

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201992715 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.08.12(51) Int. Cl. C07D 249/12 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
C07K 1/13 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2018.05.25

(54) СПОСОБ И МОЛЕКУЛЫ

(31) 62/511,415

(32) 2017.05.26

(33) US

(86) PCT/US2018/034535

(87) WO 2018/218093 2018.11.29

(71) Заявитель:

МЕДИМБЬОН, ЭлЭлСи; ДЕ
РЕДЖЕНТС ОФ ДЕ ЮНИВЕРСИТИ
ОФ КАЛИФОРНИЯ (US)

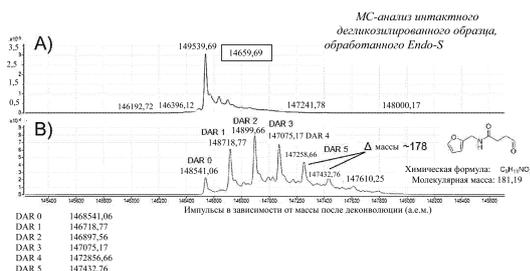
(72) Изобретатель:

Кристи Роналд Джеймс, Гао Чаншоу,
Ст. Амант Андрэ Генри, Де Аланиз
Хавьер Рид (US)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)

(57) В настоящем изобретении представлены способ биоконъюгирования и соединения, предназначенные для применения в данном способе. Способ биоконъюгирования предусматривает стадию конъюгирования биологической молекулы, содержащей первую ненасыщенную функциональную группу, с полезной нагрузкой, содержащей вторую ненасыщенную функциональную группу, где первая и вторая ненасыщенные функциональные группы комплементарны друг другу, вследствие чего конъюгирование представляет собой реакцию указанных функциональных групп, протекающую по механизму реакции Дильса-Альдера, при которой образуется циклогексеновое кольцо.



A1

201992715

201992715

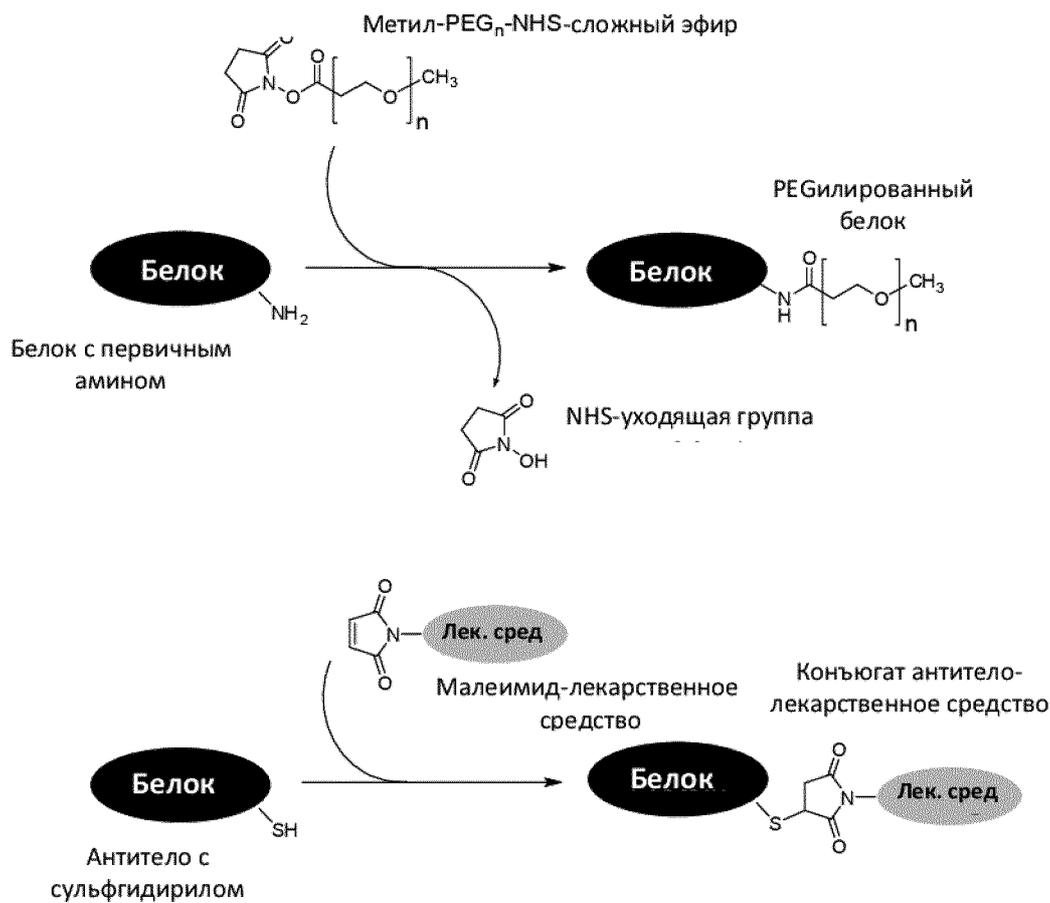
A1

СПОСОБ И МОЛЕКУЛЫ

Настоящее изобретение относится к способу конъюгирования биологической молекулы с полезной нагрузкой, к молекуле, полученной с помощью указанного способа, к содержащим их композициям, некоторым новым аминокислотным структурам, особенно подходящим для применения в способе, и к применению биологических молекул и композиций в лечении, в частности, в лечении воспалительных ответов, в том числе рака.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Существует ряд зарегистрированных фармацевтических продуктов, которые содержат белковый/полипептидный компонент, связанный с полимером или токсином. Во многих случаях полимер представляет собой полиэтиленгликоль, который конъюгируют с полипептидом за счет проведения реакции цистеиновых или лизиновых аминокислотных остатков (в частности, боковой цепи лизинового остатка) соответственно с малеимидной группой или NHS-сложноэфирной группой. Другие терапевтические соединения, такие как конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), получают с помощью такого же способа, при котором токсин/лекарственное средство несет реакционноспособную малеимидную или другую подходящие функциональные группы, предназначенные для прикрепления к антителу. Примеры таких реакций в целом показаны ниже:



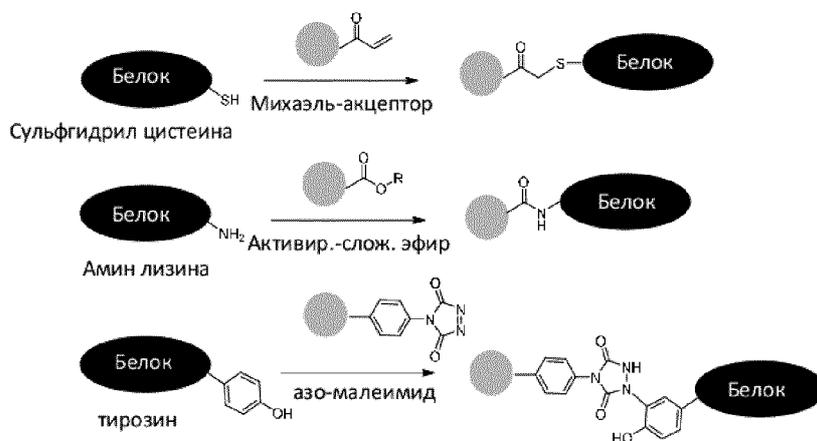
Использование природного аминокислотного остатка в полипептиде может давать в результате продукт конъюгирования, который содержит смесь соединений. Кроме того, если целевой аминокислотный остаток, предназначенный для реакции конъюгирования, находится в укладке белка или является, например, недоступным для растворителя, тогда могут потребоваться жесткие условия для обеспечения завершения реакции конъюгирования. Однако, как правило, желательно применение мягких условий в присутствии биологической молекулы, поскольку активность молекулы может быть нарушена жесткими условиями.

Основные реакции конъюгирования для соединения с природными остатками в биологических молекулах были несущественно изменены за последние пять – десять лет, при этом примеры таких реакций показаны ниже. Однако эти реакции приобретают все более важное значение, поскольку второе поколение биологических продуктов, таких как конъюгаты антитело-лекарственное средство, способны внести значительный вклад в лечение таких заболеваний, как рак. Химические реакции так называемой клик-химии можно использовать в биоконъюгировании с применением непривычных функциональных групп, например, в реакциях азид-алкинового циклоприсоединения, реакциях азид-алкинового циклоприсоединения, промотируемых напряжением цикла, алкин-нитронных присоединений, реакций алкена и азида

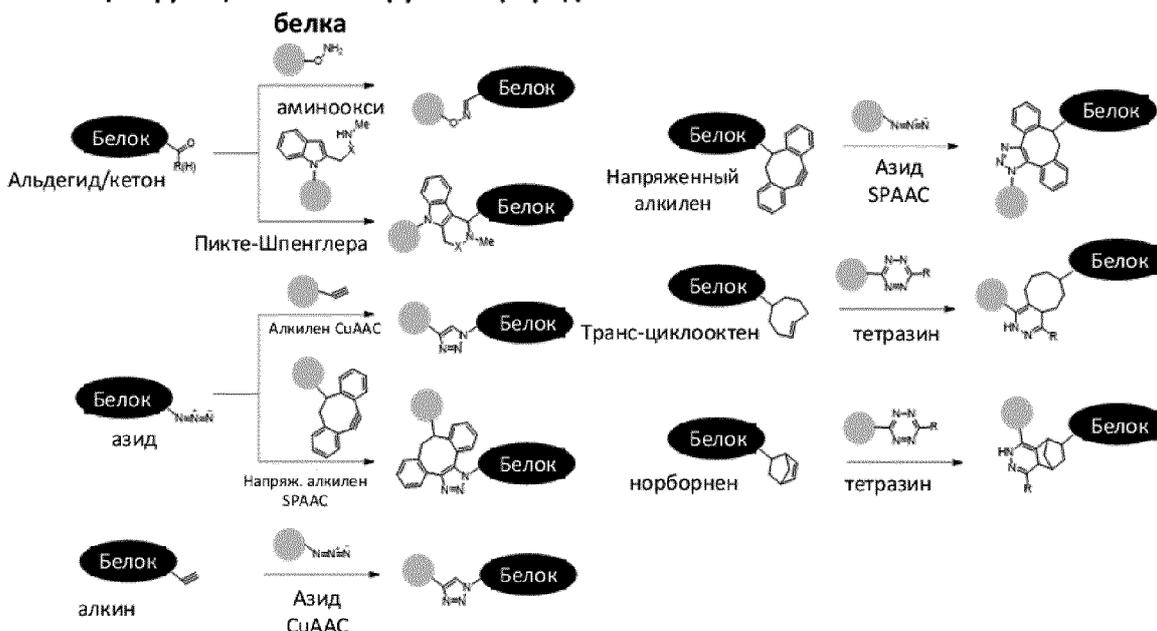
[циклоприсоединение 3 плюс 2], реакции алкена и тетразина по механизму реакции Дильса-Альдера с обращенными электронными требованиями или реакции алкена и тетразола [Хьюсгена].

Неприродные функциональные группы, необходимые для данных реакций, могут быть введены в белки с помощью химических модификаций природных лизинов, цистеинов или тирозинов или путем экспрессии белков, которые встраивают неприродные аминокислоты в структуру белка. Примеры таких химических реакций показаны ниже:

Конъюгация функциональных групп природного белка



Конъюгация функциональных групп неприродного белка



Несмотря на то, что многие из показанных выше химических реакций конъюгирования расширили возможности, доступные для получения биоконъюгатов, их практические

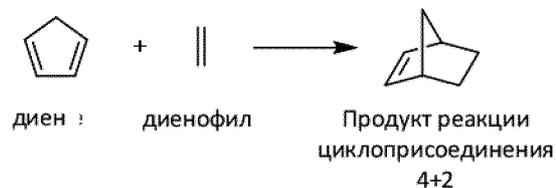
применения для получения терапевтических молекул может быть ограничено из-за длительного времени прохождения реакции, необходимости в катализаторах, которые могут окислять функциональные группы белков, гидрофобных участников реакции, которые могут влиять на свойства белка, такие как склонность к агрегации, потенциальные угрозы безопасности, связанные с взрывоопасными промежуточными соединениями (т. е. азидными соединениями), при этом перечислено лишь несколько проблем.

Кроме того, при использовании показанных выше химических реакций, предназначенных для получения ADC посредством присоединения к неприродным функциональным группам белка, требуется разработка токсина/лекарственного средства, которые содержат подходящую комплементарную реакционноспособную группу, что может усложнить разработку лекарственного средства, так как некоторые реакционноспособные группы могут быть несовместимы с некоторыми видами полезной нагрузки и/или могут оказать воздействие на свойства полезной нагрузки, такие как гидрофобность и растворимость. В настоящее время многие виды полезной нагрузки ADC были разработаны для включения малеимидных групп с целью конъюгирования с тиолами цистеина. Было бы полезно иметь альтернативный способ конъюгирования биологической молекулы с другим компонентом, таким как полимер или полезная нагрузка, например, в котором используют функциональную группу, которая доступна в настоящее время (такую как малеимид) и, как известно, совместима с широким диапазоном необходимых видов полезных нагрузок. Кроме того, было бы полезно иметь реакцию конъюгирования, которая характеризуется одним или несколькими из следующих свойств: специфичностью, быстротой прохождения, возможностью использования мягких или умеренных условий и возможностью проведения реакции с аминокислотными остатками, которые не подвержены воздействию растворителя.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Таким образом, в одном аспекте представлен способ биоконъюгирования, предусматривающий стадию конъюгирования биологической молекулы, содержащей первую ненасыщенную функциональную группу, с полезной нагрузкой, содержащей вторую ненасыщенную функциональную группу, где первая и вторая ненасыщенные функциональные группы комплементарны друг другу, вследствие чего конъюгирование представляет собой реакцию указанных функциональных групп, протекающую по механизму реакции Дильса-Альдера, при которой образуется циклогексеновое кольцо.

Реакция Дильса-Альдера, используемая в данном документе, относится к реакции циклоприсоединения 4 плюс 2, при которой образуется циклогексеновое кольцо, которое может быть частью конденсированной кольцевой системы. Типичный пример реакции показан ниже:

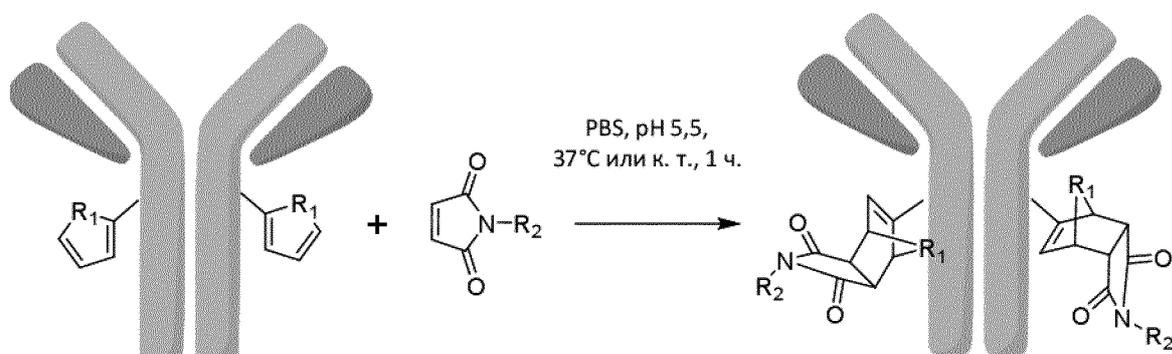


Неожиданно авторы настоящего изобретения установили, что данная реакция может использоваться при мягких условиях в специфических реакциях конъюгирования, предусматривающих биологическую молекулу. В ряде случаев данные реакции протекают в течение всего лишь двух часов при комнатной температуре. В других примерах реакция биоконъюгирования может проходить в одну стадию без необходимости в дополнительных реагентах, отличных от полезной нагрузки, белка и растворителя.

Кроме того, реакционноспособные сшивающие средства и неприродные аминокислоты, содержащие диеновую функциональную группу, требующиеся для эффективных трансформаций Дильса-Альдера, являются синтетически доступными и могут быть получены с высокими показателями выхода с помощью простого и прямого пути синтеза.

Диен или диенофил может быть встроен в биологическую молекулу посредством добавления линкера или встраивания неприродной аминокислоты в полипептидную последовательность. Необходимая комплементарная функциональная группа затем может быть встроена в полезную нагрузку.

Далее схематически представлено конъюгирование полезной нагрузки с неприродной аминокислотой, содержащей диен в аминокислоте:



Преимущественно продукт реакции конъюгирования является стабильным в биологической среде при значениях температуры тела. Однако при необходимости можно обеспечить обратную реакцию путем воздействия на продукт конъюгирования высоких температур, например, 60° С или выше.

В одном варианте осуществления первая функциональная группа (т. е. в биологической молекуле) представляет собой диен.

В одном варианте осуществления вторые функциональные группы (т. е. в полезной нагрузке) представляют собой диенофил, например, выбранный из малеимида, сложных эфиров малеиновой кислоты, сложных эфиров фумаровой кислоты, сложных эфиров акриловой кислоты, метакриловой кислоты, акрилонитрила, акриламида, метакриламида, метилвинилкетона, винилпиридина, амидов и сложных эфиров бут-2-индикарбоновой кислоты, хинона, ацетиленов.

В одном варианте осуществления вторая функциональная группа представляет собой диен.

В одном варианте осуществления первая функциональная группа (т. е. в биологических молекулах) представляет собой диенофил, например, сложные эфиры малеиновой кислоты, малеимид, сложные эфиры фумаровой кислоты, сложные эфиры акриловой кислоты, метакриловую кислоту, акрилонитрил, акриламид, метакриламид, метилвинилкетон, винилпиридин, амиды и сложные эфиры бут-2-индикарбоновой кислоты, хинон, ацетилены.

В одном варианте осуществления первая функциональная группа представляет собой диенофил в неприродной аминокислоте, например, в неприродной аминокислоте, содержащей норборнен.

В одном варианте осуществления диен предусматривает линейный диен, карбоциклический диен или гетероциклический диен, например, диен предусматривает бутадиен, циклопентадиен, 1,3-циклогексадиен, фуран или антрацен.

В одном варианте осуществления диен содержится в неприродной аминокислоте, например, в неприродной аминокислоте, полученной из лизина, цистеина, селеноцистеина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, серина, треонина, глицина и тирозина.

В одном варианте осуществления диен расположен в боковой цепи аминокислоты.

В одном варианте осуществления неприродный аминокислотный остаток имеет формулу (I):



где:

R^x представляет собой ненасыщенную группу, выбранную из:

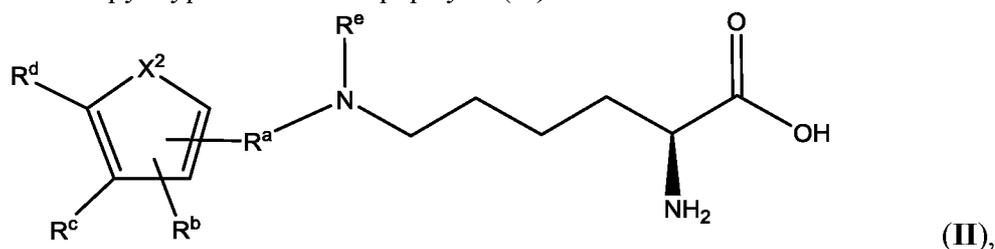
- i) линейного конъюгированного C₄₋₉диена,
 - ii) C₅₋₁₄карбоциклила, содержащего конъюгированный диен, и
 - iii) 5-14-членного гетероциклила, содержащего 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S, и конъюгированного диена,
- где i), ii) и iii) могут нести не более пяти заместителей (как например, один, два или три заместителя), например, заместителей, независимо выбранных из C₁₋₃алкила, оксо, галогена, сульфо, сульфгидрила, amino, -C₁₋₃алкиленN₃ или -C₂₋₅алкинила; и

X¹ представляет собой

- i) насыщенную или ненасыщенную, разветвленную или неразветвленную C₁₋₈алкиленовую цепь, где по меньшей мере один атом углерода (например, 1, 2 или 3 атома углерода) заменен гетероатомом, выбранным из O, N, S(O)₀₋₃, где указанная цепь необязательно замещена одной или несколькими группами, независимо выбранными из оксо, галогена, amino, -C₁₋₃алкиленN₃ или -C₂₋₅алкинила; или
- ii) вместе с атомом углерода из карбоциклила или гетероциклила представляет собой циклопропановое кольцо, связанное с насыщенной или ненасыщенной (в частности, насыщенной), разветвленной или неразветвленной C₁₋₆алкиленовой цепью, где по меньшей мере один атом углерода (например, 1, 2 или 3 атома углерода) заменен гетероатомом, выбранным из O, N, S(O)₀₋₃, где указанная цепь необязательно замещена одной или несколькими группами, независимо выбранными из оксо, галогена, amino, -C₁₋₃алкиленN₃ или -C₂₋₅алкинила, и

-O₀₋₁C(O)- связана через боковую цепь аминокислоты.

В одном варианте осуществления неприродная аминокислота представляет собой остаток со структурой согласно формуле (II):



где

X² представляет собой -C-, -C(R')-, -CH₂ или O;

R' представляет собой H или C₁₋₃-алкил,

R^a представляет собой

i) насыщенную или ненасыщенную, разветвленную или неразветвленную C₁₋₈-алкиленовую цепь, где по меньшей мере один атом углерода (например, 1, 2 или 3 атома углерода) заменен гетероатомом, выбранным из O, N, S(O)₀₋₃, где указанная цепь необязательно замещена одной или несколькими группами, независимо выбранными из оксо, галогена, амино; или

ii) вместе с атомом углерода из 5-членного кольца представляет собой циклопропановое кольцо, связанное с насыщенной или ненасыщенной (в частности, насыщенной) разветвленной или неразветвленной C₁₋₆-алкиленовой цепью, где по меньшей мере один атом углерода (например, 1, 2 или 3 атома углерода) заменен гетероатомом, выбранным из O, N, S(O)₀₋₃, где указанная цепь необязательно замещена одной или несколькими группами, независимо выбранными из оксо, галогена, амино;

R^b представляет собой H, -OC₁₋₃-алкил, C₁₋₆-алкил, необязательно несущий гидроксильный заместитель, -C₁₋₃-алкиленN₃ или -C₂₋₅-алкинил;

R^c представляет собой H, -OC₁₋₃-алкил, C₁₋₆-алкил, необязательно несущий гидроксильный заместитель, -C₁₋₃-алкиленN₃ или -C₂₋₅-алкинил;

R^d представляет собой H, -OC₁₋₃-алкил, C₁₋₆-алкил, необязательно несущий гидроксильный заместитель, -C₁₋₃-алкиленN₃ или -C₂₋₅-алкинил;

R^e представляет собой H, насыщенную или ненасыщенную (в частности, насыщенную), разветвленную или неразветвленную C₁₋₈-алкиленовую цепь, где один или несколько атомов углерода необязательно заменены -O-, и цепь необязательно замещена одним или несколькими атомами галогена (такого как йод), N₃ или -C₂₋₅-алкинилом.

В одном варианте осуществления R^a представляет собой $-(CH_2)_mC(O)-$, $-CH_2(CH_3)C(O)-$, $-(CH_2)_mCH_2OC(O)-$, $-CHCHCH_2OC(O)-$ или $-OCH_2CH_2COC(O)-$, и m представляет собой 0 или 1.

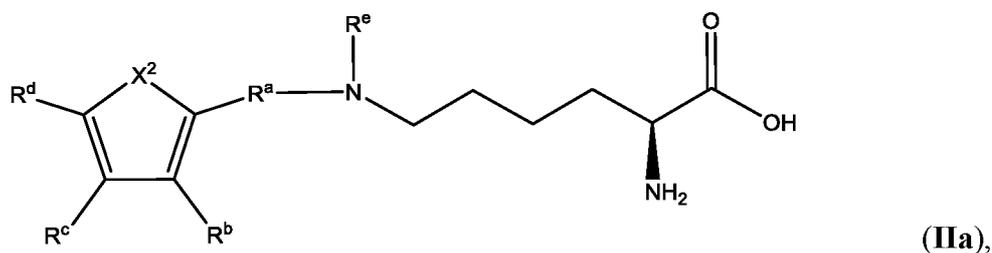
В одном варианте осуществления R^b представляет собой H, $-OC_{1-3}$ алкил, $-CH_3$, $-CH(CH_3)_2$, CH_2OH , $-CH_2N_3$ или $-CCH$.

В одном варианте осуществления R^c представляет собой H, $-OC_{1-3}$ алкил, $-CH_3$, $-CH(CH_3)_2$, CH_2OH , $-CH_2N_3$ или $-CCH$.

В одном варианте осуществления R^d представляет собой H, $-OC_{1-3}$ алкил, $-CH_3$, $-CH(CH_3)_2$, CH_2OH , $-CH_2N_3$ или $-CCH$.

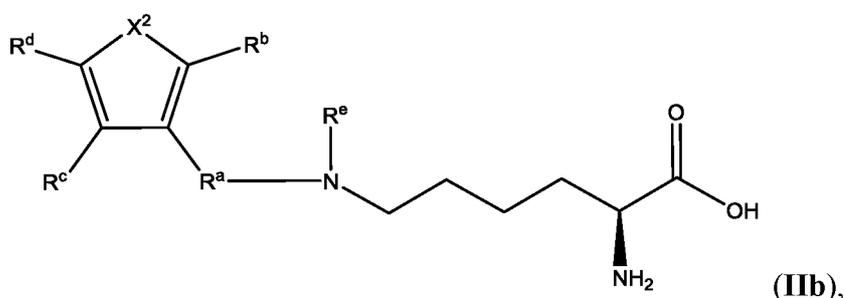
В одном варианте осуществления R^e представляет собой H или $-CH_2OCH_2CH_2N_3$.

В одном варианте осуществления неприродная аминокислота представляет собой остаток со структурой согласно формуле (IIa):



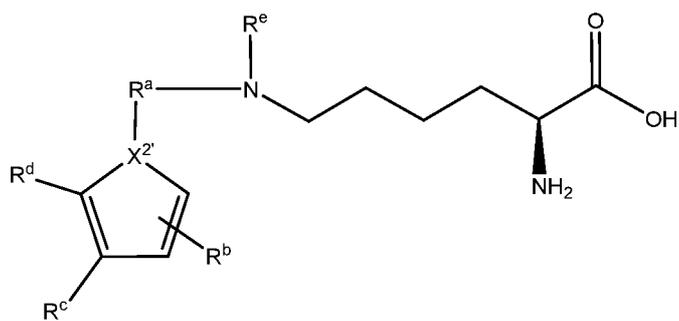
где R^a , R^b , R^c , R^d , R^e и X^2 определены выше.

В одном варианте осуществления неприродная аминокислота имеет структуру согласно формуле (IIb):



где R^a , R^b , R^c , R^d , R^e и X^2 определены выше.

В одном варианте осуществления неприродная аминокислота имеет структуру согласно формуле (IIc):

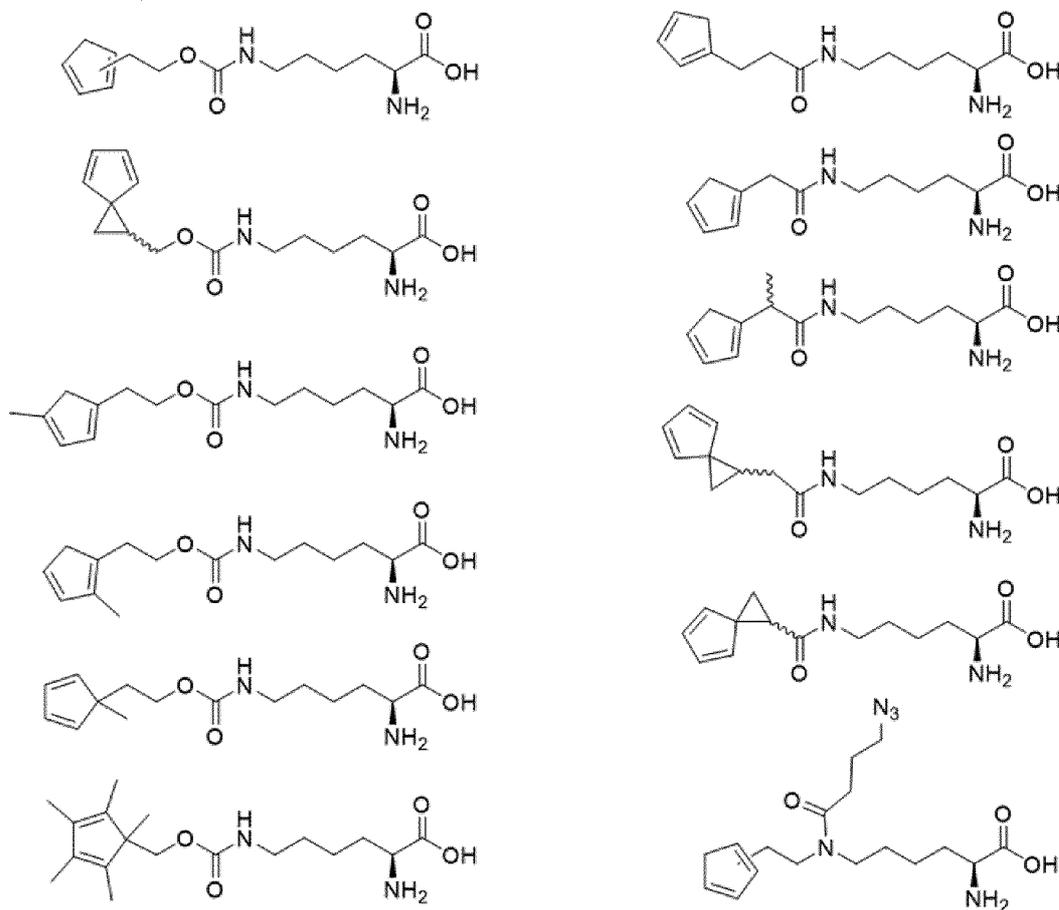


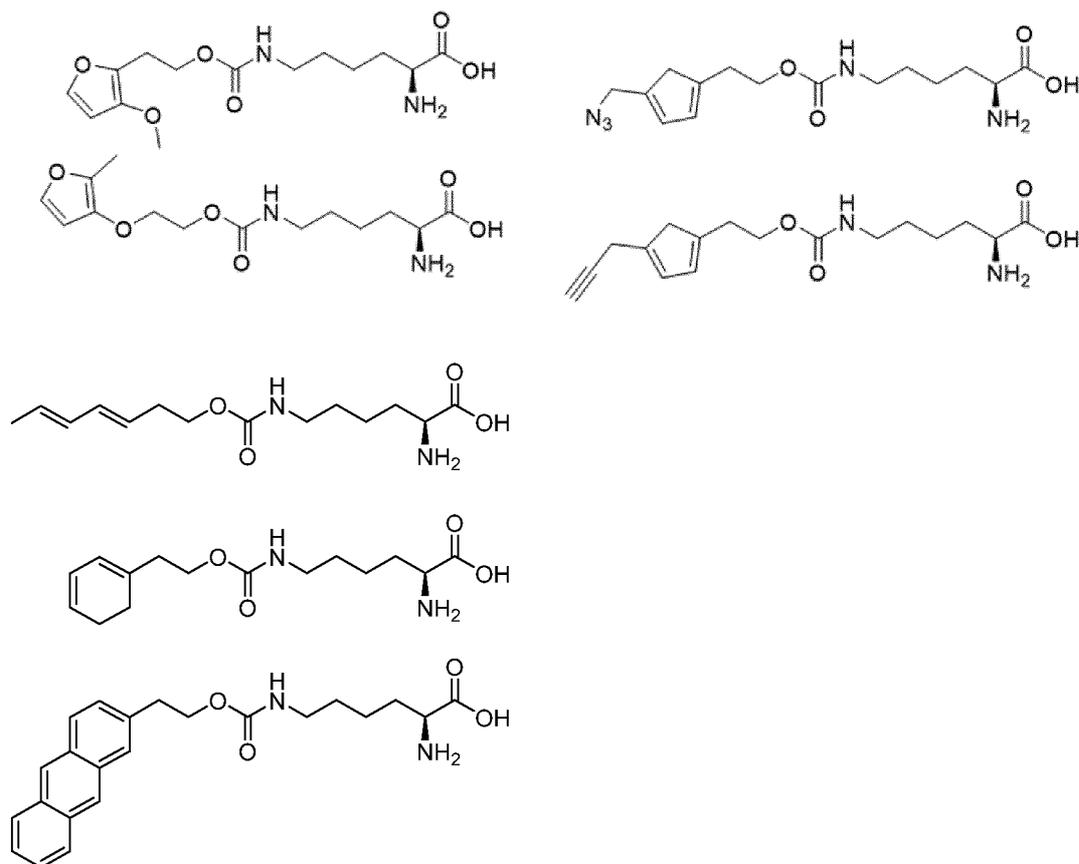
(IIIc),

где R^a , R^b , R^c , R^d , R^e определены выше, и $X^{2'}$ представляет собой -C- или -CR¹, как определено выше.

Как правило, соединения, например соединения формулы (I), (II), (IIIa), (IIIb) и (IIIc), будут содержать главным образом только одну азидную группу.

В одном варианте осуществления неприродная аминокислота выбрана из группы, включающей:





В одном варианте осуществления способ включает предварительную стадию конъюгирования диена или диенофила (в частности, диена) через линкер с аминокислотным остатком в биологической молекуле, например, где аминокислота представляет собой цистеин или лизин.

В одном варианте осуществления диен перед присоединением к указанному аминокислотному остатку в биологической молекуле имеет структуру согласно формуле (III):



где

n равняется 0 или 1;

m равняется 0 или 1;

p равняется 0 или 1;

R^X представляет собой ненасыщенную группу, выбранную из:

- i) линейного конъюгированного C₄₋₉диена,
- ii) C₅₋₁₄карбоциклила, содержащего конъюгированный диен, и
- iii) 5-14-членного гетероциклила, содержащего 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S, и конъюгированного диена,

где i), ii) и iii) могут нести не более пяти заместителей, (как например, один, два или три заместителя) например, где заместители, независимо выбраны из C₁₋₃алкила, оксо, галогена, сульфо, сульфгидрила, amino, -C₁₋₃алкиленN₃ или -C₂₋₅алкинила, и

В представляет собой C₁₋₆алкилен, -C₃₋₄циклоалкилC₁₋₆алкилен-; где необязательно остаток сахара (такого как глюкоза, глюкозамин, галактоза, галактозамин, лактоза, манноза и фруктоза) содержится в алкиленовой цепи любого из них, и где алкиленовая цепь в случае любого из указанных вариантов, определенных для **В** -, необязательно несет один или два заместителя, независимо выбранных из N- и O-связанного остатка сахара (такого как глюкоза, глюкозамин, галактоза, галактозамин, лактоза, манноза и фруктоза);

X³ представляет собой -(R¹)NC(O)-, -C(O)N(R¹)-, -OC(O)-, -OC(O)N-;

R¹ представляет собой H или -CH₂OCH₂CH₂R²;

R² представляет собой -N₃, C₂₋₅алкинил или галоген, такой как йод;

Y представляет собой -(OCH₂)_qC₂₋₆алкилен или -C₂₋₆алкилен, необязательно замещенный -NR³R⁴,

где q равняется 1-7000;

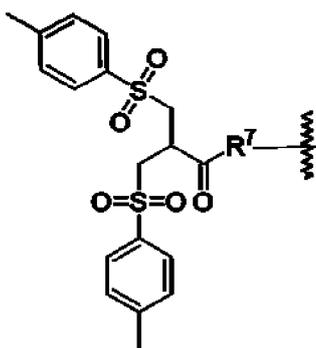
R³ и **R**⁴ независимо представляют собой H или C₁₋₃алкил;

Z представляет собой -C(O)OR⁵, R^{5'}, -NC(O)R⁶, -C₂₋₅алкилен, CH₂-O-NH₂, алкин, азид, 3-арилпропионитрил, или галоген, такой как йод;

R⁵ представляет собой C₁₋₆алкил, сукцинимид, C₆F₄H (тетрафторгексил) или H;

R^{5'} представляет собой группу, образующую поперечную связь между атомами серы, например, диброммалеимид, дихлорацетон или производное любого из них,

R⁶ представляет собой:



, где

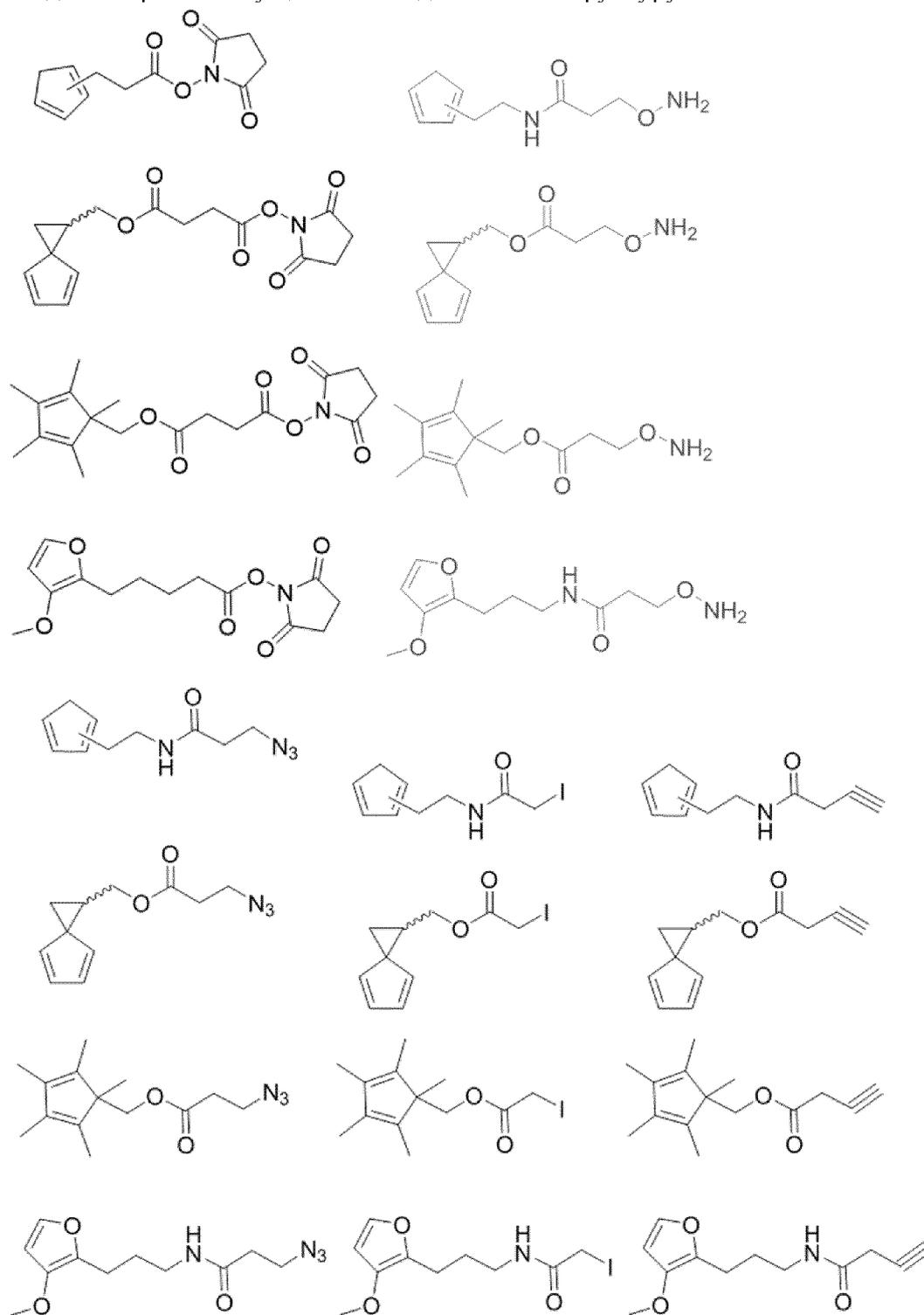
R⁷ представляет собой C₁₋₆алкилен, необязательно несущий одну или несколько (например, одну, две или три) групп, выбранных из гидроксила, сульфо, amino и -(OCH₂)_vC₂₋₆алкилена, и фенил, необязательно несущий одну или несколько (например, одну, две или три) групп, выбранных из гидроксила, сульфо, amino и -(OCH₂)_vC₂₋₆алкилена,

