R⁴ представляет собой ацил или ацилоксигруппу. В некоторых воплощениях, R⁴ представляет собой ациламиногруппу или аминоацил. В некоторых воплощениях, R⁴ представляет собой алкиламид или замещенный алкиламид. В некоторых воплощениях, R⁴ представляет собой сульфонил. В некоторых воплощениях, R⁴ представляет собой тиоалкоксигруппу или замещенную тиоалкоксигруппу. В некоторых воплощениях, R⁴ представляет собой арил или замещенный арил, такой как C₅₋₈-арил или замещенный C₅₋₈-арил, такой как C₅ арил или замещенный C₅-арил, или C₆-арил или замещенный C₆-арил (например, фенил или замещенный фенил). В некоторых воплощениях, R⁴ представляет собой гетероарил или замещенный гетероарил, такой как C₅₋₈-гетероарил или замещенный C₅₋₈-гетероарил, такой как C₅ гетероарил или замещенный C₅-гетероарил, или C₆ гетероарил или замещенный C₆-гетероарил. В некоторых воплощениях, R⁴ представляет собой циклоалкил или замещенный циклоалкил, такой как C₃₋₈-циклоалкил или замещенный C₃₋₈-циклоалкил, такой как C₃₋₆-циклоалкил или замещенный C₃₋₆-циклоалкил, или C₃₋₅-циклоалкил или замещенный C₃₋₅-циклоалкил. В некоторых воплощениях, R⁴ представляет собой гетероциклил или замещенный гетероциклил, такой как C₃₋₈-гетероциклил или замещенный C₃₋₈-гетероциклил, такой как C₃₋₆-гетероциклил или замещенный C₃₋₆-гетероциклил, или C₃₋₅-гетероциклил или замещенный C₃₋₅-гетероциклил.

В некоторых воплощениях, W¹ представляет собой майтансиноид. Дополнительное описание майтансиноида может быть найдено в раскрытии настоящего изобретения.

В некоторых воплощениях, W² представляет собой анти-CD22 антитело. Дополнительное описание анти-CD22 антитела может быть найдено в раскрытии настоящего изобретения.

В некоторых воплощениях, соединения формулы (I) включают линкер, L. Линкер может быть применен для связывания сопрягающего фрагмента с одним или несколькими представляющими интерес фрагментами и/или с одним или несколькими полипептидами. В некоторых воплощениях, линкер связывает сопрягающий фрагмент или с полипептидом, или с химическим соединением. Линкер может быть связан (например, ковалентно связан) с сопрягающим фрагментом (например, как описан в настоящем документе) в любом удобном положении. Например, линкер может прикреплять гидразинил-индолил или гидразинил-пирроло-пиридирил сопрягающий фрагмент к лекарственному средству (например, к майтансину). Гидразинил-индолил или гидразинил-пирроло-пиридирил сопрягающий фрагмент может быть применен для конъюгирования линкера (и таким способом лекарственного средства, например, майтансина) с полипептидом, таким как анти-CD22 антитело.

В некоторых воплощениях, L прикрепляет сопрягающий фрагмент к W^1 и таким способом сопрягающий фрагмент непрямо связывает W^1 через линкер L. Как описано выше, W^1 представляет собой майтансиноид, и таким способом L прикрепляет сопрягающий фрагмент к майтансиноиду, например, сопрягающий фрагмент непрямо связан с майтансиноидом через линкер L.

Любые подходящие линкеры могут быть применены в конъюгатах и соединениях изобретения. В некоторых воплощениях, L включает группу, которую выбирают из алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкоксильной группы, замещенную алкоксильной группы, аминогруппы, замещенную аминогруппы, карбоксила, карбоксилевого эфира, ациламиногруппы, алкиламида, замещенного алкиламида, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила. В некоторых воплощениях, L включает алкильную или замещенную алкильную группу. В некоторых воплощениях, L включает алкенильную или замещенную алкенильную группу. В некоторых воплощениях, L включает алкинильную или замещенную алкинильную группу. В некоторых воплощениях, L включает алкоксигруппу или замещенную алкоксигруппу. В некоторых воплощениях, L включает аминогруппу или замещенную аминогруппу. В некоторых воплощениях, L включает карбоксильную или карбоксилэфирную группу. В некоторых воплощениях, L включает ациламиногруппу. В некоторых воплощениях, L включает алкиламидную или замещенную алкиламидную группу. В некоторых воплощениях, L включает арильную или замещенную арильную группу. В некоторых воплощениях, L включает гетероарильную или замещенную гетероарильную группу. В некоторых воплощениях, L включает циклоалкильную или замещенную циклоалкильную группу. В некоторых воплощениях, L включает гетероциклильную или замещенную гетероциклильную группу.

В некоторых воплощениях, L включает полимер. Например, полимер может включать полиалкиленгликоль и его производные, включая полиэтиленгликоль, метоксиполиэтиленгликоль, гомополимеры полиэтиленгликоля, гомополимеры полипропиленгликоля, сополимеры этиленгликоля с пропиленгликолем (например, где гомополимеры и сополимеры представляют собой незамещенные или замещенные на одном конце алкильной группой соединения), поливиниловый спирт, поливинилэтиловые эфиры, поливинилпирролидон, их комбинации и им подобные. В некоторых воплощениях, полимер представляет собой полиалкиленгликоль. В определенных воплощениях, полимер представляет собой полиэтиленгликоль. Другие линкеры также возможны, как показано для конъюгатов и соединений, описанных подробно ниже.

В некоторых воплощениях, L представляет собой линкер, описанный формулой $-(L^1)_a-(L^2)_b-(L^3)_c-(L^4)_d-$, в которой L^1, L^2, L^3 и L^4 каждый независимо представляет собой единицу линкера, и a, b, c и d каждый независимо равен 0 или 1, в которой сумма a, b, c и d равна от 1 до 4.

В некоторых воплощениях, сумма a, b, c и d равна 1. В некоторых воплощениях, сумма a, b, c и d равна 2. В некоторых воплощениях, сумма a, b, c и d равна 3. В некоторых воплощениях, сумма a, b, c и d равна 4. В некоторых воплощениях, каждый из a, b, c и d равен 1. В некоторых воплощениях, каждый из a, b и c равен 1 и d равен 0. В некоторых воплощениях, каждый из a и b равен 1 и каждый из c и d равен 0. В некоторых воплощениях, a равна 1 и каждый из b, c и d равен 0.

В некоторых воплощениях, L^1 прикреплен к гидразинил-индолил или гидразинил-пирроло-пиридинил сопрягающему фрагменту (например, как показан в приведенной выше формуле (I)). В некоторых воплощениях, L^2 , если присутствует, прикреплен к W^1 .

5 В некоторых воплощениях, L^3 , если присутствует, прикреплен к W^1 . В некоторых воплощениях, L^4 , если присутствует, прикреплен к W^1 .

Любая из подходящих линкерных единиц может быть применена в линкерах изобретения. Представляющие интерес линкерные единицы включают, без ограничений,
 10 звенья полимеров, таких как полиэтиленгликоли, полиэтилены и полиакрилаты, аминокислотный остаток(аминокислотные остатки), углеводные полимеры или углеводные остатки и его производные, полинуклеотиды, алкильные группы, арильные группы, гетероциклические группы, их комбинации и их замещенные версии. В некоторых воплощениях, каждый из L^1 , L^2 , L^3 и L^4 (если присутствует) включает одну или несколько
 15 групп, которые независимо выбирают из полиэтиленгликоля, модифицированного полиэтиленгликоля, аминокислотного остатка, алкильной группы, замещенной алкильной группы, арильной группы, замещенной арильной группы и диамина (например, связывающая группа, которая включает алкилендиамин).

В некоторых воплощениях, L^1 (если присутствует) включает полиэтиленгликоль, модифицированный полиэтиленгликоль, аминокислотный остаток, алкильную группу, замещенную алкильную группу, арильную группу, замещенную арильную группу или
 20 диамин. В некоторых воплощениях, L^1 включает полиэтиленгликоль. В некоторых воплощениях, L^1 включает модифицированный полиэтиленгликоль. В некоторых воплощениях, L^1 включает аминокислотный остаток. В некоторых воплощениях, L^1 включает алкильную группу или замещенный алкил. В некоторых воплощениях, L^1 включает арильную группу или замещенную арильную группу. В некоторых
 25 воплощениях, L^1 включает диамин (например, связывающая группа, включающий алкилендиамин).

В некоторых воплощениях, L^2 (если присутствует) включает полиэтиленгликоль, модифицированный полиэтиленгликоль, аминокислотный остаток, алкильную группу, замещенную алкильную группу, арильную группу, замещенную арильную группу или
 35 диамин. В некоторых воплощениях, L^2 включает полиэтиленгликоль. В некоторых воплощениях, L^2 включает модифицированный полиэтиленгликоль. В некоторых воплощениях, L^2 включает аминокислотный остаток. В некоторых воплощениях, L^2 включает алкильную группу или замещенный алкил. В некоторых воплощениях, L^2 включает арильную группу или замещенную арильную группу. В некоторых
 40 воплощениях, L^2 включает диамин (например, связывающую группу, включающую алкилендиамин).

В некоторых воплощениях, L^3 (если присутствует) включает полиэтиленгликоль, модифицированный полиэтиленгликоль, аминокислотный остаток, алкильную группу, замещенную алкильную группу, арильную группу, замещенную арильную группу или
 45 диамин. В некоторых воплощениях, L^3 включает полиэтиленгликоль. В некоторых воплощениях, L^3 включает модифицированный полиэтиленгликоль. В некоторых

воплощениях, L^3 включает аминокислотный остаток. В некоторых воплощениях, L^3 включает алкильную группу или замещенный алкил. В некоторых воплощениях, L^3 включает арильную группу или замещенную арильную группу. В некоторых

5 воплощениях, L^3 включает диамин (например, связывающая группа, включающая алкилендиамин).

В некоторых воплощениях, L^4 (если присутствует) включает полиэтиленгликоль, модифицированный полиэтиленгликоль, аминокислотный остаток, алкильную группу, замещенную алкильную группу, арильную группу, замещенную арильную группу или

10 диамин. В некоторых воплощениях, L^4 включает полиэтиленгликоль. В некоторых воплощениях, L^4 включает модифицированный полиэтиленгликоль. В некоторых воплощениях, L^4 включает аминокислотный остаток. В некоторых воплощениях, L^4

15 включает алкильную группу или замещенный алкил. В некоторых воплощениях, L^4 включает арильную группу или замещенную арильную группу. В некоторых воплощениях, L^4 включает диамин (например, связывающую группу, включающую алкилендиамин).

В некоторых воплощениях, L представляет собой линкер, включающий

20 $-(L^1)_a-(L^2)_b-(L^3)_c-(L^4)_d-$, где:

$-(L^1)_a-$ представляет собой $-(T^1-V^1)_a-$;

$-(L^2)_b-$ представляет собой $-(T^2-V^2)_b-$;

25 $-(L^3)_c-$ представляет собой $-(T^3-V^3)_c-$; и

$-(L^4)_d-$ представляет собой $-(T^4-V^4)_d-$,

в которой T^1 , T^2 , T^3 и T^4 , если присутствует, представляют собой связывающие группы;

30 V^1 , V^2 , V^3 и V^4 , если присутствует, представляют собой ковалентные связи или связывающие функциональные группы; и

a, b, c и d каждый независимо равен 0 или 1, где сумма a, b, c и d равна от 1 до 4.

Как описано выше, в некоторых воплощениях, L^1 прикреплен к гидразинил-индолил или гидразинил-пирроло-пиридинил сопрягающему фрагменту (например, как показано

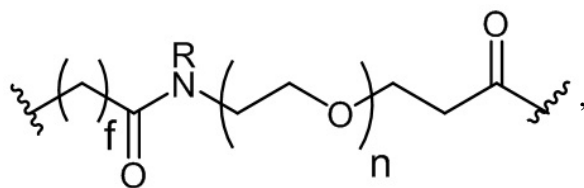
35 в приведенной выше формуле (I)). Как таковой, в некоторых воплощениях, T^1 прикреплен к гидразинил-индолил или гидразинил-пирроло-пиридинил сопрягающему фрагменту (например, как показано в приведенной выше формуле (I)). В некоторых воплощениях, V^1 прикреплен к W^1 (майтансиноиду). В некоторых воплощениях, L^2 ,

40 если присутствует, прикреплен к W^1 . Как таковой, в некоторых воплощениях, T^2 , если присутствует, прикреплен к W^1 , или V^2 , если присутствует, прикреплен к W^1 . В некоторых воплощениях, L^3 , если присутствует, прикреплен к W^1 . Как таковой, в некоторых воплощениях, T^3 , если присутствует, прикреплен к W^1 , или V^3 , если

45 присутствует, прикреплен к W^1 . В некоторых воплощениях, L^4 , если присутствует, прикреплен к W^1 . Как таковой, в некоторых воплощениях, T^4 , если присутствует, прикреплен к W^1 , или V^4 , если присутствует, прикреплен к W^1 .

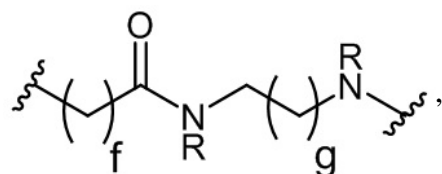
Что касается связывающих групп, T^1 , T^2 , T^3 и T^4 , то любые подходящие связывающие группы могут быть применены в линкерах изобретения. В некоторых воплощениях, каждый из T^1 , T^2 , T^3 и T^4 включает одну или несколько групп, которые независимо выбирают из (C_1-C_{12}) алкила, замещенного (C_1-C_{12}) алкила, $(EDA)_w$, $(PEG)_n$, $(AA)_p$, -
 $(CR^{13}OH)_h$, пиперидин-4-амино-(4AP), ацетальной группы, дисульфида, гидразина и сложного эфира, где w представляет собой целое число от 1 до 20, n представляет собой целое число от 1 до 30, p представляет собой целое число от 1 до 20 и h представляет собой целое число от 1 до 12.

В некоторых воплощениях, если сумма a , b , c и d равна 2 и один из T^1-V^1 , T^2-V^2 , T^3-V^3 , или T^4-V^4 представляет собой $(PEG)_n-CO$, то n не равно 6. Например, в некоторых случаях, линкер может иметь следующую структуру:



где n не равно 6.

В некоторых воплощениях, если сумма a , b , c и d равна 2 и один из T^1-V^1 , T^2-V^2 , T^3-V^3 , или T^4-V^4 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил- NR^{15} , то (C_1-C_{12}) алкил не представляет собой C_5 -алкил. Например, в некоторых случаях, линкер может иметь следующую структуру:



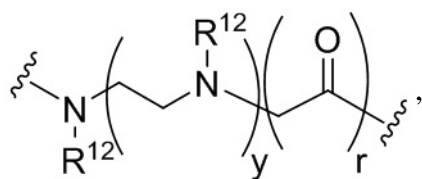
где g не равно 4.

В некоторых воплощениях, связывающая группа (например, T^1 , T^2 , T^3 и/или T^4) включает a (C_1-C_{12}) алкил или замещенный (C_1-C_{12}) алкил. В некоторых воплощениях, (C_1-C_{12}) алкил представляет собой с линейной или разветвленной цепью алкильную группу которая включает от 1 до 12 атомов углерода, таким как 1 до 10 атомов углерода или 1 до 8 атомов углерода или 1 до 6 атомов углерода или 1 до 5 атомов углерода или 1 до 4 атомов углерода или 1 до 3 атомов углерода. В некоторых случаях, (C_1-C_{12}) алкил может представлять собой алкил или замещенный алкил, такой как C_1-C_{12} алкил, или C_1-C_{10} алкил, или C_1-C_6 алкил, или C_1-C_3 алкил. В некоторых случаях, (C_1-C_{12}) алкил представляет собой C_2 -алкил. Например, (C_1-C_{12}) алкил может представлять собой алкилен или замещенный алкилен, такой как C_1-C_{12} алкилен, или C_1-C_{10} алкилен, или C_1-C_6 алкилен, или C_1-C_3 алкилен. В некоторых случаях, (C_1-C_{12}) алкил представляет собой C_2 -алкилен.

В некоторых воплощениях, замещенный (C_1-C_{12}) алкил представляет собой замещенную алкильную группу с линейной или разветвленной цепью, которая включает от 1 до 12 атомов углерода, например, от 1 до 10 атомов углерода или от 1 до 8 атомов

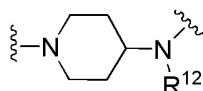
углерода или от 1 до 6 атомов углерода или от 1 до 5 атомов углерода или от 1 до 4 атомов углерода или от 1 до 3 атомов углерода. В некоторых случаях, замещенный (C₁-C₁₂)алкил может представлять собой замещенный алкил, такой как замещенный C₁-C₁₂ алкил, или замещенный C₁-C₁₀ алкил, или замещенный C₁-C₆ алкил, или замещенный C₁-C₃ алкил. В некоторых случаях, замещенный (C₁-C₁₂)алкил представляет собой замещенный C₂-алкил. Например, замещенный (C₁-C₁₂)алкил может представлять собой замещенный алкилен, таким как замещенный C₁-C₁₂ алкилен, или замещенный C₁-C₁₀ алкилен, или замещенный C₁-C₆ алкилен, или замещенный C₁-C₃ алкилен. В некоторых случаях, замещенный (C₁-C₁₂)алкил представляет собой замещенный C₂-алкилен.

В некоторых воплощениях, связывающая группа (например, T¹, T², T³ и/или T⁴) включает фрагмент этилендиамина (EDA), например, EDA содержащих связывающую группу. В некоторых воплощениях, (EDA)_w включает один или несколько фрагментов EDA, например, где w представляет собой целое число от 1 до 50, например, от 1 до 40, от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 12 или от 1 до 6, например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Связанные фрагменты этилендиамина (EDA) могут быть необязательно замещены в одном или нескольких подходящих положениях любым подходящим заместителем, например, алкилом, замещенным алкилом, ацилом, замещенным ацилом, арилом или замещенным арилом. В некоторых воплощениях, фрагмент EDA описан структурой:



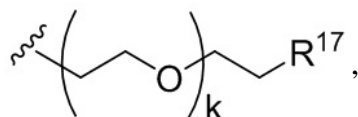
где y представляет собой целое число от 1 до 6, r равно 0 или 1 и каждый R¹² независимо выбирают из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкоксильной группы, замещенной алкоксильной группы, аминогруппы, замещенной аминогруппы, карбоксила, карбоксильного эфира, ацила, ацилоксильной группы, ацил-аминогруппы, аминоксила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиаалкоксильной группы, замещенной тиаалкоксильной группы, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила. В некоторых воплощениях, y равен 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых воплощениях, y равен 1 и r равен 0. В некоторых воплощениях, y равен 1 и r равен 1. В некоторых воплощениях, y равен 2 и r равен 0. В некоторых воплощениях, y равен 2 и r равен 1. В некоторых воплощениях, каждый R¹² независимо выбирают из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила. В некоторых воплощениях, любые две смежные R¹² группы в EDA могут быть циклически соединены, например, для образования пиперазинильного кольца. В некоторых воплощениях, y равен 1 и две смежные R¹² группы представляют собой алкильную группу, циклически соединенные с образованием пиперазинильного кольца. В некоторых воплощениях, y равен 1 и две смежные R¹² группы выбирают из водорода, алкила (например, метила) и замещенного алкила (например, низшего алкил-ОН, такого как этил-ОН или пропил-ОН).

В некоторых воплощениях, связывающая группа включает фрагмент 4-амино-пиперидина (4AP) (также обозначаемый в настоящем документе как пиперидин-4-амино, P4A). 4AP фрагмент необязательно может быть замещен в одном или нескольких подходящих положениях любым подходящим заместителем, например, алкилом, замещенным алкилом, фрагментом полиэтиленгликоля, ацилом, замещенным ацилом, арилом или замещенным арилом. В некоторых воплощениях, 4AP-фрагмент описан структурой:



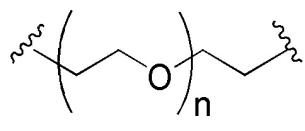
в которой R^{12} выбирают из водорода, алкила, замещенного алкила, фрагмента полиэтиленгликоля (например, полиэтиленгликоля или модифицированного полиэтиленгликоля), алкенила, замещенный алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкоксильной группы, замещенной алкоксильной группы, аминогруппы, замещенной аминогруппы, карбоксила, карбоксильного эфира, ацила, ацилоксильной группы, ациламиногруппы, аминоксила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиаалкоксильной группы, замещенной тиаалкоксильной группы, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила. В некоторых воплощениях, R^{12} представляет собой фрагмент полиэтиленгликоля. В некоторых воплощениях, R^{12} представляет собой карбокси-модифицированный полиэтиленгликоль.

В некоторых воплощениях, R^{12} включает фрагмент полиэтиленгликоля, описанный формулой: $(\text{PEG})_k$, которая могут быть представлена структурой:



в которой k представляет собой целое число от 1 до 20, такое как от 1 до 18, или от 1 до 16, или от 1 до 14, или от 1 до 12, или от 1 до 10, или от 1 до 8, или от 1 до 6, или от 1 до 4, или 1 или 2, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. В некоторых случаях, k равно 2. В некоторых воплощениях, R^{17} выбирают из OH, COOH, или COOR, где R выбирают из алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила. В некоторых воплощениях, R^{17} представляет собой COOH.

В некоторых воплощениях, связывающие группы (например, T^1 , T^2 , T^3 и/или T^4) включают $(\text{PEG})_n$, где $(\text{PEG})_n$ представляет собой полиэтиленгликольную или модифицированную полиэтиленгликольную связывающую единицу. В некоторых воплощениях, $(\text{PEG})_n$ описан структурой:



в которой n представляет собой целое число от 1 до 50, таким как от 1 до 40, от 1 до

30, от 1 до 20, от 1 до 12 или от 1 до 6, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. В некоторых случаях, n равно 2. В некоторых случаях, n равно 3. В некоторых случаях, n равно 6. В некоторых случаях, n равно 12.

В некоторых воплощениях, связывающая группа (например, T^1 , T^2 , T^3 и/или T^4) включает $(AA)_p$, где AA представляет собой аминокислотный остаток. Любая подходящая аминокислота может быть применена. Представляющие интерес аминокислоты включают без ограничений, L- и D-аминокислоты, природные аминокислоты, такие как любые из 20 первичных альфа-аминокислот и бета-аланин, неприродные аминокислоты (например, аналоги аминокислот), такие как неприродные альфа-аминокислоты или неприродные бета-аминокислоты и т.п. В некоторых воплощениях, p представляет собой целое число от 1 до 50, таким как от 1 до 40, от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 12 или от 1 до 6, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. В некоторых воплощениях, p равно 1. В некоторых воплощениях, p равно 2.

В некоторых воплощениях, связывающая группа (например, T^1 , T^2 , T^3 и/или T^4) включает фрагмент, описанный формулой $-(CR^{13}OH)_h$, где h равно 0 или n представляет собой целое число от 1 до 50, такие как от 1 до 40, от 1 до 30, от 1 до 20, от 1 до 12 или от 1 до 6, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12. В некоторых воплощениях, h равно 1. В некоторых воплощениях, h равно 2. В некоторых воплощениях, R^{13} выбирают из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, алкоксильной группы, замещенной алкоксильной группы, аминогруппы, замещенной аминогруппы, карбоксила, карбоксильного эфира, ацила, ацилоксильной группы, ацил-аминогруппы, аминокислоты, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила, тиаалкоксильной группы, замещенной тиаалкоксильной группы, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероцикла и замещенного гетероцикла. В некоторых воплощениях, R^{13} представляет собой водород. В некоторых воплощениях, R^{13} представляет собой алкил или замещенный алкил, такой как C_{1-6} алкил или C_{1-6} замещенный алкил, или C_{1-4} алкил или C_{1-4} замещенный алкил, или C_{1-3} алкил или C_{1-3} замещенный алкил. В некоторых воплощениях, R^{13} представляет собой алкенил или замещенный алкенил, такой как C_{2-6} алкенил или C_{2-6} замещенный алкенил, или C_{2-4} алкенил или C_{2-4} замещенный алкенил, или C_{2-3} алкенил или C_{2-3} замещенный алкенил. В некоторых воплощениях, R^{13} представляет собой алкинил или замещенный алкинил. В некоторых воплощениях, R^{13} представляет собой алкоксигруппу или замещенную алкоксигруппу. В некоторых воплощениях, R^{13} представляет собой аминогруппу или замещенную аминогруппу. В некоторых воплощениях, R^{13} представляет собой карбоксил или карбоксильный эфир. В некоторых воплощениях, R^{13} представляет собой ацил или ацилоксигруппу. В некоторых воплощениях, R^{13} представляет собой ациламиногруппу или аминокислоту. В некоторых воплощениях, R^{13} представляет собой алкиламид или замещенный алкиламид. В некоторых воплощениях, R^{13} представляет собой сульфонил. В некоторых воплощениях, R^{13} представляет собой тиаалкоксигруппу или замещенную

тиоалкоксигруппу. В некоторых воплощениях, R^{13} представляет собой арил или замещенный арил, такой как C_{5-8} арил или C_{5-8} замещенный арил, такой как C_5 арил или C_5 замещенный арил, или C_6 арил или C_6 замещенный арил. В некоторых

5 воплощениях, R^{13} представляет собой гетероарил или замещенный гетероарил, такой как C_{5-8} гетероарил или C_{5-8} замещенный гетероарил, такой как C_5 гетероарил или C_5 замещенный гетероарил, или C_6 гетероарил или C_6 замещенный гетероарил. В некоторых воплощениях, R^{13} представляет собой циклоалкил или замещенный циклоалкил, такой
10 как C_{3-8} циклоалкил или C_{3-8} замещенный циклоалкил, такой как C_{3-6} циклоалкил или C_{3-6} замещенный циклоалкил, или C_{3-5} циклоалкил или C_{3-5} замещенный циклоалкил. В некоторых воплощениях, R^{13} представляет собой гетероциклил или замещенный гетероциклил, такой как C_{3-8} гетероциклил или C_{3-8} замещенный гетероциклил, такой
15 как C_{3-6} гетероциклил или C_{3-6} замещенный гетероциклил, или C_{3-5} гетероциклил или C_{3-5} замещенный гетероциклил.

В некоторых воплощениях, R^{13} выбирают из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила. В данных воплощениях, алкил, замещенный алкил, арил
20 и замещенный арил были такие, как описаны выше, для R^{13} .

Что касается связывающих функциональных группы, V^1 , V^2 , V^3 и V^4 , то любые подходящие связывающие функциональные группы могут быть применены в линкерах изобретения. Представляющие интерес связывающие функциональные группы
25 включают, без ограничений, амино-, карбонильные, амидо-, оксикарбонильные, карбоксильные, сульфонильные, сульфоксидные, сульфониламино-, аминосульфонильные, тио-, окси-, фосфо-, фосфорамидатные, тиофосфорамидатные группы и им подобные. В некоторых воплощениях, V^1 , V^2 , V^3 и V^4 каждый независимо выбирают из ковалентной связи, $-CO-$, $-NR^{15}-$, $-NR^{15}(CH_2)_q-$, $-NR^{15}(C_6H_4)-$, $-CONR^{15}-$,
30 $-NR^{15}CO-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-O-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-SO_2-$, $-SO_2NR^{15}-$, $-NR^{15}SO_2-$ и $-P(O)OH-$, где q представляет собой целое число от 1 до 6. В некоторых воплощениях, q представляет собой целое число от 1 до 6 (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6). В некоторых воплощениях, q равно 1. В некоторых воплощениях, q равно 2.

35 В некоторых воплощениях, каждый R^{15} независимо выбирают из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинил, алкоксильно группу, замещенной алкоксильной группы, аминогруппы, замещенной аминогруппы, карбоксила, карбоксилового эфира, ацила, ацилоксильной группы, ацил-аминогруппы, аминоксидила, алкиламида, замещенного алкиламида, сульфонила,
40 тиоалкоксильной группы, замещенной тиоалкоксильной группы, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила.

Различные возможности для каждого R^{15} подробно описаны следующим образом.
45 В некоторых воплощениях, R^{15} представляет собой водород. В некоторых воплощениях, каждый R^{15} представляет собой водород. В некоторых воплощениях, R^{15} представляет собой алкил или замещенный алкил, такой как C_{1-6} алкил или замещенный C_{1-6} алкил, или C_{1-4} алкил или замещенный C_{1-4} алкил, или C_{1-3} алкил или замещенный C_{1-3} алкил.

В некоторых воплощениях, R^{15} представляет собой алкенил или замещенный алкенил, такой как C_{2-6} алкенил или замещенный C_{2-6} алкенил, или C_{2-4} алкенил или замещенный C_{2-4} алкенил, или C_{2-3} алкенил или замещенный C_{2-3} алкенил. В некоторых воплощениях,

5 R^{15} представляет собой алкинил или замещенный алкинил. В некоторых воплощениях, R^{15} представляет собой алкоксигруппу или замещенную алкоксигруппу. В некоторых воплощениях, R^{15} представляет собой аминогруппу или замещенную аминогруппу. В некоторых воплощениях, R^{15} представляет собой карбоксил или карбоксильный эфир.

10 В некоторых воплощениях, R^{15} представляет собой ацил или ацилоксигруппу. В некоторых воплощениях, R^{15} представляет собой ациламиногруппу или аминоацил. В некоторых воплощениях, R^{15} представляет собой алкиламид или замещенный алкиламид.

15 В некоторых воплощениях, R^{15} представляет собой сульфонил. В некоторых воплощениях, R^{15} представляет собой тиоалкоксигруппу или замещенную

тиоалкоксигруппу. В некоторых воплощениях, R^{15} представляет собой арил или замещенный арил, такой как C_{5-8} арил или замещенный C_{5-8} арил, такой как C_5 арил или замещенный C_5 арил, или C_6 арил или замещенный C_6 арил. В некоторых

20 воплощениях, R^{15} представляет собой гетероарил или замещенный гетероарил, такой как C_{5-8} гетероарил или замещенный C_{5-8} гетероарил, такой как C_5 гетероарил или замещенный C_5 гетероарил, или C_6 гетероарил или замещенный C_6 гетероарил. В

25 некоторых воплощениях, R^{15} представляет собой циклоалкил или замещенный циклоалкил, такой как C_{3-8} циклоалкил или замещенный C_{3-8} циклоалкил, такой как C_{3-6} циклоалкил или замещенный C_{3-6} циклоалкил, или C_{3-5} циклоалкил или замещенный

30 C_{3-5} циклоалкил. В некоторых воплощениях, R^{15} представляет собой гетероциклил или замещенный гетероциклил, такой как C_{3-8} гетероциклил или замещенный C_{3-8} гетероциклил, такой как C_{3-6} гетероциклил или замещенный C_{3-6} гетероциклил, или C_{3-5} гетероциклил или замещенный C_{3-5} гетероциклил.

35 В некоторых воплощениях, каждый R^{15} независимо выбирают из водорода, алкила, замещенного алкила, алкенила, замещенного алкенила, алкинила, замещенного алкинила, карбоксила, карбоксильного эфира, ацила, арила, замещенного арила, гетероарила, замещенного гетероарила, циклоалкила, замещенного циклоалкила, гетероциклила и замещенного гетероциклила. В данных воплощениях, водород, алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, карбоксил, карбоксильный эфир, ацил, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, гетероциклил и замещенный гетероциклил были такими, как описаны выше, для R^{15} .

45 В некоторых воплощениях, связывающая группа включает ацетальную группу, дисульфид, гидразин или эфир. В некоторых воплощениях, связывающая группа включает ацетальную группу. В некоторых воплощениях, связывающая группа включает дисульфид. В некоторых воплощениях, связывающая группа включает гидразин. В некоторых воплощениях, связывающая группа включает эфир.

Как описано выше, в некоторых воплощениях, L представляет собой линкер,

включающий $-(T^1-V^1)_a-(T^2-V^2)_b-(T^3-V^3)_c-(T^4-V^4)_d$, где a, b, c и d каждый независимо равен 0 или 1, где сумма a, b, c и d равна от 1 до 4.

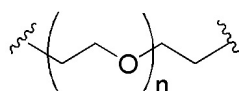
В некоторых воплощениях, в линкере изобретения:

T^1 выбирают из (C_1-C_{12}) алкила и замещенного (C_1-C_{12}) алкила;

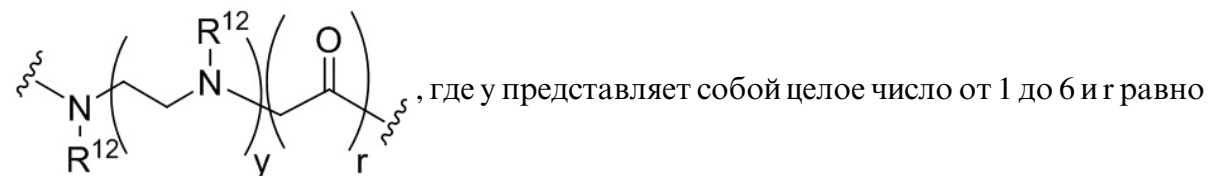
T^2 , T^3 и T^4 каждый независимо выбирают из (C_1-C_{12}) алкила, замещенного (C_1-C_{12}) алкила, $(EDA)_w$, $(PEG)_n$, $(AA)_p$, $-(CR^{13}OH)_h$, 4-амино-пиперидина (4AP), ацетальной группы, дисульфида, гидразина и сложного эфира; и

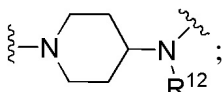
V^1 , V^2 , V^3 и V^4 каждый независимо выбирают из ковалентной связи, $-CO-$, $-NR^{15}-$, $-NR^{15}(CH_2)_q-$, $-NR^{15}(C_6H_4)-$, $-CONR^{15}-$, $-NR^{15}CO-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-$, $-O-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-SO_2-$, $-SO_2NR^{15}-$, $-NR^{15}SO_2-$ и $-P(O)OH-$, в которой q представляет собой целое число от 1 до 6;

в которой:

$(PEG)_n$ представляет собой , где n равно целому числу от 1 до 30;

EDA представляет собой этилендиаминовый фрагмент, имеющий следующую структуру:



4-амино-пиперидина (4AP) представляет собой 

AA представляет собой аминокислотный остаток, где p представляет собой целое число от 1 до 20; и

каждый R^{15} и R^{12} независимо выбирают из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила, в котором любые две смежные R^{12} группы могут быть циклически связаны с образованием пиперазинильного кольца; и

R^{13} выбирают из водорода, алкила, замещенного алкила, арила и замещенного арила.

В некоторых воплощениях, T^1 , T^2 , T^3 и T^4 и V^1 , V^2 , V^3 и V^4 выбирают из следующей таблицы, например, одна дорожка из следующей таблицы:

T^1	V^1	V^2	V^2	T^3	V^3	T^4	V^4
(C_1-C_{12}) алкил	$-CONR^{15}-$	$(PEG)_n$	$-CO-$	-	-	-	-
(C_1-C_{12}) алкил	$-CO-$	$(AA)_p$	$-NR^{15}-$	$(PEG)_n$	$-CO-$	-	-
(C_1-C_{12}) алкил	$-CO-$	$(AA)_p$	-	-	-	-	-
(C_1-C_{12}) алкил	$-CONR^{15}-$	$(PEG)_n$	$-NR^{15}-$	-	-	-	-
(C_1-C_{12}) алкил	$-CO-$	$(AA)_p$	$-NR^{15}-$	$(PEG)_n$	$-NR^{15}-$	-	-
(C_1-C_{12}) алкил	$-CO-$	$(EDA)_w$	$-CO-$	-	-	-	-

	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CONR ¹⁵ -	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-NR ¹⁵ -	-	-	-	-
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CONR ¹⁵ -	(PEG) _n	-CO-	(EDA) _w	-	-	-
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	(EDA) _w	-	-	-	-	-
5	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	(EDA) _w	-CO-	(CR ¹³ OH) _h	-CONR ¹⁵ -	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	(AA) _p	-NR ¹⁵ -	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	-	-
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CONR ¹⁵ -	(PEG) _n	-CO-	(AA) _p	-	-	-
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	(EDA) _w	-CO-	(CR ¹³ OH) _h	-CO-	(AA) _p	-
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	(AA) _p	-NR ¹⁵ -	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	(AA) _p	-
10	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	(AA) _p	-NR ¹⁵ -	(PEG) _n	-CO-	(AA) _p	-
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	(AA) _p	-NR ¹⁵ -	(PEG) _n	-SO ₂ -	(AA) _p	-
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	(EDA) _w	-CO-	(CR ¹³ OH) _h	-CONR ¹⁵ -	(PEG) _n	-CO-
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	(CR ¹³ OH) _h	-CO-	-	-	-	-
15	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CONR ¹⁵ -	замещенный (C ₁ -C ₁₂)алкил	-NR ¹⁵ -	(PEG) _n	-CO-	-	-
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-SO ₂ -	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	-	-	-	-
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CONR ¹⁵ -	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-	(CR ¹³ OH) _h	-CONR ¹⁵ -	-	-
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	(AA) _p	-NR ¹⁵ -	(PEG) _n	-CO-	(AA) _p	-NR ¹⁵ -
20	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	(AA) _p	-NR ¹⁵ -	(PEG) _n	-P(O)OH-	(AA) _p	-
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	(EDA) _w	-	(AA) _p	-	-	-
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CONR ¹⁵ -	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-NR ¹⁵ -	-	-CO-	-	-
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CONR ¹⁵ -	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-NR ¹⁵ -	-	-CO-	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-NR ¹⁵ -
	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	4AP	-CO-	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	(AA) _p	-
25	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	4AP	-CO-	(C ₁ -C ₁₂)алкил	-CO-	-	-

В некоторых воплощениях, L представляет собой линкер, включающий
 -(L¹)_a-(L²)_b-(L³)_c-(L⁴)_d-, где -(L¹)_a- представляет собой -(T¹-V¹)_a-; -(L²)_b- представляет
 собой -(T²-V²)_b-; -(L³)_c- представляет собой -(T³-V³)_c-; и -(L⁴)_d- представляет собой
 30 -(T⁴-V⁴)_d-.

В некоторых воплощениях, T¹ представляет собой (C₁-C₁₂)алкил, V¹ представляет
 собой -CO-, T² представляет собой (AA)_p, V² представляет собой -NR¹⁵-, T³ представляет
 35 собой (PEG)_n, V³ представляет собой -CO-, T⁴ отсутствует и V⁴ отсутствует.

В некоторых воплощениях, T¹ представляет собой (C₁-C₁₂)алкил, V¹ представляет
 собой -CO-, T² представляет собой (EDA)_w, V² представляет собой -CO-, T³ представляет
 40 собой (CR¹³OH)_h, V³ представляет собой -CONR¹⁵-, T⁴ представляет собой (C₁-C₁₂)алкил
 и V⁴ представляет собой -CO-.

В некоторых воплощениях, T¹ представляет собой (C₁-C₁₂)алкил, V¹ представляет
 собой -CO-, T² представляет собой (AA)_p, V² представляет собой -NR¹⁵-, T³ представляет
 45 собой (C₁-C₁₂)алкил, V³ представляет собой -CO-, T⁴ отсутствует и V⁴ отсутствует.

В некоторых воплощениях, T¹ представляет собой (C₁-C₁₂)алкил, V¹ представляет

собой -CONR¹⁵-, T² представляет собой (PEG)_n, V² представляет собой -CO-, T³ отсутствует, V³ отсутствует, T⁴ отсутствует и V⁴ отсутствует.

В некоторых воплощениях, T^1 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил, V^1 представляет собой $-CO-$, T^2 представляет собой $(AA)_p$, V^2 отсутствует, T^3 отсутствует, V^3 отсутствует, T^4 отсутствует и V^4 отсутствует.

В некоторых воплощениях, T^1 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил, V^1 представляет собой $-CONR^{15}-$, T^2 представляет собой $(PEG)_n$, V^2 представляет собой $-NR^{15}-$, T^3 отсутствует, V^3 отсутствует, T^4 отсутствует и V^4 отсутствует.

В некоторых воплощениях, T^1 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил, V^1 представляет собой $-CO-$, T^2 представляет собой $(AA)_p$, V^2 представляет собой $-NR^{15}-$, T^3 представляет собой $(PEG)_n$, V^3 представляет собой $-NR^{15}-$, T^4 отсутствует и V^4 отсутствует.

В некоторых воплощениях, T^1 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил, V^1 представляет собой $-CO-$, T^2 представляет собой $(EDA)_w$, V^2 представляет собой $-CO-$, T^3 отсутствует, V^3 отсутствует, T^4 отсутствует и V^4 отсутствует.

В некоторых воплощениях, T^1 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил, V^1 представляет собой $-CONR^{15}$ -, T^2 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил, V^2 представляет собой $-NR^{15}$ -, T^3 отсутствует, V^3 отсутствует, T^4 отсутствует и V^4 отсутствует.

В некоторых воплощениях, T^1 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил, V^1 представляет собой $-CONR^{15}-$, T^2 представляет собой $(PEG)_n$, V^2 представляет собой $-CO-$, T^3 представляет собой $(EDA)_w$, V^3 отсутствует, T^4 отсутствует и V^4 отсутствует.

В некоторых воплощениях, T^1 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил, V^1 представляет собой $-CO-$, T^2 представляет собой $(EDA)_w$, V^2 отсутствует, T^3 отсутствует, V^3 отсутствует, T^4 отсутствует и V^4 отсутствует.

В некоторых воплощениях, T¹ представляет собой (C₁-C₁₂)алкил, V¹ представляет собой -CONR¹⁵-, T² представляет собой (PEG)_n, V² представляет собой -CO-, T³ представляет собой (AA)_n, V³ отсутствует, T⁴ отсутствует и V⁴ отсутствует.

В некоторых воплощениях, T^1 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил, V^1 представляет собой $-CO-$, T^2 представляет собой $(EDA)_w$, V^2 представляет собой $-CO-$, T^3 представляет собой $(CR^{13}OH)_h$, V^3 представляет собой $-CO-$, T^4 представляет собой $(AA)_p$ и V^4 отсутствует.

В некоторых воплощениях, T^1 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил, V^1 представляет собой $-CO-$, T^2 представляет собой $(AA)_p$, V^2 представляет собой $-NR^{15}-$, T^3 представляет

собою (C_1-C_{12})алкил, V^3 представляет собою $-CO-$, T^4 представляет собою $(AA)_p$ и V^4 отсутствует.

В некоторых воплощениях, T^1 представляет собою (C_1-C_{12})алкил, V^1 представляет собою $-CO-$, T^2 представляет собою $(AA)_p$, V^2 представляет собою $-NR^{15}-$, T^3 представляет собою $(PEG)_n$, V^3 представляет собою $-CO-$, T^4 представляет собою $(AA)_p$ и V^4 отсутствует.

В некоторых воплощениях, T^1 представляет собою (C_1-C_{12})алкил, V^1 представляет собою $-CO-$, T^2 представляет собою $(AA)_p$, V^2 представляет собою $-NR^{11}-$, T^3 представляет собою $(PEG)_n$, V^3 представляет собою $-SO_2-$, T^4 представляет собою $(AA)_p$ и V^4 отсутствует.

В некоторых воплощениях, T^1 представляет собою (C_1-C_{12})алкил, V^1 представляет собою $-CO-$, T^2 представляет собою $(EDA)_w$, V^2 представляет собою $-CO-$, T^3 представляет собою $(CR^{13}OH)_h$, V^3 представляет собою $-CONR^{15}-$, T^4 представляет собою $(PEG)_n$ и V^4 представляет собою $-CO-$.

В некоторых воплощениях, T^1 представляет собою (C_1-C_{12})алкил, V^1 представляет собою $-CO-$, T^2 представляет собою $(CR^{13}OH)_h$, V^2 представляет собою $-CO-$, T^3 отсутствует, V^3 отсутствует, T^4 отсутствует и V^4 отсутствует.

В некоторых воплощениях, T^1 представляет собою (C_1-C_{12})алкил, V^1 представляет собою $-CONR^{15}-$, T^2 представляет собою замещенный (C_1-C_{12})алкил, V^2 представляет собою $-NR^{15}-$, T^3 представляет собою $(PEG)_n$, V^3 представляет собою $-CO-$, T^4 отсутствует и V^4 отсутствует.

В некоторых воплощениях, T^1 представляет собою (C_1-C_{12})алкил, V^1 представляет собою $-SO_2-$, T^2 представляет собою (C_1-C_{12})алкил, V^2 представляет собою $-CO-$, T^3 отсутствует, V^3 отсутствует, T^4 отсутствует и V^4 отсутствует.

В некоторых воплощениях, T^1 представляет собою (C_1-C_{12})алкил, V^1 представляет собою $-CONR^{15}-$, T^2 представляет собою (C_1-C_{12})алкил, V^2 отсутствует, T^3 представляет собою $(CR^{13}OH)_h$, V^3 представляет собою $-CONR^{15}-$, T^4 отсутствует и V^4 отсутствует.

В некоторых воплощениях, T^1 представляет собою (C_1-C_{12})алкил, V^1 представляет собою $-CO-$, T^2 представляет собою $(AA)_p$, V^2 представляет собою $-NR^{15}-$, T^3 представляет собою $(PEG)_n$, V^3 представляет собою $-CO-$, T^4 представляет собою $(AA)_p$ и V^4 представляет собою $-NR^{15}-$.

В некоторых воплощениях, T^1 представляет собою (C_1-C_{12})алкил, V^1 представляет собою $-CO-$, T^2 представляет собою $(AA)_p$, V^2 представляет собою $-NR^{15}-$, T^3 представляет собою $(PEG)_n$, V^3 is $-P(O)OH-$, T^4 представляет собою $(AA)_p$ и V^4 отсутствует.

В некоторых воплощениях, T^1 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил, V^1 представляет собой $-CO-$, T^2 представляет собой $(EDA)_w$, V^2 отсутствует, T^3 представляет собой $(AA)_p$, V^3 отсутствует, T^4 отсутствует и V^4 отсутствует.

В некоторых воплощениях, T^1 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил, V^1 представляет собой $-CO-$, T^2 представляет собой $(EDA)_w$, V^2 представляет собой $-CO-$, T^3 представляет собой $(CR^{13}OH)_h$, V^3 представляет собой $-CONR^{15}-$, T^4 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил и V^4 представляет собой $-CO(AA)_p-$.

В некоторых воплощениях, T^1 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил, V^1 представляет собой $-CONR^{15}-$, T^2 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил, V^2 представляет собой $-NR^{15}-$, T^3 отсутствует, V^3 представляет собой $-CO-$, T^4 отсутствует и V^4 отсутствует.

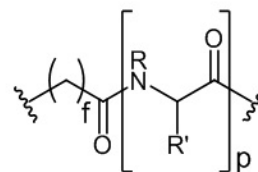
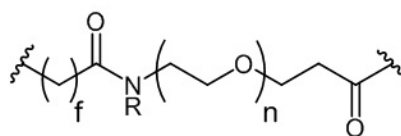
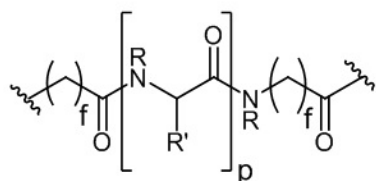
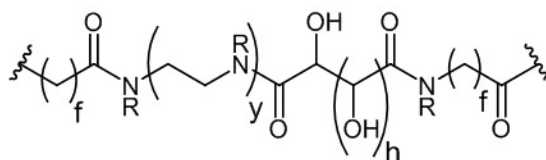
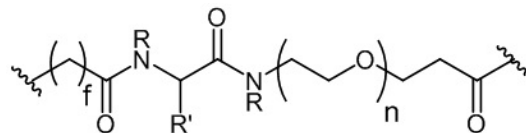
В некоторых воплощениях, T^1 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил, V^1 представляет собой $-CONR^{15}-$, T^2 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил, V^2 представляет собой $-NR^{15}-$, T^3 отсутствует, V^3 представляет собой $-CO-$, T^4 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил и V^4 представляет собой $-NR^{15}-$.

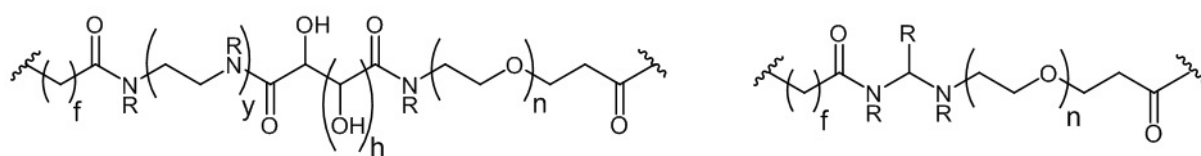
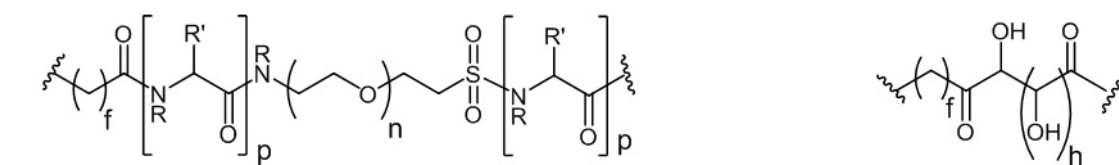
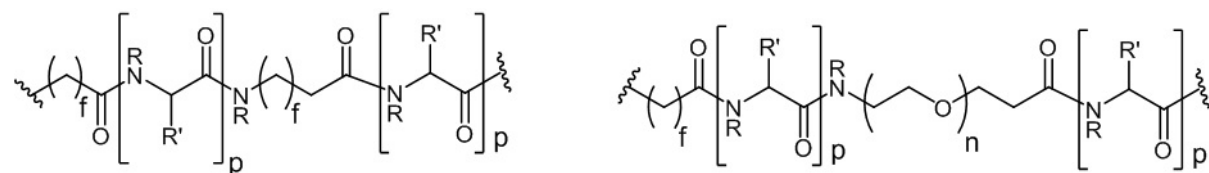
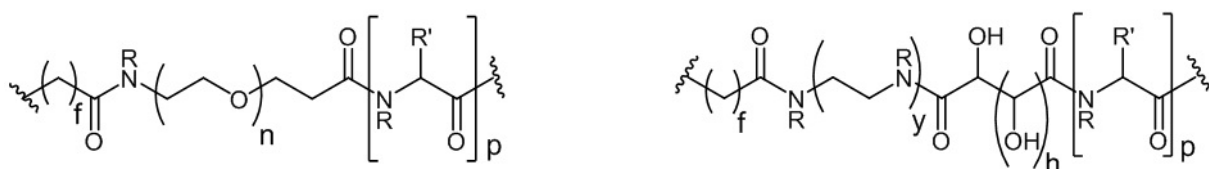
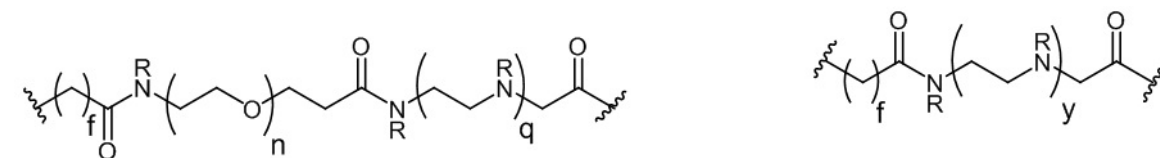
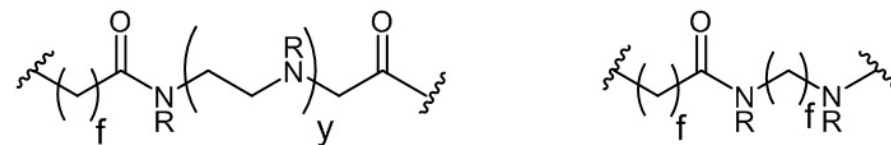
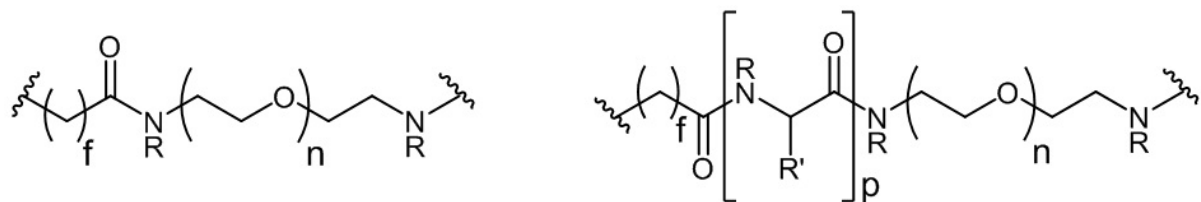
В некоторых воплощениях, T^1 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил, V^1 представляет собой $-CO-$, T^2 представляет собой $(EDA)_w$, V^2 представляет собой $-CO-$, T^3 представляет собой $(CR^{13}OH)_h$, V^3 представляет собой $-CONR^{15}-$, T^4 представляет собой $(PEG)_n$ и V^4 представляет собой $-CO(AA)_p-$.

В некоторых воплощениях, T^1 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил, V^1 представляет собой $-CO-$, T^2 представляет собой 4AP, V^2 представляет собой $-CO-$, T^3 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил, V^3 представляет собой $-CO-$, T^4 представляет собой $(AA)_p$ и V^4 отсутствует.

В некоторых воплощениях, T^1 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил, V^1 представляет собой $-CO-$, T^2 представляет собой 4AP, V^2 представляет собой $-CO-$, T^3 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил, V^3 представляет собой $-CO-$, T^4 отсутствует и V^4 отсутствует.

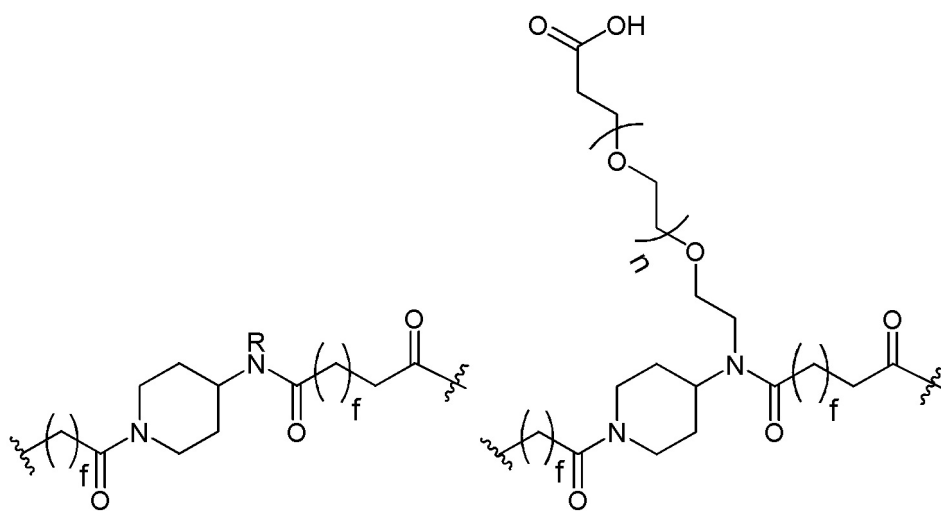
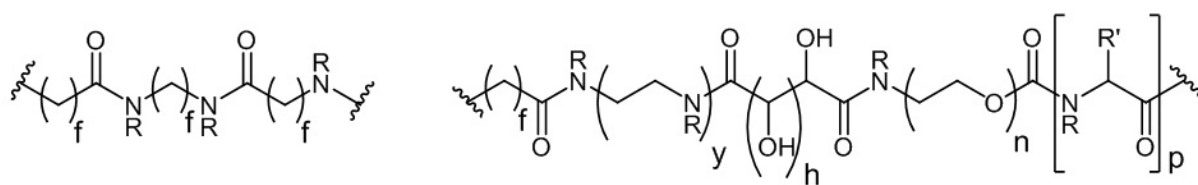
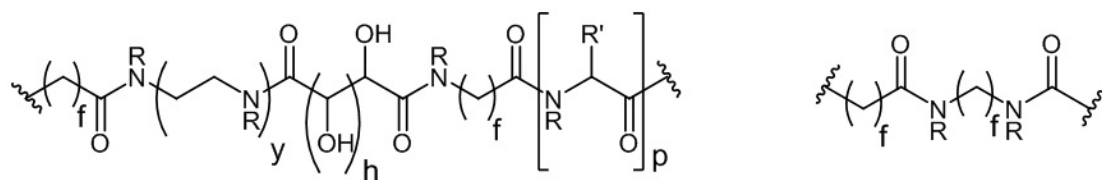
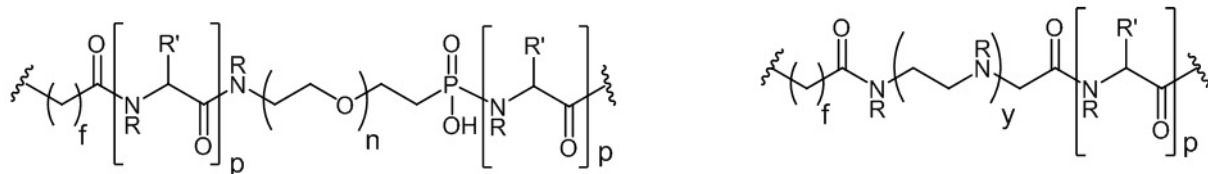
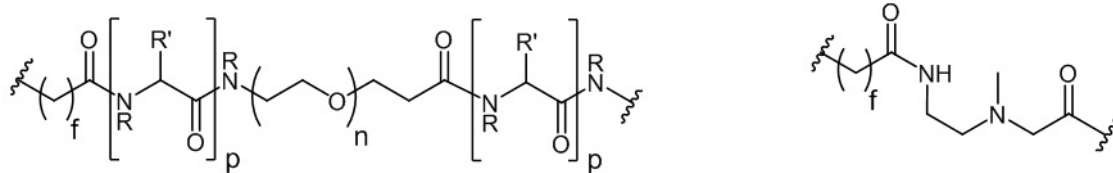
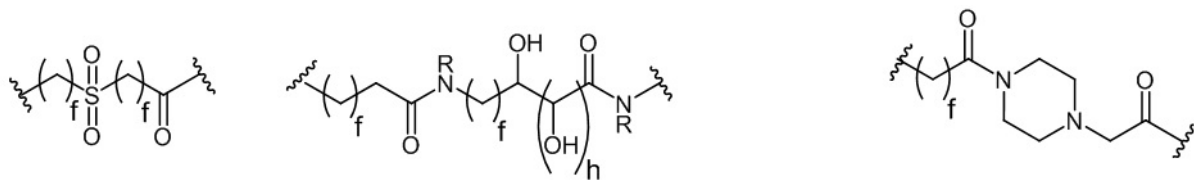
В некоторых воплощениях, линкер описан одной из следующих структур:

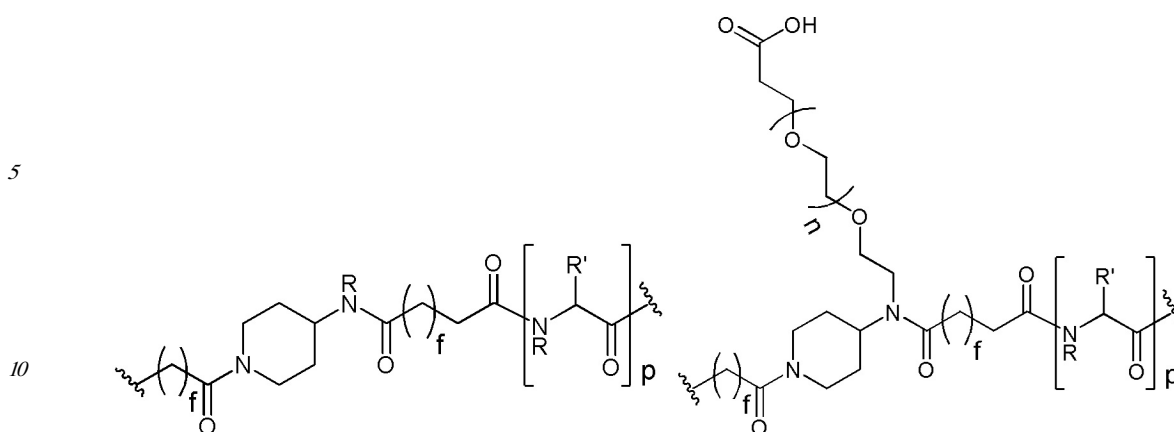




40

45

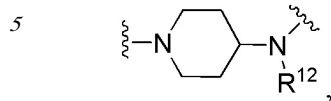




В некоторых воплощениях структур линкера, изображенных выше, каждый f независимо представляет собой 0 или целое число от 1 до 12; каждый u независимо представляет собой 0 или целое число от 1 до 20; каждый p независимо представляет собой 0 или целое число от 1 до 30; каждый r независимо представляет собой 0 или целое число от 1 до 20; каждый h независимо представляет собой 0 или целое число от 1 до 12; каждый R независимо представляет собой водород, алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, алкоксильную группу, замещенную алкоксильную группу, аминогруппу, замещенную аминогруппу, карбоксил, карбоксильный эфир, ацил, ацилоксильную группу, ацил-аминогруппу, аминоацил, алкиламид, замещенный алкиламид, сульфонил, тиаалкоксильную группу, замещенную тиаалкоксильную группу, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, гетероциклил и замещенный гетероциклил; и каждый R' независимо представляет собой H, боковую цепь аминокислоты, алкил, замещенный алкил, алкенил, замещенный алкенил, алкинил, замещенный алкинил, алкоксильную группу, замещенную алкоксильную группу, аминогруппу, замещенную аминогруппу, карбоксил, карбоксильный эфир, ацил, ацилоксильную группу, ацил-аминогруппу, аминоацил, алкиламид, замещенный алкиламид, сульфонил, тиаалкоксильную группу, замещенную тиаалкоксильную группу, арил, замещенный арил, гетероарил, замещенный гетероарил, циклоалкил, замещенный циклоалкил, гетероциклил и замещенный гетероциклил. В некоторых воплощениях в изображенных выше структурах линкера, каждый f независимо представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6; каждый u независимо представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6; каждый p независимо представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6; и каждый h независимо представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых воплощениях в изображенных выше структурах линкера, каждый R независимо представляет собой H, метил или $-(CH_2)_m-OH$, где m равен 1, 2, 3 или 4 (например, 2).

В некоторых воплощениях линкера, L , T^1 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил, V^1 представляет собой $-CO-$, T^2 представляет собой 4AP, V^2 представляет собой $-CO-$, T^3 представляет собой (C_1-C_{12}) алкил, V^3 представляет собой $-CO-$, T^4 отсутствует и V^4 отсутствует. В некоторых воплощениях, T^1 представляет собой этилен, V^1 представляет собой $-CO-$, T^2 представляет собой 4AP, V^2 представляет собой $-CO-$, T^3 представляет собой этилен, V^3 представляет собой $-CO-$, T^4 отсутствует и V^4 отсутствует. В некоторых воплощениях, T^1 представляет собой этилен, V^1 представляет собой $-CO-$, T^2

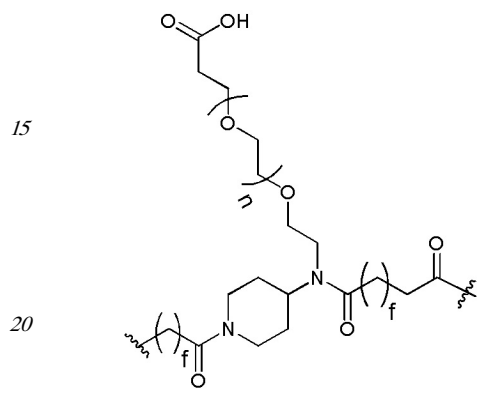
представляет собой 4AP, V^2 представляет собой -CO-, T^3 представляет собой этилен, V^3 представляет собой -CO-, T^4 отсутствует и V^4 отсутствует, где T^2 (например, 4AP) имеет следующую структуру:



в которой

10 R^{12} представляет собой фрагмент полиэтиленгликоля (например, полиэтиленгликоль или модифицированный полиэтиленгликоль).

В некоторых воплощениях, линкер, L, включает следующую структуру:



в которой

каждый f независимо представляет собой целое число от 1 до 12; и

n представляет собой целое число от 1 до 30.

25 В некоторых воплощениях, f равен 1. В некоторых воплощениях, f равен 2. В некоторых воплощениях, один f равен 2 и один f равен 1.

В некоторых воплощениях, n равно 1.

30 В некоторых воплощениях, левая часть приведенной выше линкерной структуры прикреплена к гидразинил-индолил или гидразинил-пирроло-пиридинил сопрягающему фрагменту и правая часть приведенной выше линкерной структуры прикреплена к майтансину.

Любое из химических структурных единиц, линкеров и сопрягающих фрагментов, раскрытых в приведенных выше структурах, могут быть адаптированы для применения в соединениях и конъюгатах изобретения.

35 Дополнительное раскрытие, относящееся к гидразинил-индолил и гидразинил-пирроло-пиридинил соединениям и способам получения конъюгата, можно найти в публикации заявки на патент США №2014/0141025, зарегистрированной 11 марта 2013 и публикации заявки на патент США №2015/0157736, зарегистрированной 26 ноября 2014, раскрытия каждой из которых включены в настоящий документ путем отсылки.

40 Анти-CD22 антитела

Как отмечено выше, конъюгат изобретения может включать, в качестве заместителя W^2 анти-CD22 антитела, где анти-CD22 антитело модифицировано для включения остатка 2-формилглицина (FGly). Как применено в настоящем документе, аминокислоты 45 могут быть обозначены по их стандартному названию, их стандартной трехбуквенной аббревиатуре и/или их стандартной однобуквенной аббревиатуре, например: аланин или Ala или A; цистеин или Cys или C; аспарагиновая кислота или Asp или D; глутаминовая кислот или Glu или E; фенилаланин или Phe или F; глицин или Gly или G;

гистидин или His или H; изолейцин или Ile или I; лизин или Lys или K; лейцин или Leu или L; метионин или Met или M; аспарагин или Asn или N; пролин или Pro или P; глутамин или Gln или Q; аргинин или Arg или R; серин или Ser или S; треонин или Thr или T; валин или Val или V; триптофан или Trp или W; и тирозин или Tyr или Y.

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело специфически связывается с CD22 полипептидом, где эпитоп включает аминокислотные остатки в рамках антигена CD22 (например, между аминокислотами от 1 до 847, между аминокислотами 1-759, между аминокислотами 1-751, или между аминокислотами 1-670, в аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8А-8С).

Эпитоп CD22 может быть образован полипептидом, имеющим, по меньшей мере, примерно 75%, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, примерно 98%, по меньшей мере, примерно 99%, или 100% идентичности аминокислотной последовательности со смежным участком, равным от примерно 500 аминокислот до примерно 670 аминокислот аминокислотной последовательности изоформы 4 человеческого CD22, изображенной на фиг. 8А-8С. Эпитоп CD22 может быть образован полипептидом, имеющим, по меньшей мере, примерно 75%, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, примерно 98%, по меньшей мере, примерно 99%, или 100%, идентичности аминокислотной последовательности со смежным участком, равным от примерно 500 аминокислот до примерно 751 аминокислот аминокислотной последовательности изоформы 3 человеческого CD22, изображенной на фиг. 8А-8С. Эпитоп CD22 может быть образован полипептидом, имеющим, по меньшей мере, примерно 75%, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, примерно 98%, по меньшей мере, примерно 99%, или 100%, идентичности аминокислотной последовательности со смежным участком, равным от примерно 500 аминокислот до примерно 759 аминокислот аминокислотной последовательности изоформы 2 человеческого CD22, изображенной на фиг. 8А-8С. Эпитоп CD22 может быть образован полипептидом, имеющим, по меньшей мере, примерно 75%, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, примерно 85%, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, примерно 98%, по меньшей мере, примерно 99%, или 100%, идентичности аминокислотной последовательности со смежным участком, равным от примерно 500 аминокислот до примерно 847 аминокислот аминокислотной последовательности изоформы 1 человеческого CD22, изображенной на фиг. 8А-8С.

«Антиген CD22» или «полипептид CD22» может включать аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, примерно 75%, по меньшей мере, примерно 80%, по меньшей мере, примерно 90%, по меньшей мере, примерно 95%, по меньшей мере, примерно 98%, по меньшей мере, примерно 99%, или 100%, идентичности аминокислотной последовательности со смежным участком, равным от примерно 500 аминокислот (aa) до примерно 847 aa (изоформа 1), до примерно 759 aa (изоформа 2), до примерно 751 aa (изоформа 3) или до примерно 670 aa (изоформа 4) аминокислотной последовательности изоформы 1, 2, 3 или 4 CD22, изображенной на фиг. 8А-8С.

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело проявляет высокоаффинное связывание с CD22. Например, в некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело связывается с CD22 с аффинностью, равной, по меньшей мере, примерно 10^{-7} М, по меньшей мере, примерно 10^{-8} М, по меньшей мере, примерно 10^{-9} М, по меньшей мере,

примерно 10^{-10} М, по меньшей мере, примерно 10^{-11} М, или, по меньшей мере, примерно 10^{-12} М, или более чем 10^{-12} М. В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело связывается с эпитопом, присутствующем на CD22 с аффинностью, равной от примерно 10^{-7} М до примерно 10^{-8} М, от примерно 10^{-8} М до примерно 10^{-9} М, от примерно 10^{-9} М до примерно 10^{-10} М, от примерно 10^{-10} М до примерно 10^{-11} М, или от примерно 10^{-11} М до примерно 10^{-12} М, или более чем 10^{-12} М.

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело конкурирует за связывание с эпитопом в CD22 со вторым анти-CD22 антителом и/или связывается с таким же эпитопом в CD22, как второе анти-CD22 антитело. В некоторых случаях, анти-CD22 антитело, которое конкурирует за связывание с эпитопом в CD22 со вторым анти-CD22 антителом, также связывается с эпитопом как второе анти-CD22 антитело. В некоторых случаях, анти-CD22 антитело, которое конкурирует за связывание с эпитопом в CD22 со вторым анти-CD22 антителом, связывается с эпитопом, который перекрывается с эпитопом, связанным со вторым анти-CD22 антителом. В некоторых случаях, анти-CD22 антитело представляет собой гуманизированное антитело.

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело может индуцировать апоптоз в клетке, которая экспрессирует CD22 на своей клеточной поверхности.

Анти-CD22 антитело, подходящее для применения в конъюгате изобретения, в некоторых случаях будет препятствовать пролиферации клеток опухоли человека, которые гиперэкспрессируют CD22, где ингибирование происходит *in vitro*, *in vivo*, или одновременно *in vitro* и *in vivo*. Например, в некоторых случаях, анти-CD22 антитело, подходящее для применения в конъюгате изобретения, ингибирует пролиферацию клеток опухоли человека, которые гиперэкспрессируют CD22, по меньшей мере, примерно на 15%, по меньшей мере, примерно на 20%, по меньшей мере, примерно на 25%, по меньшей мере, примерно на 30%, по меньшей мере, примерно на 40%, по меньшей мере, примерно на 50%, по меньшей мере, примерно на 60%, по меньшей мере, примерно на 70%, по меньшей мере, примерно на 80%, или более чем на 80%, например, по меньшей мере, примерно на 85%, по меньшей мере, примерно на 90%, по меньшей мере, примерно на 95%, по меньшей мере, примерно на 98%, по меньшей мере, примерно на 99% или 100%.

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело конкурирует за связывание с эпитопом CD22 (например, эпитопом, включающим аминокислотные остатки в антигене CD22 (например, между аминокислотами от 1 до 847, между аминокислотами 1-759, между аминокислотами 1-751, или между аминокислотами 1-670, в аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8A-8C) с антителом, включающим область тяжелой цепи, определяющую комплементарность (CDR), которую выбирают из IYDMS(VH CDR1; SEQ ID NO: //), YISSGGGTYYPD TVKG(VH CDR2; SEQ ID NO: //) и HSGYGSSYGVL FAY(VH CDR3; SEQ ID NO: //). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело конкурирует за связывание с эпитопом CD22 (например, эпитопом, включающим аминокислотные остатки в антигене CD22 (например, между аминокислотами от 1 до 847, между аминокислотами 1-759, между аминокислотами 1-751, или между аминокислотами 1-670, в аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8A-8C) с антителом, включающим легкую цепь CDR, которую выбирают из RASQDISNYLN(VL CDR1; SEQ ID NO: //), YTSILHS(VL CDR2; SEQ ID NO: //) и QQGNTLPWT(VL CDR3; SEQ ID NO: //). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело представляет собой гуманизированное антитело.

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело конкурирует за связывание с эпитопом CD22 (например, эпитопом, включающим аминокислотные остатки в антигене CD22 (например, между аминокислотами от 1 до 847, между аминокислотами 1-759, между аминокислотами 1-751, или между аминокислотами 1-670, в аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8A-8C) с антителом, включающим VH CDRs IYDMS (VH CDR1; SEQ ID NO: //), YISSGGGTTYYPDTVKG (VH CDR2; SEQ ID NO: //) и HSGYGSSYGVLFAFAY (VH CDR3; SEQ ID NO: //). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело конкурирует за связывание с эпитопом CD22 (например, эпитопом, включающим аминокислотные остатки в антигене CD22 (например, между аминокислотами от 1 до 847, между аминокислотами 1-759, между аминокислотами 1-751, или между аминокислотами 1-670, в аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8A-8C) с антителом, включающим VL CDRs RASQDISNYLN (VL CDR1; SEQ ID NO: //), YTSILHS (VL CDR2; SEQ ID NO: //) и QQGNTLPWT (VL CDR3; SEQ ID NO: //). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело конкурирует за связывание с эпитопом CD22 (например, эпитопом, включающим аминокислотные остатки в антигене CD22 (например, между аминокислотами от 1 до 847, между аминокислотами 1-759, между аминокислотами 1-751, или между аминокислотами 1-670, в аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8A-8C) с антителом, которое включает VH CDRs IYDMS (VH CDR1; SEQ ID NO: //), YISSGGGTTYYPDTVKG (VH CDR2; SEQ ID NO: //) и HSGYGSSYGVLFAFAY (VH CDR3; SEQ ID NO: //) и VL CDRs RASQDISNYLN (VL CDR1; SEQ ID NO: //), YTSILHS (VL CDR2; SEQ ID NO: //) и QQGNTLPWT (VL CDR3; SEQ ID NO: //). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело представляет собой гуманизированное антитело.

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело включает VH CDRs IYDMS (VH CDR1; SEQ ID NO: //), YISSGGGTTYYPDTVKG (VH CDR2; SEQ ID NO: //) и HSGYGSSYGVLFAFAY (VH CDR3; SEQ ID NO: //). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело включает VL CDRs RASQDISNYLN (VL CDR1; SEQ ID NO: //), YTSILHS (VL CDR2; SEQ ID NO: //) и QQGNTLPWT (VL CDR3; SEQ ID NO: //). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело включает VH CDRs IYDMS (VH CDR1; SEQ ID NO: //), YISSGGGTTYYPDTVKG (VH CDR2; SEQ ID NO: //) и HSGYGSSYGVLFAFAY (VH CDR3; SEQ ID NO: //) и VL CDRs RASQDISNYLN (VL CDR1; SEQ ID NO: //), YTSILHS (VL CDR2; SEQ ID NO: //) и QQGNTLPWT (VL CDR3; SEQ ID NO: //). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело представляет собой гуманизированное антитело.

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело включает VH CDRs, присутствующие в VH-области анти-CD22, включающей следующую аминокислотную последовательность: EVQLVESGGGLV KPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGK GLEWVAYISSGGGTTYYPDTVKG RFTISRDN AKNSLYLQMSSLRAEDTAMYYCARHSG YGSSYGVLFAFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: //). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело представляет собой гуманизированное антитело.

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело включает VL CDRs, присутствующие в VL-области анти-CD22, включающей следующую аминокислотную последовательность: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAV

KLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQQEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGGTKV
EIKR (SEQ ID NO: //). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело представляет собой гуманизированное антитело.

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело включает VH CDRs, присутствующие в

EVQLVESGGGLV KPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGG
TTYYPDTV KGRFTISRDN AKNSLYLQMSSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAIW
GQGLTVTVSS (SEQ ID NO: //), и VL CDRs, присутствующие в DIQMTQSPSSLSASVGDR
VTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ
QEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: //). В некоторых случаях, анти-
CD22 антитело представляет собой гуманизированное антитело.

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело включает: а) тяжелую цепь, включающую VH-область, имеющую аминокислотную последовательность

EVQLVESGGGLV KPGGSLX¹LSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGT
TTYYPDTV KGRFTISRDN AKNX²LYLQMX³SLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAIW
GQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 1), где X¹ представляет собой K (Lys) или R (Arg); X²

представляет собой S (Ser) или T (Thr); и X³ представляет собой N (Asn) или S (Ser); и б) легкую цепь иммуноглобулина.

Легкая цепь может иметь любую подходящую V_L аминокислотную последовательность, до тех пор, пока полученное антитело связывается специфически с CD22.

Типичные аминокислотные последовательности V_L включают:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSILHSGV
PSRFSGSGSGTDYTLTISSLQQEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 7;
VK1);

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSILHSGV
PSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 8;
VK2); и

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSILHSGV
PSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGGTKVEIKR (SEQ ID NO: 9;
VK4).

Таким образом, например, подходящее анти-CD22 антитело может включать: а)

тяжелую цепь, включающую VH-область, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1); и легкую цепь, включающую VL-область в VK1. В других случаях, подходящее анти-CD22 антитело может включать:

а) тяжелую цепь, включающую VH-область, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1); и легкую цепь, включающую VL-область в VK2. Еще в других случаях, анти-CD22 антитело изобретения может включать:

а) тяжелую цепь, включающую VH-область, имеющую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1); и легкую цепь, включающую VL-область в VK4.

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело включает: а) легкую цепь

иммуноглобулина, включающую аминокислотную последовательность DIQMTQSPSSX¹S
ASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAX²KLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDY
TLTISSLQX³EDFATYFCQQGNTLPWTFGGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 2), где X¹ представляет

собой L (Leu) или V (Val); X² представляет собой V (Val) или P (Pro); и X³ представляет собой Q (Gln) или P (Pro); и b) тяжелую цепь иммуноглобулина. Тяжелая цепь может включать аминокислотную последовательность, которую выбирают из:

EVQLVESGGGLV⁵KPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGG
TTYYPDTVKGRTISRDN^{AKNTLYLQ}MSSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVL^{FAYW}
GQGT^{LVTVSS} (SEQ ID NO:3; VH3);

EVQLVESGGGLV¹⁰KPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGG
TTYYPDTVKGRTISRDN^{AKNSLYLQ}MSSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVL^{FAYW}
GQGT^{LVTVSS} (SEQ ID NO:4; VH4);

EVQLVESGGGLV¹⁰KPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGG
TTYYPDTVKGRTISRDN^{AKNSLYLQ}MNSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVL^{FAYW}
GQGT^{LVTVSS} (SEQ ID NO:5; VH5); и

EVQLVESGGGLV¹⁵KPGGSLKLSAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGG
TTYYPDTVKGRTISRDN^{AKNSLYLQ}MSSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVL^{FAYW}
GQGT^{LVTVSS} (SEQ ID NO:6; VH6).

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело включает VH-область, включающую следующую аминокислотную последовательность: EVQLVESGGGLV²⁰KPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGGTTYYPDTVKGRTISR
DN^{AKNSLYLQ}MSSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVL^{FAYWGQGT}LVTVSS (SEQ ID
NO://).

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело включает VH-область, включающую следующую аминокислотную последовательность:

EVQLVESGGGLV²⁵KPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGG
TTYYPDTVKGRTISRDN^{AKNSLYLQ}MSSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVL^{FAYW}
GQGT^{LVTVSS} (SEQ ID NO://), и VL-область, включающую следующую аминокислотную

последовательность:

DIQMTQSPSSLSASVGD^{RV}TITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSILHSGV
PSRFSGSGSGTDYTLTISS^{LQ}QEDFATYFCQQGNTLPWTFGGG^{TK}VEIKR (SEQ ID NO://
).

Модифицированные последовательности константных областей

Как отмечено выше, аминокислотную последовательность анти-CD22 антитела модифицируют для включения мотива сульфатазы, который содержит остаток серина или цистеина, способный к преобразованию (окислению) в остаток 2-формилглицина (FGly) под действием формилглицин-генерирующего фермента (FGE) или *in vivo* (например, во время трансляции содержащего альдегидную метку белка в клетке), или *in vitro* (например, при контакте содержащего альдегидную метку белка с FGE в бесклеточной системе). Такие мотивы сульфатазы также могут быть обозначены в настоящем документе как сайт FGE-модификации.

Мотивы сульфатазы

Минимальный мотив сульфатазы, представляющий собой альдегидную метку, обычно равен 5 или 6 аминокислотным остаткам в длину, как правило, не более чем 6 аминокислотных остатков в длину. Мотивы сульфатазы, обеспеченные в полипептиде Ig, равны, по меньшей мере, 5 или 6 аминокислотным остаткам и могут быть равны, например, от 5 до 16, 6-16, 5-15, 6-15, 5-14, 6-14, 5-13, 6-13, 5-12, 6-12, 5-11, 6-11, 5-10, 6-10, 5-9, 6-9, 5-8 или 6-8 аминокислотным остаткам в длину, с тем, чтобы определить мотив сульфатазы меньше, чем 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8 или 7 аминокислотных остатка в длину.

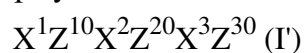
В некоторых воплощениях, представляющие интерес полипептиды включают такие,

где один или несколько аминокислотных остатков, например, 2 или более, или 3 или более, или 4 или более, или 5 или более, или 6 или более, или 7 или более, или 8 или более, или 9 или более, или 10 или более, или 11 или более, или 12 или более, или 13 или более, или 14 или более, или 15 или более, или 16 или более, или 17 или более, или 18
 5 или более, или 19 или более, или 20 или более аминокислотных остатков были вставлены, удалены, замещены (заменены) по сравнению с нативной аминокислотной последовательностью для обеспечения последовательности мотива сульфатазы в полипептиде. В некоторых воплощениях, полипептид включает модификацию (вставка, добавление, удаление и/или замена/замещение) меньше, чем 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13,
 10 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 аминокислотных остатка аминокислотной последовательности по сравнению с нативной аминокислотной последовательностью полипептида. Если нативная для полипептида аминокислотная последовательность (например, анти-CD22 антитело) содержит один или несколько остатков желаемого мотива сульфатазы, то общее число модификаций остатков может быть уменьшено,
 15 например, с помощью сайт-специфической модификации (вставка, добавление, удаление, замена/замещение) аминокислотных остатков, фланкирующих нативные аминокислотные остатки, для обеспечения последовательности желаемого мотива сульфатазы. В некоторых воплощениях, степень модификации нативной аминокислотной последовательности целевого полипептида анти-CD22 минимизирована так, чтобы
 20 свести к минимуму число аминокислотных остатков, которые были вставлены, удалены, замещены (заменены) или добавлены (например, на N- или C-конец). Минимизируя степень модификации аминокислотной последовательности целевого полипептида анти-CD22, может свести к минимуму воздействие, которое имеют такие модификации на функцию и/или структуру анти-CD22.

25 Следует отметить, что в то время как альдегидные метки, представляющие особый интерес, это метки, включающие, по меньшей мере, минимальный мотив сульфатазы (также обозначаемый как «консенсусный мотив сульфатазы»), легко понять, что настоящее раскрытие как рассматривает, так и охватывает более длинные альдегидные метки, и они могут найти применение в композициях и способах настоящего раскрытия.
 30 Альдегидные метки, таким образом, могут включать минимальный мотив сульфатазы, равный 5 или 6 остаткам, или могут быть длиннее и включать минимальный мотив сульфатазы, который может быть фланкирован со стороны N- и/или C-конца мотива дополнительными аминокислотными остатками. Рассматриваются, например, альдегидные метки, равные 5 или 6 аминокислотным остаткам, а также более длинные
 35 аминокислотные последовательности, равные более чем 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более аминокислотных остатков.

Альдегидная метка может присутствовать на или около C-конца тяжелой цепи Ig; например, альдегидная метка может присутствовать в пределах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот C-конца нативной, тяжелой цепи Ig дикого типа. Альдегидная метка
 40 может присутствовать в пределах СН1 домена тяжелой цепи Ig. Альдегидная метка может присутствовать в пределах СН2 домена тяжелой цепи Ig. Альдегидная метка может присутствовать в пределах СН3 домена тяжелой цепи Ig. Альдегидная метка может присутствовать в константной области легкой цепи Ig, например, в константной области легкой каппа-цепь или в константной области легкой лямбда-цепь.

45 В некоторых воплощениях, примененный мотив сульфатазы может быть описан формулой:



в которой

Z^{10} представляет собой цистеин или серин (который также может быть представлен как (C/S));

Z^{20} представляет собой остаток или пролина или аланина (который также может быть представлен как (P/A));

Z^{30} представляет собой основную аминокислоту (например, аргинин (R) и может представлять собой лизин (K) или гистидин (H), например, лизин) или алифатическую аминокислоту (аланин (A), глицин (G), лейцин (L), валин (V), изолейцин (I) или пролин (P), например, A, G, L, V или I;

X^1 присутствует или отсутствуют и, если присутствует, может представлять собой любую аминокислоту, например, алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную, незаряженную аминокислоту, (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например, L, M, V, S или T, например, L, M, S или V, при условии, что когда мотив сульфатазы находится на N-конце целевого полипептида, то X^1 присутствует; и

X^2 и X^3 независимо могут представлять собой любую аминокислоту, хотя как правило алифатическую аминокислоту, полярную, незаряженную аминокислоту или серосодержащую аминокислоту (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например, S, T, A, V, G или C, например, S, T, A, V или G.

Аминокислотная последовательность тяжелой и/или легкой цепи анти-CD22 может быть модифицирована для обеспечения последовательности, равной, по меньшей мере, 5 аминокислот формулы $X^1Z^{10}X^2Z^{20}X^3Z^{30}$, где

Z^{10} представляет собой цистеин или серин;

Z^{20} представляет собой пролин или аланин остаток;

Z^{30} представляет собой алифатическую аминокислоту или основную аминокислоту;

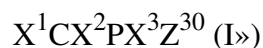
X^1 присутствует или отсутствуют и, если присутствует, представляет собой любую аминокислоту, при условии, что если гетерологичный мотив сульфатазы находится на N-конце полипептида, то X^1 присутствует;

X^2 и X^3 каждый независимо представляет собой любую аминокислоту,

где последовательность находится в пределах или рядом с участком доступной для растворителя петли константной области Ig и где последовательность не находится на C-конце тяжелой цепи Ig.