v представляет собой целое число, равное 1, 2, 3, 4 или 5,

~~~~~

представляет собой место связывания фрагмента с остальной частью молекулы.

В одном варианте осуществления диен имеет структуру:



В одном варианте осуществления реакцию осуществляют при температуре в диапазоне 10-40°C, например, при температуре окружающей среды.

В одном варианте осуществления реакцию проводят в водном растворителе, например, в системах на основе водного органического растворителя, в буфере, таком как PBS, необязательно содержащем полярный апротонный растворитель, такой как DMSO, или поверхностно-активное вещество, такое как полисорбат 80, или их комбинации.

В одном варианте осуществления терапевтическая биологическая молекула представляет собой полипептид, например, выбранный из группы, включающей лиганд, рецептор, молекулу антитела.

В одном варианте осуществления биологическая молекула сконструирована с добавлением или удалением одного или нескольких остатков лизина в исходной или нативной последовательности.

В одном варианте осуществления биологическая молекула сконструирована с добавлением или удалением одного или нескольких остатков цистеина в исходной или нативной последовательности.

В одном варианте осуществления биологическая молекула сконструирована с добавлением или удалением одного или нескольких остатков тирозина в исходной или нативной последовательности.

В одном варианте осуществления биологическая молекула сконструирована с добавлением одного или нескольких природных или неприродных аминокислотных остатков в исходную или нативную последовательность.

В одном варианте осуществления биологическая молекула представляет собой терапевтическую молекулу.

В одном варианте осуществления полезная нагрузка выбрана из:

- a.** ауристатина, например, выбрана из группы, включающей ММАЕ (монометил-ауристатин E), ММАF (монометил-ауристатин F), доксорубицин, тубулизин и дуокармицин;
- b.** предусматривает майтанзиноид, например, N2'-деацетил-N2'-(3-меркапто-1-оксопропил)-майтанзин (DM1), N2'-деацетил-N2'-(4-меркапто-1-оксопентил)-майтанзин (DM3) и N2'-деацетил-N2'-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)-майтанзин (DM4),
- c.** пирролобензодиазепина (PBD) или иминобензодиазепина (IBD)

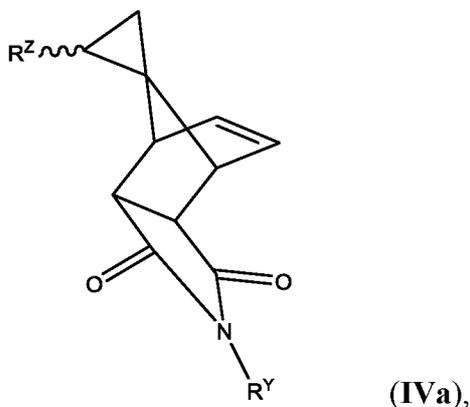
- d. ингибитора топоизомеразы, такого как SN-38, иринотекан, эксатекан или DxD1.
- e. представляет собой токсин и
- f. полимера, например, природного полимера, например, крахмала, полимера глутаминовой кислоты, полимера аспарагиновой кислоты, полимера лизина, или альбумина, или синтетического полимера, такого как PEG.

В дополнительном независимом аспекте представлена биологическая молекула, конъюгированная с полезной нагрузкой, полученная или получаемая в способе согласно настоящему изобретению.

В одном независимом аспекте также представлена биологическая молекула, конъюгированная с полезной нагрузкой посредством реакции Дильса-Альдера между диеном и диенофилом с образованием циклогексенового кольца.

В одном варианте осуществления циклогексеновое кольцо представляет собой часть конденсированной кольцевой системы, например, содержащей не более 20 атомов.

В одном варианте осуществления конденсированная кольцевая система имеет формулу (IVa):

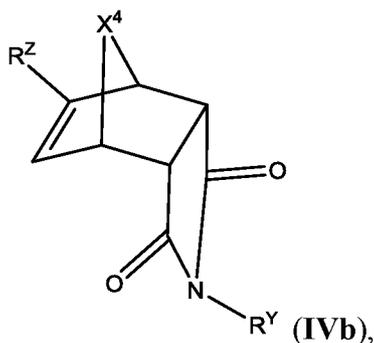


, где

$R^Y$  представляет собой полезную нагрузку, например, определенную в данном документе, и

$R^Z$  представляет собой биологическую молекулу, например, определенную в данном документе, или

формулу (IVb):



где

R<sup>Y</sup> представляет собой полезную нагрузку, например, определенную в данном документе;

R<sup>Z</sup> представляет собой биологическую молекулу, например, определенную в данном документе и

X<sup>4</sup> представляет собой -O- или -CH<sub>2</sub>-.

В одном варианте осуществления биологическая молекула представляет собой антитело или его связывающий фрагмент.

Также представлена биологическая молекула, конъюгированная с полезной нагрузкой согласно настоящему изобретению, где полезная нагрузка выбрана из:

- ауристатина, например, выбрана из группы, включающей тубулизин или пирролобензодиазепин (PBD), MMAE (монометил-ауристатин E), MMAF (монометил-ауристатин F), доксорубицин и дуокармицин;
- предусматривает майтанзиноид, например, N2'-деацетил-N2'-(3-меркапто-1-оксопропил)-майтанзин (DM1), N2'-деацетил-N2'-(4-меркапто-1-оксопентил)-майтанзин (DM3) и N2'-деацетил-N2'-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)-майтанзин (DM4),
- представляет собой токсин,
- полимера, например, природного полимера, например, крахмала, полимера глутаминовой кислоты, или альбумина, или синтетического полимера, такого как PEG.

Также представлена фармацевтическая композиция, содержащая биологическую молекулу, конъюгированную с полезной нагрузкой, согласно настоящему изобретению, и разбавитель, носитель и/или наполнитель, где, например, композиция представляет собой состав для парентерального введения.

В настоящем изобретении дополнительно представлен способ лечения пациентов, предусматривающий введение терапевтически эффективного количества биологической молекулы, конъюгированной с полезной нагрузкой, или фармацевтической композиции, раскрытых в данном документе.

Таким образом, представлена биологическая молекула, конъюгированная с полезной нагрузкой, или фармацевтическая композиция, раскрытые в данном документе, предназначенные для применения в лечении.

Дополнительным аспектом настоящего изобретения является применение биологической молекулы, конъюгированной с полезной нагрузкой, или фармацевтической композиции, раскрытых в данном документе, для изготовления лекарственного препарата.

В независимом аспекте представлена неприродная аминокислота, содержащая диен или диенофил, где, например, диен или диенофил расположены в боковой цепи.

В одном варианте осуществления неприродная аминокислота по настоящему изобретению получена из лизина, аспарагина, глутамина, цистеина, селеноцистеина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, серина, треонина, глицина и тирозина.

В одном варианте осуществления неприродная аминокислота согласно настоящему изобретению имеет формулу (I):



где:

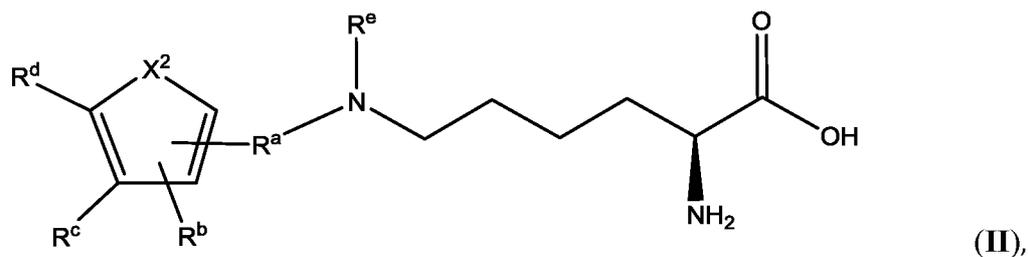
$\mathbf{R^X}$  представляет собой ненасыщенную группу, выбранную из:

- i) линейного конъюгированного C<sub>4-9</sub>диена,
  - ii) C<sub>5-14</sub>карбоциклила, содержащего конъюгированный диен, и
  - iii) 5-14-членного гетероциклила, содержащего 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S, и конъюгированного диена,
- где i), ii) и iii) могут нести один, два или три заместителя, и

$\mathbf{X^1}$  представляет собой C<sub>1-5</sub>алкил, и

$\mathbf{O_{0-1}C(O)}$  связана через боковую цепь аминокислоты.

В одном варианте осуществления неприродная аминокислота имеет формулу (II):



или ее соль, где

$X^2$  представляет собой -C-, CR', -CH<sub>2</sub> или O;  
 $R^a$  представляет собой

- i) насыщенную или ненасыщенную, разветвленную или неразветвленную C<sub>1-8</sub>алкиленовую цепь, где по меньшей мере один атом углерода (например, 1, 2 или 3 атома углерода) заменен гетероатомом, выбранным из O, N, S(O)<sub>0-3</sub>, где указанная цепь необязательно замещена одной или несколькими группами, независимо выбранными из оксо, галогена, амина; или
- ii) вместе с атомом углерода из 5-членного кольца представляет собой циклопропановое кольцо, связанное с насыщенной или ненасыщенной (например, насыщенной), разветвленной или неразветвленной C<sub>1-6</sub>алкиленовой цепью, где по меньшей мере один атом углерода (например, 1, 2 или 3 атома углерода) заменены гетероатомом, выбранным из O, N, S(O)<sub>0-3</sub>, где указанная цепь необязательно замещена одной или несколькими группами, независимо выбранными из оксо, галогена, амина;

$R^b$  представляет собой H, -OC<sub>1-3</sub>алкил, C<sub>1-6</sub>алкил, необязательно несущий гидроксильный заместитель, -C<sub>1-3</sub>алкиленN<sub>3</sub> или -C<sub>2-5</sub>алкинил;

$R^c$  представляет собой H, -OC<sub>1-3</sub>алкил, C<sub>1-6</sub>алкил, необязательно несущий гидроксильный заместитель, -C<sub>1-3</sub>алкиленN<sub>3</sub> или -C<sub>2-5</sub>алкинил;

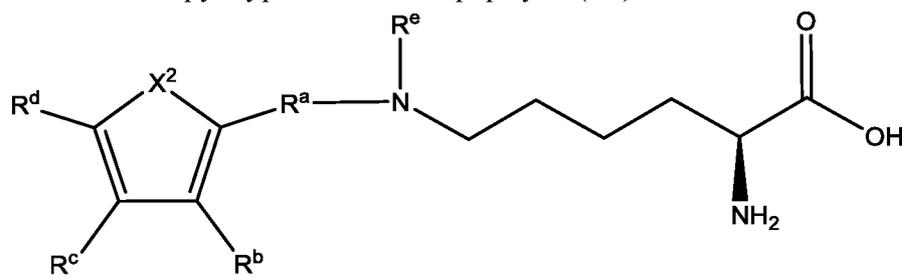
$R^d$  представляет собой H, -OC<sub>1-3</sub>алкил, C<sub>1-6</sub>алкил, необязательно несущий гидроксильный заместитель, -C<sub>1-3</sub>алкиленN<sub>3</sub> или -C<sub>2-5</sub>алкинил;

$R^e$  представляет собой H, насыщенную или ненасыщенную, разветвленную или неразветвленную C<sub>1-8</sub>алкиленовую цепь, где один или несколько атомов углерода необязательно заменены -O-,

и цепь необязательно замещена одним или несколькими атомами галогена (такого как йод),  $N_3$  или  $-C_{2,5}$ алкинилом.

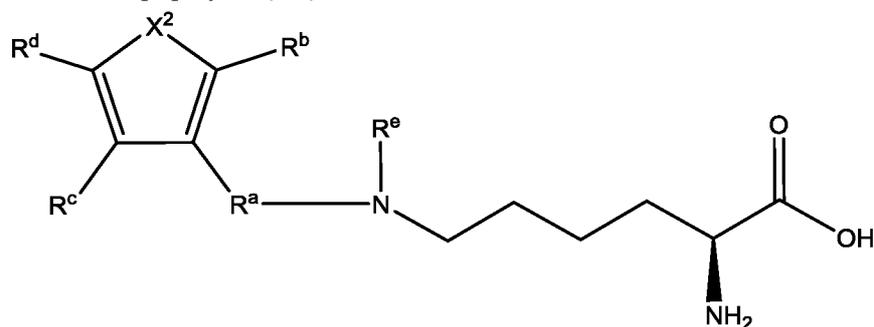
В одном варианте осуществления  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$ ,  $R^d$  и  $R^e$  являются такими, как определено в данном документе.

В одном варианте осуществления неприродная аминокислота представляет собой остаток со структурой согласно формуле (IIa):



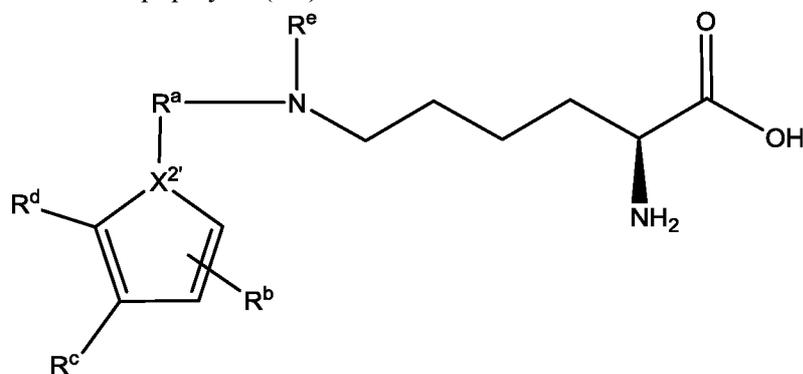
или ее соль, где  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$  и  $X^2$  определены выше для соединений формулы (II).

В одном варианте осуществления неприродная аминокислота имеет структуру согласно формуле (IIb):



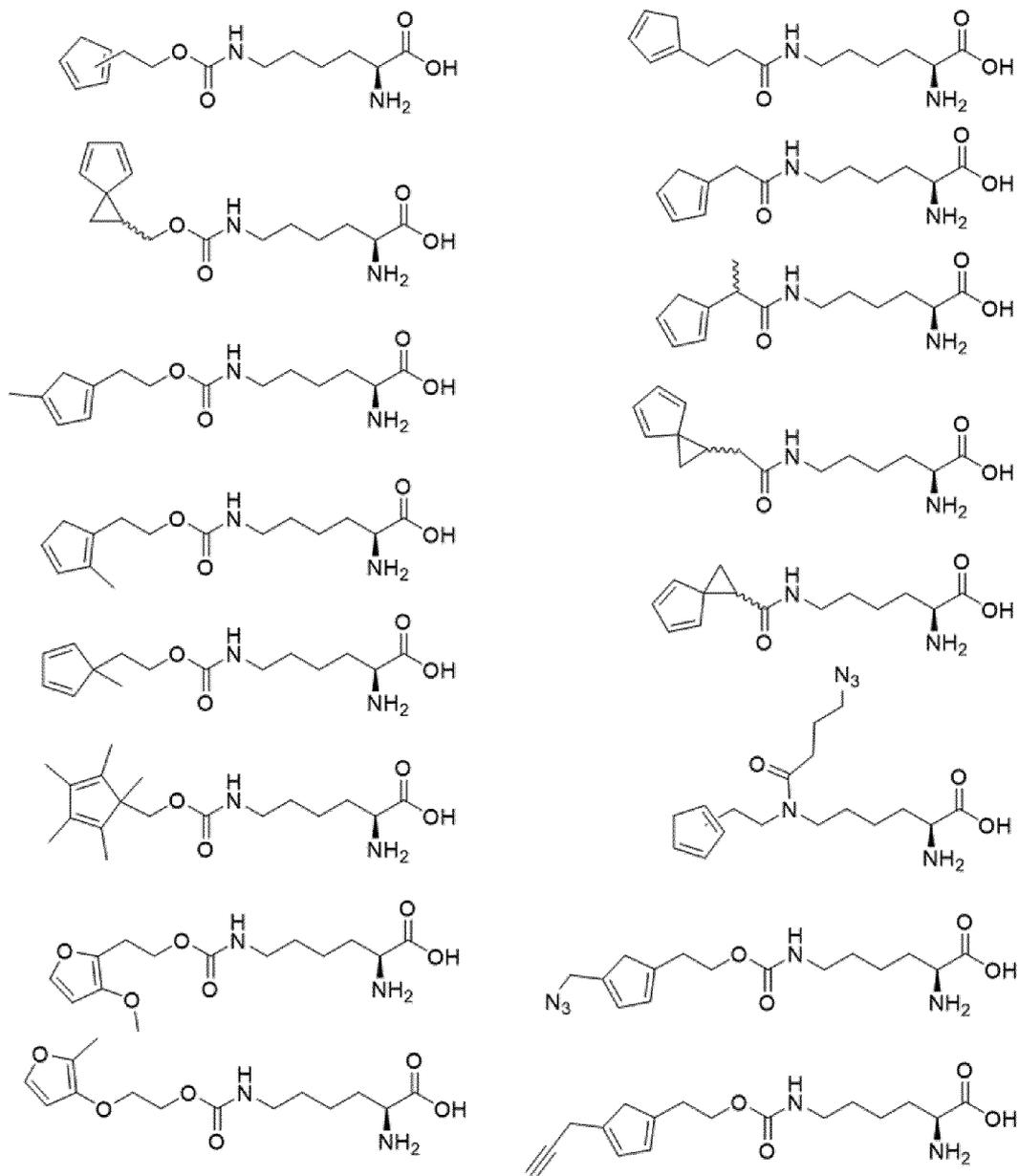
или ее соль, где  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$  и  $X^2$  определены выше для соединений формулы (II).

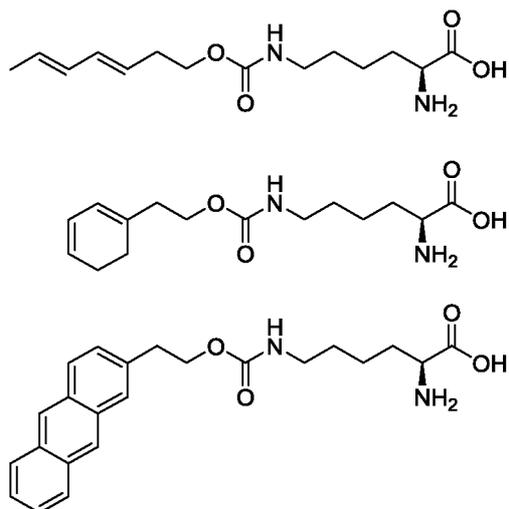
В одном варианте осуществления неприродная аминокислота имеет структуру согласно формуле (IIc):



или ее соль, где  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$  и  $X^2$  определены выше для соединений формулы (II).

В одном варианте осуществления не природная аминокислота выбрана из группы, включающей:





или соль любой из них.

Так же представлен полипептид, содержащий неприродную аминокислоту согласно настоящему изобретению.

В одном варианте осуществления в ходе реакции биоконъюгирования не происходит конъюгирования биологической молекулы с гелем или твердой частицей.

В одном независимом аспекте представлен способ биоконъюгирования, предусматривающий стадию конъюгирования биологической молекулы, содержащей первую ненасыщенную функциональную группу, с компонентом, содержащим вторую ненасыщенную функциональную группу, где первая и вторая ненасыщенные функциональные группы представляют собой комплементарную пару по отношению друг к другу, так что одна функциональная группа в комплементарной паре представляет собой диен, а вторая функциональная группа в комплементарной паре представляет собой диенофил, и при этом конъюгирование представляет собой реакцию указанных функциональных групп, протекающую по механизму реакции Дильса-Альдера, при которой образуется циклогексеновое кольцо, при условии, что диен не является незамещенным фураном.

В одном независимом аспекте представлен способ биоконъюгирования, предусматривающий стадию конъюгирования биологической молекулы, содержащей первую ненасыщенную функциональную группу в неприродной аминокислоте, с компонентом, содержащим вторую ненасыщенную функциональную группу, где первая и вторая ненасыщенные функциональные группы представляют собой комплементарную пару по отношению друг к другу, так что одна функциональная группа в комплементарной паре представляет собой диен, а вторая функциональная группа в комплементарной паре представляет собой диенофил, и при этом конъюгирование представляет собой реакцию указанных функциональных групп,

протекающую по механизму реакции Дильса-Альдера, при которой образуется циклогексеновое кольцо.

### **Подробное описание**

Выражение "биологическая молекула", используемое в данном документе, относится к полипептиду с по меньшей мере одной биологической активностью.

В одном варианте осуществления биологическая молекула представляет собой терапевтическую биологическую молекулу, а именно биологическую молекулу, которая может быть использована в терапии, в частности в терапии человека.

Термин "конъюгирование" (реакция), используемый в данном документе, относится к простой реакции связывания молекулы с другим компонентом. В контексте настоящего описания осуществляют биологическая молекула, конъюгированная, например, с полезной нагрузкой, является продуктом, полученным в результате реакции конъюгирования.

Способ биоконъюгирования, используемый в данном документе, относится к способу связывания биологической молекулы с другим компонентом, например с полезной нагрузкой.

Компонент в контексте настоящего описания включает полезную нагрузку, такую как полимер и/или токсин, твердую подложку (такую как пластина), твердую частицу или им подобные. Примеры полезных нагрузок более подробно описаны ниже.

Выражение "аминокислотный остаток", используемое в данном документе, относится к природной или неприродной аминокислоте, связанной, например, с другой аминокислотой, посредством N- и/или C-конца аминокислоты, в частности, где по меньшей мере одна связь представляет собой пептидную связь.

Выражение "неприродная аминокислота", используемое в данном документе, относится к аминокислоте, которая отличается от двадцати одной существующей в природе аминокислоты. Например, неприродная аминокислота включает диен или диенофил, а также содержит амино- и карбоксильные функциональные группы в соответствующих положениях, что является характерным для природных аминокислот. Некоторые неприродные аминокислоты и способы их получения раскрываются в патентном документе WO2015/019192, включенном в данный документ посредством ссылки. В одном варианте осуществления диенофил содержится в неприродной аминокислоте, такой как норборнен лизин, которая раскрывается в патентном документе US2015/0005481, включенном в данный документ посредством ссылки.

Неприродные аминокислоты в основном получают из природной аминокислоты. Получение из природной аминокислоты означает тот факт, что неприродная аминокислота основана на (или включает) или подобна структуре природной аминокислоты, например алкиленовая цепь в лизине, может быть укорочена с обеспечением 3-атомной углеродной цепи в противоположность природной 4-атомной углеродной цепи, но структурные подобие или сходство с лизином по-прежнему будут существовать. Таким образом, производные природных аминокислот включают такие модификации, как встраивание диена или диенофила, удлинение или укорочение алкиленовой цепи, добавление одного или нескольких заместителей к азоту, кислороду, сере в боковой цепи или превращение азота, кислорода или серы в различные функциональные группы или их любые комбинации. Как правило, большинство модификаций будут представлять собой дополнение структуры неприродной аминокислоты. Однако модификации могут включать удаление или замену атома, исходно существующего в природной аминокислоте.

Выражение "природная аминокислота", используемое в данном документе, относится к 21 протеиногенной аминокислоте (а именно: к аргинину, гистидину, лизину, аспарагиновой кислоте, глутаминовой кислоте, серину, треонину, аспарагину, глутамину, цистеину, селеноцистеину, глицину, пролину, аланину, валину, изолейцину, лейцину, метионину, фенилаланину, тирозину и триптофану).

В одном варианте осуществления неприродную аминокислоту, содержащую диен или диенофил, встраивают в аминокислотную последовательность биологической молекулы, например, в ходе процесса экспрессии рекомбинантных полипептидов. Это является преимущественным, поскольку располагает аминокислоту в определенном положении, что затем способствует высокоспецифичной реакции конъюгирования с полезной нагрузкой.

В одном варианте осуществления неприродная аминокислота может быть присоединена к биологической молекуле посредством линкера и реакции конъюгирования.

Термин "диенофил", используемый в данном документе, представляет собой функциональную группу, которая вступает в реакцию с диеном. В одном варианте осуществления диенофил включает алкен (с по меньшей мере одной двойной связью, в частности с одной двойной связью).

Термин "диен", используемый в данном документе, означает две двойные связи (две группы  $-en$ ). Однако указанные две группы пространственно должны находиться

рядом друг с другом. То есть обычно диен, используемый в данном документе, будет относиться к конъюгированному диену, если в контексте не указано иное.

Выражение "конъюгированный диен", используемое в данном документе, относится к двойной связи-одинарной связи-двойной связи в контексте линейной или циклической структуры.

Конъюгированный диен в контексте линейной структуры включает линейные конъюгированные C4-9диены, такие как бутадиен, пентадиен, гексадиен, гептадиен, октадиен и нонадиен. Линейный в данном контексте означает нециклический и, следовательно, включает разветвленный вариант углеродных C4-9цепей, которые содержат конъюгированный диен.

Конъюгированные диены в контексте циклической структуры включают, например моноциклический карбоцикл, такой как циклопентадиен или циклогексадиен, или би- или трициклическую карбоциклическую систему, такую как систему, содержащую циклопентадиен или циклогексадиен, конденсированные с другим кольцом. В одном варианте осуществления конъюгированный диен не является ароматическим. Конъюгированный диен не следует ошибочно связывать с реакцией конъюгирования, поскольку оба термина "не связаны с другом".

Термин "карбоцикл", используемый в данном документе, относится к кольцевой системе, где кольца, составляющие систему, состоят из атомов углерода т. е. гетероатомы не участвуют в образовании кольцевой структуры. Однако карбоцикл может нести один или несколько заместителей, и при этом заместитель может содержать гетероатомы. В одном варианте осуществления карбоцикл является частично ненасыщенным или ароматическим.

Циклопропан представляет собой трехчленный карбоцикл. В некоторых вариантах осуществления циклопропановое кольцо присоединено из карбоциклического диенового кольца или гетероциклического диенового кольца, например, как показано в некоторых структурах в данном документе. Это является предпочтительным, поскольку минимизирует склонность диена к внутренним реакциям, что может происходить с реакционноспособными диенами. Данное циклопропановое кольцо в настоящем описании не определено в качестве собственно заместителя, скорее оно определено относительно цепи или "линкера", которые прикреплены к кольцевой системе, содержащей диен.

C5-14карбоциклил, содержащий конъюгированный диен, используемый в данном документе, относится к 5-14-членной карбоциклической кольцевой системе, которая может нести один или несколько заместителей, например, один, два, три, четыре заместителя.

Карбоцикл, содержащий конъюгированный диен или диенофил, представляет собой часть одной из реакционноспособных функциональных групп, содержащихся в неприродной аминокислоте, или может быть компонентом линкера, присоединенного перед конъюгированием с "полезной нагрузкой". Пример C5-14карбоциклов включает цикlopentadiен (в том числе замещенный или незамещенный цикlopentadiен), циклогексадиен (в том числе замещенный или незамещенный циклогексадиен), антрацен (в том числе замещенный или незамещенный антрацен).

В одном варианте осуществления цикlopentadiен в неприродной аминокислоте или линкере является незамещенным. В одном варианте осуществления цикlopentadiен связан с неприродной аминокислотой или линкером посредством циклопропанового кольца.

В одном варианте осуществления цикlopentadiен в неприродной аминокислоте или линкере содержит один, два, три, четыре или пять C1-Залкильных заместителей, например, цикlopentadiен несет пять метильных заместителей.

Термин "гетероцикл", используемый в данном документе, относится к насыщенному, или частично ненасыщенному, или ароматическому кольцу, содержащему один или несколько, например 1, 2, 3 или 4 гетероатома, независимо выбранных из O, N и S, при этом необязательно один или два атома углерода в кольце могут нести оксо-заместитель. Безусловно, гетероатомы с любыми значениями валентности, не используемые в образовании или сохранении кольцевой структуры, могут быть заполнены водородом или заместителем при необходимости. Таким образом, заместители на гетероциклах могут быть при атоме углерода или при гетероатоме, таком как N, если это необходимо.

5-14-членный гетероцикл может содержать 5-14 членов, образующих кольцевую систему, например, содержащую один, два или три гетероатома. Гетероцикл может, например нести один, два или три заместителя. Как правило, гетероцикл будет в основном содержать диен или диенофил и, следовательно, будет по меньшей мере частично ненасыщенным, но может быть ароматическим.

5-14-членный гетероцикл будет в основном содержать диен или диенофил, предназначенный для встраивания в неприродную аминокислоту или линкер. Пример гетероциклов, содержащих диен, включает фуран (в том числе замещенный или незамещенный фуран, в частности замещенный фуран) и 2H-пиран (в том числе его замещенные или незамещенные формы). Примеры гетероциклов, содержащих диенофил, включают малеимид, винилпирдин, пирролин (такой как 2-пирролин и 3-пирролин) и 3,4-дигидропиран.

Одновременно фуран несет по меньшей мере один заместитель, например электронодонорный заместитель, такой как алкокси, в частности по меньшей мере один (например, один) метокси.

В том случае, когда диен или диенофил вводят в биологическую молекулу посредством линкера, функциональная группа, такая как N3, галоген, сукцинимид или алкин, может вступать в реакцию, например, с лизином в аминокислотной последовательности биологической молекулы.

Термин "алкил", используемый в данном документе, относится к алкилу с прямой или разветвленной цепью, к такому как без ограничения метил, этил, н-пропил, изо-пропил, бутил, н-бутил и трет-бутил. В одном варианте осуществления алкил относится к алкилу с прямой цепью.

Термин "алкокси-", используемый в данном документе, относится к алкокси- с прямой или разветвленной цепью, например, метокси-, этокси-, пропокси-, бутокси-. Термин "алкокси-", используемый в данном документе, также распространяется на варианты осуществления, в которых атом кислорода расположен в пределах алкильной цепи, например, -C1-ЗалкилOC1-Залкил, как например,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$  или  $-\text{CH}_2\text{OCH}_3$ . Таким образом, в одном варианте осуществления алкокси связана через атом углерода с остальной частью молекулы. В одном варианте осуществления алкокси связан через атом кислорода с остальной частью молекулы, например,  $-\text{COалкилOC1-балкил}$ . В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к алкокси с прямой цепью.

Термин "амино", используемый в данном документе, относится к  $-\text{NH}_2$ , при этом подразумевается, что C1-4моно- или диациламино означает соответственно  $-\text{NHC(O)C1-Залкил}$  и  $(-\text{NC(O)C1-Залкил})\text{C(O)C1-Залкил}$ .

Подразумевают, что C1-4моно- или диалкиламино соответственно означает  $-\text{NHC1-4алкил}$  и  $-\text{N(C1-4алкил)(C1-4алкил)}$ .

Галогенид или галоген включает фтор, хлор, бром или йод, в частности фтор, хлор или бром, главным образом фтор или хлор.

Термин "оксо", используемый в данном документе, относится к  $\text{C}=\text{O}$  и будет, как правило, представлен в виде  $\text{C}(\text{O})$ .

Термин "алкилен", используемый в данном документе, относится к разветвленным или неразветвленным углеродным радикалам, таким как метилен ( $-\text{CH}_2-$ ), или их цепям.

C<sub>2-5</sub>-алкин, указанный в данном документе, относится к группе или радикалу, содержащим тройную связь и 2-5 атомов углерода в линейной или разветвленной структуре.

Относительно насыщенной или ненасыщенной, разветвленной или неразветвленной C1-8алкильной цепи, где по меньшей мере один атом углерода (например, 1, 2 или 3 атома углерода, соответственно 1 или 2, в частности 1) заменен гетероатомом, выбранным из O, N, S(O)<sub>0-3</sub>, где указанная цепь необязательно замещена одной или несколькими группами, независимо выбранными из оксо, галогена, специалисту в данной области техники будет понятно, что гетероатом может заменять первичный, вторичный или третичный атом углерода, то есть CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>- или -CH-, или разветвленную углеродную группу, что технически приемлемо.

N<sub>3</sub>, используемый в данном документе, относится к азиду.

Термин "сульфо", используемый в данном документе, относится к атому серы, связанному с одним, двумя или тремя атомами кислорода.

Термин "сульфогидрил", используемый в данном документе, относится к атому серы, связанному с одним или несколькими атомами водорода, который может существовать в равновесии между протонированной и непротонированной формами.

Циклогексеновое кольцо, которое является характерным признаком конъюгированного продукта реакции согласно настоящему изобретению, протекающей по механизму Дильса-Альдера, представляет собой моноциклическую систему или часть конденсированной кольцевой системы, такой как бициклическая система.

Сахара, подходящие для присоединения к соединениям формулы (III) включают глюкозу, глюкозамин, галактозу, галактозамин, маннозу, фруктозу, галактозу, мальтозу и лактозу. Преимущественно присоединение молекулы сахара повышает растворимость.

### **Полипептиды, предназначенные для применения в настоящем изобретении**

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются в данном документе взаимозаменяемо по отношению к полимерам из аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, может содержать модифицированные аминокислоты и может быть разделен соединениями, не являющимися аминокислотами. Данные термины также охватывают полимер из аминокислот, который был модифицирован естественным путем или посредством вмешательства; например, за счет образования дисульфидной связи, гликозилирования, липидизации, ацетилирования, фосфорилирования или любой другой манипуляции или

модификации, такой как конъюгирование с метящим компонентом. В объем данного определения также включены, например, полипептиды, содержащие один или несколько аналогов аминокислот (в том числе, например, неприродные аминокислоты и т.п.), а также другие модификации, известные из уровня техники. Подразумевается, что полипептиды по настоящему изобретению основаны на антителах.

Термин "полипептид", используемый в данном документе, относится к последовательности из 5 или более аминокислот со вторичной или третичной структурой или без нее, которая содержит по меньшей мере одну тиольную группу. Таким образом, в настоящем изобретении термин "полипептиды" включает пептиды, полипептиды и белки. Они используются взаимозаменяемо, если не указано иное.

В одном варианте осуществления полипептид представляет собой белок. Белки обычно содержат вторичную и/или третичную структуру и могут быть мономерными или мультимерными по форме.

В одном варианте осуществления белок представляет собой антитело в виде одиночных цепей или ассоциированных цепей или его связывающий фрагмент.

Выражение "молекула антитела", используемое в данном документе, представляет собой общий термин, относящийся к антителам, антителосвязывающим фрагментам и конфигурациям антител, таким как полиспецифические антитела, содержащие указанные антитела или их связывающие фрагменты.

Термины "антитело" или "иммуноглобулин", используемые в данном документе взаимозаменяемо, включают полные антитела и любой их антигенсвязывающий фрагмент или отдельные цепи.

Типичное антитело содержит по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из переменного участка тяжелой цепи (в данном документе сокращенно называется VH, VH-участок или VH-домен) и константного участка тяжелой цепи. Константный участок тяжелой цепи состоит из трех или четырех константных доменов, CH1, CH2, CH3 и CH4. Fc-участок включает полипептиды, содержащие константный участок антитела за исключением первого домена константного участка иммуноглобулина, и их фрагменты. Таким образом, в случае IgG "Fc-участок" относится к CH2 и CH3 и необязательно ко всему гибкому шарнирному участку или к его части, который является N-концевым относительно данных доменов. Термин "Fc-участок" может относиться к данному участку отдельно или к данному участку в контексте антитела, фрагмента антитела или Fc-слитого белка.

Каждая легкая цепь состоит из вариабельного участка легкой цепи (в данном документе сокращенно называется VL, VL-участок или VL-домен) и константного участка легкой цепи. Константный участок легкой цепи состоит из одного домена CL.

VH- и VL-участки можно дополнительно разделять на участки гипервариабельности, называемые участками, определяющими комплементарность (CDR), которые чередуются с более консервативными участками, называемыми каркасными участками (FW). Каждый из VH и VL состоит из трех CDR и четырех FW, расположенных в направлении от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3, FW4. Каркасные участки можно обозначить согласно их соответствующим VH- и VL-участкам. Таким образом, например, VH-FW1 будет относиться к первому каркасному участку VH. Вариабельные участки тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные участки антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

Термин "антитело" означает молекулу иммуноглобулина или его антигенсвязывающий фрагмент, который распознает и специфически связывается с мишенью, такой как белок, полипептид, пептид, углевод, полинуклеотид, липид или комбинации вышеуказанных, посредством по меньшей мере одного антиген-распознающего сайта (также называемого связывающим сайтом) в вариабельном участке молекулы иммуноглобулина. Используемый в данном документе термин "антитело" охватывает интактные поликлональные антитела, интактные моноклональные антитела, фрагменты антител (такие как фрагменты Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv), фрагменты одноцепочечных антител (scFv и стабилизированный дисульфидом scFv (dsFv)), полиспецифические антитела, такие как биспецифические антитела, полученные из по меньшей мере двух различных антител, или полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител (см., например, публикации согласно PCT WO 96/27011, WO 2007/024715, WO 2009/018386, WO 2009/080251, WO 2013/006544, WO 2013/070565 и WO 2013/096291), химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, слитые белки, содержащие антигенсвязывающий фрагмент антитела, а также любую другую модифицированную молекулу иммуноглобулина, содержащую антигенсвязывающий фрагмент, при условии, что антитела проявляют необходимую биологическую активность.

Антитело может относиться к любому из пяти основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, или подклассов (изотипов) (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2), или аллотипов (например, Gm, например, G1m (f, z, a или x), G2m(n),

G3m (g, b или c), Am, Em и Km (1, 2 или 3)). Иммуноглобулины разных классов имеют разные и хорошо известные структуры субъединиц и пространственные конфигурации. Антитела могут быть получены от любого млекопитающего, включая без ограничения людей, обезьян, свиней, лошадей, кроликов, собак, кошачьих, мышей и т. д., или других животных, как например, птиц (например, кур).

Термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к фрагменту, содержащему переменные участки интактного антитела, распознающие антиген. Из уровня техники известно, что антигенсвязывающая функция антитела может осуществляться фрагментами полноразмерного антитела. Примеры фрагментов антитела включают без ограничения фрагменты Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, scFvs, линейные антитела, одноцепочечные антитела и полиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Таким образом, в одном варианте осуществления антитело, применяемое в настоящем изобретении, может содержать полную молекулу антитела, имеющую полноразмерные тяжелые и легкие цепи, или ее фрагмент и может представлять собой без ограничения Fab, модифицированный Fab, Fab', модифицированный Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, однодоменные антитела (например, VH, или VL, или VHH), scFv, би-, три- или тетравалентные антитела, Bis-scFv, диатела, триатела, тетратела, комбинации вышеупомянутых и эпитоп-связывающие фрагменты любого из вышеуказанных.

Другими конкретно рассматриваемыми антителами являются "олигоклональные" антитела, которые представляют собой заранее определенную смесь различных моноклональных антител. См., например, публикацию согласно PCT WO 95/20401; патенты США. №№ 5789208 и 6335163. Предпочтительно олигоклональные антитела состоят из заранее определенной смеси антител к одному или нескольким эпитопам, которые образуются в отдельной клетке. Более предпочтительно олигоклональные антитела содержат множество тяжелых цепей, способных к образованию пар с общей легкой цепью с получением полиспецифических антител (например, публикация согласно PCT WO 04/009618). Олигоклональные антитела являются особенно применимыми в том случае, когда необходимо целенаправленно воздействовать на несколько эпитопов на одной молекуле-мишени. Специалисты в данной области техники будут знать или смогут определить какой тип антитела или смеси антител применим для предполагаемой цели и необходимой потребности.

Другие фрагменты, конкретно рассматриваемые с целью применения в настоящем изобретении, представляют собой небольшие сконструированные белковые домены, такие как каркасная структура (см., например, публикации патентов США №№ 2003/0082630 и 2003/0157561). Каркасные структуры основаны на известных

существующих в природе семействах доменов, не относящихся к антителам, в частности на белковых внеклеточных доменах, которые, как правило, имеют небольшой размер (от ~100 до ~300 аминокислот) и содержат высоко структурированное ядро, связанное с переменными доменами с высокой конформационной толерантностью, допускающей вставки, делеции или другие замены. Такие переменные домены могут создавать предполагаемую связывающую поверхность для любого целевого белка. В целом конструирование общего каркасного белка состоит из двух основных стадий: (i) выбора подходящего корового белка с требуемыми характеристиками и (ii) получения комплексных комбинаторных библиотек путем мутагенеза части или всех доменов, допускающих высокую структурную переменность, отображения этих библиотек в соответствующем формате (т. е. фаговом, рибосомальном, бактериальном или дрожжевом) и скрининга библиотеки в отношении мутированной каркасной структуры, имеющей необходимые характеристики связывания (например, целевую специфичность и/или аффинность). Структура исходных каркасов может быть весьма разнообразной и включать высоко структурированные белковые домены, включая без ограничения домены FnIII (например, AdNectin, см., например, Protein Eng. Des. Sel. 18, 435-444 (2005), US2008/00139791 и WO 2005/056764, TN3, см. например, WO2009/058379 и WO2011/130324); Z-домены белка А (аффитело, см., например, белок Eng. Des. Sel. 17, 455-462 (2004) и EP1641818A1); домен А из LDL-рецептора (авимеры, см., например, Nature Biotechnology 23 (12), 1556-1561 (2005), и Expert Opinion on Investigational Drugs 16(6), 909-917 (June 2007)); домены анкириновых повторов (DARPin (дарпины), J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS (2003), и Biol. 369, (2007), и WO 02/20565); домены лектина С-типа (тетранектины, см., например, WO 02/48189). При необходимости два или более таких сконструированных каркасных доменов можно связать с образованием поливалентного связывающего белка. Отдельные домены могут нацелены на один тип белка или несколько, что зависит от показаний к применению/заболевания.

Фактически любая молекула (или ее часть, например, субъединицы, домены, мотивы или эпители) может быть нацелена с помощью фрагмента и/или встроена в фрагмент, включающий без ограничения интегральные мембранные белки, в том числе ионные каналы, ионные насосы, сопряженные с G-белком рецепторы, структурные белки; адгезивные белки, такие как интегрины; транспортеры; белки, участвующие в передаче сигнала, и заякоренные липидами белки, включая G-белки, ферменты, такие как киназы, включая заякоренные в мембранах киназы, связанные с мембранами ферменты, протеазы, липазы, фосфатазы, синтетазы жирных кислот, пищеварительные ферменты, такие как пепсин, трипсин и химотрипсин, лизоцим, полимеразы; рецепторы, такие как рецепторы гормонов, рецепторы лимфокинов, рецепторы

монокинов, рецепторы факторов роста, рецепторы цитокинов; цитокины и много другое.

В некоторых аспектах полипептид, используемый в настоящем изобретении, нацеливает на и/или встраивает все или часть (например, субъединицы, домены, мотивы или эпитоп) фактора роста, цитокина, родственного цитокину белка, фактора роста, лиганда рецептора или рецептора, выбранного из числа, например, FGF3, BMP1, BMP2, BMP3B (GDF10), BMP4, BMP6, BMP8, CSF1(M-CSF), CSF2 (GM-CSF), CSF3 (G-CSF), EPO, FGF1 ( $\alpha$ FGF), FGF2 ( $\beta$ FGF), FGF3 (int-2), FGF4 (HST), FGF5, FGF6 (HST-2), FGF7 (KGF), FGF9, FGF10, FGF11, FGF12, FGF12B, FGF14, FGF16, FGF17, FGF19, FGF20, FGF21, FGF23, FGFR, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FGFR6, IGF1, IGF2, IGF1R, IGF2R, IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFNA7, IFNAR1, IFNAR2, IFNB1, IFNG, IFNW1, FIL1, FIL1 (EPSILON), FIL1 (ZETA), IL1A, IL1B, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12A, IL12B, IL13, IL14, IL15, IL16, IL17, IL17B, IL18, IL19, IL20, IL22, IL23, IL24, IL25, IL26, IL27, IL28A, IL28B, IL29, IL30, IL2RA, IL1R1, IL1R2, IL1RL1, IL1RL2, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3RA, IL4R, IL5RA, IL6R, IL7R, IL8RA, IL8RB, IL9R, IL10RA, IL10RB, IL11RA, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL15RA, IL17R, IL17RA, IL17RB, IL17RC, IL17RD, IL18R1, IL20RA, IL20RB, IL21R, IL22R, IL22RA1, IL23R, IL27RA, IL28RA, PDGFA, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3, TGFBR1, TGFBR2, TGFBR3, ACVRL1, GFRA1, LTA (TNF-бета), LTB, TNF (TNF-альфа), TNFSF4 (лиганд OX40), TNFSF5 (лиганд CD40), TNFSF6 (FasL), TNFSF7 (лиганд CD27), TNFSF8 (лиганд CD30), TNFSF9 (лиганд 4-1BB), TNFSF10 (TRAIL), TNFSF11 (TRANCE), TNFSF12 (APO3L), TNFSF13 (April), TNFSF13B, TNFSF14 (HVEM-L), TNFSF15 (VEGI), TNFSF18, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF10A (Trail-рецептор), TNFRSF10B (Trail-рецептор 2), TNFRSF10C (Trail-рецептор 3), TNFRSF10D (Trail-рецептор 4), FIGF (VEGFD), VEGF, VEGFB, VEGFC, KDR, FLT1, FLT4, NRP1, IL1HY1, IL1RAP, IL1RAPL1, IL1RAPL2, IL1RN, IL6ST, IL18BP, IL18RAP, IL22RA2, AIF1, HGF, LEP (лептин), PTN, ALK и THPO.

В некоторых аспектах полипептид, используемый в настоящем изобретении, нацеливает и/или включает весь или часть (например, субъединицы, домены, мотивы или эпитоп) хемокина, рецептора хемокина или родственного хемокину белка, выбранного, например, из CCL1(I-309), CCL2 (MCP-1/MCAF), CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL8 (mcp-2), CCL11 (эотаксина), CCL13 (MCP-4), CCL15 (MIP-1d), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19 (MIP-3b), CCL20 (MIP-3a), CCL21 (SLC/exodus-2), CCL22 (MDC/STC-1), CCL23 (MPIF-1), CCL24 (MPIF-2/эотаксина-2), CCL25 (TECK), CCL26 (эотаксина-3), CCL27 (STACK/ILC), CCL28, CXCL1(GRO1), CXCL2 (GRO2), CXCL3 (GRO3), CXCL5 (ENA-

78), CXCL6 (GCP-2), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP 10), CXCL11 (I-TAC), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL14, CXCL16, PF4 (CXCL4), PPBP (CXCL7), CX3CL1 (SCYD1), SCYE1, XCL1 (лимфотактина), XCL2 (SCM-1b), BLR1 (MDR15), CCBP2 (D6/JAB61), CCR1 (CKR1/HM145), CCR2 (mcp-1RB/RA), CCR3 (CKR3/CMKBR3), CCR4, CCR5 (CMKBR5/ChemR13), CCR6 (CMKBR6/CKR-L3/STRL22/DRY6), CCR7 (CKR7/EBI1), CCR8 (CMKBR8/TER1/CKR-L1), CCR9 (GPR-9-6), CCRL1 (VSHK1), CCRL2 (L-CCR), XCR1 (GPR5/CCXCR1), CMKLR1, CMKOR1 (RDC1), CX3CR1 (V28), CXCR4, GPR2 (CCR10), GPR31, GPR81 (FKSG80), CXCR3 (GPR9/CKR-L2), CXCR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo), HM74, IL8RA (IL8Ra), IL8RB (IL8Rb), LTB4R (GPR16), TCP10, CKLFSF2, CKLFSF3, CKLFSF4, CKLFSF5, CKLFSF6, CKLFSF7, CKLFSF8, BDNF, C5R1, CSF3, GRCC10 (C10), EPO, FY (DARC), GDF5, HIF1A, IL8, PRL, RGS3, RGS13, SDF2, SLIT2, TLR2, TLR4, TREM1, TREM2, и VHL.

В некоторых аспектах полипептид, используемый в настоящем изобретении, нацеливает и/или включает весь или часть (например, субъединицы, домены, мотивы или эпитоп) белка, выбранного из числа, например, ренина; гормона роста, в том числе гормон роста человека и бычьего гормона роста; соматотропин-рилизинг-фактора; паратиреоидного гормона; тиреотропного гормона; липопротеинов; альфа-1-антитрипсина; А-цепи инсулина; В-цепи инсулина; проинсулина; фолликулостимулирующего гормона; кальцитонина; лютеинизирующего гормона; глюкагона; факторов свертывания крови, таких как фактор VII, фактор VIII, фактор IX, тканевой фактор (TF) и фактор фон Виллебранда; факторов, препятствующих свертыванию крови, таких как С-белок; предсердного натрийуретического фактора; легочного сурфактанта; активатора плазминогена, такого как урокиназа, или мочи или тканевого типа активатор плазминогена человека (t-PA); бомбезина; тромбина; гемопоэтического фактора роста; фактора некроза опухоли альфа и бета; энкефалиназы; RANTES (хемокин, экспрессируемый и секретируемый Т-клетками при активации); воспалительного белка макрофагов человека (MIP-1-альфа); сывороточного альбумина, такого как человеческий сывороточный альбумин; мюллеровой ингибирующей субстанции; А-цепи релаксина; В-цепи релаксина; прорелаксина; мышинового гонадотропин-ассоциированного белка; микробного белка, такого как бета-лактамаза; ДНКазы; IgE; цитотоксического Т-лимфоцит-ассоциированного антигена (CTLA), такого как CTLA-4; ингибина; активина; белка А или D; ревматоидных факторов; нейротрофического фактора, такого как костный нейротрофический фактор (BDNF), нейротрофин-3,-4,-5 или -6 (NT-3, NT-4, NT-5 или NT-6) или фактора роста нервов; эпидермального фактора роста (EGF); белков, связывающих инсулиноподобный фактор роста; CD-белков, таких как CD2, CD3, CD4, CD 8, CD11a, CD14, CD18, CD19, CD20, CD22, CD23, CD25, CD33, CD34, CD40, CD40L, CD52, CD63, CD64, CD80 и CD147; эритропоэтина; остеоиндуктивных

факторов; иммунотоксина; супероксиддисмутаза; рецепторов Т-клеток; поверхностных мембранных белков; фактора ускорения распада; вирусного антигена, такого как, например, часть оболочки вируса AIDS, например, gp120; транспортных белков; "хоминг"-рецепторов; адрессинов; регуляторных белков; молекул клеточной адгезии, таких как LFA-1, Mac 1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, ICAM-3 и VCAM, интегрин  $\alpha 4/\beta 7$  и интегрин  $Xv/\beta 3$ , в том числе весь или его субъединицы, альфа-субъединицы интегрин, такие как CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, альфа7, альфа8, альфа9, альфаD, CD11a, CD11b, CD51, CD11c, CD41, альфаIIb, альфаIELb; бета-субъединицы интегрин, такие как CD29, CD 18, CD61, CD104, бета5, бета6, бета7 и бета8; комбинации субъединиц интегрин, в том числе без ограничения  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 5$  и  $\alpha 4\beta 7$ ; компонента пути апоптоза; IgE; антигенов группы крови; рецептора  $flk2/flt3$ ; рецептора ожирения (OB); рецептора  $mpl$ ; CTLA-4; С-белка; Eph-рецептора, такого как EphA2, EphA4, EphB2 и т.д.; человеческого лейкоцитарного антигена (HLA), такого как HLA-DR; белков комплемента, таких как рецептор комплемента CR1, C1Rq и другие факторы комплемента, такие как C3 и C5; гликопротеинового рецептора, такого как GpIba, GPIIb/IIIa и CD200.

Также рассматриваются фрагменты, которые специфически связывают и/или содержат раковые антигены, в том числе без ограничения ALK-рецептор (рецептор плеотрофина), плеотрофин, панкарциномный антиген KS 1/4; антиген карциномы яичника (CA125); кислую фосфатазу предстательной железы; простатоспецифический антиген (PSA); меланома-ассоциированный антиген p97; антиген меланомы gp75; высокомолекулярный антиген меланомы (HMW-MAA); простатоспецифический мембранный антиген; карциноэмбриональный антиген (CEA); полиморфный эпителиальный муциновый антиген; антиген жировых глобул грудного молока; антигены, ассоциированные с колоректальными опухолями, такие как: CEA, TAG-72, CO17-1A, GICA 19-9, STA-1 и LEA; антиген-38.13 лимфомы Беркитта; CD19; антиген-CD20 В-клеточной лимфомы человека; CD33; меланома-специфические антигены, такие как ганглиозид GD2, ганглиозид GD3, ганглиозид GM2 и ганглиозид GM3; опухолеспецифичный поверхностный антиген трансплантационного типа (TSTA); антигены вирусно-индуцированных опухолей, в том числе Т-антиген, опухолевые ДНК-содержащие вирусы и антигены оболочки опухолевых РНК-содержащих вирусов; онкофетальный антиген альфа-фетопропротеин, такой как CEA кишечника, онкофетальный трофобластный гликопротеин 5T4 и онкофетальный антиген опухоли мочевого пузыря; антиген дифференцировки, такой как антиген карциномы легких человека L6 и L20; антигены фибросаркомы; Т-клеточный антиген-Gp37 лейкоза человека; неогликопротеин; сфинголипиды; антигены рака молочной железы, такие как EGFR (рецептор эпидермального фактора роста); NY-BR-16, NY-BR-16, антиген HER2 (p185HER2) и HER3; полиморфный эпителиальный муцин (PEM); антиген-АРО-

I озлокачествленных лимфоцитов человека; антиген дифференцировки, такой как антиген I, выявленный в фетальных эритроцитах; антиген I первичной эндодермы, выявленный в эритроцитах взрослых; предимплантационные эмбрионы; I(Ma), выявляемый при аденокарциномах желудка; M18, M39, выявленные в эпителии молочной железы; SSEA-1, выявленный в миелоидных клетках; VEP8; VEP9; My1; VIM-D5; D156-22, выявленный при колоректальном раке; TRA-1-85 (группа крови H); SCP-1, выявляемый при раке яичка и яичника; C14, выявляемый при аденокарциноме толстой кишки; F3, выявляемый при аденокарциноме легкого; AN6, выявляемый при раке желудка; гаптен Y; Ley, выявляемый в клетках эмбриональной карциномы; TL5 (группа крови A); EGF-рецептор, выявленный в клетках A431; серию E1 (группа крови B), выявляемую при раке поджелудочной железы; FC10.2, выявленный в клетках эмбриональной карциномы; антиген аденокарциномы желудка; CO-514 (группа крови Lea), выявляемый при аденокарциноме; NS-10, выявляемый при аденокарциномах; CO-43 (группа крови Leb); G49, выявляемый в EGF-рецепторе клеток A431; MH2 (группа крови ALeb/Ley), выявляемый при аденокарциноме толстой кишки; 19.9, выявляемый при раке толстой кишки; муцины рака желудка; T5A7, выявляемый в миелоидных клетках; R24, выявляемый при меланоме; 4.2, GD3, D1.1, OFA-1, GM2, OFA-2, GD2 и M1:22:25:8, выявленный в клетках эмбриональной карциномы, и SSEA-3 и SSEA-4, выявленные в эмбрионах на 4-8-клеточной стадии; антиген кожной Т-клеточной лимфомы; антиген MART-1; антиген сиалил-Tn (STn); антиген рака толстой кишки NY-CO-45; вариант А антигена рака легкого NY-LU-12; антиген аденокарциномы ART1; ассоциированный с паранеопластическим синдромом антиген рака яичка-головного мозга (онконейрональный антиген MA2; паранеопластический нейрональный антиген); нейроонкологический вентральный антиген 2 (NOVA2); ген антигена 520 гепатоцеллюлярной карциномы; опухоль-ассоциированный антиген CO-029; опухоль-ассоциированные антигены MAGE-C1 (раково-тестикулярный антиген CT7), MAGE-B1 (антиген MAGE-XP), MAGE-B2 (DAM6), MAGE-2, MAGE-4a, MAGE-4b и MAGE-X2; раково-тестикулярный антиген (NY-EOS-1) и фрагменты любого из выше перечисленных полипептидов.