Мотив сульфатазы, в общем, выбирают таким образом, чтобы он был способен к преобразованию под действием выбранного FGE, например, FGE присутствует в клетке-хозяине, в которой экспрессировали меченый альдегидом полипептид, или FGE, который должен связаться с меченым альдегидом полипептидом в бесклеточном *in vitro* способе.

Например, если FGE представляет собой эукариотический FGE (например, FGE млекопитающего, включая FGE человека), мотив сульфатазы может иметь формулу:



в которой

X^1 может присутствовать или отсутствовать, и, если присутствует, то может представлять собой любую аминокислоту, например, алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную, незаряженную аминокислоту, (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например,

L, M, S или V, при условии, что когда мотив сульфатазы находится на N-конце целевого полипептида, то X^1 присутствует;

X^2 и X^3 независимо могут представлять собой любую аминокислоту, например, алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную, незаряженную аминокислоту, (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например, S, T, A, V, G или C, например, S, T, A, V или G; и

Z^{30} представляет собой основную аминокислоту (например, аргинин (R) и может представлять собой лизин (K) или гистидин (H), например, лизин) или алифатическую аминокислоту (аланин (A), глицин (G), лейцин (L), валин (V), изолейцин (I) или пролин (P), например, A, G, L, V или I.

Специфические примеры мотивов сульфатазы включают LCTPSR (SEQ ID NO://), MCTPSR (SEQ ID NO://), VCTPSR (SEQ ID NO://), LCSPSR (SEQ ID NO://), LCAPSR (SEQ ID NO://), LCVPSR (SEQ ID NO://), LCGPSR (SEQ ID NO://), ICTPAR (SEQ ID NO://), LCTPSK (SEQ ID NO://), MCTPSK (SEQ ID NO://), VCTPSK (SEQ ID NO://), LCSPSK (SEQ ID NO://), LCAPSK (SEQ ID NO://), LCVPSK (SEQ ID NO://), LCGPSK (SEQ ID NO://), LCTPSA (SEQ ID NO://), ICTPAA (SEQ ID NO://), MCTPSA (SEQ ID NO://), VCTPSA (SEQ ID NO://), LCSPSA (SEQ ID NO://), LCAPSA (SEQ ID NO://), LCVPSA (SEQ ID NO://) и LCGPSA (SEQ ID NO://).

FGly-содержащие последовательности

Под действием FGE на модифицированной тяжелой и/или легкой цепи анти-CD22, серин или цистеин в мотиве сульфатазы модифицируются до FGly. Таким образом, FGly-содержащий мотив сульфатазы может иметь формулу:

$X^1(\text{FGly})X^2Z^{20}X^3Z^{30}(\Gamma''')$

в которой

FGly представляет собой остаток формилглицина;

Z^{20} представляет собой остаток или пролина или аланина (который также может быть представлен как (P/A));

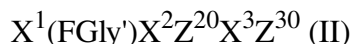
Z^{30} представляет собой основную аминокислоту (например, аргинин (R) и может представлять собой лизин (K) или гистидин (H), как правило лизин) или алифатическую аминокислоту (аланин (A), глицин (G), лейцин (L), валин (V), изолейцин (I) или пролин (P), например, A, G, L, V или I;

X^1 может присутствовать или отсутствовать, и, если присутствует, то может представлять собой любую аминокислоту, например, алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную, незаряженную аминокислоту, (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например, L, M, V, S или T, например, L, M или V, при условии, что когда мотив сульфатазы находится на N-конце целевого полипептида, то X^1 присутствует; и

X^2 и X^3 независимо могут представлять собой любую аминокислоту, например, алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную, незаряженную аминокислоту, (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например, S, T, A, V, G или C, например, S, T, A, V или G.

Как описано выше, модифицированный полипептид, содержащий остаток FGly, может быть конъюгирован с лекарственным средством (например, с майтансиноидом) в реакции FGly с лекарственным средством (например, лекарственное средство,

содержащее гидразинил-индолил или гидразинил-пирроло-пиридинил сопрягающий фрагмент, как описан выше) для получения FGly'-содержащего мотива сульфатазы. Как применен в настоящем документе, термин FGly' относится к модифицированному аминокислотному остатку мотива сульфатазы, который сопряжен с лекарственным средством, таким как майтансиноид (например, модифицированный аминокислотный остаток формулы (I)). Таким образом, FGly'-содержащий мотив сульфатазы может иметь формулу:



в которой

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I);

Z^{20} представляет собой остаток или пролина или аланина (который также может быть представлен как (P/A));

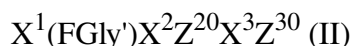
Z^{30} представляет собой основную аминокислоту (например, аргинин (R) и может представлять собой лизин (K) или гистидин (H), как правило, лизин) или алифатическую аминокислоту (аланин (A), глицин (G), лейцин (L), валин (V), изолейцин (I) или пролин (P), например, A, G, L, V или I;

X^1 может присутствовать или отсутствовать, и, если присутствует, то может представлять собой любую аминокислоту, например, алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную, незаряженную аминокислоту, (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например, L, M, V, S или T, например, L, M или V, при условии, что когда мотив сульфатазы

находится на N-конце целевого полипептида, то X^1 присутствует; и

X^2 и X^3 независимо могут представлять собой любую аминокислоту, например, алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную, незаряженную аминокислоту, (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например, S, T, A, V, G или C, например, S, T, A, V или G.

В некоторых воплощениях, модифицированный аминокислотный остаток формулы (I) расположен на C-конце константной области тяжелой цепи анти-CD22 антитела. В некоторых случаях, константная область тяжелой цепи включает последовательность формулы (II):



в которой

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I);

Z^{20} представляет собой остаток или пролина или аланина (который также может быть представлен как (P/A));

Z^{30} представляет собой основную аминокислоту (например, аргинин (R) и может представлять собой лизин (K) или гистидин (H), как правило, лизин) или алифатическую аминокислоту (аланин (A), глицин (G), лейцин (L), валин (V), изолейцин (I) или пролин (P), например, A, G, L, V или I;

X^1 может присутствовать или отсутствовать, и, если присутствует, то может представлять собой любую аминокислоту, например, алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную, незаряженную аминокислоту, (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например,

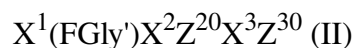
L, M, V, S или T, например, L, M или V, при условии, что когда мотив сульфатазы находится на N-конце целевого полипептида, то X^1 присутствует;

X^2 и X^3 независимо могут представлять собой любую аминокислоту, например, алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную, незаряженную аминокислоту, (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например, S, T, A, V, G или C, например, S, T, A, V или G; и

в которой последовательность представляет собой C-конец к аминокислотной последовательности QKSLSLSPGK и, где последовательность может включать 1, 2, 3, 4, 5 или от 5 до 10, аминокислот, не присутствующих в нативной, константной области тяжелой цепи Ig дикого типа.

В некоторых воплощениях, константная область тяжелой цепи включает последовательность SLSLSPGSL(FGly')TPSRGS на C-конце тяжелой цепи Ig, например, вместо нативной последовательности SLSLSPGK (SEQ ID NO://).

В некоторых воплощениях, модифицированный аминокислотный остаток формулы (I) расположен в константной области легкой цепи анти-CD22 антитела. В некоторых воплощениях, константная область легкой цепи включает последовательность формулы (II):



в которой

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I);

Z^{20} представляет собой остаток или пролина или аланина (который также может быть представлен как (P/A));

Z^{30} представляет собой основную аминокислоту (например, аргинин (R) и может представлять собой лизин (K) или гистидин (H), как правило лизин) или алифатическую аминокислоту (аланин (A), глицин (G), лейцин (L), валин (V), изолейцин (I) или пролин (P), например, A, G, L, V или I;

X^1 может присутствовать или отсутствовать, и, если присутствует, то может представлять собой любую аминокислоту, например, алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную, незаряженную аминокислоту, (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например, L, M, V, S или T, например, L, M или V, при условии, что когда мотив сульфатазы находится на N-конце целевого полипептида, то X^1 присутствует;

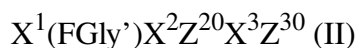
X^2 и X^3 независимо могут представлять собой любую аминокислоту, например, алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную, незаряженную аминокислоту, (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например, S, T, A, V, G или C, например, S, T, A, V или G; и

в которой последовательность представляет собой C-конец к аминокислотной последовательности KVDNAL(SEQ ID NO://) и/или представляет собой N-конец к аминокислотной последовательности QSGNSQ (SEQ ID NO://).

В некоторых воплощениях, константная область легкой цепи включает последовательность KVDNAL(FGly')TPSRQSGNSQ (SEQ ID NO://).

В некоторых воплощениях, модифицированный аминокислотный остаток формулы (I) расположен в области CH1 тяжелой цепи анти-CD22 антитела. В некоторых

воплощениях, область CH1 тяжелой цепи включает последовательность формулы (II):



в которой

5 FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I);

Z²⁰ представляет собой остаток или пролина или аланина (который также может быть представлен как (P/A));

10 Z³⁰ представляет собой основную аминокислоту (например, аргинин (R) и может представлять собой лизин (K) или гистидин (H), как правило лизин) или алифатическую аминокислоту (аланин (A), глицин (G), лейцин (L), валин (V), изолейцин (I) или пролин (P), например, A, G, L, V или I;

15 X¹ может присутствовать или отсутствовать, и, если присутствует, то может представлять собой любую аминокислоту, например, алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную, незаряженную аминокислоту, (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например, L, M, V, S или T, например, L, M или V, при условии, что когда мотив сульфатазы находится на N-конце целевого полипептида, то X¹ присутствует;

20 X² и X³ независимо могут представлять собой любую аминокислоту, например, алифатическую аминокислоту, серосодержащую аминокислоту или полярную, незаряженную аминокислоту, (т.е. отличную от ароматической аминокислоты или заряженной аминокислоты), например, S, T, A, V, G или C, например, S, T, A, V или G; и

25 в которой последовательность представляет собой C-конец к аминокислотной последовательности SWNSGA (SEQ ID NO://) и/или представляет собой N-конец к аминокислотной последовательности GVHTFP (SEQ ID NO://).

В некоторых воплощениях, область CH1 тяжелой цепи включает последовательность SWNSGAL(FGly')TPSRGVHTFP (SEQ ID NO://).

30 Сайт модификации

Как отмечено выше, аминокислотную последовательность анти-CD22 антитела модифицируют для включения мотива сульфатазы, который содержит остаток серина или цистеина, способный к преобразованию (окислению) в остаток FGly под действием FGE или *in vivo* (например, во время трансляции содержащего альдегидную метку белка в клетке) или *in vitro* (например, при контакте содержащего альдегидную метку белка с FGE в бесклеточной системе). Анти-CD22 полипептиды, примененные для создания конъюгата настоящего раскрытия, включают, по меньшей мере, константную область Ig, например, константную область тяжелой цепи Ig (например, по меньшей мере, домен CH1; по меньшей мере, домен CH1 и CH2; домен CH1, CH2 и CH3; или домен CH1, CH2, 40 CH3 и CH4) или константную область легкой цепи Ig. Такие полипептиды Ig обозначают в настоящем документе как «целевые полипептиды Ig» или «целевые анти-CD22 антитела» или «целевые анти-CD22 полипептиды Ig».

45 Сайт в анти-CD22 антителе, в который вводят мотив сульфатазы, может представлять собой любой подходящий сайт. Как отмечено выше, в некоторых случаях, степень модификации нативной аминокислотной последовательности целевого полипептида анти-CD22 минимизируют, чтобы свести к минимуму число аминокислотных остатков, который вставляют, удаляют, замещают (заменяют) и/или добавляют (например, к N-или C-концу). Минимизируя степень модификации аминокислотной последовательности

целевого полипептида анти-CD22, можно свести к минимуму воздействие таких модификаций, которые могут оказывать влияние на функцию и/или структуру анти-CD22.

Константная область тяжелой цепи анти-CD22 антитела может включать константные области Ig любого изотипа тяжелой цепи, неприродные константные области тяжелой цепи Ig (включая консенсусные константные области тяжелой цепи Ig). Константная область Ig может быть модифицирована для включения альдегидной метки, где альдегидная метка присутствует в или расположена рядом с доступной для растворителя областью петли константной области Ig. Константная область Ig может быть модифицирована с помощью вставки и/или замены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 16 аминокислот или более чем 16 аминокислот, для обеспечения аминокислотной последовательности мотива сульфатазы, как описано выше.

В некоторых случаях, альдегид-меченое анти-CD22 антитело включает альдегид-меченую константную область тяжелой цепи Ig (например, по меньшей мере, домен CH1; по меньшей мере, домен CH1 и CH2; домен CH1, CH2 и CH3; или домен CH1, CH2, CH3 и CH4). Константная область тяжелой цепи альдегид-меченого Ig может включать константную область тяжелой цепи последовательности изотипа тяжелой цепи IgA, IgM, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или любой их аллотипический вариант, например, последовательности константной области тяжелой цепи человека или последовательности константной области тяжелой цепи мыши, гибридную константную область тяжелой цепи, синтетическую последовательность константной области тяжелой цепи или консенсусную последовательность константной области тяжелой цепи и т.п., модифицированную для включения, по меньшей мере, одного мотива сульфатазы, который может быть модифицирован под действием FGE для образования FGly-модифицированного полипептида Ig. Аллотипические варианты тяжелой цепи Ig известны в данной области техники. Смотри, например, Jefferis и Lefranc (2009) MAbs 1:4.

В некоторых случаях, альдегид-меченое анти-CD22 антитело включает альдегид-меченую константную область легкой цепи Ig. Альдегид-меченая константная область легкой цепи Ig может включать последовательности константной области легкой цепи каппа, легкой цепи лямбда, например, константные области легкой цепи каппа или лямбда человека, гибридной константной области легкой цепи, последовательность синтетической константной области легкой цепи или консенсусной константной области легкой цепи и т.п., модифицированную для включения, по меньшей мере, одного мотива сульфатазы, который может быть модифицирован под действием FGE для образования FGly-модифицированного полипептида анти-CD22 антитела. Типичные константные области включают области гамма 1 и гамма 3 человека. За исключением мотива сульфатазы, модифицированная константная область может иметь аминокислотную последовательность дикого типа или она может иметь аминокислотную последовательность, которая, по меньшей мере, на 70% идентична (например, по меньшей мере, на 80%, по меньшей мере, на 90% или, по меньшей мере, на 95% идентична) аминокислотной последовательности дикого типа.

В некоторых воплощениях мотив сульфатазы находится в положении отличном от С-конца или в добавлении к С-концу полипептида тяжелой цепи Ig. Как отмечено выше, изолированный альдегид-меченый анти-CD22 полипептид может включать константную область тяжелой цепи, модифицированную для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где мотив сульфатазы находится в или рядом с областью доступной для растворителя петли константной области тяжелой цепи полипептида анти-CD22.

В некоторых случаях, целевой анти-CD22 иммуноглобулин был модифицирован для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях, мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с константной областью тяжелой цепи IgG1, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 122-127; 2) аминокислоты 137-143; 3) аминокислоты 155-158; 4) аминокислоты 163-170; 5) аминокислоты 163-183; 6) аминокислоты 179-183; 7) аминокислоты 190-192; 8) аминокислоты 200-202; 9) аминокислоты 199-202; 10) аминокислоты 208-212; 11) аминокислоты 220-241; 12) аминокислоты 247-251; 13) аминокислоты 257-261; 14) аминокислоты 269-277; 15) аминокислоты 271-277; 16) аминокислоты 284-285; 17) аминокислоты 284-292; 18) аминокислоты 289-291; 19) аминокислоты 299-303; 20) аминокислоты 309-313; 21) аминокислоты 320-322; 22) аминокислоты 329-335; 23) аминокислоты 341-349; 24) аминокислоты 342-348; 25) аминокислоты 356-365; 26) аминокислоты 377-381; 27) аминокислоты 388-394; 28) аминокислоты 398-407; 29) аминокислоты 433-451; и 30) аминокислоты 446-451; в которой нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1 человека, как показано на фиг. 9В.

В некоторых случаях, целевой анти-CD22 иммуноглобулин модифицирован для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях, мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с константной областью тяжелой цепи IgG1, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-6; 2) аминокислоты 16-22; 3) аминокислоты 34-47; 4) аминокислоты 42-49; 5) аминокислоты 42-62; 6) аминокислоты 34-37; 7) аминокислоты 69-71; 8) аминокислоты 79-81; 9) аминокислоты 78-81; 10) аминокислоты 87-91; 11) аминокислоты 100-121; 12) аминокислоты 127-131; 13) аминокислоты 137-141; 14) аминокислоты 149-157; 15) аминокислоты 151-157; 16) аминокислоты 164-165; 17) аминокислоты 164-172; 18) аминокислоты 169-171; 19) аминокислоты 179-183; 20) аминокислоты 189-193; 21) аминокислоты 200-202; 22) аминокислоты 209-215; 23) аминокислоты 221-229; 24) аминокислоты 22-228; 25) аминокислоты 236-245; 26) аминокислоты 217-261; 27) аминокислоты 268-274; 28) аминокислоты 278-287; 29) аминокислоты 313-331; и 30) аминокислоты 324-331; в которой нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот человека IgG1, как указано в SEQ ID NO:// (константная область IgG1 человека; последовательность изображена на фиг. 9В).

Типичные петли области доступной для растворителя петли тяжелой цепи IgG1 включают: 1) ASTKGP (SEQ ID NO://); 2) KSTSGGT (SEQ ID NO://); 3) PEPV (SEQ ID NO://); 4) NSGALTSG (SEQ ID NO://); 5) NSGALTSGVHTFPAVLQSSGL (SEQ ID NO://); 6) QSSGL (SEQ ID NO://); 7) VTV; 8) QTY; 9) TQTY (SEQ ID NO://); 10) HKPSN (SEQ ID NO://); 11) EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO://); 12) FPPKP (SEQ ID NO://); 13) IS RTP (SEQ ID NO://); 14) DVSHEDPEV (SEQ ID NO://); 15) SHEDPEV (SEQ ID NO://); 16) DG; 17) DGVEVHNAK (SEQ ID NO://); 18) HNA; 19) QYNST (SEQ ID NO://); 20) VLTVL (SEQ ID NO://); 21) GKE; 22) NKALPAP (SEQ ID NO://); 23) SKAKGQPRE (SEQ ID NO://); 24) KAKGQPR (SEQ ID NO://); 25) PPSRKELTKN (SEQ ID NO://); 26) YPSDI (SEQ ID NO://); 27) NGQPENN (SEQ ID NO://); 28) TPPVLDSDGS (SEQ ID NO://); 29) HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO://); и 30) SLSPGK (SEQ ID NO://), как показано на фиг. 9А и 9В.

В некоторых случаях, целевой иммуноглобулин модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок,

делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях, мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с участком константной области тяжелой цепи IgG2, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-6; 2) аминокислоты 13-24; 3) аминокислоты 33-37; 4) аминокислоты 43-54; 5) аминокислоты 58-63; 6) аминокислоты 69-71; 7) аминокислоты 78-80; 8) 87-89; 9) аминокислоты 95-96; 10) 114-118; 11) 122-126; 12) 134-136; 13) 144-152; 14) 159-167; 15) 175-176; 16) 184-188; 17) 195-197; 18) 204-210; 19) 216-224; 20) 231-233; 21) 237-241; 22) 252-256; 23) 263-269; 24) 273-282; 25) аминокислоты 299-302; где нумерация аминокислоты основана на нумерации аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:// (IgG2 человека; также изображена на фиг. 9B).

Типичные области доступной для растворителя петли тяжелой цепи IgG2 включают 1) ASTKGP (SEQ ID NO://); 2) PCSRSTSESTAA (SEQ ID NO://); 3) FPEPV (SEQ ID NO://); 4) SGALTSGVHTFP (SEQ ID NO://); 5) QSSGLY (SEQ ID NO://); 6) VTV; 7) TQT; 8) HKP; 9) DK; 10) VAGPS (SEQ ID NO://); 11) FPPKP (SEQ ID NO://); 12) RTP; 13) DVSHEDPEV (SEQ ID NO://); 14) DGVEVHNAK (SEQ ID NO://); 15) FN; 16) VLTVV (SEQ ID NO://); 17) GKE; 18) NKGLPAP (SEQ ID NO://); 19) SKTKGQPRE (SEQ ID NO://); 20) PPS; 21) MTKNQ (SEQ ID NO://); 22) YPSDI (SEQ ID NO://); 23) NGQPENN (SEQ ID NO://); 24) TPPMLDSDGS (SEQ ID NO://); 25) GNVF (SEQ ID NO://); и 26) HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO://), как показано на фиг. 9B.

В некоторых случаях, целевой иммуноглобулин модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях, мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с участком константной области тяжелой цепи IgG3, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-6; 2) аминокислоты 13-22; 3) аминокислоты 33-37; 4) аминокислоты 43-61; 5) аминокислоты 71; 6) аминокислоты 78-80; 7) 87-91; 8) аминокислоты 97-106; 9) 111-115; 10) 147-167; 11) 173-177; 16) 185-187; 13) 195-203; 14) 210-218; 15) 226-227; 16) 238-239; 17) 246-248; 18) 255-261; 19) 267-275; 20) 282-291; 21) аминокислоты 303-307; 22) аминокислоты 313-320; 23) аминокислоты 324-333; 24) аминокислоты 350-352; 25) аминокислоты 359-365; и 26) аминокислоты 372-377; где нумерация аминокислоты основана на нумерации аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:// (IgG3 человека; также изображена на фиг. 9B).

Типичные области доступных для растворителя петель тяжелой цепи IgG3 включают 1) ASTKGP (SEQ ID NO://); 2) PCSRSTSGGT (SEQ ID NO://); 3) FPEPV (SEQ ID NO://); 4) SGALTSGVHTFPAVLQSSG (SEQ ID NO://); 5) V; 6) TQT; 7) HKPSN (SEQ ID NO://); 8) RVELKTPLGD (SEQ ID NO://); 9) CPRCPKP (SEQ ID NO://); 10) PKSCDTPPPCPRCPAPELLGG (SEQ ID NO://); 11) FPPKP (SEQ ID NO://); 12) RTP; 13) DVSHEDPEV (SEQ ID NO://); 14) DGVEVHNAK (SEQ ID NO://); 15) YN; 16) VL; 17) GKE; 18) NKALPAP (SEQ ID NO://); 19) SKTKGQPRE (SEQ ID NO://); 20) PPSREEMTKN (SEQ ID NO://); 21) YPSDI (SEQ ID NO://); 22) SSGQPENN (SEQ ID NO://); 23) TPPMLDSDGS (SEQ ID NO://); 24) GNI; 25) HEALHNR (SEQ ID NO://); и 26) SLSPGK (SEQ ID NO://), как показано на фиг. 9B.

В некоторых случаях, целевой иммуноглобулин модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях, мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с участком константной области тяжелой цепи IgG4, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-5; 2) аминокислоты 12-23; 3) аминокислоты 32-36; 4) аминокислоты 42-53; 5) аминокислоты

57-62; 6) аминокислоты 68-70; 7) аминокислоты 77-79; 8) аминокислоты 86-88; 9) аминокислоты 94-95; 10) аминокислоты 101-102; 11) аминокислоты 108-118; 12) аминокислоты 122-126; 13) аминокислоты 134-136; 14) аминокислоты 144-152; 15) аминокислоты 159-167; 16) аминокислоты 175-176; 17) аминокислоты 185-186; 18) аминокислоты 196-198; 19) аминокислоты 205-211; 20) аминокислоты 217-226; 21) аминокислоты 232-241; 22) аминокислоты 253-257; 23) аминокислоты 264-265; 24) 269-270; 25) аминокислоты 274-283; 26) аминокислоты 300-303; 27) аминокислоты 399-417; где нумерация аминокислоты основана на нумерации аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:// (IgG4 человека; также изображена на фиг. 9B).

Типичные области доступных для растворителя петель тяжелой цепи IgG4 включают 1) STKGP (SEQ ID NO://); 2) PCSRSTSESTAA (SEQ ID NO://); 3) FPEPV (SEQ ID NO://); 4) SGALTSGVHTFP (SEQ ID NO://); 5) QSSGLY (SEQ ID NO://); 6) VTV; 7) TKT; 8) HKP; 9) DK; 10) YG; 11) CPAPEFLGGPS (SEQ ID NO://); 12) FPPKP (SEQ ID NO://); 13) RTP; 14) DVSQEDPEV (SEQ ID NO://); 15) DGVEVHNAK (SEQ ID NO://); 16) FN; 17) VL; 18) GKE; 19) NKGLPSS (SEQ ID NO://); 20) SKAKGQPREP (SEQ ID NO://); 21) PPSQEEMTKN (SEQ ID NO://); 22) YPSDI (SEQ ID NO://); 23) NG; 24) NN; 25) TPPVLDSGDGS (SEQ ID NO://); 26) GNVF (SEQ ID NO://); и 27) HEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO://), как показано на фиг. 9B.

В некоторых случаях, целевой иммуноглобулин модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях, мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с участком константной области тяжелой цепи IgA, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-13; 2) аминокислоты 17-21; 3) аминокислоты 28-32; 4) аминокислоты 44-54; 5) аминокислоты 60-66; 6) аминокислоты 73-76; 7) аминокислоты 80-82; 8) аминокислоты 90-91; 9) аминокислоты 123-125; 10) аминокислоты 130-133; 11) аминокислоты 138-142; 12) аминокислоты 151-158; 13) аминокислоты 165-174; 14) аминокислоты 181-184; 15) аминокислоты 192-195; 16) аминокислоты 199; 17) аминокислоты 209-210; 18) аминокислоты 222-245; 19) аминокислоты 252-256; 20) аминокислоты 266-276; 21) аминокислоты 293-294; 22) аминокислоты 301-304; 23) аминокислоты 317-320; 24) аминокислоты 329-353; где нумерация аминокислоты основана на нумерации аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO:// (человека; также изображена на фиг. 9B).

Типичные области доступных для растворителя петель тяжелой цепи IgA включают 1) ASPTSPKVFPLSL (SEQ ID NO://); 2) QPDGN (SEQ ID NO://); 3) VQGFFPQEPL (SEQ ID NO://); 4) SGQGV TAR NFP (SEQ ID NO://); 5) SGDLYTT (SEQ ID NO://); 6) PATQ (SEQ ID NO://); 7) GKS; 8) YT; 9) CHP; 10) HSPA (SEQ ID NO://); 11) LLGSE (SEQ ID NO://); 12) GLRDASGV (SEQ ID NO://); 13) SSGKSAVQGP (SEQ ID NO://); 14) GCYS (SEQ ID NO://); 15) CAEP (SEQ ID NO://); 16) PE; 17) SGNTFRPEVHLLPPPSEELALNEL (SEQ ID NO://); 18) ARGFS (SEQ ID NO://); 19) QGSQELPREKY (SEQ ID NO://); 20) AV; 21) AAED (SEQ ID NO://); 22) HEAL (SEQ ID NO://); и 23) IDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY (SEQ ID NO://), как показано на фиг. 9B.

Мотив сульфатазы может быть обеспечен в пределах или рядом с одной или несколькими данными аминокислотными последовательностями таких сайтов модификации тяжелой цепи Ig. Например, может быть модифицирован полипептид тяжелой цепи Ig (например, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков) в одной или нескольких из данных

аминокислотных последовательностей для обеспечения мотива сульфатазы, расположенного рядом с N-концом и на N-конце и/или, расположенного рядом с на С-концом и на С-конец по отношению к данным сайтам модификации. Альтернативно или кроме того, полипептид тяжелой цепи Ig может быть модифицирован (например, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков) в одной или нескольких из данных аминокислотных последовательностей для обеспечения мотива сульфатазы между двумя остатками сайтов модификаций тяжелой цепи Ig. В некоторых воплощениях, полипептид тяжелой цепи Ig может быть модифицирован для включения двух мотивов, которые могут находиться рядом друг с другом или которые могут быть разделены одной, двумя, тремя, четырьмя или более (например, от примерно 1 до примерно 25, от примерно 25 до примерно 50 или от примерно 50 до примерно 100 или более) аминокислотами. Альтернативно или кроме того, если нативная аминокислотная последовательность обеспечивает один или несколько аминокислотных остатков последовательности мотива сульфатазы, то выбранные аминокислотные остатки сайтов модификации аминокислотной последовательности полипептида тяжелой цепи Ig могут быть модифицированы (например, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков), таким образом, обеспечив мотив сульфатазы на сайте модификации.

Аминокислотную последовательность области доступной для растворителя петли, следовательно, могут модифицировать для обеспечения мотива сульфатазы, где модификации могут включать вставки, делеции и/или замены. Например, если модификация находится в домене CH1, то область доступной для растворителя петли может иметь аминокислотную последовательность NSGALTSG (SEQ ID NO://) и альдегид-меченая последовательность может представлять собой, например, NSGALCTPSRG (SEQ ID NO://), например, если остатки «TS» в последовательности NSGALTSG (SEQ ID NO://) замещены «CTPSR», (SEQ ID NO://) такими, где мотив сульфатазы имеет последовательность LCTPSR (SEQ ID NO://). В качестве другого примера, если модификация находится в домене CH2, то область доступной для растворителя петли может иметь аминокислотную последовательность NKALPAP (SEQ ID NO://) и альдегид-меченая последовательность может представлять собой, например, NLCTPSRAP (SEQ ID NO://), например, где остатки «KAL» в последовательности NKALPAP (SEQ ID NO://) замещены «LCTPSR», (SEQ ID NO://) такими, где мотив сульфатазы имеет последовательность LCTPSR (SEQ ID NO://). В качестве другого примера, если модификация находится в домене CH2/CH3, то область доступной для растворителя петли может иметь аминокислотную последовательность KAKGQPR (SEQ ID NO://) и альдегид-меченая последовательность может представлять собой, например, KAKGLCTPSR (SEQ ID NO://), например, где остатки «GQP» последовательности KAKGQPR (SEQ ID NO://) замещены «LCTPS», (SEQ ID NO://) такими, где мотив сульфатазы имеет последовательность LCTPSR (SEQ ID NO://).

Как отмечено выше, изолированный альдегид-меченый анти-CD22 полипептид Ig может включать константную область легкой цепи, модифицированную для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где мотив сульфатазы находится в области или рядом с областью доступной для растворителя петли константной области легкой цепи полипептида Ig. Иллюстративные примеры областей доступной для растворителя петли константной области легкой цепи показаны на фиг. 9А и 9С.

В некоторых случаях, целевой иммуноглобулин модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок,

делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях, мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с константной областью легкой цепи Ig, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 130-135; 2) аминокислоты 141-143; 3) аминокислоты 150; 4) аминокислоты 162-166; 5) аминокислоты 163-166; 6) аминокислоты 173-180; 7) аминокислоты 186-194; 8) аминокислоты 211-212; 9) аминокислоты 220-225; 10) аминокислоты 233-236; в которой нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот легкой цепи каппа человека, как показано на фиг. 9C. В некоторых случаях, целевой иммуноглобулин модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях, мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с участком константной области, легкой цепи Ig, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-6; 2) аминокислоты 12-14; 3) аминокислоты 21; 4) аминокислоты 33-37; 5) аминокислоты 34-37; 6) аминокислоты 44-51; 7) аминокислоты 57-65; 8) аминокислоты 83-83; 9) аминокислоты 91-96; 10) аминокислоты 104-107; где нумерация аминокислот основана на SEQ ID NO:// (легкая цепь каппа человека; аминокислотная последовательность изображена на фиг. 9C).

Типичные области доступной для растворителя петли легкой цепи Ig (например, легкая цепь каппа человека) включают: 1) RTVAAP (SEQ ID NO://); 2) PPS; 3) Gly (смотри, например, Gly в положении 150 последовательность легкая цепь каппа человека изображен на фиг. 9C); 4) YPREA (SEQ ID NO://); 5) PREA (SEQ ID NO://); 6) DNALQSGN (SEQ ID NO://); 7) TEQDSKDST (SEQ ID NO://); 8) HK; 9) HQGLSS (SEQ ID NO://); и 10) RGEC (SEQ ID NO://), как показано на фиг. 9A и 9C.

Типичные области доступной для растворителя петли легкой цепи лямбда Ig включают QPKAAP (SEQ ID NO://), PPS, NK, DFYPGAV (SEQ ID NO://), DSSPVKAG (SEQ ID NO://), TTP, SN, HKS, EG и APTECS (SEQ ID NO://), как показано на фиг. 9C.

В некоторых случаях, целевой иммуноглобулин модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях, мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с участком константной области легкой цепи Ig крысы, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-6; 2) аминокислоты 12-14; 3) аминокислоты 121-22; 4) аминокислоты 31-37; 5) аминокислоты 44-51; 6) аминокислоты 55-57; 7) аминокислоты 61-62; 8) аминокислоты 81-83; 9) аминокислоты 91-92; 10) аминокислоты 102-105; в которой нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот легкой цепи крысы как указано в SEQ ID NO:// (последовательность изображена на фиг. 9C).

В некоторых случаях, мотив сульфатазы вводят в область CH1 константой области тяжелой цепи анти-CD22. В некоторых случаях, мотив сульфатазы вводят в С-конец или рядом с (например, в пределах от 1 до 10 аминокислот от) С-концом тяжелой цепи анти-CD22. В некоторых случаях, мотив сульфатазы вводят в константную область легкой цепи.

В некоторых случаях, мотив сульфатазы вводят в область CH1 константной области тяжелой цепи анти-CD22, например, между аминокислотами 121-219 аминокислотной последовательности тяжелой цепи IgG1, изображенной на фиг. 9A. Например, в некоторых случаях, мотив сульфатазы вводят в аминокислотную последовательность: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE (SEQ ID NO://). Например, в некоторых из данных воплощений, аминокислотную последовательность GALTSGVH

(SEQ ID NO://) модифицируют до GALCTPSRGVH (SEQ ID NO://), где мотив сульфатазы представляет собой LCTPSR (SEQ ID NO://).

В некоторых случаях, мотив сульфатазы вводят в С-конец или рядом с С-концом тяжелой цепи анти-CD22, например, мотивы сульфатазы вводят в пределах 1
 5 аминокислоты, 2 аминокислот (aa), 3 aa, 4 aa, 5 aa, 6 aa, 7 aa, 8 aa, 9 aa или 10 aa от С-конца тяжелой цепи анти-CD22. В качестве одного из нелимитирующих примеров, С-концевой остаток лизина тяжелой цепи анти-CD22 может быть замещен аминокислотной последовательностью SLCTPSRGS (SEQ ID NO://).

В некоторых случаях, мотив сульфатазы вводят в константную область легкой цепи
 10 анти-CD22 антитела. В качестве одного из нелимитирующих примеров, в некоторых случаях, мотив сульфатазы вводят в константную область легкой цепи анти-CD22 антитела, где мотив сульфатазы представляет собой С-конец для KVDNAL (SEQ ID NO://), и/или N-конец для QSGNSQ (SEQ ID NO://). Например, в некоторых случаях, мотив сульфатазы представляет собой LCTPSR (SEQ ID NO://) и легкая цепь анти-CD22
 15 включает аминокислотную последовательность KVDNALLCTPSRQSGNSQ (SEQ ID NO://).

Типичные анти-CD22 антитела

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело конкурирует за связывание с эпитопом CD22 (например, эпитопом между аминокислотами от 1 до 847, между
 20 аминокислотами 1-759, между аминокислотами 1-751 или между аминокислотами 1-670, в аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8А-8С) с антителом, включающим тяжелые цепи VH CDR, которые выбирают из IYDMS (VH CDR1; SEQ ID NO://), YISSGGGTTYYPDTVKG (VH CDR2; SEQ ID NO://) и HSGYGSSYGVLFAF (VH

25 CDR3; SEQ ID NO://). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых случаях, анти-CD22 антитело модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях, мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с константной
 30 областью тяжелой цепи IgG1, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-6; 2) аминокислоты 16-22; 3) аминокислоты 34-47; 4) аминокислоты 42-49; 5) аминокислоты 42-62; 6) аминокислоты 34-37; 7) аминокислоты 69-71; 8) аминокислоты 79-81; 9) аминокислоты 78-81; 10) аминокислоты 87-91; 11) аминокислоты 100-121; 12) аминокислоты 127-131; 13) аминокислоты 137-141; 14) аминокислоты 149-
 35 157; 15) аминокислоты 151-157; 16) аминокислоты 164-165; 17) аминокислоты 164-172; 18) аминокислоты 169-171; 19) аминокислоты 179-183; 20) аминокислоты 189-193; 21) аминокислоты 200-202; 22) аминокислоты 209-215; 23) аминокислоты 221-229; 24) аминокислоты 22-228; 25) аминокислоты 236-245; 26) аминокислоты 217-261; 27) аминокислоты 268-274; 28) аминокислоты 278-287; 29) аминокислоты 313-331; и 30)
 40 аминокислоты 324-331; в которой нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1 человека, как указано в SEQ ID NO:// (константная область IgG1 человека изображена на фиг. 9В). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков;
 45 например, где мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с участком константной области каппа в Ig, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-6; 2) аминокислоты 12-14; 3) аминокислоты 21; 4) аминокислоты 33-37; 5) аминокислоты 34-37; 6) аминокислоты 44-51; 7) аминокислоты 57-65; 8)

аминокислоты 83-83; 9) аминокислоты 91-96; 10) аминокислоты 104-107; где нумерация аминокислот основана на SEQ ID NO:// (легкая цепь каппа человека; аминокислотная последовательность изображена на фиг. 9С).

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело конкурирует за связывание с эпитопом CD22 (например, эпитоп между аминокислотами от 1 до 847, между аминокислотами 1-759, между аминокислотами 1-751 или между аминокислотами 1-670, в аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8А-8С) с антителом, включающим легкую цепь CDR, которую выбирают из RASQDISNYLN (VL CDR1; SEQ ID NO://), YTSILHS (VL CDR2; SEQ ID NO://) и QQGNTLPWT (VL CDR3; SEQ ID NO://). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых случаях, анти-CD22 антитело модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях, мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с константной областью тяжелой цепи IgG1, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 122-127; 2) аминокислоты 137-143; 3) аминокислоты 155-158; 4) аминокислоты 163-170; 5) аминокислоты 163-183; 6) аминокислоты 179-183; 7) аминокислоты 190-192; 8) аминокислоты 200-202; 9) аминокислоты 199-202; 10) аминокислоты 208-212; 11) аминокислоты 220-241; 12) аминокислоты 247-251; 13) аминокислоты 257-261; 14) аминокислоты 269-277; 15) аминокислоты 271-277; 16) аминокислоты 284-285; 17) аминокислоты 284-292; 18) аминокислоты 289-291; 19) аминокислоты 299-303; 20) аминокислоты 309-313; 21) аминокислоты 320-322; 22) аминокислоты 329-335; 23) аминокислоты 341-349; 24) аминокислоты 342-348; 25) аминокислоты 356-365; 26) аминокислоты 377-381; 27) аминокислоты 388-394; 28) аминокислоты 398-407; 29) аминокислоты 433-451; и 30) аминокислоты 446-451; в которой нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1 человека, как показано на фиг. 9В. В некоторых случаях, анти-CD22 антитело модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков; например, где мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с участком константной области каппа Ig, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-6; 2) аминокислоты 12-14; 3) аминокислоты 21; 4) аминокислоты 33-37; 5) аминокислоты 34-37; 6) аминокислоты 44-51; 7) аминокислоты 57-65; 8) аминокислоты 83-83; 9) аминокислоты 91-96; 10) аминокислоты 104-107; где нумерация аминокислот основана на SEQ ID NO:// (легкая цепь каппа человека; аминокислотная последовательность изображена на фиг. 9С).

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело конкурирует за связывание с эпитопом CD22 (например, эпитоп между аминокислотами от 1 до 847, между аминокислотами 1-759, между аминокислотами 1-751 или между аминокислотами 1-670, в аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8А-8С) с антителом, включающим VH CDRs IYDMS (VH CDR1; SEQ ID NO://), YISSGGGTTPYPTVK (VH CDR2; SEQ ID NO://) и HSGYGSSYGVLFA (VH CDR3; SEQ ID NO://). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых случаях, анти-CD22 антитело модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях, мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с константной областью тяжелой цепи IgG1, соответствующей одному или более из следующего: 1)

аминокислоты 1-6; 2) аминокислоты 16-22; 3) аминокислоты 34-47; 4) аминокислоты 42-49; 5) аминокислоты 42-62; 6) аминокислоты 34-37; 7) аминокислоты 69-71; 8) аминокислоты 79-81; 9) аминокислоты 78-81; 10) аминокислоты 87-91; 11) аминокислоты 100-121; 12) аминокислоты 127-131; 13) аминокислоты 137-141; 14) аминокислоты 149-157; 15) аминокислоты 151-157; 16) аминокислоты 164-165; 17) аминокислоты 164-172; 18) аминокислоты 169-171; 19) аминокислоты 179-183; 20) аминокислоты 189-193; 21) аминокислоты 200-202; 22) аминокислоты 209-215; 23) аминокислоты 221-229; 24) аминокислоты 22-228; 25) аминокислоты 236-245; 26) аминокислоты 217-261; 27) аминокислоты 268-274; 28) аминокислоты 278-287; 29) аминокислоты 313-331; и 30) аминокислоты 324-331; в которой нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1 человека, как указано в SEQ ID NO:// (константная область IgG1 человека изображена на фиг. 9B). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков; например, где мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с участком константной области каппа Ig, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-6; 2) аминокислоты 12-14; 3) аминокислоты 21; 4) аминокислоты 33-37; 5) аминокислоты 34-37; 6) аминокислоты 44-51; 7) аминокислоты 57-65; 8) аминокислоты 83-83; 9) аминокислоты 91-96; 10) аминокислоты 104-107; где нумерация аминокислот основана на SEQ ID NO:// (легкая цепь каппа человека; аминокислотная последовательность изображена на фиг. 9C).

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело конкурирует за связывание с эпитопом CD22 (например, эпитопом между аминокислотами от 1 до 847, между аминокислотами 1-759, между аминокислотами 1-751 или между аминокислотами 1-670, в аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8A-8C) с антителом, включающим VL CDRsRASQDISNYLN (VL CDR1; SEQ ID NO://), YTSILHS (VL CDR2; SEQ ID NO://) и QQGNTLPWT (VL CDR3; SEQ ID NO://). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых случаях, анти-CD22 антитело модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях, мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с константной областью тяжелой цепи IgG1, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-6; 2) аминокислоты 16-22; 3) аминокислоты 34-47; 4) аминокислоты 42-49; 5) аминокислоты 42-62; 6) аминокислоты 34-37; 7) аминокислоты 69-71; 8) аминокислоты 79-81; 9) аминокислоты 78-81; 10) аминокислоты 87-91; 11) аминокислоты 100-121; 12) аминокислоты 127-131; 13) аминокислоты 137-141; 14) аминокислоты 149-157; 15) аминокислоты 151-157; 16) аминокислоты 164-165; 17) аминокислоты 164-172; 18) аминокислоты 169-171; 19) аминокислоты 179-183; 20) аминокислоты 189-193; 21) аминокислоты 200-202; 22) аминокислоты 209-215; 23) аминокислоты 221-229; 24) аминокислоты 22-228; 25) аминокислоты 236-245; 26) аминокислоты 217-261; 27) аминокислоты 268-274; 28) аминокислоты 278-287; 29) аминокислоты 313-331; и 30) аминокислоты 324-331; в которой нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1 человека как указано в SEQ ID NO:// (константная область IgG1 человека изображена на фиг. 9B). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков; например, где мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с участком

константной области каппа Ig, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-6; 2) аминокислоты 12-14; 3) аминокислоты 21; 4) аминокислоты 33-37; 5) аминокислоты 34-37; 6) аминокислоты 44-51; 7) аминокислоты 57-65; 8) аминокислоты 83-83; 9) аминокислоты 91-96; 10) аминокислоты 104-107; где нумерация аминокислот основана на SEQ ID NO:// (легкая цепь каппа человека; аминокислотная последовательность изображена на фиг. 9С).

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело конкурирует за связывание с эпитопом CD22 (например, эпитопом между аминокислотами от 1 до 847, между аминокислотами 1-759, между аминокислотами 1-751 или между аминокислотами 1-670, в аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8А-8С) с антителом, которое включает VH CDRs IYDMS (VH CDR1; SEQ ID NO://),

YISSGGGTTYYPDTVKG (VH CDR2; SEQ ID NO://) и HSGYGSSYGVLFAF (VH CDR3; SEQ ID NO://) и VL CDRs RASQDISNYLN (VL CDR1; SEQ ID NO://), YTSILHS (VL CDR2; SEQ ID NO://) и QQGNTLPWT (VL CDR3; SEQ ID NO://). В некоторых случаях, анти-

CD22 антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых случаях, анти-CD22 антитело модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях, мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с константной областью тяжелой цепи IgG1, соответствующей

одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-6; 2) аминокислоты 16-22; 3) аминокислоты 34-47; 4) аминокислоты 42-49; 5) аминокислоты 42-62; 6) аминокислоты 34-37; 7) аминокислоты 69-71; 8) аминокислоты 79-81; 9) аминокислоты 78-81; 10) аминокислоты 87-91; 11) аминокислоты 100-121; 12) аминокислоты 127-131; 13) аминокислоты 137-141; 14) аминокислоты 149-157; 15) аминокислоты 151-157; 16) аминокислоты 164-165; 17) аминокислоты 164-172; 18) аминокислоты 169-171; 19) аминокислоты 179-183; 20) аминокислоты 189-193; 21) аминокислоты 200-202; 22) аминокислоты 209-215; 23) аминокислоты 221-229; 24) аминокислоты 22-228; 25) аминокислоты 236-245; 26) аминокислоты 217-261; 27) аминокислоты 268-274; 28) аминокислоты 278-287; 29) аминокислоты 313-331; и 30) аминокислоты 324-331; в

которой нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1, человека как указано в SEQ ID NO:// (константная область IgG1 человека изображена на фиг. 9В). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков; например, где мотив сульфатазы

находится в пределах или рядом с участком константной области каппа Ig, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-6; 2) аминокислоты 12-14; 3) аминокислоты 21; 4) аминокислоты 33-37; 5) аминокислоты 34-37; 6) аминокислоты 44-51; 7) аминокислоты 57-65; 8) аминокислоты 83-83; 9) аминокислоты 91-96; 10) аминокислоты 104-107; где нумерация аминокислот основана на SEQ ID NO:// (легкая цепь каппа человека; аминокислотная последовательность изображена на фиг. 9С).

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело включает VH CDRs IYDMS (VH CDR1; SEQ ID NO://), YISSGGGTTYYPDTVKG (VH CDR2; SEQ ID NO://) и

HSGYGSSYGVLFAF (VH CDR3; SEQ ID NO://). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело

представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых случаях, анти-CD22 антитело модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях, мотив сульфатазы находится

в пределах или рядом с константной областью тяжелой цепи IgG1, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-6; 2) аминокислоты 16-22; 3) аминокислоты 34-47; 4) аминокислоты 42-49; 5) аминокислоты 42-62; 6) аминокислоты 34-37; 7) аминокислоты 69-71; 8) аминокислоты 79-81; 9) аминокислоты 78-81; 10) аминокислоты 87-91; 11) аминокислоты 100-121; 12) аминокислоты 127-131; 13) аминокислоты 137-141; 14) аминокислоты 149-157; 15) аминокислоты 151-157; 16) аминокислоты 164-165; 17) аминокислоты 164-172; 18) аминокислоты 169-171; 19) аминокислоты 179-183; 20) аминокислоты 189-193; 21) аминокислоты 200-202; 22) аминокислоты 209-215; 23) аминокислоты 221-229; 24) аминокислоты 22-228; 25) аминокислоты 236-245; 26) аминокислоты 217-261; 27) аминокислоты 268-274; 28) аминокислоты 278-287; 29) аминокислоты 313-331; и 30) аминокислоты 324-331; в которой нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1 человека, как указано в SEQ ID NO:// (константная область IgG1 человека изображена на фиг. 9В). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков; например, где мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с участком константной области каппа Ig, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-6; 2) аминокислоты 12-14; 3) аминокислоты 21; 4) аминокислоты 33-37; 5) аминокислоты 34-37; 6) аминокислоты 44-51; 7) аминокислоты 57-65; 8) аминокислоты 83-83; 9) аминокислоты 91-96; 10) аминокислоты 104-107; где нумерация аминокислот основана на SEQ ID NO:// (легкая цепь каппа человека; аминокислотная последовательность изображена на фиг. 9С).

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело включает VL CDRs RASQDISNYLN (VL CDR1; SEQ ID NO://), YTSILHS (VL CDR2; SEQ ID NO://) и QQGNTLPWT (VL CDR3; SEQ ID NO://). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых случаях, анти-CD22 антитело модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях, мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с константной областью тяжелой цепи IgG1, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-6; 2) аминокислоты 16-22; 3) аминокислоты 34-47; 4) аминокислоты 42-49; 5) аминокислоты 42-62; 6) аминокислоты 34-37; 7) аминокислоты 69-71; 8) аминокислоты 79-81; 9) аминокислоты 78-81; 10) аминокислоты 87-91; 11) аминокислоты 100-121; 12) аминокислоты 127-131; 13) аминокислоты 137-141; 14) аминокислоты 149-157; 15) аминокислоты 151-157; 16) аминокислоты 164-165; 17) аминокислоты 164-172; 18) аминокислоты 169-171; 19) аминокислоты 179-183; 20) аминокислоты 189-193; 21) аминокислоты 200-202; 22) аминокислоты 209-215; 23) аминокислоты 221-229; 24) аминокислоты 22-228; 25) аминокислоты 236-245; 26) аминокислоты 217-261; 27) аминокислоты 268-274; 28) аминокислоты 278-287; 29) аминокислоты 313-331; и 30) аминокислоты 324-331; в которой нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1 человека, как указано в SEQ ID NO:// (константная область IgG1 человека изображена на фиг. 9В). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков; например, где мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с участком константной области каппа Ig, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-6; 2)

аминокислоты 12-14; 3) аминокислоты 21; 4) аминокислоты 33-37; 5) аминокислоты 34-37; 6) аминокислоты 44-51; 7) аминокислоты 57-65; 8) аминокислоты 83-83; 9) аминокислоты 91-96; 10) аминокислоты 104-107; где нумерация аминокислот основана на SEQ ID NO:// (легкая цепь каппа человека; аминокислотная последовательность

изображена на фиг. 9С).

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело включает VH CDRs IYDMS (VH CDR1; SEQ ID NO://), YISSGGGTTYYPDTVKG (VH CDR2; SEQ ID NO://) и HSGYGSSYGVLFAF (VH CDR3; SEQ ID NO://) and VL CDRs RASQDISNYLN (VL CDR1; SEQ ID NO://), YTSILHS (VL CDR2; SEQ ID NO://) и QQGNTLPWT (VL CDR3; SEQ ID

NO://). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых случаях, анти-CD22 антитело модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях, мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с константной областью тяжелой

цепи IgG1, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-6;

2) аминокислоты 16-22; 3) аминокислоты 34-47; 4) аминокислоты 42-49; 5) аминокислоты 42-62; 6) аминокислоты 34-37; 7) аминокислоты 69-71; 8) аминокислоты 79-81; 9)

аминокислоты 78-81; 10) аминокислоты 87-91; 11) аминокислоты 100-121; 12)

аминокислоты 127-131; 13) аминокислоты 137-141; 14) аминокислоты 149-157; 15)

аминокислоты 151-157; 16) аминокислоты 164-165; 17) аминокислоты 164-172; 18)

аминокислоты 169-171; 19) аминокислоты 179-183; 20) аминокислоты 189-193; 21)

аминокислоты 200-202; 22) аминокислоты 209-215; 23) аминокислоты 221-229; 24)

аминокислоты 22-228; 25) аминокислоты 236-245; 26) аминокислоты 217-261; 27)

аминокислоты 268-274; 28) аминокислоты 278-287; 29) аминокислоты 313-331; и 30)

аминокислоты 324-331; в которой нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1 человека, как указано в SEQ ID NO:// (константная область IgG1 человека изображена на фиг. 9В).

В некоторых случаях, анти-CD22 антитело модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков;

например, где мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с участком константной области каппа Ig, соответствующей одному или более из следующего: 1)

аминокислоты 1-6; 2) аминокислоты 12-14; 3) аминокислоты 21; 4) аминокислоты 33-

37; 5) аминокислоты 34-37; 6) аминокислоты 44-51; 7) аминокислоты 57-65; 8)

аминокислоты 83-83; 9) аминокислоты 91-96; 10) аминокислоты 104-107; где нумерация

аминокислот основана на SEQ ID NO:// (легкая цепь каппа человека; аминокислотная последовательность изображена на фиг. 9С).

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело включает VH CDRs, присутствующие в VH-области анти-CD22, включающей следующую аминокислотную последовательность: EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGK

GLEWVAYISSGGGTTYYPDTVKG RFTISRDN AKNSLYLQMSSLRAEDTAMYYCARHSG

YGSSYGVLFAFWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO://). В некоторых случаях, анти-CD22

антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых случаях, анти-CD22 антитело модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше,

где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен

аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях, мотив сульфатазы находится

в пределах или рядом с константной областью тяжелой цепи IgG1, соответствующей

одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-6; 2) аминокислоты 16-22; 3)

аминокислоты 34-47; 4) аминокислоты 42-49; 5) аминокислоты 42-62; 6) аминокислоты

34-37; 7) аминокислоты 69-71; 8) аминокислоты 79-81; 9) аминокислоты 78-81; 10) аминокислоты 87-91; 11) аминокислоты 100-121; 12) аминокислоты 127-131; 13) аминокислоты 137-141; 14) аминокислоты 149-157; 15) аминокислоты 151-157; 16) аминокислоты 164-165; 17) аминокислоты 164-172; 18) аминокислоты 169-171; 19) аминокислоты 179-183; 20) аминокислоты 189-193; 21) аминокислоты 200-202; 22) аминокислоты 209-215; 23) аминокислоты 221-229; 24) аминокислоты 22-228; 25) аминокислоты 236-245; 26) аминокислоты 217-261; 27) аминокислоты 268-274; 28) аминокислоты 278-287; 29) аминокислоты 313-331; и 30) аминокислоты 324-331; в которой нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1 человека, как указано в SEQ ID NO:// (константная область IgG1 человека изображена на фиг. 9B). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков; например, где мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с участком константной области каппа Ig, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-6; 2) аминокислоты 12-14; 3) аминокислоты 21; 4) аминокислоты 33-37; 5) аминокислоты 34-37; 6) аминокислоты 44-51; 7) аминокислоты 57-65; 8) аминокислоты 83-83; 9) аминокислоты 91-96; 10) аминокислоты 104-107; где нумерация аминокислот основана на SEQ ID NO:// (легкая цепь каппа человека; аминокислотная последовательность изображена на фиг. 9C).

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело включает VL CDRs, присутствующие в VL-области анти-CD22, включающей следующую аминокислотную последовательность: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAV KLLIYYTSLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQQEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKV EIKR (SEQ ID NO://). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых случаях, анти-CD22 антитело модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях, мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с константной областью тяжелой цепи IgG1, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-6; 2) аминокислоты 16-22; 3) аминокислоты 34-47; 4) аминокислоты 42-49; 5) аминокислоты 42-62; 6) аминокислоты 34-37; 7) аминокислоты 69-71; 8) аминокислоты 79-81; 9) аминокислоты 78-81; 10) аминокислоты 87-91; 11) аминокислоты 100-121; 12) аминокислоты 127-131; 13) аминокислоты 137-141; 14) аминокислоты 149-157; 15) аминокислоты 151-157; 16) аминокислоты 164-165; 17) аминокислоты 164-172; 18) аминокислоты 169-171; 19) аминокислоты 179-183; 20) аминокислоты 189-193; 21) аминокислоты 200-202; 22) аминокислоты 209-215; 23) аминокислоты 221-229; 24) аминокислоты 22-228; 25) аминокислоты 236-245; 26) аминокислоты 217-261; 27) аминокислоты 268-274; 28) аминокислоты 278-287; 29) аминокислоты 313-331; и 30) аминокислоты 324-331; в которой нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1 человека, как указано в SEQ ID NO:// (константная область IgG1 человека изображена на фиг. 9B). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен аминокислотных остатков; например, где мотив сульфатазы находится в пределах или рядом с участком константной области каппа Ig, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-6; 2) аминокислоты 12-14; 3) аминокислоты 21; 4) аминокислоты 33-37; 5) аминокислоты 34-37; 6) аминокислоты 44-51; 7) аминокислоты 57-65; 8)

аминокислоты 83-83; 9) аминокислоты 91-96; 10) аминокислоты 104-107; где нумерация аминокислот основана на SEQ ID NO:// (легкая цепь каппа человека; аминокислотная последовательность изображена на фиг. 9C).

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело включает VH CDRs, присутствующие в

EVQLVESGGGLV KPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGG
 TTYYPDTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMSSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAIW
 GQGTLLTVSS (SEQ ID NO://) и VL CDRs, присутствующие в DIQMTQSPSSLSASVGDR
 VTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSILHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ
 QEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO://). В некоторых случаях, анти-
 CD22 антитело представляет собой гуманизированное антитело. В некоторых случаях,
 анти-CD22 антитело модифицируют для включения мотива сульфатазы, как описано
 выше, где модификация включает одну или несколько вставок, делеций и/или замен
 аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях, мотив сульфатазы находится
 в пределах или рядом с константной областью тяжелой цепи IgG1, соответствующей
 одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-6; 2) аминокислоты 16-22; 3)
 аминокислоты 34-47; 4) аминокислоты 42-49; 5) аминокислоты 42-62; 6) аминокислоты
 34-37; 7) аминокислоты 69-71; 8) аминокислоты 79-81; 9) аминокислоты 78-81; 10)
 аминокислоты 87-91; 11) аминокислоты 100-121; 12) аминокислоты 127-131; 13)
 аминокислоты 137-141; 14) аминокислоты 149-157; 15) аминокислоты 151-157; 16)
 аминокислоты 164-165; 17) аминокислоты 164-172; 18) аминокислоты 169-171; 19)
 аминокислоты 179-183; 20) аминокислоты 189-193; 21) аминокислоты 200-202; 22)
 аминокислоты 209-215; 23) аминокислоты 221-229; 24) аминокислоты 22-228; 25)
 аминокислоты 236-245; 26) аминокислоты 217-261; 27) аминокислоты 268-274; 28)
 аминокислоты 278-287; 29) аминокислоты 313-331; и 30) аминокислоты 324-331; в
 которой нумерация аминокислот основана на нумерации аминокислот IgG1 человека,
 как указано в SEQ ID NO:// (константная область IgG1 человека изображена на фиг.
 9B). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело модифицируют для включения мотива
 сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок,
 делеций и/или замен аминокислотных остатков; например, где мотив сульфатазы
 находится в пределах или рядом с участком константной области каппа Ig,
 соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-6; 2)
 аминокислоты 12-14; 3) аминокислоты 21; 4) аминокислоты 33-37; 5) аминокислоты 34-
 37; 6) аминокислоты 44-51; 7) аминокислоты 57-65; 8) аминокислоты 83-83; 9)
 аминокислоты 91-96; 10) аминокислоты 104-107; где нумерация аминокислот основана
 на SEQ ID NO:// (легкая цепь каппа человека; аминокислотная последовательность
 изображена на фиг. 9C).

В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело включает аминокислотную последовательность VH

EVQLVESGGGLV KPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGG
 TTYYPDTVKGRFTISRDNANKNSLYLQMSSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAIW
 GQGTLLTVSS (SEQ ID NO://). В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело
 включает аминокислотную последовательность VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSILHSGV
 PSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ QEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO://
). В некоторых случаях, подходящее анти-CD22 антитело включает аминокислотную
 последовательность VH

EVQLVESGGGLV KPGGSLRLSCAASGFAFSIYDMSWVRQAPGKGLEWVAYISSGGG

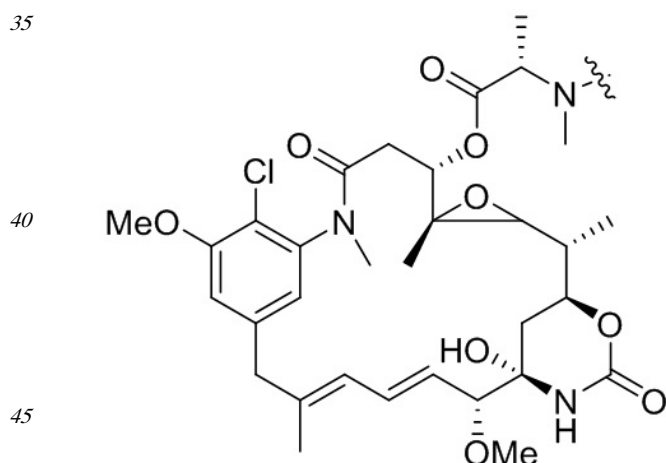
TTYYPDTVKGRTISRDNANKNSLYLQMSSLRAEDTAMYYCARHSGYGSSYGVLFAIW
QGGTLVTVSS (SEQ ID NO://); и аминокислотную последовательность VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYYTSILHSGV
PSRFSGSGSGTDYTLTISSLQQEDFATYFCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKR (SEQ ID NO://

5). В некоторых случаях, анти-CD22 антитело модифицируют для включения мотива
сульфатазы, как описано выше, где модификация включает одну или несколько вставок,
делений и/или замен аминокислотных остатков. В некоторых воплощениях, мотив
сульфатазы находится в пределах или рядом с константной областью тяжелой цепи
IgG1, соответствующей одному или более из следующего: 1) аминокислоты 1-6; 2)
10 аминокислоты 16-22; 3) аминокислоты 34-47; 4) аминокислоты 42-49; 5) аминокислоты
42-62; 6) аминокислоты 34-37; 7) аминокислоты 69-71; 8) аминокислоты 79-81; 9)
аминокислоты 78-81; 10) аминокислоты 87-91; 11) аминокислоты 100-121; 12)
аминокислоты 127-131; 13) аминокислоты 137-141; 14) аминокислоты 149-157; 15)
аминокислоты 151-157; 16) аминокислоты 164-165; 17) аминокислоты 164-172; 18)
15 аминокислоты 169-171; 19) аминокислоты 179-183; 20) аминокислоты 189-193; 21)
аминокислоты 200-202; 22) аминокислоты 209-215; 23) аминокислоты 221-229; 24)
аминокислоты 22-228; 25) аминокислоты 236-245; 26) аминокислоты 217-261; 27)
аминокислоты 268-274; 28) аминокислоты 278-287; 29) аминокислоты 313-331; и 30)
аминокислоты 324-331; в которой нумерация аминокислот основана на нумерации
20 аминокислот IgG1 человека, как указано в SEQ ID NO:// (константная область IgG1
человека изображена на фиг. 9B).

Лекарственные средства для конъюгации с полипептидом

Настоящее раскрытие обеспечивает конъюгат лекарственное средство-полипептид.
Примеры лекарственных средств включают лекарственные средства, представляющие
25 собой небольшие молекулы, такие как химиотерапевтическое средство для лечения
рака. Например, если полипептид представляет собой антитело (или его фрагмент),
которое имеет специфичность для опухолевой клетки, антитело может быть
модифицировано, как описано в настоящем документе, для включения
модифицированной аминокислоты, которая может быть впоследствии конъюгирована
30 с химиотерапевтическим средством для лечения рака, таким как средство, влияющее
на микротрубочки. В некоторых воплощениях, лекарственное средство представляет
собой средство, влияющее на микротрубочки, которое обладает антипролиферативной
активностью, такое как майтансиноид. В некоторых воплощениях, лекарственное
средство представляет собой майтансиноид, который имеет следующую структуру:



где $\sim$ указывает на точку соединения между майтансиноидом и линкером, L, в
формуле (I). Термин «точка соединения» означает, что символ $\sim$ обозначает связь

между N майтансиноида и линкером, L, в формуле (I). Например, в формуле (I), W^1 представляет собой майтансиноид, такой как майтансиноид, имеющий приведенную выше структуру, где  указывает на точку соединения между майтансиноидом и линкером, L.

Как описано выше, в некоторых воплощениях, L представляет собой линкер, описываемый формулой $-(L^1)_a-(L^2)_b-(L^3)_c-(L^4)_d-$, в которой L^1 , L^2 , L^3 и L^4 каждый независимо представляет собой единицу линкера. В некоторых воплощениях, L^1 присоединен к сопрягающему фрагменту, такому как гидразинил-индолил или гидразинил-пирроло-пиридинил сопрягающему фрагменту (например, как показано в приведенной выше формуле (I)). В некоторых воплощениях, L^2 , если присутствует, прикреплен к W^1 (майтансиноиду). В некоторых воплощениях, L^3 , если присутствует, прикреплен к W^1 (майтансиноиду). В некоторых воплощениях, L^4 , если присутствует, прикреплен к W^1 (майтансиноиду).

Как описано выше, в некоторых воплощениях, линкер $-(L^1)_a-(L^2)_b-(L^3)_c-(L^4)_d-$ описан формулой $-(T^1-V^1)_a-(T^2-V^2)_b-(T^3-V^3)_c-(T^4-V^4)_d-$, где a, b, c и d каждый независимо равен 0 или 1, где сумма a, b, c и d равна от 1 до 4. В некоторых воплощениях, как описано выше, L^1 прикреплен к гидразинил-индолил или гидразинил-пирроло-пиридинил сопрягающему фрагменту (например, как показан в приведенной выше формуле (I)).

Как таковой, в некоторых воплощениях, T^1 прикреплен к гидразинил-индолил или гидразинил-пирроло-пиридинил сопрягающему фрагменту (например, как показано в приведенной выше формуле (I)). В некоторых воплощениях, V^1 прикреплен к W^1 (майтансиноиду). В некоторых воплощениях, как описано выше, L^2 , если присутствует, прикреплен к W^1 (майтансиноиду). Как таковой, в некоторых воплощениях, T^2 , если присутствует, прикреплен к W^1 (майтансиноиду) или V^2 , если присутствует, прикреплен к W^1 (майтансиноиду). В некоторых воплощениях, как описано выше, L^3 , если присутствует, прикреплен к W^1 (майтансиноиду). Как таковой, в некоторых воплощениях, T^3 , если присутствует, прикреплен к W^1 (майтансиноиду) или V^3 , если присутствует, прикреплен к W^1 (майтансиноиду). В некоторых воплощениях, как описано выше, L^4 , если присутствует, прикреплен к W^1 (майтансиноиду). Как таковой, в некоторых воплощениях, T^4 , если присутствует, прикреплен к W^1 (майтансиноиду) или V^4 , если присутствует, прикреплен к W^1 (майтансиноиду).

Воплощения настоящего раскрытия включают конъюгаты, в которых полипептид (например, анти-CD22 антитело) конъюгирован с одним или несколькими фрагментами лекарственного средства (например, майтансиноида), например, с 2 фрагментами лекарственного средства, 3 фрагментами лекарственного средства, 4 фрагментами лекарственного средства, 5 фрагментами лекарственного средства, 6 фрагментами лекарственного средства, 7 фрагментами лекарственного средства, 8 фрагментами лекарственного средства, 9 фрагментами лекарственного средства или 10 или более фрагментами лекарственного средства. Фрагменты лекарственного средства могут быть конъюгированы с полипептидом в одном или нескольких сайтах в полипептиде,

как описано в настоящем документе. В некоторых воплощениях, конъюгаты имели среднее отношение лекарственное средство-к-антителу (DAR) (молярное отношение), лежащее в диапазоне от 0,1 до 10 или от 0,5 до 10 или от 1 до 10, например, от 1 до 9 или от 1 до 8 или от 1 до 7 или от 1 до 6 или от 1 до 5 или от 1 до 4 или от 1 до 3 или от 1 до 2. В некоторых воплощениях, конъюгаты имели среднее DAR от 1 до 2, такое как 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2. В некоторых воплощениях, конъюгаты имели среднее DAR, равное от 1,6 до 1,9. В некоторых воплощениях, конъюгаты имели среднее DAR, равное 1,7. Среднее означает среднее арифметическое.

Композиции

Конъюгаты (включая конъюгаты антитела) настоящего раскрытия могут быть составлены множеством различных способов. В общем, если конъюгат представляет собой конъюгат полипептид-лекарственное средство, то конъюгат составляют способом, совместимым с лекарственным средством, конъюгированным с полипептидом, состоянием, подлежащим лечению, и способом введения, который будет применен.

Конъюгат (например, конъюгат полипептид-лекарственное средство) может быть обеспечен в любой подходящей форме, например, в форме фармацевтически приемлемой соли и может быть составлен для любого подходящего пути введения, например, перорального, местного или парентерального введения. Если конъюгат обеспечивают как жидкие формы для инъекций (такие как в воплощениях, где их вводят внутривенно или непосредственно в ткань), то конъюгат может быть обеспечен в виде готовой к применению лекарственной формы или в виде восстанавливаемого стабильного при хранении порошка или жидкости, состоящей из фармацевтически приемлемых носителей и вспомогательных веществ.

Способы получения композиций конъюгатов могут быть адаптированы из легкодоступных способов. Например, конъюгаты могут быть обеспечены в виде фармацевтической композиции, включающей терапевтически эффективные количества конъюгата и фармацевтически приемлемый носитель (например, солевой раствор). Фармацевтическая композиция необязательно может включать другие добавки (например, буферы, стабилизаторы, консерванты и им подобные). В некоторых воплощениях, композиции подходят для введения млекопитающим, например, те, которые подходят для введения человеку.

Способы лечения

Конъюгаты полипептид-лекарственное средство настоящего раскрытия находят применение в лечении состояния или заболевания у субъекта, которые поддаются лечению путем введения родительского лекарственного средства (т.е. лекарственного средства до конъюгации с полипептидом). Термин «лечение» означает, что достигают, по меньшей мере, ослабления симптомов, связанных с состоянием, от которого страдает хозяин, где термин ослабление применяют в широком смысле для обозначения, по меньшей мере, уменьшения величины параметра, например, симптома, связанного с подвергаемым лечению состоянием. Как таковое, лечение также включает ситуации, в которых патологическое состояние, или, по меньшей мере, связанные с ним симптомы, полностью ингибируются, например, предотвращаются или останавливаются, например, прекращаются, так что хозяин больше не страдает от состояния, или, по меньшей мере, симптомы, которые характеризуют состояние. Следовательно, лечение включает: (i) предупреждение, которое представляет собой снижение риска развития клинических симптомов, включая то, в результате чего клинические симптомы не развиваются, например, предотвращение прогрессии заболевания до опасного состояния; (ii) ингибирование, которое останавливает развитие или дальнейшее развитие клинических

симптомов, например, смягчающее или полностью ингибирующее активное заболевание; и/или (iii) облегчение, которой вызывают регрессию клинических симптомов.

В контексте рака, термин «лечение» включает любое или все из следующего: снижение роста солидной опухоли, подавление репликации раковых клеток, снижение общей опухолевой нагрузки и снижение интенсивности одного или нескольких симптомов, связанных с раком.

Субъект, подлежащий лечению, может представлять собой персону, которая нуждается в терапии, если хозяин, подлежащий лечению, представляет собой персону, поддающуюся лечению с применением родительского лекарственного средства.

Соответственно, множество субъектов могут поддаваться лечению с применением конъюгатов полипептид-лекарственное средство, раскрытых в настоящем документе. В общем, такие субъекты представляют собой «млекопитающих», при этом люди относятся к представляющим интерес субъектам. Другие субъекты могут включать домашних животных (например, собак и кошек), домашний скот (например, коров, свиней, коз, лошадей и им подобных), грызунов (например, мышей, морских свинок и крыс, например, в качестве моделей заболевания на животных), а также приматов, не относящихся к человеку, (например, шимпанзе и мартышек).

Количество введенного конъюгата полипептид-лекарственное средство может быть первоначально определено на основе указания дозы и/или режима дозирования родительского лекарственного средства. В общем, конъюгаты полипептид-лекарственное средство могут быть обеспечены для целевой доставки и/или увеличения периода полужизни в сыворотке лекарственного средства, таким образом, обеспечивая, по меньшей мере, одно из следующего: снижение дозы или уменьшение числа введений в режиме дозирования. Таким образом, конъюгаты полипептид-лекарственное средство могут обеспечивать снижение дозы и/или уменьшение числа введений в режиме дозирования по сравнению с родительским лекарственным средством до конъюгирования в конъюгат полипептид-лекарственное средство настоящего раскрытия.

Кроме того, как отмечено выше, поскольку конъюгаты полипептид-лекарственное средство могут быть обеспечены для контролируемой стехиометрии доставки лекарственного средства, дозировки конъюгатов полипептид-лекарственное средство могут быть рассчитаны на основании количества молекул лекарственного средства, предоставленных на основе конъюгата полипептид-лекарственное средство.

В некоторых воплощениях, вводят множественные дозы конъюгата полипептид-лекарственное средство. Частота введения конъюгата полипептид-лекарственное средство может варьировать в зависимости от множества факторов, например, тяжести симптомов, состояния субъекта и т.п. Например, в некоторых воплощениях, конъюгат полипептид-лекарственное средство вводят один раз в месяц, два раза в месяц, три раза в месяц, каждую вторую неделю, раз в неделю (qwk), два раза в неделю, три раза в неделю, четыре раза в неделю, пять раз в неделю, шесть раз в неделю, через день, раз в день (qd/od), два раза в день (bds/bid) или три раза в день (tds/tid) и т.п.

Способы лечения рака

Настоящее раскрытие обеспечивает способы доставки химиотерапевтического средства для лечения рака у индивидуума, имеющего рак. Способы полезны для лечения широкого разнообразия раков, включая карциномы, саркомы, лейкемии и лимфомы.

Карциномы, которые можно лечить с помощью способа изобретения, включают, без ограничений, карциному пищевода, гепатоцеллюлярную карциному, базально-клеточную карциному (форма рака кожи), плоскоклеточную карциному (различные ткани), карциному мочевого пузыря, включая транзиторную клеточную карциному

(злокачественное новообразование мочевого пузыря), бронхогенную карциному, карциному толстой кишки, колоректальную карциному, карциному желудка, карциному легких, включая мелкоклеточную карциному и немелкоклеточную карциному легкого, аденокортикальную карциному, карциному щитовидной железы, карциному
 5 поджелудочной железы, карциному молочной железы, карциному яичников, карциному предстательной железы, аденокарциному, карциному потовых желез, карцинома сальных желез, папиллярную карциному, папиллярную аденокарциному, цистаденокарциному, медуллярную карциному, карциному почек, протоковую карциному *in situ* или карциному желчных протоков, хориокарциному, семиному, эмбриональную карциному, опухоль
 10 Вильма, цервикальную карциному, карциному матки, карциному яичка, остеогенную карциному, эпителиальную карциному и карциному носоглотки и т.п.

Саркомы, которые можно лечить с помощью способа изобретения включают, без ограничений, фибросаркому, миосаркому, липосаркому, хондросаркому, хордому, остеогенную саркому, остеосаркому, ангиосаркому, эндотелиосаркому,
 15 лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, синовиому, мезотелиому, саркому Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому и другие саркомы мягких тканей.

Другие твердые опухоли, которые можно лечить с помощью способа изобретения включают, без ограничений, глиому, астроцитому, медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластому, акустическую неврому, олигодендроглиому,
 20 менангиому, меланому, нейробластому и ретинобластому.

Лейкемии, которые можно лечить с помощью способа изобретения, включают, без ограничений, а) хронические миелопролиферативные синдромы (неопластические расстройства мультипотентных гемопоэтических стволовых клеток); б) острые миелогенные лейкозы (неопластическое превращение мультипотентных гемопоэтических
 25 стволовых клеток или гемопоэтических клеток ограниченного клонального потенциала); с) хронические лимфоцитарные лейкозы (CLL; клональная пролиферация иммунологически незрелых и функционально некомпетентных малых лимфоцитов), включая пролимфоцитарный лейкоз CLL В-клеток, CLL Т-клеток и лейкемию ворсистых клеток; и d) острый лимфобластный лейкоз (характеризующийся накоплением
 30 лимфобластов). Лимфомы, которые можно лечить с помощью способа изобретения, включают, без ограничений, В-клеточные лимфомы (например, лимфома Беркитта); лимфому Ходжкина; неходжкинскую В-клеточную лимфому; и им подобные.

Примеры

Следующие примеры предоставлены для обеспечения специалистов в данной области техники полным раскрытием и описанием того, как выполнить и применить настоящее
 35 изобретение, и не предназначены для ограничения объема того, что изобретатели считают своим изобретением, или они не предназначены для представления того, что приведенные ниже эксперименты представляют собой всеми или единственными выполненными экспериментами. Были предприняты усилия для обеспечения точности
 40 в отношении используемых чисел (например количества, температура и т.п.), но некоторые экспериментальные ошибки и отклонения должны учитываться. Если не указано иное, части представляют собой части по массе, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура приведена в градусах Цельсия и давление было равно атмосферному или вблизи атмосферного. Под «среднее»
 45 понимают среднее арифметическое. Могут быть применены стандартные аббревиатуры, например, bp, пара оснований (пары оснований); kb, килобаза (килобазы); pl, пиколитр (пиколитры); s или sec, секунда (секунды); min, минута (минуты); h или hr, час (часы); aa, аминокислота (аминокислоты); kb, килобаза (килобазы); bp, пара оснований (пары

оснований); nt, нуклеотид (нуклеотиды); i.m., внутримышечный(внутримышечно); i.p., внутрибрюшинный (внутрибрюшинно); s.c., подкожный (подкожно); и им подобные.

Общие процедуры синтеза

Многие общие ссылки, обеспечивающие широко известные схемы химического синтеза и условия и полезные для синтеза раскрытого соединения, доступны (смотри, например, Smith and March, *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, Fifth Edition, Wiley-Interscience, 2001; или Vogel, *A Textbook of Practical Organic Chemistry, Including Qualitative Organic Analysis*, Fourth Edition, New York: Longman, 1978).

Соединения, как описаны в настоящем документе, могут быть очищены с помощью любого протокола очистки, известного в данной области техники, включая хроматографию, такую как HPLC, препаративную тонкослойную хроматографию, колоночную флэш-хроматографию и ионообменную хроматографию. Может быть применена любая подходящая стационарная фаза, включая нормальную и обращенную фазу, а также ионные смолы. В некоторых воплощениях, раскрытые соединения очищают с помощью хроматографии на силикагеле и/или на окиси алюминия. Смотри, например, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2nd Edition, ed. L. R. Snyder and J. J. Kirkland, John Wiley and Sons, 1979; и *Thin Layer Chromatography*, ed E. Stahl, Springer-Verlag, New York, 1969.

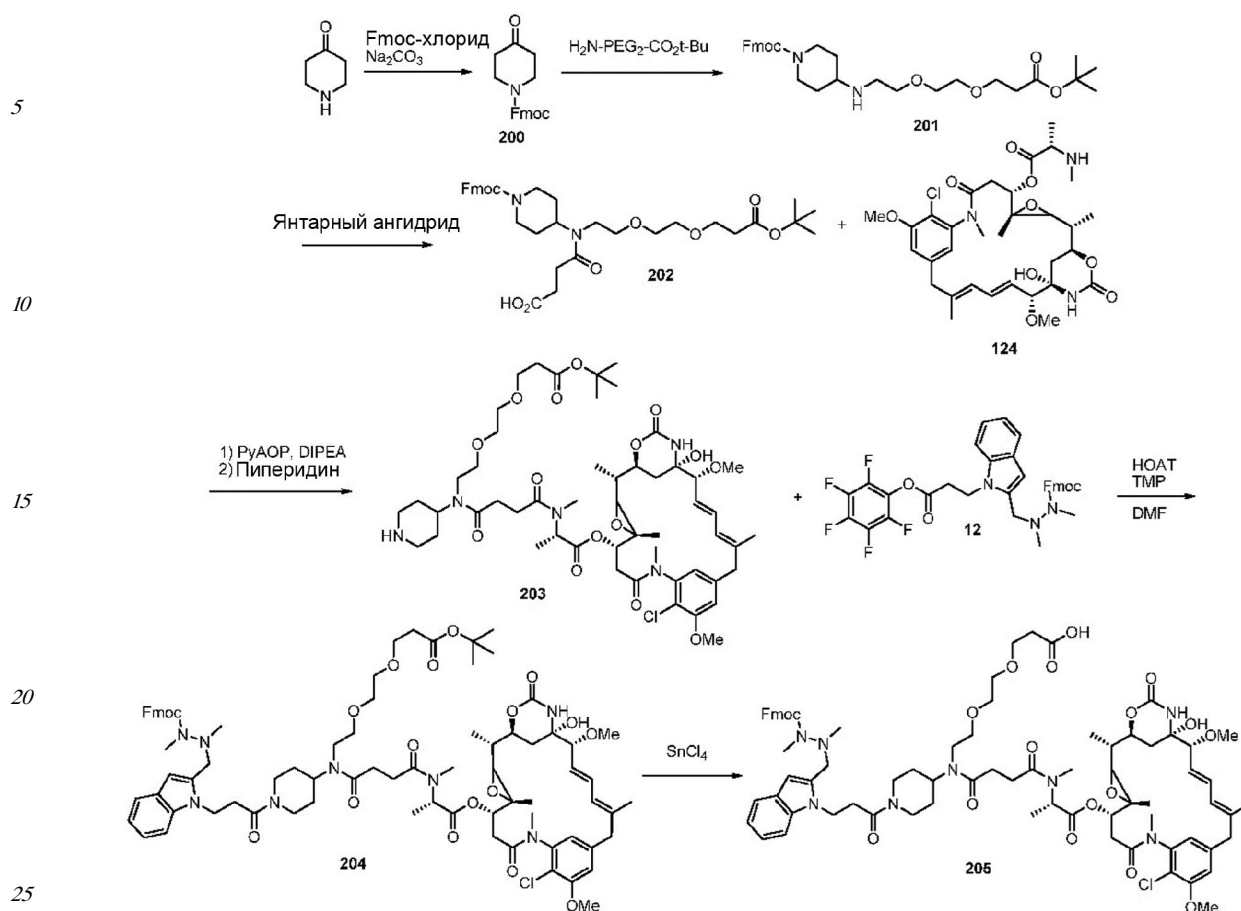
В ходе любого способа получения соединений изобретения, может быть необходимо и/или желательно защищать чувствительные или реакционноспособные группы на любых представляющих интерес молекулах. Этого можно достичь с помощью таких обычных защитных группы, как описаны в стандартных работах, таких как F. W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, London and New York 1973, in T. W. Greene and P. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", Third edition, Wiley, New York 1999, in "The Peptides"; Volume 3 (editors: E. Gross and J. Meienhofer), Academic Press, London and New York 1981, in "Methoden der organischen Chemie", Houben-Weyl, 4th edition, Vol. 15/1, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974, in H.-D. Jakubke and H. Jescheit, "Aminosäuren, Peptide, Proteine", Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, and Basel 1982, и/или в Jochen Lehmann, "Chemie der Kohlenhydrate: Monosaccharide and Derivate", Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974. Защитные группы могут быть удалены на подходящей последующей стадии с помощью способов, известных из уровня техники.

Соединения изобретения могут быть синтезированы множеством различных путей синтеза с применением коммерчески доступных исходных материалов и/или исходных материалов, полученных обычными способами синтеза. Множество примеров путей синтеза, которые могут быть применены для синтеза соединений, раскрытых в настоящем документе, описаны в приведенных ниже схемах.

Пример 1

Линкер, содержащий группу 4-амино-пиперидина (4AP), синтезировали в соответствии с приведенной ниже схемой 1.

Схема 1



Синтез (9Н-флуорен-9-ил)метил 4-оксопиперидин-1-карбоксилата (200)

В 100-мл круглодонную колбу, содержащую магнит для магнитной мешалки, добавляли пиперидин-4-он гидрохлорид моногидрат (1,53 г, 10 ммоль), Fmoc-хлорид (2,58 г, 10 ммоль), карбонат натрия (3,18 г, 30 ммоль), диоксан (20 мл) и воду (2 мл). Реакционные смеси перемешивали при комнатной температуре в течение 1-го часа. Смеси разбавляли EtOAc (100 мл) и экстрагировали водой (1×100 мл). Органический слой высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученный материал высушивали при пониженном давлении и получали соединение 200 в виде белого твердого вещества (3,05 г, 95%-ный выход).

¹H NMR (CDCl₃) δ 7,78 (d, 2H, J = 7,6), 7,59 (d, 2H, J = 7,2), 7,43 (t, 2H, J = 7,2), 7,37 (t, 2H, J = 7,2), 4,60 (d, 2H, J = 6,0), 4,28 (t, 2H, J = 6,0), 3,72 (br, 2H), 3,63 (br, 2H), 2,39 (br, 2H), 2,28 (br, 2H).

MS (ESI) m/z: [M+H]⁺ Рассчитано для C₂₀H₂₀NO₃ 322,4; Получено 322,2.

Синтез (9Н-флуорен-9-ил)метил4-((2-(2-(3-(трет-бутокс)-3-оксипропокс)этокс)этил)амино)пиперидин-1-карбоксилата (201)

В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнит для магнитной мешалки, добавляли пиперидин-4-он (642 мг, 2,0 ммоль), H₂N-PEG₂-CO₂t-Bu (560 мг, 2,4 ммоль), 4 Å молекулярные сита (активированный порошок, 500 мг) и 1,2-дихлопентан (5 мл). Смеси перемешивали в течение 1-го часа при комнатной температуре. К реакционным смесям добавляли натрия триацетоксиборогидрид (845 мг, 4,0 ммоль). Смеси перемешивали в течение 5-ти дней при комнатной температуре.

Полученные смеси разбавляли EtOAc. Органический слой промывали насыщенным NaHCO_3 (1×50 мл) и насыщенным соевым раствором (1×50 мл), высушивали над Na_2SO_4 , фильтровали, концентрировали при пониженном давлении и получали соединение 201 в виде масла, которое в дальнейшем применяли без дополнительной очистки.

Синтез 13-(1-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)пиперидин-4-ил)-2,2-диметил-4,14-диоксо-3,7,10-триокса-13-азагептадекан-17-овой кислоты (202)

В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнит для магнитной мешалки, добавляли N-Fmoc-пиперидин-4-амино- $\text{PEG}_2\text{-CO}_2\text{t-Bu}$ (201) с предыдущей стадии, янтарный ангидрид (270 мг, 2,7 ммоль) и дихлорметан (5 мл). Смеси перемешивали в течение 18-ти часов при комнатной температуре. Реакционные смеси распределялись между EtOAc и насыщенным NaHCO_3 . Водный слой экстрагировали EtOAc (3х). Водный слой закисляли HCl (1 М) до pH ~3. Водный слой экстрагировали (3х) DCM. Объединенные органические слои высушивали над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Реакционные смеси очищали с помощью C18 флэш-хроматографии (элюировали 10-100% MeCN/вода с 0,1%-ной уксусной кислотой). Содержавшие продукт фракции концентрировали при пониженном давлении и затем подвергались азеотропной перегонке с толуолом (3×50 мл) для удаления остатков уксусной кислоты, чтобы получить 534 мг (42%, 2 стадии) соединения 202 в виде белого твердого вещества.