В одном варианте осуществления используемый полипептид является рекомбинантным. "Рекомбинантный" полипептид или белок относится к полипептиду или белку, полученным посредством технологии рекомбинантных ДНК. Полученные рекомбинантным путем полипептиды и белки, экспрессированные в сконструированных клетках-хозяевах, считаются выделенными для целей настоящего изобретения, поскольку являются нативными или рекомбинантными полипептидами, отделенными, фракционированными или частично или в значительной степени очищенными с помощью любой подходящей методики. Раскрытые в данном документе полипептиды можно получить рекомбинантным путем с применением

известных в данной области техники способов. В качестве альтернативы раскрытые в данном документе белки и пептиды можно синтезировать химическим путем.

### **Молекулы, представляющие собой полезную нагрузку**

Компонент включает частицу (такую как наночастица или микрочастица), твердую подложку (такую как пластина), а также включает полезную нагрузку.

Полезная нагрузка обычно не распространяется на включение частицы или твердой подложки. Как правило, полезная нагрузка приносит некоторое улучшение биологической молекуле и, например дополняет или оптимизирует свойства конечного терапевтического продукта конъюгирования. Улучшения включают целенаправленное воздействие, повышенную растворимость, увеличенный период полувыведения, эффекторную функцию, дополнительную (еще одну новую активность), повышенную активность, обеспечение детектируемых меток, снижение токсичности (например, полезная нагрузка может превращать биологическую молекулу в пролекарство).

Выражение "полезная нагрузка", используемое в данном документе, относится к молекуле или компоненту, которые предназначены для "доставки" к целевому участку путем конъюгирования с полипептидом. В большинстве случаев полезная нагрузка обычно будет представлять собой эффекторную молекулу, например, выбранную из группы, состоящей из токсина, например, цитотоксина, как например, химиотерапевтического средства, лекарственного средства, пролекарства, фермента, иммуномодулятора, антиангиогенного средства, проапоптического средства, цитокина, гормона, антитела или его фрагмента, синтетического или существующего в природе полимеров, нуклеиновых кислот и их фрагментов, например, ДНК, РНК и их фрагменты (например, антисмысловая молекула или ген), радионуклидов, в частности, радиоактивного йода, радиоактивных изотопов, хелатированных металлов, наночастиц и репортерных групп, как например, флуоресцентные соединения или соединения, которые могут быть обнаружены с помощью ЯМР- или ЭПР-спектроскопии.

В одном варианте осуществления полезная нагрузка выбрана из группы, включающей токсин, лекарственное средство, радионуклид, иммуномодулятор, цитокин, лимфокин, хемокин, фактор роста, фактор некроза опухоли, гормон, антагонист гормона, фермент, олигонуклеотид, ДНК, РНК, siRNA, RNAi, микроРНК, пептидную нуклеиновую кислоту, фотоактивное терапевтическое средство, антиангиогенное средство, проапоптотическое средство, не природную аминокислоту, пептид, липид, полимер, углеводов, каркасную молекулу, флуоресцентную метку, пептид для визуализации, биотин, средство, удлиняющее период полувыведения из сыворотки крови, метку захвата, хелатирующее средство, твердую подложку или их комбинацию.

В одном варианте осуществления полезной нагрузкой является молекула лекарственного средства (также называемая в данном документе лекарственным средством). Примеры молекул лекарственного средства для применения в настоящем изобретении включают азотистый иприт, производное этиленимина, алкилсульфонаты, нитрозомочевину, гемцитабин, триазен, аналог фолиевой кислоты, антрациклин, таксан, ингибитор СОХ-2, аналог пиримидина, аналог пурина, антибиотик, ингибитор фермента, эпиподофиллотоксин, платиновый координационный комплекс, алкалоид барвинка, замещенную мочевину, производное метилгидразина, средство для подавления функции коры надпочечников, антагонист гормона, эндостатин, таксол, камптотецин, доксорубицин, аналог доксорубицина, антиметаболит, алкилирующее средство, антимитотическое средство, антиангиогенное средство, ингибитор тирозинкиназы, ингибитор mTOR, ингибитор топоизомеразы, ингибитор белка теплового шока (HSP90), ингибитор протеосомы, ингибитор HDAC, проапоптотическое средство, метотрексат, СРТ-11 или их комбинация, и в которых присутствует конъюгирование.

В конкретных аспектах лекарственное средство представляет собой амифостин, цисплатин, дакарбазин, дактиномицин, мехлорэтамин, стрептозоцин, циклофосфамид, кармустин, ломустин, инкапсулированный в липосомы доксорубицин, гемцитабин, даунорубицин, инкапсулированный в липосомы даунорубицин, прокарбазин, митомицин, цитарабин, этопозид, метотрексат, 5-фторурацил, винбластин, винкристин, блеомицин, паклитаксел, доцетаксел, альдеслейкин, аспарагиназу, бусульфан, карбоплатин, кладрибин, 10-гидрокси-7-этилкамптотецин (SN38), gefitinib, дакарбазин, флоксуридин, флударабин, гидроксимочевину, ифосфамид, идарубицин, месну, интерферон альфа, интерферон бета, иринотекан, митоксантрон, топотекан, лейпролид, мегестрол, мелфалан, меркаптопурин, пликамицин, митотан, пэгаспаргазу, пентостатин, пипоброман, пликамицин, стрептозоцин, тамоксифен, тенипозид, тестолактон, тиогуанин, тиотепу, урациловый иприт, винорелбин, хлорамбуцил, ингибиторы ароматазы и их комбинации.

В одном варианте осуществления лекарственное средство выбрано из группы, включающей алкилфосфохолины, ингибиторы топоизомеразы I, таксоиды и сурамин.

В одном варианте осуществления полезная нагрузка предусматривает тубулизин, например тубулизин А, который представляет собой цитотоксический пептид с антимитотической активностью.

В одном из вариантов осуществления токсин предусматривает цитотоксины или цитотоксические средства, в том числе любые средства, которые наносят ущерб (например уничтожают) клеткам. Примеры включают аплидин, анастрозол,

азацидин, бортезомиб, бриостатин-1, бусульфан, комбрестатины, кармустин, доластатины, эпотилоны, стауроспорин, майтанзиноиды, спонгистатины, ризоксин, галихондрины, роридины, гемиастерлины, таксол, цитохалазин В, грамицидин D, этидия бромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пурамицин и их аналоги или гомологи.

В одном варианте осуществления лекарственное средство (так же цитотоксин в данном случае) включает антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, дакарбазин), алкилирующие средства (например, хлорметин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромоманнит, стрептозотоцин, митомицин C, и цис-дихлородиаминоплатина (II) (DDP) или цисплатин), карбоплатин, антрациклины (например, даунорубицин (прежде дауномицин) и доксорубицин или доксорубицин-глюкуронид), антибиотики (например, дактиномицин (прежде актиномицин), блеомицин, митрамицин, антрамицины (AMC), калихеамицин или дуокармицины) и антимитотические средства (например, винкристин и винбластин).

В некоторых аспектах лекарственное средство представляет собой ауристатин (патенты США №№ 5635483; 5780588), например, ММАЕ (монометил-ауристатин E) или ММАF (монометил-ауристатин F). В других аспектах лекарственное средство представляет собой доластатин или пептидный аналог или производное доластатина. Было показано, что доластатины и ауристатины нарушают динамику образования микротрубочек, гидролиз GTP и деление ядер и клеток (Woyke et al, *Antimicrob, Agents and Chemother.* 45:3580-3584 (2001)), а также обладают противораковой активностью (патентный документ US5663149). Фрагмент лекарственного средства, представляющего собой доластатин или ауристатин, может быть присоединен к соединению-конъюгату через N (амино)-конец или C (карбокси)-конец пептидного фрагмента лекарственного средства. См., например, международную публикацию № WO2002/088172, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей ее полноте.

В других аспектах лекарственное средство представляет собой майтанзиноид. В некоторых аспектах майтанзиноид представляет собой N2'-деацетил-N2'-(3-меркапто-1-оксопролил)-майтанзин (DM1), N2'-деацетил-N2'-(4-меркапто-1-оксопентил)-майтанзин (DM3) или N2'-деацетил-N2'-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)-майтанзин (DM4). Майтанзиноиды представляют собой ингибиторы митоза, которые действуют путем ингибирования полимеризации тубулина. Майтанзин впервые был выделен из восточноафриканского кустарника *Maytenus serrata* (патент США № 3896111). Позднее

обнаружили, что определенные микроорганизмы также продуцируют майтанзиноиды, такие как майтанзинол и С-3-сложные эфиры майтанзинола (патент США № 4151042). Синтетический майтанзинол и его производные и аналоги раскрыты, например, в патентах США №№ 4137230; 4248870; 4256746; 4260608; 4265814; 4294757; 4307016; 4308268; 4308269; 4309428; 4313946; 4315929; 4317821; 4322348; 4331598; 4361650; 4364866; 4424219; 4450254; 4362663 и 4371533, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

Фрагменты лекарственного средства, представляющего собой майтанзиноид, являются перспективными фрагментами в составе конъюгатов антитело-лекарственное средство в связи с тем, что они: (i) являются относительно доступными для получения путем ферментации или химической модификации, дериватизации продуктов ферментации, (ii) поддаются дериватизации с помощью функциональных групп, подходящих для конъюгирования посредством линкеров, не содержащих дисульфидные связи, с антителами, (iii) стабильны в плазме крови и (iv) эффективны в отношении широкого диапазона линий опухолевых клеток. Конъюгаты, содержащие майтанзиноиды, способы их получения и их терапевтическое применение раскрыты, например, в патентах США №№ 5208020, 5416064 и в Европейском патенте EP0425235; Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) (описаны иммуноконъюгаты, содержащие майтанзиноид, обозначенный DM1) и Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992), которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Майтанзиноиды хорошо известны из уровня техники, и их можно синтезировать с помощью известных методик или выделять из природных источников. Подходящие майтанзиноиды раскрыты, например, в патенте США №5208020. Иллюстративные фрагменты лекарственного средства, представляющего собой майтанзиноид, включают такие фрагменты, у которых имеется модифицированное ароматическое кольцо, как например, С-19-дехлор (патентный документ US№4256746), полученный путем восстановления ансамитоцина P2 с помощью алюмогидрида лития); С-20-гидрокси (или С-20-деметил)+/-С-19-дехлор (патенты США №№4361650 и 4307016) (полученные посредством деметилирования с использованием *Streptomyces* или *Actinomycetes* или дехлорирования с использованием LAH) и С-20-деметокси, С-20-ацилокси (—OCOR), +/-дехлор (патент США №4294757) (полученный посредством ацилирования с использованием хлорангидридов), и фрагменты с модификациями в других положениях. Иллюстративные фрагменты лекарственного средства, представляющего собой майтанзиноид, также включают такие фрагменты, в которых имеются модификации, как например, С-9-SH, полученная с помощью реакции майтанзинола с H<sub>2</sub>S или P<sub>2</sub>S<sub>5</sub> (патент США №4424219); С-14-

алкоксиметил(деметокси/CH<sub>2</sub>OR) (патент США №4331598); C-14-гидроксиметил или ацилоксиметил (CH<sub>2</sub>OH или CH<sub>2</sub>OAc), полученная из *Nocardia* (патент США №4450254); C-15-гидрокси/ацилокси, полученная путем превращения майтанзинола с помощью *Streptomyces* (патент США № 4364866); C-15-метокси, выделенный из *Trewia nudiflora* (патент США №№4313946 и 4315929); C-18-N-деметил, полученная путем деметилирования майтанзинола с помощью *Streptomyces* (патент США №№4362663 и 4322348), и 4,5-дезоксид, полученная путем восстановления майтанзинола с помощью трихлорида титана/ЛАН (патент США №4371533). Известно много положений на соединениях, представляющих собой майтанзин, применимых в качестве положения для связывания в зависимости от типа связи. Например, для образования сложноэфирной связи подходящими являются все из положения C-3 с гидроксильной группой, положения C-14, модифицированного гидроксиметилом, положения C-15, модифицированного гидроксильной группой, и положения C-20 с гидроксильной группой.

В некоторых аспектах лекарственное средство представляет собой калихеамицин. Антибиотики семейства калихеамицинов способны индуцировать двухнитевые разрывы ДНК в субпиколярных концентрациях. Касательно получения конъюгатов на основе семейства калихеамицинов см., например, патенты США №№5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001, 5877296, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте. Структурные аналоги калихеамицина, которые могут использоваться, включают без ограничения  $\gamma$ II,  $\alpha$ II,  $\alpha$ 3I, N-ацетил- $\gamma$ II, PSAG и  $\theta$ 11 (Hinman et al., *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993), Lode et al., *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998) и вышеупомянутые патенты США, закрепленные за American Cyanamid).

В некоторых аспектах лекарственное средство представляет собой тубулизин. Тубулизины являются представителями класса природных веществ, выделенных из видов миксобактерий (Sasse et al., *J. Antibiot.* 53:879-885 (2000)). В качестве средств, взаимодействующих с цитоскелетом, тубулизины являются митотическими ядами, которые ингибируют полимеризацию тубулина и приводят к блокированию клеточного цикла и апоптозу (Steinmetz et al., *Chem. Int. Ed.* 43:4888-4892 (2004); Khalil et al., *ChemBioChem.* 7:678-683 (2006); Kaur et al., *Biochem. J.* 396: 235-242 (2006)). Тубулизины являются высокоэффективными цитотоксическими молекулами, превосходящими в отношении ингибирования роста клеток любые клинически подходящие традиционные химиотерапевтические средства, например, эпотилоны, паклитаксел и винбластин. Кроме того, они эффективны в отношении линий клеток с множественной лекарственной устойчивостью (Domling et al., *Mol. Diversity* 9:141-147 (2005)). Данные соединения демонстрируют высокую цитотоксичность при

тестировании в отношении панели линий раковых клеток со значениями IC50 в узком пикомолярном диапазоне; таким образом, они представляют интерес в качестве противораковых терапевтических средств. См., например, международную публикацию № WO/2012019123, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей ее полноте. Конъюгаты с тубулизином раскрыты, например, в патентном документе US7776814.

В некоторых аспектах лекарственное средство представляет собой пирролобензодиазепин (PBD). PBD представляют собой относительно небольшие молекулы, и некоторые из них обладают способностью распознавать и ковалентно связываться со специфичными последовательностями в малой бороздке ДНК и, следовательно, проявляют антибиотическую/противоопухолевую активность. Ряд PBD и их производных известны из уровня техники, например, димеры PBD (например, SJG-136 или SG2000), C2-ненасыщенные димеры PBD, пирролобензодиазепиновые димеры, несущие арильные заместители в C2 (например, SG2285), пролекарство на основе димеров PBD, активируемое гидролизом (например, SG2285), и полипиррол-PBD (например, SG2274). PBD дополнительно описаны в международных публикациях №№ WO2000/012507, WO2007/039752, WO2005/110423, WO2005/085251 и WO2005/040170, и в патенте США №7612062, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей его полноте.

В некоторых аспектах лекарственное средство представляет собой ингибитор топоизомеразы. Ингибиторы топоизомеразы представляют собой соединения, которые блокируют действие топоизомеразы (топоизомераз I и II), которые являются ферментами, контролирующими изменения в структуре ДНК с помощью катализирования, введения разрыва и присоединения фосфодиэфирной связи нитей ДНК в ходе нормального клеточного цикла.

В некоторых аспектах токсин включает, например, абрин, бруцин, цикутоксин, дифтерийный токсин, ботулотоксин, шига-токсин, эндотоксин, столбнячный токсин, коклюшный токсин, сибиреязвенный токсин, холерный токсин, фалкаринол, альфа-токсин, гелданамицин, гелонин, лотавастрин, рицин, стрихнин, тетродотоксин, сапонин, рибонуклеазу (РНКазу), ДНКазу I, стафилококковый энтеротоксин-A, противовирусный белок лаконоса, экзотоксин синегнойной палочки, эндотоксин синегнойной палочки или их комбинацию. В других аспектах токсин включает, например, цепь A модессина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, диантиновые белки, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор из *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор из *Saponaria officinalis*, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, неомицин, трихотецины или их комбинацию. См., например, международную публикацию № WO1993/021232.

В некоторых аспектах хелатирующее средство представляет собой DTPA, ЕС, DMSA, EDTA, Cy-EDTA, EDTMP, DTPA, CyDTPA, Cy<sub>2</sub>DTPA, BOPTA, DTPA-MA, DTPA-BA, DTPMP, DOTA, TRITA, TETA, DOTMA, DOTA-MA, HP-DO3A, pNB-DOTA, DOTP, DOTMP, DOTEP, DOTPP, DOTBzP, DOTPME, HEDP, DTTP, N3S триамидотиол, DADS, МАМА, DADT, N2S4 диаминотетратиол, N2P2 дитиол-бисфосфин, 6-гидразиноникотиновую кислоту, пропиленаминооксим, тетраамин, циклам или их комбинацию.

В одном варианте осуществления лекарственное средство представляет собой ауристин, тубулизин или пирролобензодиазепин (PBD).

В одном варианте осуществления ауристин представляет собой MMAE (монометил-ауристин E) или MMAF (монометил-ауристин F).

В одном варианте осуществления лекарственное средство представляет собой майтанзиноид, например, N<sup>2'</sup>-деацетил-N<sup>2'</sup>-(3-меркапто-1-оксопропил)-майтанзин (DM1), N<sup>2'</sup>-деацетил-N<sup>2'</sup>-(4-меркапто-1-оксопентил)-майтанзин (DM3) или N<sup>2'</sup>-деацетил-N<sup>2'</sup>-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)-майтанзин (DM4).

Примеры радионуклидов включают <sup>3</sup>H, <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>N, <sup>15</sup>O, <sup>18</sup>F, <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P, <sup>35</sup>S, <sup>47</sup>Sc, <sup>51</sup>Cr, <sup>54</sup>Mn, <sup>57</sup>Co, <sup>58</sup>Co, <sup>59</sup>Fe, <sup>62</sup>Cu, <sup>65</sup>Zn, <sup>67</sup>Cu, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ge, <sup>75</sup>Br, <sup>75</sup>Se, <sup>76</sup>Br, <sup>77</sup>Br, <sup>77</sup>As, <sup>80m</sup>Br, <sup>85</sup>Sr, <sup>89</sup>Sr, <sup>90</sup>Y, <sup>95</sup>Ru, <sup>97</sup>Ru, <sup>99</sup>Mo и <sup>99m</sup>Tc, <sup>103</sup>Pd, <sup>103m</sup>Rh, <sup>103</sup>Ru, <sup>105</sup>Rh, <sup>105</sup>Ru, <sup>107</sup>Hg, <sup>109</sup>Pd, <sup>109</sup>Pt, <sup>111</sup>Ag, <sup>111</sup>In, <sup>112</sup>In, <sup>113m</sup>In, <sup>113</sup>Sn, <sup>115</sup>In, <sup>117</sup>Sn, <sup>119</sup>Sb, <sup>121m</sup>Te, <sup>121</sup>I, <sup>122m</sup>Te, <sup>125m</sup>Te, <sup>125</sup>I, <sup>126</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>133</sup>I, <sup>133</sup>Xe, <sup>140</sup>La, <sup>142</sup>Pr, <sup>143</sup>Pr, <sup>149</sup>Pm, <sup>152</sup>Dy, <sup>153</sup>Sm, <sup>153</sup>Gd, <sup>159</sup>Gd, <sup>161</sup>Ho, <sup>161</sup>Tb, <sup>165</sup>Tm, <sup>166</sup>Dy, <sup>166</sup>Ho, <sup>167</sup>Tm, <sup>168</sup>Tm, <sup>169</sup>Er, <sup>169</sup>Yb, <sup>175</sup>Yb, <sup>177</sup>Lu, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>188</sup>W, <sup>189m</sup>Os, <sup>189</sup>Re, <sup>192</sup>Ir, <sup>194</sup>Ir, <sup>197</sup>Pt, <sup>198</sup>Au, <sup>199</sup>Au, <sup>201</sup>Tl, <sup>203</sup>Hg, <sup>211</sup>At, <sup>211</sup>Bi, <sup>211</sup>Pb, <sup>212</sup>Pb, <sup>212</sup>Bi, <sup>213</sup>Bi, <sup>215</sup>Po, <sup>217</sup>At, <sup>219</sup>Rn, <sup>221</sup>Fr, <sup>223</sup>Ra, <sup>224</sup>Ac, <sup>225</sup>Ac, <sup>225</sup>Fm, <sup>252</sup>Cf и их комбинацию.

В одном варианте осуществления радионуклиды выбраны из группы, включающей или состоящей из хрома (<sup>51</sup>Cr), кобальта (<sup>57</sup>Co), фтора (<sup>18</sup>F), гадолиния (<sup>153</sup>Gd, <sup>159</sup>Gd), германия (<sup>68</sup>Ge), гольмия (<sup>166</sup>Ho), индия (<sup>115</sup>In, <sup>113</sup>In, <sup>112</sup>In, <sup>111</sup>In), йода (<sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>121</sup>I), лантана (<sup>140</sup>La), лютеция (<sup>177</sup>Lu), марганца (<sup>54</sup>Mn), молибдена (<sup>99</sup>Mo), палладия (<sup>103</sup>Pd), фосфора (<sup>32</sup>P), празеодима (<sup>142</sup>Pr), прометия (<sup>149</sup>Pm), рения (<sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re), родия (<sup>105</sup>Rh), рутения (<sup>97</sup>Ru), самария (<sup>153</sup>Sm), скандия (<sup>47</sup>Sc), селена (<sup>75</sup>Se), стронция (<sup>85</sup>Sr), серы (<sup>35</sup>S), технеция (<sup>99</sup>Tc), таллия (<sup>201</sup>Tl), олова (<sup>113</sup>Sn, <sup>117</sup>Sn), трития (<sup>3</sup>H), ксенона (<sup>133</sup>Xe), иттербия (<sup>169</sup>Yb, <sup>175</sup>Yb), иттрия (<sup>90</sup>Y), цинка (<sup>65</sup>Zn) или их комбинации.

В одном варианте осуществления радионуклид присоединен к соединению-конъюгату по настоящему изобретению с помощью хелатирующего средства.

В одном варианте осуществления полезная нагрузка представляет собой средство, удлиняющее период полувыведения из сыворотки крови, например, представляющее собой альбумин, альбумин-связывающий полипептид, PAS,  $\beta$ -субъединицу С-концевого пептида (СТР) хорионического гонадотропина человека, полиэтиленгликоль (PEG), гидроксипропилкрахмал (HES), XTEN, альбумин-связывающие малые молекулы или их комбинацию.

В тех случаях, когда эффекторная молекула представляет собой полимер, то, как правило, он может быть синтетическим или существующим в природе полимером, например, полимером с необязательно замещенной прямой или разветвленной полиалкиленовой, полиалкениленовой или полиоксиалкиленовой цепью, или разветвленным или неразветвленным полисахаридом, например, гомо- или гетерополисахаридом.

Конкретные необязательные заместители, которые могут присутствовать в указанных выше синтетических полимерах, включают одну или несколько гидрокси-, метильных или метоксигрупп.

Конкретные существующие в природе полимеры включают лактозу, гиалуроновую кислоту, гепарансульфат, хондроитинсульфат, альгинат, целлюлозу, амилозу, декстран, гликоген или их производные.

В некоторых вариантах осуществления полимер представляет собой полиэтиленгликоль (PEG), разветвленный PEG, полисиаловую кислоту (PSA), гидроксипропилкрахмал (HPS), гидроксипропилкрахмал (HES), углевод, полисахариды, пуллулан, хитозан, гиалуроновую кислоту, хондроитинсульфат, дерматансульфат, крахмал, декстран, карбоксиметилдекстран, полиалкиленоксид (PAO), полиалкиленгликоль (PAG), полипропиленгликоль (PPG), полиоксазолин, полиакрилоилморфолин, поливиниловый спирт (PVA), поликарбоксилат, поливинилпирролидон, полифосфазен, полиоксазолин, сополимер полиэтилена и ангидрида малеиновой кислоты, сополимер полистирола и ангидрида малеиновой кислоты, поли(1-гидроксиметилэтиленгидроксиметилформаль) (PHF), 2-метакрилоилокси-2'-этилтриметиламмония фосфат (MPC). В некоторых вариантах осуществления полимер представляет собой полиэтиленгликоль. В одном варианте осуществления настоящего изобретения полиэтиленгликоль имеет молекулярную массу в диапазоне от 300 до 1000000, от 500 до 100000, от 1000 до 50000, от 1500 до 30000, от 2000 до 20000 Да, от 3000 до 5000 Да и от 4000 до 5000 Да. В других вариантах осуществления полиэтиленгликоль имеет молекулярную массу, составляющую приблизительно 1000 Да, приблизительно 1500 Да, приблизительно 2000 Да, приблизительно 3000 Да, приблизительно 4000 Да, приблизительно 5000 Да,

приблизительно 10000 Да, приблизительно 20000 Да, приблизительно 30000 Да, приблизительно 40000 Да, приблизительно 50000 Да или больше. Это можно перевести в 1-7000 PEG мономерных единиц, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000 единиц (произвольное количество определено в другом месте данного документа).

В одном варианте осуществления полезная нагрузка или полипептид (биологическая молекула) содержит метку для визуализации. Метки для визуализации включают без ограничения хромофор, флуорофор, флуоресцентный белок, фосфоресцентный краситель, tandemный краситель, частицу, гаптен, фермент, радиоактивный изотоп или их комбинацию.

В одном варианте осуществления меткой для визуализации является пептид для визуализации. В некоторых аспектах пептид для визуализации обеспечивает возможность визуализации или определения местоположения соединения-конъюгата *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* или любой их комбинации. В некоторых аспектах пептидом для визуализации является, например, биотин-акцепторный пептид, акцепторный пептид с липоевой кислотой, флуоресцентный белок, цистеин-содержащий пептид для лигирования мышьяксодержащего красителя или для конъюгирования метастабильного технеция, пептид для конъюгирования клатратов с европием, предназначенный для анализов с определением расстояния на основе резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET), или любую их комбинацию. В некоторых аспектах флуоресцентный белок представляет собой, например, зеленый флуоресцентный белок (GFP), красный флуоресцентный белок (RFP), желтый флуоресцентный белок (YFP), усиленный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), усиленный желтый флуоресцентный белок (EYFP) или любую их комбинацию. В некоторых аспектах флуоресцентный белок представляет собой фикобилипротеин или его производное.

Флуоресцентные белки, в частности фикобилипротеин, применимы для получения реагентов для мечения на основе tandemных красителей. Эти tandemные красители содержат флуоресцентный белок и флуорофор с целью получения большего стоксового сдвига, где спектры испускания дальше смещены от длины волны спектров поглощения флуоресцентного белка. Это может быть эффективным для выявления небольшого количества мишени в образце, где испускаемый флуоресцентный свет

максимально оптимизирован, другими словами, испускаемый свет повторно поглощается флуоресцентным белком в незначительном количестве или вовсе не поглощается. Чтобы это функционировало, флуоресцентный белок и флуорофор действуют в качестве пары для переноса энергии, при этом флуоресцентный белок испускает при длине волны, при которой флуорофор поглощает, а затем флуорофор испускает при длине волны, смещенной относительно флуоресцентных белков дальше, чем можно было бы получить с помощью только флуоресцентного белка. Функциональной комбинацией могут быть фикобилипротеины и сульфородаминовые флуорофоры или сульфированные цианиновые флуорофоры, известные из уровня техники. Флуорофор в некоторых случаях функционирует в качестве донора энергии, при этом акцептором энергии является флуоресцентный белок.

В других аспектах мышьяксодержащий краситель представляет собой 4',5'-бис(1,3,2-дитиоарсолан-2-ил)флуоресцеин (FlAsH). В некоторых аспектах биотин-акцепторный пептид способствует конъюгированию реагентов на основе авидина и стрептавидина. В некоторых аспектах акцепторный пептид с липоевой кислотой способствует конъюгированию зондов с реакционноспособной тиольной группой со связанной липоевой кислотой или непосредственному лигированию флуоресцентных аналогов липоевой кислоты.

В одном из вариантов осуществления R1 или полипептид (в частности, R1) содержит флуоресцентную метку. В некоторых аспектах флуоресцентная метка представляет собой, например, краситель флуоресцеинового типа, краситель родаминового типа, краситель данзилового типа, краситель лиссаминового типа, краситель цианинового типа, краситель фикоэритринового типа, краситель типа тexasский красный или любую их комбинацию. Флуорофоры, подходящие для конъюгирования с антителами, сконструированными с цистеинами, или их антигенсвязывающими фрагментами, раскрытыми в данном документе, включают без ограничения пирен (в том числе любое из соответствующих производных соединений), антрацен, нафталин, акридин, стильбен, индол или бензиндол, оксазол или бензоксазол, тиазол или бензотиазол, 4-амино-7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол (NBD), цианин (в том числе любые соответствующие соединения), карбоцианин (в том числе любые соответствующие соединения), карбостирил, порфилин, салицилат, антранилат, азулен, перилен, пиридин, хинолин, бораполиазаиндацен (в том числе любые соответствующие соединения), ксантен (в том числе любые соответствующие соединения), оксазин (в том числе любые соответствующие соединения) или бензоксазин, карбазин (в том числе любые соответствующие соединения), феналенон, кумарин (в том числе любые соответствующие соединения), бензофуран (в том числе любые соответствующие соединения) и бензфеналенон (в том числе любые соответствующие

соединения) и их производные. Используемые в данном документе оксазины включают резорфуины (в том числе любые соответствующие соединения), аминоксазины, диаминоксазины и их бензозамещенные аналоги или любую их комбинацию.

В определенных аспектах флуорофоры включают, например, ксантен (родол, родамин, флуоресцеин и их производные), кумарин, цианин, пирен, оксазин, борополизаиндацен или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления такие флуорофоры представляют собой, например, сульфированные ксантены, фторированные ксантены, сульфированные кумарины, фторированные кумарины, сульфированные цианины или любую их комбинацию. Также включены красители, реализуемые под торговыми марками, и широко известные под названиями ALEXA FLUOR®, DYLIGHT®, CY DYES®, BODIPY®, OREGON GREEN®, PACIFIC BLUE®, IRDYES®, FAM®, FITC® и ROX®.

Выбор флуорофора, присоединяемого через линкер "Z", что раскрыто в данном документе, будет определять свойства поглощения и испускания флуоресценции конечного соединения. Физические свойства флуорофорной метки, которую можно применять, включают без ограничения спектральные характеристики (поглощение, испускание и стоксов сдвиг), интенсивность, длительность, поляризацию флуоресценции и скорость обесцвечивания или их комбинацию. Все эти физические свойства можно использовать для того, чтобы отличить один флуорофор от другого, за счет этого обеспечивается возможность мультиплексного анализа. В определенных аспектах флуорофор имеет максимум поглощения при длинах волн более 480 нм. В некоторых аспектах флуорофор поглощает при 488-514 нм или вблизи этих значений (что особенно подходит для возбуждения излучением аргонового ионного лазерного источника возбуждения) или вблизи 546 нм (что особенно подходит для возбуждения ртутной дуговой лампой). В некоторых аспектах флуорофор может испускать в NIR (ближней инфракрасной области спектра) для применений в тканях или во всем организме. Другие необходимые свойства флуоресцентной метки могут включать клеточную проницаемость и низкую токсичность, например, если мечение антитела необходимо проводить в клетке или организме (например, живом животном).

В одном варианте осуществления полипептид содержит метку захвата. В некоторых аспектах меткой захвата является биотин или His6-метка. Биотин является подходящим, поскольку он может функционировать в ферментной системе для дополнительного усиления выявляемого сигнала, и он также может функционировать в качестве метки для применения в аффинной хроматографии в целях выделения. В целях выявления можно применять конъюгат фермента, который характеризуется аффинностью к биотину, такой как авидин-HRP.

Затем можно добавить субстрат пероксидазы для получения выявляемого сигнала. Помимо биотина можно применять и другие гаптены, в том числе гормоны, существующие в природе и синтетические лекарственные средства, загрязнители, аллергены, эффекторные молекулы, факторы роста, хемокины, цитокины, лимфокины, аминокислоты, пептиды, промежуточные химические соединения, нуклеотиды и т. п.

В одном варианте осуществления полезная нагрузка включает фермент. Ферменты являются эффективными метками, поскольку можно получить усиление выявляемого сигнала, дающее повышение чувствительности анализов. Зачастую сам фермент не индуцирует образование выявляемого ответа, а действует путем разрушения субстрата при контакте с соответствующим для него субстратом, поэтому превращаемый субстрат испускает флуоресцентный, колориметрический или люминесцентный сигнал. Ферменты усиливают выявляемый сигнал, поскольку один фермент в реагенте для мечения может приводить в результате к тому, что нескольких субстратов превращаются в поддающийся выявлению сигнал. Субстрат для фермента выбирают так, чтобы получить поддающийся измерению продукт, например, колориметрический, флуоресцентный или хемилюминесцентный. Такие субстраты широко используются в данной области техники и известны из уровня техники.

В некоторых вариантах осуществления в комбинации колориметрического или флуорогенного субстрата и фермента используются оксидоредуктазы, такие как пероксидаза хрена, и субстрат, такой как 3,3'-диаминобензидин (DAB) и 3-амино-9-этилкарбазол (AEC), которые дают характерный цвет (коричневый и красный соответственно). Другие колориметрические субстраты для оксидоредуктаз, которые дают выявляемые продукты, включают без ограничения: 2,2-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновую кислоту) (ABTS), о-фенилендиамин (OPD), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ), о-дианизидин, 5-аминосалициловую кислоту, 4-хлор-1-нафтол. Флуорогенные субстраты включают без ограничения гомованилиновую кислоту или 4-гидрокси-3-метоксифенилуксусную кислоту, восстановленные феноксазины и восстановленные бензотиазины, в том числе реагент Amplex® Red и его варианты, и восстановленные дигидроксантены, в том числе дигидрофлуоресцеины, и дигидрородамины, в том числе дигидрородамин 123.

Настоящее изобретение распространяется на использование субстратов пероксидазы, которыми являются тирамиды, представляющие собой уникальный класс субстратов для пероксидазы, поскольку по своей природе они могут быть выявлены до действия фермента, но под действием пероксидазы "фиксируются на месте" в процессе, описанном как тирамидное усиление сигнала (TSA). Эти субстраты широко используются для мечения мишеней в образцах, которыми являются клетки, ткани или

монослои, с целью их последующего выявления с помощью микроскопии, проточной цитометрии, оптического сканирования и флуорометрии.

Настоящее изобретение распространяется на комбинацию колориметрического (и в некоторых случаях флуорогенного) субстрата и фермента, где используется фермент фосфатаза, как например, кислая фосфатаза, щелочная фосфатаза или рекомбинантный вариант такой фосфатазы, в комбинации с колориметрическим субстратом, таким как 5-бром-6-хлор-3-индолилфосфат (BCIP), 6-хлор-3-индолилфосфат, 5-бром-6-хлор-3-индолилфосфат, п-нитрофенилфосфат или о-нитрофенилфосфат, или с флуорогенным субстратом, таким как 4-метилумбеллиферилфосфат, 6,8-дифтор-7-гидрокси-4-метилкумаринилфосфат (DiFMUP, патент США № 5830912), флуоресцеиндифосфат, 3-О-метилфлуоресцеинфосфат, резорфинфосфат, 9Н-(1,3-дихлор-9,9-диметилакридин-2-он-7-ил)фосфат (DDAO фосфат) или ELF 97, ELF 39 или родственные им фосфаты.

Настоящее изобретение также распространяется на полезную нагрузку, представляющую собой гликозидазу, в частности бета-галактозидазу, бета-глюкуронидазу и бета-глюкозидазу, представляющие собой дополнительные подходящие ферменты. Подходящие колориметрические субстраты включают без ограничения 5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактопиранозид (X-gal) и подобные индолилгалактозиды, глюкозиды и глюкурониды, о-нитрофенил-бета-D-галактопиранозид (ONPG) и п-нитрофенил-бета-D-галактопиранозид. В некоторых вариантах осуществления флуорогенные субстраты включают резорфин-бета-D-галактопиранозид, флуоресцеиндигалактозид (FDG), флуоресцеиндиглюкуронид и их структурные варианты, 4-метилумбеллиферил-бета-D-галактопиранозид, карбоксиумбеллиферил-бета-D-галактопиранозид и фторированные кумарин-бета-D-галактопиранозиды.

Дополнительные ферменты включают без ограничения гидролазы, такие как холинэстеразы и пептидазы, оксидазы, такие как глюкозооксидаза и цитохромоксидазы, и редуктазы, для которых известны подходящие субстраты.

Ферменты и их соответствующие субстраты, которые дают хемилюминесценцию, применимы для встраивания в молекулы по настоящему изобретению. Они включают без ограничения природные и рекомбинантные формы люцифераз и экворинов. Дополнительно продуктивными являются дающие хемилюминесценцию субстраты для фосфатаз, гликозидаз и оксидаз, как например, содержащие стабильные диоксетаны, люминол, изолюминол и сложные эфиры акридиния.

## **Другие определения**

Прежде чем описывать предусмотренные варианты осуществления более подробно, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными композициями или стадиями способа, и в связи с этим они могут изменяться. Используемые в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают определяемые объекты и во множественном числе, если из контекста явно не следует иное. Формы единственного числа, а также выражения "один или несколько" и "по меньшей мере один" можно использовать в данном документе взаимозаменяемо.

Кроме того, сочетание союзов "и/или", в случае его использования в данном документе, следует рассматривать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом, подразумевается, что сочетание союзов "и/или", используемое в данном документе в такой фразе, как "А и/или В", включает "А и В", "А или В", "А" (отдельно) и "В" (отдельно). Аналогично подразумевается, что термин "и/или" используемый в такой фразе, как "А, В, и/или С" охватывает каждый из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А или С; А или В; В или С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно).

Если не определено иное, то все используемые в данном документе технические и научные термины и выражения имеют то же значение, которое обычно понимает специалист в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Например, the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; the Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press предоставляют специалисту общий глоссарий из многих терминов, используемых в настоящем изобретении.

Единицы измерения, префиксы и символы обозначены в их форме, которая принята согласно Международной системе единиц (SI). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, то аминокислотные последовательности записаны слева направо в направлении от амино- к карбокси-концу. Приведенные в данном документе заголовки не ограничивают различные аспекты, которые могут обеспечиваться ссылкой на описание в целом. Исходя из этого, термины и выражения, которым определение дано непосредственно ниже, более точно определены по ссылке на описание полном объеме.

В данном документе аминокислоты обозначены либо с помощью их общеизвестных трехбуквенных символов, либо с помощью однобуквенных символов, рекомендованных Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB.

Аналогичным образом нуклеотиды обозначены с помощью их общепринятых однобуквенных кодов. В том случае, если положения аминокислотных остатков в антителе обозначены с помощью числа, нумерация приведена согласно системе нумерации по КАВАТ.

Выражение "субъект" относится к любому животному (например, млекопитающему), в том числе без ограничения к людям, отличным от человека приматам, грызунам и т. п., которое будет реципиентом конкретного лечения. Как правило, выражения "субъект" и "пациент" можно использовать взаимозаменяемо в отношении субъекта-человека.

Выражение "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который пребывает в такой форме, обеспечивающей биологическую активность активного ингредиента (например, раскрытого в данном документе соединения-конъюгата), и который не содержит дополнительных компонентов, которые неприемлемо токсичны для субъекта, которому будут вводить данную композицию. Такая композиция может содержать один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей. Такая композиция может быть стерильной.

"Эффективное количество" раскрытого в данном документе соединения-конъюгата представляет собой количество, достаточное для осуществления конкретно поставленной задачи. "Эффективное количество" в отношении поставленной задачи можно определить эмпирическим путем и обычным способом.

Выражение "терапевтически эффективное количество" относится к количеству раскрытого в данном документе соединения-конъюгата или другого лекарственного средства, эффективного для "лечения" заболевания или нарушения у субъекта или млекопитающего.

Слово "метка" при использовании в данном документе относится к выявляемому соединению или композиции, которые конъюгированы прямо или опосредовано со сконструированным антителом или его фрагментом, раскрытым в данном документе (например, с антителом, сконструированным с цистеином, или его фрагментом), с тем, чтобы получить "меченое" соединение-конъюгат. Метка может быть собственно выявляемой (например, радиоизотопные метки или флуоресцентные метки) или в случае ферментной метки может катализировать химическую перестройку субстратных соединения или композиции, которые являются выявляемыми.

Такие термины как "осуществление лечения", или "лечение", или "лечить" относятся как к (1) терапевтическим мерам, с помощью которых излечивают, замедляют, ослабляют симптомы диагностированного патологического состояния или нарушения и/или останавливают его прогрессирование, так и к (2) профилактическим или превентивным мерам, с помощью которых предупреждают и/или замедляют развитие

целевого патологического состояния или нарушения. Таким образом, к нуждающимся в лечении относят тех, у кого уже имеется нарушение; тех, кто предрасположен к развитию нарушения, и тех, у кого необходимо предупредить развитие нарушения. В некоторых аспектах субъекта успешно "лечат" от заболевания или состояния, например рака, в соответствии со способами по настоящему изобретению, если пациент демонстрирует, например, общую, частичную или временную ремиссию заболевания или состояния, например определенного типа рака.

Термины "полинуклеотид" и "нуклеиновая кислота" используются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к полимерам нуклеотидов любой длины, в том числе к ДНК и РНК. Нуклеотиды могут представлять собой дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания, и/или их аналоги или любой субстрат, который можно встроить в полимер с помощью ДНК- или РНК-полимеразы. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги.

Используемый в данном документе термин "вектор" относится к конструкции, которая способна к доставке, а в некоторых аспектах и к экспрессии одного или несколько из представляющих интерес гена(генов) или последовательности(последовательностей) в клетке-хозяине. Примеры векторов включают без ограничения вирусные векторы, векторы экспрессии "голой" ДНК или РНК, плазмиды, космиды или фаговые векторы, векторы экспрессии ДНК или РНК, ассоциированные с катионными конденсирующими средствами, векторы экспрессии ДНК или РНК, инкапсулированные в липосомы, а также определенные эукариотические клетки, такие как клетки-продуценты.

Используемое в данном документе выражение "содержащий" в контексте настоящего описания следует интерпретировать как "включающий".

Выражение "используемый в настоящем изобретении", используемое в данном документе, относится к используемому в способе, раскрытом в данном документе, используемому в молекулах, в том числе промежуточных соединениях, раскрытых в данном документе, или в обоих в соответствии с контекстом используемого термина.

Следует понимать, что какие бы аспекты ни описывались в данном документе формулировкой "содержащий", также предусмотрены другие аналогичные аспекты, описываемые выражениями "состоящий из" и/или "состоящий по сути из".

Любой положительный вариант осуществления или их комбинация, описанные в данном документе, могут быть основанием для отрицательного исключения, т. е. для отказа от прав.

## **Композиции**

Настоящее изобретение распространяется на композиции, содержащие молекулу, описанную в данном документе (как например, гидролизованные молекулы по настоящему изобретению), в частности, фармацевтическую композицию (или диагностическую композицию), содержащую молекулу по настоящему изобретению и фармацевтический наполнитель, разбавитель или носитель.

Композиция, как правило, будет поставляться в виде части стерильной фармацевтической композиции, которая будет, как правило, включать фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно содержать фармацевтически приемлемый адъювант в контексте вакцинного состава.

Настоящее изобретение также распространяется на способы получения указанных композиций, например получение фармацевтической или диагностической композиции, предусматривающие добавление и смешивание молекулы по настоящему изобретению, такой как гидролизованная молекула согласно раскрытию настоящего изобретения, вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемым наполнителем, разбавителем или носителем.

Антитело по настоящему изобретению может быть единственным активным ингредиентом в фармацевтической или диагностической композиции или может дополняться другими активными ингредиентами.

Фармацевтические композиции, соответственно, содержат терапевтически эффективное количество молекулы по настоящему изобретению. Выражение "терапевтически эффективное количество", используемое в данном документе, относится к количеству терапевтического средства, необходимому для лечения, облегчения или профилактики целевых заболевания или состояния или для достижения выявляемого терапевтического или превентивного эффекта. Терапевтически эффективное количество можно оценить первоначально либо в анализах на клеточных культурах, либо на моделях с использованием животных, как правило, на грызунах, кроликах, собаках, свиньях или приматах. Модель с использованием животных можно также применять для определения подходящего диапазона концентраций и способа введения. Затем такую информацию можно использовать для определения подходящих доз и путей для введения человеку.