^1H NMR (DMSO-d_6) δ 11,96 (br, 1H), 7,89 (d, 2H, $J = 7,2$), 7,63 (d, 2H, $J = 7,2$), 7,42 (t, 2H, $J = 7,2$), 7,34 (t, 2H, $J = 7,2$), 4,25-4,55 (m, 3H), 3,70-4,35 (m, 3H), 3,59 (t, 2H, $J = 6,0$), 3,39 (m, 5H), 3,35 (m, 3H), 3,21 (br, 1H), 2,79 (br, 2H), 2,57 (m, 2H), 2,42 (q, 4H, $J = 6,0$), 1,49 (br, 3H), 1,37 (s, 9H).

MS (ESI) m/z : $[\text{M}+\text{H}]^+$ Рассчитано для $\text{C}_{35}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_9$ 639,3; Получено 639,2.

Синтез (2S)-1-(((1 ^4S ,1 ^6S ,3 ^3S ,2R,4S,10E,12E,14R)-8 6 -хлор-1 4 -гидрокси-8 5 ,14-диметокси-3 3 ,2,7,10-тетраметил-1 2 ,6-диоксо-7-аза-1(6,4)-оксазинан-3(2,3)-оксиран-8(1,3)-бензолациклотетрадекафан-10,12-диен-4-ил)окси)-2,3-диметил-1,4,7-триоксо-8-(пиперидин-4-ил)-11,14-диокса-3,8-диазагептадекан-17-овой кислоты (203)

К раствору сложного эфира 202 (227 мг, 0,356 ммоль), диизопропилэтиламина (174 мкл, 1,065 ммоль), N-деацетилмайтансина 124 (231 мг, 0,355 ммоль) в 2 мл DMF добавляли RuAOP (185 мг, 0,355 ммоль). Раствор перемешивали в течение 30-ти мин. К реакционным смесям добавляли пиперидин (0,5 мл) и перемешивали в течение дополнительных 20 мин. Неочищенную реакционную смесь очищали с помощью C18 обращенно-фазовой хроматографии, применяя градиент ацетонитрила 0-100% ацетонитрил:вода, получая 203,2 мг (55%, 2 стадии) соединения 203.

Синтез 17-(трет-бутил) 1-(((1 ^4S ,1 ^6S ,3 ^3S ,2R,4S,10E,12E,14R)-8 6 -хлор-1 4 -гидрокси-8 5 ,14-диметокси-3 3 ,2,7,10-тетраметил-1 2 ,6-диоксо-7-аза-1(6,4)-оксазинан-3(2,3)-оксиран-8(1,3)-бензолациклотетрадекафан-10,12-диен-4-ил)-(2S)-8-(1-(3-(2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-1,2-диметилгидразинил)метил)-1H-индол-1-ил)пропаноил)пиперидин-4-ил)-2,3-диметил-4,7-диоксо-11,14-диокса-3,8-диазагептадекандиоата (204)

Раствор пиперидина 203 (203,2 мг, 0,194 ммоль), сложный эфир 12 (126,5 мг, 0,194 ммоль), 2,4,6-триметилпиридин (77 мкл, 0,582 ммоль), HOAT (26,4 мг, 0,194 ммоль) в 1 мл DMF перемешивали 30 мин. Неочищенную реакционную смесь очищали с помощью C18 обращенно-фазовой хроматографии, применяя градиент ацетонитрила 0-100%

ацетонитрил:вода с 0,1%-ной муравьиной кислотой, получая 280,5 мг (97%-ный выход) соединения 204.

MS (ESI) m/z: $[M+H]^+$ Рассчитано для $C_{81}H_{106}ClN_8O_{18}$ 1513,7; Получено 1514,0.

Синтез (2S)-8-(1-(3-(2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-1,2-диметилгидразинил)метил)-1H-индол-1-ил)пропаноил)пиперидин-4-ил)-1-(((1⁴S,1⁶S,3³S,2R,4S,10E,12E,14R)-8⁶-хлор-1⁴-гидрокси-8⁵,14-диметокси-3³,2,7,10-тетраметил-1²,6-диоксо-7-аза-1(6,4)-оксазинан-3(2,3)-оксиран-8(1,3)-бензолациклотетрадекан-10,12-диен-4-ил)окси)-2,3-диметил-1,4,7-триоксо-11,14-диокса-3,8-диазагептадекан-17-овой кислоты (205)

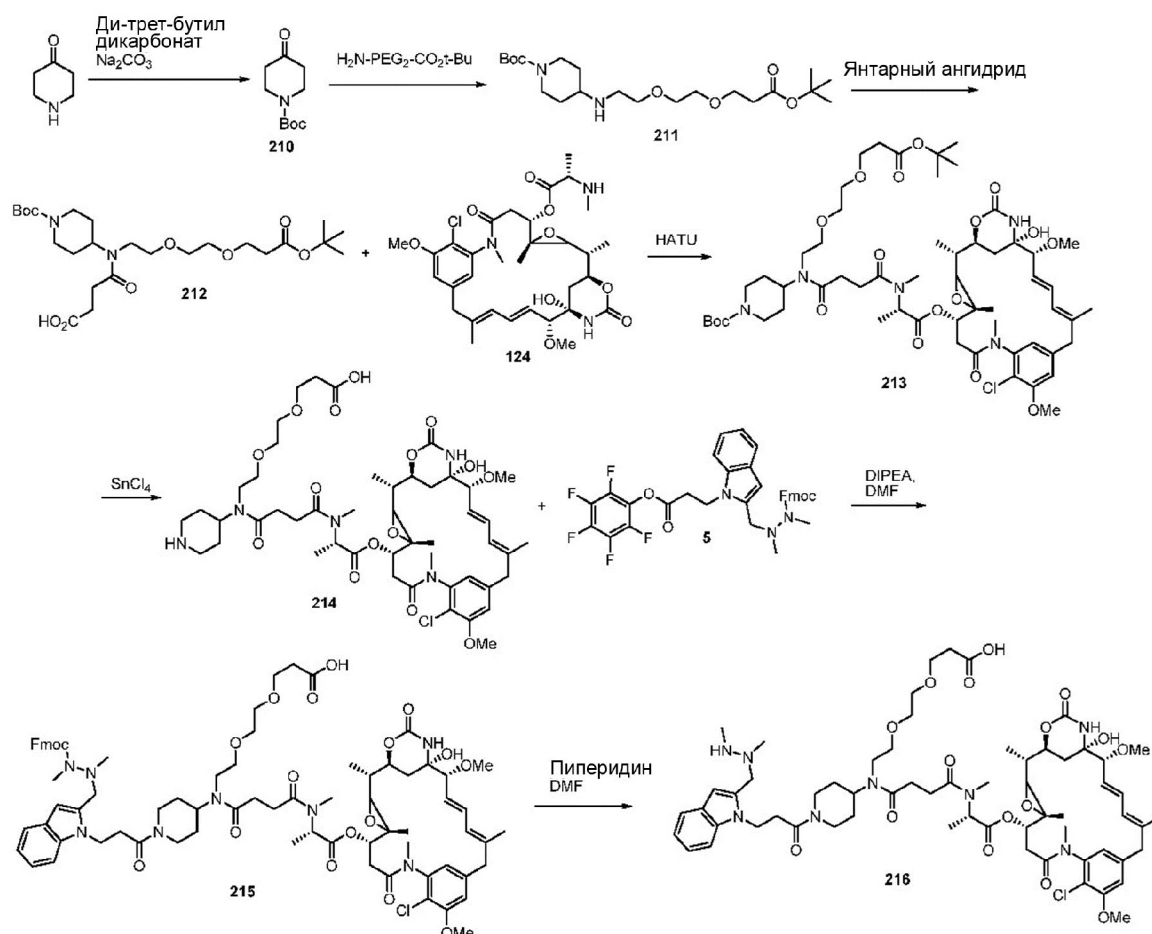
К раствору соединения 204 (108 мг, 0,0714 ммоль) в 500 мкл безводного DCM добавляли 357 мкл 1M раствора $SnCl_4$ в DCM. Гетерогенные смеси перемешивали в течение 1-го часа и затем очищали с помощью C18 обращенно-фазовой хроматографии, применяя градиент ацетонитрила 0-100% ацетонитрил:вода с 0,1%-ной муравьиной кислотой, получая 78,4 мг (75%-ный выход) соединения 205.

MS (ESI) m/z: $[M-H]^-$ Рассчитано для $C_{77}H_{96}ClN_8O_{18}$ 1455,7; Получено 1455,9.

Пример 2

Линкер, содержащий группу 4-амино-пиперидина (4AP), синтезировали в соответствии с приведенной ниже схемой 2.

Схема 2



Синтез трет-бутил 4-оксопиперидина-1-карбоксилата (210)

В 100-мл круглодонную колбу, содержащую магнит для магнитной мешалки,

добавляли пиперидин-4-он гидрохлорида моногидрат (1,53 г, 10 ммоль), ди-трет-бутил-дикарбонат (2,39 г, 11 ммоль), карбонат натрия (1,22 г, 11,5 ммоль), диоксан (10 мл) и воду (1 мл). Реакционные смеси перемешивали при комнатной температуре в течение 1-го часа. Смеси разбавляли водой (100 мл) и экстрагировали EtOAc (3 x 100 мл).

5 Объединенные органические слои промывали насыщенным соевым раствором, высушивали над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученный материал высушивали при пониженном давлении для получения 1,74 г (87%) соединения 210 в виде белого твердого вещества.

10 ^1H NMR (CDCl_3) δ 3,73 (t, 4H, J = 6,0), 2,46 (t, 4H, J = 6,0), 1,51 (s, 9H).

MS (ESI) m/z: $[\text{M}+\text{H}]^+$ Рассчитано для $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{NO}_3$ 200,3; Получено 200,2.

Синтез трет-бутил 4-((2-(2-(3-(трет-бутоксид)-3-оксопропокси)этокси)этил)амино)пиперидина-1-карбоксилата (211)

15 В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнит для магнитной мешалки, добавляли трет-бутил-4-оксопиперидин-1-карбоксилат (399 мг, 2 ммоль), $\text{H}_2\text{N-PEG}_2\text{-COOt-Bu}$ (550 мг, 2,4 ммоль), 4 Å молекулярные сита (активированный порошок, 200 мг) и 1,2-дихлопентан (5 мл). Смеси перемешивали в течение 1-го часа при комнатной температуре. К реакционным смесям добавляли натрия
20 триацетоксиборогидрид (845 мг, 4 ммоль). Смеси перемешивали в течение 3-х дней при комнатной температуре. Полученные смеси распределялись между EtOAc и насыщенным водным NaHCO_3 . Органический слой промывали насыщенным соевым раствором, высушивали над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении для получения 850 мг соединения 211 в виде вязкого масла.

25 MS (ESI) m/z: $[\text{M}+\text{H}]^+$ Рассчитано для $\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_6$ 417,3; Получено 417,2.

Синтез 13-(1-(трет-бутоксикарбонил)пиперидин-4-ил)-2,2-диметил-4,14-диоксо-3,7,10-триокса-13-азагептадекан-17-овой кислоты (212)

30 В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнит для магнитной мешалки, добавляли трет-бутил-4-((2-(2-(3-(трет-бутоксид)-3-оксопропокси)этокси)этил)амино)пиперидина-1-карбоксилат 211 (220 мг, 0,5 ммоль), янтарный ангидрид (55 мг, 0,55 ммоль), 4-(диметиламино)пиридин (5 мг, 0,04 ммоль) и дихлорметан (3 мл). Смеси перемешивали в течение 24-х часов при комнатной температуре. Реакционные смеси частично очищали с помощью флэш-хроматографии (элюировали 50-100% EtOAc/
35 гексаны) для получения 117 мг соединения 212 в виде прозрачного масла, которое применяли в дальнейшем без дополнительной характеристики.

MS (ESI) m/z: $[\text{M}+\text{H}]^+$ Рассчитано для $\text{C}_{25}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_9$ 517,6; Получено 517,5.

40 Синтез 17-(трет-бутил) 1-((1 ^4S ,1 ^6S ,3 ^3S ,2R,4S,10E,12E,14R)-8 6 -хлор-1 4 -гидроксид-8 5 ,14-диметокси-3 3 ,2,7,10-тетраметил-1 2 ,6-диоксо-7-аза-1(6,4)-оксазинан-3(2,3)-оксиран-8(1,3)-бензолациклотетрадекафан-10,12-диен-4-ил)-(2S)-8-(1-(трет-бутоксикарбонил)пиперидин-4-ил)-2,3-диметил-4,7-диоксо-11,14-диокса-3,8-диазагептадекандиоата (213)

45 В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнит для магнитной мешалки, добавляли 13-(1-(трет-бутоксикарбонил)пиперидин-4-ил)-2,2-диметил-4,14-диоксо-3,7,10-триокса-13-азагептадекан-17-овой кислоты 212 (55 мг, 0,1 ммоль), N-деацилмайтансин 124 (65 мг, 0,1 ммоль), NATU (43 мг, 0,11 ммоль), DMF (1 мл) и дихлорметан (0,5 мл). Смеси перемешивали в течение 8-ми часов при комнатной температуре. Реакционные смеси непосредственно очищали с помощью C18 флэш-

хроматографии (элюировали 5-100% MeCN/вода) с получением 18 мг (16%) соединения 213 в виде белой пленки.

MS (ESI) m/z: [M+H]⁺ Рассчитано для C₅₇H₈₇ClN₅O₁₇ 1148,6; Получено 1148,7.

Синтез (2S)-1-(((1⁴S,1⁶S,3³S,2R,4S,10E,12E,14R)-8⁶-хлор-1⁴-гидрокси-8⁵,14-диметокси-3³,2,7,10-тетраметил-1²,6-диоксо-7-аза-1(6,4)-оксазинан-3(2,3)-оксиран-8(1,3)-бензолациклотетрадекафан-10,12-диен-4-ил)окси)-2,3-диметил-1,4,7-триоксо-8-(пиперидин-4-ил)-11,14-диокса-3,8-диазагептадекан-17-овой кислоты (214)

В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнит для магнитной мешалки, добавляли майтансиноид 213 (31 мг, 0,027 ммоль) и дихлорметан (1 мл). Раствор охлаждали до 0°C и добавляли олова (IV) тетрахлорид (1,0 М раствор в дихлорметане, 0,3 мл, 0,3 ммоль). Реакционные смеси перемешивали в течение 1-го часа при 0°C. Реакционные смеси непосредственно очищали с помощью C18 флэш-хроматографии (элюировали 5-100% MeCN/вода) для получения 16 мг (60%) соединения 214 в виде белого твердого вещества (16 мг, 60%-ный выход).

MS (ESI) m/z: [M+H]⁺ Рассчитано для C₄₈H₇₁ClN₅O₁₅ 992,5; Получено 992,6.

Синтез (2S)-8-(1-(3-(2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-1,2-диметилгидразинил)метил)-1H-индол-1-ил)пропаноил)пиперидин-4-ил)-1-(((1⁴S,1⁶S,3³S,2R,4S,10E,12E,14R)-8⁶-хлор-1⁴-гидрокси-8⁵,14-диметокси-3³,2,7,10-тетраметил-1²,6-диоксо-7-аза-1(6,4)-оксазинан-3(2,3)-оксиран-8(1,3)-бензолациклотетрадекафан-10,12-диен-4-ил)окси)-2,3-диметил-1,4,7-триоксо-11,14-диокса-3,8-диазагептадекан-17-овой кислоты (215)

В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнит для магнитной мешалки, добавляли майтансиноид 214 (16 мг, 0,016 ммоль), (9H-флуорен-9-ил)метил 1,2-диметил-2-(((1-(3-оксо-3-(перфторфенокси)пропил)-1H-индол-2-ил)метил)гидразина-1-карбоксилат (5) (13 мг, 0,02 ммоль), DIPEA (8 мкл, 0,05 ммоль) и DMF (1 мл). Раствор перемешивали в течение 18-ти часов при комнатной температуре. Реакционные смеси непосредственно очищали с помощью C18 флэш-хроматографии (элюировали 5-100% MeCN/вода) для получения 18 мг (77%) соединения 215 в виде белого твердого вещества.

MS (ESI) m/z: [M+H]⁺ Рассчитано для C₇₇H₉₈ClN₈O₁₈ 1457,7; Получено 1457,9.

Синтез (2S)-1-(((1⁴S,1⁶S,3³S,2R,4S,10E,12E,14R)-8⁶-хлор-1⁴-гидрокси-8⁵,14-диметокси-3³,2,7,10-тетраметил-1²,6-диоксо-7-аза-1(6,4)-оксазинан-3(2,3)-оксиран-8(1,3)-бензолациклотетрадекафан-10,12-диен-4-ил)окси)-8-(1-(3-(2-(((1,2-диметилгидразинил)метил)-1H-индол-1-ил)пропаноил)пиперидин-4-ил)-2,3-диметил-1,4,7-триоксо-11,14-диокса-3,8-диазагептадекан-17-овой кислоты (216)

В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнит для магнитной мешалки, добавляли майтансиноид 215 (18 мг, 0,012 ммоль), пиперидин (20 мкл, 0,02 ммоль) и DMF (1 мл). Раствор перемешивали в течение 20-ти минут при комнатной температуре. Реакционные смеси непосредственно очищали с помощью C18 флэш-хроматографии (элюировали 1-60% MeCN/вода) для получения 15 мг (98%) соединения 216 (также обозначаемого в настоящем документе как HIPS-4AP-майтансин или HIPS-4-амино-пиперидин-майтансин) в виде белого твердого вещества.

MS (ESI) m/z: [M+H]⁺ Рассчитано для C₆₂H₈₈ClN₈O₁₆ 1235,6; Получено 1236,0.

Пример 3

Экспериментальные процедуры

Общие

Эксперименты выполняли для создания сайт-специфических конъюгированных конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADCs). Получение сайт-специфических ADC включало встраивание формилглицина (FGly), неприродной аминокислоты, в последовательности белка. Для внесения FGly (фиг. 1), короткую консенсусную последовательность, СХРХR, где Х представлял собой серин, треонин, аланин или глицин, вставляли в желаемое место в консервативной области тяжелой или легкой цепей антитела с помощью стандартной молекулярно-биологической методики клонирования. Данную «меченую» конструкцию получали рекомбинантно в клетках, коэкспрессировавших генерирующий формилглицин фермент (FGE), который котрансляционно преобразовывает цистеин в пределах метки в остаток FGly, и получали альдегидную функциональную группу (также обозначаемую в настоящем документе как альдегидная метка). Альдегидная функциональная группа служила в качестве химической ручки для биоортогонального сопряжения. Гидразино-изо-Пикте-Шпенглер (HIPS) лигирование применяли для соединения нагрузки (например, лекарственного средства, такого как цитоксин (например, майтансин)) с FGly, что приводило к образованию стабильной, ковалентной С-С связи между цитоксиновой нагрузкой и антителом. Ожидается, что данная С-С связь будет стабильной в физиологически значимых условиях, с которыми сталкивается ADC во время циркуляции в кровотоке и рециклировании FcRn, например, к протеазам, низкому рН и восстанавливающим реагентам. Антитела, несущие альдегидную метку, могут быть получены во множестве местоположений. Эксперименты выполняли для проверки эффектов вставки альдегидной метки на С-конце тяжелой цепи (СТ). Биофизическую и функциональную характеристику выполняли на полученных ADCs, сделанных путем конъюгации с майтансиновыми нагрузками через линкер HIPS.

Клонирование, экспрессия и очистка меченых антител

Последовательность альдегидной метки вставляли на С-конец тяжелой цепи (СТ) с помощью стандартной молекулярно-биологической методики. Для мелкомасштабного производства, клетки CHO-S трансфицировали экспрессионными конструкциями FGE человека и пулы FGE-гиперэкспрессирующих клеток применяли для временного производства антитела. Для крупномасштабного производства, применяли технологию GPEX (Catalent, Inc., Somerset, NJ) для генерации клональной клеточной линии гиперэкспрессирующих FGE человека (GPEX). Затем, клон FGE применяли для генерации стабильных пулов экспрессирующих антитела клеток в больших объемах. Антитела очищали от кондиционированной среды с помощью белковой хроматографии (MabSelect, GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA). Очищенные антитела подвергали мгновенной заморозке и хранили при -80°C до дальнейшего применения.

Биоконъюгация, очистка и HPLC-анализ

α CD22 антитело, меченое С-концевым альдегидом (15 мг/мл), конъюгировали с HIPS-4AP-майтансином (8 моль-эквивалентов лекарственного средства:антитело) в течение 72-х часов при 37°C в 50 мМ натрия цитрате, 50 мМ NaCl pH 5,5, содержавших 0,85% DMA. Неконъюгировавшее антитело удаляли, применяя хроматографию с гидрофобным взаимодействием (HIC; GE Healthcare 17-5195-01) в препаративном масштабе с мобильной фазой А: 1,0 М аммония сульфат, 25 мМ натрия фосфат pH 7,0, и мобильной фазой В: 25% изопропанол, 18,75 мМ натрия фосфат, pH 7,0. Изократический градиент 33% В применяли для элюирования неконъюгированного материала, с последующим линейным градиентом 41-95% В для элюирования моно- и диконъюгированных видов. Для определения DAR конечного продукта, ADCs анализировали с помощью аналитической

НИС (Tosoh #14947, Grove City, OH) с мобильной фазой А: 1,5 М аммония сульфат, 25 мМ натрия фосфат, рН 7,0, и мобильной фазой В: 25% изопропанол, 18,75 мМ натрия фосфат рН 7,0. Для определения агрегации, образцы анализировали с помощью аналитической гель-фильтрационной хроматографии (SEC; Tosoh #08541) с мобильной фазой 300 мМ NaCl, 25 мМ натрия фосфат, рН 6,8.

Результаты

α CD22 антитела, модифицированные так, что они содержали альдегидную метку на С-конце тяжелой цепи (СТ) конъюгировали с майтансиновой нагрузкой, прикрепленной к линкеру HIPS-4AP, как описано выше. После завершения реакции конъюгации, неконъюгированное антитело удаляли с помощью препаративной НИС и оставшееся свободное лекарственное средство удаляли при обмене буфера посредством тангенциальной фильтрации потока. Реакции имели высокий выход, с $\geq 84\%$ эффективностью конъюгации и $>70\%$ общим выходом. Полученные ADCs имели отношения лекарственное средство-к-антителу (DARs), равное 1,6-1,9, и были преимущественно мономерными. Фиг. 2-5 показывают DARs из типичных неочищенных реакций и очищенные ADCs, как определено с помощью НИС и хроматографии с обращенной фазой PLRP, и демонстрируют мономерную целостность, как определено с помощью SEC.

Фиг. 2 показывает регистрацию элюции с колонки для хроматографии с гидрофобным взаимодействием (НИС) альдегид-меченого анти-CD22 антитела, конъюгированного на С-конце (СТ) с майтансиновой нагрузкой, прикрепленной к линкеру HIPS-4AP. Фиг. 2 указывает, что неочищенный DAR был равен 1,68, как было определено с помощью НИС.

Фиг. 3 показывает регистрацию НИС альдегид-меченого анти-CD22 антитела, конъюгированного на С-конце (СТ) с майтансиновой нагрузкой, прикрепленной к линкеру HIPS-4AP. Фиг. 3 показывает, что конечный DAR был равен 1,77, как было определено с помощью НИС.

Фиг. 4 показывает регистрацию хроматографии с обращенной фазой (PLRP) альдегид-меченого анти-CD22 антитела, конъюгированного на С-конце (СТ) с майтансиновой нагрузкой, прикрепленной к линкеру HIPS-4AP. Фиг. 4 указывает, что конечный DAR был равен 1,81, как было определено с помощью PLRP.

Фиг. 5 показывает анализ графика аналитической гель-фильтрационной хроматографии (SEC) альдегид-меченого анти-CD22 антитела, конъюгированного на С-конце (СТ) с майтансиновой нагрузкой, прикрепленной к линкеру HIPS-4AP. Как показано на фиг. 5, аналитическая SEC указывает на 98,2% мономера для конечного продукта.

In vitro цитотоксичность

Линии клеток CD22-положительной В-клеточной лимфомы, Ramos и WSU-DLCL2, получали из банков клеток ATCC и DSMZ, соответственно. Клетки поддерживали в среде RPMI-1640 (Cellgro, Manassas, VA), дополненной 10%-ной фетальной бычьей сывороткой (Invitrogen, Grand Island, NY) и Glutamax (Invitrogen). За 24 часа до посева на чашки, клетки пассировали для обеспечения роста в логарифмической фазе. В день посева, 5000 клетки/лунку высевали в 96-луночные планшеты в 90 мкл среды нормального роста, дополненной 10 IU пенициллина и 10 мкг/мл стрептомицин (Cellgro). Клетки обрабатывали в различных концентрациях с 10 мкл разбавленных аналитов и чашки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Через 5 дней добавляли 100 мкл/лунку реагента Cell Titer-Glo (Promega, Madison, WI) и измеряли люминесценцию, с помощью спектрофотометра для прочтения планшетов Molecular Devices SpectraMax

М5. Для анализа данных применяли программное обеспечение GraphPad Prism.

Результаты

α CD22 CT HIPS-4AP-майтансин продемонстрировал *in vitro* очень высокую активность против клетки WSU-DLCL2 и Ramos по сравнению с свободным мйтансином (фиг. 6). Концентрации IC₅₀ были равны 0,018 и 0,086 нМ для ADC и свободного лекарственного средства, соответственно, против клеток WSU-DLCL2, и были равны 0,007 и 0,040 нМ для ADC и свободного лекарственного средства, соответственно, против клеток Ramos.

Фиг. 6А показывает график *in vitro* активности против клеток WSU-DLCL2 (% жизнеспособность против Log концентрации конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) (нМ)) для анти-CD22 ADCs, конъюгированных на С-конце (CT) с мйтансиновой нагрузкой, прикрепленной к линкеру HIPS-4AP. Фиг. 6В показывает график *in vitro* активности против клеток Ramos (% жизнеспособность против Log концентрации конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) (нМ)) для анти-CD22 ADCs, конъюгированных на С-конце (CT) с мйтансиновой нагрузкой, прикрепленной к линкеру HIPS-4AP.

Исследования ксенотрансплантатов

Самкам мышей ICR SCID (8/группу) инокулировали подкожно 5×10^6 клеток WSU-DLCL2. Обработку начинали, когда опухоли достигали среднего размера, равного 262 мм³, в этот момент животным вводили внутривенно только растворитель или CT-меченое α CD22 HIPS-4AP-майтансин (10 мг/кг). Введение дозы продолжали каждые четыре дня, в общей сложности четыре дозы (q4d x 4). Животных контролировали два раза в неделю в отношении массы тела и размера опухоли. Животных умерщвляли, когда опухоли достигали размера 2000 мм³.

Результаты

Среднее время до конечной точки для животных в контрольных группах с растворителем было равно 16 дням; поэтому ингибирование роста опухоли (TGI%) рассчитывали на этот день. TGI% определяли по следующей формуле:

$$TGI (\%) = (TV_{\text{контрольная группа}} - TV_{\text{обработанная группа}}) / TV_{\text{контрольная}} \times 100$$

где TV представляет собой объем опухоли.

Животные, получавшие дозу α CD22 HIPS-4AP-майтансина, продемонстрировали 90% TGI на день 16, с 5 из 8 опухолей, претерпевшими полную регрессию (фиг. 7). Три из этих полных регрессий были долговечными до конца исследования (день 58). Фиг. 7 показывает график, показывающий *in vivo* эффективность против WSU-DLCL2 в модели ксенотрансплантата (средний объем опухоли (мм³) от дней) для анти-CD22 ADCs, конъюгированных на С-конце (CT) с мйтансиновой нагрузкой, прикрепленной к линкеру HIPS-4AP. Вертикальные стрелки на фиг. 7 указывают на введение дозы, которое происходило каждые четыре дня, в общей сложности четыре дозы (q4d x 4).

Пример 4

Введение

Опухоли, имеющие гематологическое происхождение, составляют ~10% от всех вновь диагностированных случаев рака в США. Из них обозначаемые как неходжкинская лимфома (НХЛ) описывают как группу разнообразных раков, который в совокупности входят в первую десятку наиболее часто диагностируемых раков по всему миру. Хотя долгосрочные тенденции к выживанию улучшаются, остается значительная неудовлетворенная клиническая потребность в терапиях для помощи пациентам с рецидивирующим или резистентным заболеванием, одна из причин которого

заключается в оттоке лекарственного средства через активацию ксенобиотических насосов, таких как MDR1. Был получен конъюгат сайт-специфически конъюгированное антитело-лекарственное средство, нацеленный против CD22 и несущий нерасщепляемую майтансиновую нагрузку, который устойчив к опосредуемому MDR1 оттоку.

- 5 Конструкция была эффективна против ксенотрансплантатов CD22+ NHL и может быть многократно введена яванскому макаку в дозе 60 мг/кг без наблюдаемых побочных эффектов. Вместе, данные указывают на то, что данное лекарственное средство имеет потенциал, который может быть эффективно применен у пациентов с опухолями CD22+, у которых возникла связанная с MDR1 резистентность к предшествующим терапиям.
- 10 CD22 представляет собой клинически апробированную мишень для лечения NHL и ALL. Конъюгат анти-CD22 антитело-лекарственное средство (ADC) в соответствии с настоящим раскрытием может быть применен для лечения пациентов с рецидивами/резистентностью NHL и ALL.

Материал и способы

- 15 Анти-CD22 антитело конъюгировали сайт-специфически, применяя технологию с альдегидной меткой, с нерасщепляемой майтансиновой нагрузкой. ADC характеризовали как биофизически, так и функционально *in vitro*. Затем, *in vivo* эффективность определяли у мышей, применяя две модели ксенотрансплантатов и проводили исследования токсичности и у крыс, и у яванских макаков. Фармакодинамические исследования
- 20 проводили у обезьян, и в фармако- и токсикокинетических исследованиях сравнивали общее воздействие АЦП в исследованиях эффективности и токсичности.

Результаты

- ADC был очень активен *in vivo*, даже против линии клеток, которые были сконструированы так, чтобы они сверхэкспрессировали эффлюксный насос, MDR1.
- 25 Конструкция была эффективна в концентрации 10 мг/кг x 4 дозы против моделей опухолей ксенотрансплантатов NHL и в исследованиях токсичности у яванских макаков, ADC вводили дважды в дозе 60 мг/кг без наблюдаемых побочных эффектов. Воздействие общего ADC в данных дозах (как оценивали с помощью AUC_{0-inf}) указывает на то, что воздействие, необходимое для достижения эффективности, было ниже максимальных
- 30 переносимых доз. Наконец, исследование фармакодинамического ответа у обработанных обезьян продемонстрировало, что компартмент В-клеток был избирательно истощен, указывая на то, что ADC устраняли целевые клетки без заметной нецелевой токсичности.

- Результаты указывают на то, что ADC могут быть эффективно применены у пациентов с CD22+ опухолями, у которых развилась связанная с MDR1 устойчивость
- 35 к предшествующим терапиям.

Пример 5

Введение

- Лейкемии, лимфомы и миеломы широко распространены среди населения, составляя ~10% всех вновь выявленных случаев рака в США за 2015. Из этих видов рака,
- 40 происходящие от В-клеток злокачественные опухоли составляют большую и разнообразную группу, которая включает неходжкинскую лимфому (NHL), хроническую лимфоцитарную лейкемию (CLL) и острый лимфобластный лейкоз (ALL). Аналогичным образом, как категория, термином NHL обозначают примерно 60 подмножеств лимфомы, из которых примерно 85% происходят из В-клеток, включая диффузную
- 45 крупноклеточную В-клеточную лимфому (DLBCL), фолликулярную лимфому (FL) и лимфомы из клеток мантии (MCL). В совокупности, заболевания NHL представляют собой одни из наиболее распространенных наблюдаемых типов рака, в порядке значимости, 7-ой наиболее распространенный рак в США и 10-ой наиболее

распространенный рак, диагностированный во всем мире в 2012. Хотя долгосрочные тенденции показывают улучшение показателей пятилетней выживаемости для большинства диагнозов рака крови, остается значительная неудовлетворенная клиническая потребность, с 16% для CLL, 30% для ALL и 30% для NHL пациентов, получивших диагноз в период с 2004 до 2010, не достигнувших 5-летней конечной точки выживания.

CD22 представляет собой гликобелок клеточной поверхности линии В-клеток с ограниченной дифференцировкой, который экспрессируется на большинстве В-клеточных гематологических злокачественных новообразованиях, но не экспрессируется на гемопоэтических стволовых клетках, В-клетках памяти или других нормальных не гемопоэтических тканях. Образцы его экспрессии и быстрая кинетика интернализации делает его мишенью для терапий с применением конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), что было подтверждено для него в клинических испытаниях против NHL и ALL.

В экспериментах, описанных в настоящем документе, применяли технологию сайт-специфической конъюгации, основанную на альдегидной метке и гидразио-изо-Пикте-Шпенглер (HIPS) химии, для помещения майтансиновой нагрузки, сопряженной через нерасщепляемый линкер на С-конец тяжелой цепи антитела. Генетически кодируемая альдегидная метку включала шести-аминокислотную последовательность, LCTPSR.

Котрансляционно сверхэкспрессированный формилглицин-генерирующий фермент (FGE), преобразовывал цистеин в пределах консенсусной последовательности в остаток формилглицина, несущий альдегидную функциональную группу, которая реагировала с HIPS-линкер-нагрузкой с образованием ADC. Такой подход дает возможность контролировать как размещение нагрузки и DAR, так и получение высокоомогенных препаратов ADC. Сайт-специфически конъюгированные ADCs продемонстрировали улучшенные фармакокинетические характеристики (PK) и эффективность по сравнению с стохастическими конъюгатами, вероятно, из-за отсутствия недостаточно- и избыточно конъюгированных типов в препарате, что могло привести к неэффективности или к чрезмерно токсичным молекулам, соответственно. Кроме того, примененная нерасщепляемая линкер-майтансиновая нагрузка на анти-CD22 ADC была устойчива к оттоку под действием MDR1 и не опосредовала нецелевой или неспецифический цитолиз. В совокупности, эти признаки способствовали эффективности и безопасности анти-CD22 ADC, наблюдаемым в доклинических исследованиях.

Материалы и способы

Общее

Все исследования на животных проводили в соответствии с рекомендациями комитета по содержанию и использованию лабораторных животных и выполняли в лабораториях Charles River Laboratories, Aragen Bioscience или Covance Laboratories. Мышиное антимаитансин антитело было сделано компанией «ProMab» и проверено собственными силами. Кроличье анти-AF488 антитело был приобретен у компании «Life Technologies». Конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) вторичные антитела были от компании «Jackson ImmunoResearch». Антитела, примененные для фармакодинамических исследований, были от компании «BD Pharmingen». Линии клеток получали из банков клеток ATCC и DSMZ, где они были подтверждены морфологией, кариотипированием и подходами на основе ПЦР.

Клонирование, экспрессия и очистка меченого антитела

Антитела создавали с помощью стандартных методик клонирования и очистки и технологии экспрессии GPEX®.

Биоконъюгация, очистка и HPLC-анализ

ADCs получали и характеризовали как описано в работе Drake et al., Bioconjugate Chem., 2014, 25, 1331-41.

Создание линии клеток MDR1+

5 кДНК из MDR1 (ABCB1) получали от компании «Sino Biological» и клонировали в плазмиду pEF с гигромицином в качестве маркера отбора. Прибор AMAXA Nucleofector™ применяли для выполнения электропорации клеток Ramos (ATCC CRL-1923) и WSU-DLCL2 (DSMZ ACC 575) в соответствии с инструкциями производителя. После отбора с помощью гигромицина (Invitrogen 10687010), пулы обогащали обработкой
10 паклитакселом (25 нМ вплоть до 10-го дня) для дальнейшего отбора клеток с функциональными MDR1. Полученные клетки поддерживали под гигромициновым отбором в RPMI (Gibco 21870-092), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS) и 1X GlutaMax (Gibco 35050-079).

In vitro анализы цитотоксичности

15 Линии клеток высевали в 96-луночные планшеты (Costar 3610) при плотности, равной 5×10^4 клеток/лунку в 100 мкл среды роста и оставляли на 5 часов. Серийные разведения тестируемых образцов проводили в RPMI при 6х конечной концентрации и 20 мкл добавляли к клеткам. После инкубации при 37°C с 5% CO₂ в течение 5-ти дней, измеряли
20 жизнеспособность, применяя Promega CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (G3581) в соответствии с инструкциями производителя. Кривые для GI₅₀ рассчитаны в программе GraphPad Prism, применяя величину отношения лекарственное средство-к-антителу (DAR) в ADC для нормализации концентрации доза к нагрузке.

Исследования ксенотрансплантатов

25 Самкам мышей CB17 ICR SCID инокулировали подкожно клетки WSU-DLCL2 или Ramos в 50%-ном матрикеле. Опухоли измеряли два раза в неделю, и объем опухоли оценивали в соответствии с уравнением: $\text{tumor volume (mm}^3\text{)} = \frac{w^2 \times l}{2}$, где w = ширина
30 опухоли и l = длина опухоли. Когда опухоли достигали желаемого среднего объема, животных случайным образом распределяли по группам в 8-12 мышей и вводили им лекарственные препараты в приведенных ниже дозах. Животных умерщвляли в конце исследования или если опухоли достигали объема 2000 мм³.

Токсикологическое исследование и токсикокинетический (ТК) анализ у крыс

35 Крысам-самцам Sprague-Dawley (в возрасте 8-9 недель на начало исследования) давали единственную внутривенную дозу 6, 20, 40 или 60 мг/кг анти-CD22 ADC (5 животные/группу). Животных наблюдали в течение 12-ти дней после введения дозы. Массы тела регистрировали на день 0, 1, 4, 8 и 11. Кровь собирали от всех животных на 8-м часу и на 5, 9 и 12 день и применяли для токсикокинетических анализов (все
40 временные точки) и для клинической химии и гематологических анализов (дни 5 и 12). Токсикокинетические анализы выполняли способом ELISA, применяя те же условия и реагенты как описаны для фармакокинетических анализов.

Токсикологические и ТК исследования на приматах, не представляющих собой человека

45 Яванским макакам (2/пол/группу) давали две дозы (каждый 21-ый день) по 10, 30 или 60 мг/кг анти-CD22 ADC с последующим 21-дневным периодом наблюдения. Массы тела оценивали до введения дозы в день 1 и на дни 8, 15, 22 (преддоза), 29, 36 и 42. Кровь собирали для токсикокинетических исследований, клинической химии и гематологических

анализов в соответствии с графиками, представленными в таблица 2.

Токсикокинетические анализы проводили с помощью ELISA, применяя те же условия и реагенты как описаны для фармакокинетических анализов, за исключением тех, в которых применяли белок CD22-His как реагент для захвата для измерений суммарного антитела и суммарного ADC.

Таблица 2. Резюме фармакокинетический результатов у крыс, получавших анти-CD22 ADC в дозе 3 мг/кг

Параметр, среднее (SD)	Суммарные Ab	Суммарные ADC	Суммарные конъюгаты
AUC _{0-inf} (день · мкг/мл)	304 (40)	218 (18)	261 (26)
Clearance (мл/дань/кг)	10,0 (1)	13,8 (1)	11,6 (1)
C _{0,04 d}	73,2 (5)	83,9 (16)	76,8 (6)
t _{1/2} эффективное (дни)*	9,48 (1)	6,13 (0,6)	7,22 (0,6)
V _{SS} (мл/кг)	41,1 (3)	36,7 (7)	39,2 (3)

Суммарные измерения антител конъюгированного и неконъюгированного Ab; Суммарные ADC представляет собой DAR-чувствительное измерение; Суммарные измерения антител, все анализы, с DAR ≥ 1. SD, стандартное отклонение; AUC_{0-inf}, площадь под концентрацией против временной кривой от времени 0 до бесконечности; C_{0,04 d}, концентрация, наблюдаемая в 1 ч; t_{1/2} эффективное, эффективное время полужизни; V_{SS}, объем распределения в стационарном состоянии. *Неопределенность для времени полужизни дается как стандартная ошибка.

Фармакодинамическое исследование на приматах, не представляющих собой человека

Образцы цельной крови из яванских макаков, поступившие в анти-CD22 ADC токсикологические исследования, анализировали с помощью проточной цитометрии для оценки популяции CD3+, CD20+ и CD3-/CD20-лейкоцитов. Коротко, к 100 мкл аликвотам цельной крови, добавляли или флуоресцеин, или конъюгированные с фикоэритрином изотипические контрольные антитела, или конъюгированные флуоресцеином анти-CD20 и конъюгированные с фикоэритрином анти-CD3 антитела, и инкубировали на льду в течение 30 мин. Затем, эритроциты лизировали раствором хлорида аммония (Stem Cell Technologies) и клетки дважды промывали в фосфатном буферном солевом растворе + 1% FBS. Меченые клетки анализировали с помощью проточной цитометрии на приборе FACSCanto™, применяя программное обеспечение FACSDiva™.

Дизайн фармакокинетических (ПК) исследований

Для исследования на мышах, животных, примененных в эксперименте с ксенотрансплантатами Ramos, отбирали в группы по трое во временных точках, начинавшихся через 1 час после первой дозы, и на весь период наблюдения. Для исследования на крысах, крысам-самцам Sprague-Dawley (3 на группу) вводили внутривенно болюсом, в виде единственной дозы, 3 мг/кг ADC. Плазму собирали в 1 час, 8 часов и 24 часа и на 2, 4, 6, 8, 10, 14 и 21 день после введения дозы. Образцы плазмы хранили при -80°C до применения.

Анализ образцов ПК и ТК

Концентрацию суммарных антител, суммарных ADC (DAR-чувствительных) и суммарных конъюгатов (DAR ≥ 1) определяли количественно с помощью ELISA, как схематически показано на фиг. 10. Для суммарных антител, конъюгаты захватывали человеческими IgG-специфическими антителами и детектировали с HRP-конъюгированными антителами против Fc-специфических антител человека. Для суммарных ADC, конъюгаты захватывали антителами против Fab-специфических

антител человека и детектировали с мышинными первичными антимайтансиновыми антителами, а затем с HRP-конъюгированными специфическими вторичными антителами против мышинных IgG субкласса 1. Для суммарных конъюгатов, конъюгаты захватывали с антимайтансиновыми антителами и детектировали с HRP-конъюгированными антителами против Fc-специфических антител человека. Связавшиеся вторичные антитела детектировали, применяя субстрат Ultra TMB One-Step ELISA (Thermo Fisher). После тушения реакции серной кислотой, сигналы считывали по поглощению при 450 нМ на спектрофотометра для прочтения планшетов Molecular Devices Spectra Max M5, оснащенный программным обеспечением SoftMax Pro. Данные анализировали, применяя программы GraphPad Prism и Microsoft Excel.

Связывание антигена CD22 в непрямом анализе ELISA

96-луночные планшеты Maxisorp (Nunc) покрывали в течение ночи при 4°C 1 мкг/мл CD22-His человека (Sino Biological) в PBS. Планшет блокировали казеиновым буфером (ThermoFisher) и затем антителами анти-CD22 дикого типа и ADCs высевали в 11-стадийных сериях с 2-кратными разведениями, начиная с 200 нг/мл. Планшет инкубировали, встряхивая, при комнатной температуре в течение 2-х часов. После промывания в фосфатном буферном солевом растворе (PBS) 0,1% Tween-20, связавшиеся аналиты детектировали с ослиными вторичными антителами против специфических Fc-γ человека, конъюгированных с пероксидазой хрена (HRP). Сигналы визуализировали с помощью Ultra TMB (Pierce) и тушили 2 н H₂SO₄. Определяли поглощение при 450 нМ, применяя спектрофотометр для прочтения планшетов Molecular Devices SpectraMax M5, и данные анализировали, применяя GraphPad Prism.

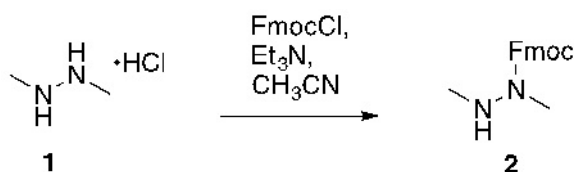
Опосредованная анти-CD22 ADC интернализация CD22 на линии клеток CD22+ NHL

Клетки Ramos, Granta-519 и WSU-DLCL2 (1e6/тест) инкубировали или только в буфере для мечения [PBS+ 1% фетальной бычьей сыворотки (FBS)], или в буфере для мечения с анти-CD22 ADC (1 мкг/тест). Образцы помещали при 4 или 37°C на 2 часа. Затем, клетки инкубировали на льду в течение 20 мин с меченными флуоресцеином анти-CD22. После промывки 2х в буфере для мечения, клетки анализировали с помощью проточной цитометрии на приборе FACSCanto™ с помощью программного обеспечения FACSDiva™. Разницу в флуоресценции между клетками при 4 и 37°C ± ADC интерпретировали как анти-CD22 ADC-опосредованную интернализацию.

Исследования перекрестной реактивности тканей яванских макаков и человека

Исследования перекрестной реактивности тканей проводили с помощью системы Ensigna Biosystems Inc. (Richmond, CA), применяя биотинилированные анти-CD22 ADC и биотинилированный изотип антитела, конъюгированного с майтансиновой нагрузкой через линкер HIPS-4AP, в качестве контроля. Применяли микропанели тканей, содержавшие ткани кожи, сердца, легких, почек, печени, поджелудочной железы, желудка, тонкого кишечника, толстой кишки и селезенки (положительный контроль). Первичные антитела детектировали, применяя стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена, с последующей визуализацией с субстратом DAB.

Синтез линкерной нагрузки HIPS-4AP-майтансин

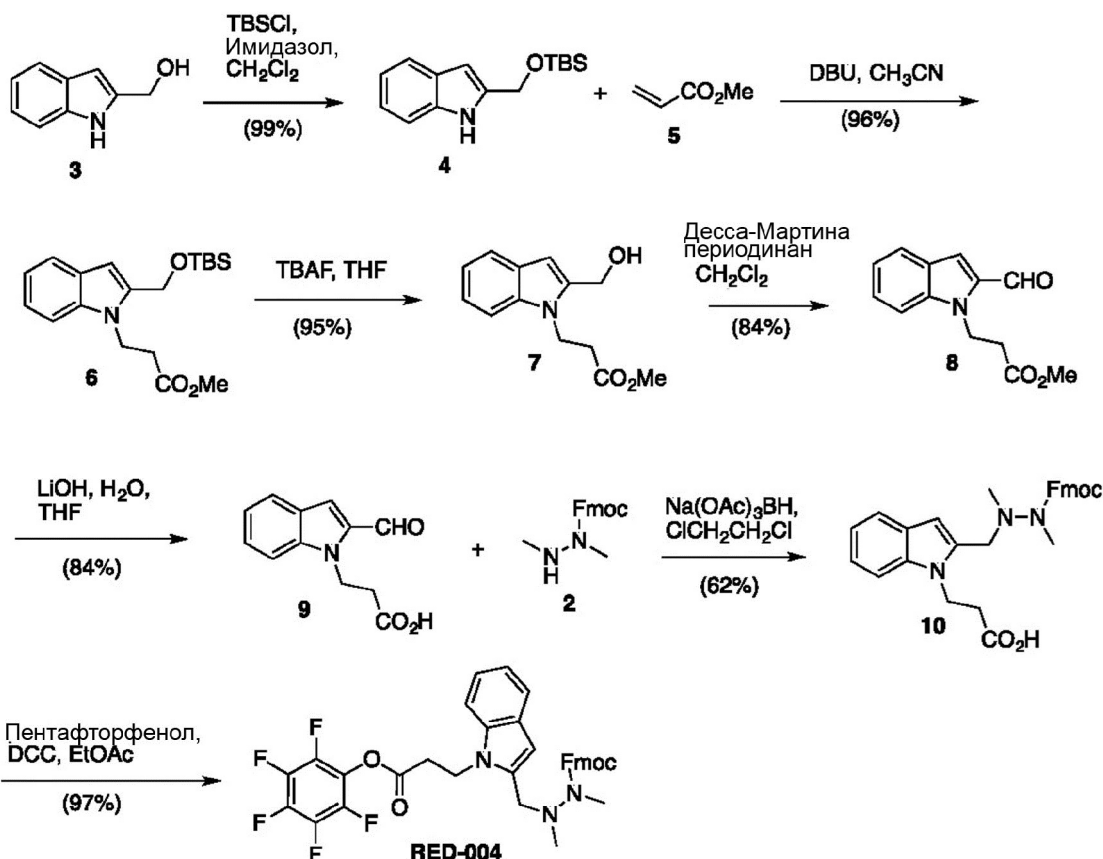


(9H-Флуорен-9-ил)метил 1,2-диметилгидразина-1-карбоксилат (2).

MeNHNHMe·2HCl (1) (5,0 г, 37,6 ммоль) растворяли в CH₃CN (80 мл). Добавляли Et₃N

(22 мл, 158 ммоль) и сформировавшийся осадок удаляли фильтрованием. К оставшемуся раствору MeNHNHMe, добавляли раствор FmocCl (0,49 г, 18,9 ммоль, 0,5 экв.) по каплям в течение 2,5 часов при -20°C. Реакционные смеси затем разбавляли EtOAc, промывали H₂O, насыщенным солевым раствором, высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали при пониженном давлении. Остаток очищали с помощью флэш-хроматографии на силикагеле (гексаны:EtOAc = 3:2) с получением 3,6 г (34%) соединения 2.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,75-7,37 (m, 8 H), 4,48 (br s, 2H), 4,27 (t, J = 6,0 Hz, 1H), 3,05 (s, 3H), 2,55 (br s, 3H).



2-(((трет-Бутилдиметилсилил)окси)метил)-1H-индол (4)

В высушенную в печи колбу загружали индол-2-метанол, 3, (1,581 г, 10,74 ммоль), TBSCl (1,789 г, 11,87 ммоль) и имидазол (2,197 г, 32,27 ммоль) и данную смесь суспендировали в CH₂Cl₂ (40 мл, безводный). Через 16 часов, реакционные смеси концентрировали до оранжевого остатка. Неочищенные смеси помещали в Et₂O (50 мл), промывали водным AcOH (5% v/v, 3 x 50 мл) и насыщенным солевым раствором (25 мл). Объединенные органических слои высушивали над Na₂SO₄ и концентрировали с получением 2,789 г (99%) соединения 4 в виде кристаллического твердого вещества, которое применяли без дополнительной очистки.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8,29 (s, 1H), 7,57 (d, J = 7,7 Hz, 1H), 7,37 (dd, J = 8,1, 0,6 Hz, 1H), 7,19-7,14 (m, 1H), 7,12-7,07 (m, 1H), 6,32 (d, J = 1,0 Hz, 1H), 4,89 (s, 2H), 0,95 (s, 9H), 0,12 (s, 6H).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 138,3, 136,0, 128,6, 121,7, 120,5, 119,8, 110,9, 99,0, 59,4, 26,1, 18,5, -5,2.

HRMS (ESI) Рассчитано для $C_{15}H_{24}NOSi$ $[M+H]^+$: 262,1627; получено: 262,1625.

Метил-3-(2-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)-1H-индол-1-ил)пропаноат (6)

К раствору индола 4 (2,789 мкг, 10,67 ммоль) в CH_3CN (25 мл) добавляли

5 метилакрилат, 5, (4,80 мл, 53,3 ммоль), а затем 1,8-дизабицикло[5,4,0]ундец-7-ен (800 мкл, 5,35 ммоль) и полученные смеси нагревали с обратным холодильником. Через 18 часов, раствор охлаждали, концентрировали до оранжевого масла, которое очищали хроматографией на силикагеле (9:1 гексаны:EtOAc) для получения 3,543 г (96%) соединения 6 в виде бесцветного масла.

10 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,58 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,34 (d, J = 8,2 Hz, 1H), 7,23-7,18 (m, 1H), 7,12-7,07 (m, 1H), 6,38 (s, 1H), 4,84 (s, 2H), 4,54-4,49 (m, 2H), 2,89-2,84 (m, 2H), 0,91 (s, 9H), 0,10 (s, 6H).

15 ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 172,0, 138,5, 137,1, 127,7, 122,0, 121,0, 119,8, 109,3, 101,8, 58,2, 51,9, 39,5, 34,6, 26,0, 18,4, -5,2.

HRMS (ESI) Рассчитано для $C_{19}H_{30}NO_3Si$ $[M+H]^+$: 348,1995; получено: 348,1996.

Метил 3-(2-(гидроксиметил)-1H-индол-1-ил)пропаноат (7)

К раствору соединения 6 (1,283 г, 3,692 ммоль) в THF (20 мл) при 0°C добавляли 1,0 М раствор тетрабутиламмония фторида в THF (3,90 мл, 3,90 ммоль). Через 15 минут, 20 реакционные смеси разбавляли Et_2O (20 мл) и промывали $NaHCO_3$ (насыщ. водн., 3×20 мл) и концентрировали до бледно-зеленого масла. Масло очищали с помощью хроматографии на силикагеле (2:1 гексаны:EtOAc) для получения 822 мг (95%) соединения 7 в виде белого кристаллического вещества.

25 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7,60 (d, J = 7,8 Hz, 1H), 7,34 (dd, J = 8,2, 0,4 Hz, 1H), 7,27-7,23 (m, 1H), 7,16-7,11 (m, 1H), 6,44 (s, 1H), 4,77 (s, 2H), 4,49 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 3,66 (s, 3H), 2,87 (t, J = 7,3 Hz, 2H), 2,64 (s, 1H).

30 ^{13}C NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 172,3, 138,5, 137,0, 127,6, 122,2, 121,1, 119,9, 109,3, 102,3, 57,1, 52,0, 39,1, 34,3.

HRMS (ESI) Рассчитано для $C_{13}H_{15}NNaO_3$ $[M+Na]^+$: 256,0950; получено: 256,0946.

Метил 3-(2-формил-1H-индол-1-ил)пропаноат (8)

35 Периодинан Десса-Мартина (5,195 г, 12,25 ммоль) суспендировали в смеси CH_2Cl_2 (20 мл) и пиридина (2,70 мл, 33,5 ммоль). Через 5 мин, полученную белую суспензию переносили в раствор метил-3-(2-(гидроксиметил)-1H-индол-1-ил)пропаноата (7; 2,611 г, 11,19 ммоль) в CH_2Cl_2 (10 мл), и получали красно-коричневую суспензию. Через 1 час, реакцию тушили тиосульфатом натрия (10% водный раствор, 5 мл) и $NaHCO_3$ (насыщенный водный раствор, 5 мл). Водный слой экстрагировали CH_2Cl_2 (3×20 мл); 40 объединенные экстракты высушивали над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали до коричневого масла. Очистка хроматографией на силикагеле (5-50% EtOAc в гексанах) давала выход в 2,165 г (84%) соединения 8 в виде бесцветного масла.

45 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9,87 (s, 1H), 7,73 (dt, J = 8,1, 1,0 Hz, 1H), 7,51 (dd, J = 8,6, 0,9 Hz, 1H), 7,45-7,40 (m, 1H), 7,29 (d, J = 0,9 Hz, 1H), 7,18 (ddd, J = 8,0, 6,9, 1,0 Hz, 1H), 4,84 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 3,62 (s, 3H), 2,83 (t, J = 7,2 Hz, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 182,52, 171,75, 140,12, 135,10, 127,20, 126,39, 123,46, 121,18, 118,55, 110,62, 51,83, 40,56, 34,97.

HRMS (ESI) Рассчитано для $C_{13}H_{13}NO_3Na$ $[M+Na]^+$: 254,0793; получено: 254,0786.

3-(2-Формил-1H-индол-1-ил)пропионовая кислота (9)

К раствору индола 8 (2,369 г, 10,24 ммоль), растворенному в диоксане (100 мл) добавляли LiOH (4 М водный раствор, 7,68 мл, 30,73 ммоль). В течение нескольких часов постепенно формировался обильный белый осадок. Через 21 час, HCl (1 М водный раствор, 30 мл) добавляли по каплям с получением раствора с pH = 4. Раствор концентрировали и полученное бледно-коричневое масло растворяли в EtOAc (50 мл) и промывали водой (2×50 мл) и насыщенным соевым раствором (20 мл). Органический слой высушивали над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали до оранжевого твердого вещества. Очищали хроматографией на силикагеле (10-50% EtOAc в гексанах с 0,1% уксусной кислотой) с получением 1,994 г (84%) соединения 9 в виде бледно-желтого твердого вещества.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 9,89 (s, 1H), 7,76 (dt, J = 8,1, 0,9 Hz, 1H), 7,53 (dd, J = 8,6, 0,9 Hz, 1H), 7,48 – 7,43 (m, 1H), 7,33 (d, J = 0,8 Hz, 1H), 7,21 (ddd, J = 8,0, 6,9, 1,0 Hz, 1H), 4,85 (t, J = 7,2 Hz, 2H), 2,91 (t, J = 7,2 Hz, 2H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 182,65, 176,96, 140,12, 135,02, 127,33, 126,42, 123,53, 121,27, 118,76, 110,55, 40,19, 34,82.

HRMS (ESI) Рассчитано для $C_{12}H_{10}NO_3[M-H]^-$: 216,0666; получено: 216,0665.

3-(2-((2-(((9H-Флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-1,2-диметилгидразинил)метил)-1H-индол-1-ил)пропионовая кислота (10)

К раствору соединения 9 (1,193 г, 5,492 ммоль) и (9H-флуорен-9-ил)метил 1,2-диметилгидразинакарбоксилата, 2, (2,147 г, 7,604 ммоль) в 1,2-дихлопентане (безводного, 25 мл) добавляли натрия триацетоксиборогидрид (1,273 г, 6,006 ммоль). Полученную желтую суспензию перемешивали в течение 2-х часов и затем тушили $NaHCO_3$ (насыщенным водным раствором, 10 мл), затем добавляли HCl (1 М водный раствор) до pH 4. Органический слой отделяли и водный слой экстрагировали CH_2Cl_2 (5×10 мл).

Объединенные органические экстракты высушивали над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали до оранжевого масла. Очищали хроматографией на силикагеле C18 (20-90% CH_3CN в воде) с получением 1,656 г (62%) соединения 10 в виде воскообразного розового твердого вещества.

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7,76 (d, J = 7,4 Hz, 2H), 7,70-7,47 (br m, 3H), 7,42-7,16 (br m, 6H), 7,12-7,05 (m, 1H), 6,37 (s, 0,6H), 6,05 (s, 0,4H), 4,75-4,30 (br m, 4H), 4,23 (m, 1H), 4,10 (br s, 1H), 3,55 (br d, 1H), 3,11-2,69 (m, 5H), 2,57 (br s, 2H), 2,09 (br s, 1H).

^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 174,90, 155,65, 143,81, 141,42, 136,98, 134,64, 127,75, 127,48, 127,12, 124,92, 122,00, 120,73, 120,01, 119,75, 109,19, 103,74, 67,33, 66,80, 51,39, 47,30, 39,58, 39,32, 35,23, 32,10.

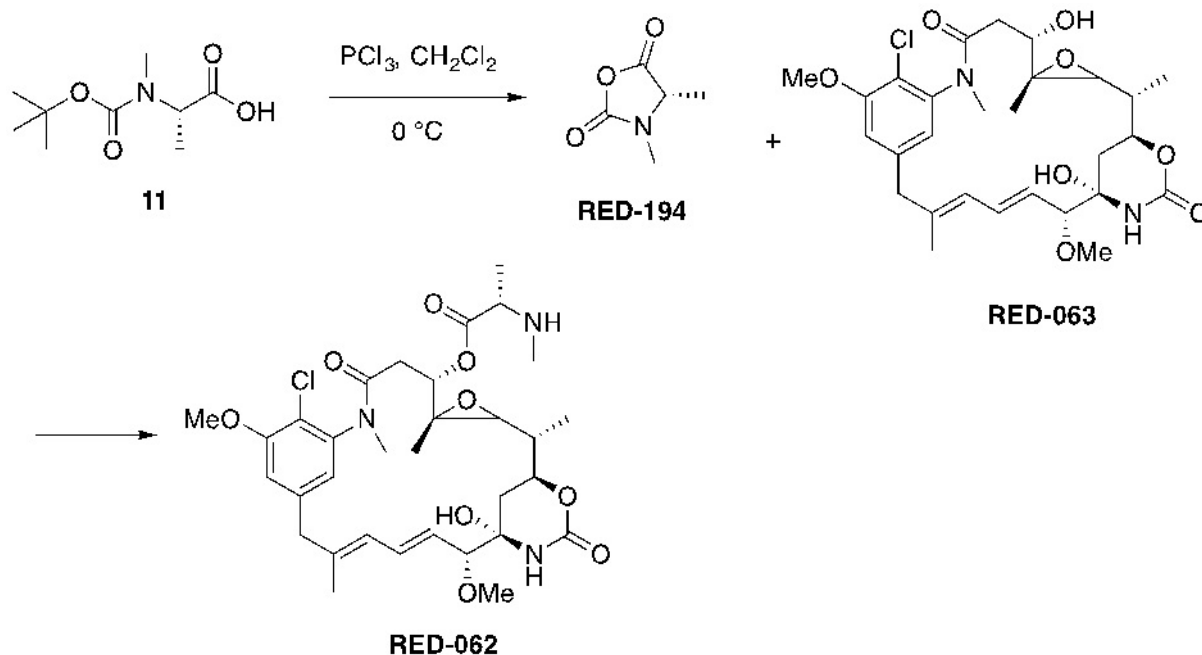
HRMS (ESI) Рассчитано для $C_{29}H_{30}N_3O_4[M+H]^+$: 484,2236; получено: 484,2222.

(9H-Флуорен-9-ил)метил 1,2-диметил-2-((1-(3-оксо-3-(перфторфенокси)пропил)-1H-индол-2-ил)метил)гидразина-1-карбоксилат (RED-004).

Соединение 10 (5,006 г, 10,4 ммоль), добавляли к высушенной 100 мл 2-горлой круглодонной колбе, содержавшей высушенный магнит для магнитной мешалки. Безводный EtOAc, 40 мл, добавляли с помощью шприца и раствор перемешивали при 20°C в течение 5 мин, получая прозрачный, бледный, желто-зеленый раствор. Раствор

охлаждали до 0°C в бане с ледяной водой и по каплям добавляли пентафторфенол (2098,8 мг, 11,4 ммоль) в 3 мл безводного EtOAc. Раствор перемешивали при 0°C в течение 5 мин. DCC (2348,0 мг, 11,4 ммоль) в 7 мл безводного EtOAc, добавляли по каплям, медленно с помощью шприца. Раствор перемешивали при 0°C в течение 5 мин, затем удаляли из бани и нагревали до 20°C. Реакционную смесь перемешивали в течение 2-х часов, охлаждали до 0°C и фильтровали с получением прозрачного, бледного, желто-зеленого раствора. Раствор разбавляли 50 мл EtOAc и промывали 2×25 мл H₂O, 1 × 25 мл 5 М NaCl и высушивали над Na₂SO₄. Раствор фильтровали, упаривали и сушили в высоком вакууме, получая 6552,5 мг (97%) RED-004 в виде зеленовато-белого твердого вещества.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,80 (d, J = 7,2 Hz, 2H), 7,58 (m, 3H), 7,45-7,22 (m, 6H), 7,14 (dd(appt. t), J = 7,4 Hz, 1H), 6,42 & 6,10 (2 br s, 1H), 4,74 (dd(appt. t), J = 5,4 Hz, 2H), 3,65-3,18 (br, 3H), 3,08 & 2,65 (2 br s, 3H), 2,88 (s, 3H).



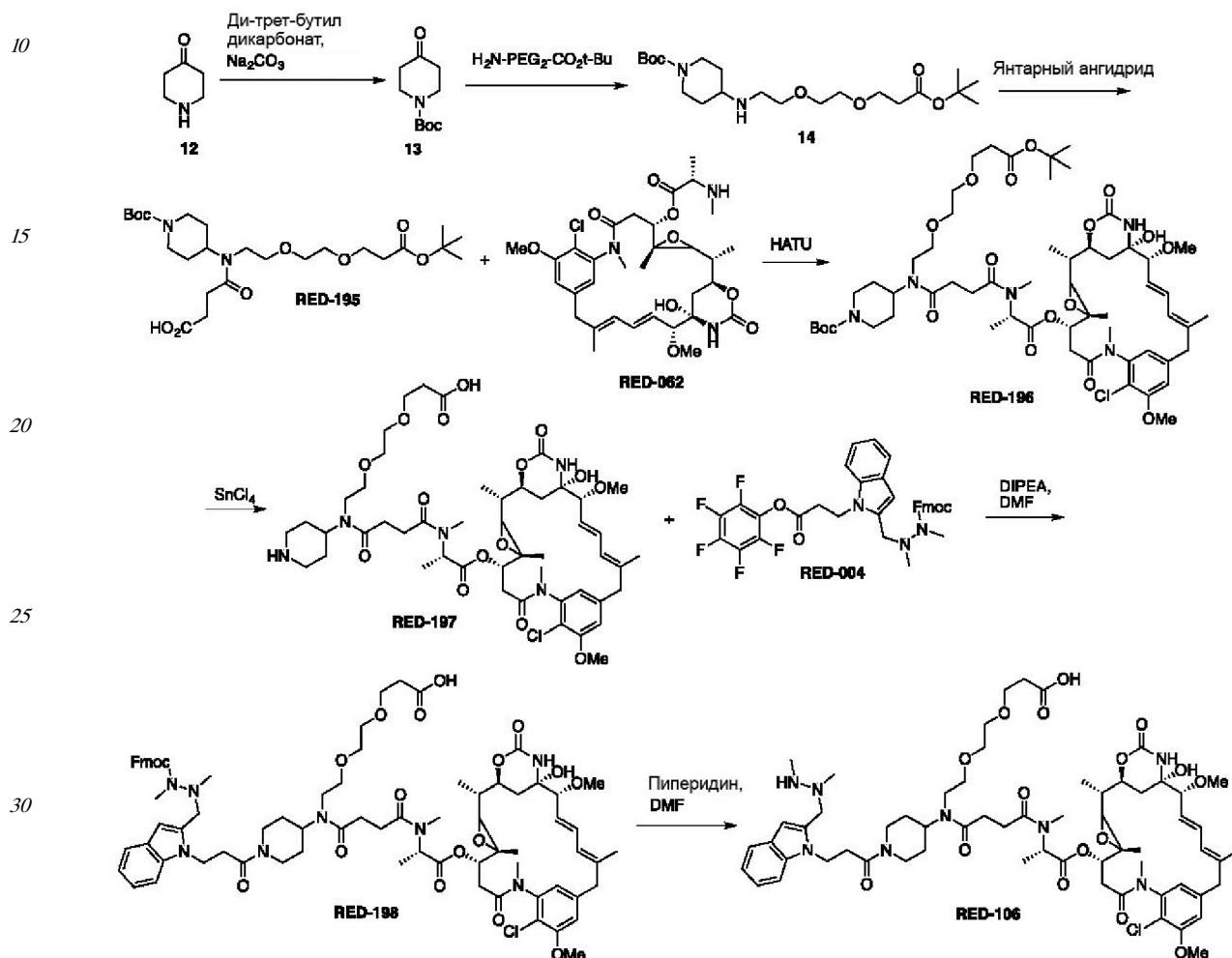
(S)-3,4-диметил-оксазолидин-2,5-дион (RED-194).

К раствору N-Вос-Ala-OH (11) (0,005 моль) в метиленхлориде (25 мл) при 0°C, добавляли под азотом 1,2 эквивалента трихлорида фосфора. Реакционные смеси перемешивали в течение 2-х часов при 0°C, растворитель удаляли при пониженном давлении и остаток промывали тетрачлоруглеродом (3×20 мл), чтобы получить RED-194.

(1⁴S,1⁶S,3²R,3³R,2R,4S,10E,12E,14R)-8⁶-хлор-1⁴-гидрокси-8⁵,14-диметокси-3³,2,7,10-тетраметил-1²,6-диоксо-7-аза-1(6,4)-оксазинан-3(2,3)-оксиран-8(1,3)-бензолациклотетрадекафан-10,12-диен-4-ил метил-L-аланинат (RED-062).

Майтансинол (RED-063) (4,53 г, 8 ммоль) растворяли в безводном DMF (11 мл) с получением прозрачного, бесцветного раствора, который переносили в высушенную двугорлую круглодонную колбу под N₂. Добавляли безводный THF (44 мл), а затем DIPEA (8,4 мл, 48 ммоль). Добавляли раствор RED-194 (5,4 г, 42 ммоль) с получением прозрачного, бесцветного раствора. Осушенный, мелко измельченный Zn(OTf)₂ (8,7 г, 24 ммоль) добавляли к перемешиваемому раствору и реакционные смеси перемешивали при 20°C в течение 2-х дней. Реакцию тушили добавлением к раствору 70 мл 1,2 М

NaHCO₃ и 70 мл EtOAc. При перемешивании полученные смеси давали белый осадок, который удаляли фильтрованием. Фильтрат экстрагировали EtOAc (5 x 70 мл), высушивали (Na₂SO₄) и концентрировали с получением красновато-оранжевого масла. Данное масло растворяли в CH₂Cl₂ (15 мл) и очищали, применяя систему Biotage (адсорбированные на 2х Biotage Ultra 10 г образцы, очистка на 100 г картриджа 2х Biotage Ultra с 0-20% градиентом MeOH в CH₂Cl₂) для получения 4,38 г RED-062 в виде бледно-персикового твердого вещества (95% de, 93,7% желаемого диастереомера).



Трет-бутил 4-оксопиперидина-1-карбоксилат (13).

В 100-мл круглодонную колбу, содержащую магнит для магнитной мешалки, добавляли пиперидин-4-он гидрохлорид моногидрат (12) (1,53 г, 10 ммоль), ди-трет-бутил дикарбонат (2,39 г, 11 ммоль), карбонат натрия (1,22 г, 11,5 ммоль), диоксан (10 мл) и воду (1 мл). Реакционные смеси перемешивали при комнатной температуре в течение 1-го часа. Смеси разбавляли вода (100 мл) и экстрагировали EtOAc (3 x 100 мл). Объединенные органических слои промывали насыщенным солевым раствором, высушивали над Na₂SO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Полученный материал высушивали при пониженном давлении для получения 1,74 г (87%) соединения 13 в виде белого твердого вещества.

¹H NMR (CDCl₃) δ 3,73 (t, 4H, J = 6,0), 2,46 (t, 4H, J = 6,0), 1,51 (s, 9H).

MS (ESI) m/z: [M+H]⁺ Рассчитано для C₁₀H₁₈NO₃ 200,3; Получено 200,2.

Трет-бутил-4-((2-(2-(3-(трет-бутоксипропокси)этокси)этил)амино)пиперидина-

1-карбоксилат (14).

В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнит для магнитной мешалки, добавляли соединение 13 (399 мг, 2 ммоль), $\text{H}_2\text{N-PEG}_2\text{-COOt-Bu}$ (550 мг, 2,4 ммоль), 4 Å молекулярный сита (активированный порошок, 200 мг) и 1,2-дихлопентан (5 мл). Смеси перемешивали в течение 1-го часа при комнатной температуре. К реакционным смесям добавляли натрия триацетоксиборогидрид (845 мг, 4 ммоль). Смеси перемешивали в течение 3-х дней при комнатной температуре. Полученные смеси распределялись между EtOAc и насыщенным водным NaHCO_3 . Органический слой промывали насыщенным соевым раствором, высушивали над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении, чтобы получить 850 мг соединения 14 в виде вязкого масла.

MS (ESI) m/z: $[\text{M}+\text{H}]^+$ Рассчитано для $\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_6$ 417,3; Получено 417,2.

13-(1-(трет-бутоксикарбонил)пиперидин-4-ил)-2,2-диметил-4,14-диоксо-3,7,10-триокса-13-азагептадекан-17-овой кислоты (RED-195).

В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнит для магнитной мешалки, добавляли соединение 14 (220 мг, 0,5 ммоль), янтарный ангидрид (55 мг, 0,55 ммоль), 4-(диметиламино)пиридин (5 мг, 0,04 ммоль) и дихлорметан (3 мл). Смеси перемешивали в течение 24-х часов при комнатной температуре. Реакционные смеси частично очищали с помощью флэш-хроматографии (элюировали 50-100% EtOAc/гексаны) для получения 117 мг соединения RED-195 в виде прозрачного масла, которое применяли в дальнейшем без дополнительной характеристики.

MS (ESI) m/z: $[\text{M}+\text{H}]^+$ Рассчитано для $\text{C}_{25}\text{H}_{45}\text{N}_2\text{O}_9$ 517,6; Получено 517,5.

17-(трет-бутил)-1-((1⁴S,1⁶S,3³S,2R,4S,10E,12E,14R)-8⁶-хлор-1⁴-гидрокси-8⁵,14-диметокси-3³,2,7,10-тетраметил-1²,6-диоксо-7-аза-1(6,4)-оксазинан-3(2,3)-оксиран-8(1,3)-бензолациклотетрадекафан-10,12-диен-4-ил)-(2S)-8-(1-(трет-бутоксикарбонил)пиперидин-4-ил)-2,3-диметил-4,7-диоксо-11,14-диокса-3,8-диазагептадекандиоат (RED-196).

В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнит для магнитной мешалки, добавляли RED-195 (445 мг, 0,86 ммоль), NATU (320 мг, 0,84 ммоль), DIPEA (311 мг, 2,42 ммоль) и дихлорметан (6 мл). Реакционные смеси перемешивали при комнатной температуре в течение 5-ти минут. Полученный раствор добавляли к RED-062 (516 мг, 0,79 ммоль) и реакционные смеси перемешивали в течение дополнительных 30 минут при комнатной температуре. Реакционные смеси непосредственно очищали с помощью флэш-хроматографии (элюировали 3-10% MeOH/DCM) с получением 820 мг (90%) RED-196 в виде светло-коричневого твердого вещества.

MS (ESI) m/z: $[\text{M}+\text{H}]^+$ Рассчитано для $\text{C}_{57}\text{H}_{87}\text{ClN}_5\text{O}_{17}$ 1148,6; Получено 1148,8.

(2S)-1-(((1⁴S,1⁶S,3³S,2R,4S,10E,12E,14R)-8⁶-хлор-1⁴-гидрокси-8⁵,14-диметокси-3³,2,7,10-тетраметил-1²,6-диоксо-7-аза-1(6,4)-оксазинан-3(2,3)-оксиран-8(1,3)-бензолациклотетрадекафан-10,12-диен-4-ил)окси)-2,3-диметил-1,4,7-триоксо-8-(пиперидин-4-ил)-11,14-диокса-3,8-диазагептадекан-17-овая кислота (RED-197).

В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнит для магнитной мешалки, добавляли RED-196 (31 мг, 0,027 ммоль) и дихлорметан (1 мл). Раствор охлаждали до °C и добавляли тетрахлорид олова (IV) (1,0 М раствор в дихлорметане, 0,3 мл, 0,3 ммоль). Реакционные смеси перемешивали в течение 1-го часа при 0°C.

Реакционные смеси непосредственно очищали с помощью C18 флэш-хроматографии (элюировали 5-100% MeCN/вода) для получения 16 мг (60%) RED-197 в виде белого твердого вещества (16 мг, 60%-ный выход).

MS (ESI) m/z: $[M+H]^+$ Рассчитано для $C_{48}H_{71}ClN_5O_{15}$ 992,5; Получено 992,6.

(2S)-8-(1-(3-(2-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)-1,2-диметилгидразинил)метил)-1H-индол-1-ил)пропаноил)пиперидин-4-ил)-1-(((1⁴S,1⁶S,3³S,2R,4S,10E,12E,14R)-8⁶-хлор-1⁴-гидрокси-8⁵,14-диметокси-3³,2,7,10-тетраметил-1²,6-диоксо-7-аза-1(6,4)-оксазинан-3(2,3)-оксиран-8(1,3)-бензолациклотетрадекафан-10,12-диен-4-ил)окси)-2,3-диметил-1,4,7-триоксо-11,14-диокса-3,8-диазагептадекан-17-овая кислота (RED-198).

В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнит для магнитной мешалки, добавляли RED-197 (16 мг, 0,016 ммоль), (9H-флуорен-9-ил)метил 1,2-диметил-2-(((1-(3-оксо-3-(перфторфенокси)пропил)-1H-индол-2-ил)метил)гидразина-1-карбоксилат (12) (13 мг, 0,02 ммоль), DIPEA (8 мкл, 0,05 ммоль) и DMF (1 мл). Раствор перемешивали в течение 18-ти часов при комнатной температуре. Реакционные смеси непосредственно очищали с помощью C18 флэш-хроматографии (элюировали 5-100% MeCN/вода) для получения 18 мг (77%) RED-198 в виде белого твердого вещества.

MS (ESI) m/z: $[M+H]^+$ Рассчитано для $C_{77}H_{98}ClN_8O_{18}$ 1457,7; Получено 1457,9.

(2S)-1-(((1⁴S,1⁶S,3³S,2R,4S,10E,12E,14R)-8⁶-хлор-1⁴-гидрокси-8⁵,14-диметокси-3³,2,7,10-тетраметил-1²,6-диоксо-7-аза-1(6,4)-оксазинан-3(2,3)-оксиран-8(1,3)-бензолациклотетрадекафан-10,12-диен-4-ил)окси)-8-(1-(3-(2-(((1,2-диметилгидразинил)метил)-1H-индол-1-ил)пропаноил)пиперидин-4-ил)-2,3-диметил-1,4,7-триоксо-11,14-диокса-3,8-диазагептадекан-17-овая кислота (RED-106).

В высушенный сцинтилляционный флакон, содержащий магнит для магнитной мешалки, добавляли RED-197 (18 мг, 0,012 ммоль), пиперидин (20 мкл, 0,02 ммоль) и DMF (1 мл). Раствор перемешивали в течение 20-ти минут при комнатной температуре. Реакционные смеси непосредственно очищали с помощью C18 флэш-хроматографии (элюировали 1-60% MeCN/вода) для получения 15 мг (98%) соединения RED-106 в виде белого твердого вещества.

MS (ESI) m/z: $[M+H]^+$ Рассчитано для $C_{62}H_{88}ClN_8O_{16}$ 1235,6; Получено 1236,0.

Результаты и обсуждение

Получение и начальная характеристика анти-CD22 ADC

Примененное анти-CD22 антитело (CAT-02) представляло собой гуманизированный вариант антитела RFB4. Было создано меченое на C-конце анти-CD22 антитело, с помощью клональной клеточной линии GPEx® с титрами биореактора 1,6 г/л и 97% преобразования цистеина в формилглицин. NIPS-4AP-майтансиновую соединенную линкером нагрузку синтезировали (описано выше) и конъюгировали с альдегид-меченым антителом. Полученный ADC характеризовали (фиг. 11) гель-фильтрационной хроматографией для оценки процента мономера (99,2%) и хроматографией с гидрофобным взаимодействием (HIC) и хроматографией с обращенной фазой (PLRP) для оценки отношения лекарственного средства к антителу (DAR), которое было равно 1,8. ADC сравнивали с анти-CD22 антителом дикого типа (немеченым) в терминах сродства для белка CD22 человека и интернализации на CD22+ клетках способом ELISA (фиг. 12) и с помощью проточной цитометрии (фиг. 13), соответственно. По результатам обоих функциональных определений, ADC работало так же хорошо, как и антитело дикого типа, следовательно, конъюгация не имела никакого эффекта на данные

параметры.

Анти-CD22 ADC не представляет собой субстрат для MDR1 и не стимулирует нецелевой или неспецифический цитолиз

Активности анти-CD22 ADC тестировали *in vitro* против линии опухолевых клеток Ramos и WSU-DLCL2 HNL. Активность сравнивали с активностью свободного майтансина и родственного ADC, созданного с CAT-02 анти-CD22 антителом, конъюгированным с майтансином через расщепляемый валин-цитруллиновый дипептидный линкер. Оба ADCs показали активность в субнанолярном диапазоне против клеток Ramos и WSU-DLCL2 дикого типа (фиг. 14, панель А и панель С). В вариантах данных клеток, сконструированных для экспрессии ксенобиотического эффлюксного насоса, MDR1, только анти-CD22 ADC настоящего раскрытия сохраняли свои первоначальные активности (фиг. 14, панель В и панель D). Напротив, свободный майтансин был в ~10 раз менее эффективен, и ADC, несущие расщепляемый майтансин, были в основном лишены активности. В контрольных экспериментах, совместная обработка клеток WSU-DLCL2 циклоспорином, ингибитором MDR1, не оказывала влияния на клетки дикого типа, но восстанавливала исходные активности свободного майтансина и расщепляемого ADC в клетках MDR1+ (фиг. 14, панель Е и панель F). Вместе, данные результаты указывают на то, что активный метаболит анти-CD22 ADC настоящего раскрытия не представляет собой субстрат высвобождения MDR1. В связанных *in vitro* исследованиях цитотоксичности, анти-CD22 ADC настоящего раскрытия не оказывали влияния на антиген-отрицательную линию клеток, NCI-N87 (фиг. 15), показывая, что она не имела нецелевой активности в течение 5-дневного периода культивирования клеток. Кроме того, основанные на анти-HER2 ADC, конъюгированные с HIPS-4AP-майтансиновой линкерной нагрузкой, не опосредовали неспецифический цитолиз антиген-отрицательных клеток при совместном культивировании с антиген-положительными клетками (фиг. 16), подразумевая, что активный метаболит анти-CD22 ADC настоящего раскрытия, который будет таким же, как конъюгат анти-HER2 ADC, также не будет опосредовать неспецифический цитолиз.

Анти-CD22 ADC было эффективно против NHL в модели ксенотрансплантатов

Эффективность *in vivo* анти-CD22 ADC оценивали против модели ксенотрансплантатов WSU-DLCL2 и Ramos (фиг. 17), которые экспрессировали относительно более высокие и относительно более низкие количества CD22, соответственно (фиг. 18). В исследование с единственной дозой, мышам, которые несли опухоли WSU-DLCL2, вводили 10 мг/кг анти-CD22 ADC или контрольный растворитель. Введение инициировали, когда опухоли достигали в среднем 118 мм³. Из всех животных, который получали ADC, 25% (2 из 8) имели частичный ответ, с опухолями, которые регрессировали до 4 мм³ на день 31. Группы, обработанные анти-CD22 ADC и контрольным растворителем, имели средний объем опухолей, равный 415 и 1783 мм³, соответственно, на день 31. Затем, в многодозовом исследовании, мышам, несших ксенотрансплантаты WSU-DLCL2, обрабатывали 10 мг/кг анти-CD22 ADC или контрольным растворителем каждые четыре дня, суммарно четыре дозы. Введение инициировали, когда опухоли достигали в среднем 262 мм³. Из всех животных, который получали ADC, 75% (6 из 8) показали полный ответ, с 38% из них (3 из 8) устойчивый до конца исследования (день 59), 43 день после введения последней дозы. Напротив, группа с контрольным растворителем достигала среднего объема опухоли, равного 2191 мм³ на день 17. Наконец, в многодозовом исследовании, мышам, которые несли ксенотрансплантаты Ramos, обрабатывали 5, или 10 мг/кг анти-CD22 ADC или

контрольным растворителем каждые четыре дня, суммарно четыре дозы. Введение инициировали, когда опухоли достигали в среднем 246 мм³. Как и ожидалось, эффект дозы наблюдали в группах, получавших дозу 5 или 10 мг/кг, демонстрировавших 63% или 87% задержку росту опухоли, соответственно. Конкретно, медианные времена до конечной точки были равны 12, 19 и 22 дням для группы с контрольным растворителем, группы, получавшей дозу 5 и 10 мг/кг, соответственно. Во всех трех исследованиях, не наблюдали никакого влияния на массу тела мышей в группах, получавших анти-CD22 ADC (фиг. 19).

Анти-CD22 ADC хорошо переносится крысами и яванскими макаками вплоть до 60 мг/кг

Анти-CD22 ADC не связывался с CD22 грызунов, однако, введение ADC в данных животных обеспечило информацию в отношении к нецелевой токсичности и безопасности линкера-нагрузки. Как уже упоминалось выше, в исследованиях с мышинными ксенотрансплантатами не наблюдали никакого влияния введения на массу тела или клинические показатели. В исследовании токсичности на экспериментальных крысах (фиг. 20), животным (5 на группу) вводили единственную внутривенную дозу анти-CD22 ADC в 6, 20, 40 или 60 мг/кг и наблюдали их 12 дней после введения дозы. Все животные выжили до конца исследования. Животные, которым вводили дозу, равную 60 мг/кг, претерпевали 10% снижение в массе тела по сравнению с группой, получавшей контрольный растворитель. Изменения в клинической химии соответствовали гепатобилиарной травме, от минимальной до умеренной, возникавшей на день 5 у животных, получавших >40 мг/кг, и включали повышение активности аланинаминотрансферазы (ALT), аспартат-трансаминазы (AST) и щелочной фосфатазы (ALP). Большинство изменений обращались на день 12. В отношении гематологии, уменьшение количества тромбоцитов от умеренного до заметного произошло на день 5 у животных, получавших >40 мг/кг, и было полностью обращено на день 12. Изменения, соответствовавшие воспалению, проявлялись на день 5 и 12 у животных, получавших >40 мг/кг, и включали от слабого до умеренного повышение количества нейтрофилов и моноцитов, слабое повышение концентрации глобулина и снижение отношения альбумин:глобулин.

Анти-CD22 ADC связывалось с CD22 яванских макак (фиг. 21) и имело сходный профиль перекрестной тканевой реактивности у обезьян по сравнению с человеком (фиг. 22). Следовательно, яванские макаки представляет собой подходящую модель, для тестирования как целевой, и нецелевой токсичности данных ADC. В исследовании с экспериментальными повторными дозами, обезьянам (2/пол/группу) давали 10, 30 или 60 мг/кг анти-CD22 ADC один раз в три недели, суммарно две дозы с последующим 21-дневным периодом наблюдения. Все животные выжили к моменту окончания исследования. Не произошло никаких связанных с введением анти-CD22 ADC изменений в клинических показателях, массах тела или потреблении пищи. Клинические патологические изменения имели место в основном у животных, получавших ≥ 30 мг/кг, и согласовывались с минимальным повреждением печени, повышенным потреблением и/или секвестрацией тромбоцитов, и воспалением (фиг. 23). Данные изменения были схожими при 30 и 60 мг/кг и после первой и второй дозы, и были такой величины, от которой не ожидают, что она будет связана с микроскопическими изменениями или клиническими эффектами. Изменения, соответствовавшие минимальному повреждению печени у животных, получавших ≥ 30 мг/кг, заключались в повышении активностей ALT, AST и ALP, которые частично обращались к дням 21 и 42. Снижение в количестве тромбоцитов от слабого до умеренного, наблюдаемое в пределах недели

после введения, в основном обращалось к дням 21 и 42. Изменения, соответствующие воспалению, состояли из от минимального умеренного повышения количества нейтрофилов и моноцитов, от слабого до умеренного повышения концентрации глобулинов и минимального снижения концентрации альбуминов.