Композиции можно вводить пациенту по отдельности или можно вводить в комбинации (например, одновременно, последовательно или отдельно) с другими средствами, лекарственными средствами или гормонами.

Фармацевтически приемлемый носитель не должен самостоятельно индуцировать выработку антител, вредных для индивидуума, получающего композицию, и не должен быть токсичным. Подходящими носителями могут быть крупные, медленно метаболизируемые макромолекулы, такие как белки, полипептиды, липосомы, полисахариды, полимолочные кислоты, полигликолевые кислоты, полимерные аминокислоты, сополимеры аминокислот и неактивные вирусные частицы.

Фармацевтически приемлемые носители в терапевтических композициях могут дополнительно содержать жидкости, такие как вода, физиологический раствор, глицерин и этанол. Кроме того, в таких композициях могут присутствовать вспомогательные вещества, такие как увлажняющие или эмульгирующие средства, или буферные вещества для поддержания pH. Такие носители позволяют составлять фармацевтические композиции в виде таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей и суспензий для приема внутрь пациентом.

Подходящие формы для введения включают формы, подходящие для парентерального введения, например путем инъекции или инфузии, например путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. В тех случаях, когда продукт предназначен для инъекции или инфузии, он может иметь форму суспензии, раствора или эмульсии в масляном или водном носителе и может содержать средства для составления, такие как суспендирующие, консервирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие средства. В качестве альтернативы молекула по настоящему изобретению может быть в сухом виде и предназначена для восстановления перед применением с помощью соответствующей стерильной жидкости.

Соответственно, в составах по настоящему изобретению показатель pH конечного состава не аналогичен показателю изоэлектрической точки антитела, например, если показатель pH состава равен 7, то показатель pI 8-9 или выше может быть целесообразным. Не вдаваясь в теорию, полагают, что в перспективе это наделять конечный состав улучшенной стабильностью, например, антителу хранящемуся в растворе.

Фармацевтические композиции данного изобретения могут быть с помощью любого из путей, включая без ограничений пероральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедуллярный, интратекальный, внутрижелудочковый, трансдермальный, чрескожный (например, см. WO98/20734), подкожный, внутрибрюшинный, интраназальный, энтеральный, местный, сублингвальный, интравагинальный или ректальный. Безыгольные инъекторы также могут быть использованы для введения фармацевтических композиций по настоящему изобретению. Как правило, терапевтические композиции могут быть приготовлены в

виде инъеклируемых, либо в виде жидких растворов, либо в виде суспензий. Также могут быть получены твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидких носителях перед инъекцией.

Прямая доставка композиций обычно будет осуществляться путем инъекции, подкожно, внутривенно, внутримышечно, или доставляться в интерстициальное пространство ткани. Композиции также можно вводить в очаг поражения. Дозировка в ходе лечения может осуществляться согласно схеме с однократным введением или схеме с многократными введениями.

Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых носителей доступно в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

## **Лечение**

Настоящее изобретение также распространяется на способы лечения нуждающегося в этом пациента путем введения терапевтически эффективного количества молекулы по настоящему изобретению или композиции, такой как фармацевтическая композиция, содержащая вышеупомянутое.

В одном варианте осуществления представлена молекула по настоящему изобретению или композиция, содержащая вышеупомянутое, предназначенная для применения в лечении, в частности для применения в лечении заболевания или состояния, описанного в данном документе, такого как рак.

В одном варианте осуществления представлено применение молекулы по настоящему изобретению или композиции, содержащей вышеупомянутое, в производстве лекарственного препарата, предназначенного для лечения состояния или заболевания, описанного в данном документе, такого как рак.

Следовательно, молекулы по настоящему изобретению являются применимыми для лечения и/или профилактики патологического состояния.

Антитела, представленные в настоящем изобретении, являются применимыми в лечении заболеваний или нарушений, в том числе воспалительных заболеваний и нарушений, иммунных заболеваний и нарушений, фиброзирующих нарушений и видов рака.

Термины "воспалительное заболевание" или "нарушение" и "иммунное заболевание или нарушение" включают ревматоидный артрит, псориатический артрит, болезнь Стилла, болезнь Макла-Уэльса, псориаз, болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, SLE (системную красную волчанку), астму, аллергический ринит, атопический

дерматит, рассеянный склероз, васкулит, сахарный диабет I типа, вторичную болезнь и реакцию трансплантат против хозяина.

Термин "фиброзирующее нарушение" включает идиопатический легочный фиброз (IPF), системный склероз (или склеродермию), фиброз почек, диабетическую нефропатию, IgA-нефропатию, артериальную гипертензию, терминальную стадию почечной недостаточности, перитонеальный фиброз (постоянный амбулаторный перитонеальный диализ), цирроз печени, возрастную макулярную дегенерацию (ARMD), ретинопатию, кардиальный реактивный фиброз, рубцевание, келоиды, ожоги, кожные язвы, ангиопластику, аортокоронарное шунтирование, артропластику и хирургическое лечение катаракты.

Термин "рак" включает злокачественное новообразование, которое возникает из эпителия, обнаруживаемое в коже или, что чаще, в выстилке органов тела, например, молочной железы, яичника, предстательной железы, кишечника, легких, почках, поджелудочной железы, желудка, мочевого пузыря или пищеварительного тракта. Виды рака проявляют тенденцию к проникновению в смежные ткани и распространяться (метастазировать) в отдаленные органы, например, в кости, печень, легкие или головной мозг.

Субъекты, подлежащие лечению, могут представлять собой животных. Однако в одном или нескольких вариантах осуществления композиции адаптированы для введения субъектам-людям.

В контексте настоящего описания выражение "содержащий" следует интерпретировать как "включающий".

Также предполагается, что варианты осуществления настоящего изобретения, содержащие определенные признаки/элементы, распространяются на альтернативные конструкции "состоящий" или "по сути состоящий" относительно соответствующих элементов/признаков.

Варианты осуществления настоящего изобретения могут быть объединены там, где это технически возможно.

Источники специализированной литературы, такие как патенты и патентные заявки, включены в данный документ посредством ссылки.

Любые варианты осуществления, прямо и однозначно перечисленные в данном документе, могут составить основу отказа как по отдельности, так и в комбинации с одним или несколькими дополнительными вариантами осуществления.

Настоящее изобретение дополнительно описано лишь для наглядности посредством следующих примеров, которые ссылаются на прилагаемые графические материалы, в которых:

### **АББРЕВИАТУРЫ**

**NNAА**           неприродная аминокислота  
**DAR**           соотношение лекарственное средство:антитело, также обычно используемое для описания соотношения любых конъюгированных соединений, таких как линкеры.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

**Фигура 1.1.** Изображены данные масс-спектрометрии интактного дегликозилированного образца до (А) и после (В) реакции mAb с фуран-NHS.

**Фигура 1.2.** Изображены данные масс-спектров восстановленных дегликозилированных образцов mAb-фуран-линкер после 20 ч. реакции с ММАЕ.

**Фигура 1.3.** Изображены данные масс-спектрометрического анализа восстановленного дегликозилированного продукта реакции mAb-фуран-линкер с аллос-лизином.

**Фигура 2.1.** Общая схема конструкции циклопентадиеновых сшивающих средств (А) и NNAА с циклопентадиеновой группой (В), описанная в примере 2.

**Фигура 3.1.** Изображены данные масс-спектрометрии интактного дегликозилированного образца до (А) и после (В) реакции mAb с CP1-NHS.

**Фигура 3.2.** Изображены данные с масс-спектрами восстановленных гликозилированных продуктов реакции mAb-CP1-линкера с малеимид-ММАЕ, при этом графики увеличены для того, чтобы показать и легкую, и тяжелую цепи mAb.

**Фигура 3.3.** Изображены данные с масс-спектрами для восстановленных дегликозилированных продуктов реакции mAb-CP1-линкера и малеимид-

ММАЕ, при этом графики увеличили для того, чтобы показать участок тяжелой цепи mAb.

- Фигура 3.4.** Изображены данные масс-спектрометрического анализа восстановленного дегликозилированного продукта реакции mAb-CP1-линкера с аллос-лизинном, указывающие на отсутствие конъюгирования.
- Фигура 4.1.** Изображены данные масс-спектрометрии интактного дегликозилированного образца до (А) и после (В) реакции mAb с CP1-NHS.
- Фигура 4.2.** Изображены масс-спектры восстановленных дегликозилированных образцов немодифицированного mAb, mAb-CP1-линкера (обозначенного на фигуре как mAb-CP1) и AM-ММАЕ-вступившего в реакцию с mAb-CP1-линкер (обозначенного на фигуре как mAb-CP1 AM-ММАЕ) в моменты времени 15 мин и 2,5 ч.
- Фигура 4.3.** Реакция mAb-CP1-линкер с малеимид-ММАЕ. Не вступивший в реакцию CP1-диен определяли по интенсивностям пиков масс-спектров восстановленного дегликозилированного образца.
- Фигура 5.1.** Изображены данные масс-спектрометрии интактного дегликозилированного образца до (А) и после (В) реакции mAb с CP1-NHS.
- Фигура 5.2.** Изображены масс-спектры восстановленных дегликозилированных образцов немодифицированного mAb, модифицированного mAb-CP-1 и PM-ММАЕ-вступившего в реакцию CP1-mAb-линкера в момент времени 5 мин. и 150 мин.
- Фигура 5.3.** Изображена реакция mAb-CP1-линкера с малеимид-ММАЕ. А) Молярная концентрация не вступившего в реакцию CP1-диена на протяжении времени. Не вступивший в реакцию CP1-диен на mAb определяли по интенсивностям пиков в масс-спектрах восстановленного дегликозилированного образца. В) График зависимости обратной концентрации от времени, используемый для расчета скоростей реакции.
- Фигура 6.1.** Изображены титры mAb 12G3H11 K274CP1-NNAA после экспрессии в клетках млекопитающих, содержащих мутантную TRS или TRS дикого типа. Конечную концентрацию CP1-NNAA в средах и время добавления варьировали, что указано на оси x.

- Фигура 6.2.** Изображены данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного образца mAb 12G3H11 K274CP1-NNAА. А) Диапазон масс, показывающий легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC) mAb. В) График с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать только тяжелую цепь mAb.
- Фигура 6.3.** Изображен SEC-анализ mAb 12G3H11 K274CP1-NNAА, указывающий на получение мономерного продукта. Указаны высокомолекулярные твердые частицы (HMWS).
- Фигура 6.4.** Изображен анализ mAb 1C1 K274CP1-NNAА с использованием SDS-PAGE.
- Фигура 6.5.** Изображены данные масс-спектрометрического анализа восстановленных дегликозилированных продуктов конъюгирования mAb 12G3H11 K274CP1-NNAА с АМ-ММАЕ.
- Фигура 6.6.** Изображены данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта конъюгирования mAb 1C1 K274CP1-NNAА с АМ-ММАЕ.
- Фигура 6.7.** Изображена химическая структура CP1-NNAА и изомеров соединения, которые встречаются в соотношении 1:1.
- Фигура 6.8.** Изображена химическая структура соединения 50, фурансодержащего аналога CP1-NNAА, который описан в литературе. Данное соединение использовали в качестве контроля для исследований экспрессии с использованием mAb 12G3H11.
- Фигура 6.9.** Изображены данные масс-спектрометрического анализа восстановленных дегликозилированных продуктов конъюгирования mAb 12G3H11 K274CP1-NNAА с АМ-ММАЕ. А) не вступившее в реакцию антитело, В) продукт реакции с АМ-ММАЕ, С) продукт реакции с РМ-ММАЕ. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую, и легкую цепи антитела.
- Фигура 6.10.** Изображены данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта конъюгирования mAb 1C1 K274CP1-NNAА с АМ-ММАЕ. А) не вступившее в реакцию антитело, В) продукт реакции с АМ-ММАЕ. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую, и легкую цепи антитела, а также высокомолекулярные фрагменты.

- Фигура 7.1.** Изображена стабильность ADC 12G3H11 K274CP1-NNAА АМ-ММАЕ в сыворотке крови крыс. АСД инкубировали в сыворотке крови крыс при 37°С в течение 7 дней и извлекали с помощью иммунозахвата до проведения масс-спектрометрического анализа восстановленного образца. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы подробно показать значения масс, соответствующие участкам тяжелой цепи (НС). Значительной деконволюции не выявили.
- Фигура 7.2.** Изображена стабильность АСД 12G3H11 K274CP1-NNAА РМ-ММАЕ в сыворотке крови крыс. АСД инкубировали в сыворотке крови крыс при 37°С в течение 7 дней и извлекали с помощью иммунозахвата до проведения масс-спектрометрического анализа восстановленного образца. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы подробно показать значения масс, соответствующие участкам тяжелой цепи (НС). Значительного деконъюгирования не выявили, однако выявили расщепление линкера в фенилацетамидной группе. Описание продукта расщепления см. в приложении 7.
- Фигура 7.3.** Изображена стабильность АСД 12G3H11 K274CP1-NNAА АМ-ММАЕ в сыворотке крови мышей. АСД инкубировали в сыворотке крови мышей при 37°С в течение 7 дней и извлекали с помощью иммунозахвата до проведения масс-спектрометрического анализа восстановленного образца. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы подробно показать значения масс, соответствующие участкам тяжелой цепи (НС). Значительного деконъюгирования не выявили, однако выявили практически полное расщепление линкера в дипептиде val-cit. Описание продукта расщепления см. в приложении 7.
- Фигура 7.4.** Изображена стабильность АСД 12G3H11 K274CP1-NNAА РМ-ММАЕ в сыворотке крови мышей. АСД инкубировали в сыворотке крови мышей при 37°С в течение 7 дней и извлекали с помощью иммунозахвата до проведения масс-спектрометрического анализа восстановленного образца. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы подробно показать значения масс, соответствующие участкам тяжелой цепи (НС). Значительного деконъюгирования не выявили, однако выявили практически полное расщепление линкера. Описание продуктов расщепления см. в приложении 7.
- Фигура 7.5.** Изображены химические структуры полезных нагрузок ММАЕ и их молекулярная масса.

- Фигура 7.6.** Показаны химические структуры преобладающих продуктов расщепления, которые выявили после инкубации ADC в сыворотке крови мышей. На А) и В) показаны фрагменты, оставшиеся связанными с антителом (CP1-малеимидная связь не показана), соответственно для конъюгатов AM-MMAE и PM-MMAE. С) Изображены фрагменты, высвободившиеся после расщепления дипептида val-cit.
- Фигура 7.7.** Показана химическая структура продуктов расщепления PM-MMAE после инкубации в сыворотке крови крыс. А) фрагменты, оставшиеся связанными с антителом, и В) высвободившиеся фрагменты.
- Фигура 8.1.** Общая схема конструкции спироциклопентадиеновых сшивающих средств (А) и NNAА со спироциклопентадиеновой группой (В), описанных в примере 8.
- Фигура 9.1.** Изображены данные масс-спектрометрии интактного дегликозилированного образца до (А) и после (В) реакции с CP2-NHS. Числа под пиками в (В) указывают на количество групп CP2-линкер, введенных в mAb. Оценка введения CP2-линкера по интенсивностям пиков дала 3,29 CP2-линкеров на mAb.
- Фигура 9.2.** Изображены данные масс-спектрометрического анализа восстановленного дегликозилированного образца mAb-CP2-линкера до и после реакции с AM-MMAE и PM-MMAE. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую, и легкую цепи.
- Фигура 9.3.** Изображены масс-спектры восстановленных дегликозилированных продуктов реакции mAb-CP2-линкера с малеимид-MMAE. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать тяжелую цепь антитела.
- Фигура 10.1.** Изображены масс-спектры восстановленного дегликозилированного образца mAb-CP2-линкера и AM-MMAE-вступившего в реакцию с mAb-CP2-линкером в момент времени 4 ч. и 48 ч. График с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать только тяжелую цепь.
- Фигура 10.2.** Изображены масс-спектры восстановленного дегликозилированного образца mAb-CP2-линкера и PM-MMAE-вступившего в реакцию с mAb-CP2-линкером в момент времени 4 ч. и 48 ч. График с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать только тяжелую цепь.
- Фигура 10.3.** Изображена реакция mAb-CP2-линкера с малеимид-MMAE. А) Молярная концентрация не вступившего в реакцию CP2-диена на

протяжении времени. Не вступивший в реакцию CP2-диен на mAb определяли по интенсивностям пиков в масс-спектрах восстановленного дегликозилированного образца. В) График зависимости обратной концентрации от времени, используемый для расчета скоростей реакции.

- Фигура 11.1.** Изображены титры конструкции mAb 12G3H11 K274CP2-NNAА и жизнеспособность клеток млекопитающих после ее экспрессии, содержащих мутантные или дикого типа tRS.
- Фигура 11.2.** Изображены масс-спектры дегликозилированного образца mAb 1C1 K274CP2-NNAА.
- Фигура 11.3.** Изображены данные масс-спектрометрического анализа дегликозилированного образца mAb 1C1 S239CP2-NNAА.
- Фигура 11.4.** Изображены данные масс-спектрометрического анализа дегликозилированного образца mAb-1C1 дикого типа.
- Фигура 11.5.** Изображены результаты SEC-анализа mAb 1C1 K274CP2-NNAА, свидетельствующие о получении мономерного продукта.
- Фигура 11.6.** Изображены результаты SEC-анализа mAb 1C1 S239CP2-NNAА, свидетельствующие о получении мономерного продукта.
- Фигура 11.7.** Изображены результаты анализа mAb 1C1-K274CP2-NNAА и mAb 1C1-S239CP2-NNAА с использованием SDS-PAGE.
- Фигура 12.1.** Изображена общая схема получения ADC mAb-CP2-NNAА и ADC 239C-mAb.
- Фигура 12.2.** Изображены данные масс-спектрометрического анализа восстановленных гликозилированных образцов mAb-CP2-NNAА и образцов mAb-цистеина до и после реакции с АМ-ММАЕ. График с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать тяжелую цепь mAb.
- Фигура 12.3.** Изображены данные масс-спектрометрического анализа восстановленных гликозилированных образцов mAb-CP2-NNAА и образцов mAb-цистеина до и после реакции с АМ-ММАЕ. График с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать легкую цепь mAb.
- Фигура 12.4.** Изображены данные хроматографического анализа гидрофобных взаимодействий ADC mAb-CP2-NNAА и ADC mAb-цистеин.

- Фигура 12.5.** Изображены данные обращенно-фазового высокоэффективного хроматографического анализа восстановленных образцов ADC mAb-CP2-NNAA и mAb-цистеин.
- Фигура 12.6.** Изображен анализ SDS-PAGE в восстанавливающих условиях ADC mAb-CP2-NNAA и ADC mAb-цистеина.
- Фигура 12.7.** Изображены данные масс-спектрометрического анализа восстановленного дегликозилированного образца ADC mAb-CP2-NNAA до и после инкубации в сыворотке крови крыс в течение 7 дней при 37°C. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать только участки тяжелой цепи (HC).
- Фигура 12.8.** Изображены количественные показатели DAR для ADC mAb-CP2-NNAA до и после инкубации в сыворотке крови крыс в течение 7 дн. при 37°C. DAR рассчитывали по высотам пиков масс-спектров, показанных на фигуре 12.7. Значения представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение, n=3.
- Фигура 12.9.** Изображена цитотоксичность ADC mAb-CP2-NNAA и mAb-цистеин по отношению к раковым клеткам PC3 *in vitro*.
- Фигура 13.1.** Изображены положения сложноэфирных связей в линкерах А) CP1-NHS и В) CP1b-NHS.
- Фигура 14.1.** Изображен масс-спектрометрический анализ конъюгатов mAb-CP1b. Числа над пиками указывают на количество линкеров (В и Е) или АМ-ММАЕ (С и F), конъюгированных с mAb. Все образцы перед анализом подвергли дегликозилированию с использованием EndoS.
- Фигура 14.2.** Изображены данные масс-спектрометрического анализа конъюгатов mAb-F2-линкер. Числа над пиками указывают на количество линкеров (В и Е) или АМ-ММАЕ (С и F), конъюгированных с mAb. Все образцы перед анализом подвергли дегликозилированию с использованием EndoS.
- Фигура 14.3.** Изображены данные масс-спектрометрического анализа конъюгатов mAb-цистеин. Указаны легкая цепь (LC) и тяжелая цепь (HC) mAb (А-D), а также количество конъюгированных ММАЕ (В и D). Все образцы подвергли дегликозилированию и восстановлению с использованием EndoS перед анализом.

- Фигура 14.4.** Изображены данные анализа *rRP-HPLC* mAb, конъюгатов mAb-линкер и ADC. Указаны легкие цепи и тяжелые цепи mAb, количество MMAE, конъюгированных с mAb, также указано для образцов ADC.
- Фигура 14.5.** Изображен SEC-анализ mAb, конъюгатов mAb-линкер и ADC. Указаны высокомолекулярные фрагменты (HMWS).
- Фигура 14.6.** Изображено удержание лекарственного средства в ADC после инкубации в сыворотке крови крыс в течение 7 дн.
- Фигура 14.7.** Изображена активность ADC *in vitro* по отношению к рецептор-положительным А) клеткам NCI-N87 и В) клеткам SKBR3.
- Фигура 14.8.** Изображена противоопухолевая активность ADC герцептин-линкер в отношении подкожной ксенотрансплантатной опухолевой модели N87 у мышей.
- Фигура 15.1.** Изображены данные анализа SDS-PAGE ADC 1C1 K274CP1-NNAA AZ1508. А) Невосстанавливающие условия, В) восстанавливающие условия.
- Фигура 15.2.** Изображены данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта конъюгирования mAb 1C1 K274CP1-NNAA с AZ1508. А) не вступившее в реакцию mAb, В) продукт реакции с AZ1508. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую цепь (HC), и легкую (LC) цепь антитела.
- Фигура 15.3.** Изображены результаты SEC-анализа ADC 1C1 K274CP1-NNAA AZ1508, свидетельствующие о том, что был получен высокомономерный продукт. Указаны высокомолекулярные твердые частицы (HMWS).
- Фигура 16.1.** Изображены результаты анализа SDS-PAGE ADC 1C1 CP2-NNAA AZ1508 и ADC 1C1-цистеин-AZ1508. А) Невосстановленные образцы, В) восстановленные образцы.
- Фигура 16.2.** Изображены данные анализа ADC 1C1 S239CP2-NNAA AZ1508. А) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного образца mAb, не вступившего в реакцию. В) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта реакции с AZ1508. С) НИС-анализ продукта конъюгирования не вступившего в реакцию антитела с AZ1508, D) SEC-анализ продукта реакции с AZ1508. Графики с масс-спектрами

увеличили для того, чтобы показать и тяжелую (HC), и легкую (LC) цепи в (A) и (B).

**Фигура 16.3.** Изображены данные анализа ADC 1C1 K274CP2-NNAА AZ1508. А) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного образца mAb, не вступившего в реакцию. В) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта реакции с AZ1508. С) НИС-анализ продукта конъюгирования не вступившего в реакцию антитела с AZ1508, D) SEC-анализ продукта реакции с AZ1508. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую (HC), и легкую (LC) цепи в (A) и (B).

**Фигура 16.4.** Изображены данные анализа ADC 1C1 N297CP2-NNAА AZ1508. А) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного образца mAb, не вступившего в реакцию. В) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта реакции с AZ1508. С) НИС-анализ продукта конъюгирования не вступившего в реакцию антитела с AZ1508, D) SEC-анализ продукта реакции с AZ1508. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую (HC), и легкую (LC) цепи в (A) и (B).

**Фигура 16.5.** Изображены данные анализа ADC 1C1 S239C AZ1508. А) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного образца mAb, не вступившего в реакцию. В) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта реакции с AZ1508. С) НИС-анализ продукта конъюгирования не вступившего в реакцию антитела с AZ1508, D) SEC-анализ продукта реакции с AZ1508. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую (HC), и легкую (LC) цепи в (A) и (B).

**Фигура 16.6.** Изображены данные анализа ADC 1C1 K274C AZ1508. А) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного образца mAb, не вступившего в реакцию. В) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта реакции с AZ1508. С) НИС-анализ продукта конъюгирования не вступившего в реакцию антитела с AZ1508, D) SEC-анализ продукта реакции с AZ1508. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую (HC), и легкую (LC) цепи в (A) и (B).

**Фигура 16.7.** Изображены данные анализа ADC 1C1 N297C AZ1508. А) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного образца mAb, не вступившего в реакцию. В) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта реакции с AZ1508. С) НИС-анализ продукта конъюгирования не вступившего в реакцию антитела с AZ1508, D) SEC-анализ продукта реакции с AZ1508. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую (HC), и легкую (LC) цепи в (А) и (В).

**Фигура 17.1.** Изображены репрезентативные данные масс-спектров восстановленных гликозилированных образцов ADC 1C1 CP2-NNAA и 1C1 цистеин-AZ1508 до и после инкубации в сыворотке крови крыс. (А) Положение S239, (В) положение K274, (С) положение N297. Указаны неконъюгированные и конъюгированные фрагменты.

**Фигура 17.2.** Изображены количественные показатели остаточного AZ1508, присоединенного к CP2-NNAA или к антителам, сконструированным с цистеинами, после инкубации в сыворотке крови крыс в течение 7 дн. при 37°C. Соотношения лекарственное средство:антитело (DAR) рассчитывали на основе масс-спектров восстановленных гликозилированных образцов. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение, n=3.

**Фигура 17.3.** Изображены количественные показатели остаточного AZ1508, присоединенного к CP2-NNAA или к антителам, сконструированным с цистеинами, после инкубации в сыворотке крови мышей в течение 7 дн. при 37°C. Соотношения лекарственное средство:антитело (DAR) рассчитывали на основе масс-спектров восстановленных гликозилированных образцов. В случае проведения анализа деацетилированный AZ1508 расценивали как конъюгированный фрагмент. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение, n=3.

**Фигура 18.1.** Изображены кинетические параметры конъюгирования mAb 1C1 CP1-NNAA и mAb 1C1 CP2-NNAA с AZ1508, измеренные с помощью масс-спектрометрии восстановленного гликозилированного образца. Данные нанесены на график в виде среднего  $\pm$  абсолютная погрешность, n=2, 1C1 K274CP1-NNAA, 1C1 K274CP2-NNAA и 1C1 N297CP2-NNAA, и среднего  $\pm$  стандартное отклонение, n=3, для 1C1 S239CP2-NNAA.

**Фигура 18.2.** Изображен график зависимости обратной концентрации от времени, показывающий расход диенов в ходе реакции mAb CP1-NNAA и CP2-NNAA с AZ1508. (A) mAb 1C1 K274CP1-NNAA, (B) mAb 1C1 S239CP2, mAb 1C1 K274CP2-NNAA и mAb N297CP2-NNAA. Данные нанесены на график в виде среднего  $\pm$  абсолютная погрешность,  $n=2$ , 1C1 K274CP1-NNAA, 1C1 K274CP2-NNAA и 1C1 N297CP2-NNAA, и среднего  $\pm$  стандартное отклонение,  $n=3$ , для 1C1 S239CP2-NNAA.

**Фигура 19.1.** Изображена противоопухолевая активность ADC 1C1 CP2-NNAA AZ1508 в отношении ксенотрансплантатной опухолевой модели PC3 у мышей.

**Фигура 20.1.** Изображен анализ динамического светорассеяния (DLS) малеимид-функционализированных наночастиц золота размером 60 нм до и после инкубации с антителами 1C1 дикого типа (WT) или 1C1 K274CP1-NNAA (mAb CP1-NNAA) в течение 2 ч. при 25°C.

## ПРИМЕРЫ

### Пример 1. Фуран-малеимидная реакция для получения ADC

Фуран-малеимидную реакцию оценивали в качестве метода конъюгирования, предназначенного для получения ADC. Фуран-NHS был предоставлен SynChem, Inc. с чистотой 90%.

*Введение фурановой функциональной группы в mAb:* фуран-диеновую функциональную группу вводили в mAb IgG1 путем реакции первичных аминов лизина с фурановым линкером, активированным с помощью NHS-сложного эфира. Данный подход в результате привел к произвольному конъюгированию связанных амидной связью фурановых групп с модифицированным mAb, при этом полученной конструкции присвоили название mAb-фурановый линкер. Следует отметить, что mAb-фуран-линкер может быть обозначен как mAb-фуран на некоторых фигурах; для уточнения см. подпись к фигуре. Раствор mAb доводили до концентрации 5 мг/мл (3 мл, 15 мг mAb, 0,1 мкмоль, 1 экв.), используя PBS, pH 7,2, с последующим добавлением 10% об./об. 1 М NaHCO<sub>3</sub>. Данный раствор охлаждали на льду и добавляли 30 мкл фуран-NHS (10 мМ исходного раствора в DMAc, 0,3 мкмоль, 3 экв.). Реакцию проводили на льду в течение 5 минут, а затем при комнатной температуре в течение 1 ч. при непрерывном перемешивании. Прохождение реакции контролировали с помощью масс-спектрометрии и фуран-NHS добавляли порциями по 30 мкл до достижения степени конъюгирования, составляющей ~2 фурановые группы/mAb. В общей

сложности добавление раствора фуран-NHS осуществляли 3 раза с общим объемом 90 мкл (0,9 мкмоль, 9 экв.). Вступившее в реакцию mAb очищали с помощью диализа (Slide-A-Lyzer, MWCO - номинальное отсечение по молекулярной массе 10 кДа) против PBS, 1 mM EDTA, pH 7,4, 0°C в течение 24 ч.

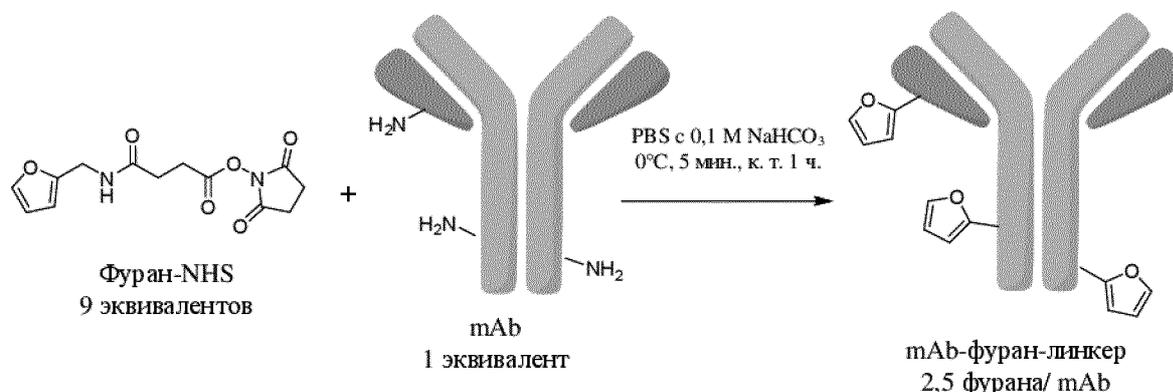


Схема 1.1. Введение фурановой функциональной группы в mAb

*Реакция фуран-модифицированного mAb с малеимид-ММАЕ:* полезные нагрузки для ADC, представляющие собой MMAE, вводили в mAb-фуран-линкер посредством реакции сочетания фурановых групп или с алкил-, или с фенил-малеимидными группами, содержащимися в MMAE, по механизму циклоприсоединения 4+2 Дильса-Альдера. Сначала раствор mAb-фуран-линкер (286 мкл, 3,5 мг/мл, 6,7 нмоль, 1 экв.) объединяли с 10% об./об. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и 20% об./об. DMSO. Затем раствор AM-MMAE или раствор PM-MMAE (10 мкл 10 mM исходного раствора в DMAc, 100 нмоль, 15 экв.) добавляли к раствору антитела. Реакционную смесь герметично закрывали в атмосфере окружающей среды и реакцию проводили при 37°C в течение 20 ч. с перемешиванием. После завершения 20 ч. периода реакции добавляли N-ацетилцистеин (8 мкл 100 mM раствора, 8 эквивалентов) и раствор дополнительно инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут для гашения малеимидных групп. После гашения конъюгаты очищали с использованием устройств PD Spintrap G-25 (GE Healthcare Life Sciences) перед анализом с помощью масс-спектрометрии дегликозилированного образца, как это описано ниже. Проводили реакцию Алос-лизина с mAb, модифицированным фуран-линкером, как описано выше, используя 200 mM исходный раствор в 75 mM NaOH (10 мкл, 2 мкмоль, 300 экв.).

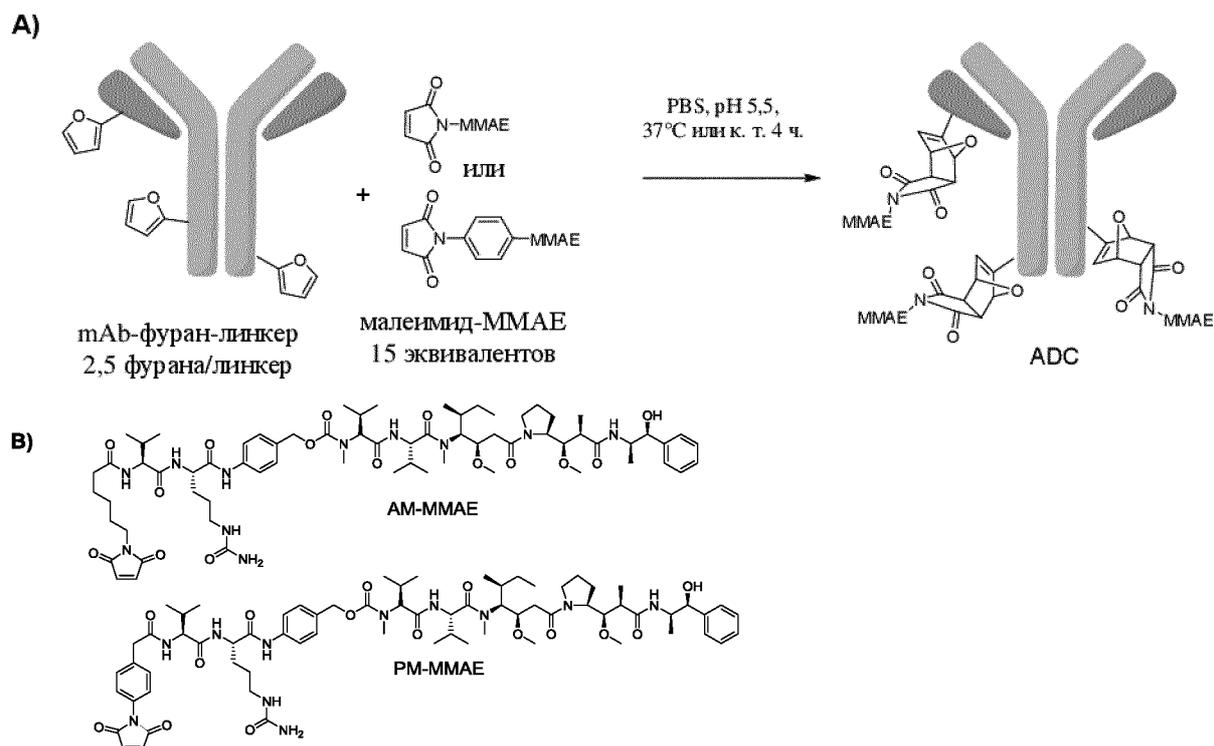


Схема 1.2. А) реакция mAb-фуран-линкера с малеимид-ММАЕ, В) химическая структура AM-MMAE и PM-MMAE.

**Масс-спектрометрический анализ:** сначала mAb или конъюгаты на основе mAb подвергали дегликозилированию с помощью EndoS (New England BioLabs) путем объединения 50 мкл образца (1 мг/мл mAb) с 5 мкл буфера Glyco Buffer 1 (New England BioLabs) и 5 мкл Remove-iT EndoS (разведение 1:10 в PBS, 20000 единиц/мл, New England BioLabs) с последующей инкубацией в течение 1 ч. при 37°C. Восстановленные образцы получали путем добавления 5 мкл раствора Bond-Breaker TCEP (0,5 M, Thermo Fisher Scientific) и инкубации в течение 10 мин. при 37°C. Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием масс-спектрометра Agilent 6520B Q-TOF, оснащенного колонкой RP-HPLC (ZORBAX 300 Diphenyl RRHD, 1,8 микрона, 2,1 мм x 50 мм). Параметры высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) были следующими: скорость потока 0,5 мл/мин; подвижная фаза А представляла собой 0,1% (об./об.) муравьиной кислоты в H<sub>2</sub>O со степенью чистоты для HPLC, и подвижная фаза В представляла собой 0,1% (об./об.) муравьиной кислоты в ацетонитриле. Колонку уравнивали в смеси 90% А/10% В, которую также использовали для обессоливания образцов mAb с последующим элюированием в смеси 20% А/80% В. Данные масс-спектров получали при 100-3000 масса/заряд, положительной полярности, температуре газа 350°C, давлении распылителя 48 фунтов/дюйм<sup>2</sup> и напряжении на капилляре 5000 В. Данные анализировали с использованием поставляемого изготовителем программного обеспечения для качественного анализа MassHunter (Agilent v.В.04.00), и при этом интенсивности пиков

спектров после деконволюции использовали для определения относительной доли фрагментов в каждом образце.

**Фигура 1.1.** Данные масс-спектрометрии интактного дегликозилированного образца до (А) и после (В) реакции mAb с фуран-NHS.

**Фигура 1.2.** Данные масс-спектров восстановленных дегликозилированных образцов mAb-фуран-линкер после 20 ч. реакции с MMAE. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать масс-спектр, соответствующий только участку тяжелой цепи mAb. Аналогичные результаты получили для легких цепей mAb. Выявляли присоединение MMAE к тяжелой цепи mAb с фураном и без него, что свидетельствует о неспецифическом конъюгировании.

Таблица 1.1. Краткое изложение реакций с mAb-фуран-линкером при 37°C в течение 20 часов

| Полезная нагрузка | Эквив.* | Показатель pH | [mAb] мг/мл | фуран /mAb | Общее конъюгирование с mAb (%) | Неспецифическое конъюгирование с mAb (%) | Специфическое конъюгирование с фураном (%) |
|-------------------|---------|---------------|-------------|------------|--------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------------|
| AM-MMAE           | 15      | 5,5           | 3,5         | 2,5        | 2,4                            | 1,1                                      | 1,3                                        |
| PM-MMAE           | 15      | 5,5           | 3,5         | 2,5        | 16,6                           | 12,0                                     | 4,0                                        |
| алло-лизин        | 300     | 5,5           | 3,5         | 2,5        | 0                              | 0                                        | 0                                          |

\*(относит. mAb)

**Фигура 1.3.** Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного дегликозилированного продукта реакции mAb-фуран-линкера с алло-лизинном. Пики, соответствующие предполагаемой массе конъюгата, отсутствовали. Структура алло-лизина показана под графиком.

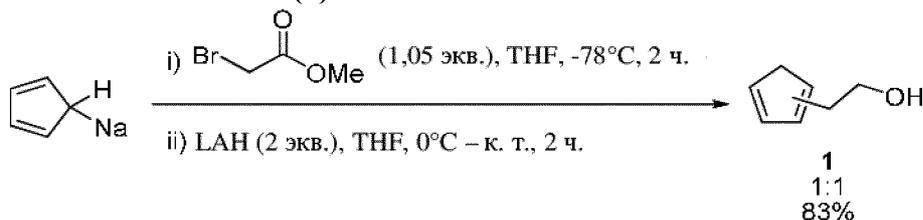
Введение фурановой функциональной группы в антитело осуществляли с использованием молекулы фуран-NHS, вступающей в реакцию с аминами. Показатель

присоединения фурановых функциональных групп контролировали по количеству фуран-NHS, используемому в реакции модификации mAb. Больше или меньшее количество фурановых групп может быть достигнуто за счет соответствующего изменения молярного соотношения добавляемого соединения. Реакция mAb-фуран-линкера с малеимид-ММАЕ была неэффективной и неспецифичной. В случае полезных нагрузок, представляющих собой алкил- или фенил-малеимид, полученное специфическое конъюгирование не превышало 5% даже после продолжительности реакции 20 ч. при 37°C. Неспецифичность реакции с mAb (предположительно за счет реакции присоединения к аминам по Михаэлю) была в 12 раз выше в случае РМ-ММАЕ по сравнению с АМ-ММАЕ, что указывает на более высокую реакционную способность данной малеимидной группы. Кроме того, неспецифичность реакции (предположительно с аминами) оказалась в ~4 раза выше, чем специфическая реакция с фуранами в случае полезной нагрузки, представляющей собой РМ-малеимид ММАЕ. Реакция фуран-малеимидного сочетания является не пригодной для получения ADC.

## **Пример 2. Синтез циклопентадиен (СР1)-содержащих соединений**

Сшивающие средства и неприродные аминокислоты (NNAА) получали на основе общей схемы, показанной на фигуре 2.1.

*Материалы и способы:* если не указано иное, реакции проводили в атмосфере N<sub>2</sub> с использованием растворителей, чистых для анализа. DСM и толуол выдерживали над 3Å молекулярными ситами. THF пропускали через колонку с активированным оксидом алюминия. Все коммерчески доступные реагенты использовали в том виде, в котором они были получены. Тонкослойную хроматографию (TLC) проводили с использованием пластин (0,25 мм) от E. Merck, предварительно покрытых силикагелем 60 с флуоресцентным индикатором F254, и визуализировали путем воздействия УФ-излучения (254 нм) или окрашивания *n*-анисовым альдегидом, нингидрином или перманганатом калия. Колоночную флэш-хроматографию проводили с использованием силикагеля для нормальной фазы (60 Å, 0,040–0,063 мм, Geduran). <sup>1</sup>H ЯМР-спектры регистрировали на спектрометрах Varian (400, 500 или 600 МГц) и представляли относительно сигналов дейтерированного растворителя. Данные <sup>1</sup>H ЯМР-спектров представлены следующим образом: химический сдвиг (δ ppm), мультиплетность, константа взаимодействия (Гц) и интеграция. <sup>13</sup>C ЯМР-спектры регистрировали на спектрометрах Varian (100, 125 или 150 МГц). Данные спектров ЯМР<sup>13</sup>C представлены в виде показателей химического сдвига (δ ppm). Масс-спектры получали из отдела масс-спектрометрии Калифорнийского университета в Санта-Барбаре, полученные на времяпролетном масс-спектрометре GCT Premier (Waters Corp.) с высокой разрешающей способностью с источником десорбции полев (FD).

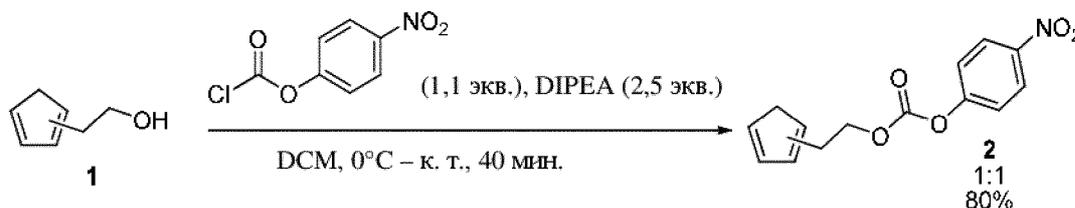
**Синтез CP1-NNAА (4)**

Изомеры 2-(циклопентадиенил)этанола (**1**):

метилбромацетат (6,0 мл, 63 ммоль, 1,05 экв.) добавляли к THF (60 мл) и охлаждали до  $-78^\circ\text{C}$ . Натрия циклопентадиенид (2 М раствор в THF, 30 мл, 60 ммоль, 1 экв.) добавляли по каплям в течение 10 мин. Реакционную смесь перемешивали при  $-78^\circ\text{C}$  в течение 2 ч. Реакцию гасили с помощью  $\text{H}_2\text{O}$  (6 мл) и силикагеля (6 г) и оставляли нагреваться до комнатной температуры. Реакционную смесь фильтровали через слой силикагеля, затем споласкивали DCM (100 мл). Органические слои объединяли и растворитель удаляли с получением изомеров метил-2-(циклопентадиенил)ацетата (1:1) в виде коричневого масла, которое использовали непосредственно на следующей стадии.

LAH (4,55 г, 120 ммоль, 2 экв.) добавляли к THF (300 мл) и охлаждали до  $0^\circ\text{C}$ . Неочищенный метил-2-(циклопентадиенил)ацетат (60 ммоль), растворенный в THF (10 мл), добавляли по каплям 4 порциями в течение 1 ч. Реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры и перемешивали до израсходования исходного материала (TLC, 2 ч.). Реакционную смесь охлаждали до  $0^\circ\text{C}$  и медленно гасили путем добавления по каплям  $\text{H}_2\text{O}$  (10 мл), а затем NaOH (4 М в  $\text{H}_2\text{O}$ , 5 мл). Добавляли  $\text{H}_2\text{O}$  (20 мл), смесь фильтровали и промывали с использованием  $\text{Et}_2\text{O}$  (100 мл). Фильтраты объединяли и удаляли растворитель. Остаток суспендировали в солевом растворе (100 мл) и экстрагировали с помощью  $\text{Et}_2\text{O}$  (3 x 100 мл). Органические слои объединяли, промывали соевым раствором (100 мл), сушили над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали и растворитель удаляли. Остаток фильтровали через слой силикагеля (гексан:EtOAc, 2:1) и растворитель удаляли с получением **1** (5,45 г, 83%) в виде масла янтарного цвета. Для предотвращения димеризации **1** следует хранить в замороженном виде в бензольном растворе.

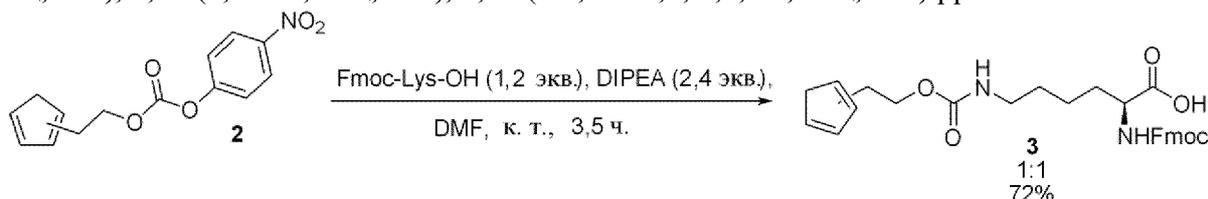
Фактор отклика (гексан:EtOAc, 4:1): 0,11;  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6,50 - 6,13 (m, 3 H), 3,81 (td,  $J = 6,3, 10,1$  Гц, 2 H), 3,01 (d,  $J = 1,6$  Гц, 1 H), 2,95 (d,  $J = 1,6$  Гц, 1 H), 2,70 (dt,  $J = 1,2, 6,5$  Гц, 1 H), 2,66 (dt,  $J = 1,4, 6,4$  Гц, 1 H), 1,52 (s, 1 H) ppm.



Изомеры 2-(циклопентадиенил)этил-4-нитрофенилкарбоната (**2**):

**2** (2,86 г, 26,0 ммоль, 1 экв.) добавляли к DCM (100 мл) и охлаждали до 0°C. Добавляли пиридин (5,2 мл, 65 ммоль, 2,5 экв.) с последующим добавлением 4-нитрофенилхлорформиата (5,76 г, 28,6 ммоль, 1,1 экв) 2 порциями в течение 10 мин. Ледяную баню удаляли, перемешивали реакционную смесь до израсходования исходного материала (TLC, 40 мин.). Реакционную смесь вливали в делительную воронку и промывали с помощью насыщенного NH<sub>4</sub>Cl в H<sub>2</sub>O (100 мл). Водный слой экстрагировали с помощью DCM (100 мл). Органические слои объединяли, промывали солевым раствором (50 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и растворитель удаляли. Остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (гексан:EtOAc, 6:1) с получением **2** (5,69 г, 80%) в виде желтого масла, которое твердеет в морозильной камере.

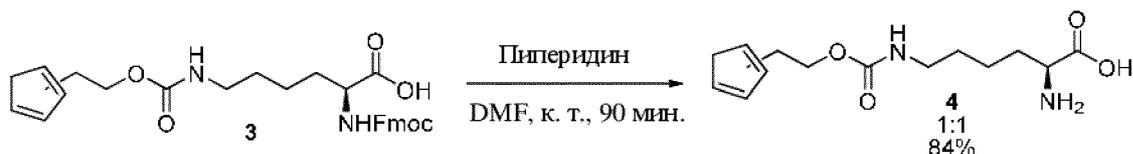
Фактор отклика (гексан:EtOAc, 4:1): 0,43; <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,34 - 8,24 (m, 2 H), 7,40 - 7,34 (m, 2 H), 6,56 - 6,13 (m, 3 H), 4,47 (td, *J* = 6,8, 10,2 Гц, 2 H), 3,02 (d, *J* = 0,8 Гц, 1 H), 2,98 (d, *J* = 1,2 Гц, 1 H), 2,88 (dtd, *J* = 1,0, 6,9, 16,1 Гц, 2 H) ppm.



Изомеры Fmoc-Lys-OH(2-(циклопентадиенил)этилформиат)-OH (**3**):

**2** (3,60 г, 13,1 ммоль, 1 экв) добавляли к DMF (30 мл), затем добавляли Fmoc-Lys-OH (5,78 г, 15,7 ммоль, 1,2 экв.) и DIPEA (5,4 мл, 32 ммоль, 2,4 экв.). Реакционную смесь взбалтывали до израсходования исходного материала (ЯМР, 3,5 ч.), затем вливали в смесь EtOAc (100 мл) и H<sub>2</sub>O (140 мл). Водный слой подкисляли с помощью HCl (1 M, 60 мл), вливали в делительную воронку и разделяли слои. Водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (2 x 100 мл). Органические слои объединяли, промывали солевым раствором (100 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и растворитель удаляли. Остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (гексан:EtOAc, 3:1, затем DCM:MeOH:AcOH, 89:10:1) с получением **3** (4,73 г, 72%) в виде белой пены.

Фактор отклика (DCM:MeOH:AcOH, 89:10:1): 0,50; <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,76 (d, *J* = 7,4 Гц, 2 H), 7,66 - 7,56 (m, 2 H), 7,39 (t, *J* = 7,4 Гц, 2 H), 7,31 (t, *J* = 7,2 Гц, 2 H), 6,57 - 5,96 (m, 3 H), 5,85 - 5,54 (m, 1 H), 4,84 - 4,11 (m, 7 H), 3,27 - 2,61 (m, 6 H), 1,99 - 1,11 (m, 6 H) ppm.



CP1-NNAА (**4**):

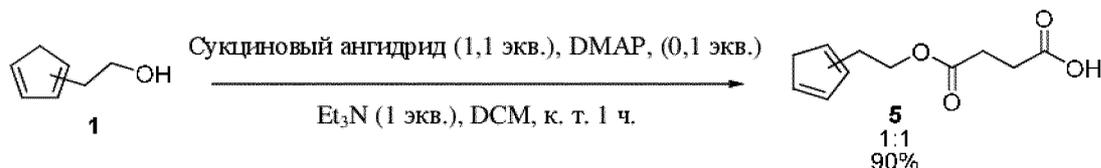
ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ

к ответу на запрос формальной экспертизы от 01.04.2020

**3** (4,61 г, 9,13 ммоль, 1 экв) добавляли к DMF (130 мл), затем добавляли пиперидин (14,4 мл). Реакционную смесь перемешивали до израсходования исходного материала (TLC, 90 мин.), затем растворитель удаляли. Et<sub>2</sub>O (100 мл) добавляли к остатку и суспензию обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин. Суспензию фильтровали и споласкивали Et<sub>2</sub>O (100 мл). Твердое вещество суспендировали в MeOH (10 мл), перемешивали в течение 10 мин, добавляли Et<sub>2</sub>O (40 мл), суспензию фильтровали и промывали с помощью Et<sub>2</sub>O (50 мл). Соединение высушивали в вакууме с получением **4** (2,15 г, 84%) в виде коричневого порошка.

<sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, метанол-d<sub>4</sub> + одна капля TFA) δ 6,53 - 6,07 (m, 3 H), 4,29 - 4,11 (m, 2 H), 3,96 (t, J = 6,3 Гц, 1 H), 3,11 (t, J = 1,0 Гц, 2 H), 3,01 - 2,62 (m, 3 H), 2,02 - 1,81 (m, 2 H), 1,62 - 1,35 (m, 4 H) ppm; MS (FD) Точная масса расщ. для C<sub>14</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 283,17, найденное значение: 283,19.

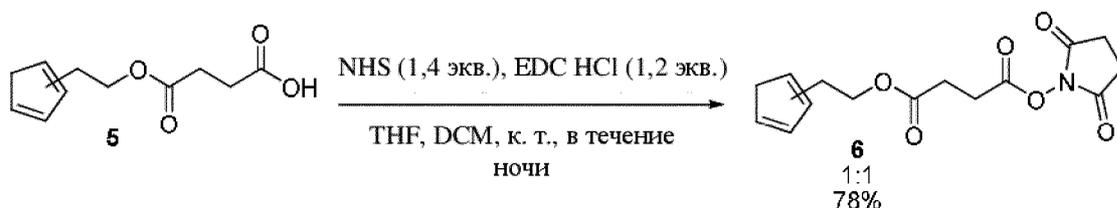
### Синтез CP1-NHS (**6**)



Изомеры 4-(2-(циклопентадиенил)этокси)-4-оксобутановой кислоты (**5**):

DCM (1,5 мл) добавляли в флакон, содержащий **1** (0,33 г, 3,0 ммоль, 1 экв.). Добавляли Et<sub>3</sub>N (0,42 мл, 3,0 ммоль, 1 экв.), DMAP (37 мг, 0,30 ммоль, 0,1 экв.) и янтарный ангидрид (0,33 г, 3,3 ммоль, 1,1 экв.), реакционную смесь герметично закрывали в атмосфере воздуха и перемешивали при комнатной температуре до израсходования исходного материала (TLC, 60 мин.). Реакционную смесь вливали в делительную воронку с DCM (50 мл) и экстрагировали с помощью водного раствора HCl (1 М, 50 мл), а затем H<sub>2</sub>O (50 мл). Органический слой сушили над MgSO<sub>4</sub>, фильтровали и удаляли растворитель с получением **5** (0,57 г, 90%) в виде коричневого порошка.

Фактор отклика (EtOAc): 0,67; <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 11,49 (br. s., 1 H), 6,49 - 6,05 (m, 3 H), 4,27 (td, J = 7,0, 9,0 Гц, 2 H), 2,94 (d, J = 17,6 Гц, 2 H), 2,80 - 2,56 (m, 6 H) ppm.



CP1-NHS (**6**):

THF (10 мл) добавляли в флакон, содержащий **5** (0,42 г, 2,0 ммоль, 1 экв.). Добавляли NHS (0,32 г, 2,8 ммоль, 1,4 экв.), EDC·HCl (0,46 г, 2,4 ммоль, 1,2 экв.) и DCM (5 мл), реакционную смесь герметично закрывали в атмосфере воздуха и взбалтывали при к. т. в течение ночи. Растворитель удаляли и остаток подвергали колоночной флэш-

хроматографии (гексан:EtOAc, 1:1) с получением **6** (0,48 г, 78%) в виде прозрачного вязкого масла. CP1-NHS обозначен как CP1-линкер после конъюгирования с антителами.

Фактор отклика (гексан:EtOAc, 1:1): 0,38;  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6,49 - 6,40 (m, 3 H), 6,31 (dd,  $J = 1,2, 5,1$  Гц, 1 H), 6,25 (td,  $J = 1,5, 2,8$  Гц, 1 H), 6,11 (td,  $J = 1,8, 3,0$  Гц, 1 H), 4,30 (td,  $J = 7,0, 9,0$  Гц, 4 H), 3,00 - 2,90 (m, 8 H), 2,85 (br. s., 8 H), 2,80 - 2,68 (m, 8 H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (125 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170,8, 170,8, 168,9, 168,8, 167,6, 167,6, 144,3, 142,3, 134,2, 134,1, 132,3, 131,4, 128,4, 128,0, 64,5, 64,2, 43,5, 41,4, 29,7, 29,0, 28,7, 26,2, 25,5 ppm.

Синтез неприродной аминокислоты (NNAА), функционализированной циклопентадиеном (CP), начинали с реакции коммерчески доступного NaCr с метилбромацетатом. Неочищенный сложный эфир восстанавливали с использованием ЛАН до спирта **1**, который получали в виде смеси изомеров (~1:1). **1** будет димеризоваться при хранении при  $-20^\circ\text{C}$ , поэтому его необходимо хранить замороженным в бензольном растворе или сразу же использовать. С помощью реакции **1** с 4-нитрофенилхлорформиатом получали активированный карбамат **2**, который можно хранить в течение нескольких недель при  $-20^\circ\text{C}$ . Предприняли попытку проведения реакции **2** с лизинамом меди, но выделение NNAА **4** после обработки 8-гидроксихинолином или EDTA было неудовлетворительным. С помощью реакции **2** с Вос-Lys-OH получают Вос-защищенную группа NNAА в 71% (или непосредственно из **1** с использованием трифосгена в 38%), но попытки удаления Вос-группы с использованием TFA, муравьиной кислоты или кислоты Льюиса приводили к быстрому распаду CP-кольца. Реакция **2** с Fmoc-Lys-OH дает Fmoc-защищенный **3**, в котором может быть удалена защитная группа с использованием пиперидина с целью получения NNAА **4**. Соединение **4** является слабо растворимым в широко распространенных дейтерированных растворителях. Каплю TFA можно добавить для повышения растворимости, но это приводит к распаду в течение нескольких часов. Обмен протонов CP-кольца в **4** происходит при растворении в  $\text{D}_2\text{O}$  с каталитическим NaOH вследствие последовательных [1,5]-гидридных сдвигов.