5 Введение анти-CD22 ADC приводило к истощению В-клеток у яванского макака
 С целью оценить фармакодинамические эффекты анти-CD22 ADC в видах способных к кросс-реакции, популяции периферических моноклеарных клеток крови исследовали в образцах, отобранных из яванских макаков, участвовавших в исследовании токсичности с повторными дозами. Конкретно, проточную цитометрию применяли для детекции
 10 отношения В-клеток (CD20+), Т-клеток (CD3+) и НК-клеток (CD20-/CD3-), наблюдаемого у животных до введения дозы и на дни 7, 14, 28 и 35 (фиг. 5). До введения дозы анти-CD22 ADC-обработанным животным, В-клетки включали в среднем 11,6% от суммарных лимфоцитов; это значение упало в среднем до 3,8% на день 35, что представляет собой сокращение в среднем на 68% в измеряемой популяции В-клеток по сравнению с
 15 базовыми уровнями (фиг. 24). Истощение В-клеток было одинаковым во всех группах введения, от 10 до 60 мг/кг, показывая, что наименьшая доза была достаточной для получения эффекта. В то же время, клетки в обработанных контрольным растворителем животных и Т-клетки и НК-клетки (не показано) во всех группах в основном не изменились в течение лечения. Результаты указывают на то, что анти-CD22 ADC были
 20 способны избирательно опосредовать *in vivo* истощение CD22+ клеток у яванских макаков, не приводя к неблагоприятным нецелевым токсичностям.

Фармако- и токсикокинетика анти-CD22 ADC у мышей, крыс и яванских макаков
 Для того, чтобы оценить *in vivo* стабильность анти-CD22 ADC, проводили фармакокинетические (ПК) исследования на крысах. Концентрации суммарных антител,
 25 суммарных ADC и суммарных конъюгатов контролировали в периферической крови животных (3/группу) в течение 21-го дня после получения единственной дозы 3 мг/кг анти-CD22 ADC (таблица 2 и фиг. 25). Как показано на фиг. 10, в анализах суммарных ADC и суммарных конъюгатов применяли DAR-чувствительные и DAR-нечувствительные измерения, соответственно. Параметры ПК, полученные для всех
 30 трех аналитов, были похожими, показывая, что конъюгат был в значительной степени стабильным при циркуляции в кровотоке. Например, периоды полувыведения суммарных антител, суммарных ADC и суммарных конъюгатов были равны 9,48, 6,13 и 7,22 дням, соответственно.

Затем, концентрации анти-CD22 ADC аналитов измеряли с течением времени в
 35 периферической крови мышей из многодозовых исследований эффективности с Ramos, описанных выше. Целью этого анализа было определение суммарного уровня воздействия ADC, достигнутого при эффективной дозе в исследованиях с ксенотрансплантатом (фиг. 26). Для этого теста, напомним, что введение 10 мг/кг x 4 дозы в течении 22 дней приводило к 87%-ной задержке роста опухоли в модели Ramos
 40 и что введение 10 мг/кг x 4 дозы в течении 28 дней приводило к 75% животных, демонстрирующих полный ответ (не остается осязаемой опухоли) в модели WSU-DLCL2 1. Средняя площадь под кривой концентрация против времени от временной точки 0 до бесконечности (AUC_{0-inf}) для 10 мг/кг x 4 доз у мышей была равна 2530 ± 131 (S.D.) день · мг/мл.

45 Наконец, концентрации анти-CD22 ADC аналитов оценивали в токсикокинетических исследованиях образцов плазмы животных, получавших дозы в ранее описанных исследованиях токсичности у крыс и яванских макаков (фиг. 26). Данные анализы проводили для определения уровней воздействия суммарных ADC, достигнутых в дозах,

коррелировавших с наличием или отсутствием наблюдаемой токсичности. В отношении исследования на крысах, величины $C_{\max}$ и $AUC_{0-\infty}$ были, в общем, пропорциональны дозе. Среднее $AUC_{0-\infty}$ для дозы 60 мг/кг было равно 5201 ± 273 день · мкг/мл. В отношении исследования на обезьянах, величины $C_{\max}$ и $AUC_{0-\infty}$ были, в общем, пропорциональны дозе. Среднее $AUC_{0-\infty}$ для первой дозы 60 мг/кг было равно 6140 ± 667 день · мкг/мл.

Однако клиренс антитела, связанного с антигеном в модели яванских макак (не показано), был одинаковым среди всех групп введения. Это указывает на то, что низкая доза (10 мг/кг) была достаточной для насыщения опосредованных мишенью механизмов клиренса и, следовательно, опосредованный антигеном клиренс не оказал существенного влияния на результаты данного исследования. Это наблюдение согласуется с фармакодинамическим эффектом обработки анти-CD22 ADC на истощение В-клеток, степень которого была сходной у всех групп введения.

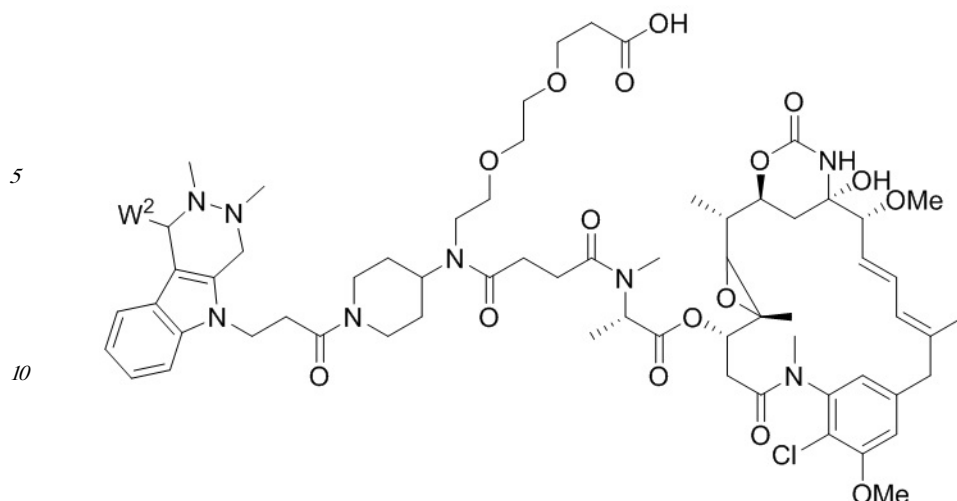
Выводы

Были получены ADC, нацеленные на CD22 и сайт-специфически конъюгированные с майтансиновой нагрузкой, которые были устойчивы к высвобождению MDR1-экспрессирующими клетками. ADC, имевшие DAR, равное от 1,8, продемонстрировали хорошие биофизические характеристики и опосредовали эффективность, начиная от значительной задержки роста опухоли (87%) до полного ответа *in vivo* в двух моделях ксенотрансплантатов NHL. Данная эффективность была достигнута на уровнях воздействия, значительно ниже тех, что связаны с токсичностью; действительно, при повторном введении дозы в исследовании токсичности на яванских макаках, не были замечены наблюдаемые неблагоприятные эффекты даже при самой высокой дозе, равной 60 мг/кг, показывая, что могут быть применены более высокие дозы. Анти-CD22 ADC обладает сочетанием эффективности и безопасности. В качестве дополнительного преимущества, ряд базовых компонентов, включая целевой антиген, родительское антитело и майтансин-основанную цитотоксическую нагрузку, были применены у людей и были хорошо изучены в отношении безопасности и токсичности. Основываясь на яванских макаках, которые представляют собой разумную модель для проектирования фармакокинетических профилей и профилей токсичности человека, результаты данных исследований указывают на то, что анти-CD22 ADC имеют терапевтическое применение для NHL-пациентов, таких как те, у которых развивается устойчивое заболевание в связи с усилением активности MDR1.

Хотя настоящее изобретение было описано со ссылкой на его конкретные воплощения, специалистам в данной области техники следует понимать, что могут быть сделаны различные изменения, и эквиваленты могут быть заменены, без отступления от истинного духа и объема изобретения. Кроме того, многие модификации могут быть выполнены для адаптации конкретной ситуации, материала, состава вещества, способа, стадии или стадий способа, к цели, духу и объему настоящего изобретения. Все такие модификации должны находиться в пределах объема прилагаемой формулы изобретения.

(57) Формула изобретения

1. Конъюгат, который включает, по меньшей мере, один модифицированный аминокислотный остаток с боковой цепью формулы (I):



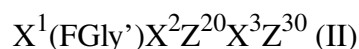
(I)

в которой

 W^2 представляет собой анти-CD22 антитело.

2. Конъюгат по п. 1, в котором анти-CD22 антитело связывается с эпитопом между аминокислотами от 1 до 847, между аминокислотами 1-759, между аминокислотами 1-751 или между аминокислотами 1-670 в аминокислотной последовательности CD22, изображенной на фиг. 8А-8С.

3. Конъюгат по п. 1, в котором анти-CD22 антитело включает последовательность формулы (II):



в которой

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I);

Z^{20} представляет собой остаток или пролина, или аланина;

Z^{30} представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту;

X^1 может присутствовать или отсутствовать, и, если присутствует, то может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что, если последовательность находится на N-конце конъюгата, то X^1 присутствует; и

X^2 и X^3 каждый независимо представляет собой любую аминокислоту.

4. Конъюгат по п. 3, в котором последовательность представляет собой L(FGly') TPSR.

5. Конъюгат по п. 3, в котором

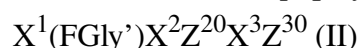
Z^{30} выбирают из R, K, H, A, G, L, V, I и P;

X^1 выбирают из L, M, S и V; и

X^2 и X^3 каждый независимо выбирают из S, T, A, V, G и C.

6. Конъюгат по п. 1, в котором модифицированный аминокислотный остаток расположен на C-конце константной области тяжелой цепи анти-CD22 антитела.

7. Конъюгат по п. 6, в котором константная область тяжелой цепи включает последовательность формулы (II):



в которой

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I);

Z^{20} представляет собой остаток или пролина, или аланина;

Z^{30} представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту;

X^1 может присутствовать или отсутствовать, и, если присутствует, то может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что, если последовательность находится на N-конце конъюгата, то X^1 присутствует; и

X^2 и X^3 каждый независимо представляет собой любую аминокислоту, и в котором последовательность представляет собой C-конец к аминокислотной последовательности SLSLSPG.

8. Конъюгат по п. 7, в котором константная область тяжелой цепи включает последовательность SPGSL(FGly')TPSRGS.

9. Конъюгат по п. 7, в котором

Z^{30} выбирают из R, K, H, A, G, L, V, I и P;

X^1 выбирают из L, M, S и V; и

X^2 и X^3 каждый независимо выбирают из S, T, A, V, G и C.

10. Конъюгат по п. 1, в котором модифицированный аминокислотный остаток расположен в константной области легкой цепи анти-CD22 антитела.

11. Конъюгат по п. 10, в котором константная область легкой цепи включает последовательность формулы (II):

$X^1(\text{FGly}')X^2Z^{20}X^3Z^{30}$ (II)

в которой

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I);

Z^{20} представляет собой остаток или пролина, или аланина;

Z^{30} представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту;

X^1 может присутствовать или отсутствовать, и, если присутствует, то может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что, если последовательность находится на N-конце конъюгата, то X^1 присутствует; и

X^2 и X^3 каждый независимо представляет собой любую аминокислоту, и в котором последовательность представляет собой C-конец к последовательности KVDNAL, и/или представляет собой N-конец к последовательности QSGNSQ.

12. Конъюгат по п. 11, в котором константная область легкой цепи включает последовательность KVDNAL(FGly')TPSRQSGNSQ.

13. Конъюгат по п. 11, в котором

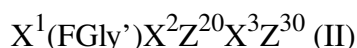
Z^{30} выбирают из R, K, H, A, G, L, V, I и P;

X^1 выбирают из L, M, S и V; и

X^2 и X^3 каждый независимо выбирают из S, T, A, V, G и C.

14. Конъюгат по п. 1, в котором модифицированный аминокислотный остаток расположен в области CH1 тяжелой цепи анти-CD22 антитела.

15. Конъюгат по п. 14, в котором область CH1 тяжелой цепи включает последовательность формулы (II):



в которой

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I);

Z^{20} представляет собой остаток или пролина, или аланина;

Z^{30} представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту;

X^1 может присутствовать или отсутствовать, и, если присутствует, то может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что, если последовательность находится на N-конце конъюгата, то X^1 присутствует; и

X^2 и X^3 каждый независимо представляет собой любую аминокислоту, и в котором последовательность представляет собой C-конец к аминокислотной последовательности SWNSGA и/или представляет собой N-конец к аминокислотной последовательности GVHTFP.

16. Конъюгат по п. 15, в котором область CH1 тяжелой цепи включает последовательность SWNSGAL(FGly')TPSRGVHTFP.

17. Конъюгат по п. 15, в котором

Z^{30} выбирают из R, K, H, A, G, L, V, I и P;

X^1 выбирают из L, M, S и V; и

X^2 и X^3 каждый независимо выбирают из S, T, A, V, G и C.

18. Конъюгат по п. 1, в котором модифицированный аминокислотный остаток расположен в области CH2 тяжелой цепи анти-CD22 антитела.

19. Конъюгат по п. 1, в котором модифицированный аминокислотный остаток расположен в области CH3 тяжелой цепи анти-CD22 антитела.

20. Фармацевтическая композиция для лечения карциномы, саркомы, лейкемии или лимфомы, включающая:

терапевтически эффективное количество конъюгата по любому из пп. 1-19; и

фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

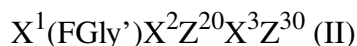
21. Способ лечения карциномы, саркомы, лейкемии или лимфомы у субъекта, включающий:

введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата по любому из пп. 1-19 или фармацевтической композиции по п. 20, где введение эффективно для лечения карциномы, саркомы, лейкемии или лимфомы у субъекта.

22. Способ по п. 21, где лимфома представляет собой одну из: В-клеточных лимфом, лимфомы Ходжкина, неходжкинской В-клеточной лимфомы.

23. Конъюгат по п. 6, в котором модифицированный аминокислотный остаток расположен на C-конце области CH3 тяжелой цепи анти-CD22 антитела.

24. Конъюгат по п. 23, в котором область CH3 тяжелой цепи включает последовательность формулы (II):



в которой

FGly' представляет собой модифицированный аминокислотный остаток формулы (I);

Z^{20} представляет собой остаток или пролина, или аланина;

Z^{30} представляет собой основную аминокислоту или алифатическую аминокислоту;

X^1 может присутствовать или отсутствовать, и, если присутствует, то может представлять собой любую аминокислоту, при условии, что, если последовательность находится на N-конце конъюгата, то X^1 присутствует; и

5 X^2 и X^3 каждый независимо представляет собой любую аминокислоту, и в котором последовательность представляет собой C-конец к аминокислотной последовательности SLSLSPG.

25. Конъюгат по п. 24, в котором область CH₃ тяжелой цепи включает последовательность SPGSL(FGly')TPSRGS.

10 26. Конъюгат по п. 24, в котором Z^{30} выбирают из R, K, H, A, G, L, V, I и P;

X^1 выбирают из L, M, S и V; и

X^2 и X^3 каждый независимо выбирают из S, T, A, V, G и C.

15

20

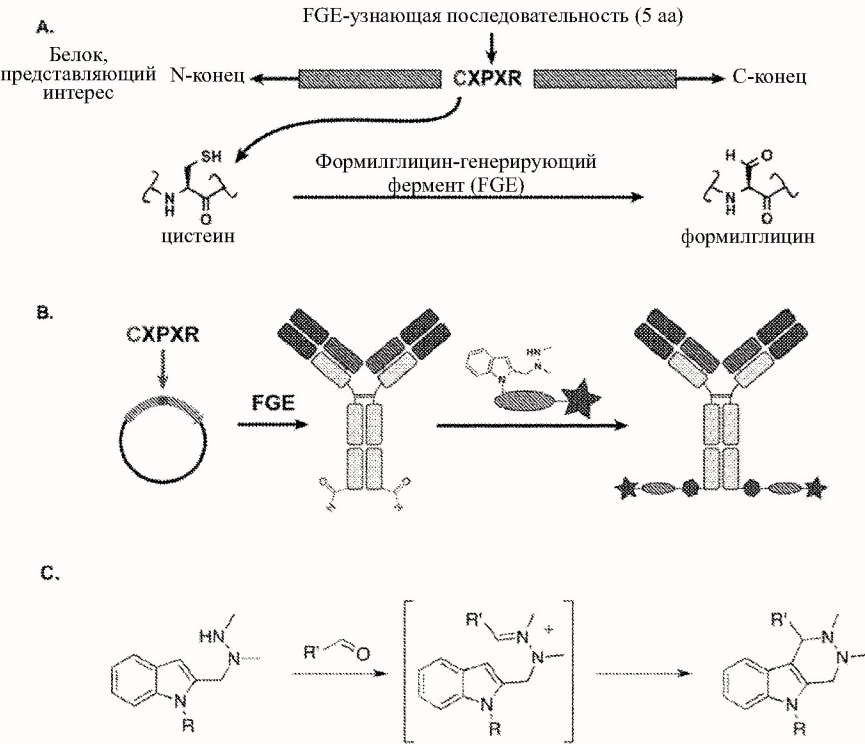
25

30

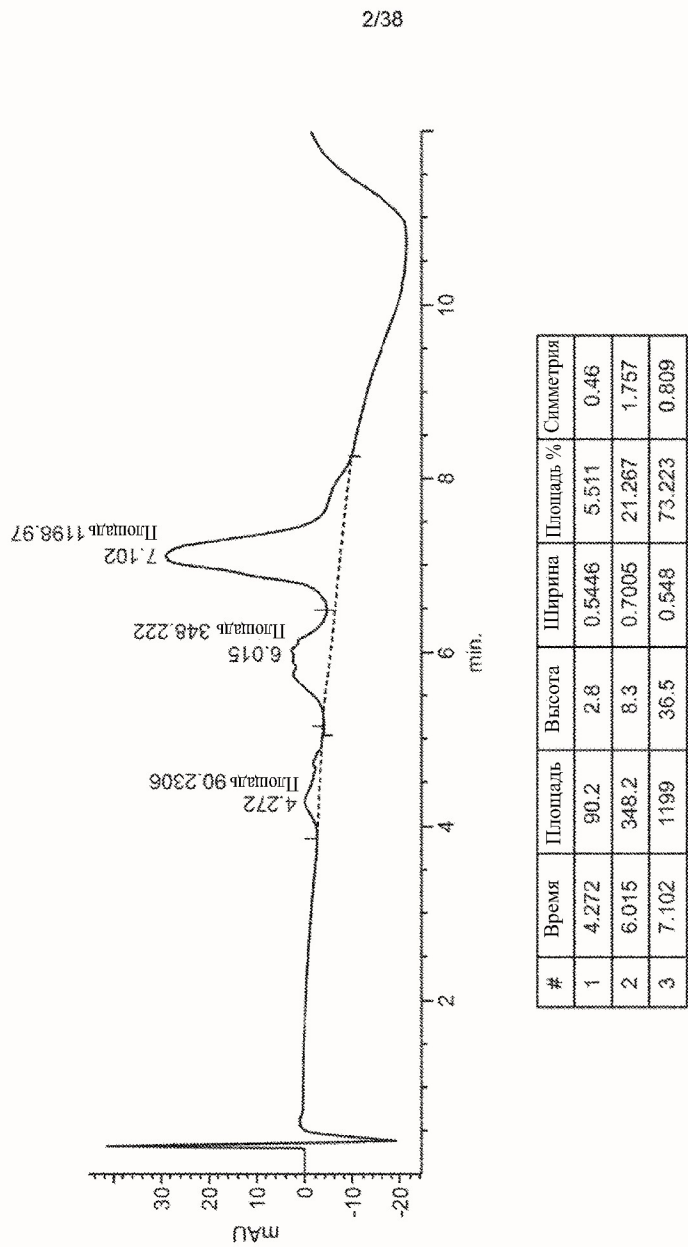
35

40

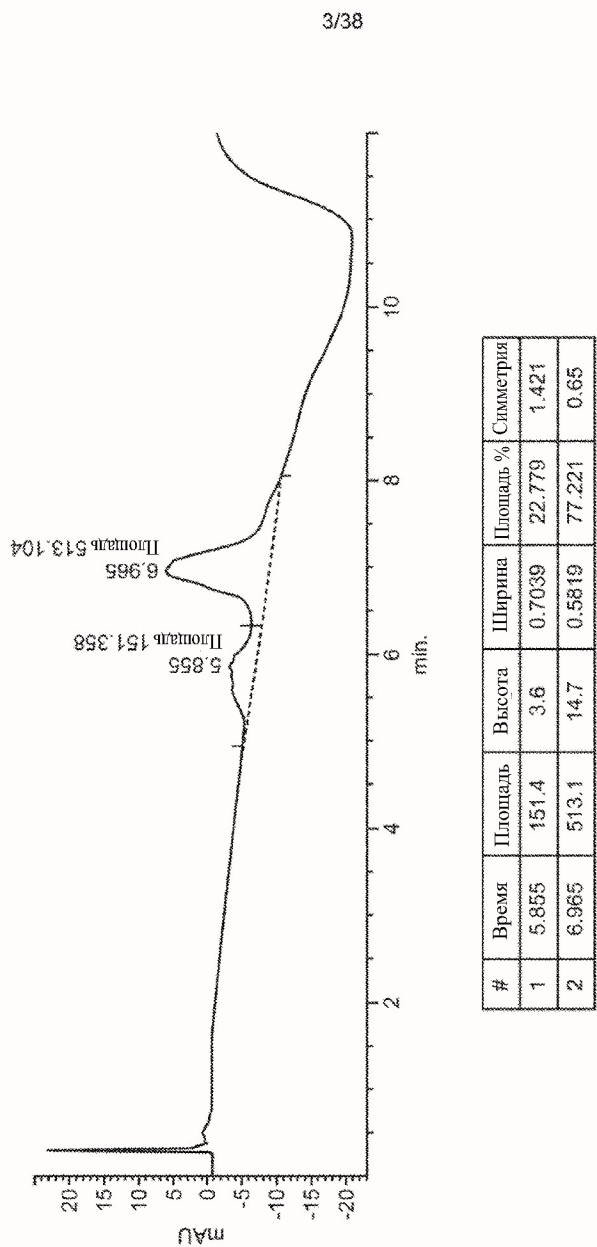
45



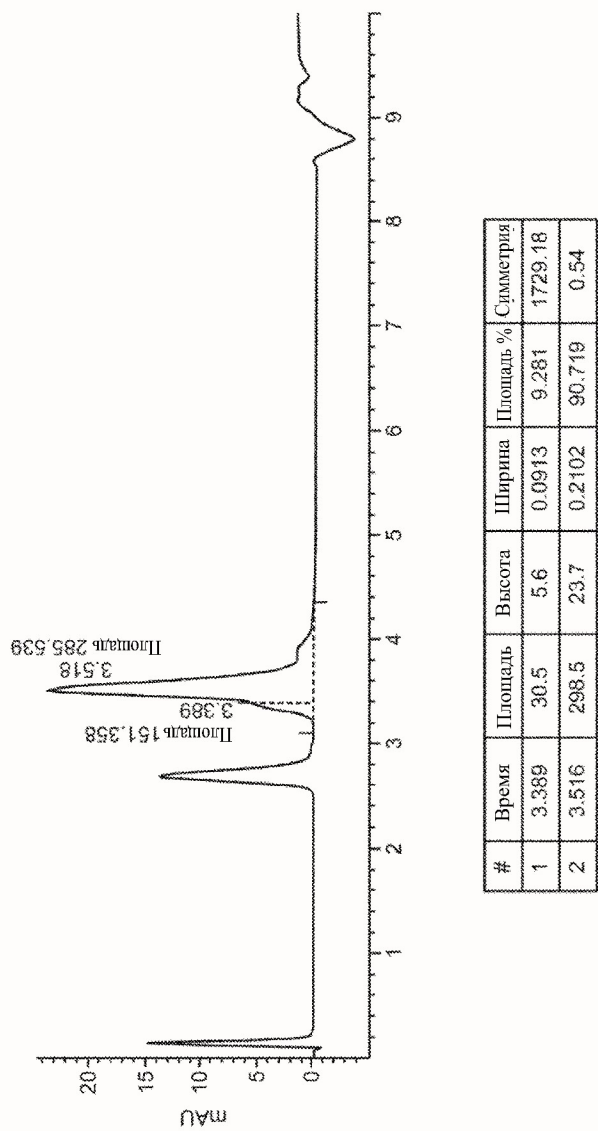
Фиг. 1



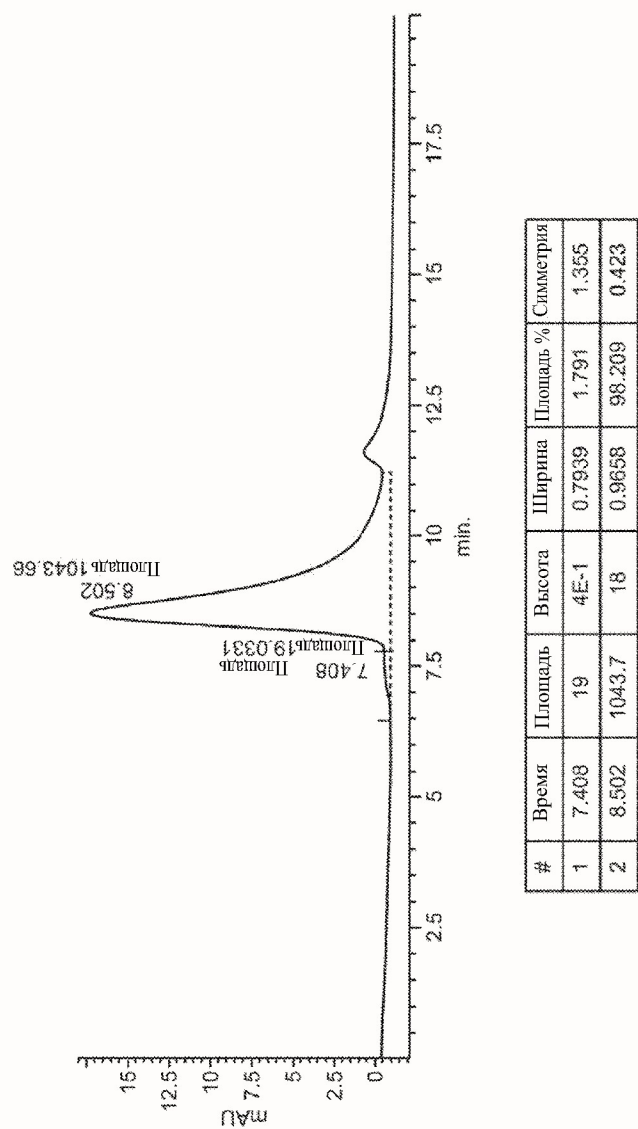
ФИГ. 2



Фиг. 3

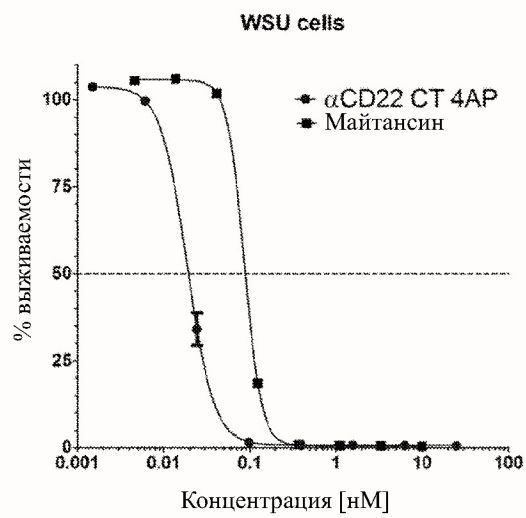


ФИГ. 4

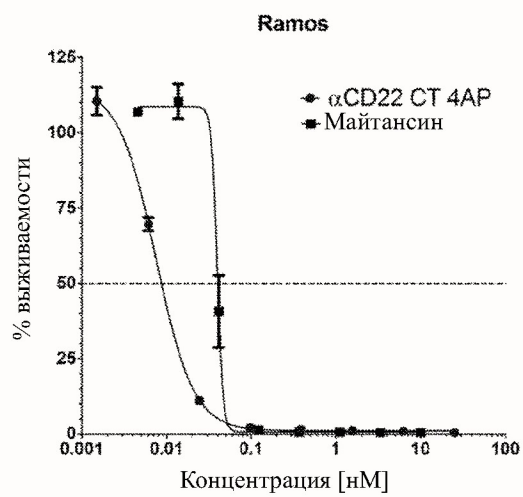


Фиг. 5

6/38

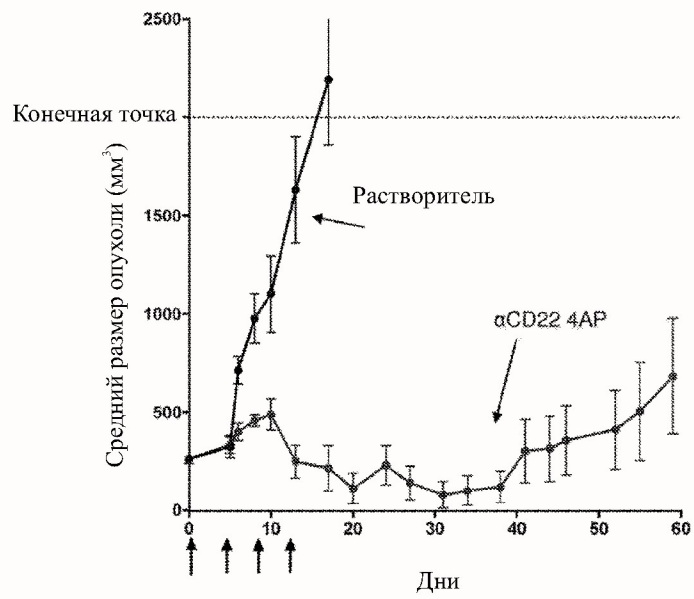


Фиг. 6А



Фиг. 6В

7/38



Фиг. 7

изоформа2
изоформа4
изоформа1
изоформа3

изоформа2
изоформа4
изоформа1
изоформа3

изоформа2
изоформа4
изоформа1
изоформа3

изоформа2
изоформа4
изоформа1
изоформа3

изоформа2
изоформа4
изоформа1
изоформа3

изоформа2
изоформа4
изоформа1
изоформа3

MLLGPMILLVLEVLAFSDSKWVFEPETLAWEGACWIPCTYRALDGLSEFILTH 60
MLLGPMILLVLEVLAFSDSKWVFEPETLAWEGACWIPCTYRALDGLSEFILTH 60
MLLGPMILLVLEVLAFSDSKWVFEPETLAWEGACWIPCTYRALDGLSEFILTH 60
MLLGPMILLVLEVLAFSDSKWVFEPETLAWEGACWIPCTYRALDGLSEFILTH 60

NREYNKNTSKFOTRLYEKTDGKVPSEQKVPFLGKKNKNTLSIHFWHNDGQGLR 120
NREYNKNTSKFOTRLYEKTDGKVPSEQKVPFLGKKNKNTLSIHFWHNDGQGLR 120
NREYNKNTSKFOTRLYEKTDGKVPSEQKVPFLGKKNKNTLSIHFWHNDGQGLR 120
NREYNKNTSKFOTRLYEKTDGKVPSEQKVPFLGKKNKNTLSIHFWHNDGQGLR 120

MESKTEKMERINLAWSERPRPRHIOQPPFIQPSQEVITFCILNTSCYGYPIQIOWLLE 180
MESKTEKMERINLAWSERPRPRHIOQPPFIQPSQEVITFCILNTSCYGYPIQIOWLLE 180
MESKTEKMERINLAWSERPRPRHIOQPPFIQPSQEVITFCILNTSCYGYPIQIOWLLE 180
MESKTEKMERINLAWSERPRPRHIOQPPFIQPSQEVITFCILNTSCYGYPIQIOWLLE 180

VPMQAAVTSITLTKSVTTRSELEKSPQMSHNGKIVTCQLQADGKFLSNDTVQLVKKH 240
VPMQAAVTSITLTKSVTTRSELEKSPQMSHNGKIVTCQLQADGKFLSNDTVQLVKKH 240
VPMQAAVTSITLTKSVTTRSELEKSPQMSHNGKIVTCQLQADGKFLSNDTVQLVKKH 240
VPMQAAVTSITLTKSVTTRSELEKSPQMSHNGKIVTCQLQADGKFLSNDTVQLVKKH 240

TPKLEIKVTPSEALVREGDSVTMNCYSSNPETTVSMIKDGTSLKKONTFTINLREVT 300
TPKLEIKVTPSEALVREGDSVTMNCYSSNPETTVSMIKDGTSLKKONTFTINLREVT 300
TPKLEIKVTPSEALVREGDSVTMNCYSSNPETTVSMIKDGTSLKKONTFTINLREVT 300

KDSGKYCCQGVNDVGFGRSEEVFLQVQ----- 328

KDSGKYCCQGVNDVGFGRSEEVFLQVQAFPESTVOILHSAVEGSGQVEFLCMLANPL 360
KDSGKYCCQGVNDVGFGRSEEVFLQVQAFPESTVOILHSAVEGSGQVEFLCMLANPL 360

Фиг. 8А

изоформа2
изоформа4
изоформа1
изоформа3

.....YPPK 332
PTNYTYNGKEMQGRTEKVNIFRILFWHAGTYSVAENILGTQGRGAELEWQYPPK 243
PINITWYNGKEMQGRTEKVNIFRILFWHAGTYSVAENILGTQGRGAELEWQYPPK 420

изоформа2
изоформа4
изоформа1
изоформа3

KVTTVIQNPMRIREGDTVTLSQNYSSNPSVTRYEKPHGAEPSLGVLKIQNVGMDNT 392
KVTTVIQNPMRIREGDTVTLSQNYSSNPSVTRYEKPHGAEPSLGVLKIQNVGMDNT 303
KVTTVIQNPMRIREGDTVTLSQNYSSNPSVTRYEKPHGAEPSLGVLKIQNVGMDNT 489
KVTTVIQNPMRIREGDTVTLSQNYSSNPSVTRYEKPHGAEPSLGVLKIQNVGMDNT 489

изоформа2
изоформа4
изоформа1
изоформа3

TIACACNWCWSWASFYALNVQYAPRDYRVVKIKPLSETHSGNSYSLOQDFSSSHPEVQ 452
TIACACNWCWSWASFYALNVQYAPRDYRVVKIKPLSETHSGNSYSLOQDFSSSHPEVQ 363
TIACACNWCWSWASFYALNVQYAPRDYRVVKIKPLSETHSGNSYSLOQDFSSSHPEVQ 540
TIACACNWCWSWASFYALNVQYAPRDYRVVKIKPLSETHSGNSYSLOQDFSSSHPEVQ 549

изоформа2
изоформа4
изоформа1
изоформа3

FFWEKNGRLLEGESQNLNFDISIFEDAGSYSCWVNNSIGQTASKAWTLEVLXAPRLVSM 512
FFWEKNGRLLEGESQNLNFDISIFEDAGSYSCWVNNSIGQTASKAWTLEVLXAPRLVSM 423
FFWEKNGRLLEGESQNLNFDISIFEDAGSYSCWVNNSIGQTASKAWTLEVLXAPRLVSM 609
FFWEKNGRLLEGESQNLNFDISIFEDAGSYSCWVNNSIGQTASKAWTLEVLXAPRLVSM 609

изоформа2
изоформа4
изоформа1
изоформа3

SFGQVMEGKSATLTCESDANPPYSHYTWFEDWNNQSLPYHSQKRLIEPKVQHSGAYWCQ 572
SFGQVMEGKSATLTCESDANPPYSHYTWFEDWNNQSLPYHSQKRLIEPKVQHSGAYWCQ 483
SFGQVMEGKSATLTCESDANPPYSHYTWFEDWNNQSLPYHSQKRLIEPKVQHSGAYWCQ 669
SFGQVMEGKSATLTCESDANPPYSHYTWFEDWNNQSLPYHSQKRLIEPKVQHSGAYWCQ 669

изоформа2
изоформа4
изоформа1
изоформа3

GTNSVKGSRSPSLTITVYYSPETIGRRVAVGLSCSLAILILATCGKIKQRWKRTQSQG 632
GTNSVKGSRSPSLTITVYYSPETIGRRVAVGLSCSLAILILATCGKIKQRWKRTQSQG 543
GTNSVKGSRSPSLTITVYYSPETIGRRVAVGLSCSLAILILATCGKIKQRWKRTQSQG 729
GTNSVKGSRSPSLTITVYYSPETIGRRVAVGLSCSLAILILATCGKIKQRWKRTQSQG 729

Фиг. 8В

Фиг. 8С

изоформа2	LQENSSQSFVNNKKYVRAPLSEGPBSLGCYNPMEDGISYTTLRFFEMNIPRTGDAES 692
изоформа4	LQENSSQSFVNNKKYVRAPLSEGPBSLGCYNPMEDGISYTTLRFFEMNIPRTGDAES 693
изоформа1	LQENSSQSFVNNKKYVRAPLSEGPBSLGCYNPMEDGISYTTLRFFEMNIPRTGDAES 780
изоформа3	LQENSSQSFVNNKKYVRAPLSEGPBSLGCYNPMEDGISYTTLRFFEMNIPRTGDAES 746 ***** * ***
изоформа2	SEMQRPRDCHVTYTSALHKKQVGDYENVIPDFEEEGHYSELLQGVGGRFQAQENV 752
изоформа4	SEMQRPRDCHVTYTSALHKKQVGDYENVIPDFEEEGHYSELLQGVGGRFQAQENV 663
изоформа1	SEMQRPRDCHVTYTSALHKKQVGDYENVIPDFEEEGHYSELLQGVGGRFQAQENV 849
изоформа3	SPGLR-----* *****
изоформа2	DYVILKH 759
изоформа4	DYVILKH 670
изоформа1	DYVILKH- 846
изоформа3	-----

Консервативная область легкой цепи

140 150 160 170 180 189
KTHAAASVET EPSEDEQLKS GTASVUCILN NFYFEEKVG WKVVAALQSC NSQESVTEED
200 210 220 230 236
SEDYSLSS TLPLSKADYE KHKVYACEVT ECSSSPVTK SFNTEEC

Консервативная область тяжелой цепи

130 140 150 160 170 180
KTHAAASVET LAPSSCTGGAALGCLVK DYTFFETVS WKKAAATTEEV HTTFATVQSS
190 200 210 220 230 240
EDYSLSSVET VPSSSLGTEI IICNVNHKES NTNVKVKVE KSCAKHTTE KQDAPTESS
250 260 270 280 290 300
PSVTEFPKPK KDTLNSETE EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDQVEVHDA KTKPREEKIN
310 320 330 340 350 360
SDYRVVSVLT VILQDWLNKK EYKCRVSNLA TPAPIEKTIS KAKQDPSAPQ VYTIPTPSKEE
370 380 390 400 410 420
MTKNQVSLTC EVKGTFFSDI AVENESGGEB HNNYKTHLY KPDSEFTLY SKLTIVDKSRW
430 440 450
QQGNVFSCSV MHEALRNHYT QKSLGIDPKK

Фиг. 9A

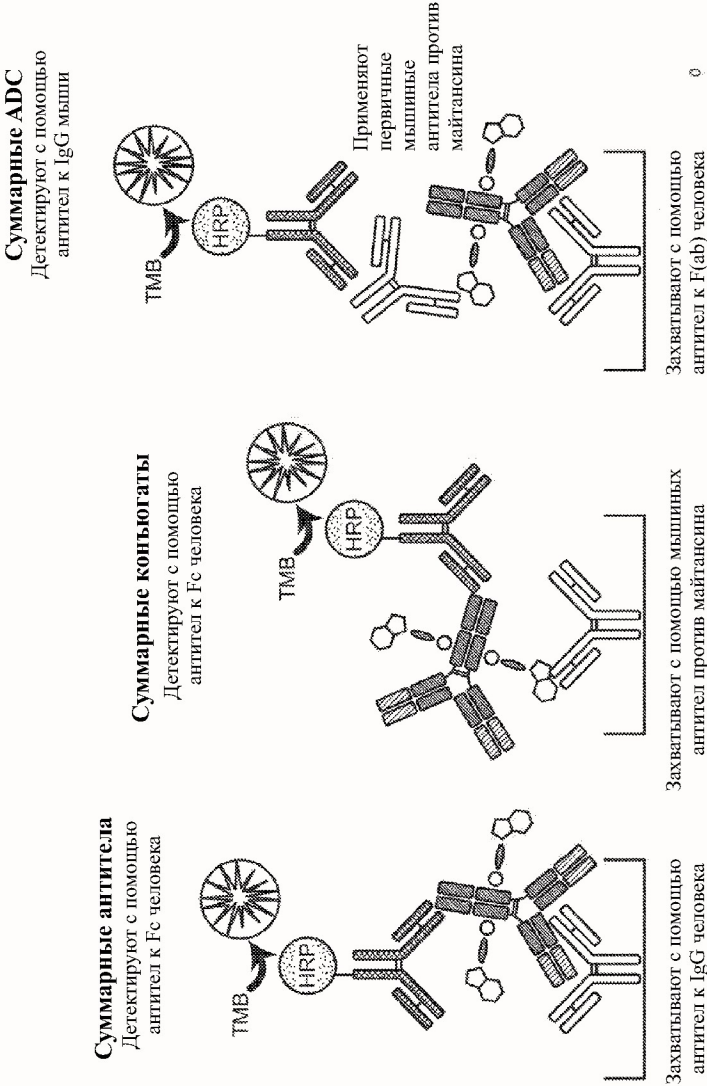
[illegible]

Фиг. 9В

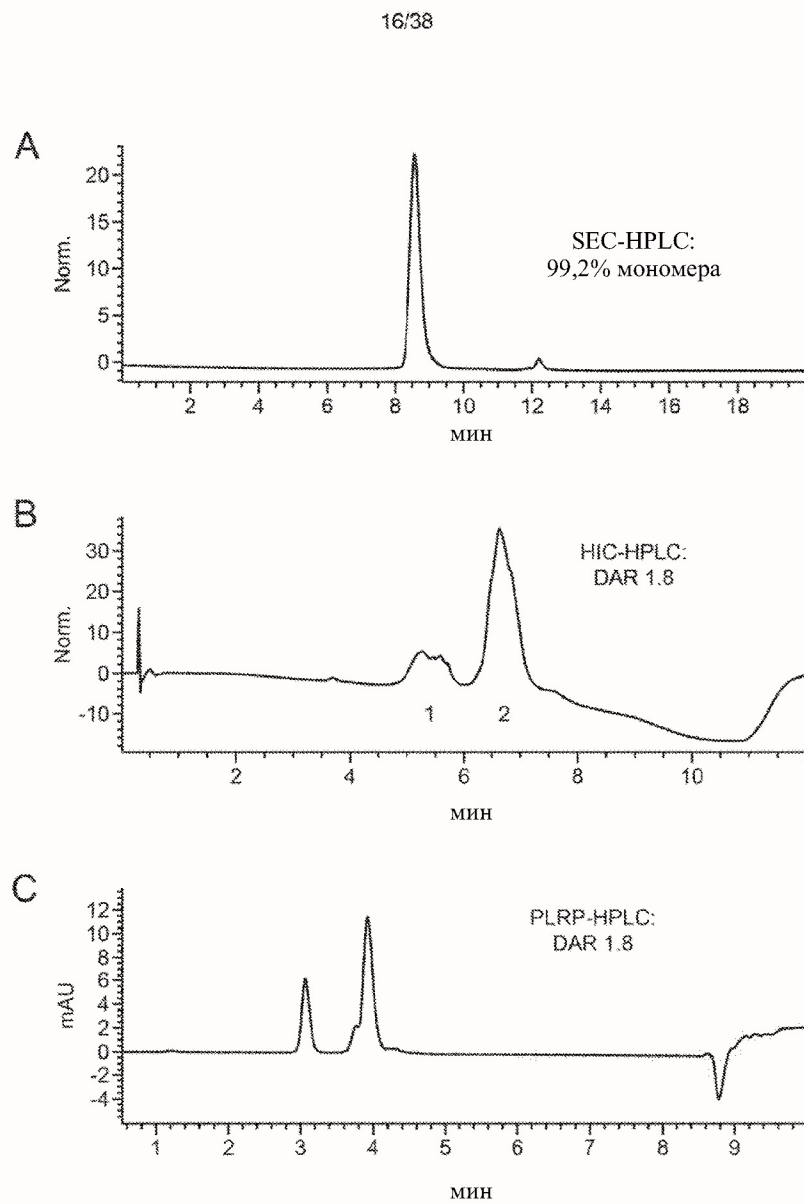
Фиг. 9В продолжение

[illegible]

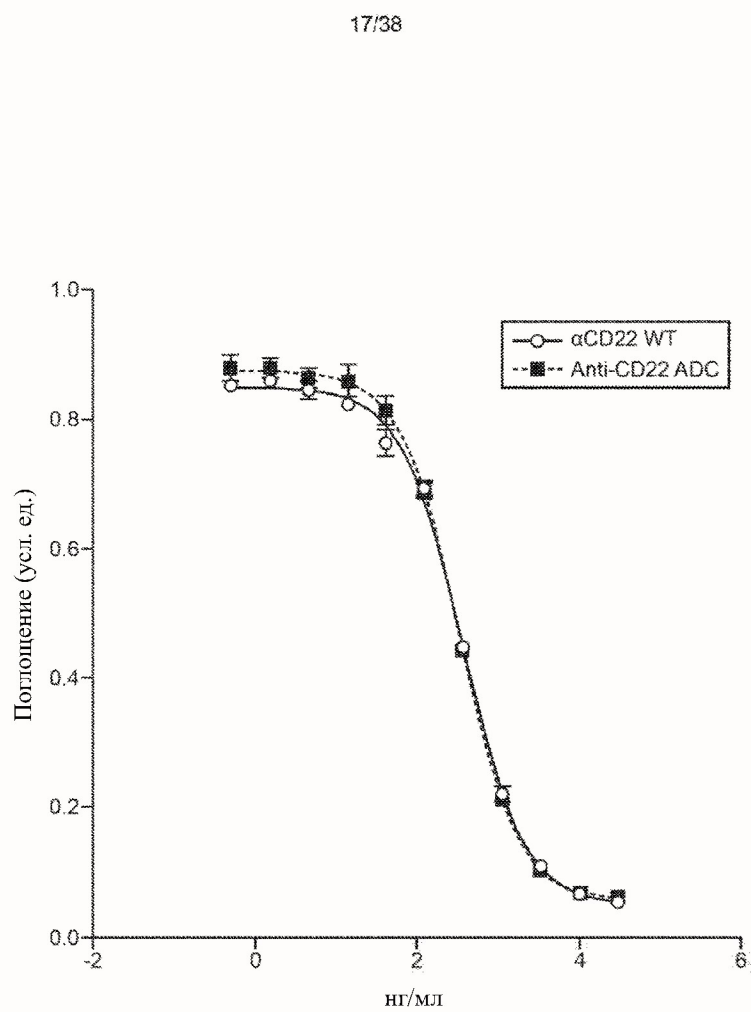
Фиг. 9С



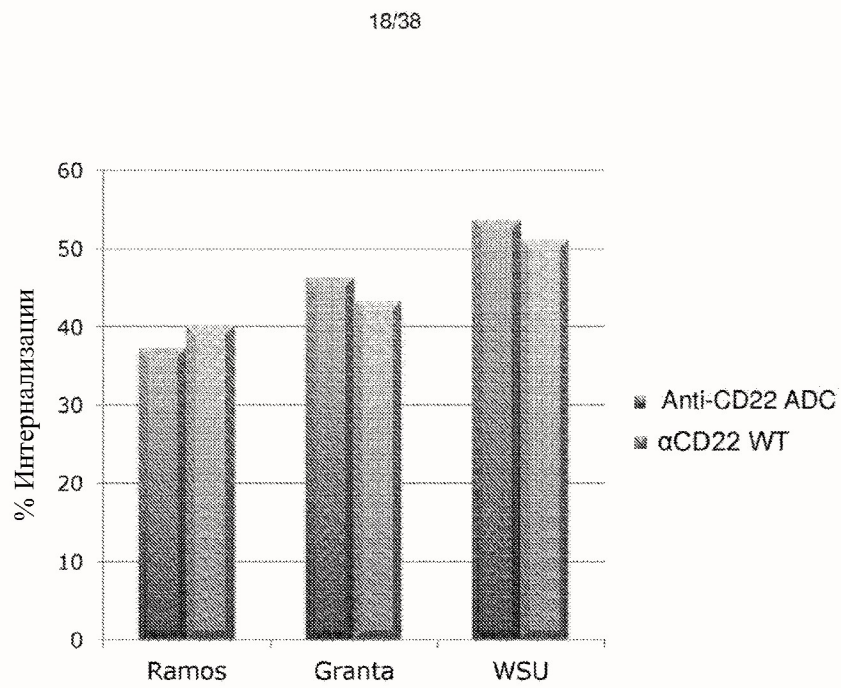
Фиг. 10



Фиг. 11

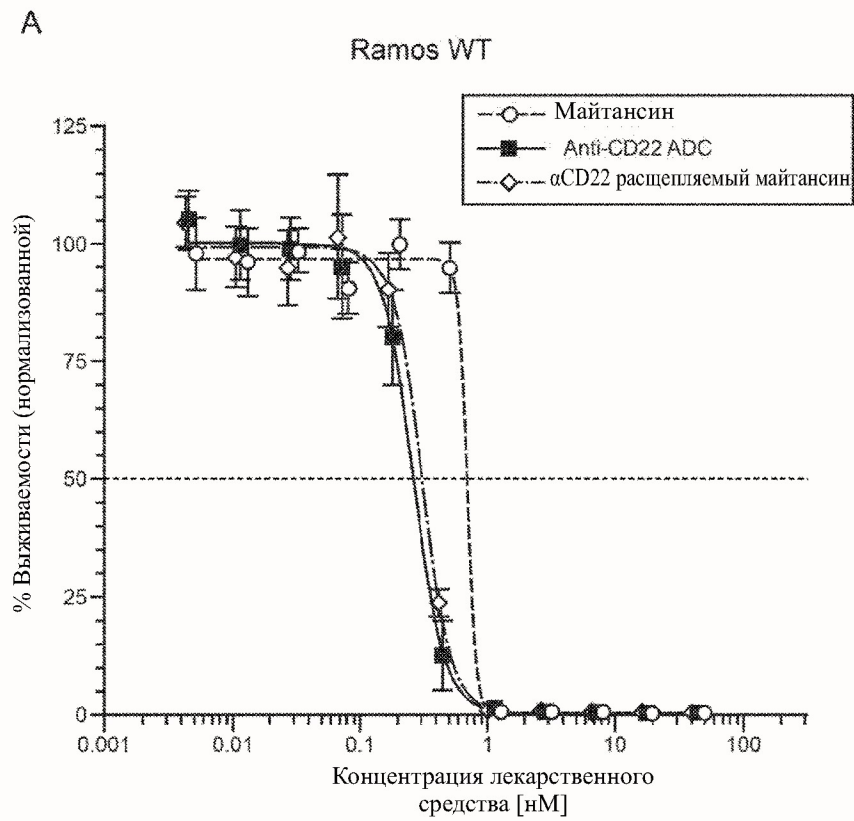


Фиг. 12

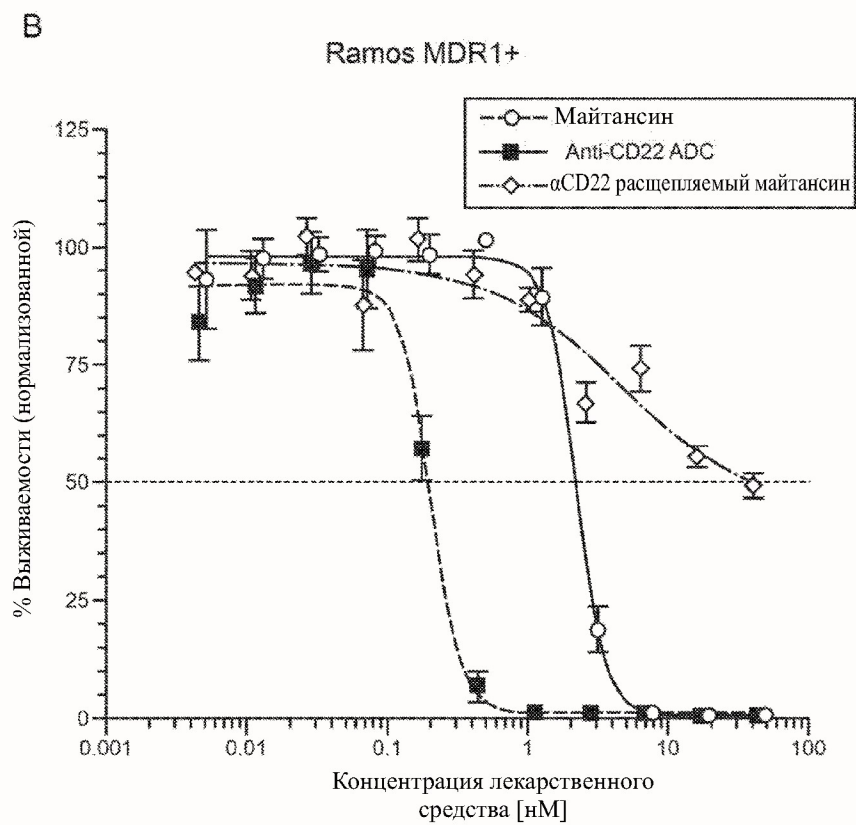


Фиг. 13

19/38

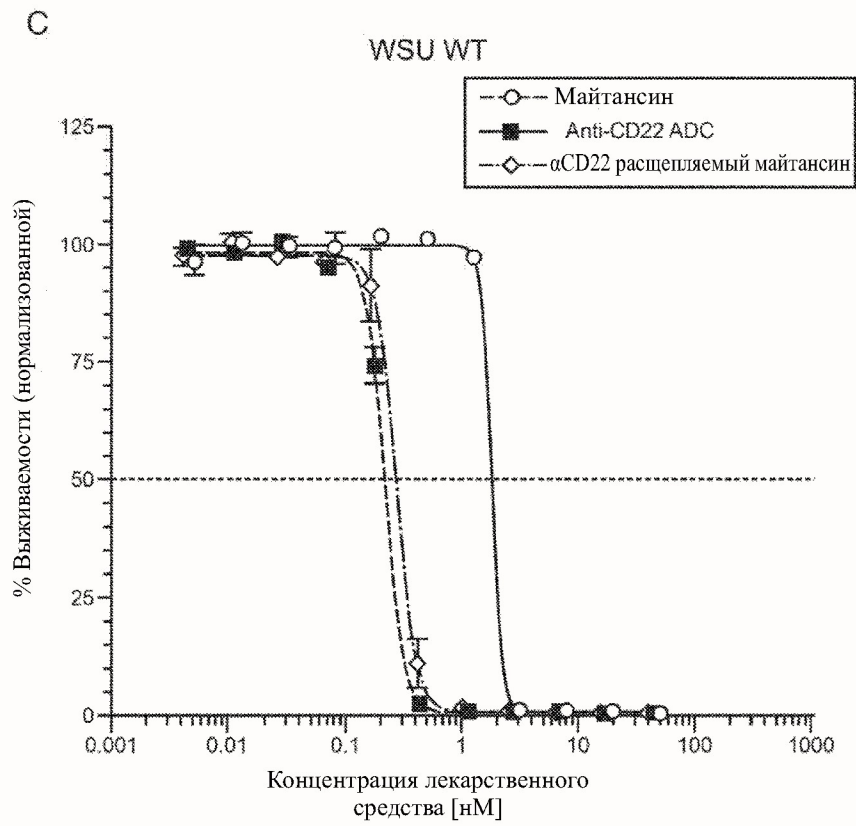


Фиг. 14



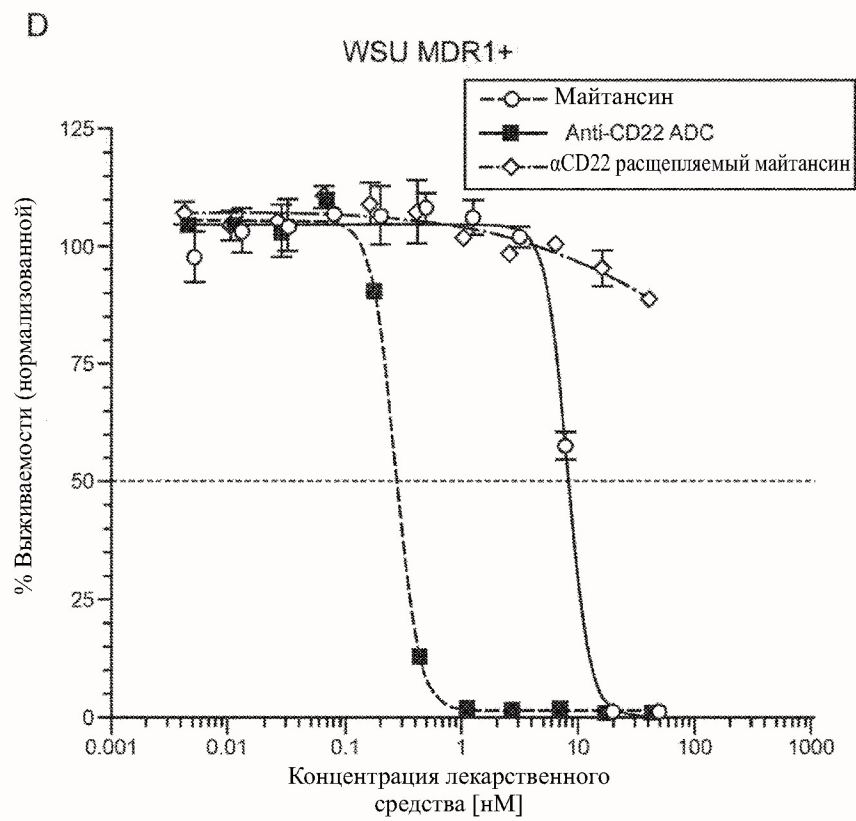
Фиг. 14 продолжение

21/38



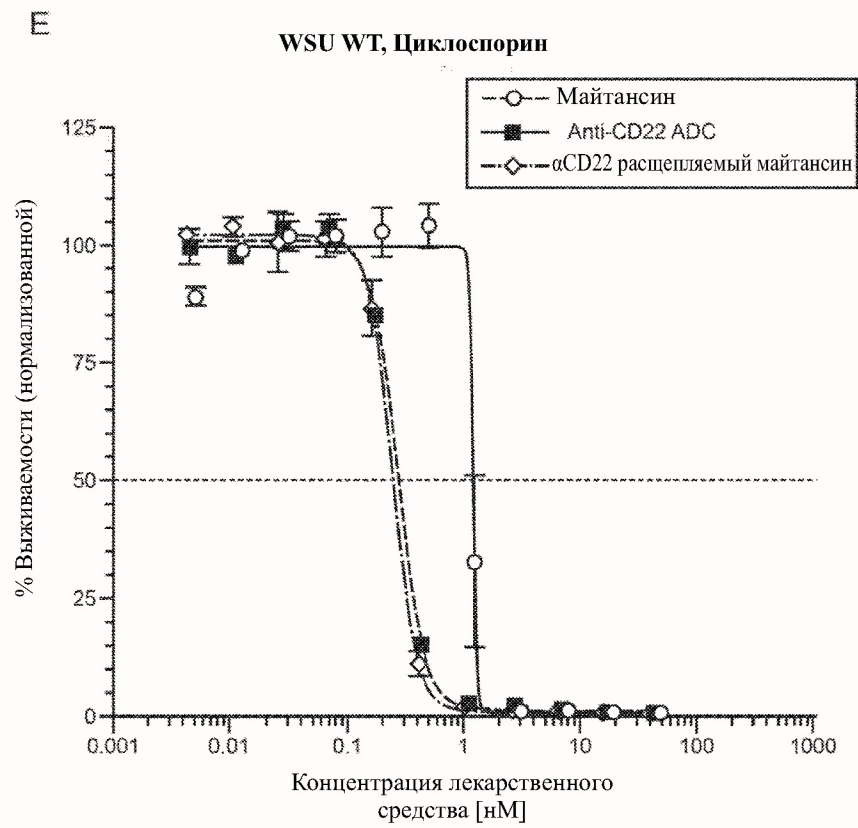
Фиг. 14 продолжение

22/38

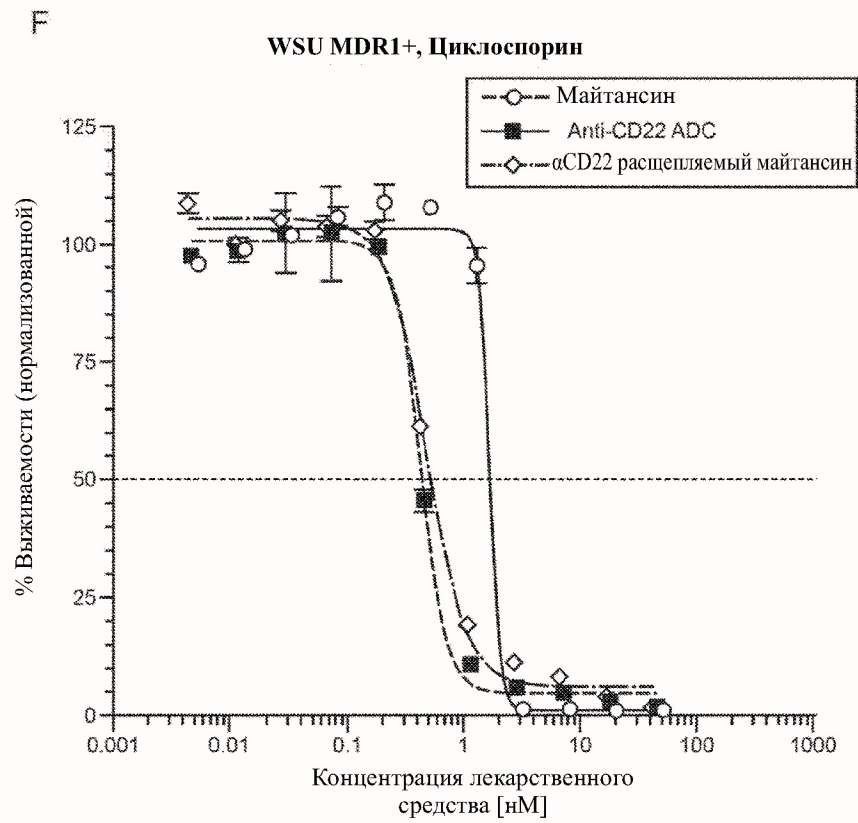


Фиг. 14 продолжение

23/38

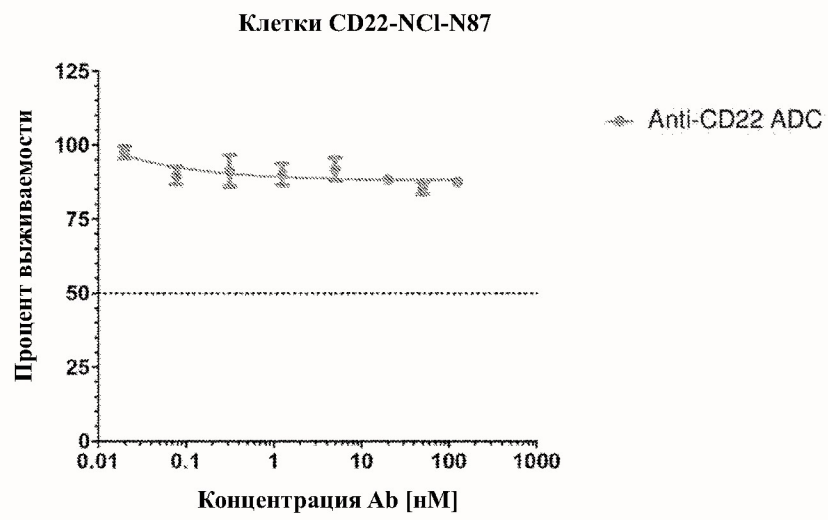


Фиг. 14 продолжение



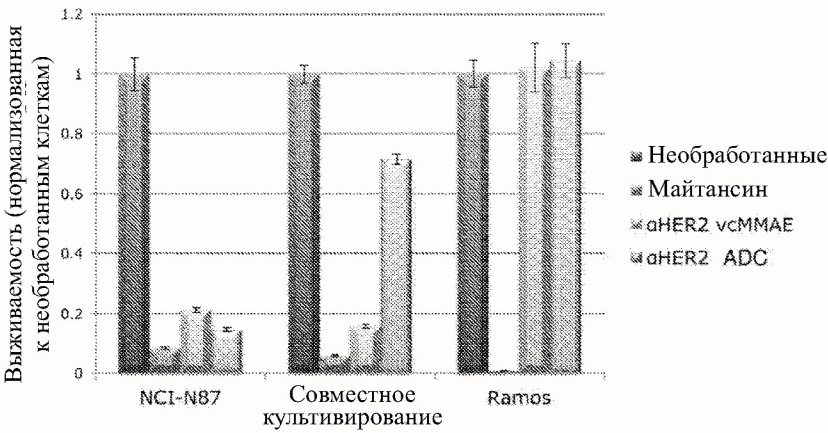
Фиг. 14 продолжение

25/38



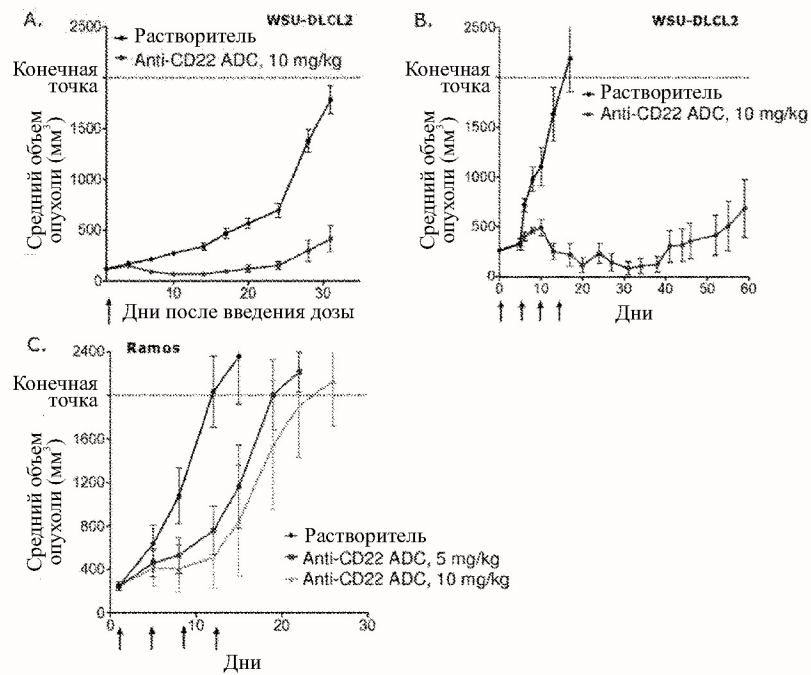
Фиг. 15

26/38



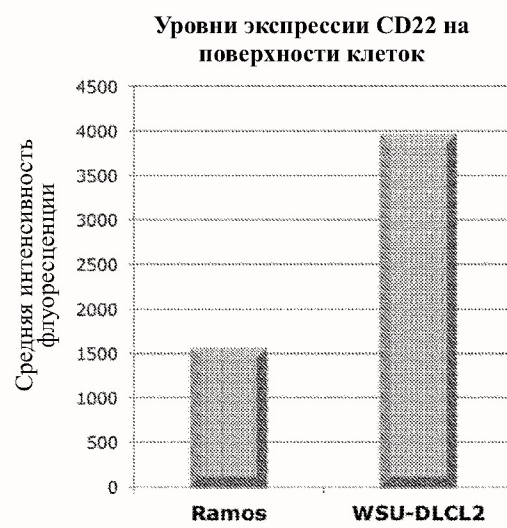
Фиг. 16

27/38

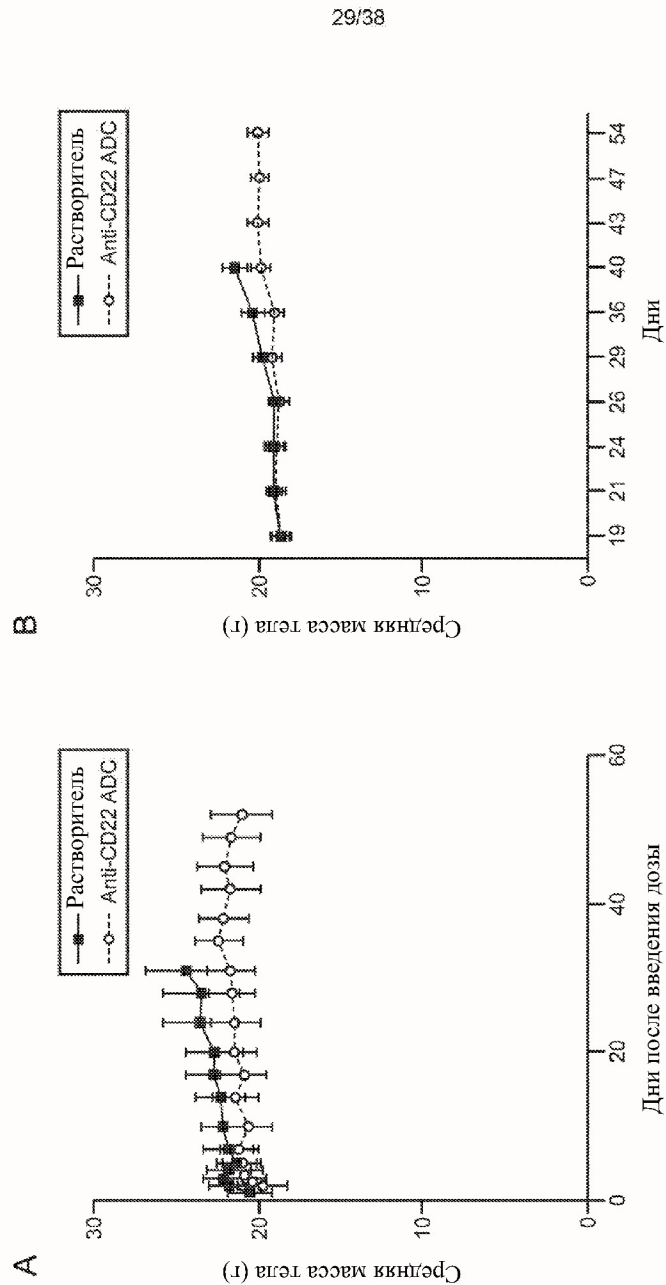


Фиг. 17

28/38

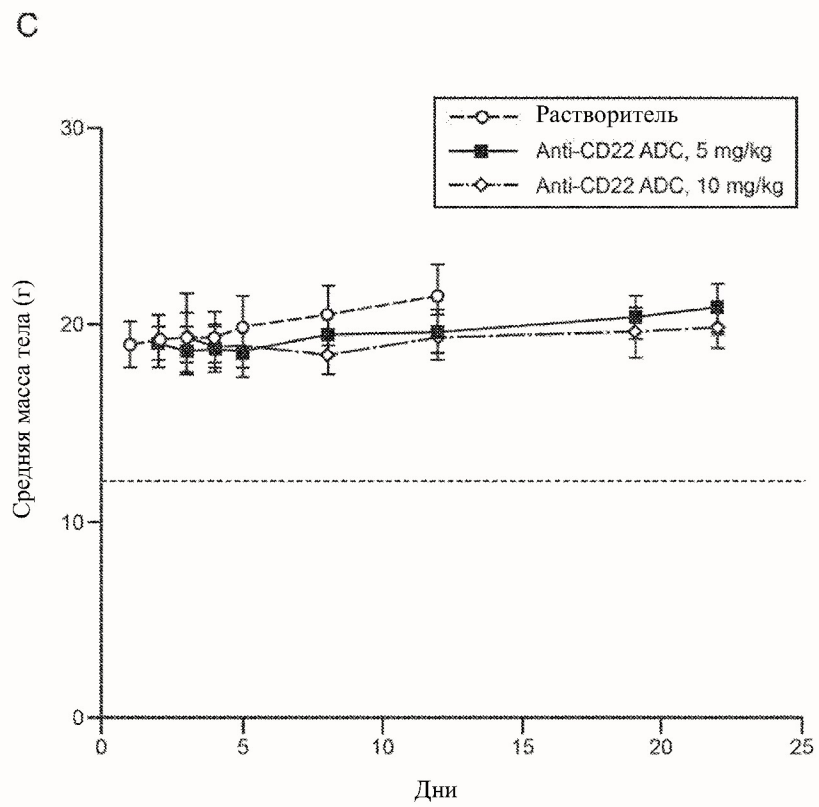


Фиг. 18



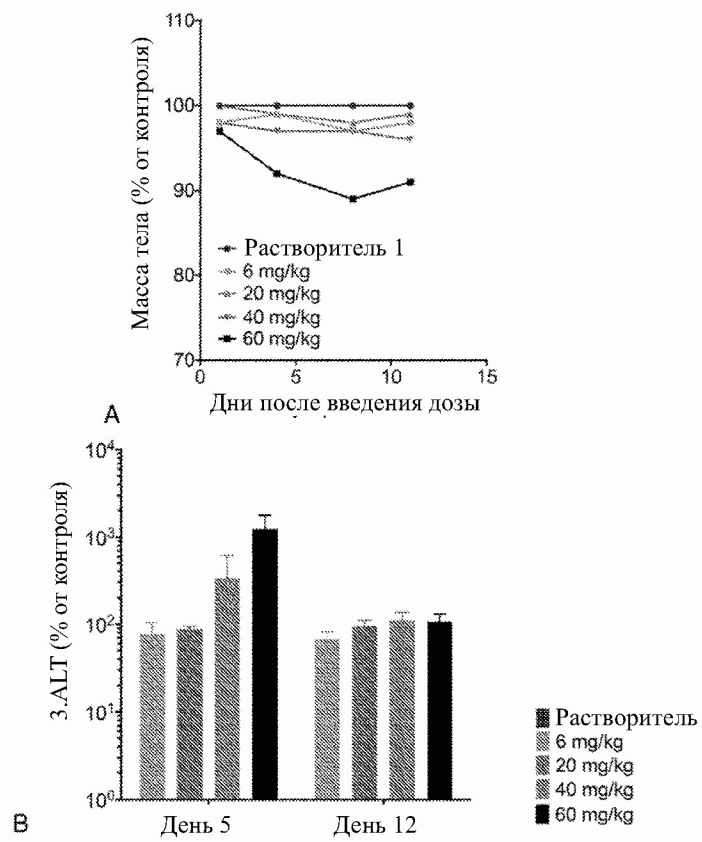
Фиг. 19

30/38

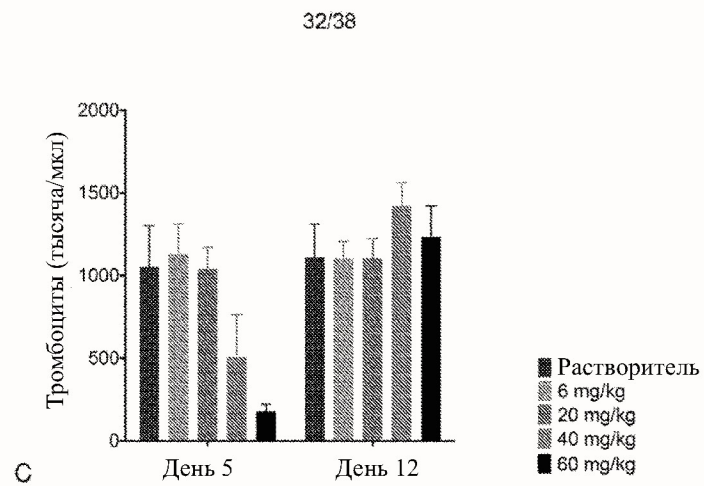


Фиг. 19 продолжение

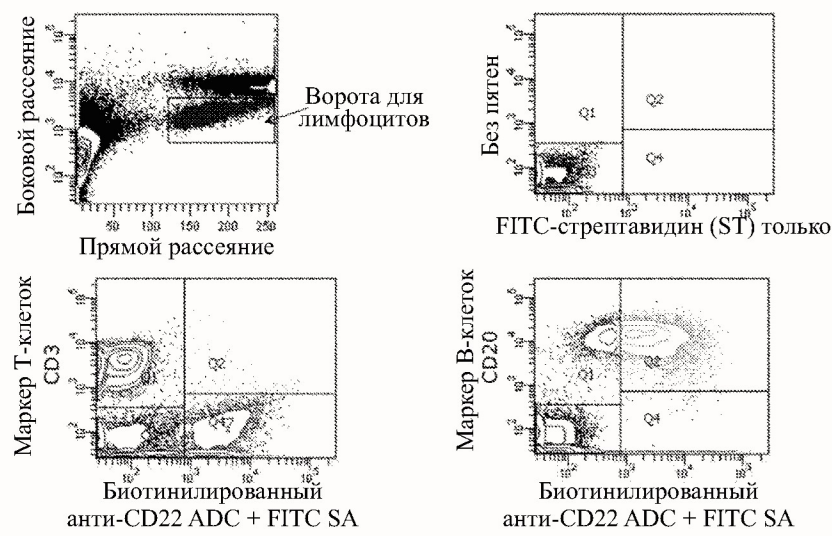
31/38



Фиг. 20

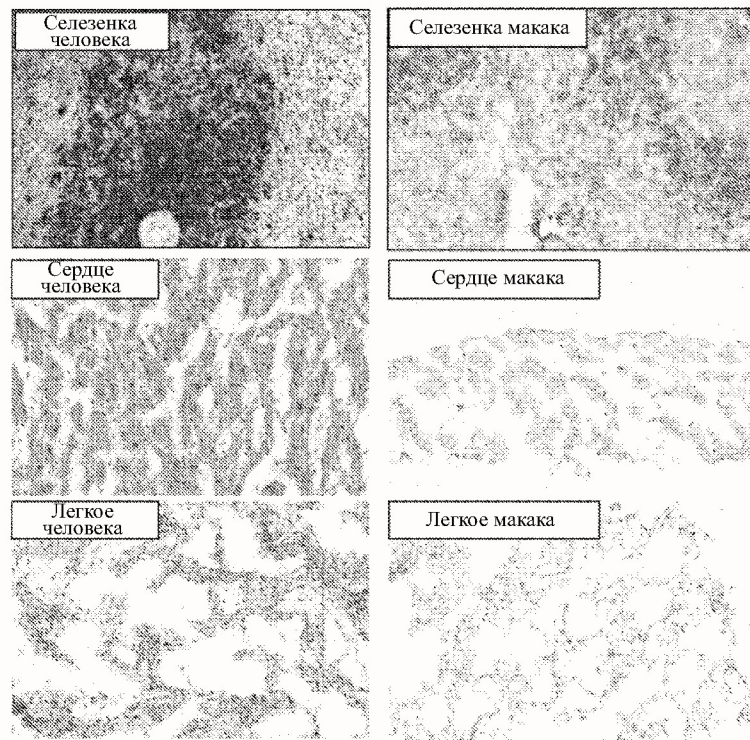


Фиг. 20 продолжение



Фиг. 21

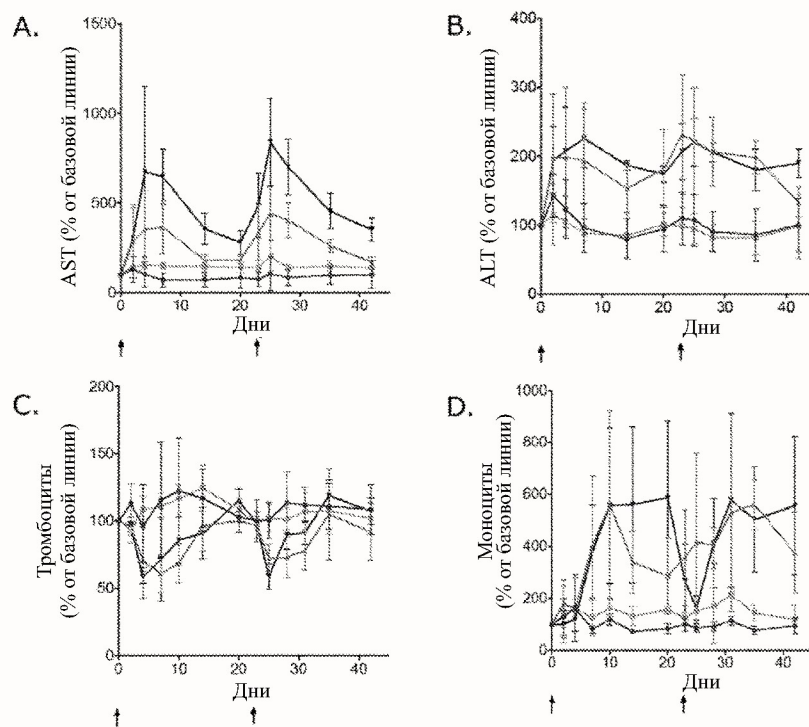
34/38



Фиг. 22

35/38

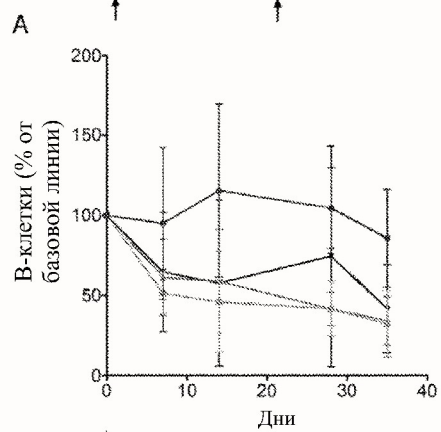
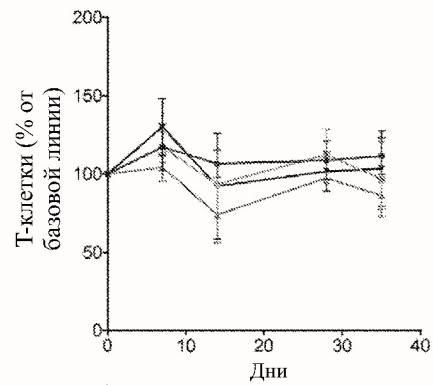
— Растворитель
— 10 mg/kg
— 30 mg/kg
— 60 mg/kg



Фиг. 23

36/38

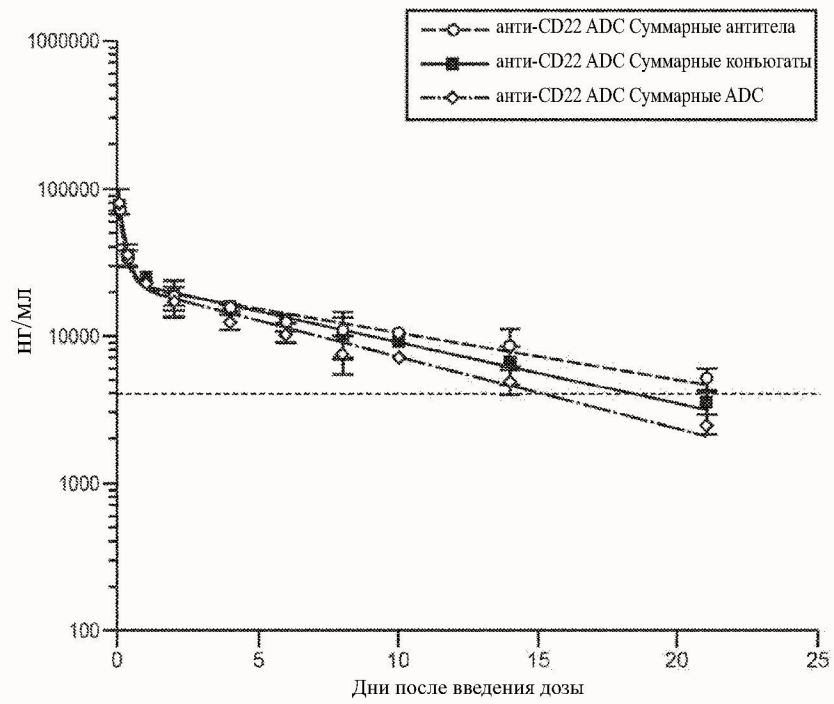
- Растворитель
- 10 mg/kg
- 30 mg/kg
- 60 mg/kg



В

Фиг. 24

37/38



Фиг. 25

Таблица 3. Сводка средних ($\pm$ SD) фармакокинетических (РК) и токсикокинетических (ТК) параметров от всех величин ADC у животных, получавших анти-CB22 ADC

Доза (мг/кг)	Мыши (q4d x 4) ^a		Крысы (единственная доза)		Яванский макак (q3w x 3) ^b	
	C _{max} первая доза (мкг/мл)	AUC _{0-inf} (день*мкг/мл)	C _{max} (мкг/мл)	AUC _{0-inf} (день*мкг/мл)	C _{max} первая доза (мкг/мл)	AUC _{0-inf} (день*мкг/мл)
3			83,9 (16)	218 (18,4)		
5	74,4 (5,48)	1500 (45,1)				
6			110 (38,5)	660 (143)		
10	136 (4,57)	2530 (131)			318 (110)	1360 (556)
20			382 (63,0)	2280 (325)		
30					1030 (57,4)	4200 (768)
40			687 (52,8)	3740 (185)		
60			1020 (158)	5201 (273)	1630 (138)	6140 (667)

^aРасчет ADC включал все дозы

^bРасчет ADC только из первой дозы

SD, стандартное отклонение; AUC_{0-inf} площадь под кривой концентрации от времени от времени) до бесконечности; C_{max} самая высокая концентрация, наблюдаемая в первой точке отбора образца из каждого исследования следующим образом: РК мыши и крысы, 1 час; ТК крысы, 1 час; ТК яванский макак, 5 мин.

Фиг. 26