Синтез CP1-функционализированного NHS-сложного эфира начинали с реакции **1** с янтарным ангидридом для получения кислоты **5**. Проводили реакцию кислоты **5** с EDC·HCl и *N*-гидроксисукцинимидом с получением NHS-сложного эфира **6**. При комнатной температуре CP-кольцо на **6** будет димеризоваться в течение нескольких дней, но его можно хранить больше месяца при  $-20^\circ\text{C}$ .

**Пример 3. CP1-диен-малеимидное конъюгирование, предназначенное для получения ADC посредством сшивающего средства, связанного с модифицированным mAb**

Проводили оценку цикlopентадиен-малеимидных реакций на предмет биоконъюгирования, где цикlopентадиеновые группы вводили посредством линкера.

*Введение функциональной группы CP1 в mAb:* функциональную CP1-диеновую группу вводили в IgG1 mAb путем проведения реакции первичных аминов лизина с CP1-NHS (соединением 6). Данный подход в результате привел к произвольному конъюгированию связанных амидной связью цикlopентадиеновых групп с модифицированным mAb, при этом полученной конструкции присвоили название mAb-CP1-линкер. Следует отметить, что на некоторых фигурах mAb-CP1-линкер может быть обозначен как mAb-CP1, для уточнения см. подпись к фигуре. Типичную реакцию модификации mAb можно описать следующим образом. Раствор mAb доводили до концентрации 5 мг/мл (3 мл, 15 мг mAb, 100 нмоль, 1 экв.) с PBS, pH 7,2, с последующим добавлением 10% об./об. 1 М NaHCO<sub>3</sub>. Данный раствор охлаждали на льду и добавляли 30 мкл CP1-NHS (10 мМ исходного раствора в DMAc, 300 нмоль, 3 эквивалента). Реакцию проводили на льду в течение 5 минут с последующей реакцией при комнатной температуре в течение 1 ч. при непрерывном перемешивании. Вступившее в реакцию mAb очищали путем диализа (Slide-A-Lyzer, 10 кДа MWCO) против PBS, 1 мМ EDTA, pH 7,4, 0°C в течение 24 ч. Введение CP1-линкера определяли количественно с помощью масс-спектрометрии интактного дегликозилированного образца, как это описано ниже, и выявили, что в данном примере оно составило 2,3 CP1 на mAb, что соответствует 77% превращению CP1-NHS в конъюгат на основе антитела. Краткое изложение результатов данной реакции, которую проводили в разных условиях, описано в приложении А3.1.

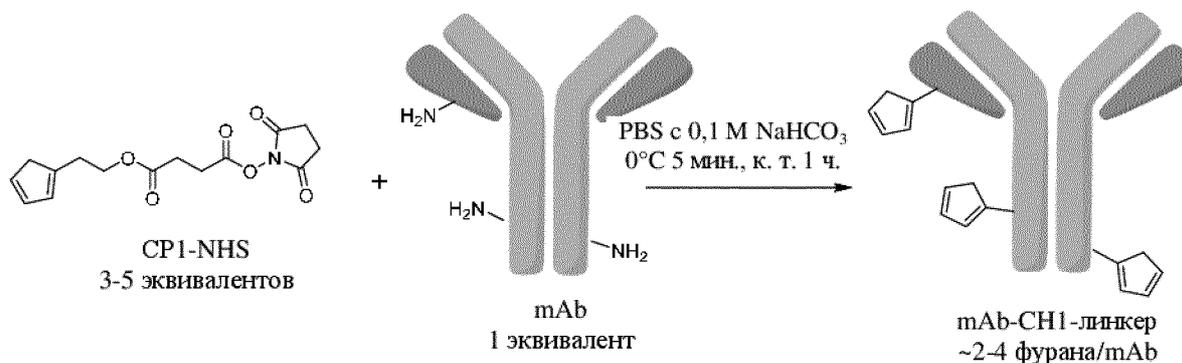


Схема 3.1. Модификация mAb с помощью CP1-NHS, предназначенная для получения mAb-CP1-линкера

*Реакция CP1-модифицированного mAb с maleimide-MMAE:* mAb-CP1-линкер (2,3 CP1-диена/mAb, 1 мг, 6,7 нмоль mAb, 1 эквивалент) разбавляли с использованием PBS (pH 7,4), доводя до конечной концентрации 3,5 мг/мл. Затем добавляли DMSO с получением 20% об./об. раствора с последующим добавлением 1 М одноосновного фосфата натрия с получением 10% об./об. раствора. После добавления всех компонентов раствора получали смесь, содержащую 2,7 мг/мл mAb, 41,4 мкМ CP1-

диена, 1,78 М DMSO, 110 мМ монофосфата натрия, 100 мМ NaCl, pH 5,5. AM-ММАЕ или PM-ММАЕ (10 мкл 10 мМ исходного раствора в DMAc, 100 нмоль, 15 эквивалентов) добавляли к раствору антитела. Реакционную смесь кратковременно встряхивали и выдерживали при 22°C или 37°C с перемешиванием. После 4 ч. реакции N-ацетилцистеин (8 мкл 100 мМ раствора, 120 эквивалентов) добавляли для гашения не вступивших в реакцию малеимидных групп. Затем образцы очищали с использованием устройств PD Spintrap G-25 (GE Healthcare Life Sciences) для удаления низкомолекулярных компонентов из смеси. Затем проводили анализ образцов с помощью масс-спектрометрии восстановленного дегликозилированного образца, как это описано ниже.

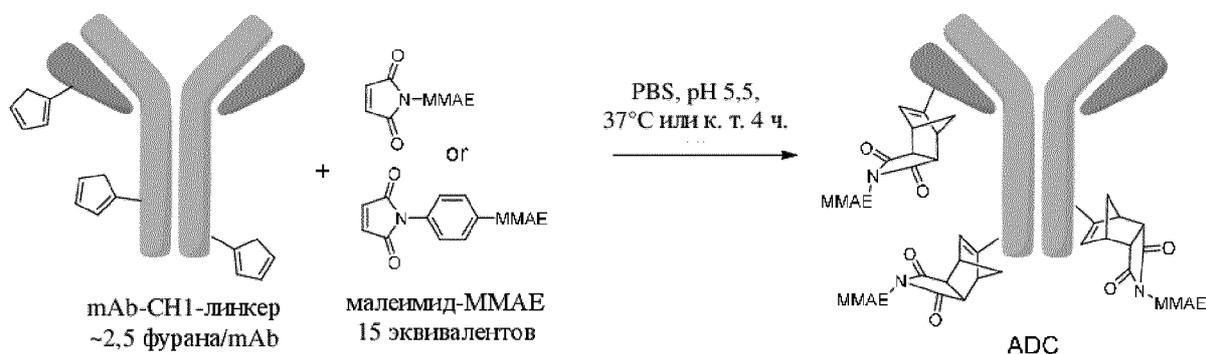


Схема 3.2. Реакция mAb-CP1-линкера с малеимид-ММАЕ

*Масс-спектрометрический анализ:* Образцы анализировали так, как это описано в примере 1.

**Фигура 3.1.** Данные масс-спектрометрии интактного дегликозилированного образца до (A) и после (B) реакции mAb с CP1-NHS. Числа под пиками в (B) указывают на количество групп CP1-линкер, введенных в mAb. Следует отметить ряд более высоких MW пиков в (A), соответствующих гликозилированному mAb. Оценка введения CP1-линкера по интенсивностям пиков дала 2,3 CP1-линкера на mAb.

Таблица 3.1. Краткое изложение реакций CP1-NHS с mAb

| Эквиваленты CP1-NHS (относительно mAb) | [mAb] мг/мл | CP1-линкер на mAb | Превращение (%) |
|----------------------------------------|-------------|-------------------|-----------------|
| 3                                      | 5           | 2,3               | 77              |
| 5,4                                    | 3,75        | 3,9               | 74              |
| 4                                      | 5           | 3,7               | 93              |

**Фигура 3.2.** Масс-спектры восстановленных гликозилированных продуктов реакции mAb-CP1-линкера малеимид-ММАЕ. Изображения увеличили для того, чтобы показать и тяжелую, и легкую цепи.

**Фигура 3.3.** Данные с масс-спектрами для восстановленных дегликозилированных продуктов реакции mAb-CP1-линкера и малеимид-ММАЕ увеличили для того, чтобы показать участок тяжелой цепи mAb. DAR-0 указывает на отсутствие ММАЕ, конъюгированного с тяжелой цепью mAb, DAR-1 указывает на один ММАЕ, конъюгированный с тяжелой цепью mAb, и DAR-2 указывает на два ММАЕ, конъюгированных с тяжелой цепью mAb. Не выявили пиков, соответствующих неконъюгированному CP1-линкеру, в продукте реакции, и при этом все пики, соответствующие конъюгату ММАЕ, регистрировали по соответствующим пикам, соответствующим CP1-линкеру и тяжелой цепи, свидетельствуя о том, что конъюгирование было специфичным для групп CP1-линкер.

Таблица 3.2. Краткое изложение реакций mAb-CP1-линкера с малеимид-ММАЕ<sup>a</sup>

| Полезная нагрузка | Эквиваленты (относительно mAb) | Показатель pH | Темп. | Конъюгирование ММАЕ с mAb-CP1-линкером (%) |
|-------------------|--------------------------------|---------------|-------|--------------------------------------------|
| AM-ММАЕ           | 15                             | 5,5           | 37 °C | 100                                        |
|                   |                                |               | 22 °C | 100                                        |
| PM-ММАЕ           | 15                             | 5,5           | 37 °C | 100                                        |
|                   |                                |               | 22 °C | 100                                        |
| allos-лизин       | 300                            | 5,5           | 37 °C | 0                                          |
|                   |                                |               | 22 °C | 0                                          |

<sup>a</sup>Все реакции проводили при 2,7 мг/мл mAb-CP1-линкера в течение 4 ч.

**Фигура 3.4.** Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного дегликозилированного продукта реакции mAb-CP1-линкера с allos-лизином. Пики, соответствующие предполагаемой массе конъюгата, отсутствовали.

CP1-диеновые группы, которые вводили на поверхность антитела, полностью вступали в реакцию с пролекарствами, представляющими собой малеимид-ММАЕ, в течение 4 ч. при комнатной температуре. В ходе проведения масс-спектрометрии неспецифическое конъюгирование отсутствовало, поскольку все пики, соответствующие конъюгату CP1-линкер-ММАЕ, регистрировали по пикам, соответствующим mAb-CP1-линкеру, но не по пикам, соответствующим немодифицированному mAb (т. е. отсутствует CP1-линкер). Это резко отличается от реакций mAb-фуран-линкера с малеимид-ММАЕ, при которых выявляли только ~2-

20% конъюгирование, в том числе неспецифическое конъюгирование после 20 ч. при 37°C. Диеи-малеимидное конъюгирование с mAb-CP1-линкером является улучшенным по сравнению с реакцией сочетания на основе mAb-фуран-линкера.

**Пример 4. Кинетические параметры конъюгирования mAb-CP1-линкера с малеимид-ММАЕ при молярных эквивалентах малеимид-ММАЕ и диеновых групп, составляющих 0,6, содержащихся в CP1-mAb-линкере**

Кинетические параметры реакции mAb-CP1-линкера с малеимид-ММАЕ исследовали при стехиометрическом составе, составляющем 0,6 молярных эквивалентов малеимид-ММАЕ и диена, содержащегося в mAb-CP1-линкере.

*Введение функциональной группы CP1 в mAb:* функциональную CP1-диеновую группу вводили в IgG1 mAb путем проведения реакции первичных аминов лизина с CP1-NHS (соединением 6). Данный подход в результате привел к произвольному конъюгированию связанных амидной связью циклопентадиеновых групп. Полученному в результате конъюгату присвоили название mAb-CP1-линкер, и его также можно обозначить как mAb-CP1, для уточнения см. подпись к фигуре. Раствор mAb доводили до концентрации 3,7 мг/мл (3 мл, 11,1 мг mAb, 74 нмоль, 1 экв.), используя PBS, pH 7,2, с последующим добавлением 10% об./об. 1 М NaHCO<sub>3</sub>. Данный раствор охлаждали на льду и добавляли 40 мкл CP1-NHS (10 мМ исходного раствора в DMAc, 400 нмоль, 5,4 эквивалента). Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 1 ч. при непрерывном перемешивании. Вступившее в реакцию mAb очищали путем диализа (Slide-A-Lyzer, 10 кДа MWCO) против PBS, 1 мМ EDTA, pH 7,4, 0°C в течение 24 ч. Встраивание CP1-диена определяли количественно с помощью масс-спектрометрии интактного дегликозилированного образца, как это описано ниже, и выявили, что в данном примере оно составляет 3,99 CP1-диена на mAb, что соответствует 74% превращению CP1-NHS в конъюгат на основе антитела.

*Реакция mAb-CP1-линкера с малеимид-ММАЕ:* CP1-модифицированное mAb (3,99 CP1-диена/mAb, 3 мг, 80 нмоль CP1-диена, 1 эквивалент) разбавляли с использованием PBS (pH 7,4), доводя до конечной концентрации 1,7 мг/мл. Затем добавляли DMSO с получением 20% об./об. раствора с последующим добавлением 1 М одноосновного фосфата натрия с получением 10% об./об. раствора. После добавления всех компонентов раствора получали смесь, содержащую 1,3 мг/мл mAb, 34,6 мкМ CP1-диена, 1,78 М DMSO, 110 мМ монофосфата натрия, 100 мМ NaCl, pH 5,5. AM-ММАЕ или PM-ММАЕ (5,2 мкл 10 мМ исходного раствора в DMSO, 52 нмоль, 0,67 эквивалента) добавляли к раствору антитела. Реакционную смесь кратковременно встряхивали и выдерживали при 22°C с перемешиванием. Аликвоты (180 мкл) удаляли в разные моменты времени и добавляли N-ацетилцистеин (2 мкл 100 мМ раствора, 38 эквивалентов) для гашения малеимидных групп. Затем образцы очищали с

использованием устройств PD Spintrap G-25 (GE Healthcare Life Sciences) для удаления низкомолекулярных компонентов из смеси. Затем проводили анализ образцов с помощью масс-спектрометрии восстановленного дегликозилированного образца, как это описано ниже.

*Масс-спектрометрический анализ:* образцы анализировали так, как это описано в примере 1.

*Расчет констант скорости CP1-диен-малеимидной реакции:* константы скорости реакции второго порядка мАб-CP1-линкера с диенами антител определяли по интенсивностям пиков масс-спектров восстановленного дегликозилированного образца. Прохождение реакции контролировали и по исчезновению пиков, соответствующих мАб-CP1-линкеру, и по появлению пиков, соответствующих мАб-CP1-линкер-АМ ММАЕ, но только интенсивности пиков, соответствующих мАб-CP1-линкеру на тяжелых цепях антитела, использовали для расчета относительного количества вступившего в реакцию CP1-диена. Относительное количество не вступивших в реакцию CP1-диеновых групп на тяжелых цепях мАб рассчитывали с использованием уравнения, приведенного ниже:

$$\text{CP1 на мАб} = \left[ \frac{b}{a + b + c + d} \times 1 \right] + \left[ \frac{c}{a + b + c + d} \times 2 \right] + \left[ \frac{d}{a + b + c + d} \times 3 \right]$$

a = интенсивность пика, соответствующего немодифицированной тяжелой цепи

b = сумма интенсивностей пиков, соответствующих тяжелым цепям с одной группой CP1-линкер

c = сумма интенсивностей пиков, соответствующих тяжелым цепям с двумя группами CP1-линкер

d = интенсивность пика, соответствующего тяжелой цепи с тремя группами CP1-линкер

Примечание: тяжелые цепи, содержащие малеимид-ММАЕ, также включали в расчет. Например, CP1-линкер-2 + 1 малеимид-ММАЕ могут быть включены как фрагмент CP1-линкер-1.

### Результаты

**Фигура 4.1.** Данные масс-спектрометрии интактного дегликозилированного образца до (А) и после (В) реакции мАб с CP1-NHS.

**Фигура 4.2.** Масс-спектры восстановленных дегликозилированных немодифицированных мАб, мАб-CP1-линкера (мАб-CP1) и АМ-ММАЕ-вступившего в реакцию с мАб-CP1-линкер (мАб-CP1 АМ-ММАЕ) в моменты времени 15 мин. и 2,5 ч.

**Фигура 4.3.** Реакция mAb-CP1-линкера с малеимид-ММАЕ на протяжении времени: Не вступивший в реакцию диен определяли по интенсивностям пиков в масс-спектрах восстановленного дегликозилированного образца.

Таблица 4.1. Краткое изложение результатов конъюгирования mAb-CP1-линкера<sup>a</sup>

| Полезная нагрузка | Добавляемое количество <sup>b</sup> | Вступивший в реакцию диен <sup>c</sup> |
|-------------------|-------------------------------------|----------------------------------------|
| AM-ММАЕ           | 0,65                                | 60,0%                                  |
| PM-ММАЕ           | 0,65                                | 63,4%                                  |

<sup>a</sup> все реакции конъюгирования проводили при показателе pH 5,5, 20% DMSO, 22°C и 1,3 мг/мл mAb в течение 3,5 ч.

<sup>b</sup> добавляемое количество рассчитывается в виде молярного эквивалента малеимид-ММАЕ:CP1-диен

<sup>c</sup> рассчитали по интенсивностям пиков масс-спектров восстановленного дегликозилированного образца.

Реакция CP1-диенов (содержащихся на mAb-CP1-линкере) с малеимид-ММАЕ была быстрой и специфичной в условиях водного раствора, при этом полного завершения реакции достигали в течение порядка 10 минут. Рассчитанные молярные соотношения добавляемого количества малеимид-ММАЕ совпадают со степенью конъюгирования, которую определяли по масс-спектру интактного образца, поскольку добавляемое молярное количество MMAE и превращение диена в конъюгат по сути были одинаковыми.

#### **Пример 5. Кинетические параметры конъюгирования mAb-CP1-линкера с малеимид-ММАЕ при молярном эквиваленте малеимид-ММАЕ и диеновые-группы, составляющем 1,0**

Оценивали кинетические параметры реакции CP1-диенов с малеимид-ММАЕ при 22°C.

*Введение функциональной группы CP1 в mAb:* функциональную CP1-диеновую группу вводили в IgG1 mAb путем проведения реакции первичных аминов лизина с CP1-NHS (соединением 6). Данный подход в результате привел к произвольному конъюгированию связанных амидной связью циклопентадиеновых групп. Раствор mAb доводили до концентрации 5 мг/мл (3 мл, 5 мг mAb, 100 нмоль, 1 экв.), используя PBS, pH 7,2, с последующим добавлением 10% об./об. 1 М NaHCO<sub>3</sub>. Данный раствор охлаждали на льду и добавляли 40 мкл CP1-NHS (10 мМ исходного раствора в DMAc, 400 нмоль, 4 эквивалента). Реакционную смесь кратковременно встряхивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. с непрерывным перемешиванием. Вступившее в реакцию mAb очищали путем диализа (Slide-A-Lyzer,

10 кДа MWCO) против PBS, 1 mM EDTA, pH 7,4, 0°C в течение 24 ч. Встраивание CP1-диена определяли количественно с помощью масс-спектрометрии интактного дегликозилированного образца, как это описано ниже, и выявили, что в данном примере оно составляет 3,7 CP1-диена на mAb, что соответствует 92% превращению CP1-NHS в конъюгат на основе антитела.

*Реакция mAb-CP1-линкера с малеимид-ММАЕ:* mAb-CP1-линкер (3,7 CP1-диена/mAb, 3 мг, 74 нмоль CP1-диена, 1 эквивалент) разбавляли с использованием PBS (pH 7,4), доводя до конечной концентрации 1,7 мг/мл. Затем добавляли DMSO с получением 20% об./об. раствора с последующим добавлением 1 M одноосновного фосфата натрия с получением 10% об./об. раствора. После добавления всех компонентов раствора получали смесь, содержащую 1,3 мг/мл mAb, 32,3 мкМ CP1-диена, 1,78 M DMSO, 110 mM монофосфата натрия, 100 mM NaCl, pH 5,5. AM-ММАЕ или PM-ММАЕ (7,4 мкл 10 mM исходного раствора в DMSO, 74 нмоль, 1 эквивалент) добавляли к раствору антитела. Реакционную смесь кратковременно встряхивали и выдерживали при 22°C с перемешиванием. Аликвоты (180 мкл) удаляли в разные моменты времени и добавляли N-ацетилцистеин (3 мкл 100 mM раствора, 51 эквивалентов) для гашения не вступивших в реакцию малеимидных групп. Затем образцы очищали с использованием устройств PD Spintrap G-25 (GE Healthcare Life Sciences) для удаления низкомолекулярных компонентов из смеси. Затем проводили анализ образцов с помощью масс-спектрометрии восстановленного дегликозилированного образца, как это описано ниже.

*Масс-спектрометрический анализ:* образцы анализировали так, как это описано в примере 1.

*Расчет констант скорости CP1-диен-малеимидной реакции:* константы скорости реакции второго порядка малеимид-ММАЕ с диенами в mAb определяли по интенсивностям пиков масс-спектров восстановленного дегликозилированного образца. Прохождение реакции контролировали и по исчезновению пиков, соответствующих mAb-CP1-линкеру, и по появлению пиков, соответствующих mAb-CP1-линкер-ММАЕ, но только интенсивности пиков, соответствующих mAb-CP1-линкеру на тяжелых цепях антитела, использовали для расчета относительного количества вступивших в реакцию CP1-диенов. Не вступившие в реакцию CP1-диеновые группы на mAb-CP1-линкере рассчитывали с использованием уравнения, приведенного ниже:

CP1 – диенов на mAb

$$= \left[ \frac{b}{a + b + c + d} \times 1 \right] + \left[ \frac{c}{a + b + c + d} \times 2 \right] + \left[ \frac{d}{a + b + c + d} \times 3 \right] \\ + \left[ \frac{f}{e + f + g} \times 1 \right] + \left[ \frac{g}{e + f + g} \times 2 \right]$$

a = интенсивность пика, соответствующего немодифицированной тяжелой цепи  
 b = сумма интенсивностей пиков, соответствующих тяжелым цепям с одной группой CP1-линкер  
 c = сумма интенсивностей пиков, соответствующих тяжелым цепям с двумя группами CP1-линкер  
 d = интенсивность пика, соответствующего тяжелой цепи с тремя группами CP1-линкер  
 e = интенсивность пика, соответствующего немодифицированной легкой цепи  
 f = сумма интенсивностей пиков, соответствующих легким цепям с одной группой CP1-линкер  
 g = сумма интенсивностей пиков, соответствующих легким цепям с двумя группами CP1-линкер

Данные конъюгирования дополнительно определяли в единицах молярной концентрации для определения кинетических констант скорости реакции. Константы скорости реакции второго порядка определяли по наклонам кривых, полученных при нанесении на график  $1/[CP1]$  в зависимости от времени, и по линейному регрессионному анализу. Периоды полупревращения реакции рассчитывали на основе констант скорости реакции второго порядка с использованием уравнения, приведенного ниже:

$$T_{1/2} = \frac{1}{k_2[CP1]_0}$$

$k_2$  = константа скорости реакции второго порядка,  
 $[CP1]_0$  = концентрация CP1-диена в момент времени = 0.

**Фигура 5.1.** Данные масс-спектрометрии интактного дегликозилированного образца до (A) и после (B) реакции mAb с CP1-NHS. Числа над пиками указывают на количество групп CP1-линкер, присутствующих на фрагментах mAb.

**Фигура 5.2.** Масс-спектры восстановленного дегликозилированного немодифицированного mAb, mAb-CP1-линкер (mAb-CP1) и PM-MMAE-вступивший в реакцию с mAb-CP1-линкер (mAb-CP1 PM-MMAE) в момент времени 5 мин. и 150 мин. График с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать только тяжелую цепь.

**Фигура 5.3.** Реакция mAb-CP1-линкер с малеимид-MMAE. A) Молярная концентрация не вступившего в реакцию CP1-диена на протяжении времени. Не вступивший в реакцию CP1-диен на mAb определяли по интенсивностям пиков в масс-спектрах восстановленного дегликозилированного образца. B) График зависимости обратной концентрации от времени, используемый для расчета скоростей реакции.

Таблица 5.1. Краткое изложение кинетических параметров диен-малеимидной реакции сочетания для реакции mAb-CP1-линкера с малеимид-ММАЕ<sup>a,b,c</sup>

| Полезная нагрузка | константа скорости реакции 2 <sup>-го</sup> порядка (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) | t <sub>1/2</sub> (мин) | Превращение (%) <sup>d</sup> |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|------------------------------|
| AM-ММАЕ           | 36 ± 1,4                                                                               | 13,5                   | 90                           |
| PM-ММАЕ           | 54 ± 1,2                                                                               | 8,9                    | 97                           |

<sup>a</sup>все реакции конъюгирования проводили при показателе рН 5,5, 20% DMSO, 22°C и 1,3 мг/мл CP1-модифицированного mAb

<sup>b</sup>использованное молярное соотношение MMAE:CP1-диен составляло 1:1.

<sup>c</sup>рассчитывали по интенсивностям пиков масс-спектров восстановленного дегликозилированного образца

<sup>d</sup>после 150 минут реакции

Реакция CP1-диенов с малеимид-ММАЕ была быстрой и специфичной, с периодом полупревращения порядка нескольких минут. Превращение в реакции составляло 90% или больше для обеих малеимид-ММАЕ. Скорости фенил-малеимидной реакции были несколько выше, чем скорости алкил-малеимидной реакции, однако скорости и конечное превращение двух типов малеимидов были сопоставимы.

### Пример 6. Встраивание CP1-NNAА в антитело

CP1-NNAА встраивали в положение K274 в антителе, оценивали качество экспрессированного mAb и реакционную способность CP1-диена после встраивания в антитело.

*Получение исходного раствора CP1-NNAА* : CP1-NNAА (0,5 г, 1,77 ммоль) объединяли с 6,81 мл H<sub>2</sub>O и 1,38 мл 1 М NaOH. Полученную взвесь взбалтывали при комнатной температуре до растворения всех твердых частиц (10 минут). После полного растворения светло-желтый раствор пропускали через фильтр 0,2 мкм, разделяли на аликвоты и хранили при -80°C до использования. В результате этой процедуры получили 8,2 мл исходного раствора, содержащего 216 мМ CP1 и 168 мМ NaOH.

*Экспрессия антитела*: гены антитела 12G3H11 или 1C1 IgG1 с мутацией amber в положении K274 или S239 в Fc клонировали в запатентованный рОЕ-вектор для экспрессии антител. Конструкцией трансфицировали CHO-G22 с помощью PEI<sub>max</sub> (1,5 л клеток G22) вместе с плазмидой, кодирующей дважды мутантную PylRS (Y306A/Y384F) или PylRS дикого типа, и плазмидой, содержащей tandemные повторы кассеты для экспрессии tRNA (pORIP 9X tRNA). Через четыре часа после трансфекции

в клетки вносили 3,3% добавки F9 (запатентована) и 0,2% добавки F10 (запатентована) и клетки дополнительно инкубировали при 34°C. На следующий день добавляли CP1-NNAA при конечной концентрации 0,26 мМ для клеток, трансфицированных 1C1.K274. В день 3 и день 7 в клетки снова добавляли 6,6% добавки F9 и 0,4% добавки F10. Клетки центрифугировали и собирали надосадочную жидкость в день 11. Надосадочную жидкость очищали с помощью колонки для аффинной хроматографии IgSelect (GE Health Care Life Science). Антитело элюировали с помощью 50 мМ глицина, 30 мМ NaCl, pH 3,5, элюирующего буфера, нейтрализовали с помощью 1 М трис-буфера, pH 7,5, и диализировали в PBS с pH 7,2. Концентрацию элюированного антитела определяли путем измерения поглощения при 280 нм. Рассчитанный обратный титр составил 47 мг/л для 1C1.K274. mAb 12G3H11 экспрессировали аналогичным образом в меньшем количестве, при этом добавляемое количество CP1-NNAA и время внесения варьировались. Анализ выделенного антитела проводили с помощью SDS-PAGE, используя стандартные методики. Антитело также анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии и масс-спектрометрии, как это описано ниже. Антитела со встроенной конструкцией CP1-NNAA обозначили как mAb-CP1-NNAA, чтобы отличать их от антител mAb-CP1-линкер или mAb-[положение]CP1-NNAA, где [положение] обозначает номер аминокислоты и символ аминокислоты, которую подвергли мутации в CP1-NNAA.

*Эксклюзионная хроматография (SEC):* SEC-анализ проводили с использованием системы Agilent 1100 Capillary LC, оснащенной тройной детекторной матрицей (Viscotek 301, Viscotek, Хьюстон, Техас); длину волны устанавливали на 280 нм и образцы пропускали через колонку TSK-GEL G3000SWXL (Toso Bioscience LLC, Монтгомеривилл, Пенсильвания), используя 100 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 6,8, при скорости потока 1 мл/мин.

*Конъюгирование mAb-CP1-NNAA с малеимид-ММАЕ:* mAb-CP1-NNAA (0,4 мг, 2,7 нмоль, 1 эквивалент) доводили до концентрации 3 мг/мл, используя PBS (0,133 мл). Добавляли DMSO (27 мкл) и 1 М одноосновный фосфат натрия (13 мкл) с получением соответственно ~20% и 10% об./об. растворов. Добавляли малеимид-ММАЕ (5 мкл 10 мМ исходного раствора в DMSO, 13 нмоль, 5 эквивалентов) к раствору mAb-CP1-NNAA и смесь кратковременно встряхивали. Получали ADC и с AM-ММАЕ, и с PM-ММАЕ. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 1 ч. при непрерывном перемешивании. Добавляли N-ацетилцистеин (1,1 мкл, 100 мМ, 108 нмоль, 40 эквивалентов) и раствор дополнительно инкубировали в течение 15 мин. для гашения не вступивших в реакцию малеимидных групп. Затем образцы очищали с использованием устройств PD Spintrap G-25 (GE Healthcare Life Sciences) для удаления низкомолекулярных компонентов из смеси. Затем проводили анализ образцов с помощью масс-спектрометрии восстановленных образцов, как это описано ниже.

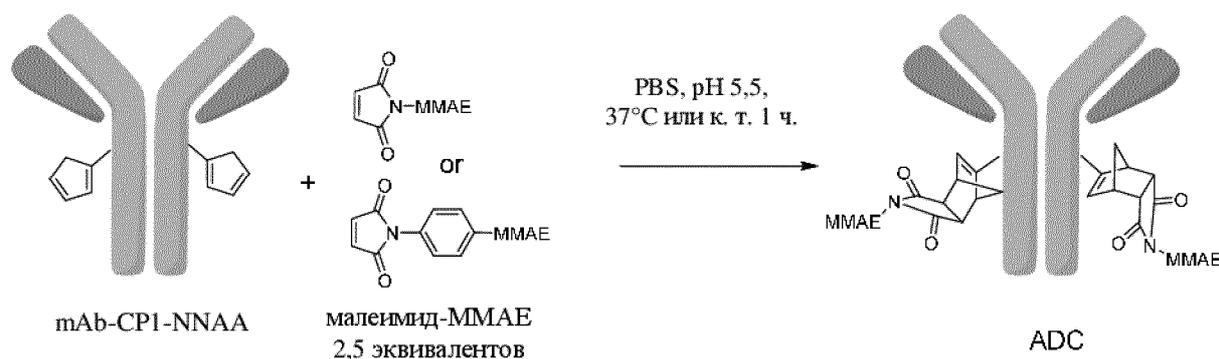


Схема 6.1. А) Реакция mAb-CP1-NNAA с малеимид-ММАЕ. CP1-NNAA встраивали в положение K274 путем мутации лизина в CP1-NNAA.

*Масс-спектрометрический анализ:* с целью проведения анализа дегликозилированного mAb EndoS (5 мкл Remove-iT EndoS (разведение 1:10 в PBS, 20000 единиц/мл, New England BioLabs) объединяли с 50 мкл образца (1 мг/мл mAb) и 5 мкл буфера Glyco Buffer 1 (New England BioLabs) с последующей инкубацией в течение 1 ч. при 37°C. Восстановленные образцы получали путем добавления 5 мкл раствора Bond-Breaker TCEP (0,5 М, Thermo Fisher Scientific) и инкубации в течение 10 мин. при 37°C. Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием масс-спектрометра Agilent 6520B Q-TOF, оснащенного колонкой RP-HPLC (ZORBAX 300 Diphenyl RRHD, 1,8 микрон, 2,1 мм x 50 мм). Параметры высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) были следующими: скорость потока 0,5 мл/мин; подвижная фаза А представляла собой 0,1% (об./об.) муравьиной кислоты в H<sub>2</sub>O со степенью чистоты для HPLC, и подвижная фаза В представляла собой 0,1% (об./об.) муравьиной кислоты в ацетонитриле. Колонку уравнивали в смеси 90% А/10% В, которую также использовали для обессоливания образцов mAb с последующим элюированием в смеси 20% А/80% В. Данные масс-спектров получали при 100-3000 масса/заряд, положительной полярности, температуре газа 350°C, давлении распылителя 48 фунтов/дюйм<sup>2</sup> и напряжении на капилляре 5000 В. Данные анализировали с использованием поставляемого изготовителем программного обеспечения для качественного анализа MassHunter (Agilent v.B.04.00), и при этом интенсивности пиков спектров после деконволюции использовали для определения относительной доли фрагментов в каждом образце, как описано ранее.

**Фигура 6.1.** Титры mAb 12G3H11 K274CP1-NNAA после экспрессии в клетках млекопитающих, содержащих мутантную или дикого типа tRNA-синтетазу (TRS). Конечную концентрацию CP1-NNAA в средах и время добавления варьировали, что указано на оси х. Следует отметить, что структура неприродной аминокислоты #50 показана на фигуре 6.8.

Таблица 6.1. Краткое изложение получения mAb 1C1 K274CP1-NNAА

|                                      |      |
|--------------------------------------|------|
| Количество добавленной CP1 NNAА (мМ) | 0,26 |
| Объем (л)                            | 1,7  |
| Масса выделенного (мг)               | 67   |
| Титр (мг/л)                          | 39   |
| Мономер (%)                          | 90,8 |

**Фигура 6.2.** Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного образца mAb 12G3H11 K274CP1-NNAА. А) Диапазон масс, показывающий легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC) mAb. В) График с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать только тяжелую цепь mAb. Выявленная масса тяжелой цепи (51129,55 а.е.м.) практически совпадает с расчетной массой тяжелой цепи (51127 а.е.м.), доказывая встраивание CP1NNAА в тяжелую цепь антитела.

**Фигура 6.3.** SEC-анализ mAb 12G3H11 K274CP1-NNAА, свидетельствующий о получении мономерного продукта. Указаны высокомолекулярные фрагменты (HMWS).

**Фигура 6.4.** Анализ mAb 1C1-K274CP1-NNAА (1C1.K274CP1) с использованием SDS-PAGE.

**Фигура 6.5.** Данные масс-спектрометрического анализа восстановленных дегликозилированных продуктов конъюгирования mAb 12G3H11 K274CP1-NNAА с MMAЕ. А) не вступившее в реакцию антитело, В) продукт реакции с AM-MMAЕ, С) продукт реакции с PM-MMAЕ. График с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать только тяжелую цепь mAb.

**Фигура 6.6.** Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта конъюгирования mAb 1C1 K274CP1-NNAА с AM-MMAЕ. А) не вступившее в реакцию антитело, В) продукт реакции с AM-MMAЕ. График с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать только тяжелую цепь mAb (HC). На фигурах 6.9 и 6.10 показаны графики с масс-спектрами, увеличенные для того, чтобы показать и тяжелую, и легкую цепи.

**Фигура 6.7.** Химическая структура CP1-NNAА, демонстрирующая изомеры соединения, которые встречаются в соотношении 1:1.

**Фигура 6.8.** Химическая структура соединения 50, фуранового аналога CP1-NNAА, описанного в литературе. Данное соединение использовали в качестве контроля для исследований экспрессии с использованием mAb 12G3H11.

**Фигура 6.9.** Данные масс-спектрометрического анализа восстановленных дегликозилированных продуктов конъюгирования mAb-ММАЕ с 12G3H11 K274 CP1-NNAА. А) не вступившее в реакцию антитело, В) продукт реакции с AM-ММАЕ, С) продукт реакции с PM-ММАЕ. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую, и легкую цепи антитела.

**Фигура 6.10.** Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта конъюгирования mAb 1C1 K274CP1-NNAА с AM-ММАЕ. А) не вступившее в реакцию антитело, В) продукт реакции с AM-ММАЕ. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую, и легкую цепи антитела, а также высокомолекулярные фрагменты.

Таблица 6.2. Краткое изложение данных конъюгирования K274CP1-NNAА mAb-ММАЕ<sup>a,b,c</sup>

| mAb     | Полезная нагрузка | Эффективность конъюгирования (%) | Выявленная $\Delta$ массы (а.е.м.) | Расчетная $\Delta$ массы (а.е.м.) | DAR <sup>d</sup> | Комментарии                            |
|---------|-------------------|----------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------|----------------------------------------|
| 12G3H11 | AM-ММАЕ           | 95,7                             | 1315,47                            | 1316,65                           | 1,91             |                                        |
| 12G3H11 | PM-ММАЕ           | 95,1                             | 1335,96                            | 1336,64                           | 1,46             | Выявленное расщепление линкера         |
| 1C1     | AM-ММАЕ           | 100                              | 1317,59                            | 1316,65                           | 2,0              | Неконъюгированные фрагменты не выявили |

<sup>a</sup> все реакции конъюгирования проводили при показателе pH 5,5, 20% DMSO, 22°C и 3 мг/мл CP1-NNAА mAb. CP1-NNAА встраивали в положение K274 вместо лизина.

<sup>b</sup> использованное молярное соотношение ММАЕ:CP1-диен равнялось 2,5:1.

<sup>c</sup> рассчитывали по интенсивностям пиков масс-спектров восстановленного образца.

<sup>d</sup> DAR = соотношение лекарственное средство и антитело, при этом при расчете DAR фрагменты расщепленного линкера не включали.

Встраивание CP1-NNAА в антитела в положение K274 подтвердили с использованием двух разных конструкций на основе антитела: 12G3H11 и 1C1. Выделенное антитело характеризовалось высоким качеством и не содержало усеченный продукт и содержало лишь незначительное количество агрегатов. Титр, достигнутый при получении

антитела 1C1 в масштабе 1,7 л, был достаточно высоким, учитывая небольшое количество CP1-NNAА, которое добавили к клеткам. Реакционная способность CP1-диена сохранялась на протяжении всего процесса экспрессии и очистки о чем свидетельствовало практически полное превращение антитела в ADC.

**Пример 7. Стабильность конъюгатов mAb CP1 NNAА с лекарственным средством малеимид-ММАЕ в сыворотке крови**

Стабильность продукта циклоприсоединения 4+2 (циклопентадиен-малеимидная связь) в физиологически нормальной среде *ex vivo* оценивали путем инкубации в сыворотках крови мышей и крыс в течение 7 дней при 37°C.

*Получение ADC:* 12G3H11 K274CP1-NNAА, который несет CP1-NNAА в положении K274, конъюгировали с малеимид-ММАЕ для получения необходимого ADC. Сначала mAb 12G3H11 K274CP1-NNAА (0,4 мг, 2,7 нмоль, 1 эквивалент) довели до концентрации 3 мг/мл, используя PBS (0,133 мл). Добавляли DMSO (27 мкл) и 1 М одноосновного фосфата натрия (13 мкл) с получением соответственно ~20% и 10% об./об. растворов. Добавляли малеимид-ММАЕ (5 мкл 10 мМ исходного раствора в DMSO, 13 нмоль, 5 эквивалентов) к раствору 12G3H11 K274CP1-NNAА mAb и смесь кратковременно встряхивали. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 1 ч. при непрерывном перемешивании. Добавляли N-ацетилцистеин (1,1 мкл, 100 мМ, 108 нмоль, 40 эквивалентов) и раствор дополнительно инкубировали в течение 15 мин. для гашения не вступивших в реакцию малеимидных групп. Затем образцы очищали с использованием устройств PD Spintrap G-25 (GE Healthcare Life Sciences) для удаления низкомолекулярных компонентов из смеси. Затем проводили анализ восстановленных образцов с помощью масс-спектрометрии, как описано ниже, для подтверждения конъюгирования и количественного определения соотношения лекарственное средство:антитело.

*Анализ стабильности в сыворотке крови:* стабильность образцов ADC оценивали в цельной сыворотке крови крыс (Jackson Immunoresearch, № кат. 012-000-120) и цельной сыворотке крови мышей (Jackson Immunoresearch, № кат. 015-000-120). Продукт в виде лиофилизированной сыворотки крови восстанавливали с помощью стерильной воды согласно протоколу производителя. Образцы ADC добавляли к сыворотке крови с получением раствора антитела, имеющего концентрацию 0,2 мг/мл. Смеси ADC/сыворотка крови пропускали через 0,2 мкм фильтр, герметично закрывали в воздухонепроницаемом флаконе и инкубировали при 37°C. В качестве референтного образца T=0 дн. отбирали и замораживали аликвоту. Оставшийся образец инкубировали при 37°C в течение 7 дн., а затем выделяли антитело (конъюгированное и неконъюгированное) путем иммунозахвата с использованием смолы, содержащей антитело, специфическое к Fc-фрагменту IgG человека, конъюгированное с агарозой

(Sigma-Aldrich). Смолу дважды промывали с использованием PBS, однократно буфером для элюирования IgG, и затем двухкратно с использованием PBS. Затем образцы сыворотки крови с ADC объединяли со смолой, содержащей антитело к IgG человека (100 мкл смеси ADC-сыворотка крови, 50 мкл суспензии смолы), и осторожно перемешивали в течение 15 минут при комнатной температуре. Смолу извлекали центрифугированием, а затем дважды промывали с использованием PBS. Осадок смолы ресуспендировали в 100 мкл буфера для элюирования IgG (Thermo Scientific) и дополнительно инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Смолу удаляли путем центрифугирования, а затем добавляли 20 мкл 10X буфера Glyco Buffer 1 (New England Biolabs) и 5 мкл Endo S (Remove iT EndoS, New England Biolabs) к надосадочной жидкости, далее инкубировали в течение 1 ч. при 37°C. Раствор дегликозилированного антитела человека стерильно фильтровали, восстанавливали с помощью TCEP (раствора Bond Breaker 0,5 М TCEP, Thermo Fisher Scientific) и анализировали с помощью LC/MS. Процент конъюгированного антитела и количественные показатели продуктов расщепления линкера рассчитывали по высоте пиков масс-спектров.

*Масс-спектрометрический анализ:* образцы анализировали так, как это описано в примере 1.

**Фигура 7.1.** Стабильность ADC 12G3H11 K274CP1-NNAА АМ-ММАЕ в сыворотке крови крыс. ADC инкубировали в сыворотке крови крыс при 37°C в течение 7 дней и извлекали с помощью иммунозахвата до проведения масс-спектрометрического анализа восстановленного образца. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы подробно показать значения масс, соответствующие участкам тяжелой цепи (НС). Значительной деконволюции не выявили.

**Фигура 7.2.** Стабильность ADC 12G3H11 K274CP1-NNAА РМ-ММАЕ в сыворотке крови крыс. ADC инкубировали в сыворотке крови крыс при 37°C в течение 7 дней и извлекали с помощью иммунозахвата до проведения масс-спектрометрического анализа восстановленного образца. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы подробно показать значения масс, соответствующие участкам тяжелой цепи (НС). Значительного деконъюгирования не выявили, однако выявили расщепление линкера в фенилацетамидной группе. Описание продукта расщепления см. в приложении 7.

**Фигура 7.3.** Стабильность ADC 12G3H11 K274CP1-NNAА АМ-ММАЕ в сыворотке крови мышей. ADC инкубировали в сыворотке крови мышей при 37°C в течение 7 дней и извлекали с помощью иммунозахвата до проведения масс-спектрометрического анализа восстановленного образца. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы подробно показать значения масс, соответствующие участкам тяжелой цепи

(НС). Значительного деконъюгирования не выявили, однако выявили практически полное расщепление линкера в дипептиде val-cit. Описание продукта расщепления см. в приложении 7.

**Фигура 7.4.** Стабильность ADC 12G3H11 K274CP1-NNAА РМ-ММАЕ в сыворотке крови мышей. ADC инкубировали в сыворотке крови мышей при 37°C в течение 7 дней и извлекали с помощью иммунозахвата до проведения масс-спектрометрического анализа восстановленного образца. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы подробно показать значения масс, соответствующие участкам тяжелой цепи (НС). Значительного деконъюгирования не выявили, однако выявили практически полное расщепление линкера. Описание продуктов расщепления см. в приложении 7.

Таблица 7.1. Краткое изложение данных стабильности ADC 12G3H11 K274CP1-NNAА ММАЕ в сыворотке крови<sup>a,b</sup>

| Полезная нагрузка | Вид   | Деконъюгирование <sup>c</sup> (%) | Расщепление линкера (%) <sup>c</sup> | ММАЕ DAR <sup>d</sup> |
|-------------------|-------|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| АМ-ММАЕ           | мышь  | 0,52 ± 0,9                        | 99,1 ± 0,1 <sup>e</sup>              | 0                     |
|                   | крыса | 0,07 ± 0,4                        | не выявили                           | 1,9 ± 0,01            |
| РМ-ММАЕ           | мышь  | не выявили                        | 78 ± 2 <sup>e</sup>                  | 0,07 ± 0,06           |
|                   | крыса | 1,4 ± 2,4                         | 31 ± 1 <sup>f</sup>                  | 1,35 ± .02            |

<sup>a</sup>ADC, полученные с mAb 12G3H11, несущим мутацию K274CP1-NNAА.

<sup>b</sup>образцы инкубировали в течение 7 дней при 37°C

<sup>c</sup>рассчитали по интенсивностям пиков масс-спектров восстановленного дегликозилированного образца.

<sup>d</sup>при расчете DAR фрагменты расщепленного линкера не включали. Теоретическое DAR = 2.

<sup>e</sup>И расщепление дипептида val-cit, и расщепление фенилацетамида способствовали полному расщеплению линкера и потере лекарственного средства.

<sup>f</sup>Выявили расщепление фенилацетамида в линкере, но не расщепление дипептида val-cit.

**Фигура 7.5.** Показаны химические структуры полезных нагрузок, представляющих собой ММАЕ, и их молекулярная масса.

**Фигура 7.6.** Химические структуры преобладающих продуктов расщепления, которые выявили после инкубации ADC в сыворотке крови мышей. На А) и В) показаны фрагменты, оставшиеся связанными с антителом (CP1-малеимидная связь не показана), соответственно для конъюгатов АМ-ММАЕ и РМ-ММАЕ. С) Изображены фрагменты, высвободившиеся после расщепления дипептида val-cit.

**Фигура 7.7.** Химическая структура продуктов расщепления РМ-ММАЕ после инкубации в сыворотке крови крыс. А) Фрагменты, оставшиеся связанными с антителом, и В) высвободившиеся фрагменты.

Продукты циклопентадиен-малеимидного конъюгирования mAb-CP1-NNAА с малеимид-ММАЕ стабильны в сыворотке крови крыс и мышей в течение 7 дней независимо от типа малеимида, который содержится в полезной нагрузке, представляющей собой ММАЕ. Обнаружили, что другие части полезной нагрузки ADC разрушаются до малеимид-CP1-диеновой связи. В частности, в полезных нагрузках, представляющих собой и фенилмалеимид-, и алкилмалеимид-ММАЕ, проявляется максимальное расщепление дипептида val-cit в сыворотке крови мышей, очевидно, из-за высокой степени доступности для ферментов сайта конъюгирования K274. Фенил-малеимидный конъюгат демонстрирует дополнительную структурную уязвимость в фенилацетамиде между фенилмалеимидом и дипептидом val-cit. Данное расщепление было более очевидным в сыворотке крови крыс, чем в сыворотке крови мышей. Не ясно, в какой момент процесса происходит расщепление фенилацетамида, поскольку оно не увеличивалось в период 0-7 дней. Возможно, что расщепление происходит в ходе иммунозахвата, который включает стадию промывания при низком показателе pH. В целом продукт конъюгирования циклопентадиена с малеимидом продемонстрировал стабильность в физиологически нормальной среде.

### **Пример 8. Синтез спироциклопентадиен (CP2)-содержащих соединений**

Спироциклопентадиен-содержащие сшивающие средства и неприродные аминокислоты (NNAА) получали согласно общей схеме, приведенной ниже:

**Фигура 8.1.** Общая схема конструкции спироциклопентадиеновых сшивающих средств (А) и NNAА со спироциклопентадиеновой группой (В), описанных в примере 8.

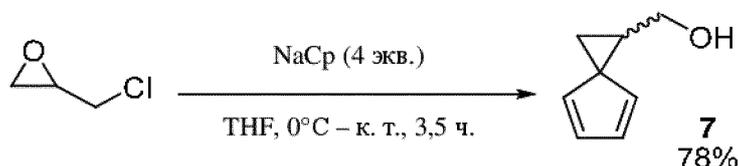
Синтез CP2-NNAА (**10**) начинали с реакции коммерчески доступного раствора NaCr с эпихлоргидрином согласно модифицированному варианту реакции Карреры.<sup>1</sup> Использовали рацемический эпихлоргидрин, но **7** может быть синтезирован в 91% э.и. с использованием энантимерно чистого эпихлоргидрина. В ходе реакции **7** с 4-нитрофенилхлорформиадом получали активированный карбамат **8**. Реакция **8** с Fmoc-Lys-OH дает Fmoc-защищенный **9**, в котором может быть удалена защитная группа с использованием пиперидина с целью получения NNAА **10**. Соединение **10** демонстрирует высокую стабильность к кислоте по сравнению с **4**, и ни один из

промежуточных продуктов его синтеза не проявляет димеризации или распада при хранении при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Синтез CP2-функционализированного NHS-сложного эфира **12** начинали с реакции **7** с янтарным ангидридом с целью получения кислоты **11**. Проводили реакцию кислоты **7** с EDC·HCl и *N*-гидроксисукцинимидом с получением NHS-сложного эфира **12**. Соединение **12** не проявляет тенденции к димеризации при хранении в течение нескольких дней при комнатной температуре.

*Материалы и способы:* если не указано иное, реакции проводили в атмосфере  $\text{N}_2$  с использованием растворителей, чистых для анализа. DCM и толуол выдерживали над  $3\text{ \AA}$  молекулярными ситами. THF пропускали через колонку с активированным оксидом алюминия. Все коммерчески доступные реагенты использовали в том виде, в котором они были получены. Тонкослойную хроматографию (TLC) проводили с использованием пластин (0,25 мм) от E. Merck, предварительно покрытых силикагелем 60 с флуоресцентным индикатором F254, и визуализировали путем воздействия УФ-излучения (254 нм) или окрашивания *n*-анисовым альдегидом, нингидрином или перманганатом калия. Колоночную флэш-хроматографию проводили с использованием силикагеля для нормальной фазы (60  $\text{ \AA}$ , 0,040–0,063 мм, Geduran).  $^1\text{H}$  ЯМР-спектры регистрировали на спектрометрах Varian (400, 500 или 600 МГц) и представляли относительно сигналов дейтерированного растворителя. Данные для  $^1\text{H}$  ЯМР-спектров представлены следующим образом: химический сдвиг ( $\delta$  ppm), мультиплетность, константа взаимодействия (Гц) и интеграция.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектры регистрировали на спектрометрах Varian (100, 125 или 150 МГц). Данные для  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектров выражены показателями химического сдвига ( $\delta$  ppm). Масс-спектры получали из отдела масс-спектрометрии Калифорнийского университета в Санта-Барбаре, полученные на времяпролетном масс-спектрометре GCT Premier (Waters Corp.) с высокой разрешающей способностью с источником десорбции полев (FD).

### Синтез CP2-NNAА (10)

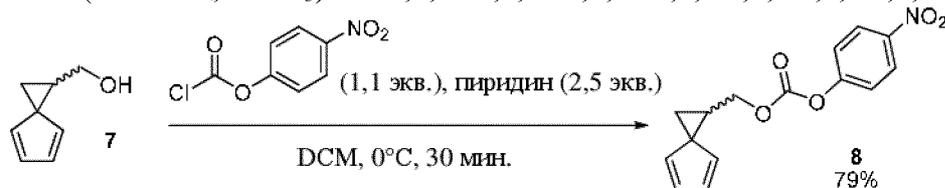


Спиро[2,4]гепта-4,6-диен-1-илметанол (**7**):

натрия циклопентадиенид (2 М раствор в THF, 10 мл, 20 ммоль, 4 экв.) добавляли к THF (40 мл) и охлаждали до  $0^{\circ}\text{C}$ . Эпихлоргидрин (0,39 мл, 5,0 ммоль, 1 экв.) добавляли по каплям в течение 10 мин. и реакционную смесь перемешивали при  $0^{\circ}\text{C}$  в течение 1,5 ч., а затем дополнительно в течение 2 ч. при к.т. Реакционную смесь гасили с помощью  $\text{H}_2\text{O}$  (40 мл), затем переносили в делительную воронку. Добавили насыщенный раствор  $\text{NaHCO}_3$  в  $\text{H}_2\text{O}$  (40 мл) и простом эфире (40 мл) и разделяли слои. Органические слои

промывали солевым раствором (40 мл), сушили над  $MgSO_4$ , фильтровали, а затем удаляли растворитель. Остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (гексан:EtOAc, 2:1) с получением **7** (0,48 г, 78%) в виде коричневого масла.

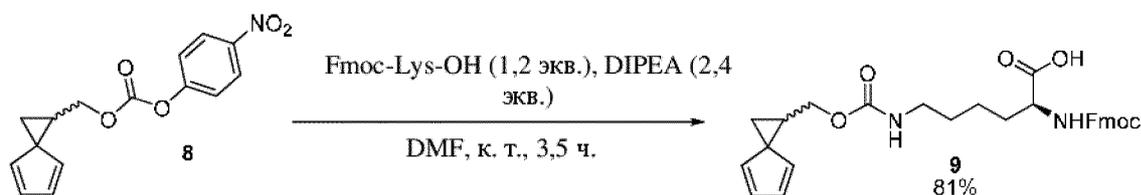
Фактор отклика (гексан:EtOAc, 2:1): 0,22;  $^1H$  ЯМР (500 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  6,64 (td,  $J = 1,6, 5,1$  Гц, 1 H), 6,51 (td,  $J = 1,7, 5,1$  Гц, 1 H), 6,27 (tdd,  $J = 1,0, 2,1, 5,2$  Гц, 1 H), 6,12 (td,  $J = 1,7, 5,1$  Гц, 1 H), 4,08 - 3,88 (m, 1 H), 3,59 (dd,  $J = 8,8, 11,7$  Гц, 1 H), 2,48 - 2,40 (m, 1 H), 1,87 (dd,  $J = 4,3, 8,7$  Гц, 1 H), 1,69 (dd,  $J = 4,4, 7,0$  Гц, 1 H), 1,57 (br. s., 1 H) ppm;  $^{13}C$  ЯМР (125 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  139,4, 133,9, 131,7, 128,6, 64,9, 41,9, 30,0, 17,6 ppm.



4-Нитрофенилспиро[2,4]гепта-4,6-диен-1-илметилкарбонат (**8**):

**7** (2,80 г, 22,9 ммоль, 1 экв.) добавляли к DCM (100 мл) и охлаждали до  $0^\circ C$ . Добавляли пиридин (4,61 мл, 57,3 ммоль, 2,5 экв.), затем добавляли 4-нитрофенилхлорформиат (5,08 г, 25,2 ммоль, 1,1 экв.). Реакционную смесь перемешивали при  $0^\circ C$  до израсходования исходного материала (TLC, 30 мин). Реакционную смесь вливали в делительную воронку и промывали с помощью насыщенного раствора  $NH_4Cl$  в  $H_2O$  (100 мл). Водный слой экстрагировали с помощью DCM (50 мл). Органические слои объединяли, промывали солевым раствором (50 мл), сушили над  $Na_2SO_4$ , фильтровали и растворитель удаляли. Остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (гексан:EtOAc, 6:1-4:1) с получением **8** (5,17 г, 79%) в виде масла янтарного цвета.

Фактор отклика (гексан:EtOAc, 4:1): 0,28;  $^1H$  ЯМР (400 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,28 (d,  $J = 9,0$  Гц, 2 H), 7,37 (d,  $J = 9,0$  Гц, 2 H), 6,62 (td,  $J = 1,7, 5,2$  Гц, 1 H), 6,53 (td,  $J = 1,7, 4,8$  Гц, 1 H), 6,25 (td,  $J = 1,8, 5,5$  Гц, 1 H), 6,11 (td,  $J = 1,6, 5,1$  Гц, 1 H), 4,53 (dd,  $J = 7,6, 11,5$  Гц, 1 H), 4,40 (dd,  $J = 7,4, 11,3$  Гц, 1 H), 2,52 (quin,  $J = 7,6$  Гц, 1 H), 1,92 (dd,  $J = 4,7, 8,6$  Гц, 1 H), 1,76 (dd,  $J = 4,7, 6,7$  Гц, 1 H) ppm;  $^{13}C$  ЯМР (100 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  155,4, 152,3, 145,3, 138,6, 133,8, 131,7, 129,4, 125,2, 121,7, 70,9, 41,5, 24,6, 16,9 ppm.

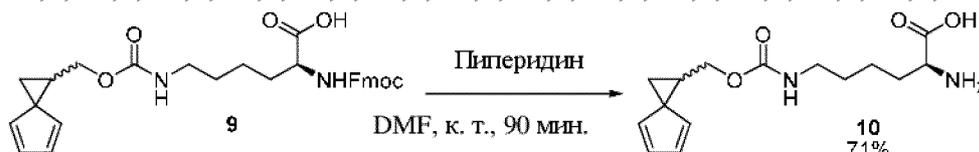


Фmoc-Lys(спиро[2,4]гепта-4,6-диен-1-илметилкарбонат)-ОН (**9**):

**8** (5,12 г, 17,8 ммоль, 1 экв.) добавляли к DMF (40 мл), затем добавляли Фmoc-Lys-ОН (7,87 г, 21,4 ммоль, 1,2 экв.) и DIPEA (7,44 мл, 42,7 ммоль, 2,4 экв.). Реакционную смесь взбалтывали до израсходования исходного материала (ЯМР, 3,5 ч.), затем вливали в смесь EtOAc (100 мл) и  $H_2O$  (140 мл). Водный слой подкисляли до

показателя pH 2-3 с помощью HCl (1 М, 100 мл), вливали в делительную воронку и разделяли слои. Водный слой экстрагировали с помощью EtOAc (2 x 100 мл). Органические слои объединяли, промывали солевым раствором (100 мл), сушили над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтровали и растворитель удаляли. Остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (гексан:EtOAc, 3:1, затем DCM:MeOH:AcOH, 89:10:1) и удаляли растворитель. Остаточные AcOH и DMF удаляли путем суспендирования продукта в DCM, промывания солевым раствором, высушивания органического слоя над Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фильтрации с последующим удалением растворителя с получением **9** (7,43 г, 81%) в виде бледно-желтой пены.

Фактор отклика (DCM:MeOH, 90:10): 0,39; <sup>1</sup>H ЯМР (500 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,62 (br. s., 1 H), 7,75 (d, *J* = 7,3 Гц, 2 H), 7,66 - 7,49 (m, 2 H), 7,39 (t, *J* = 7,4 Гц, 2 H), 7,30 (t, *J* = 7,3 Гц, 2 H), 6,54 (br. s., 1 H), 6,47 (br. s., 1 H), 6,21 (br. s., 1 H), 6,04 (br. s., 1 H), 5,74 (d, *J* = 7,3 Гц, 1 H), 4,91 (br. s., 1 H), 4,53 - 4,00 (m, 5 H), 3,21 - 3,00 (m, 2 H), 2,97 (s, 1 H), 2,90 (d, *J* = 0,8 Гц, 1 H), 2,47 - 2,31 (m, 1 H), 1,95 - 1,27 (m, 6 H) ppm; <sup>13</sup>C ЯМР (125 МГц, CDCl<sub>3</sub>) 163,2, 156,7, 143,6, 141,2, 138,9, 134,5, 130,9, 128,9, 127,6, 127,0, 125,1, 119,9, 115,6, 67,0, 66,5, 53,5, 47,1, 41,6, 40,4, 36,8, 31,8, 29,2, 25,7, 22,2, 21,4, 17,1 δ ppm.



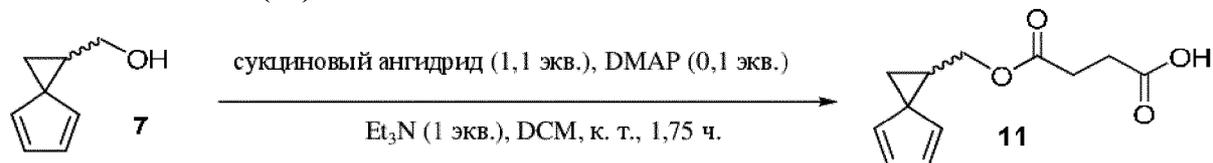
CP2-NNAА (**10**):

**9** (5,50 г, 10,6 ммоль, 1 экв) добавляли к DMF (150 мл), затем добавляли пиперидин (16,8 мл). Реакционную смесь перемешивали до израсходования исходного материала (TLC, 90 мин.), затем растворитель удаляли. Et<sub>2</sub>O (100 мл) добавляли к остатку и суспензию обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин. Суспензию фильтровали и споласкивали H<sub>2</sub>O (2 x 100 мл) и Et<sub>2</sub>O (100 мл). Твердое вещество суспендировали в MeOH (10 мл), перемешивали с легким нагреванием (~40°C) в течение 10 мин, добавляли Et<sub>2</sub>O (40 мл), суспензию фильтровали и промывали с помощью Et<sub>2</sub>O (2 x 50 мл). Соединение высушивали в вакууме с получением **10** (2,24 г, 71 %) в виде белого порошка.

Фактор отклика (DCM:MeOH, 85:15): 0,29; <sup>1</sup>H ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub> + 1 капля TFA) δ 8,20 (br. s., 3 H), 7,16 (t, *J* = 5,5 Гц, 1 H), 6,48 (td, *J* = 1,8, 5,1 Гц, 1 H), 6,40 (d, *J* = 5,1 Гц, 1 H), 6,32 (d, *J* = 5,1 Гц, 1 H), 6,12 (td, *J* = 1,9, 4,9 Гц, 1 H), 4,24 (dd, *J* = 6,7, 11,7 Гц, 1 H), 3,99 (dd, *J* = 7,6, 11,5 Гц, 1 H), 3,88 (d, *J* = 5,1 Гц, 1 H), 2,94 (d, *J* = 5,9 Гц, 2 H), 2,37 (quin, *J* = 7,5 Гц, 1 H), 1,83 - 1,63 (m, 4 H), 1,44 - 1,19 (m, 4 H) ppm; <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц, DMSO-d<sub>6</sub> + 1 капля TFA):

171,2, 156,2, 139,3, 135,2, 130,4, 128,3, 65,3, 51,9, 42,0, 29,7, 28,9, 25,7, 21,6, 16,4; MS (EI) Точная расчетная масса для  $C_{15}H_{22}N_2O_4$   $[M]^+$ : 294,1580; измеренное значение: 294,1571.

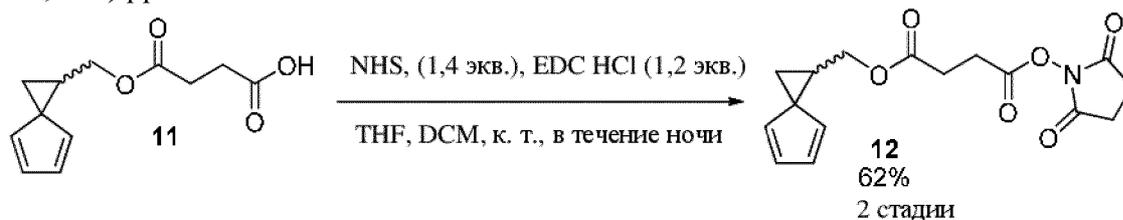
### Синтез CP2-NHS (12)



4-Оксо-4-(спиро[2,4]гепта-4,6-диен-1-илметокси)бутановая кислота (**11**):

DCM (1,5 мл) добавляли в флакон, содержащий **1** (0,37 г, 3,0 ммоль, 1 экв.). Добавляли  $Et_3N$  (0,42 мл, 3,0 ммоль, 1 экв.), DMAP (37 мг, 0,30 ммоль, 0,1 экв.) и янтарный ангидрид (0,33 г, 3,3 ммоль, 1,1 экв.), реакционную смесь герметично закрывали в атмосфере воздуха и перемешивали при комнатной температуре до израсходования исходного материала (TLC, 1,75 ч.). Реакционную смесь вливали в делительную воронку с DCM (50 мл) и промывали водным раствором HCl (1 М, 50 мл). Водный слой экстрагировали с использованием DCM (50 мл), органические слои объединяли, сушили над  $Na_2SO_4$ , фильтровали и растворитель удаляли с получением **11** с достаточной степенью чистоты для следующей реакции.

Фактор отклика (EtOAc): 0,56;  $^1H$  ЯМР (400 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  10,60 (br. s., 1 H), 6,57 (td,  $J = 1,9, 5,3$  Гц, 1 H), 6,50 (td,  $J = 1,8, 5,1$  Гц, 1 H), 6,21 (td,  $J = 1,7, 5,2$  Гц, 1 H), 6,07 (td,  $J = 1,8, 5,1$  Гц, 1 H), 4,37 (dd,  $J = 7,4, 11,7$  Гц, 1 H), 4,20 (dd,  $J = 7,0, 11,7$  Гц, 1 H), 2,74 - 2,57 (m, 4 H), 2,42 (quin,  $J = 7,8$  Гц, 1 H), 1,85 (dd,  $J = 4,5, 8,4$  Гц, 1 H), 1,69 (dd,  $J = 4,3, 7,0$  Гц, 1 H) ppm.



CP2-NHS (**12**):

THF (10 мл) добавляли в пробирку, содержащую **11** (теор. 3,0 ммоль, 1 экв.). Добавляли NHS (0,48 г, 4,2 ммоль, 1,4 экв.), EDC·HCl (0,69 г, 3,6 ммоль, 1,2 экв.) и DCM (5 мл), реакционную смесь герметично закрывали в атмосфере воздуха и взбалтывали при к. т. в течение ночи. Растворитель удаляли и остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (гексан:EtOAc, 1:1) с получением **12** (0,59 г, 62% за две стадии) в виде бесцветного вязкого масла.

Фактор отклика (гексан:EtOAc, 1:1): 0,34;  $^1H$  ЯМР (400 МГц,  $CDCl_3$ )  $\delta$  6,56 (td,  $J = 1,8, 5,1$  Гц, 1 H), 6,48 (td,  $J = 1,8, 5,1$  Гц, 1 H), 6,21 (td,  $J = 1,6, 3,4$  Гц, 1 H), 6,06 (td,  $J = 1,6, 3,4$  Гц, 1 H), 4,36 (dd,  $J = 7,4, 11,7$  Гц, 1 H), 4,21 (dd,  $J = 7,4, 11,7$  Гц, 1 H), 2,93 (t,  $J = 7,0$

Гц, 2 H), 2,83 (s, 4 H), 2,73 (t, J = 7,4 Гц, 2 H), 2,42 (quin, J = 7,6 Гц, 1 H), 1,83 (dd, J = 4,3, 8,6 Гц, 1 H), 1,68 (dd, J = 4,5, 6,8 Гц, 1 H) ppm; <sup>13</sup>C ЯМР (100 МГц, CDCl<sub>3</sub>) δ 170,8, 168,9, 167,6, 138,8, 134,3, 131,2, 129,0, 66,6, 41,5, 28,6, 26,2, 25,5, 25,1, 17,3 ppm.

1. Ledford, B. E.; Carreira, E. M., Total Synthesis of (+)-Trehazolin: Optically Active Spirocycloheptadienes as Useful Precursors for the Synthesis of Amino Cyclopentitols. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, *117*, 11811-11812.

**Пример 9. CP2-диен-малеимидное конъюгирование, предназначенное для получения ADC посредством сшивающего средства, связанного с модифицированным mAb**

Оценивали возможность осуществления спироциклопентадиен-малеимидных реакций для биоконъюгирования. Spiroциклопентадиеновые группы вводили посредством гетеробифункционального линкера, вступающего в реакцию с аминогруппой, согласно такой же общей стратегии, которая описана в примере 3.

*Введение функциональной группы CP2 в mAb:* CP2-диеновую функциональную группу вводили в mAb IgG1 посредством реакции первичных аминов лизина с CP2-диеном, активированным NHS-сложным эфиром. Данный подход в результате привел к произвольному конъюгированию связанных амидной связью циклопентадиеновых групп. Полученное антитело назвали mAb-CP2-линкер, но также на фигурах оно может обозначаться как mAb-CP2. См. подписи к фигурам для уточнения. Типичную реакцию модификации mAb можно описать следующим образом. Раствор mAb доводили до концентрации 5 мг/мл (3 мл, 15 мг mAb, 100 нмоль, 1 экв.), используя PBS, pH 7,2, с последующим добавлением 10% об./об. 1 М NaHCO<sub>3</sub>. Данный раствор охлаждали на льду и добавляли 35 мкл CP2-NHS (10 мМ исходного раствора в DMAc, 350 нмоль, 3,5 эквивалента). Реакцию проводили на льду в течение 5 минут с последующей реакцией при комнатной температуре в течение 1 ч. при непрерывном перемешивании. Вступившее в реакцию mAb очищали путем диализа (Slide-A-Lyzer, 10 кДа MWCO) против PBS, 1 мМ EDTA, pH 7,4, 0°C в течение 24 ч. Введение CP2 определяли количественно с помощью масс-спектрометрии интактного дегликозилированного образца, как описано ниже, и выявили, что в данном примере оно составило 3,29 CP2-линкера (и, соответственно, диена) на mAb, что соответствует 94% превращению CP2-NHS в конъюгат на основе антитела.

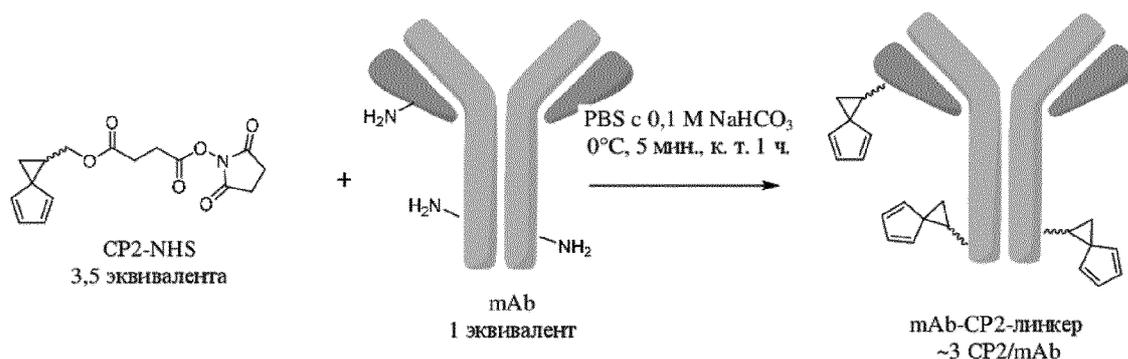


Схема 9.1. Модификация mAb с помощью CP2-NHS

*Реакция CP2-модифицированного mAb с малеимид-ММАЕ:* mAb-CP2-линкер (3,29 CP2-диена/mAb, 1 мг, 6,7 нмоль mAb, 1 эквивалент) разбавляли с использованием PBS (pH 7,4), доводя до конечной концентрации 3,16 мг/мл. Затем добавляли DMSO с получением 20% об./об. раствора с последующим добавлением 1 М одноосновного фосфата натрия с получением 10% об./об. раствора. После добавления всех компонентов раствора получали смесь, содержащую 2,43 мг/мл mAb, 53,3 мкМ CP2, 1,78 М DMSO, 110 мМ монофосфата натрия, 100 мМ NaCl, pH 5,5. AM-ММАЕ или PM-ММАЕ (10 мкл 10 мМ исходного раствора в DMAc, 100 нмоль, 15 эквивалентов) добавляли к раствору антитела. Реакционную смесь кратковременно встряхивали и выдерживали при 22°C или 37°C с перемешиванием. После 4 ч. реакции N-ацетилцистеин (8 мкл 100 мМ раствора, 120 эквивалентов) добавляли для гашения не вступивших в реакцию малеимидных групп. Образцы очищали с использованием устройств PD Spintrap G-25 (GE Healthcare Life Sciences) для удаления низкомолекулярных компонентов из смеси. Затем проводили анализ образцов с помощью масс-спектрометрии восстановленного дегликозилированного образца, как описано ниже.

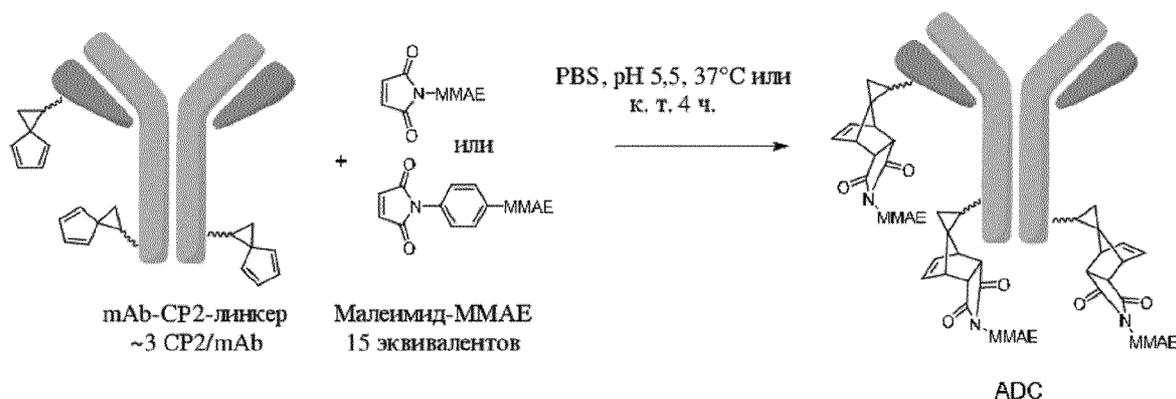


Схема 9.2. Реакция mAb-CP2-линкера с малеимид-ММАЕ

*Масс-спектрометрический анализ:* образцы анализировали так, как это описано в примере 1.

**Фигура 9.1.** Данные масс-спектрометрии интактного дегликозилированного образца до (А) и после (В) реакции с CP2-NHS. Числа под пиками в (В) указывают на количество CP2-диеновых групп, введенных в mAb. Оценка введения CP2-линкера по интенсивностям пиков дала 3,29 CP2-диена на mAb.

Таблица 9.1. Краткое изложение реакций CP2-NHS с mAb

| Эквиваленты CP1-NHS (относительно mAb) | [mAb] мг/мл | CP2-линкер на mAb | Превращение (%) |
|----------------------------------------|-------------|-------------------|-----------------|
| 3,5                                    | 5           | 3,29              | 94              |

**Фигура 9.2.** Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного дегликозилированного образца mAb-CP2-линкер до и после реакции с AM-MMAE и PM-MMAE. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую, и легкую цепи.

**Фигура 9.3.** Масс-спектры восстановленных дегликозилированных продуктов реакции mAb-CP2-линкер с малеимид-MMAE. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать тяжелую цепь антитела. Количество конъюгированных фрагментов указано над каждым пиком.

Таблица 9.2. Краткое изложение реакций mAb-CP2-линкера с малеимид-MMAE<sup>a</sup>

| Полезная нагрузка | Эквиваленты (относительно mAb) | Показатель pH | Темп. | Конъюгирование с MMAE (%) |
|-------------------|--------------------------------|---------------|-------|---------------------------|
| AM-MMAE           | 15                             | 5,5           | 37 °C | 88                        |
|                   |                                |               | 22 °C | 73                        |
| PM-MMAE           | 15                             | 5,5           | 37 °C | 95                        |
|                   |                                |               | 22 °C | 78                        |

<sup>a</sup>Все реакции проводили при 2,43 мг/мл mAb-CP2-линкера в течение 4 ч.

CP2-диеновые группы, которые вводили на поверхность антитела, полностью вступали в реакцию с пролекарствами, представляющими собой малеимид-MMAE, в течение 4 ч. при комнатной температуре. В ходе проведения масс-спектрометрии неспецифическое конъюгирование отсутствовало, поскольку все пики, соответствующие конъюгату, регистрировали по пикам, соответствующим mAb-CP2-линкеру и не вступившему в реакцию mAb. Данная реакция намного эффективнее, чем

фуран-диеновая, но менее эффективна, чем реакция CP1-диена с полезными нагрузками, представляющими собой малеимид-ММАЕ. Данный подход можно использовать для получения биоконъюгатов.

**Пример 10. Кинетические параметры конъюгирования mAb-CP2-линкера с малеимид-ММАЕ при молярном эквиваленте малеимид-ММАЕ и диеновые-группы, составляющем 1,0**

Оценивали кинетические параметры реакции CP2-диенов с малеимид-ММАЕ при 22°C.

*Введение функциональной CP2-диеновой группы в mAb:* функциональную группу CP2 вводили в mAb IgG1 путем проведения реакции первичных аминов лизина с CP2, активированным NHS-сложным эфиром. Данный подход в результате привел к произвольному конъюгированию связанных амидной связью циклопентадиеновых групп. Типичную реакцию модификации mAb можно описать следующим образом. Раствор mAb доводили до концентрации 5 мг/мл (3 мл, 15 мг mAb, 100 нмоль, 1 экв.), используя PBS, pH 7,2, с последующим добавлением 10% об./об. 1 М NaHCO<sub>3</sub>. Данный раствор охлаждали на льду и добавляли 35 мкл CP2-NHS (10 mM исходного раствора в DMAc, 350 нмоль, 3,5 эквивалента). Реакцию проводили на льду в течение 5 минут с последующей реакцией при комнатной температуре в течение 1 ч. при непрерывном перемешивании. Вступившее в реакцию mAb очищали путем диализа (Slide-A-Lyzer, 10 кДа MWCO) против PBS, 1 mM EDTA, pH 7,4, 0°C в течение 24 ч. Введение CP2-линкера определяли количественно с помощью масс-спектрометрии интактного дегликозилированного образца так, как это описано ниже, и выявили, что в данном примере оно составляет 3,29 CP2-линкера (и, соответственно, диена) на mAb, что соответствует 94% превращению CP2-NHS в конъюгат на основе антитела.

*Реакция CP2-модифицированного mAb с малеимид-ММАЕ:* mAb-CP2-линкер (3 мг, 3,29 CP2/mAb, 66 нмоль CP2 диена, 1 эквивалент) разбавляли с использованием PBS (pH 7,4), доводя до конечной концентрации 1,7 мг/мл. Затем добавляли DMSO с получением 20% об./об. раствора с последующим добавлением 1 М одноосновного фосфата натрия с получением 10% об./об. раствора. После добавления всех компонентов раствора получали смесь, содержащую 1,3 мг/мл mAb, 32,3 мкМ CP2-диена, 1,78 М DMSO, 110 mM монофосфата натрия, 100 mM NaCl, pH 5,5. AM-ММАЕ или PM-ММАЕ (6,6 мкл 10 mM исходного раствора в DMSO, 66 нмоль, 1 эквивалент) добавляли к раствору антитела. Реакционную смесь кратковременно встряхивали и выдерживали при 22°C с перемешиванием. Аликвоты (180 мкл) удаляли в разные моменты времени и добавляли N-ацетилцистеин (3 мкл 100 mM раствора, 45 эквивалентов) для гашения не вступивших в реакцию малеимидных групп. Затем образцы очищали с использованием устройств PD Spintrap G-25 (GE Healthcare Life

Sciences) для удаления низкомолекулярных компонентов из смеси. Затем проводили анализ образцов с помощью масс-спектрометрии восстановленного дегликозилированного образца, как это описано ниже.

*Масс-спектрометрический анализ:* образцы анализировали так, как это описано в примере 1.

*Расчет констант скорости CP2-диен-малеимидной реакции:* константы скорости реакции второго порядка для малеимид-ММАЕ с CP2-диенами в mAb-CP2-линкере определяли по интенсивностям пиков в масс-спектре дегликозилированного восстановленного образца. Прохождение реакции контролировали и по исчезновению пиков, соответствующих mAb-CP2-линкеру, и по появлению пиков, соответствующих конъюгату mAb-CP2-линкер-ММАЕ, но только интенсивности пиков, соответствующих mAb-CP2-линкеру на тяжелых цепях антитела, использовали для расчета относительного количества вступившего в реакцию CP2-диена. Не вступившие в реакцию CP2-диеновые группы на тяжелых цепях mAb рассчитывали с использованием уравнения, приведенного ниже:

$$\text{CP2 на mAb} = \left[ \frac{b}{a + b + c + d} \times 1 \right] + \left[ \frac{c}{a + b + c + d} \times 2 \right] + \left[ \frac{d}{a + b + c + d} \times 3 \right] \\ + \left[ \frac{f}{e + f + g} \times 1 \right] + \left[ \frac{g}{e + f + g} \times 2 \right]$$

a = интенсивность пика, соответствующего немодифицированной тяжелой цепи

b = сумма интенсивностей пиков тяжелых цепей с одной CP2-диеновой группой

c = сумма интенсивностей пиков тяжелых цепей с двумя CP2-диеновыми группами

d = интенсивность пика, соответствующего тяжелой цепи с тремя CP2-диеновыми группами

e = интенсивность пика, соответствующего немодифицированной легкой цепи

f = сумма интенсивностей пиков легких цепей с одной CP2-диеновой группой

g = сумма интенсивностей пиков легких цепей с двумя CP2-диеновыми группами

Данные конъюгирования дополнительно определяли в единицах молярной концентрации для определения кинетических констант скорости реакции. Константы скорости реакции второго порядка определяли по наклонам кривых, полученных при нанесении на график  $1/[\text{CP2 диен}]$  в зависимости от времени, и в линейном регрессионном анализе. Периоды полупревращения реакции рассчитывали на основе констант скорости реакции второго порядка с использованием уравнения, приведенного ниже:

$$T_{1/2} = \frac{1}{k_2[\text{CP2}]_0}$$

$k_2$  = константа скорости реакции второго порядка,

$[\text{CP2}]_0$  = концентрация CP2-диена в момент времени = 0.

**Фигура 10.1.** Масс-спектры восстановленного дегликозилированного образца mAb-CP2-линкер и AM-ММАЕ-вступивший в реакцию с mAb-CP2-линкер в момент времени 4 ч. и 48 ч. График с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать только тяжелую цепь. Каждый пик отметили для указания количества конъюгированных фрагментов.

**Фигура 10.2.** Масс-спектры восстановленного дегликозилированного образца mAb-CP2-линкера и PM-ММАЕ-вступивший в реакцию с mAb-CP2-линкер в момент времени 4 ч. и 48 ч. График с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать только тяжелую цепь. Каждый пик отметили для указания количества конъюгированных фрагментов.

**Фигура 10.3.** Реакция mAb-CP2-линкер-диенов с малеимид-ММАЕ. А) Молярная концентрация не вступившего в реакцию CP2-диена на протяжении времени. Не вступивший в реакцию CP2-диен на mAb определяли по интенсивностям пиков в масс-спектрах восстановленного дегликозилированного образца. В) График зависимости обратной концентрации от времени, используемый для расчета скоростей реакции.

Таблица 10.1. Краткое изложение данных кинетических параметров реакции mAb-CP2-линкер-диена с малеимид-ММАЕ<sup>a,b,c</sup>

| Полезная нагрузка | константа скорости реакции $2^{-t_0}$ порядка (M <sup>-1</sup> сек <sup>-1</sup> ) | t <sub>1/2</sub> (мин) | Превращение (%) |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|-----------------|
| AM-ММАЕ           | 2,2 ± 0,1                                                                          | 219                    | 73              |
| PM-ММАЕ           | 2,1 ± 0,1                                                                          | 230                    | 93              |

<sup>a</sup>все реакции конъюгирования проводили при показателе pH 5,5, 20% DMSO, 22°C и 1,3 мг/мл CP2-модифицированного mAb

<sup>b</sup>использованное молярное соотношение MMAE:CP2-диен составляло 1:1.

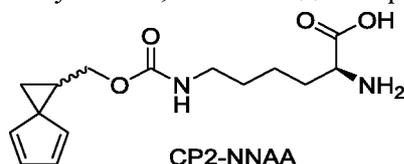
<sup>c</sup>рассчитывали по интенсивностям пиков масс-спектров восстановленного дегликозилированного образца при измерении в 48 ч.

Реакция CP2-диена с малеимид-ММАЕ была более медленной, чем CP1-диенов, с периодом полупревращения порядка нескольких часов. В отличие от CP1-диена различие в скоростях реакции между фенил- и алкил-малеимидом не выявили. Реакция превращения составляла 90% для AM-ММАЕ и всего 73% для PM-ММАЕ после реакции в течение 48 ч. Принимая во внимание аналогичные константы скорости реакции для обоих субстратов, возможно, что часть фенилмалеимидов распадается за более длительный период времени при этих условиях, что таким образом ограничивает полное превращение.

### **Пример 11. Встраивание CP2-NNAА в антитела**

Оценивали встраивание CP2-NNAА в положение K274 или S239 в антителе к EphA2 (1C1), качество экспрессированного mAb и реакционную способность CP2-NNAА-диагена после встраивания в антитело.

*Получение исходного раствора CP2 NNAА:* объединяли CP2 NNAА (0,5 г, 1,7 ммоль) с 7,8 мл 0,2 М NaOH в H<sub>2</sub>O. Полученную взвесь взбалтывали при комнатной температуре до растворения всех твердых частиц (10 минут). После полного растворения светло-желтый раствор пропускали через фильтр 0,2 мкм, разделяли на аликвоты и хранили при -80°C до использования. В результате этой процедуры получили 8,2 мл исходного раствора, содержащего 216 мМ CP2-NNAА.



Структура CP2-NNAА

*Экспрессия антитела:* гены антитела 12G3H11 или 1C1 IgG1 с мутацией amber в положении K274 или S239 в Fc клонировали в запатентованный pOE-вектор для экспрессии антител. Конструкцией трансфицировали CHO-G22 с помощью PEImax (1,5 л клеток G22) вместе с плазмидой, кодирующей дважды мутантную PylRS (Y306A/Y384F) или PylRS дикого типа, и плазмидой, содержащей тандемные повторы кассеты для экспрессии tRNA (pORIP 9X tRNA). Через четыре часа после трансфекции в клетки вносили 3,3% добавки F9 (запатентована) и 0,2% добавки F10 (запатентована) и клетки дополнительно инкубировали при 34 градусах. На следующий день добавляли CP2-NNAА до конечной концентрации 0,26 мМ для клеток трансфицированных, 1C1 K274 и 1C1 S239. В день 3 и день 7 в клетки снова добавляли 6,6% добавки F9 и 0,4% добавки F10. Клетки центрифугировали и собирали надосадочную жидкость в день 11. Надосадочную жидкость очищали с помощью колонки для аффинной хроматографии IgSelect (GE Health Care Life Science). Антитело элюировали с помощью 50 мМ глицина, 30 мМ NaCl, pH 3,5, элюирующего буфера, нейтрализовали с помощью 1 М трис-буфера, pH 7,5, и диализировали в PBS с pH 7,2. Концентрацию элюированного антитела определяли путем измерения поглощения при 280 нм. Рассчитанный обратный составил 57 мг/л для 1C1 K274CP2-NNAА и 76 мг/л для 1C1 S239CP2-NNAА. Аналогичным образом экспрессировали mAb 12G3H11 в количестве с меньшим масштабом, при этом концентрация добавляемого CP2-NNAА варьировалась. Анализ выделенного антитела проводили с помощью SDS-PAGE, используя стандартные методики. Антитело также анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии и масс-спектрометрии, как это описано ниже. Антитела со встроенной

конструкцией CP2-NNAA обозначили как mAb-CP1-NNAA, чтобы отличать их от конструкций mAb-CP2-линкер или mAb-[положение]CP2-NNAA, где [положение] обозначает номер аминокислоты и название аминокислоты, которую подвергли мутации в CP2-NNAA.

*Эксклюзионная хроматография:* SEC-анализ проводили с использованием системы Agilent 1100 Capillary LC, оснащенной тройной детекторной матрицей (Viscotek 301, Viscotek, Хьюстон, Техас); длину волны устанавливали на 280 нм и образцы пропускали через колонку TSK-GEL G3000SWXL (Toso Bioscience LLC, Монтгомеривилл, Пенсильвания), используя 100 mM натрий-фосфатный буфер, pH 6,8, при скорости потока 1 мл/мин.

*Масс-спектрометрический анализ:* с целью проведения анализа дегликозилированного mAb EndoS (5 мкл Remove-iT EndoS (разведение 1:10 в PBS, 20000 единиц/мл, New England BioLabs) объединяли с 50 мкл образца (1 мг/мл mAb) и 5 мкл буфера Glyco Buffer 1 (New England BioLabs) с последующей инкубацией в течение 1 ч. при 37°C. Восстановленные образцы получали путем добавления 5 мкл раствора Bond-Breaker TCEP (0,5 M, Thermo Fisher Scientific) и инкубации в течение 10 мин. при 37°C. Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием масс-спектрометра Agilent 6520B Q-TOF, оснащенного колонкой RP-HPLC (ZORBAX 300 Diphenyl RRHD, 1,8 микрон, 2,1 мм x 50 мм). Параметры высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC) были следующими: скорость потока 0,5 мл/мин; подвижная фаза А представляла собой 0,1% (об./об.) муравьиной кислоты в H<sub>2</sub>O со степенью чистоты для HPLC, и подвижная фаза В представляла собой 0,1% (об./об.) муравьиной кислоты в ацетонитриле. Колонку уравнивали в смеси 90% А/10% В, которую также использовали для обессоливания образцов mAb с последующим элюированием в смеси 20% А/80% В. Данные масс-спектров получали при 100-3000.масса/заряд, положительной полярности, температуре газа 350°C, давлении распылителя 48 фунтов/дюйм<sup>2</sup> и напряжении на капилляре 5000 В. Данные анализировали с использованием поставляемого изготовителем программного обеспечения для качественного анализа MassHunter (Agilent v.B.04.00), и при этом интенсивности пиков спектров после деконволюции использовали для определения относительной доли фрагментов в каждом образце.

**Фигура 11.1.** Титры конструкции mAb 12G3H11 K274CP2-NNAA и жизнеспособность клеток млекопитающих после ее экспрессии, содержащих мутантные или дикого типа tRS. Конечная концентрация CP2-NNAA в средах указана на подписи к фигуре.

Экспрессия mAb 12G3H11 K274CP2-NNAA с мутантной tRS была сопоставима с азидо-лизином с tRS дикого типа при минимальной токсичности.

Таблица 11.1. Краткое изложение получения mAb 1C1 K274CP1-NNAA и mAb 1C1 S239CP2-NNAA

|                                  | K274 | S239 |
|----------------------------------|------|------|
| Добавляемое количество NNAA (мМ) | 0,5  | 0,5  |
| Объем (л)                        | 2    | 2    |
| Масса выделенного (мг)           | 114  | 153  |
| Титр (мг/л)                      | 57   | 76   |
| Мономер (%)                      | 93,2 | 99   |

**Фигура 11.2.** Данные масс-спектрометрического анализа дегликозилированного образца mAb 1C1 K274CP2-NNAA. А) Интактное mAb. В) Изображение данных анализа восстановленного mAb увеличили для того, чтобы показать легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC). Выявленная масса интактной молекулы практически совпадает с расчетной массой интактной молекулы (147546,03), доказывая встраивание двух CP2-NNAA в структуру интактного mAb. Выявленная масса тяжелой цепи практически совпадает с расчетной массой тяжелой цепи (50325,93 а.е.м.), доказывая встраивание одной CP2-NNAA в тяжелую цепь антитела. Встраивание CP2-NNAA в легкую цепь mAb отсутствовало. Аналогичные спектры для mAb 1C1 дикого типа показаны на фигуре 11.4.

**Фигура 11.3.** Данные масс-спектрометрического анализа дегликозилированного образца mAb 1C1 S239CP2-NNAA. А) Интактное mAb. В) Изображение данных анализа восстановленного mAb увеличили для того, чтобы показать легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC). Выявленная масса интактной молекулы практически совпадает с расчетной массой интактной молекулы (147628,23), доказывая встраивание двух CP2-аминокислот в структуру интактного mAb. Выявленная масса тяжелой цепи практически совпадает с расчетной массой тяжелой цепи (50367,03 а.е.м.), доказывая встраивание CP2-NNAA в тяжелую цепь антитела. Встраивание CP2-NNAA в легкую цепь mAb отсутствовало. Аналогичные спектры для mAb 1C1 дикого типа показаны на фигуре 11.4.

**Фигура 11.4.** Данные масс-спектрометрического анализа дегликозилированного образца mAb 1C1 дикого типа. А) Интактное mAb. В) Изображение данных анализа восстановленного mAb увеличили для того, чтобы показать легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC). А) Диапазон значений массы, показывающий интактное mAb. В) Диапазон значений массы, показывающий легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC).

Таблица 11.2. Краткое изложение данных масс-спектрометрии для mAb 1C1-K274CP2-NNAА и mAb 1C1-S239CP2-NNAА

|                                        | K274      | S239     | WT         |
|----------------------------------------|-----------|----------|------------|
| Выявленная масса интактной молекулы    | 147545,85 | 147628,1 | 147249,63  |
| Выявленные изменения по сравнению с WT | +296,2    | +378,4   | Нет данных |
| Расчетные изменения по сравнению с WT  | +296,4    | +378,6   | Нет данных |
| Выявленная масса тяжелой цепи          | 50325,22  | 50367,71 | 50177,73   |
| Выявленные изменения по сравнению с WT | +147,5    | +189,9   | Нет данных |
| Расчетные изменения по сравнению с WT  | +148,2    | +189,3   | Нет данных |

**Фигура 11.5.** По результатам SEC-анализа mAb 1C1 K274CP2-NNAА определили, что был получен мономерный продукт. Указаны высокомолекулярные фрагменты (HMWS).

**Фигура 11.6.** По результатам SEC-анализа mAb 1C1 S239CP2-NNAА определили, что был получен мономерный продукт.

**Фигура 11.7.** Анализ mAb 1C1-K274CP2-NNAА и mAb 1C1-S239CP2-NNAА с использованием SDS-PAGE.

Встраивание CP2-NNAА в положения K274 и S239 в антителах подтвердили с помощью масс-спектрометрии. Выделенное антитело характеризовалось высоким качеством и не содержало усеченный продукт и содержало лишь незначительное количество агрегатов. Титры, достигнутые при получении антитела 1C1 в масштабе 2 л, были достаточно высокими, учитывая небольшое количество CP2-NNAА, которое добавили к клеткам.

**Пример 12. Получение и оценка ADC на основе mAb 1C1 K274CP2-NNAА и mAb 1C1 S239CP2-NNAА**

Реакционную способность CP2-NNAА после встраивания в mAb в положение K274 или S239 антитела к EphA2 (1C1) оценивали по конъюгированию с АМ-ММАЕ. Полученные в результате ADC оценивали с целью определения соотношения лекарственное средство:антитело (DAR), стабильности в сыворотке крови и *in vitro* цитотоксичности.

*Получение ADC CP2-mAb:* ADC на основе mAb CP2-NNAА получали с помощью одностадийной реакции путем простого смешивания антитела с алкил-малеимид-ММАЕ (АМ-ММАЕ). Сначала раствор mAb 1C1-S239CP2-NNAА (8 мг, 53 нмоль, 1 эквивалент) доводили до концентрации 2 мг/мл, используя PBS (общий объем 4 мл). Добавляли DMSO (813 мкл) и 1 М одноосновный фосфат натрия (407 мкл) с получением соответственно ~20% и ~10% об./об. растворов. Добавляли АМ-ММАЕ (53,3 мкл 10 мМ исходного раствора в DMSO, 533 нмоль, 10 эквивалентов) к раствору mAb 1C1-S239CP2-NNAА и смесь кратковременно встряхивали. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 7 ч. при непрерывном перемешивании. Добавляли N-ацетилцистеин (43 мкл, 100 мМ исходного раствора в воде, 4,3 мкмоль, 80 эквивалентов) и раствор дополнительно инкубировали в течение 15 мин. для гашения не вступивших в реакцию малеимидных групп. Затем реакционную смесь 3-кратно разбавляли дистиллированной водой и подвергали СНТ-хроматографии (колонок Bio-Scale Mini Cartridge СНТ Type II, носитель 40 мкм). ADC элюировали в градиенте от буфера А (10 мМ фосфата, рН 7,0) до буфера В (10 мМ фосфата, рН 7,0, содержащий 2М NaCl) в течение 25 минут. После СНТ-хроматографии образец подвергали процедуре замена буфера на PBS, дополненный 1 мМ EDTA, рН 7,4, с помощью диализа в кассете slide-a-lyzer при 4°С. mAb 1C1-K274CP2-NNAА конъюгировали с АМ-ММАЕ с помощью такого же способа за исключением того, что реакцию проводили в течение 17 ч. при комнатной температуре.

*Получение ADC с сайт-специфическими цистеинами:* в случае некоторых экспериментов ADC на основе mAb-CP2-NNAА сравнивали с ADC, конъюгированными за счет цистеинов. Для этой цели получили антитело, содержащее цистеин в положении 239 (под названием 1C1-239С). Конъюгирование АМ-ММАЕ с 1C1-239С проводили на трех стадиях: i) восстановление и диализ, ii) окисление, iii) реакция с АМ-ММАЕ. Сперва антитела подвергали умеренному восстановлению с целью получения свободных сульфгидрильных групп путем объединения 4 мл 2,5

мг/мл раствора антитела в 10 мМ PBS, pH 7,4, содержащего 1 мМ EDTA (10 мг антитела, 66,7 нМ, 1 экв.), с 53 мкл 50 мМ раствора TCEP в воде (2,7 мкмоль, 40 экв. относительно mAb), затем осторожно перемешивали при 37 °С в течение 3 ч. Восстановленное антитело переносили в кассету для диализа slide-a-lyzer (10000 MWCO) и подвергали диализу против PBS, 1 мМ EDTA, pH 7,4, при 4 °С в течение 24 ч. с несколькими заменами буфера. Восстановленное антитело подвергали окислению с повторным образованием внутренних дисульфидных связей путем добавления дигидроаскорбиновой кислоты (27 мкл 50 мМ исходного раствора в DMSO, 1,3 мкмоль, 20 экв.) с последующим перемешиванием в течение 4 ч. при комнатной температуре. Раствор окисленного антитела объединяли с 20% об./об. DMSO с последующим добавлением AM-MMAE (53 мкл 10 мМ исходного раствора в DMSO, 530 нмоль, 8 экв.). Реакцию проводили при комнатной температуре при перемешивании в течение 1 ч., затем добавляли N-ацетилцистеин (43 мкл 100 мМ исходного раствора в воде, 4,2 мкмоль, 64 экв.) для гашения не вступивших в реакцию малеимидных групп. Затем реакционную смесь 3-кратно разбавляли дистиллированной водой и подвергали СНТ-хроматографии и диализу, как это описано выше.

**Фигура 12.1.** Получение ADC на основе mAb-CP2-NNAА и ADC mAb-239C и структура AM-MMAE. Следует отметить, что получение ADC на основе mAb-CP2-NNAА осуществляли одностадийно, при этом получение ADC на основе mAb-239C проходит в 4 стадии. R-группа, изображенная на (B), может представлять собой эндогенную тиолсодержащую малую молекулу, такую как цистеин.

*Масс-спектрометрический анализ:* образцы анализировали так, как это описано в примере 1.

*НМС-хроматографический анализ:* ADC анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии с использованием колонки Proteomics HIC Butyl NPS (4,6 x 35 мм, 5 мкм, Serax), элюировали в градиенте от 100% А до 100% В в течение 22 минут (подвижная фаза А: 25 мМ трис, pH 8,0, 1,5 М (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, подвижная фаза В: 25 мМ трис, pH 8,0, 5% (об./об.) изопропиловый спирт) при комнатной температуре. Белок определяли путем поглощения в УФ-области спектра при 280 нм. Для каждого анализа вводили примерно 50-100 мкг белка.

*Анализ с помощью rRP-HPLC:* для каждого анализа антитела и ADC подвергали восстановлению при 37 °С в течение 20 минут с использованием 42 мМ дитиотреитола (DTT) в PBS, pH 7,2. 10 мкг восстановленных антител и ADC загружали в колонку PLRP-S, 1000Å (2,1 x 50 мм, Agilent) и элюировали при 40 °С при скорости потока 0,5

мл/мин с градиентом от 5% В до 100% В в течение 25 минут (подвижная фаза А: 0,1% трифторуксусная кислота в воде, и подвижная фаза В: 0,1% трифторуксусная кислота в ацетонитриле). Процент конъюгирования определяли с использованием интегрированных площадей пиков хроматограммы.

*Стабильность ADC в сыворотке крови:* ADC инкубировали в сыворотке крови крыс с целью определения стабильности конъюгата, полученного в реакции Дильса-Альдера. ADC добавляли к нормальной сыворотке крови крыс (Jackson Immunogresearch) до достижения конечной концентрации 0,2 мг/мг (1,33 мкм антитела), при этом общий объем раствора ADC, добавленного к сыворотке крови, составил менее 10%. Смесь ADC и сыворотки крови стерильно фильтровали и аликвоту отбирали из смеси, замораживая в качестве контроля  $t=0$ . Затем оставшуюся часть образца дополнительно инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в герметичном контейнере без взбалтывания.

Конъюгированное и неконъюгированное человеческие антитела выделяли из сыворотки крови крысы с помощью иммунопреципитации с использованием смолы, содержащей антитело, специфическое к Fc-фрагменту IgG человека, конъюгированное с агарозой (Sigma-Aldrich). Смолу дважды промывали с использованием PBS, однократно буфером для элюирования IgG, и затем двухкратно с использованием PBS. Затем образцы сыворотки крови с ADC объединяли со смолой, содержащей антитело к IgG человека (100 мкл смеси ADC-сыворотка крови, 50 мкл суспензии смолы), и перемешивали в течение 15 минут при комнатной температуре. Смолу извлекали центрифугированием, а затем дважды промывали с использованием PBS. Промытую смолу ресуспендировали в 100 мкл буфера для элюирования IgG (Thermo Scientific) и дополнительно инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Смолу удаляли центрифугированием, а затем к надосадочной жидкости добавляли 20 мкл 10X буфера Glyco Buffer 1 (New England Biolabs). Раствор выделенного антитела человека стерильно фильтровали и инкубировали с EndoS в течение 1 ч. при  $37^{\circ}\text{C}$ .

Дегликозилированные mAb затем восстанавливали с помощью TCEP и анализировали с помощью LC/MS, как это описано выше. Процент конъюгированного антитела определяли по высотам пиков масс-спектров.

*Анализ in vitro цитотоксичности:* клеточную линию рака предстательной железы человека PC3 получали из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Клетки PC3 поддерживали в среде RPMI1640 (Life Technologies) с добавлением 10% термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки (HI-FBS) (Life Technologies) при  $37^{\circ}\text{C}$  с 5%  $\text{CO}_2$  в атмосфере. Клетки выращивали до экспоненциальной фазы роста, собирали путем мягкой трипсинизации и высевали в 96-луночные культуральные планшеты по 1500 клеток/лунку. Клетки выращивали в течение 24 ч., а затем

обрабатывали антителами и ADC, подвергали 4-кратному серийному разведению в 9 концентрациях в двух параллелях, начиная с 4000 нг/мл. Обработанные клетки культивировали в течение 6 дней и жизнеспособность клеток определяли с использованием набора CellTiter-Glo Luminescent Viability Assay (Promega) согласно протоколу производителя. Жизнеспособность клетки рассчитали в виде процентной доли от контрольных необработанных клеток. IC<sub>50</sub> цитотоксичности для ADC определяли с использованием логистического нелинейного регрессионного анализа с использованием программного обеспечения Prism (GraphPad).

**Фигура 12.2.** Данные масс-спектрометрического анализа восстановленных гликозилированных образцов mAb-CP2-NNAА и mAb-цистеин до и после реакции с АМ-ММАЕ. График с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать тяжелую цепь mAb. Пики, соответствующие соотношению лекарственное средство:антитело (DAR) 0 и 1, указаны для образцов ADC, из расчета одно лекарственное средство на тяжелую цепь (DAR 1) в случае каждой конструкции.

**Фигура 12.3.** Данные масс-спектрометрического анализа восстановленных гликозилированных образцов mAb-CP2-NNAА и mAb-цистеин до и после реакции с АМ-ММАЕ. График с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать легкую цепь mAb. Не выявили конъюгатов АМ-ММАЕ с легкой цепью, что свидетельствует о том, что конъюгирование было сайт-специфичным для тяжелой цепи mAb.

Таблица 12.1 Краткое изложение характеристик ADC mAb-CP2-NNAА, полученных с помощью масс-спектрометрии<sup>а</sup>

| mAb              | Полезная нагрузка | Выявленная Δ массы (а.е.м.) | Расчетная Δ массы (а.е.м.) | Преобразование <sup>б</sup> | DAR  |
|------------------|-------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|------|
| 1C1-K274CP2-NNAА | АМ-ММАЕ           | 1317,06                     | 1316,65                    | 98%                         | 1,96 |
| 1C1-S239CP2-NNAА | АМ-ММАЕ           | 1316,28                     | 1316,65                    | 97%                         | 1,94 |
| 1C1-239C         | АМ-ММАЕ           | 1316,42                     | 1316,65                    | 95%                         | 1,90 |

<sup>а</sup>Тяжелые цепи mAb анализировали на основе данных масс-спектров гликозилированного восстановленного образца.

<sup>б</sup>Рассчитывали на основе относительных высот пиков, соответствующих конъюгированным и неконъюгированным фрагментам.

**Фигура 12.4.** Хроматографический анализ гидрофобных взаимодействий ADC mAb-CP2-NNAA и ADC mAb-цистеин. Исчезновение пика, соответствующего времени удерживания 1C1 CP2-NNAA, и появление пика с увеличенным временем удерживания указывает на конъюгирование AM-MMAE с mAb. Следует отметить, что в случае ADC 1C1 K274CP2-NNAA выявили компоненты DAR 1 и DAR 2.

**Фигура 12.5.** Данные обращенно-фазового высокоэффективного хроматографического анализа восстановленных образцов ADC mAb-CP2-NNAA и mAb-цистеин. Исчезновение пика, соответствующего тяжелой цепи в ADC, и появление пика с более длительным временем удерживания свидетельствует о конъюгировании AM-MMAE с тяжелой цепью. Время удерживания пика легкой цепи (LC) не изменялось ни до, ни после конъюгирования, что свидетельствует о том, что конъюгирование была специфичным для тяжелой цепи mAb.

Таблица 12.2. Краткое изложение характеристик ADC, полученных с помощью хроматографических методик

| mAb              | Полезная нагрузка | Эффективность конъюгирования, HIC <sup>a</sup> | DAR, HIC | Эффективность конъюгирования, rRP-HPLC <sup>a</sup> | DAR, rRP-HPLC |
|------------------|-------------------|------------------------------------------------|----------|-----------------------------------------------------|---------------|
| 1C1-K274CP2-NNAA | AM-MMAE           | 97%                                            | 1,94     | 91%                                                 | 1,82          |
| 1C1-S239CP2-NNAA | AM-MMAE           | 95%                                            | 1,9      | 97%                                                 | 1,94          |
| 1C1-239C         | AM-MMAE           | 98%                                            | 1,96     | 95%                                                 | 1,9           |

<sup>b</sup>Рассчитывали на основе относительных площадей пиков, соответствующих конъюгированным и неконъюгированным фрагментам.

**Фигура 12.6.** Анализ SDS-PAGE в восстанавливающих условиях ADC mAb-CP2-NNAA и mAb-цистеина.

**Фигура 12.7.** Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного дегликозилированного образца ADC mAb-CP2-NNAA до и после инкубации в сыворотке крови крыс в течение 7 дней при 37°C. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать только участки тяжелой цепи (HC). Отсутствие сигнала неконъюгированной HC в инкубированных в сыворотке крови образцах (D и H) свидетельствует о том, что конъюгат, полученный в реакции Дильса-Альдера, был стабильным.

**Фигура 12.8.** Количественные показатели DAR для ADC mAb-CP2-NNAA до и после инкубации в сыворотке крови крыс в течение 7 дн. при 37°C. DAR рассчитывали по высотам пиков масс-спектров, показанных на фигуре 12.7. Значения представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение, n=3. В данных условиях потерю лекарственного средства не выявили.

**Фигура 12.9.** Цитотоксичность ADC mAb-CP2-NNAA и mAb-цистеин по отношению к раковым клеткам PC3 *in vitro*. ADC mAb-CP2-NNAA AM-MMAE проявляли активность, сходную с активностью аналогичного ADC, полученного путем сайт-специфического конъюгирования цистеина с AM-MMAE.

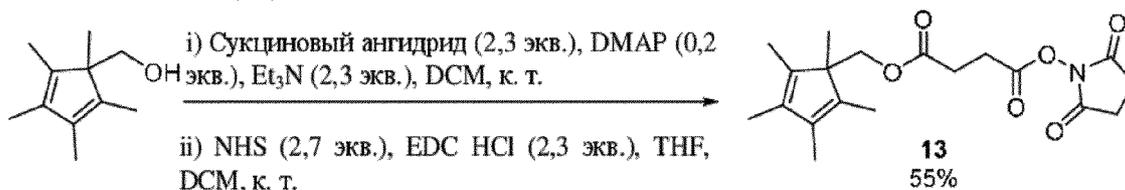
Проводили реакцию CP2-NNAA-диена с малеимидом, содержащимся в AM-MMAE, с аналогичными превращениями в сульфгидрильные группы цистеина. Основное отличие в получении ADC mAb-CP2-NNAA в сравнении с ADC mAb-цистеин заключается в уменьшении количества стадий в процессе конъюгирования. Для получения цистеинового mAb необходимо 3 стадии и 2 дня, тогда как получение ADC CP2-NNAA mAb проводят за одну стадию в течение менее 24 ч. Полученные ADC mAb-CP2-NNAA устойчивы в физиологически соответствующих условиях и не демонстрируют потерю лекарственного средства в ходе инкубирования в сыворотке крови крыс при 37°C в течение 7 дней. ADC mAb CP2-NNAA эффективны *in vitro* с активностями, аналогичными ADC, полученному путем сайт-специфического конъюгирования с цистеином.

### **Пример 13. Синтез соединений, содержащих циклопентадиен и фуран.**

*Материалы и способы:* если не указано иное, реакции проводили в атмосфере N<sub>2</sub> с использованием растворителей, чистых для анализа. DCM и толуол выдерживали над 3 Å молекулярными ситами. THF пропускали через колонку с активированным оксидом алюминия. Все коммерчески доступные реагенты использовали в том виде, в котором они были получены. Тонкослойную хроматографию (TLC) проводили с использованием пластин (0,25 мм) от E. Merck, предварительно покрытых силикагелем 60 с флуоресцентным индикатором F254, и визуализировали путем воздействия УФ-излучения (254 нм) или окрашивания *n*-анисовым альдегидом, нингидрином или перманганатом калия. Колоночную флэш-хроматографию проводили с использованием силикагеля для нормальной фазы (60 Å, 0,040–0,063 мм, Geduran). <sup>1</sup>H ЯМР-спектры регистрировали на спектрометрах Varian (400, 500 или 600 МГц) и представляли относительно сигналов дейтерированного растворителя. Данные <sup>1</sup>H ЯМР-спектров представлены следующим образом: химический сдвиг ( $\delta$  ppm), мультиплетность,

константа взаимодействия (Гц) и интеграция.  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектры регистрировали на спектрометрах Varian (100, 125 или 150 МГц). Данные спектров ЯМР  $^{13}\text{C}$  представлены в виде показателей химического сдвига ( $\delta$  ppm). Масс-спектры получали из отдела масс-спектрометрии Калифорнийского университета в Санта-Барбаре, полученные на времяпролетном масс-спектрометре GCT Premier (Waters Corp.) с высокой разрешающей способностью с источником десорбции полев (FD).

### Синтез CP3-NHS (13)



2,5-диоксопирролидин-1-ил(1,2,3,4,5-пентаметилциклопента-2,4-диенил)метилсукцинат (**13**):

DCM (8 мл) добавляли во флакон, содержащий (1,2,3,4,5-пентаметилциклопента-2,4-диенил)метанол<sup>1</sup> (0,33 г, 2,0 ммоль, 1 экв.). Добавляли  $\text{Et}_3\text{N}$  (0,64 мл, 4,6 ммоль, 2,3 экв.), DMAP (46 мг, 0,38 ммоль, 0,2 экв.) и янтарный ангидрид (0,46 г, 4,6 ммоль, 2,3 экв.), реакционную смесь герметично закрывали в атмосфере воздуха и взбалтывали при к. т. в течение ночи. Реакционную смесь гасили с помощью  $\text{H}_2\text{O}$  (1 мл), затем вливали в делительную воронку. Добавляли  $\text{HCl}$  (1 М, 50 мл) и экстрагировали с использованием DCM (2 x 50 мл). Органические слои объединяли, промывали солевым раствором (50 мл), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали и растворитель удаляли с получением 4-оксо-4-((1,2,3,4,5-пентаметилциклопента-2,4-диенил)метокси)бутановой кислоты, которую использовали непосредственно на следующей стадии.

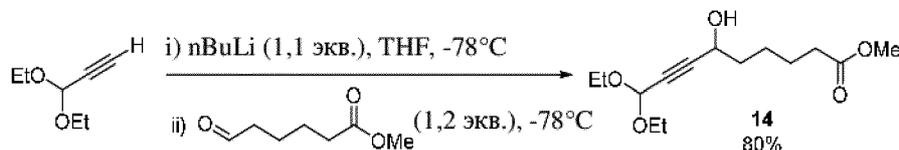
Фактор отклика (EtOAc): 0,24;  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3,98 (s, 2 H), 2,64 - 2,59 (m, 2 H), 2,59 - 2,54 (m, 2 H), 1,76 (s, 6 H), 1,74 (s, 6 H), 0,95 (s, 3 H) ppm.

THF (10 мл) добавляли во флакон, содержащий 4-оксо-4-((1,2,3,4,5-пентаметилциклопента-2,4-диенил)метокси)бутановую кислоту (~2 ммоль). Добавляли NHS (0,61 г, 5,3 ммоль, 2,7 экв.), EDC·HCl (0,87 г, 4,6 ммоль, 2,3 экв.) и DCM (6 мл), реакционную смесь герметично закрывали в атмосфере воздуха и взбалтывали при к. т. в течение ночи. Растворитель удаляли и остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (гексан:EtOAc, 3:1  $\rightarrow$  2:1) с получением **7** (0,39 г, 55% за две стадии) в виде белого твердого вещества.

Фактор отклика (гексан:EtOAc, 7:3): 0,27;  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4,00 (s, 2 H), 2,89 (t,  $J = 6,7$  Гц, 2 H), 2,85 (br. s., 4 H), 2,67 (t,  $J = 7,8$  Гц, 2 H), 1,77 (s, 6 H), 1,74 (s, 6 H), 0,95 (s, 3 H) ppm;  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170,7, 168,9, 167,6, 138,4, 135,0, 68,2, 55,3, 28,6, 26,2, 25,5, 16,8, 11,0, 10,1 ppm; IR (ATR) 2973, 2935, 1815, 1782, 1729, 1208,

1089, 1069, 967  $\text{cm}^{-1}$ ; HRMS (EI) Точная расчетн. масса для  $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NO}_6$   $[\text{M}]^+$ : 363,1682; измеренная масса: 363,1676.

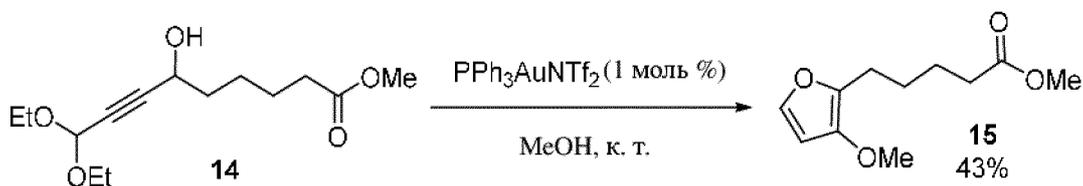
### Синтез F2-NHS (17)



#### Метил-9,9-диэтоксипроп-1-ин (14):

3,3-диэтоксипроп-1-ин (0,72 мл, 5,0 ммоль, 1 экв.) добавляли к THF (15 мл), затем охлаждали до  $-78^\circ\text{C}$ . Добавляли по каплям nBuLi (2,33 М в гексане, 2,4 мл, 5,5 ммоль, 1,1 экв.), затем реакционную смесь дополнительно перемешивали в течение 30 мин. при  $-78^\circ\text{C}$ . Метил-6-оксгексаноат (0,87 г, 6,0 ммоль, 1,2 экв.), растворенный в THF (5 мл), добавляли по каплям, затем реакционную смесь перемешивали при  $-78^\circ\text{C}$  в течение 1 ч. Реакционную смесь вливали в делительную воронку, содержащую насыщенный водный раствор бикарбоната натрия (100 мл), затем экстрагировали с использованием  $\text{Et}_2\text{O}$  (2 x 50 мл). Объединенные органические слои промывали с помощью солевого раствора (50 мл), сушили над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали, растворитель удаляли и остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (гексан:EtOAc, 2:1) с получением **14** (1,1 г, 80%) в виде прозрачного бесцветного масла.

Фактор отклика (гексан:EtOAc, 6:4): 0,41;  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5,28 (d,  $J = 1,6$  Гц, 1 H), 4,47 - 4,36 (m,  $J = 3,5$  Гц, 1 H), 3,76 - 3,67 (m, 2 H), 3,67 - 3,63 (m, 3 H), 3,56 (qd,  $J = 7,0, 9,4$  Гц, 2 H), 2,34 - 2,27 (m, 3 H), 1,76 - 1,59 (m, 4 H), 1,54 - 1,42 (m, 2 H), 1,21 (t,  $J = 7,0$  Гц, 6 H) ppm;  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174,0, 91,2, 86,2, 80,0, 61,8, 60,8, 60,8, 51,5, 36,9, 33,8, 24,6, 24,4, 15,0 ppm; IR (ATR) 3451, 2932, 1736, 1437, 1328, 1135, 1051, 1012  $\text{cm}^{-1}$ ; HRMS (EI) Точная расчетн. масса для  $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{O}_5$   $[\text{M}-\text{H}]^+$ : 271,1545; измеренное значение: 271,1546.

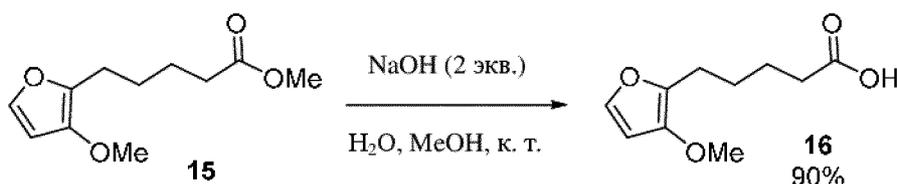


#### Метил-5-(3-метоксифуран-2-ил)пентаноат (15):

MeOH (3,9 мл) добавляли в пробирку, содержащую **14** (1,06 г, 3,89 ммоль, 1 экв.). Добавляли  $\text{PPh}_3\text{AuNTf}_2$  (29 мг, 0,039 ммоль, 0,01 экв.), реакционную смесь герметично закрывали в атмосфере воздуха и перемешивали при к. т. в течение ночи. Реакционную смесь выливали в делительную воронку, содержащую солевой раствор (50 мл), затем экстрагировали с использованием DCM (2 x 50 мл). Объединенные органические слои

промывали с помощью солевого раствора (50 мл), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали, растворитель удаляли и остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (гексан:EtOAc, 15:1  $\rightarrow$  9:1) с получением **15** (0,35 г, 43%) в виде прозрачного бесцветного масла.

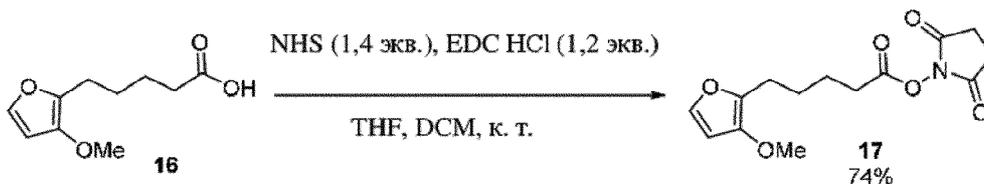
Фактор отклика (гексан:EtOAc, 9:1): 0,35;  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,11 (d,  $J = 2,0$  Гц, 1 H), 6,27 (d,  $J = 2,0$  Гц, 1 H), 3,72 (s, 3 H), 3,66 (s, 3 H), 2,61 (t,  $J = 6,8$  Гц, 2 H), 2,33 (t,  $J = 7,2$  Гц, 2 H), 1,69 - 1,60 (m, 4 H) ppm;  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174,1, 143,3, 139,2, 138,9, 102,9, 59,4, 51,4, 33,7, 27,5, 24,5, 24,3 ppm; IR (ATR) 2950, 1734, 1662, 1600, 1230, 1179, 1111  $\text{cm}^{-1}$ ; HRMS (EI) Точная расчетн. масса для  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_4$   $[\text{M}]^+$ : 212,1049; измеренное значение: 212,1045.



5-(3-метоксифуран-2-ил)пентановая кислота (**16**):

в флакон, содержащий **15** (0,331 г, 1,56 ммоль, 1 экв.), растворенный в MeOH (4 мл), добавляли раствор NaOH (0,125 г, 3,12 ммоль, 2 экв.) в  $\text{H}_2\text{O}$  (4 мл). Реакционную смесь герметично закрывали в атмосфере воздуха и перемешивали при к. т. в течение 30 мин. Реакционную смесь выливали в делительную воронку, содержащую  $\text{H}_2\text{O}$  (50 мл), и HCl (1 М в  $\text{H}_2\text{O}$ ) добавляли для доведения показателя pH до 2-3 (~4 мл). Водный слой экстрагировали с помощью DCM (2 x 50 мл). Объединенные органические слои промывали с помощью солевого раствора (50 мл), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали, растворитель удаляли с получением **16** (0,280 г, 90%) в виде прозрачного и бесцветного масла.

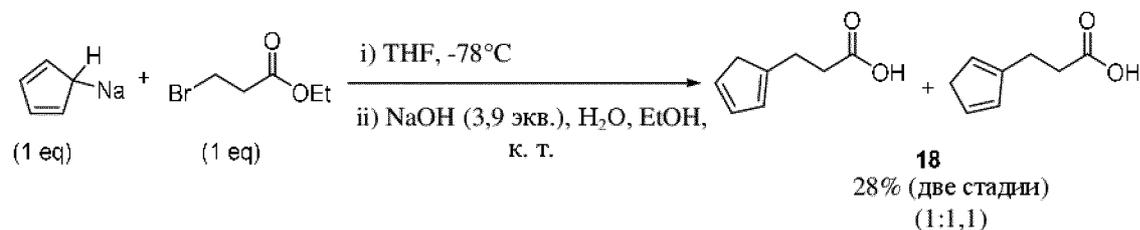
Фактор отклика (гексан:EtOAc, 1:1): 0,55;  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,37 (br. s., 1 H), 7,12 (d,  $J = 2,0$  Гц, 1 H), 6,28 (d,  $J = 2,0$  Гц, 1 H), 3,73 (s, 3 H), 2,62 (t,  $J = 6,5$  Гц, 2 H), 2,38 (t,  $J = 6,5$  Гц, 2 H), 1,73 - 1,61 (m, 4 H) ppm;  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  179,8, 143,4, 139,1, 139,0, 102,9, 59,4, 33,7, 27,4, 24,4, 24,0 ppm; IR (ATR) 3133, 2940, 1706, 1662, 1454, 1411, 1279, 1236, 1109  $\text{cm}^{-1}$ ; HRMS (EI) Точная расчетн. масса для  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4$   $[\text{M}]^+$ : 198,0892; измеренное значение: 198,0890.



2,5-диоксопирролидин-1-ил-5-(3-метоксифуран-2-ил)пентаноат (**17**):

THF (5 мл) добавляли в флакон, содержащий **16** (0,265 г, 1,34 ммоль, 1 экв.). Добавляли NHS (0,216 г, 1,87 ммоль, 1,4 экв.), EDC·HCl (0,308 г, 1,61 ммоль, 1,2 экв.) и DCM (3 мл), реакционную смесь герметично закрывали в атмосфере воздуха и взбалтывали при к. т. в течение ночи. Растворитель удаляли и остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (гексан:EtOAc, 2:1 → 1:1) с получением **17** (0,293 г, 74%) в виде бесцветного вязкого масла.

Фактор отклика (гексан:EtOAc, 2:1): 0,33;  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7,11 (d,  $J = 2,0$  Гц, 1 H), 6,27 (d,  $J = 2,0$  Гц, 1 H), 3,72 (s, 3 H), 2,82 (br. s., 4 H), 2,69 - 2,54 (m, 4 H), 1,81 - 1,60 (m, 4 H) ppm;  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169,1, 168,5, 143,5, 139,1, 138,7, 102,8, 59,3, 30,5, 27,0, 25,5, 24,2, 23,8 ppm; IR (ATR) 2948, 1814, 1735, 1638, 1413, 1206, 1058, 1046  $\text{cm}^{-1}$ ; HRMS (EI) Точная расчетн. масса для  $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{NO}_6$   $[\text{M}]^+$ : 295,1056; измеренное значение: 295,1062.

**Синтез CP1b-NHS (19)**

3-(циклопента-1,3-диенил)пропановая кислота и 3-(циклопента-1,4-диенил)пропановая кислота (**12**):

этил-3-бромпропионат (1,65 мл, 12,9 ммоль, 1 экв) добавляли к THF (30 мл) и охлаждали до  $-78^{\circ}\text{C}$ . Натрия циклопентадиенид (2 М раствор в THF, 6,45 мл, 12,9 ммоль, 1 экв.) добавляли по каплям в течение 5 мин. и реакционную смесь перемешивали при  $-78^{\circ}\text{C}$  в течение 3,5 ч. Реакционную смесь выливали в DCM (20 мл) и добавляли силикагель (6 г). Реакционную смесь фильтровали через силикагель с помощью DCM (100 мл) и растворитель удаляли с получением изомеров этил-3-(циклопентадиенил)пропаноата в виде желтого масла.

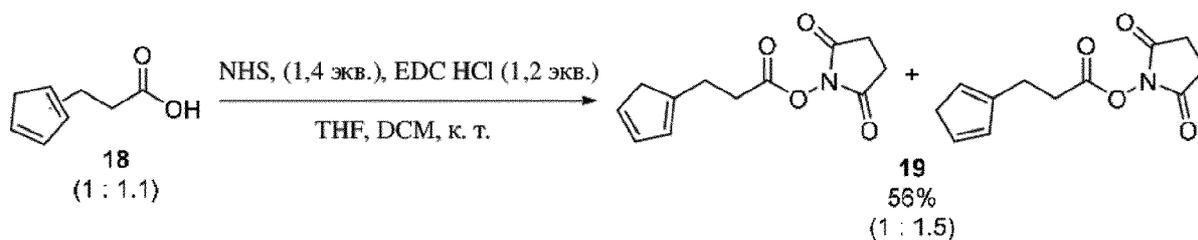
Спектральные данные соответствовали опубликованным литературным данным.<sup>3</sup>

Фактор отклика (гексан:EtOAc, 9:1): 0,45;  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6,47 - 6,02 (m, 3 H), 4,17 - 4,11 (m, 2 H), 2,96 (s, 0,31 H), 2,91 (d,  $J = 1,4$  Гц, 1,69 H), 2,78 - 2,68 (m,  $J = 1,7$  Гц, 2 H), 2,59 - 2,53 (m, 2 H), 1,26 (t,  $J = 7,1$  Гц, 3 H).

К раствору изомеров этил-3-(циклопентадиенил)пропаноата (~12,9 ммоль), растворенных в EtOH (20 мл), добавляли раствор NaOH (2,0 г, 50 ммоль, 3,9 экв.) в  $\text{H}_2\text{O}$  (20 мл). Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 15 мин. Реакционную смесь выливали в делительную воронку, содержащую  $\text{H}_2\text{O}$  (50 мл) и DCM (50 мл). Водный слой подкисляли с помощью HCl (1 М в  $\text{H}_2\text{O}$ ) до показателя pH 2 (~70 мл). Слои разделяли, затем водный слой экстрагировали с помощью DCM (50 мл).

Объединенные органические слои промывали с помощью солевого раствора (50 мл), сушили над  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , фильтровали, растворитель удаляли с получением **18** (0,50 г, 28% за две стадии) в виде коричневого масла.

Фактор отклика (гексан:EtOAc, 1:2): 0,69;  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10,57 (br. s., 1 H), 6,49 - 6,02 (m, 3 H), 2,97 (d,  $J = 1,6$  Гц, 1,07 H), 2,92 (d,  $J = 1,2$  Гц, 0,93 H), 2,82 - 2,68 (m, 2 H), 2,68 - 2,58 (m, 2 H) ppm;  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  179,7, 179,7, 147,1, 144,9, 134,2, 134,1, 132,3, 131,1, 127,0, 126,4, 43,3, 41,3, 33,9, 33,3, 25,5, 24,7 ppm; IR (ATR) 3070, 2926, 1705, 1412, 1283, 1205, 913  $\text{cm}^{-1}$ ; HRMS (EI) Точная расчетн. масса для  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{NO}_2$   $[\text{M}]^+$ : 138,0681; измеренное значение: 138,0678.



2,5-диоксопирролидин-1-ил-3-(циклопента-1,3-диенил)пропаноат и 2,5-диоксопирролидин-1-ил-3-(циклопента-1,4-диенил)пропаноат (**19**):

THF (10 мл) добавляли в флакон, содержащий **18** (0,460 г, 3,33 ммоль, 1 экв.). Добавляли NHS (0,537 г, 4,66 ммоль, 1,4 экв.), EDC·HCl (0,766 г, 4,00 ммоль, 1,2 экв.) и DCM (6 мл), реакционную смесь герметично закрывали в атмосфере воздуха и взбалтывали при к. т. в течение ночи. Растворитель удаляли и остаток подвергали колоночной флэш-хроматографии (гексан:EtOAc, 2:1 → 1:1) с получением **19** (0,438 г, 56%) в виде бледно-желтого порошка.

Фактор отклика (гексан:EtOAc, 2:1): 0,29;  $^1\text{H}$  ЯМР (400 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6,47 - 6,08 (m, 3 H), 2,97 (d,  $J = 1,2$  Гц, 1,2 H), 2,92 (d,  $J = 1,6$  Гц, 0,8 H), 2,90 - 2,75 (m, 8 H);  $^{13}\text{C}$  ЯМР (100 МГц,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  169,1, 168,2, 168,1, 145,7, 143,9, 134,4, 133,8, 132,2, 131,4, 127,7, 127,1, 43,2, 41,4, 30,8, 30,2, 25,5, 25,3, 24,5; IR (ATR) 2947, 1810, 1779, 1735, 1420, 1366, 1204, 1062, 1046  $\text{cm}^{-1}$ ; HRMS (EI) Точная расчетн. масса для  $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_4$   $[\text{M}]^+$ : 235,0845; измеренное значение: 235,0848.

Предприняли попытку синтезировать NHS-производное пентаметилциклопентадиена (CP3) с использованием  $\text{Sr}^*\text{Li}$  и этил-3-бромпропионата, которая оказалась неудачной, вместо этого произошел распад до этилакрилата. Реакция  $\text{CP}^*\text{Li}$  с метилбромацетатом была удачной, но после сложноэфирного гидролиза и повторного окисления, соединение подверглось неожиданной циклизации. В нашей третьей стратегии использовали метанол (1,2,3,4,5-пентаметилциклопента-2,4-диенил) Бойдстона<sup>1</sup>, с которым проводили реакцию с янтарным ангидридом до получения промежуточной кислоты, которую использовали без дополнительной очистки. Проводили реакцию с EDC·HCl и *N*-гидроксисукцинимидом с получением NHS-сложного эфира **13**.

Основой для схемы и синтеза NHS-производного фурана (F2) являлась работа Шеппарда по 3-алкоксифуранам<sup>2</sup>. Литиевую соль 3,3-диэтоксипроп-1-ина добавляли к метил-6-оксогексаноату с получением спирта **14**, который подвергали циклизации с использованием каталитического золота (I) в метаноле с получением 3-метоксифурана **15**. Сложный эфир **15** подвергали гидролизу, затем проводили реакцию с EDC·HCl и *N*-гидроксисукцинимидом с получением NHS-сложного эфира **17**.

Синтез NHS-производного CP1, который не содержит внутренний сложный эфир (CP1b), начинали с реакции NaCP с этил-3-бромпропионатом, затем сложный эфир

подвергали гидролизу с получением кислоты **12**. Проводили реакцию с EDC·HCl и *N*-гидроксисукцинимидом с получением NHS-сложного эфира **19**. Структурные различия между CP1 и CP1b показаны на фигуре 13.1.

**Фигура 13.1.** Обзор положений сложноэфирных связей в линкерах А) CP1-NHS и В) CP1b-NHS.

1. Peterson, G. I.; Church, D. C.; Yakelis, N. A.; Boydston, A. J., 1,2-oxazine linker as a thermal trigger for self-immolative polymers. *Polymer* **2014**, *55*, 5980-5985.
2. Foster, R. W.; Benhamou, L.; Porter, M. J.; Bučar, D.-K.; Hailes, H. C.; Tame, C. J.; Sheppard, T. D., Irreversible endo-Selective Diels–Alder Reactions of Substituted Alkoxyfurans: A General Synthesis of endo-Cantharimides. *Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)* **2015**, *21*, 6107-6114.
3. Honzický, J.; Mukhopadhyay, A.; Santos-Silva, T.; Romão, M. J.; Romão, C. C., Ring-Functionalized Molybdenocene Complexes. *Organometallics* **2009**, *28*, 2871-2879.

#### **Пример 14. Оценка ADC, полученных с линкер-модифицированным антителом**

Оценивали стабильность и активность ADC, полученных путем конъюгирования по Дильсу-Альдеру AM-MMAE с линкер-модифицированным антителом. Конъюгаты, полученные с помощью реакции Дильса-Альдера, сравнивали с цистеин-конъюгатами.

*Материалы.* Все антитела (в формате IgG1) экспрессировали и очищали с использованием стандартных молекулярно-биологических методик. Все реагенты приобретали у коммерческого поставщика, если не указано иное. Фуран-2-илметил сукцинамовая кислота-NHS-сложный эфир (F1-NHS) и малеимидакапроил-валин-цитруллин-*n*-аминобензилоксикарбонил-монометил-ауристатин-Е (AM-MMAE) приобрели у SynChem, Inc. (Элк Гров Виллидж, Иллинойс).

*Получение конъюгатов mAb-линкер:* диеновую функциональную группу вводили в произвольном порядке в антитела путем реакции описанных выше линкеров **17** и **19** (F2 и CP1b), содержащих NHS-сложный эфир, с аминами лизина. Степень модификации mAb контролировали по количеству NHS-линкера, используемого в реакции, и вводили различные количества линкера в зависимости от эксперимента. Общую процедуру модификации mAb с использованием CP1 можно описать следующим образом: Сначала раствор mAb доводили до концентрации 5 мг/мл (3 мл, 15 мг mAb, 100 нмоль, 1 экв.), используя PBS, pH 7,2, с последующим добавлением 10% об./об. 1 М NaHCO<sub>3</sub>. Данный раствор охлаждали на льду и добавляли 30 мкл

CP1b-NHS (10 mM исходного раствора в DMAc, 300 нмоль, 3 эквивалента, также называемого как CP1-линкер). Реакцию проводили на льду в течение 5 минут с последующей реакцией при комнатной температуре в течение 1 ч. при непрерывном перемешивании. Вступившее в реакцию mAb очищали путем диализа (Slide-A-Lyzer, 10 кДа MWCO) против PBS, 1 mM EDTA, pH 7,4, 4°C в течение 24 ч. Введение CP1-линкера определяли количественно с помощью масс-спектрометрии интактного дегликозилированного образца, как описано ниже.

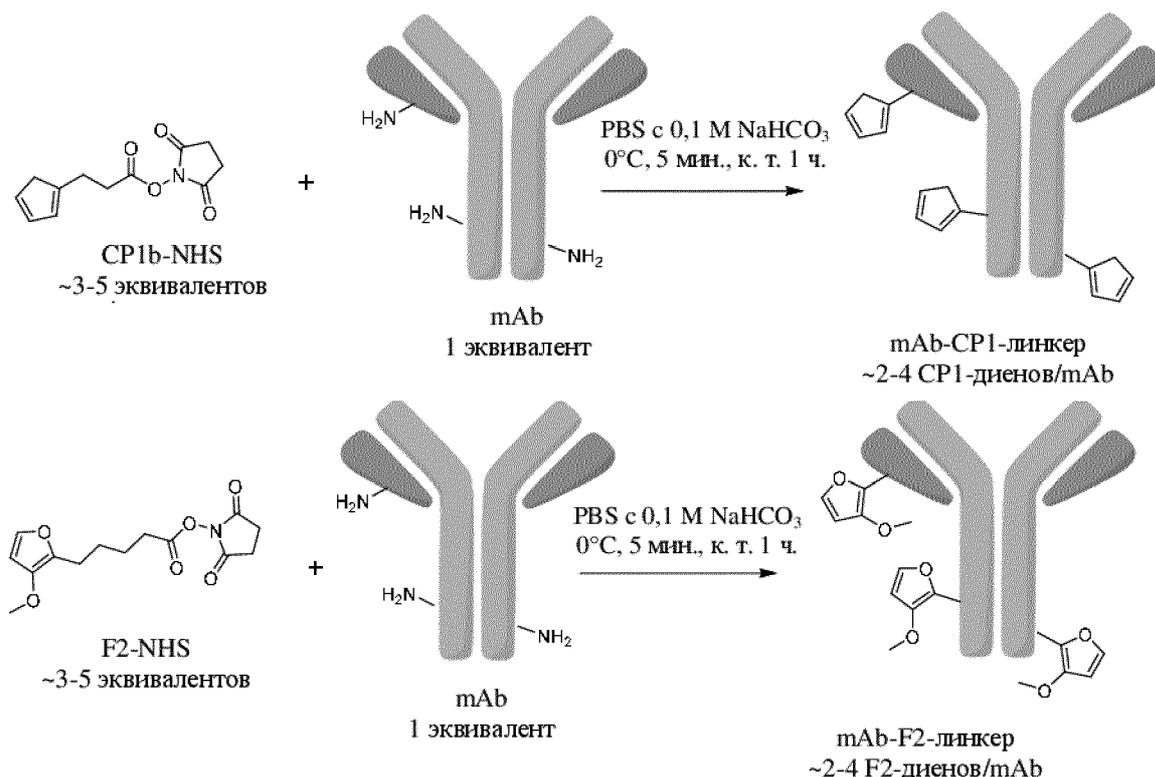


Схема 14.1. Получение конъюгатов mAb-CP1b-линкер и mAb-F2-линкер

*Получение ADC:* конъюгаты антитела с лекарственным средством получили из mAb герцептина (нецелевого) или mAb IgG-1 изотипического контроля-1 (мишени) с использованием и конъюгирования согласно реакции Дильса-Альдера посредством линкеров, и прямого конъюгирования с тиолами цистеина антитела. С использованием реакции Дильса-Альдера ADC получали из линкер-модифицированных антител CP1b-NHS (соединения 19) и F2-NHS (соединения 17), используя ту же общую методику, которая описана для mAb-CP1b-линкера, следующим образом: mAb-CP1b-линкер (10 мг, 67 нмоль, 1 эквивалент) доводили до концентрации 4,27 мг/мл, используя PBS, pH 7,4, затем добавляли DMSO (493 мкл) и 1 M одноосновного фосфата натрия (247 мкл) с получением соответственно ~20% и 10% об./об. растворов. AM-MMAE (53,3 мкл 10 mM исходного раствора в DMSO, 530 нмоль, 8 эквивалентов) добавляли к раствору антитела и далее реакцию проводили при комнатной температуре с перемешиванием в

течение 4 ч. N-ацетилцистеин (43 мкл 100 мМ раствора в воде, 4,3 мкмоль, 64 эквивалента) добавляли для гашения не вступивших в реакцию малеимидов. ADC очищали от реакционной смеси с использованием СНТ-хроматографии. Раствор ADC 3-кратно разбавляли дистиллированной водой и вводили в колонку Bio-Scale Mini Cartridge СНТ Type II 40 мкм. ADC элюировали в градиенте от буфера А (10 мМ фосфата, рН 7,0) до буфера В (10 мМ фосфата, рН 7,0, содержащий 2М NaCl) в течение 25 минут при скорости потока 5 мл/мин. После СНТ-хроматографии образец ADC подвергали процедуре замена буфера на PBS с использованием кассеты slide-a-lyzer при 4°C. Ту же процедуру использовали для получения ADC с конструкциями mAb-F2-линкер за исключением того, что реакцию конъюгирования с АМ-ММАЕ проводили в течение 24 ч. при комнатной температуре. Следует отметить, что содержание диена для каждого mAb до реакции с АМ-ММАЕ представлено в таблице 14.1. 8 эквивалентов АМ-ММАЕ по отношению к mAb, использованные для реакции конъюгирования, соответствуют примерно 2 молярным эквивалентам АМ-ММАЕ по отношению к диену.

ADC также получали посредством конъюгирования АМ-ММАЕ с тиолами цистеина, которые содержатся в шарнирном участке антитела. Сначала раствор антитела (10 мг, 67 нмоль, 1 эквивалент) доводили до концентрации 2,5 мг/мл, используя PBS, содержащий 1 мМ EDTA. Затем добавляли ТСЕР (10 мкл 50 мМ раствора в воде, 500 нмоль, 7,5 эквивалента) для восстановления дисульфидных связей в шарнирном участке, и смесь инкубировали при 37°C с перемешиванием в течение 1 ч. Затем добавляли DMSO (410 мкл, 10% об./об. конечная концентрация реакционной смеси), реакцию проводили при комнатной температуре с помешиванием в течение 1 ч. Добавляли N-ацетилцистеин для гашения не вступивших в реакцию малеимидных групп и очищали ADC с помощью СНТ-хроматографии и диализа, как это описано выше. ADC, которые получали путем конъюгирования с цистеинами в шарнирном участке, обозначают с добавлением Cys в названии, например: герцептин-Cys-ММАЕ.

*Анализ с помощью rRP-HPLC:* для каждого анализа антитела и ADC подвергали восстановлению при 37°C в течение 20 минут с использованием 42 мМ дитиотреитола (DTT) в PBS, рН 7,2. 10 мкг восстановленных антител и ADC загружали в колонку PLRP-S, 1000Å (2,1 x 50 мм, Agilent) и элюировали при 40°C при скорости потока 0,5 мл/мин с градиентом от 5% В до 100% В в течение 60 минут (подвижная фаза А: 0,1% трифторуксусная кислота в воде, и подвижная фаза В: 0,1% трифторуксусная кислота в ацетонитриле). Процент конъюгирования определяли с использованием интегрированных площадей пиков хроматограммы.

*Анализ с помощью эксклюзионной хроматографии:* SEC-анализ проводили с использованием системы Agilent 1100 Capillary LC, оснащенной тройной детекторной матрицей (Viscotek 301, Viscotek, Хьюстон, Техас); длину волны устанавливали на 280 нм и образцы (50 мкг) пропускали через колонку TSK-GEL G3000SWXL (Toso Bioscience LLC, Монтгомеривилл, Пенсильвания), используя 100 мМ натрий-фосфатный буфер, 10% изопропиловый спирт, pH 6,8, при скорости потока 1 мл/мин.

*Анализ стабильности в сыворотке крови:* ADC инкубировали в сыворотке крови крыс для определения стабильности связи антитела с полезной нагрузкой. ADC добавляли к нормальной сыворотке крови крыс (Jackson Immunoresearch) до достижения конечной концентрации 0,2 мг/мг (1,33 мкм антитела), при этом общий объем раствора ADC, добавленного к сыворотке крови, составил менее 10%. Смесь ADC и сыворотки крови стерильно фильтровали и аликвоту отбирали из смеси, замораживая в качестве контроля  $t=0$ . Затем оставшийся образец дополнительно инкубировали при 37°C в герметичном контейнере в течение 7 дн. Конъюгированное и неконъюгированное антитело человека выделяли из сыворотки крови крыс с помощью иммунопреципитации с использованием смолы, содержащей антитело, специфическое к Fc-фрагменту IgG человека, конъюгированное с агарозой (Sigma-Aldrich). Смолу дважды промывали с использованием PBS, однократно буфером для элюирования IgG, и затем двукратно с использованием PBS. Затем образцы сыворотки крови с ADC объединяли со смолой, содержащей антитело к IgG человека (100 мкл смеси ADC-сыворотка крови, 50 мкл суспензии смолы), и перемешивали в течение 15 минут при комнатной температуре. Смолу извлекали центрифугированием, а затем дважды промывали с использованием PBS. Промытую смолу ресуспендировали в 100 мкл буфера для элюирования IgG (Thermo Scientific) и дополнительно инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Смолу удаляли центрифугированием, а затем к надосадочной жидкости добавляли 20 мкл 10X буфера Glyco Buffer 1 (New England Biolabs). Раствор выделенного антитела человека стерильно фильтровали и инкубировали с EndoS в течение 1 ч. при 37°C. Дегликозилированные mAb затем восстанавливали с помощью TCEP и анализировали с помощью LC/MS, как это описано выше. Процент конъюгированного антитела определяли по высотам пиков масс-спектров, как это описано в примере 12.

*Масс-спектрометрический анализ:* образцы анализировали так, как это описано в примере 1.

*Анализ in vitro цитотоксичности:* раковые клеточные линии SKBR3 и N87 получали из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Клетки поддерживали в среде

RPMI 1640 (Life Technologies) с добавлением 10% термоинактивированной фетальной бычьей сыворотки (HI-FBS) (Life Technologies) при 37°C с 5% CO<sub>2</sub>. Клетки SKBR3 и NCI-N87, собранные в экспоненциальную фазу роста, высевали в 96-луночные культуральные планшеты при 2500 и 2000 клеток/лунку и выращивали в течение ночи. Затем на следующий день клетки обрабатывали путем добавления 4-кратного серийного разведения ADC, начиная с 4000 и 64000 нг/мл (9 концентраций), в двух параллелях. Обработанные клетки культивировали в течение 6 дней и жизнеспособность клеток определяли с использованием набора CellTiter-Glo Luminescent Viability Assay (Promega) согласно протоколу производителя. Жизнеспособность клетки рассчитали в виде процентной доли от необработанных контрольных клеток. Значения IC<sub>50</sub> определяли с использованием анализа методом логистического нелинейного регрессионного анализа с помощью программного обеспечения Prism (GraphPad).

*Ингибирование роста опухоли in vivo:* ADC герцептин-ММАЕ, которые получали с использованием mAb, модифицированных линкерами F2 и CP1b, дополнительно оценивали в плане противоопухолевой активности in vivo на подкожной ксенотрансплантатной модели опухоли N87 у мышей. Опухоли получали путем инокуляции клеток N87 (5 миллионов клеток N87 в 50% Matrigel) подкожно самкам безтимусных мышей 4-6 недельного возраста. Когда опухоли достигали примерно 200 мм<sup>3</sup>, мышей произвольно распределяли в группы по 5 мышей на группу. ADC вводили внутривенно в указанных дозах, при этом введение осуществляли на 5 день после инокуляции клеток. Размеры опухолей (продольная ось и поперечная ось) измеряли два раза в неделю с помощью штангенциркуля. Объем опухоли рассчитывали с использованием уравнения:

$$V = \frac{1}{2} a \times b^2$$

где

a= продольная ось опухоли в мм,

b = поперечная ось опухоли в мм.

**Фигура 14.1.** Данные масс-спектрометрического анализа конъюгатов mAb-CP1b-линкер. Числа над пиками указывают на количество линкеров (B и E) или AM-ММАЕ (C и F), конъюгированных с mAb. Все образцы перед анализом подвергли дегликозилированию с использованием EndoS.

**Фигура 14.2.** Данные масс-спектрометрического анализа конъюгатов mAb-F2-линкер. Числа над пиками указывают на количество линкеров (В и Е) или АМ-ММАЕ (С и F), конъюгированных с mAb. Все образцы перед анализом подвергли дегликозилированию с использованием EndoS.

**Фигура 14.3.** Изображены данные масс-спектрометрического анализа конъюгатов mAb-цистеин. Указаны легкая цепь (LC) и тяжелая цепь (HC) mAb (A-D), а также количество конъюгированных АМ-ММАЕ (В и D). Все образцы подвергли дегликозилированию и восстановлению с использованием EndoS перед анализом.

**Фигура 14.4.** Данные анализа rRP-HPLC mAb, конъюгатов mAb-линкер и ADC. Указаны легкие цепи и тяжелые цепи mAb, количество АМ-ММАЕ, конъюгированных с mAb, также указано для образцов ADC.

**Фигура 14.5.** SEC-анализ mAb, конъюгатов mAb-линкер и ADC. Указаны высокомолекулярные фрагменты (HMWS).

**Фигура 14.6.** А) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленных дегликозилированных образцов ADC после инкубации в сыворотке крови крыс в течение 7 дн. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать только тяжелую цепь. Потерю лекарственного средства определяли по уменьшению высот пиков образцов DAR-1 и DAR-2 по отношению к высоте пика DAR-0. В) Количественные показатели остаточного лекарственного средства (%) рассчитывали с использованием данных масс-спектрометрии. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение, n=3.

**Фигура 14.7.** Активность ADC *in vitro* по отношению к А) клеткам NCI-N87 и В) клеткам SKBR3.

**Фигура 14.8.** Активность ингибирования опухолевого роста посредством ADC герцептин-линкер MMAE в отношении опухолевой модели мышей, полученной с помощью подкожного введения N87.

Таблица 14.1. Краткое описание ADC, конъюгированных с линкером и конъюгированных с цистеином

| mAb | Линкер | Реакция конъюгирования | Линкер DAR (MS) | MMAE DAR (MS) | MMAE DAR (rRP-HPLC) | Мономер (%) |
|-----|--------|------------------------|-----------------|---------------|---------------------|-------------|
|     | p      |                        |                 |               |                     |             |

|                            |             |                               |               |     |     |      |
|----------------------------|-------------|-------------------------------|---------------|-----|-----|------|
| Герцептин                  | CP1b        | Дильса-Альдера                | 4,1           | 3,9 | 3,5 | 98,7 |
| Изотипический контроль IgG | CP1b        | Дильса-Альдера                | 3,7           | 3,2 | 3,4 | 98,4 |
| Герцептин                  | F2          | Дильса-Альдера                | 4,0           | 3,5 | 4,5 | 97,7 |
| Изотипический контроль IgG | F2          | Дильса-Альдера                | 3,8           | 3,2 | 3,5 | 98,1 |
| Герцептин                  | отсутствует | Реакция присоединения Михаэля | Не определено | 3,2 | 3,5 | 97,4 |
| Изотипический контроль IgG | Отсутствует | Реакция присоединения Михаэля | Не определено | 2,9 | 3,1 | 98,5 |

<sup>a</sup>ADC, полученные без линкеров, конъюгировали с нативными цистеинами

Таблица 14.2. Активность *in vitro* линкер-конъюгированных и цистеин-конъюгированных ADC

| ADC                                  | MMAE DAR <sup>a</sup> | N87, IC <sub>50</sub><br>(нг/мл) | SKBR3,<br>IC <sub>50</sub> (нг/мл) |
|--------------------------------------|-----------------------|----------------------------------|------------------------------------|
| Герцептин-CP1b-MMAE                  | 3,7                   | 2                                | 2                                  |
| Изотипический контроль IgG-CP1b-MMAE | 3,3                   | 8230                             | 1811                               |
| Герцептин-F2-MMAE                    | 4                     | 3                                | 1,6                                |
| Изотипический контроль IgG-F2-MMAE   | 3,4                   | 9990                             | ~2000                              |
| Герцептин-Cys-MMAE                   | 3,4                   | 3,6                              | 2,8                                |
| Изотипический контроль IgG-Cys-MMAE  | 3                     | 8177                             | >2000                              |

<sup>a</sup>среднее значение DAR рассчитывали по значениям MS и rRP-HPLC, представленным в таблице 14.1.

ADC получали с помощью реакции Дильса-Альдера или реакции присоединения Михаэля малеимид-MMAE с герцептином и mAb изотипического контроля IgG. Реакционно способные группы Дильса-Альдера вводили в амины лизина с помощью

сшивающих средств, затем проводили реакцию с АМ-ММАЕ, при этом реакция присоединения Михаэля с АМ-ММАЕ осуществлялась с тиолами нативного цистеина (названо Cys-ADC). С помощью обоих способов конъюгирования получали гетерогенные ADC с содержанием лекарственного средства 3-4 ММАЕ-лекарственных средств на mAb.

Присоединение по Дильсу-Альдеру АМ-ММАЕ к mAb, модифицированным CP1b- и F2-линкерами, было эффективным с практически оцениваемым количественно превращением, подтвержденным с помощью масс-спектрометрии. Кроме того, модификация mAb посредством циклопентадиеновых или метокси-фурановых линкеров и последующее присоединение АМ-ММАЕ с помощью реакции Дильса-Альдера не повышали содержание агрегатов в продуктах конъюгирования, что показано с помощью SEC-анализа. В итоге ADC, полученные с помощью конъюгирования по Дильсу-Альдеру, были высокого качества.

Анализ с помощью масс-спектрометрии стабильности ADC в сыворотке крови крыс продемонстрировал, что конструкции, полученные с использованием mAb-CP1b-линкера и mAb-F2-линкера с помощью реакции Дильса-Альдера, были более стабильными, чем конструкции, полученные с помощью реакции присоединения Михаэля с тиолами цистеина. Инкубация в сыворотке крови крыс в течение 7 дней при 37°C в результате приводила к 60% потере лекарственного средства в случае ADC mAb-цистеин, при этом для ADC mAb-CP1b-линкера и mAb-F2-линкера показана потеря лекарственного средства, составляющая менее 10% в тех же условиях.

Герцептин mAb-CP1b-линкер и герцептин ADC mAb-F2-линкер являлись высокоэффективными ингибиторами клеточной пролиферации по отношению к клеточным линиям Her2-позитивным N87 и SKBR3 со значениями IC<sub>50</sub>, аналогичными соответствующему цистеин-связанному ADC. ADC с изотипическим контролем, не оказывающие целенаправленного воздействия, были в 2000-4000 раз менее эффективными, чем целевые конструкции на основе герцептина с аналогичной эффективностью *in vitro*, наблюдаемой для конструкций, полученных с помощью реакции Дильса-Альдера, и конструкций ADC-цистеин. И наконец, ADC на основе герцептина, полученные с использованием mAb, модифицированных с использованием линкеров CP1b и F2, были эффективными ингибиторами опухолевого роста *in vivo*. Состояние полной остановки роста опухоли наблюдали в течение 30 дней в опухолевой модели, полученной путем подкожного введения N87, при дозе ADC в 3 мг/кг. Данный результат подтверждает, что ADC, полученные с помощью реакции Дильса-Альдера, являются достаточно стабильными *in vivo* для проявления терапевтического эффекта.

### Пример 15. Сравнение констант скорости реакции Дильса-Альдера в водном буфере и органическом растворителе

Кинетические параметры низкомолекулярной диен-малеимидной реакции в органических условиях определяли с целью сравнения с реакциями на основе антител в водных условиях. Константы скорости реакции диенов на линкер-модифицированных mAb и малеимида определяли для: mAb-CP1b-линкера, mAb-CP2-линкера, mAb-CP3-линкера и mAb-F2-линкера.

*Определение скорости диен-малеимидной реакции в органических растворителях:* диен и *N*-этилмалеимид в CDCl<sub>3</sub> объединяли в пробирках для ЯМР (конечная концентрация 0,01 М в каждой) и контролировали путем проведения <sup>1</sup>H ЯМР при комнатной температуре. Концентрацию исходного материала [A] рассчитывали с использованием интегрирования этиловых пиков (3,59 или 1,20 ppm) *N*-этилмалеимида и этилового пика(этиловых пиков) DA-конъюгата (как правило, 4,40 или 1,05 ppm).

$[A] = 0,01 \text{ M} * (\text{интегрирование исходного материала})/(\text{интегрирование исходного материала} + \text{продукт})$

Обратную концентрацию (1/[A]) наносили на график в зависимости от времени (с). Скорость реакции второго порядка (M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) получали из эмпирической кривой с наилучшим соответствием. Использовали среднее значение скорости и стандартное отклонение по трем экспериментам.

*Получение конъюгатов mAb-линкер:* диеновую функциональную группу встраивали произвольным образом в антитела путем реакции с линкерами CP1b-линкер (соединение 19), CP2-линкер (соединение 12), CP3-линкер (соединение 13) и F2-линкер (соединение 17), содержащими NHS-сложный эфир, описанных в примере 9 и примере 14. Реакция CP3-NHS с mAb показана на схеме 15.1. Степень модификации mAb контролировали по количеству NHS-линкера, используемого в реакции, и вводили различные количества линкера в зависимости от эксперимента. Количество линкеров (и, соответственно, диенов) на mAb определяли с помощью масс-спектрометрии интактного дегликозилированного образца, как это описано в примере 1.

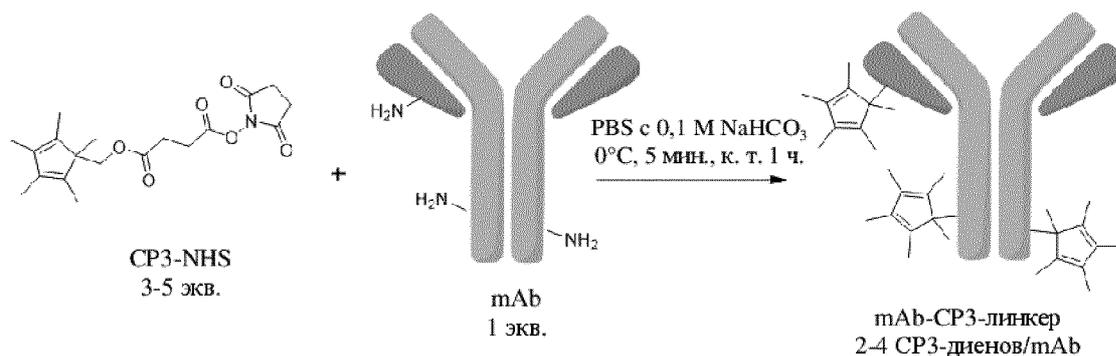


Схема 15.1. Получение mAb-CP3-линкера

*Реакция линкер-модифицированного mAb с малеимид-ММАЕ:* проводили реакцию диенов, которые содержатся в линкер-модифицированных mAb, с 1 молярным эквивалентом AM-ММАЕ (диен:малеимид) в водном буфере, как это описано в примере 10.

*Расчет констант скорости реакции mAb-линкера с диен-малеимидом:* Константы скорости реакции второго порядка для малеимид-ММАЕ с диенами в mAb-линкерах определяли по интенсивностям пиков в масс-спектрах дегликозилированного восстановленного образца, как описано в примере 10. В случае одного образца анализировали только пики, соответствующие тяжелой цепи, как это описано в примере 4.

Таблица 15.1. Краткое изложение показателей скорости реакции AM-ММАЕ с диен-линкер модифицированными mAb в водном буфере и N-этилмалеимида с диеновыми линкерами в CDCl<sub>3</sub>

| Скорость реакции Дильса-Альдера для mAb-линкера в буфере <sup>a,b</sup> |                             |      |                                                                              |                               | Скорость реакции Дильса-Альдера для линкера в CDCl <sub>3</sub> <sup>c</sup>   | Повышение скорости реакции в воде<br>$k_2(\text{H}_2\text{O})/k_2(\text{CDCl}_3)$ |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|------|------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Эксперимент                                                             | mAb-линкер                  | LAR  | $k_2(\text{H}_2\text{O})$<br>(M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) <sup>d</sup> | Период полупревращения (мин.) | $k_2(\text{CDCl}_3)$<br>(1000 x M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ) <sup>e</sup> |                                                                                   |
| 1                                                                       | IgG-CP1-линкер <sup>f</sup> | 3,7  | 35,7 <sup>h</sup>                                                            | 14                            | 97 ± 7 <sup>f</sup>                                                            | 368                                                                               |
| 2                                                                       | IgG-CP1-линкер <sup>f</sup> | 3,74 | 77                                                                           | 7                             |                                                                                | 794                                                                               |
| 3                                                                       | IgG-CP1-линкер <sup>f</sup> | 3,21 | 119                                                                          | 4                             |                                                                                | 1227                                                                              |
| 4                                                                       | IgG-CP1-линкер <sup>f</sup> | 3,21 | 116                                                                          | 5                             |                                                                                | 1196                                                                              |

ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ

к ответу на запрос формальной экспертизы от 01.04.2020

|   |                    |      |                 |       |            |                  |
|---|--------------------|------|-----------------|-------|------------|------------------|
| 1 | IgG-CP2-<br>линкер | 3,29 | 2,6             | 214   | 8,7 ± 0,6  | 299              |
| 2 | IgG-CP2-<br>линкер | 3,29 | 2,7             | 215   |            | 310              |
| 3 | IgG-CP2-<br>линкер | 2,63 | 3,0             | 192   |            | 345              |
| 4 | IgG-CP2-<br>линкер | 2,63 | 2,3             | 318   |            | 264              |
| 1 | IgG-CP3-<br>линкер | 3,04 | 10,2            | 59    | 12,1 ± 0,1 | 843              |
| 2 | IgG-CP3-<br>линкер | 3,04 | 16,1            | 39    |            | 1331             |
| 3 | IgG-CP3-<br>линкер | 2,81 | 24,1            | 24    |            | 1992             |
| 1 | IgG-F2-<br>линкер  | 2,95 | 6,6             | 94    | 12,6 ± 0,7 | 524              |
| 2 | IgG-F2-<br>линкер  | 2,95 | 2,3             | 210   |            | 183              |
| 3 | IgG-F2-<br>линкер  | 3,03 | 5,5             | 117   |            | 437              |
| 1 | IgG-<br>фуран      | 2,5  | ND <sup>g</sup> | >1200 | ~0,1       | Не<br>определено |

a) все реакции конъюгирования проводили в PBS с добавлением 100 мМ одноосновного фосфата натрия, 20% DMSO, pH 5,5.

b) Все реакции проводили с 1 экв. AM-MMAE по отношению к диену. Концентрация mAb составляла 1,3 мг/мл ± 0,35 мг/мл во всех реакциях.

c) Все реакции проводили в CDCl<sub>3</sub> с диен-линкером (0,01 М) и *N*-этилмалеимидом (0,01 М) при комнатной температуре.

d)  $k_2(\text{H}_2\text{O})$  рассчитывали по концентрации пиков не вступившего в реакцию mAb-линкера (масс-спектрометрический анализ дегликозилированного и восстановленного образца). Анализировали и тяжелую, и легкую цепи.

e)  $k_2(\text{CDCl}_3)$  рассчитывали путем интеграции идентифицирующих пиков в <sup>1</sup>H ЯМР-спектре. Значения представляют собой средние значения по 3 анализам и стандартное отклонение.

f) с использованием CP1b-линкера.

g) ND, не определено.

h) Анализировали только тяжелую цепь.

Сравнение констант скорости реакции между малеимидными соединениями и диеновыми соединениями в антителе/водных условиях и низкомолекулярных условиях/условиях органического растворителя демонстрирует несколько ключевых признаков данной реакции, предназначенной для применений в биоконъюгировании. Во-первых, немодифицированный фуран недостаточно реакционноспособен для конъюгирования малеимидных соединений с антителом при типичных условиях биоконъюгирования. Об этом свидетельствует отсутствие конъюгирования AM-MMAE

с IgG-фураном, что продемонстрировало минимальную реакцию после 20 ч., а также ~100-1000-кратное снижение константы скорости реакции с малеимидом в органических условиях по сравнению с другими диенами. Во-вторых, подтверждали ускорение реакции Дильса-Альдера в водных условиях в контексте конъюгирования антитела. Повышение скорости реакции является решающим для практического применения данной химии с целью получения биоконъюгатов, рассмотрение только констант скорости реакции в органических условиях сделало бы реакцию Дильса-Альдера бесперспективной в отношении всех описанных в данном документе диенов. Например циклопентадиен, который содержится в CP1-линкере, проявлял период полупревращения в реакции, составляющий приблизительно 10 минут, в реакции антитела с малеимидом (AM-MMAE) в условиях водного раствора, тогда как соответствующая органическая фаза реакции потребовала бы 3,6 дня. И наконец, данные результаты демонстрируют, что реакционная способность диена поддается регулированию, при этом модификация химической структуры может повышать или понижать скорость реакции с диенофилом. В совокупности циклопентадиеновые и модифицированные фурановые функциональные группы поддаются эффективным реакциям биоконъюгирования между антителами и соединениями малеимида в мягких условиях и при концентрациях антитела в диапазоне ~1-2 мг/мл, тогда как простой немодифицированный фуран не поддается.

#### **Пример 15. Получение ADC на основе mAb 1C1-K274CP1 NNAA с лекарственным средством AZ1508-линкером**

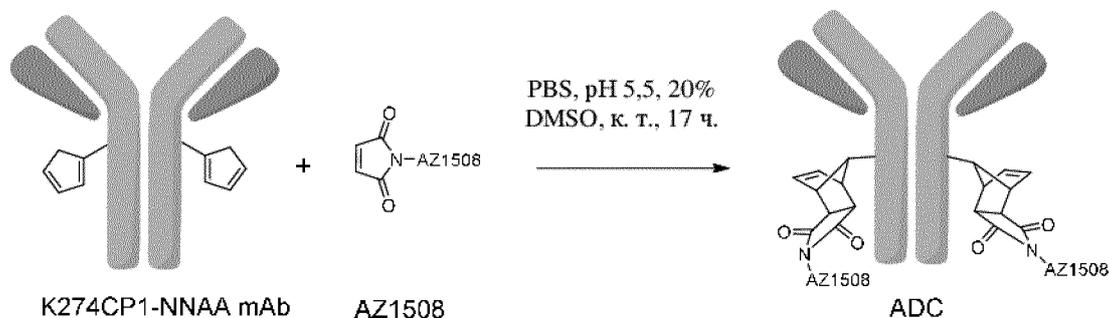
Оценивали возможность получения ADC на основе CP1-NNAA, встроенными в положение K274 в антителе, с лекарственным средством AZ1508-линкером.

*Получение антитела.* CP1-NNAA встраивали в антитело 1C1 с использованием способов, описанных в примере 6.

*Конъюгирование 1C1 K274CP1-mAb с AZ1508:* K274CP1 NNAA-mAb (0,4 мг, 2,7 нмоль, 1 эквивалент) доводили до концентрации 3 мг/мл, используя PBS (0,133 мл). Добавляли DMSO (27 мкл) и 1 М одноосновный фосфат натрия (13 мкл) с получением соответственно ~20% и 10% об./об. растворов. Добавляли AZ1508 (5 мкл 10 мМ исходного раствора в DMSO, 13 нмоль, 5 эквивалентов) к раствору 1C1 K274CP1-mAb и смесь кратковременно встряхивали. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 17 ч. при непрерывном перемешивании. Добавляли N-ацетилцистеин (1,1 мкл, 100 мМ, 108 нмоль, 40 эквивалентов) и раствор дополнительно инкубировали в течение 15 мин. для гашения не вступивших в реакцию малеимидных групп. Затем

образцы 3-кратно разбавляли водой и очищали с использованием СНТ-хроматографии. Затем образцы анализировали с помощью масс-спектрометрии восстановленного образца и SEC, как это описано в примерах 6 и 12.

**А)**



**В)**

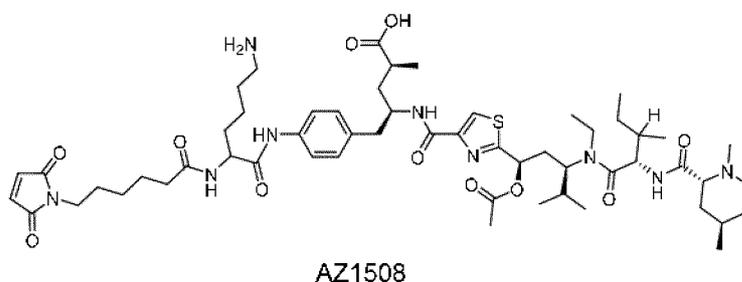


Схема 15.1. А) Реакция mAb K274CP1-NNAA с AZ1508. В) Структура AZ1508.

*Определение характеристик ADC 1C1 K274CP1-NNAA:* образцы анализировали с помощью масс-спектрометрии восстановленного образца и SEC, как это описано в примерах 6 и 12. Анализ *in vitro* активности в клетках PC3 проводили так, как это описано в примере 12.

**Фигура 15.1.** Анализ SDS-PAGE ADC 1C1 K274CP1-NNAA AZ1508. А) Невосстанавливающие условия, В) восстанавливающие условия.

**Фигура 15.2.** Масс-спектрометрический анализ восстановленного гликозилированного продукта конъюгирования mAb 1C1 K274CP1-NNAA с AZ1508. А) Не вступившее в реакцию mAb, В) продукт реакции с AZ1508. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую цепь (HC), и легкую (LC) цепь антитела.

**Фигура 15.3.** По результатам SEC-анализа ADC 1C1 K274CP1-NNAA AZ1508 определили, что был получен высокомономерный продукт. Указаны высокомолекулярные твердые частицы (HMWS).

Таблица 15.1. Краткое описание свойств<sup>a,b,c</sup> ADC 1C1 K274CP1-NNAА AZ1508

| Эффективность конъюгирования (%) | Выявленная Δ массы (а.е.м.) | Расчетная Δ массы (а.е.м.) | DAR <sup>d</sup> | Мономер (%) | EC50 <sup>e</sup> (нг/мл) |
|----------------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------|-------------|---------------------------|
| 96                               | +1094,1                     | +1092,4                    | 1,91             | 95          | 9,75                      |

<sup>a</sup>все реакции конъюгирования проводили при pH 5,5, 20% DMSO, 22°C и 3 мг/мл mAb 1C1 K274CP1-NNAА. CP1-NNAА встраивали в положение K274 вместо лизина.

<sup>b</sup>использованное молярное соотношение AZ1508:CP1-диена равнялось 2,5:1.

<sup>c</sup>рассчитывали по интенсивностям пиков масс-спектров восстановленного образца.

<sup>d</sup>DAR = соотношение лекарственное средство и антитело.

<sup>e</sup>Определяли в клетках РС3, положительных по рецептору EphA2.

Подтвердили реакционную способность CP1-NNAА-диена по отношению к AZ1508 после встраивания в положение K274 в антителе 1C1. Продукт ADC был высокого качества, с >95% конъюгированием и с незначительным количеством агрегатов. Полученный ADC был активным по отношению к рецептор-положительным клеткам РС3.

#### **Пример 16. Получение ADC на основе антител 1C1 S239CP2-NNAА, 1C1 K274CP2-NNAА и 1C1 N297CP2-NNAА с лекарственным средством AZ1508-линкер и сравнение с аналогичными сайт-специфичными цистеин-связанными ADC на основе AZ1508**

ADC, несущие лекарственное средство AZ1508-линкер, получали с антителами 1C1, имеющими CP2-NNAА, встроенные в положения S239, K274 и N297 путем мутации кодона нативной аминокислоты в стоп-кодон amber в плазмиде для экспрессии. CP2-NNAА встраивали в каждое положение в отдельных антителах.

Получение антитела: CP2-NNAА встраивали в антитела 1C1 и экспрессировали с использованием способов, описанных в примере 6. Цистеин встраивали в антитела 1C1 путем сайт-направленного мутагенеза с использованием стандартных молекулярно-биологических методик.

Конъюгирование mAb 1C1 CP2-NNAА с AZ1508: аналогичный способ конъюгирования проводили со всеми тремя конструкциями на основе антител и CP2-NNAА с использованием процедуры, описанной в примере 12, с одним отличием, заключающемся в том, что вместо AM-MMAE использовали AZ1508. Следует отметить, что конъюгирование с лекарственным средством-линкером осуществляли

путем простого смешивания AZ1508 с mAb CP2-NNAА с последующим перемешиванием.

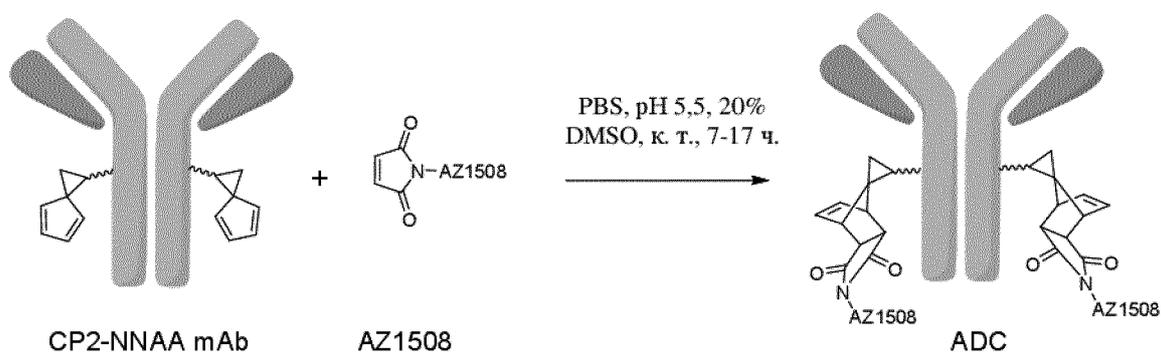


Схема 16.1. А) Реакция mAb CP2-NNAА с AZ1508 См. на схеме 15.1 структуру AZ1508.

*Конъюгирование mAb 1C1, сконструированных с цистеинами, с AZ1508.* Сайт-специфические цистеин-связанные ADC AZ1508 получали с использованием аналогичного способа, описанного в примере 12, с одним отличием, заключающемся в том, что вместо AM-MMAE использовали AZ1508. Следует отметить, что цистеин-mAb должен быть подвергнут восстановлению, диализу и окислению перед добавлением AZ1508.

*Определение характеристик ADC 1C1 CP2-NNAА и ADC 1C1, сконструированных с цистеином.* Образцы анализировали посредством SDS-PAGE, масс-спектрометрии восстановленного образца, HIC, rRP-HPLC и SEC, как это описано в примерах 6 и 12. Анализ *in vitro* активности в культивируемых клетках PC3 проводили так, как это описано в примере 12.

**Фигура 16.1.** Результаты анализа SDS-PAGE ADC 1C1 CP2-NNAА AZ1508 и ADC 1C1-цистеин-AZ1508. А) Невосстановленные образцы, В) восстановленные образцы.

**Фигура 16.2.** Анализ ADC 1C1 S239CP2-NNAА AZ1508. А) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного образца mAb, не вступившего в реакцию. В) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта реакции с AZ1508. С) HIC-анализ продукта конъюгирования не вступившего в реакцию антитела с AZ1508, D) SEC-анализ продукта реакции с AZ1508. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую (HC), и легкую (LC) цепи в (А) и (В).

**Фигура 16.3.** Анализ ADC 1C1 K274CP2-NNAА AZ1508. А) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного образца mAb, не

вступившего в реакцию. В) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта реакции с AZ1508. С) НИС-анализ продукта конъюгирования не вступившего в реакцию антитела с AZ1508, D) SEC-анализ продукта реакции с AZ1508. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую (HC), и легкую (LC) цепи в (A) и (B).

**Фигура 16.4.** Анализ ADC 1C1 N297CP2-NNAА AZ1508. А) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного образца mAb, не вступившего в реакцию. В) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта реакции с AZ1508. С) НИС-анализ продукта конъюгирования не вступившего в реакцию антитела с AZ1508, D) SEC-анализ продукта реакции с AZ1508. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую (HC), и легкую (LC) цепи в (A) и (B).

**Фигура 16.5.** Анализ ADC 1C1 S239C AZ1508. А) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного образца mAb, не вступившего в реакцию. В) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта реакции с AZ1508. С) НИС-анализ продукта конъюгирования не вступившего в реакцию антитела с AZ1508, D) SEC-анализ продукта реакции с AZ1508. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую (HC), и легкую (LC) цепи в (A) и (B).

**Фигура 16.6.** Анализ ADC 1C1 K274C AZ1508. А) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного образца mAb, не вступившего в реакцию. В) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта реакции с AZ1508. С) НИС-анализ продукта конъюгирования не вступившего в реакцию антитела с AZ1508, D) SEC-анализ продукта реакции с AZ1508. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую (HC), и легкую (LC) цепи в (A) и (B).

**Фигура 16.7.** Анализ ADC 1C1 N297C AZ1508. А) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного образца mAb, не вступившего в реакцию. В) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта реакции с AZ1508. С) НИС-анализ продукта конъюгирования не вступившего в реакцию антитела с AZ1508, D) SEC-анализ продукта реакции с AZ1508. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую (HC), и легкую (LC) цепи в (A) и (B).

Таблица 16.1. Краткое описание ADC 1C1 CP2-NNAА и ADC цистеин-mAb<sup>a,b</sup>

| Положение | Мутация  | Титр, мг/л | Мономер mAb (%) <sup>c</sup> | ADC DAR MS <sup>d,e</sup> | ADC DAR, НИС <sup>d,f</sup> | ADC, Δ массы (а.е.м) <sup>g</sup> | Мономер ADC (%) <sup>c</sup> | ADC, EC50 (нг/мл) <sup>h</sup> |
|-----------|----------|------------|------------------------------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| S239      | CP2-NNAА | 76-82      | 99                           | 1,96                      | Не определено               | +1089,5                           | 97                           | 9                              |
|           | Cys      | 792        | 96                           | 1,96                      | Не определено               | +1093,7                           | 97                           | 7                              |
| K274      | CP2-NNAА | 54-69      | 92                           | 1,96                      | 1,87                        | +1089,0                           | >99                          | 7                              |
|           | Cys      | 468        | 97                           | 1,88                      | 1,84                        | +1092,9                           | 97                           | 8                              |
| N297      | CP2-NNAА | 42         | 79                           | 1,96                      | Не определено               | +1091,0                           | >99                          | 10                             |
|           | Cys      | 594        | 93                           | 1,60                      | Не определено               | +1092,3                           | 86                           | 4                              |

<sup>a</sup>Все реакции конъюгирования с CP2-NNAА проводили при показателе pH 5,5, 20% DMSO, 22°C и 3 мг/мл mAb.

<sup>b</sup>Использованное молярное соотношение AZ1508:CP2-диен равнялось 2,5:1.

<sup>c</sup>Определяли по площадям пиков кривых в SEC.

<sup>d</sup>DAR = соотношение лекарственное средство и антитело.

<sup>e</sup>Рассчитывали по интенсивностям пиков масс-спектров восстановленного образца.

<sup>f</sup>Определяли по площадям пиков с последующим анализом интактных ADC.

<sup>g</sup>Определяли по масс-спектрам восстановленного образца.

<sup>h</sup>Определяли в клетках PC3, положительных по рецептору EphA2.

CP2-NNAА встраивали в три положения в антителе 1C1 и подтверждали реакционную способность в отношении AZ1508. Следует отметить, что CP2-NNAА встраивали в каждое положение в отдельных антителах. ADC, полученные с mAb CP2-NNAА, были высокого качества, с >95% конъюгирования и содержали незначительное количество агрегатов. Полученные ADC CP2-NNAА AZ1508 были активными по отношению к клеткам PC3, положительным по рецептору.

Сравнение ADC CP2-NNAА с соответствующими антителами, сконструированными с цистеинами, показало, что положение N297 поддается мутации с CP2-NNAА, но не цистеином. Введение цистеина в данное положение привело к дисульфидному скремблированию в ходе процесса конъюгирования, что подтвердили результатами

SDS-PAGE. В случае ADC N297CP2-NNAА дисульфидное скремблирование отсутствовало. Это демонстрирует, что CP2-NNAА можно вводить в положения, не подходящие для встраивания цистеина, при этом цистеины могут воздействовать на нативные дисульфиды в каркасе антитела.

### **Пример 17. Стабильность ADC CP1-NNAА и CP2-NNAА AZ1508 в сыворотках крови крыс и мышей**

Оценивали стабильность в сыворотке крови ADC на основе AZ1508, полученных путем конъюгирования по Дильсу-Альдеру. Стабильность ADC оценивали по отношению к химической связи между антителом и полезной нагрузкой (т. е. по отношению к продукту присоединения по реакции Дильса-Альдера). Также для сравнения представлена стабильность аналогичных цистеин-связанных (тиосукцинимидных) ADC.

*Способ:* ADC 1C1 AZ1508 инкубировали в сыворотке крови мышей или сыворотке крови крыс *ex vivo* в течение 7 дн. при 37°C, выделяли посредством иммунозахвата и проводили анализ посредством масс-спектрометрии, как это описано в примере 7. Относительные количества конъюгированного и неконъюгированного антител определяли по высоте пиков масс-спектров, как это описано в примере 7. В случае образцов, инкубированных в сыворотке крови мышей, выявляли деацетилирование AZ1508. Для расчета DAR деацетилированный AZ1508 расценивали как конъюгированный фрагмент.

**Фигура 17.1.** Репрезентативные данные масс-спектров восстановленных гликозилированных образцов ADC 1C1 CP2-NNAА и 1C1 цистеин-AZ1508 до и после инкубации в сыворотке крови крыс. Природные аминокислоты подвергли мутации в CP2-NNAА или цистеин, как указано, (А) в положении S239, (В) в положении K274, (С) в положении N297. Указаны неконъюгированные и конъюгированные фрагменты.

**Фигура 17.2.** Количественные показатели остаточного AZ1508, присоединенного к CP2-NNAА или к антителам, сконструированным с цистеином, после инкубации в сыворотке крови крысы в течение 7 дн. при 37°C. Соотношения лекарственное средство:антитело (DAR) рассчитывали на основе масс-спектров восстановленных гликозилированных образцов. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение, n=3.

**Фигура 17.3.** Количественные показатели остаточного AZ1508, присоединенного к CP2-NNAА или к антителам, сконструированным с цистеином, после инкубации в сыворотке крови мышей в течение 7 дн. при 37°C. Соотношения лекарственное средство:антитело (DAR) рассчитывали на основе масс-спектров восстановленных

гликозилированных образцов. В случае проведения анализа деацетилированный AZ1508 расценивали как конъюгированный фрагмент. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение,  $n=3$ .

**Фигура 17.4.** Количественные показатели остаточного AZ1508, присоединенного к антителам с CP1-NNAA, после инкубации в сыворотке крови крыс в течение 7 дн. при 37°C. Соотношения лекарственное средство:антитело (DAR) рассчитывали на основе масс-спектров восстановленных гликозилированных образцов. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение,  $n=3$ .

С помощью анализа ADC 1C1 CP2-NNAA AZ1508 после инкубации в сыворотке крови мышей или крыс в течение 7 дн. при 37°C показали, что продукт присоединения по реакции Дильса-Альдера стабилен, поскольку потери лекарственного средства не выявили. Полученный 1C1 CP1-NNAA AZ1508 с модификацией в положении K274 также не продемонстрировал потери лекарственного средства после инкубации в сыворотке крови крыс в течение 7 дн. при 37°C, однако наблюдали значительную потерю лекарственного средства в случае аналогичных цистеин-связанных ADC, подвергнутых тем же условиям. Стабильность цистеин-связанного ADC зависела от положения, при этом конъюгат с модификацией в положении S239 был стабильным, а с модификацией в положении K274 и N297 был не стабильным. В случае цистеин-связанных ADC AZ1508 связывался с антителом посредством тиосукцинимидной связи, которая может подвергаться ретро-реакции деконъюгирования Михаэля, что приводит к потере лекарственного средства. На этот процесс в большей степени воздействуют открытые наружу положения, чем скрытые положения, в результате чего наблюдается зависимость от положения стабильность цистеин-связанных ADC. Что же касается продуктов присоединения по реакции Дильса-Альдера, и CP1-, и CP2-диенов, то они были стабильными в положениях, которые нестабильны в случае конъюгатов с тиосукцинимидной связью. Таким образом, в плане стабильности конъюгата реакция конъюгирования по Дильсу-Альдеру с циклопентадиен-NNAA демонстрирует преимущество перед стратегиями конъюгирования на основе тиолов.

#### **Пример 18. Кинетические параметры реакции mAb 1C1, содержащего CP1-NNAA или CP2-NNAA, с AZ1508**

Реакционную способность соединения диеновая группа-NNAA оценивали после встраивания в положения S239, K274 или N297 в каркас антитела 1C1.

*Способы:* проводили реакцию антител 1C1 CP1-NNAA или CP2-NNAA (3 мг, 1,3 мг/мл mAb, 17,4 мкМ диена, 1 эквивалент) с AZ1508 (4 мкл 10 мМ исходного раствора в DMSO, 40 нмоль, 1 эквивалент) в 0,1 М фосфата натрия, 0,15 М NaCl, 20% DMSO, pH

5,5, 22°C. Аликвоты (100 мкл) отбирали из реакционной смеси в предварительно заданные моменты времени и добавляли N-ацетилцистеин (3 мкл 100 мМ в воде, 8 эквивалентов) после инкубации в течение 15 минут при комнатной температуре для гашения не вступивших в реакцию малеимидов. Затем образцы очищали с использованием устройств PD Spintrap G-25 (GE Healthcare Life Sciences) для удаления низкомолекулярных компонентов из смеси, а затем проводили анализ с помощью масс-спектрометрии восстановленных гликозилированных образцов. Процедуры масс-спектрометрического анализа и расчеты кинетических констант скорости реакции описаны в примерах 5 и 10.

**Фигура 18.1.** Кинетические параметры конъюгирования mAb 1C1 CP1-NNAА и mAb 1C1 CP2-NNAА с AZ1508, измеренные с помощью масс-спектрометрии восстановленного гликозилированного образца. Данные нанесены на график в виде среднего  $\pm$  абсолютная погрешность, n=2, 1C1 K274CP1-NNAА, 1C1 K274CP2-NNAА и 1C1 N297CP2-NNAА, и среднего  $\pm$  стандартное отклонение, n=3, для 1C1 S239CP2-NNAА.

**Фигура 18.2.** График зависимости обратной концентрации от времени, показывающий расход диенов в ходе реакции mAb CP1-NNAА и CP2-NNAА с AZ1508. (А) mAb 1C1 K274CP1-NNAА, (В) mAb 1C1 S239CP2, mAb 1C1 K274CP2-NNAА и mAb N297CP2-NNAА. Данные нанесены на график в виде среднего  $\pm$  абсолютная погрешность, n=2, 1C1 K274CP1-NNAА, 1C1 K274CP2-NNAА и 1C1 N297CP2-NNAА, и среднего  $\pm$  стандартное отклонение, n=3, для 1C1 S239CP2-NNAА.

**Таблица 18.1.** Краткое изложение данных кинетических параметров реакции mAb 1C1 CP1-NNAА и mAb CP2-NNAА с AZ1508.<sup>a,b,c</sup>

| Положение | Мутация  | $k_2$<br>( $M^{-1}c^{-1}$ ) | $R^2$ <sup>d</sup> | $T_{1/2}$ (мин) <sup>e</sup> |
|-----------|----------|-----------------------------|--------------------|------------------------------|
| K274      | CP1-NNAА | 73,2 $\pm$ 6,9 <sup>b</sup> | 0,99               | 12 $\pm$ 1                   |
| S239      | CP2-NNAА | 2,6 $\pm$ 0,5 <sup>c</sup>  | 0,99               | 383 $\pm$ 84                 |
| K274      | CP2-NNAА | 1,8 $\pm$ 0,4 <sup>c</sup>  | 0,99               | 545 $\pm$ 108                |
| N297      | CP2-NNAА | 5,4 $\pm$ 1,1 <sup>c</sup>  | 0,99               | 183 $\pm$ 41                 |

<sup>a</sup>Все реакции конъюгирования проводили в PBS с добавлением 100 мМ одноосновного фосфата натрия, 20% DMSO, pH 5,5.

<sup>b</sup>Использованное молярное соотношение AZ1508:CP1-NNAА или CP2-NNAА-диена равнялось 1:1. Концентрация mAb составляла 1,3 мг/мл (17,3 мкМ диена) для всех реакций.

<sup>c</sup>Реакцию диена контролировали с использованием масс-спектрометрии восстановленного гликозилированного образца.

<sup>d</sup>определяли по линии наилучшего приближения графика зависимости обратной концентрации диена (M) от времени (с).

<sup>e</sup>рассчитывали с использованием уравнения периода полупревращения, показанного в примерах 5 и 10.

Проводили реакцию с антителами, несущими CP1-NNAA или CP2-NNAA, с малеимид-содержащим лекарственным средством-линкером AZ1508 при молярном эквиваленте диен:малеимид, составляющем 1:1. Периоды полупревращения в реакциях составили 12 минут для mAb CP1-NNAA и 3-10 часов для mAb CP2-NNAA. Конечные превращения, достигнутые после 48 ч. периода измерения, варьировали от 87 до 100%.

### **Пример 19. Противоопухолевая активность ADC, полученных с использованием mAb CP2-NNAA и AZ1508.**

ADC, полученные с использованием 1C1 CP2-NNAA и конструкции лекарственное средство AZ1508-линкер, оценивали в отношении их способности к ингибированию опухолевого роста у мышей с ксенотрансплантатами PC3.

*Получение ADC:* ADC получали с использованием mAb 1C1 таким образом, как это описано в примере 16. Несвязывающие EphA2 ADC получали с использованием изотипического контрольного антитела (названного R347). CP2-NNAA встраивали в положения S239 и N297 в mAb 1C1 и положение S239 в mAb R347.

*Способы in vivo:* исследования ингибирования опухолевого роста проводили в Charles River Discovery Services, Северная Каролина (CR Discovery Services), руководствуясь рекомендациям из *Наставления по уходу за лабораторными животными и их использованию* относительно содержания, разведения, проведения хирургических процедур, контроля кормления и выпаивания и предоставления ветеринарной помощи. Ксенотрансплантатные опухолевые модели PC3 создавали у мышей путем инокуляции клеток PC3 (10 миллионов клеток в 50% Matrigel) подкожно самкам безтимусных мышей 8-9 недельного возраста. Через семнадцать дней в день, обозначенный как день 1 исследования, когда объемы опухолей достигли  $\sim 150-200 \text{ мм}^3$ , мышей произвольным образом распределяли в группы по 8 мышей на группу. В день 1 исследования начали введение, и ADC вводили по 3 мг/кг посредством инъекции в хвостовую вену. ADC вводили один раз в неделю по 3 мг/кг в течение трех недель, при этом всего ввели три дозы. Затем размеры опухолей (продольная ось и поперечная ось) измеряли два раза в неделю с помощью штангенциркуля. Объем опухоли рассчитывали с использованием уравнения из примера 14.

Фигура 19.1. Ингибирование опухолевого роста у мышей с ксенотрансплантатами PC3 после введения ADC CP2-NNAA AZ1508. Целевые ADC mAb 1C1 получали с использованием соединения CP2-NNAA, встроенного в положение S239 или N297, тогда как нецелевой ADC на основе изотипического контрольного mAb R347 получали путем встраивания CP2 в положение S239 ADC вводили внутривенно по 3 мг/кг в дни 0, 7 и 14 (указано стрелками). Данные представлены в виде среднее  $\pm$  стандартное отклонение, N=8.

ADC 1C1 CP2-NNAA AZ1508 являлись эффективными в ингибировании опухолевого роста в EphA2-положительной опухолевой мышечной модели, полученной с использованием ксенотрансплантата PC3, в течение по меньшей мере 60 дней после первой инъекции ADC. Нецелевой ADC, полученный с использованием несвязывающего mAb R347, был не таким эффективным, как целевые ADC.

#### Пример 20. Конъюгирование антитела, содержащего CP1-NNAA, с малеимид-функционализированными наночастицами

Проводили реакцию антитела 1C1 K274CP1-NNAA с функционализированными малеимидом наночастицами золота размером 60 нм.

*Способ:* малеимид-функционализированные наночастицы золота размером 60 нм получали с использованием коммерческого набора (Sigma Aldrich, кат. № 9009465) согласно инструкции производителя. Сначала лиофилизированный продукт, представляющий собой функционализированные малеимидом наночастицы золота, ресуспендировали в 100 мкл реакционного буфера, поставляемого с набором. Затем готовили растворы антител дикого типа (WT) или K274CP1-NNAA 1C1 в концентрации 0,5 мг/мл в PBS. Раствор наночастиц (10 мкл) и раствор антитела (10 мкл) объединяли и смешивали посредством пипетирования вверх и вниз несколько раз. Реакция конъюгирования длилась в течение 2 ч. при 25°C, после чего проводили анализ светорассеяния с использованием Zetasizer-Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания). Каждую реакцию конъюгирования проводили в трех повторностях.

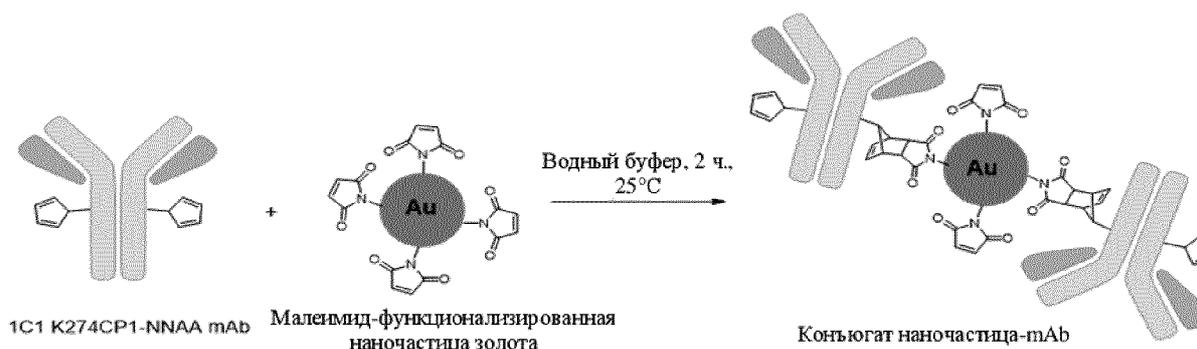


Схема 20.1. Реакция mAb 1C1 K274CP1-NNAА с функционализированными малеимидом наночастицами золота

**Фигура 20.1.** Анализ динамического светорассеяния (DLS) функционализированных малеимидом наночастиц золота размером 60 нм до и после инкубации с антителами 1C1 дикого типа (WT) или 1C1 K274CP1-NNAА (mAb CP1-NNAА) в течение 2 ч. при 25°C.

Таблица 1. Краткое изложение данных по светорассеянию для наночастиц и конъюгатов наночастица-mAb

| Образец <sup>а</sup>                        | Размер (d, нм) <sup>б</sup> | PDI   |
|---------------------------------------------|-----------------------------|-------|
| 60 нм наночастица Au, контрольный образец 1 | 61,5                        | 0,136 |
| 60 нм наночастица Au, контрольный образец 2 | 57,7                        | 0,146 |
| 60 нм наночастица Au, контрольный образец 3 | 60,8                        | 0,112 |
| mAb 1C1 WT, реакционный образец 1           | 63,3                        | 0,102 |
| mAb 1C1 WT, реакционный образец 2           | 59,5                        | 0,115 |
| mAb 1C1 WT, реакционный образец 3           | 59,0                        | 0,121 |
| mAb 1C1 K274CP1-NNAА, реакционный образец 1 | 71,8                        | 0,07  |
| mAb 1C1 K274CP1-NNAА, реакционный образец 2 | 73,4                        | 0,06  |
| mAb 1C1 K274CP1-NNAА, реакционный образец 3 | 70,8                        | 0,08  |

а) Каждый реакционный образец представлял собой независимый эксперимент.

б) Размер представлен как среднечисловой диаметр в нанометрах.

Антитело со встроенным соединением CP1-NNAА конъюгировали с функционализированными малеимидом наночастицами посредством реакции Дильса-Альдера.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ биоконъюгирования, предусматривающий стадию конъюгирования биологической молекулы, содержащей первую ненасыщенную функциональную группу, с полезной нагрузкой, содержащей вторую ненасыщенную функциональную группу, где первая и вторая ненасыщенные функциональные группы комплементарны друг другу, вследствие чего конъюгирование представляет собой реакцию указанных функциональных групп, протекающую по механизму реакции Дильса-Альдера, при которой образуется циклогексеновое кольцо.
2. Способ биоконъюгирования по п. 1, где первая функциональная группа представляет собой диен.
3. Способ биоконъюгирования по п. 2, где вторая функциональная группа представляет собой диенофил, например, малеимид, сложные эфиры малеиновой кислоты, сложные эфиры фумаровой кислоты, сложные эфиры акриловой кислоты, метакриловую кислоту, акрилонитрил, акриламид, метакриламид, метилвинилкетон, амиды и сложные эфиры бут-2-индикарбоновой кислоты, хинон, ацетилены.
4. Способ биоконъюгирования по п. 1, где вторая функциональная группа представляет собой диен.
5. Способ биоконъюгирования по п. 4, где первая функциональная группа представляет собой диенофил, выбранный из сложных эфиров малеиновой кислоты, малеимида, сложных эфиров фумаровой кислоты, сложных эфиров акриловой кислоты, метакриловой кислоты, акрилонитрила, акриламида, метакриламида, метилвинилкетона, амидов и сложных эфиров бут-2-индикарбоновой кислоты, хинона, ацетиленов.

6. Способ биоконъюгирования по п. 3 или п. 5, где диенофил содержится в неприродной аминокислоте, например, в неприродной аминокислоте, содержащей норборнен.
7. Способ биоконъюгирования по любому из пп. 2-6, где диен представляет собой линейные диены, карбоциклический диен или гетероциклический диен.
8. Способ биоконъюгирования по п. 7, где диен предусматривает бутадиен, циклопентадиен, 1,3-циклогексадиен, фуран или антрацен.
9. Способ биоконъюгирования по любому из пп. 2-8, где диен содержится в неприродной аминокислоте.
10. Способ биоконъюгирования по п. 9, где диен представляет собой неприродную аминокислоту, полученную из лизина, цистеина, селеноцистеина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, серина, треонина и тирозина.
11. Способ биоконъюгирования по п. 8 или п. 9, где диен расположен в боковой цепи аминокислоты.
12. Способ биоконъюгирования по любому из пп. 8-10, где неприродная аминокислота имеет формулу (I):



где:

$\mathbf{R^X}$  представляет собой ненасыщенную группу, выбранную из:

iv) линейного конъюгированного  $\mathbf{C_{4-9}}$ диена,

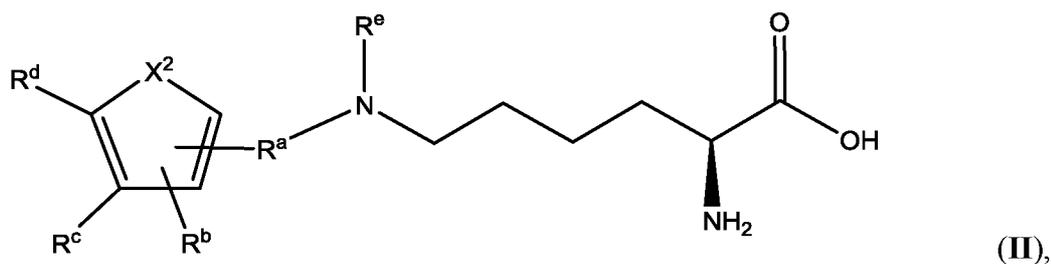
- v)  $C_{5-14}$ карбоциклила, содержащего конъюгированный диен, и
- vi) 5-14-членного гетероциклила, содержащего 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S, и конъюгированного диена, где i), ii) и iii) могут нести не более пяти заместителей (как например, один, два или три заместителя), например, заместителей, независимо выбранных из  $C_{1-3}$ алкила, оксо, галогена, сульфо, сульфгидрила, амино,  $-C_{1-3}$ алкилен $N_3$  или  $-C_{2-5}$ алкинила; и; и

**X<sup>1</sup>** представляет собой

- i) насыщенную или ненасыщенную, разветвленную или неразветвленную  $C_{1-8}$ алкиленовую цепь, где по меньшей мере один атом углерода (например, 1, 2 или 3 атома углерода) заменен гетероатомом, выбранным из O, N,  $S(O)_{0-3}$ , где указанная цепь необязательно замещена одной или несколькими группами, независимо выбранными из оксо, галогена, амино,  $-C_{1-3}$ алкилен $N_3$  или  $-C_{2-5}$ алкинила; или
- ii) вместе с атомом углерода из карбоциклила или гетероциклила представляет собой циклопропановое кольцо, связанное с насыщенной или ненасыщенной (в частности, насыщенной), разветвленной или неразветвленной  $C_{1-6}$ алкиленовой цепью, где по меньшей мере один атом углерода (например, 1, 2 или 3 атома углерода) заменен гетероатомом, выбранным из O, N,  $S(O)_{0-3}$ , где указанная цепь необязательно замещена одной или несколькими группами, независимо выбранными из оксо, галогена, амино,  $-C_{1-3}$ алкилен $N_3$  или  $-C_{2-5}$ алкинила, и

$O_{0-1}C(O)$  связана через боковую цепь аминокислоты.

13. Способ биоконъюгирования по п. 12, где заместители независимо выбраны из оксо, галогена, сульфо, сульфгидрила, амино,  $-C_{1-3}$  алкилен $N_3$  или  $-C_{2-5}$ алкинила.
14. Способ биоконъюгирования по п. 12 или п. 13, где неприродная аминокислота представляет собой остаток со структурой согласно формуле (II):



где

$X^2$  представляет собой -C-, -C(R')-, -CH<sub>2</sub> или O;

$R^a$  представляет собой

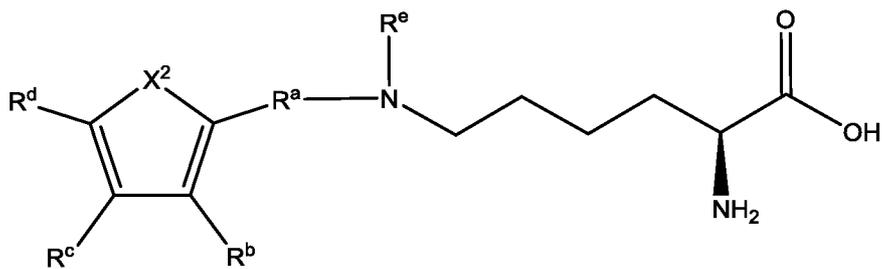
- i) насыщенную или ненасыщенную, разветвленную или неразветвленную C<sub>1-8</sub>алкиленовую цепь, где по меньшей мере один атом углерода (например, 1, 2 или 3 атома углерода) заменен гетероатомом, выбранным из O, N, S(O)<sub>0-3</sub>, где указанная цепь необязательно замещена одной или несколькими группами, независимо выбранными из оксо, галогена, амина; или
- ii) вместе с атомом углерода из 5-членного кольца, представленного в формуле (II), представляет собой циклопропановое кольцо, связанное с насыщенной или ненасыщенной, разветвленной или неразветвленной C<sub>1-6</sub>алкиленовой цепью, где по меньшей мере один атом углерода (например, 1, 2 или 3 атома углерода) заменен гетероатомом, выбранным из O, N, S(O)<sub>0-3</sub>, где указанная цепь необязательно замещена одной или несколькими группами (например, 1, 2 или 3), независимо выбранными из оксо, галогена, амина;

$R^b$  представляет собой H, -OC<sub>1-3</sub>алкил, C<sub>1-6</sub>алкил, необязательно несущий гидроксильный заместитель, -C<sub>1-3</sub>алкиленN<sub>3</sub> или -C<sub>2-5</sub>алкинил;

$R^c$  представляет собой H, -OC<sub>1-3</sub>алкил, C<sub>1-6</sub>алкил, необязательно несущий гидроксильный заместитель, -C<sub>1-3</sub>алкиленN<sub>3</sub>, или -C<sub>2-5</sub>алкинил;

- R<sup>d</sup>** представляет собой H, -OC<sub>1-3</sub>алкил, C<sub>1-6</sub>алкил, необязательно несущий гидроксильный заместитель, -C<sub>1-3</sub>алкиленN<sub>3</sub> или -C<sub>2-5</sub>алкинил;
- R<sup>e</sup>** представляет собой H, насыщенную или ненасыщенную, разветвленную или неразветвленную C<sub>1-8</sub>алкиленовую цепь, где один или несколько атомов углерода необязательно заменены -O-, и цепь необязательно замещена одним или несколькими атомами галогена (такого как йод), N<sub>3</sub> или -C<sub>2-5</sub>алкинилом.

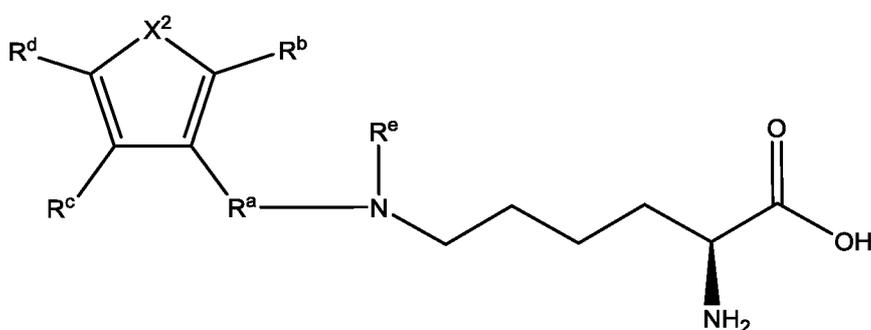
15. Способ биоконъюгирования по п. 14, где **R<sup>a</sup>** представляет собой -CH(CH<sub>2</sub>)CH<sub>2</sub>COC(O)-, -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COC(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CH<sub>2</sub>OC(O)-, -CH(CH<sub>2</sub>)C(O)-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -CH(CH<sub>3</sub>)C(O)-, C<sub>1-6</sub>алкилен (как например, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), и **m** равняется 0 или 1.
16. Способ биоконъюгирования по п. 14 или п. 15, где **R<sup>b</sup>** представляет собой H, -OC<sub>1-3</sub>алкил, -CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub> или -CCH.
17. Способ биоконъюгирования по любому из пп. 14-16, где **R<sup>c</sup>** представляет собой H, -OC<sub>1-3</sub>алкил, -CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub> или -CCH.
18. Способ биоконъюгирования по любому из пп. 14-17, где **R<sup>d</sup>** представляет собой H, -OC<sub>1-3</sub>алкил, -CH<sub>3</sub>, -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>OH, -CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub> или -CCH.
19. Способ биоконъюгирования по любому из пп. 14-18, где **R<sup>e</sup>** представляет собой H или -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>.
20. Способ биоконъюгирования по любому из пп. 14-19, где неприродная аминокислота представляет собой остаток со структурой согласно формуле (**IIa**):



(IIa),

где  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$  и  $X^2$  определены выше.

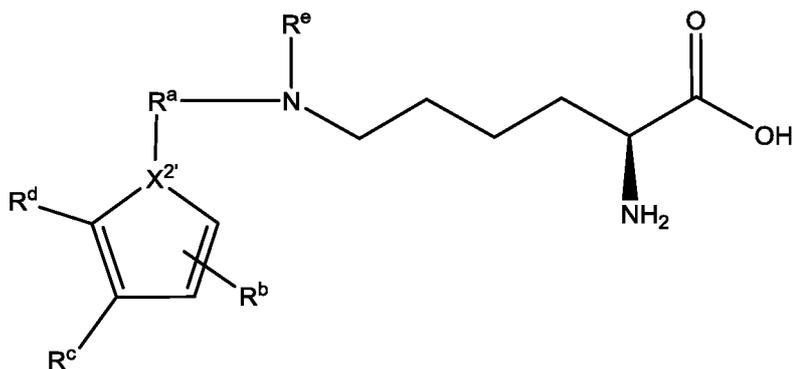
21. Способ биоконъюгирования по любому из пп. 14-19, где неприродная аминокислота имеет структуру согласно формуле (IIb):



(IIb),

где  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$  и  $X^2$  определены выше.

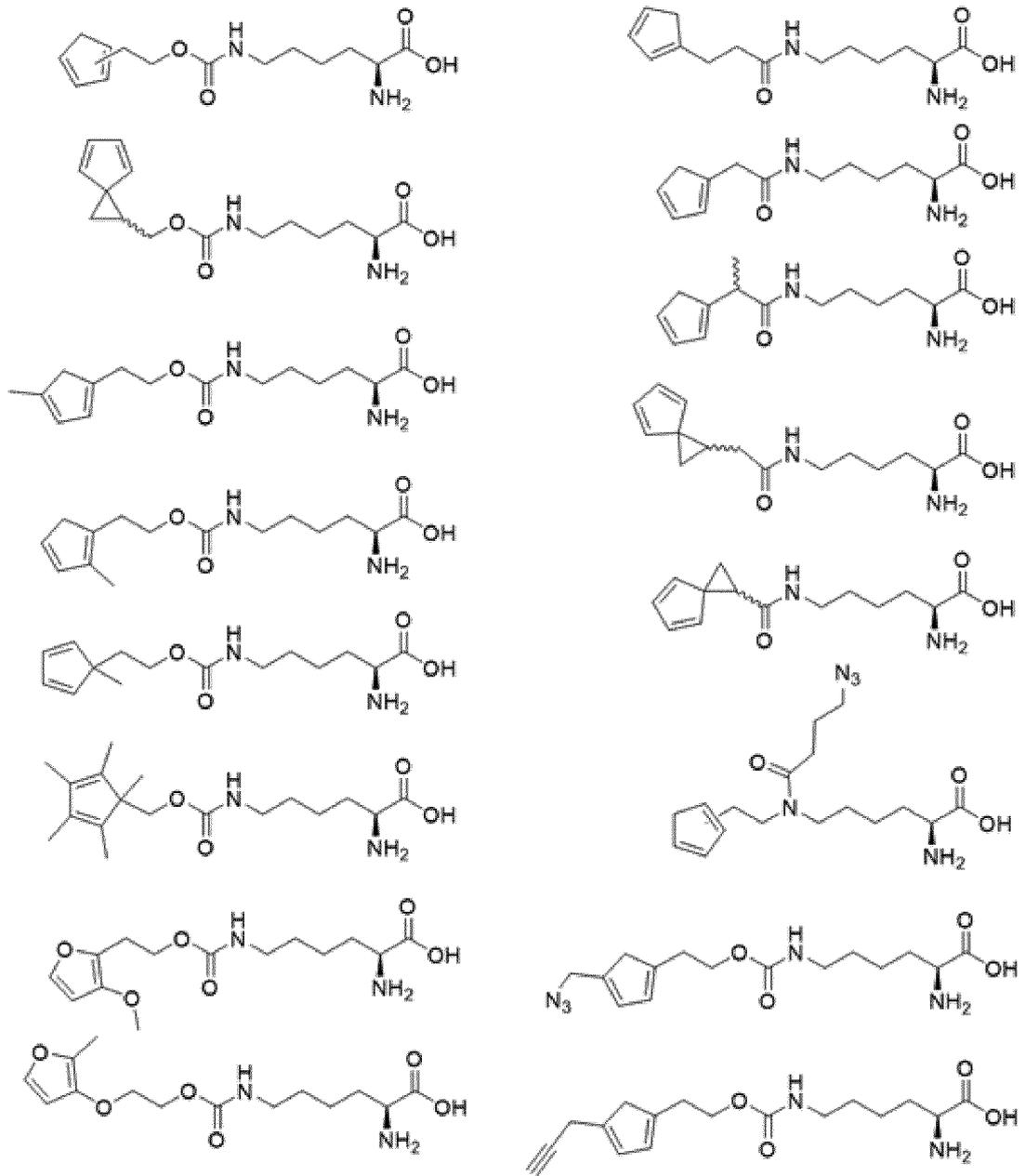
22. Способ биоконъюгирования по любому из пп. 14-19, где неприродная аминокислота имеет структуру согласно формуле (IIc):

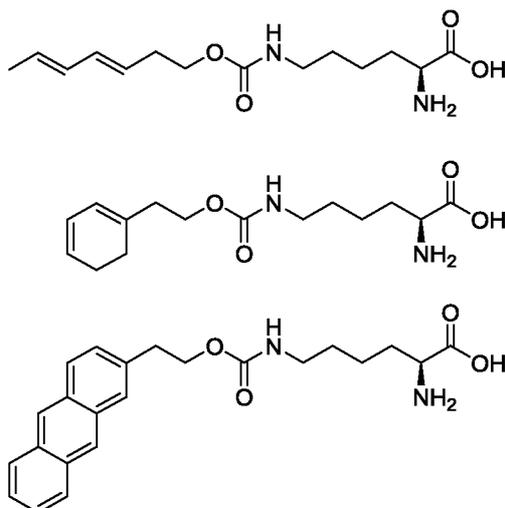


(IIc),

где  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$  определены выше, и  $X^{2'}$  представляет собой  $-C-$  или  $CR^1$ .

23. Способ биоконъюгирования по любому из пп. 9-22, где неприродная аминокислота выбрана из группы, включающей:





24. Способ биоконъюгирования по любому из пп. 1-23, где диенофил представляет собой боковую цепь неприродной аминокислоты.
25. Способ биоконъюгирования по любому из пп. 1-24, где способ предусматривает предварительную стадию конъюгирования диена или диенофила (в частности, диена) посредством линкера с аминокислотным остатком в биологической молекуле.
26. Способ биоконъюгирования по п. 25, где аминокислота представляет собой цистеин или лизин.
27. Реакция биоконъюгирования по п. 25 или п. 26, где диен перед присоединением к указанному аминокислотному остатку в биологической молекуле имеет структуру согласно формуле (III):



или его производное с O- или N-связанным сахарным остатком,

где

**n** равняется 0 или 1;

**m** равняется 0 или 1;

**p** равняется 0 или 1;

**R<sup>x</sup>** представляет собой ненасыщенную группу, выбранную из:

- i) линейного конъюгированного C<sub>4-9</sub>диена,
- ii) C<sub>5-14</sub>карбоциклила, содержащего конъюгированный диен, и
- iii) 5-14-членного гетероциклила, содержащего 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S, и конъюгированного диена,

где i), ii) и iii) могут нести не более пяти заместителей, (как например, один, два или три заместителя), где, например, заместители независимо выбраны из C<sub>1-3</sub>алкила, оксо, галогена, сульфо, сульфгидрила, амина, -C<sub>1-3</sub>алкиленN<sub>3</sub> или -C<sub>2-5</sub>алкинила, и

**B** представляет собой C<sub>1-6</sub>алкилен, -C<sub>3-4</sub>циклоалкилC<sub>1-6</sub>алкилен-; где необязательно остаток сахара (такого как глюкоза, глюкозамин, галактоза, галактозамин, лактоза, манноза и фруктоза) содержится в алкиленовой цепи любого из них, и где алкиленовая цепь в случае любого из указанных вариантов, определенных для B -, необязательно несет один или два заместителя, независимо выбранных из N- и O-связанного остатка сахара (такого как глюкоза, глюкозамин, галактоза, галактозамин, лактоза, манноза и фруктоза);

**X<sup>3</sup>** представляет собой -(R<sup>1</sup>)NC(O)-, -C(O)N(R<sup>1</sup>)-, -OC(O)-, -OC(O)N-;

**R<sup>1</sup>** представляет собой H или -CH<sub>2</sub>OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>R<sup>2</sup>;

**R<sup>2</sup>** представляет собой -N<sub>3</sub>, C<sub>2-5</sub>алкинил или галоген, такой как йод;

**Y** представляет собой -(OCH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>C<sub>2-6</sub>алкилен или -C<sub>2-6</sub>алкилен, необязательно замещенный

-NR<sup>3</sup>R<sup>4</sup>,

где q равняется 1-7000;

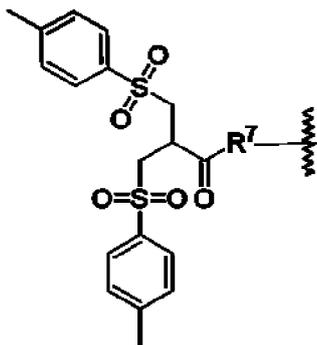
**R<sup>3</sup>** и **R<sup>4</sup>** независимо представляют собой H или C<sub>1-3</sub>алкил;

**Z** представляет собой -C(O)OR<sup>5</sup>, R<sup>5'</sup>, -NC(O)R<sup>6</sup>, -C<sub>2-5</sub>алкилен, CH<sub>2</sub>-O-NH<sub>2</sub>, алкин, азид, 3-арилпропионитрил или галоген, такой как йод;

**R<sup>5</sup>** представляет собой C<sub>1-6</sub>алкил, сукцинимид, C<sub>6</sub>F<sub>4</sub>H (тетрафторфенил) или H;

**R<sup>5'</sup>** представляет собой группу, образующую поперечную связь между атомами серы, например, диброммалеимид, дихлорацетон или производное любого из них,

**R<sup>6</sup>** представляет собой:



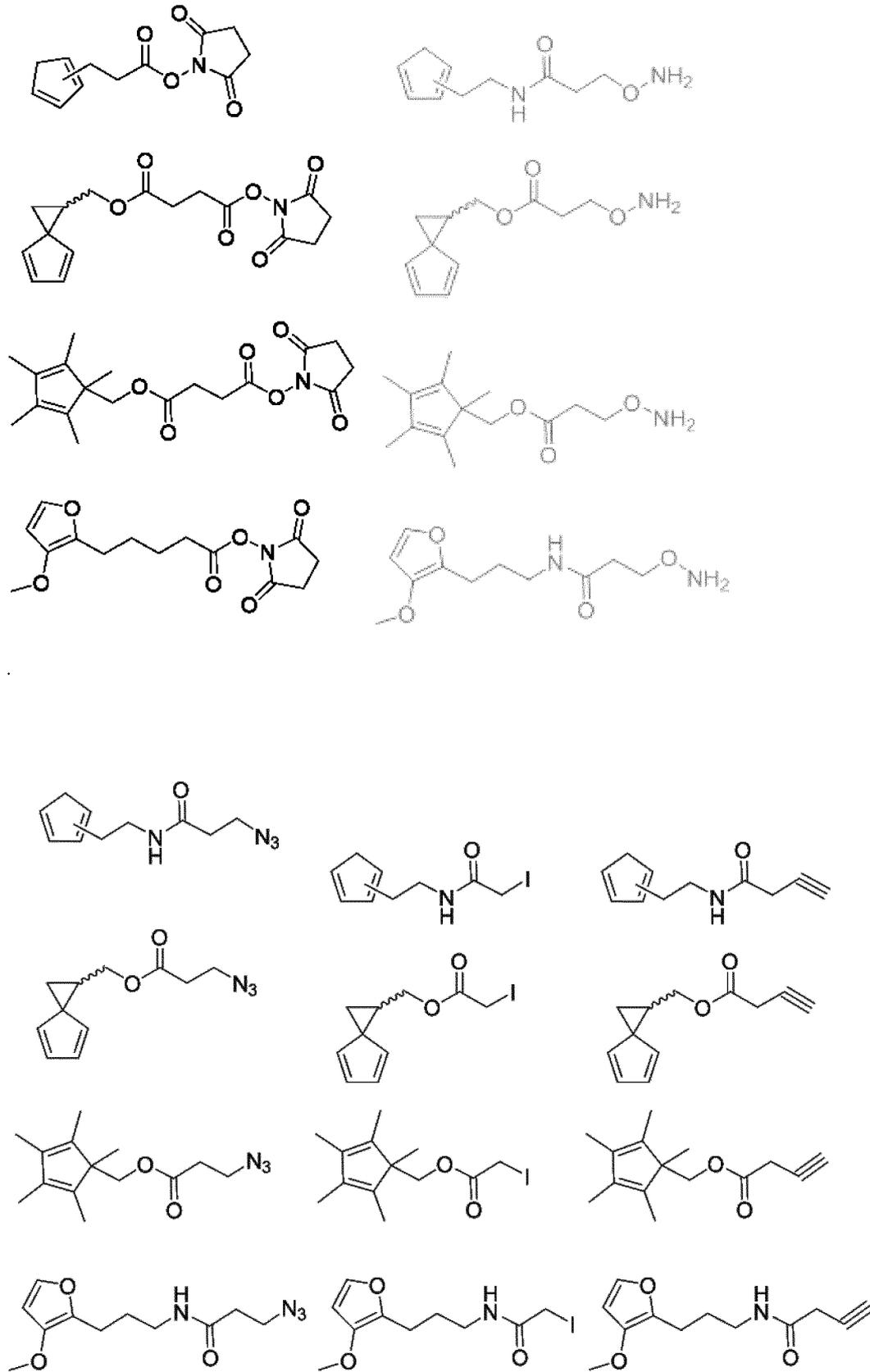
, где

$R^7$  представляет собой  $C_{1-6}$ алкилен, необязательно несущий одну или несколько (например, одну, две или три) групп, выбранных из гидроксильной, сульфогруппы, амино- и  $(OCH_2)_v C_{2-6}$ алкилена, и фенил, необязательно несущий одну или несколько (например, одну, две или три) групп, выбранных из гидроксильной, сульфогруппы, амино- и  $(OCH_2)_v C_{2-6}$ алкилена,

$v$  представляет собой целое число, равное 1, 2, 3, 4 или 5,

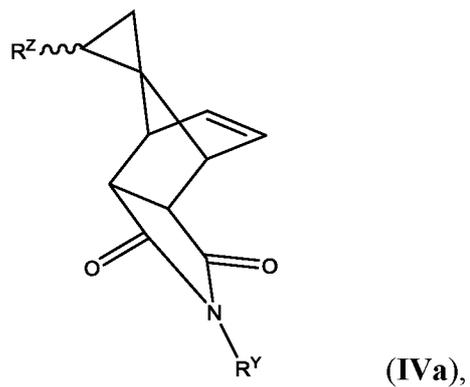
 представляет собой место связывания фрагмента с остальной частью молекулы.

28. Способ биоконъюгирования по любому из пп. 25-27, где диен имеет структуру:



29. Способ биоконъюгирования по любому из пп. 1-28, где реакцию проводят при температуре в диапазоне 10-40°C, например, при температуре окружающей среды.
30. Способ биоконъюгирования по любому из пп. 1-29, где реакцию проводят в водном растворителе, например, в системах на основе водного органического растворителя, в буфере, таком как PBS, необязательно содержащем полярный апротонный растворитель, такой как DMSO, или поверхностно-активное вещество, такое как полисорбат 80, или их комбинации.
31. Способ биоконъюгирования по любому из пп. 1-30, где биологическая молекула представляет собой полипептид.
32. Реакция биоконъюгирования по п. 31, где полипептид выбран из группы, включающей лиганд, рецептор, молекулу антитела.
33. Способ биоконъюгирования по любому из пп. 1-32, где биологическая молекула представляет собой терапевтическую молекулу.
34. Реакция биоконъюгирования по любому из пп. 1-33, где биологическая молекула сконструирована с удалением одного или нескольких остатков лизина из исходной или нативной последовательности.
35. Реакция биоконъюгирования по любому из пп. 1-34, где полезная нагрузка выбрана из:
  - a. ауристатина, например, выбрана из группы, включающей тубулизин или пирролобензодиазепин (PBD), MMAE (монометил-ауристин E), MMAF (монометил-ауристин F), доксорубицин, тубулизин и дуокармицин;

- b. предусматривает майтанзиноид, например, N2'-деацетил-N2'-(3-меркапто-1-оксопропил)-майтанзин (DM1), N2'-деацетил-N2'-(4-меркапто-1-оксопентил)-майтанзин (DM3) и N2'-деацетил-N2'(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)-майтанзин (DM4),
  - c. представляет собой токсин,
  - d. полимера, например, природного полимера, например, крахмала, полимера глутаминовой кислоты, полимера аспарагиновой кислоты, полимера лизина, или альбумина, или синтетического полимера, такого как PEG.
36. Биологическая молекула, конъюгированная с полезной нагрузкой, полученная или получаемая с помощью способа по любому из пп. 1-35.
37. Биологическая молекула, конъюгированная с полезной нагрузкой, где реакция конъюгирования, за счет которой биологическая молекула связывается с полезной нагрузкой, протекает по механизму реакции Дильса-Альдера между диеном и диенофилом с образованием циклогексенового кольца.
38. Биологическая молекула, конъюгированная с полезной нагрузкой, по п. 37, где циклогексеновое кольцо представляет собой часть конденсированной кольцевой системы, например, содержащей не более 20 атомов.
39. Биологическая молекула, конъюгированная с полезной нагрузкой, по п. 38, соответствующая формуле (IVa):

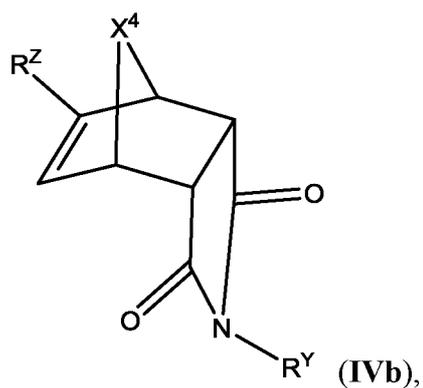


где

$R^Y$  представляет собой полезную нагрузку, и

$R^Z$  представляет собой биологическую молекулу.

40. Биологическая молекула, конъюгированная с полезной нагрузкой, по п. 38, соответствующая формуле (IVb):



где

$R^Y$  представляет собой полезную нагрузку;

$R^Z$  представляет собой биологическую молекулу, и

$X^4$  представляет собой -O- или -CH<sub>2</sub>-.

41. Биологическая молекула, конъюгированная с полезной нагрузкой, по любому из пп. 36-40, где биологическая молекула представляет собой антитело или его связывающий фрагмент.

42. Биологическая молекула, конъюгированная с полезной нагрузкой, по любому из пп. 36-41, где полезная нагрузка выбрана из:
- a. ауристатина, например, выбрана из группы, включающей тубулизин или пирролобензодиазепин (PBD), MMAE (монометил-ауристатин E), MMAF (монометил-ауристатин F), доксорубицин и дуокармицин;
  - b. предусматривает майтанзиноид, например, N2'-деацетил-N2'-(3-меркапто-1-оксопропил)-майтанзин (DM1), N2'-деацетил-N2'-(4-меркапто-1-оксопентил)-майтанзин (DM3) и N2'-деацетил-N2'-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)-майтанзин (DM4),
  - c. представляет собой токсин,
  - d. полимера, например, природного полимера, например, крахмала, полимера глутаминовой кислоты, или альбумина, или синтетического полимера, такого как PEG.
43. Фармацевтическая композиция, содержащая биологическую молекулу, конъюгированную с полезной нагрузкой, по любому из пп. 36-42, и разбавитель, носитель и/или наполнитель.
44. Фармацевтическая композиция по п. 43, где композиция представляет собой состав для парентерального введения.
45. Способ лечения пациента, предусматривающий введение терапевтически эффективного количества биологической молекулы, конъюгированной с полезной нагрузкой, по любому из пп. 36-42, или фармацевтической композиции по п. 43 или п. 44.

46. Биологическая молекула, конъюгированная с полезной нагрузкой, по любому из пп. 36-42 и разбавитель или фармацевтическая композиция по п. 43 или п. 44, предназначенные для применения в лечении.
47. Применение биологической молекулы, конъюгированной с полезной нагрузкой, по любому из пп. 36-42 и разбавителя или фармацевтической композиции по п. 43 или п. 44 с целью изготовления лекарственного препарата.
48. Неприродная аминокислота, содержащая диен или диенофил.
49. Неприродная аминокислота, где диен или диенофил расположен в боковой цепи.
50. Неприродная аминокислота по п. 48 или п. 49, полученная из лизина, аспарагина, глутамина, цистеина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты.
51. Неприродная аминокислота по любому из пп. 48-50, которая имеет формулу (I):



где:

$\mathbf{R^X}$  представляет собой ненасыщенную группу, выбранную из:

- iv) линейного конъюгированного C<sub>4-9</sub>диена,
- v) C<sub>5-14</sub>карбоциклила, содержащего конъюгированный диен, и
- vi) 5-14-членного гетероциклила, содержащего 1, 2 или 3 гетероатома, выбранных из O, N и S, и конъюгированного диена,

где i), ii) и iii) могут нести не более пяти заместителей (как например, один, два или три заместителя), например, заместителей, независимо выбранных из C<sub>1-3</sub>алкила, оксо, галогена, сульфо, сульфгидрила, amino, -C<sub>1-3</sub>алкиленN<sub>3</sub> или -C<sub>2-5</sub>алкинила; и

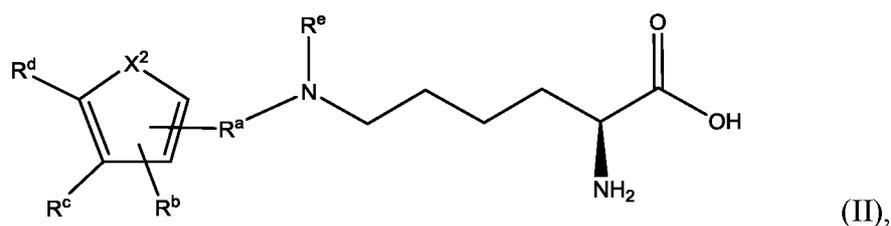
$X^1$  представляет собой

iii) насыщенную или ненасыщенную, разветвленную или неразветвленную  $C_{1-8}$ алкиленовую цепь, где по меньшей мере один атом углерода (например, 1, 2 или 3 атома углерода) заменен гетероатомом, выбранным из O, N, S(O)<sub>0-3</sub>, где указанная цепь необязательно замещена одной или несколькими группами, независимо выбранными из оксо, галогена, амина,  $-C_{1-3}$ алкиленN<sub>3</sub> или  $-C_{2-5}$ алкинила; или

iv) вместе с атомом углерода из карбоциклила или гетероциклила представляет собой циклопропановое кольцо, связанное с насыщенной или ненасыщенной (в частности, насыщенной), разветвленной или неразветвленной  $C_{1-6}$ алкиленовой цепью, где по меньшей мере один атом углерода (например, 1, 2 или 3 атома углерода) заменен гетероатомом, выбранным из O, N, S(O)<sub>0-3</sub>, где указанная цепь необязательно замещена одной или несколькими группами, независимо выбранными из оксо, галогена, амина,  $-C_{1-3}$ алкиленN<sub>3</sub> или  $-C_{2-5}$ алкинила, и

$-O_{0-1}C(O)-$  связана через боковую цепь аминокислоты.

52. Неприродная аминокислота по п. 51, где неприродная аминокислота имеет формулу (II):



или ее соль, где

$X^2$  представляет собой  $-C-$ ,  $-CH_2$  или O;

$R^a$  представляет собой

- i) насыщенную или ненасыщенную, разветвленную или неразветвленную  $C_{1-8}$ алкиленовую цепь, где по меньшей мере один атом углерода (например, 1, 2 или 3 атома углерода) заменен гетероатомом, выбранным из O, N, S(O)<sub>0-3</sub>, где указанная цепь необязательно замещена одной или несколькими группами, независимо выбранными из оксо, галогена, amino; или
- ii) вместе с атомом углерода из 5-членного кольца представляет собой циклопропановое кольцо, связанное с насыщенной или ненасыщенной, разветвленной или неразветвленной  $C_{1-6}$ алкиленовой цепью, где по меньшей мере один атом углерода (например, 1, 2 или 3 атома углерода) заменены гетероатомом, выбранным из O, N, S(O)<sub>p</sub>, где указанная цепь необязательно замещена одной или несколькими группами, независимо выбранными из оксо, галогена, сульфо, сульфгидрила, amino;
- R<sup>b</sup>** представляет собой H, -OC<sub>1-3</sub>алкил, C<sub>1-6</sub>алкил, необязательно несущий гидроксильный заместитель, -C<sub>1-3</sub>алкиленN<sub>3</sub> или -C<sub>2-5</sub>алкинил;
- R<sup>c</sup>** представляет собой H, -OC<sub>1-3</sub>алкил, C<sub>1-6</sub>алкил, необязательно несущий гидроксильный заместитель, -C<sub>1-3</sub>алкиленN<sub>3</sub> или -C<sub>2-5</sub>алкинил;
- R<sup>d</sup>** представляет собой H, -OC<sub>1-3</sub>алкил, C<sub>1-6</sub>алкил, необязательно несущий гидроксильный заместитель, -C<sub>1-3</sub>алкиленN<sub>3</sub> или -C<sub>2-5</sub>алкинил;
- R<sup>e</sup>** представляет собой H, насыщенную или ненасыщенную, разветвленную или неразветвленную  $C_{1-8}$ алкиленовую цепь, где один или несколько атомов углерода необязательно заменены -O-, и цепь необязательно замещена одним или несколькими атомами галогена (такого как йод), N<sub>3</sub> или -C<sub>2-5</sub>алкинилом.

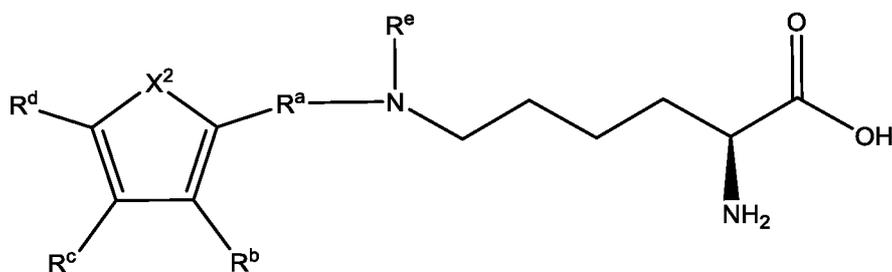
53. Неприродная аминокислота по п. 52, где **R<sup>a</sup>** представляет собой -(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>C(O)-,

$-\text{CH}_2(\text{CH}_3)\text{C}(\text{O})-$ ,  $-(\text{CH}_2)_m\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})-$ ,  $-\text{CHCHCH}_2\text{OC}(\text{O})-$ ,  $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{COC}(\text{O})-$ , и

$m$  равняется 0 или 1.

54. Неприродная аминокислота по п. 52 или п. 53, где  $\mathbf{R}^b$  представляет собой H,  $-\text{OC}_{1-3}$ алкил,  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{N}_3$  или  $-\text{CCH}$ .
55. Неприродная аминокислота по любому из пп. 52-53, где  $\mathbf{R}^c$  представляет собой H,  $-\text{OC}_{1-3}$ алкил,  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{N}_3$  или  $-\text{CCH}$ .
56. Неприродная аминокислота по любому из пп. 52-55, где  $\mathbf{R}^d$  представляет собой H,  $-\text{OC}_{1-3}$ алкил,  $-\text{CH}_3$ ,  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $-\text{CH}_2\text{N}_3$  или  $-\text{CCH}$ .
57. Неприродная аминокислота по любому из пп. 52-56, где  $\mathbf{R}^e$  представляет собой H или  $-\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}_3$ .

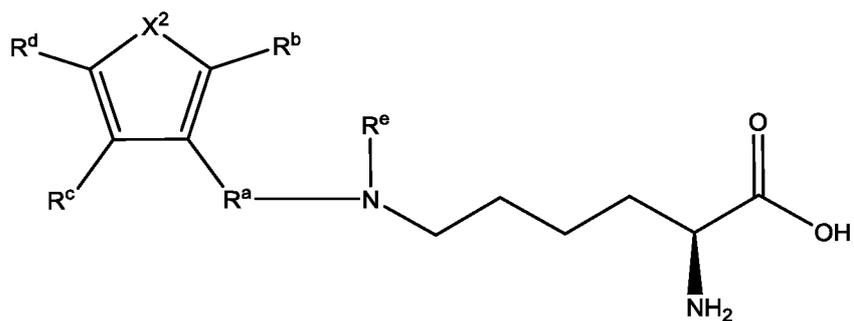
58. Неприродная аминокислота по любому из пп. 52-57, где неприродная аминокислота представляет собой остаток со структурой согласно формуле (IIa):



(IIa),

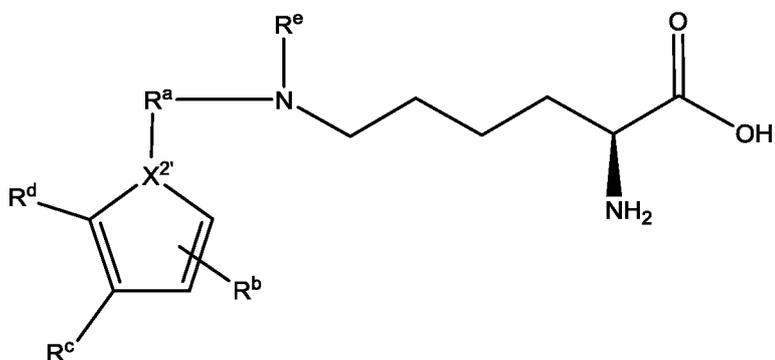
или ее соль, где  $\mathbf{R}^a$ ,  $\mathbf{R}^b$ ,  $\mathbf{R}^c$ ,  $\mathbf{R}^d$ ,  $\mathbf{R}^e$  и  $\mathbf{X}^2$  определены выше для соединений формулы (II).

59. Неприродная аминокислота по любому из пп. 52-58, где неприродная аминокислота имеет структуру согласно формуле (IIb):



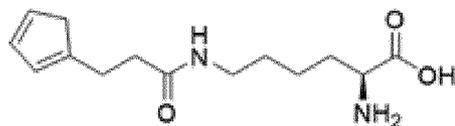
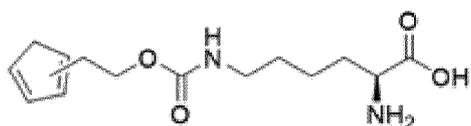
или ее соль, где  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$  и  $X^2$  определены выше для соединений формулы (II).

60. Неприродная аминокислота по любому из пп. 52-58, где неприродная аминокислота имеет структуру согласно формуле (IIc):



или ее соль, где  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^c$ ,  $R^d$ ,  $R^e$  определены выше, и  $X^{2'}$  представляет собой -C- или -CR', как определено выше.

61. Неприродная аминокислота по п. 60, где неприродная аминокислота выбрана из группы, включающей:

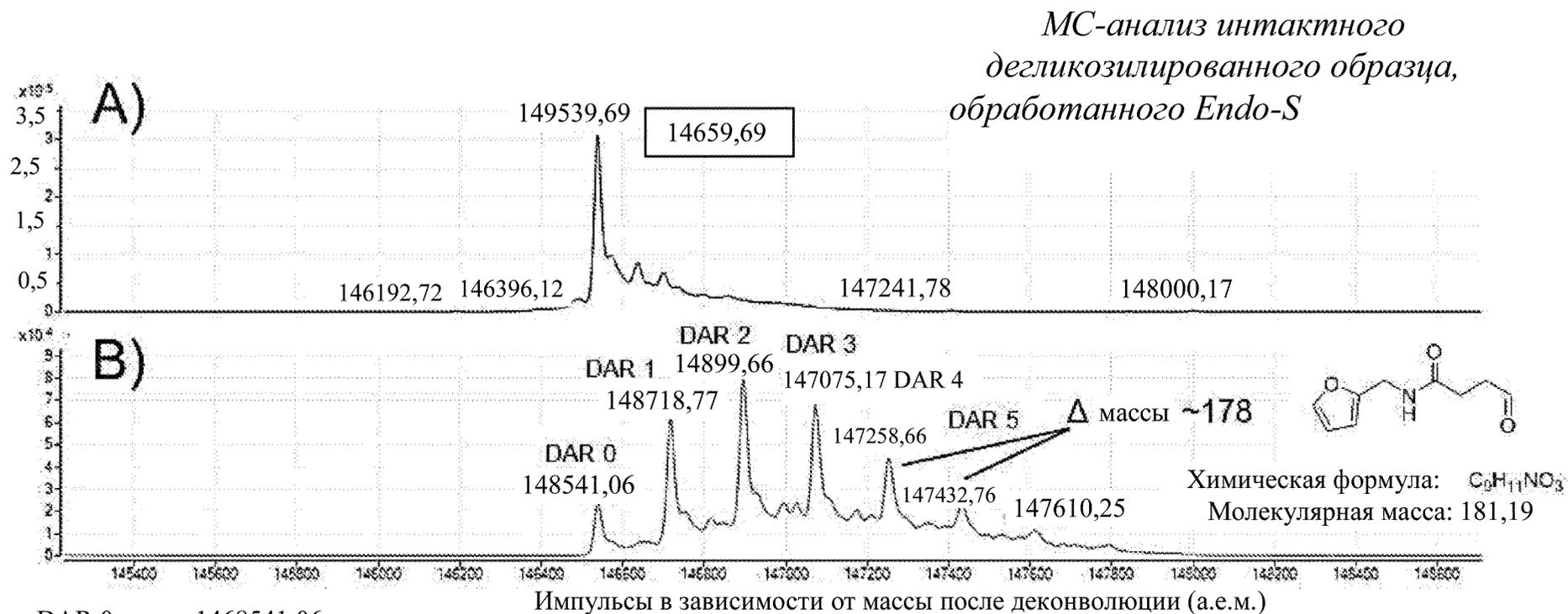




или соль любой из них.

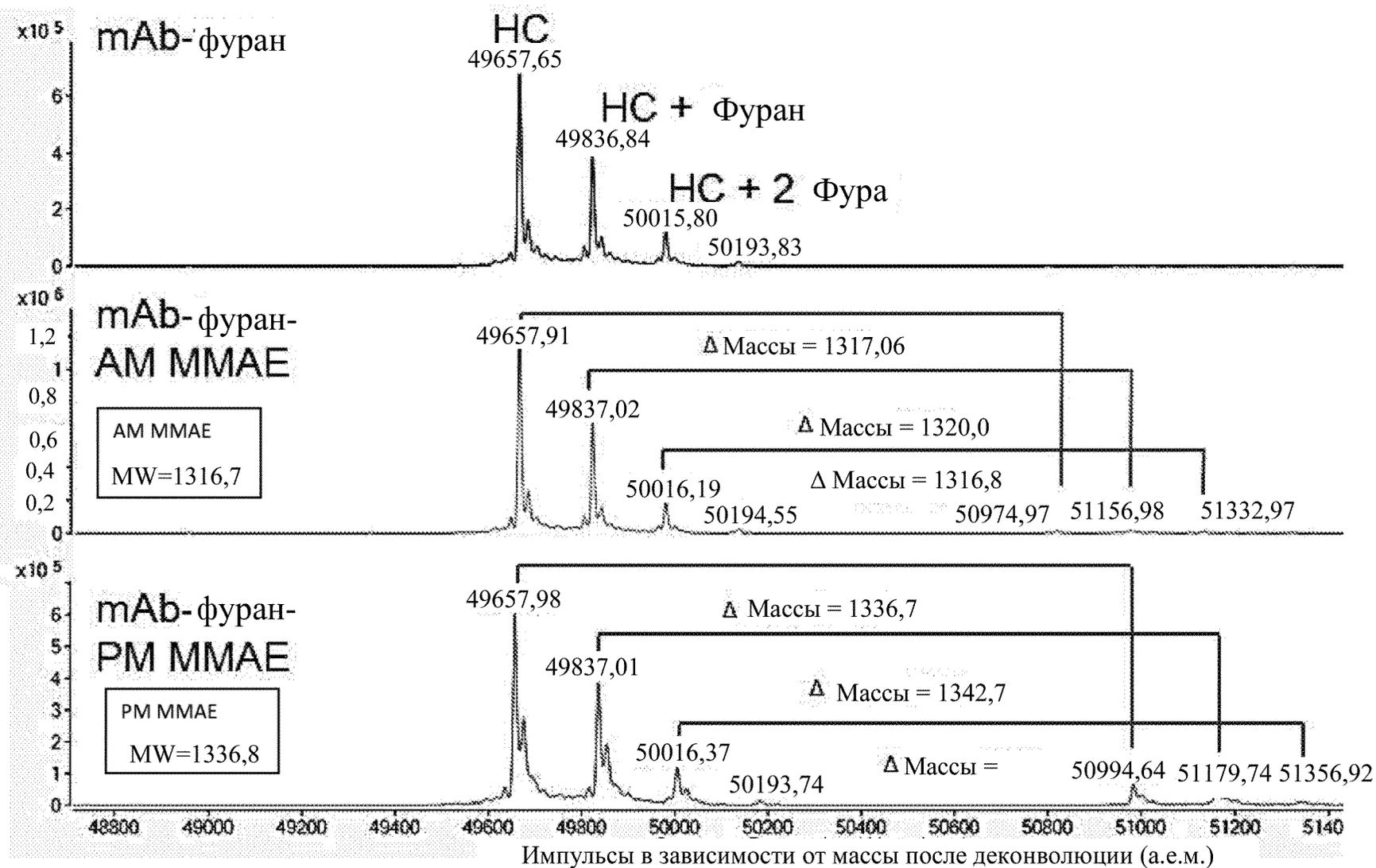
62. Полипептид, содержащий неприродную аминокислоту по любому из пп. 51-61.

Фигура 1.1. Данные масс-спектрометрии интактного дегликозилированного образца до (A) и после (B) реакции mAb с фуран-NHS



|       |            |
|-------|------------|
| DAR 0 | 1468541,06 |
| DAR 1 | 146718,77  |
| DAR 2 | 146897,56  |
| DAR 3 | 147075,17  |
| DAR 4 | 1472856,66 |
| DAR 5 | 147432,76  |

Фигура 1.2. Данные масс-спектров восстановленных дегликозилированных образцов mAb-фуран-линкер после 20 ч. реакции с MMAE

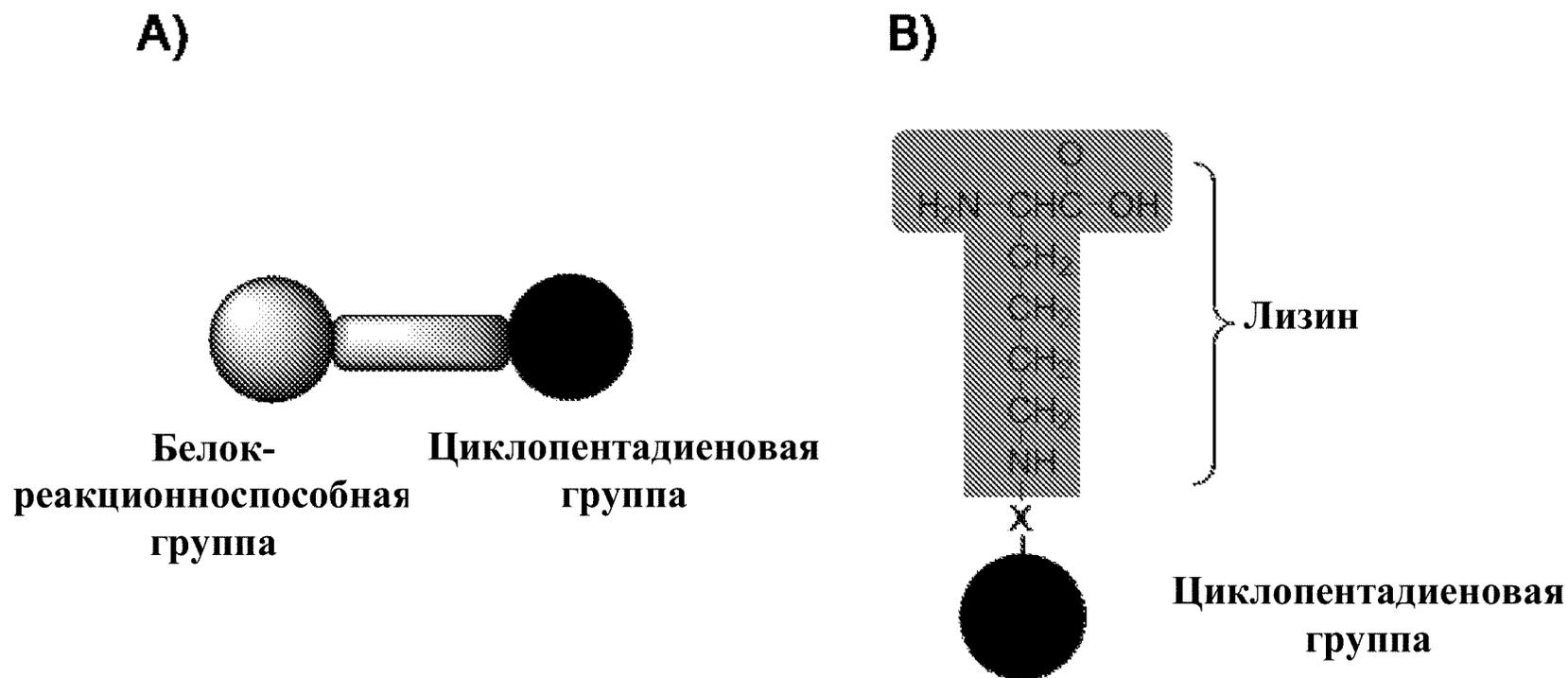


**Фигура 1.3. Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного дегликозилированного продукта реакции mAb-фуран-линкера с аллос-лизиним. Пики, соответствующие предполагаемой массе конъюгата, отсутствовали. Химическая структура аллос-лизина показана под графиком со спектрами**

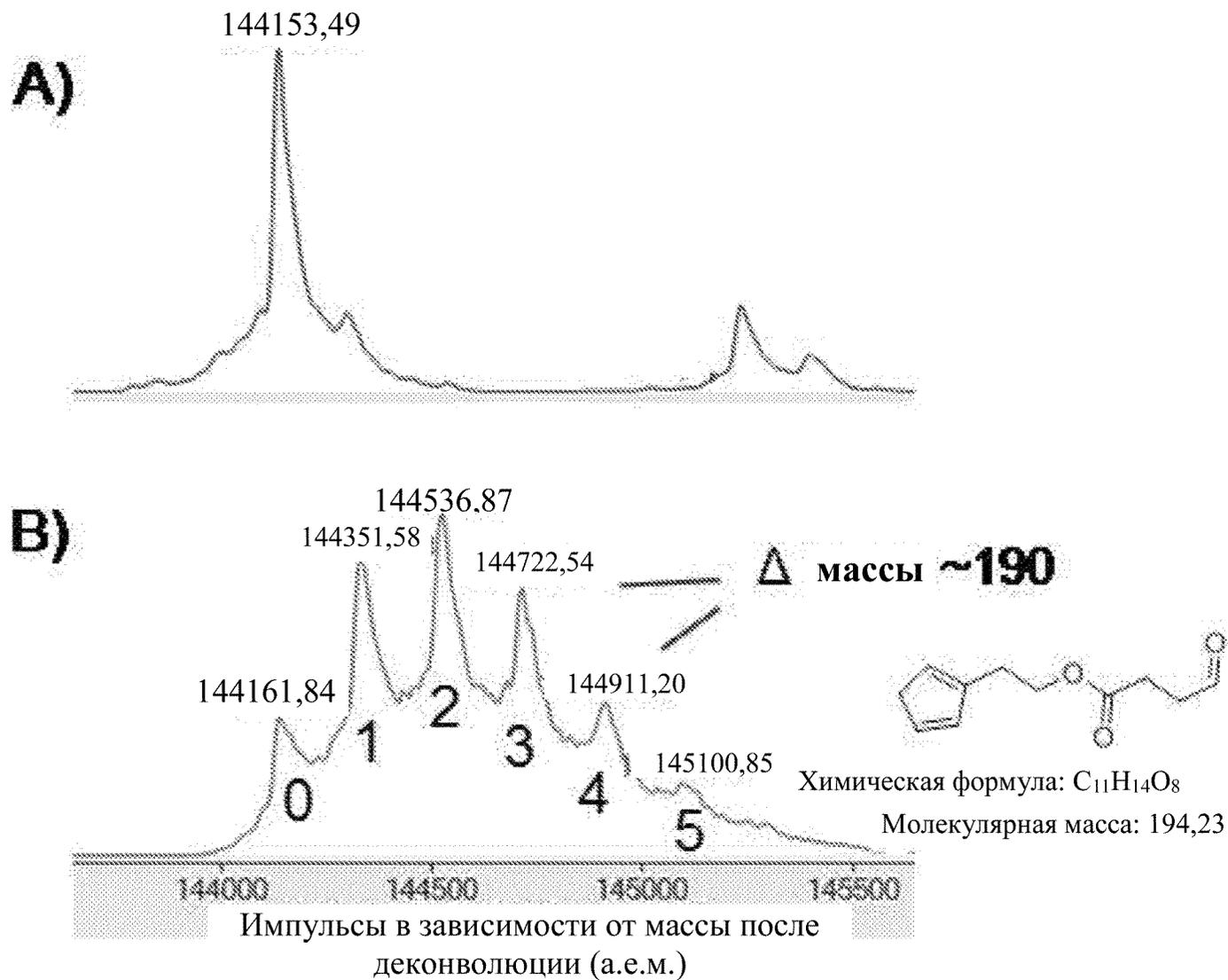


MW = 230,36

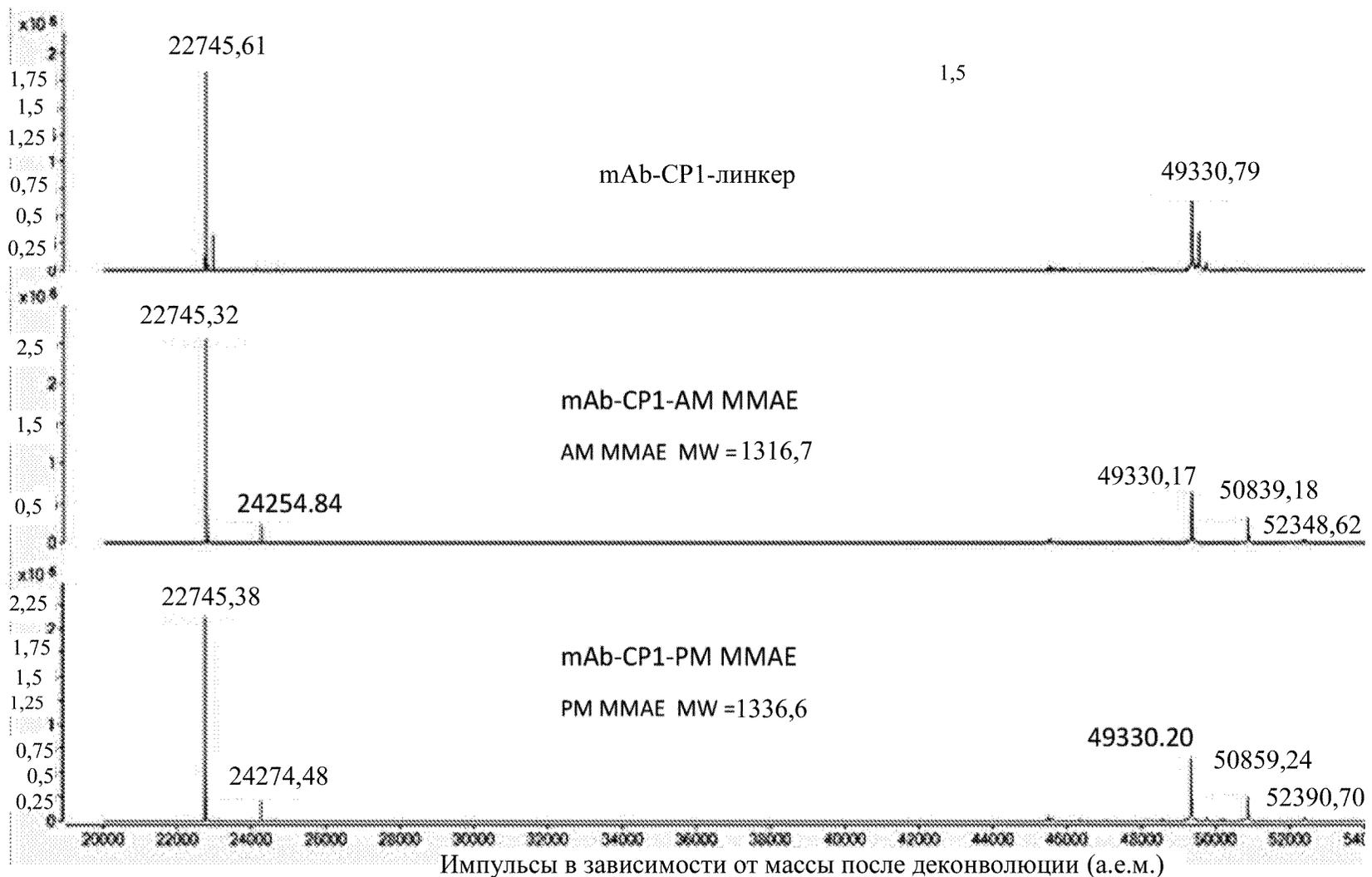
Фигура 2.1. Общая схема конструкции циклопентадиеновых сшивающих средств (А) и NNAА с циклопентадиеновой группой (В), описанная в примере 2



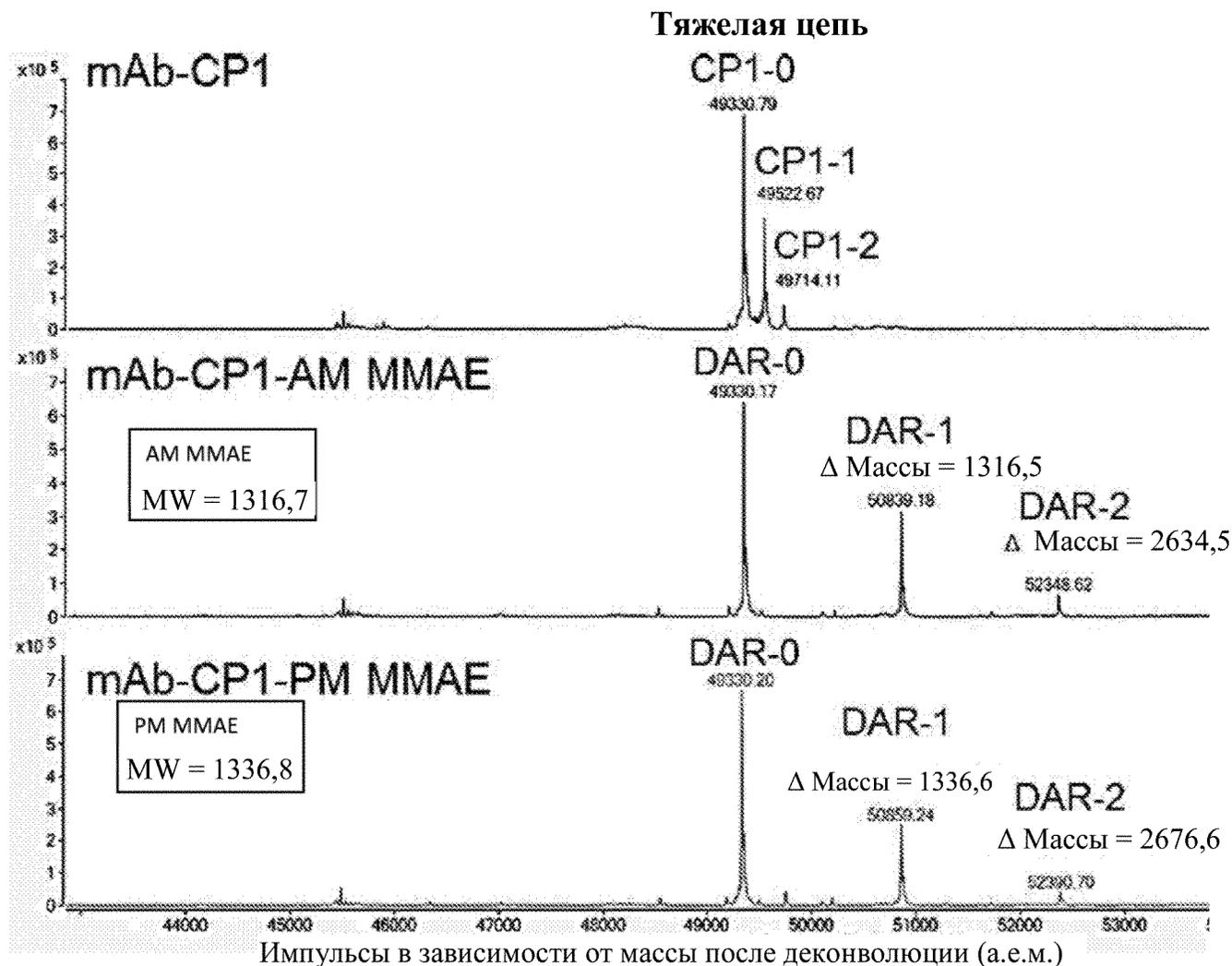
Фигура 3.1. Изображены данные масс-спектрометрии интактного дегликозилированного образца до (А) и после (В) реакции mAb с CP1-NHS



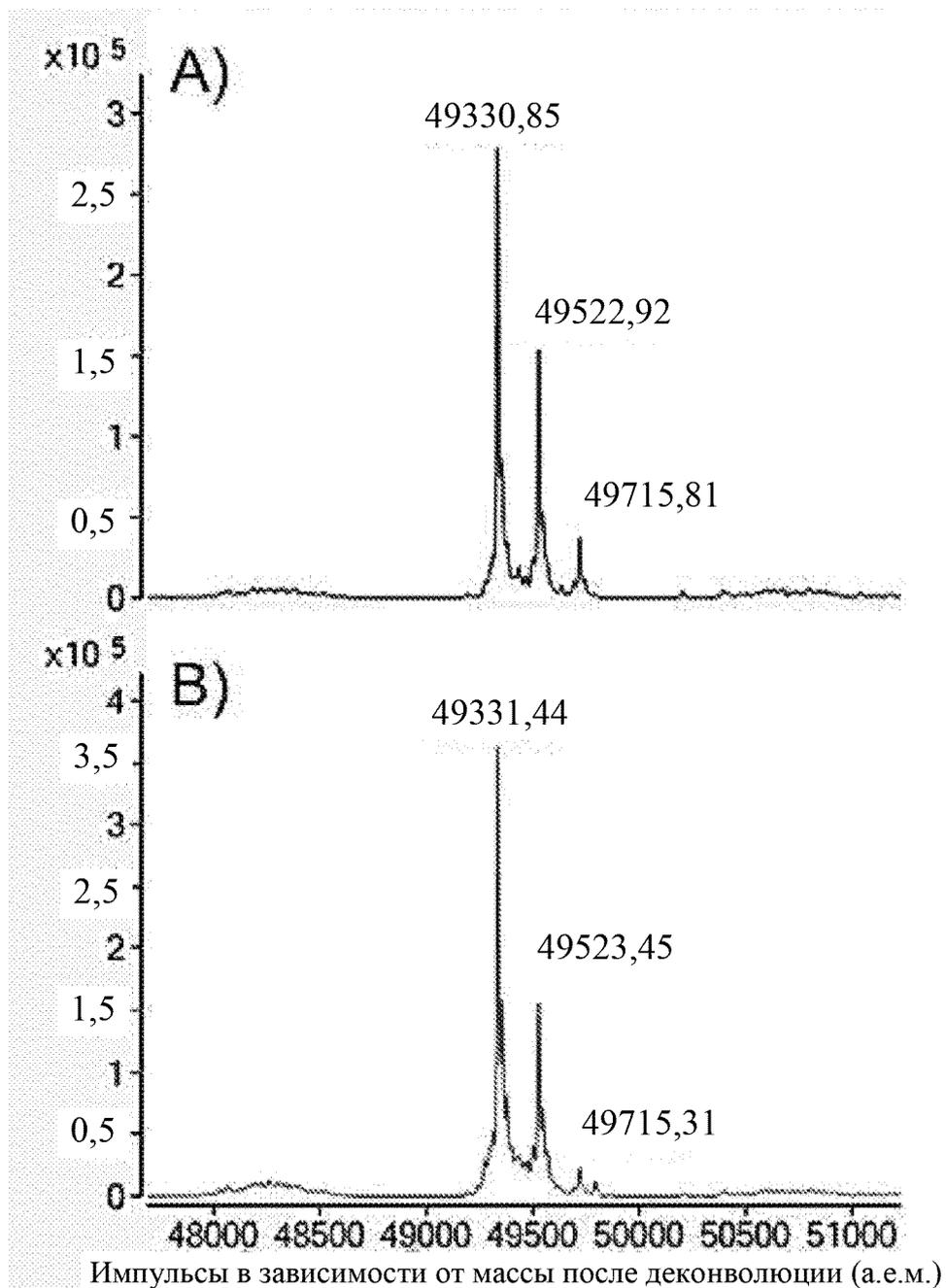
Фигура 3.2. Масс-спектры восстановленных дегликозилированного продукта реакции mAb-CP1-линкер с maleimide-MMAE. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую, и легкую цепи mAb



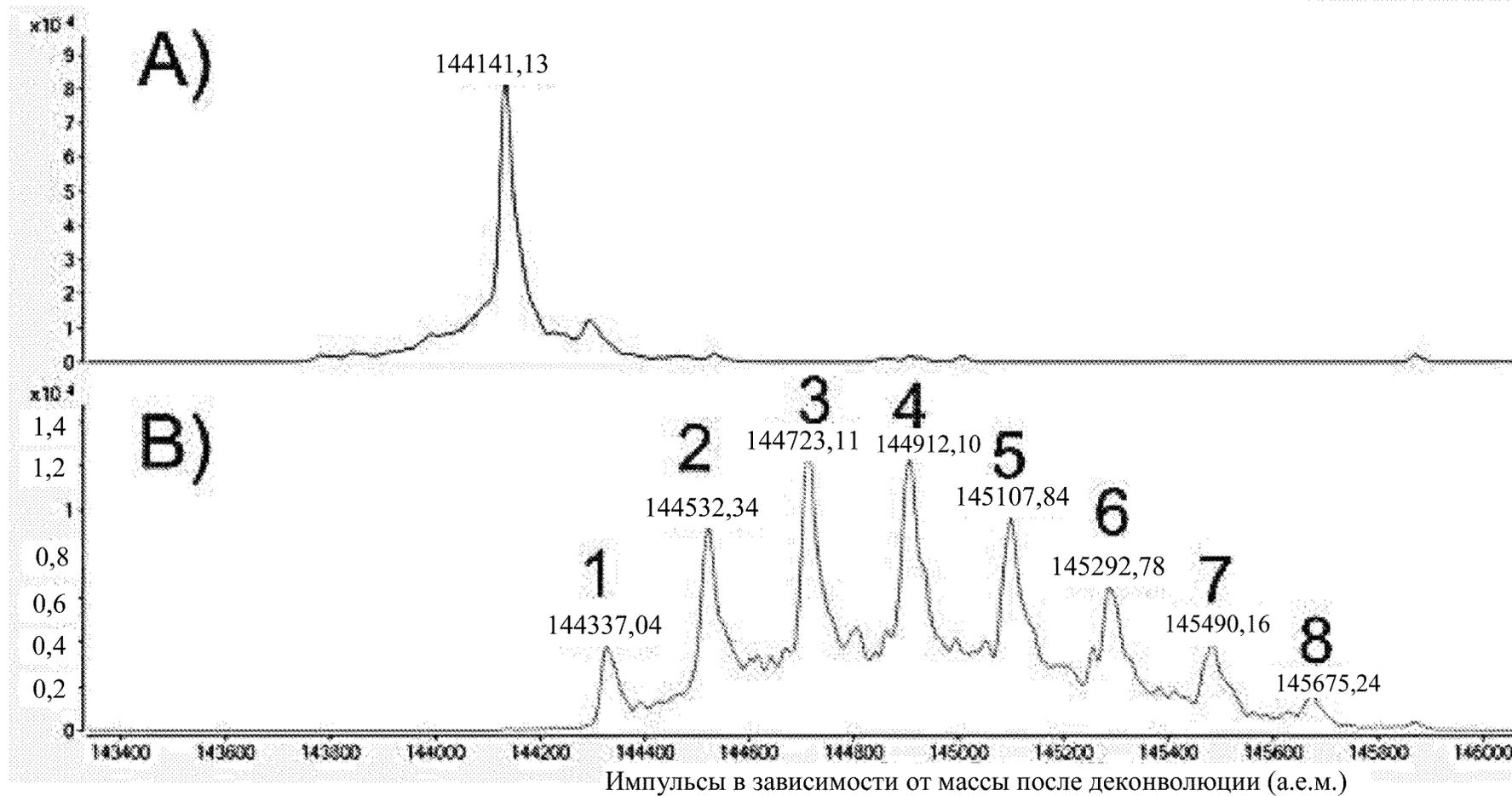
Фигура 3.3. Данные с масс-спектрами для восстановленных дегликозилированных продуктов реакции mAb-CP1-линкера и AM-MMAE, увеличенные для того, чтобы показать участок тяжелой цепи mAb DAR-0 указывает на отсутствие AM-MMAE, конъюгированного с тяжелой цепью mAb, DAR-1 указывает на один AM-MMAE, конъюгированный с тяжелой цепью mAb, и DAR-2 указывает на два AM-MMAE, конъюгированных с тяжелой цепью mAb



Фигура 3.4. Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного дегликозилированного продукта реакции mAb-CP1-линкера с алос-лизином. Пики, соответствующие предполагаемой массе конъюгата, отсутствовали

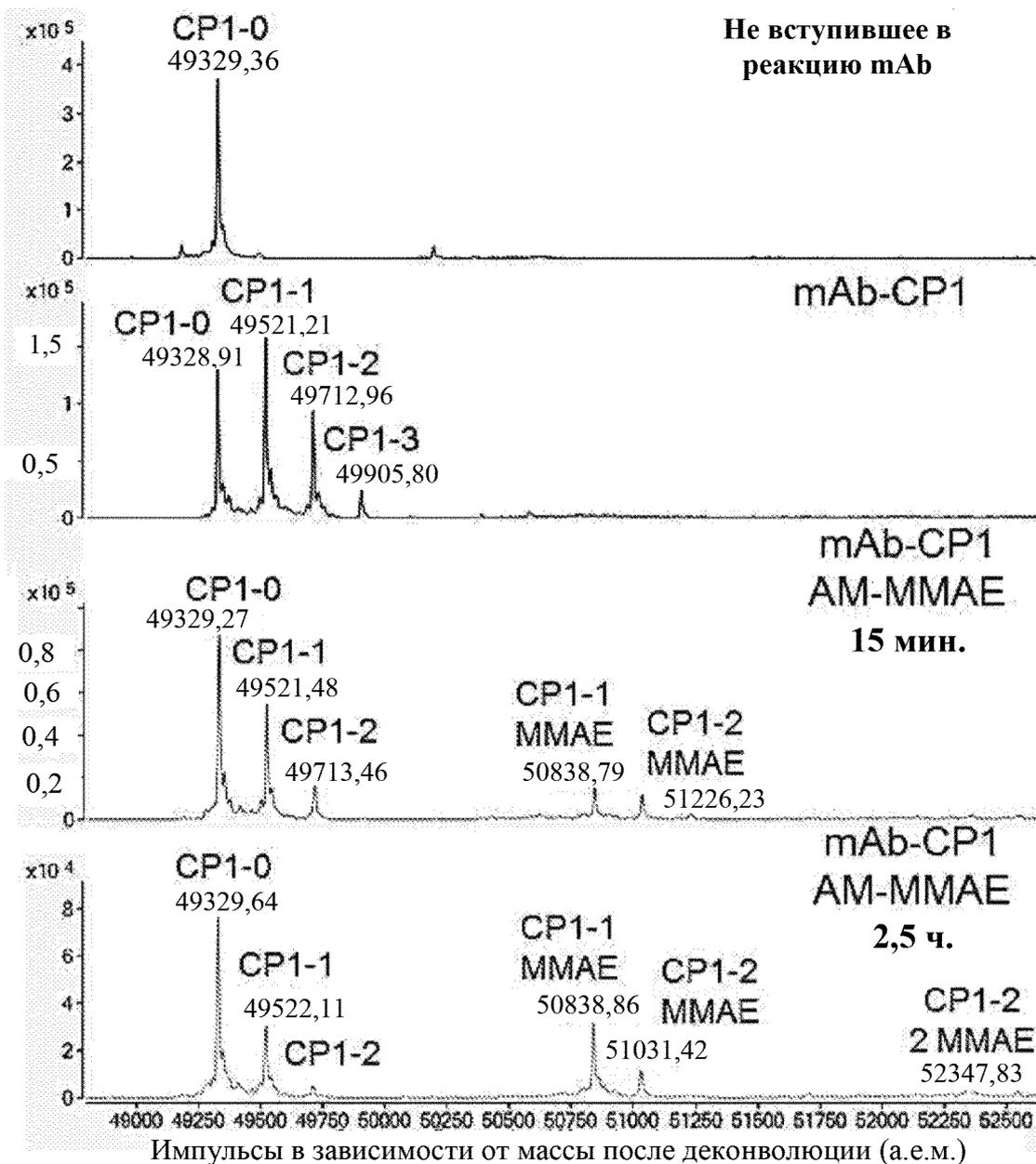


Фигура 4.1. Изображены данные масс-спектрометрии интактного дегликозилированного образца до (А) и после (В) реакции mAb с CP1-NHS

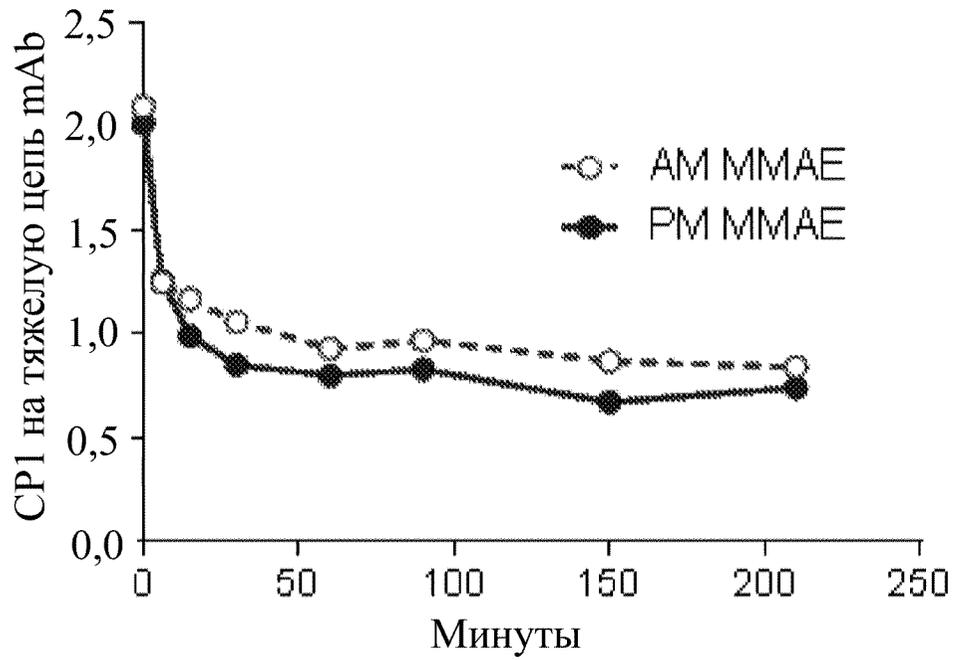


|           |            |           |            |           |            |           |            |
|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|------------|
| <b>1.</b> | 144337,04; | <b>3.</b> | 144723,11; | <b>5.</b> | 145107,84; | <b>7.</b> | 145490,16; |
| <b>2.</b> | 144532,34; | <b>4.</b> | 144912,10; | <b>6.</b> | 145292,78; | <b>8.</b> | 145675,24; |

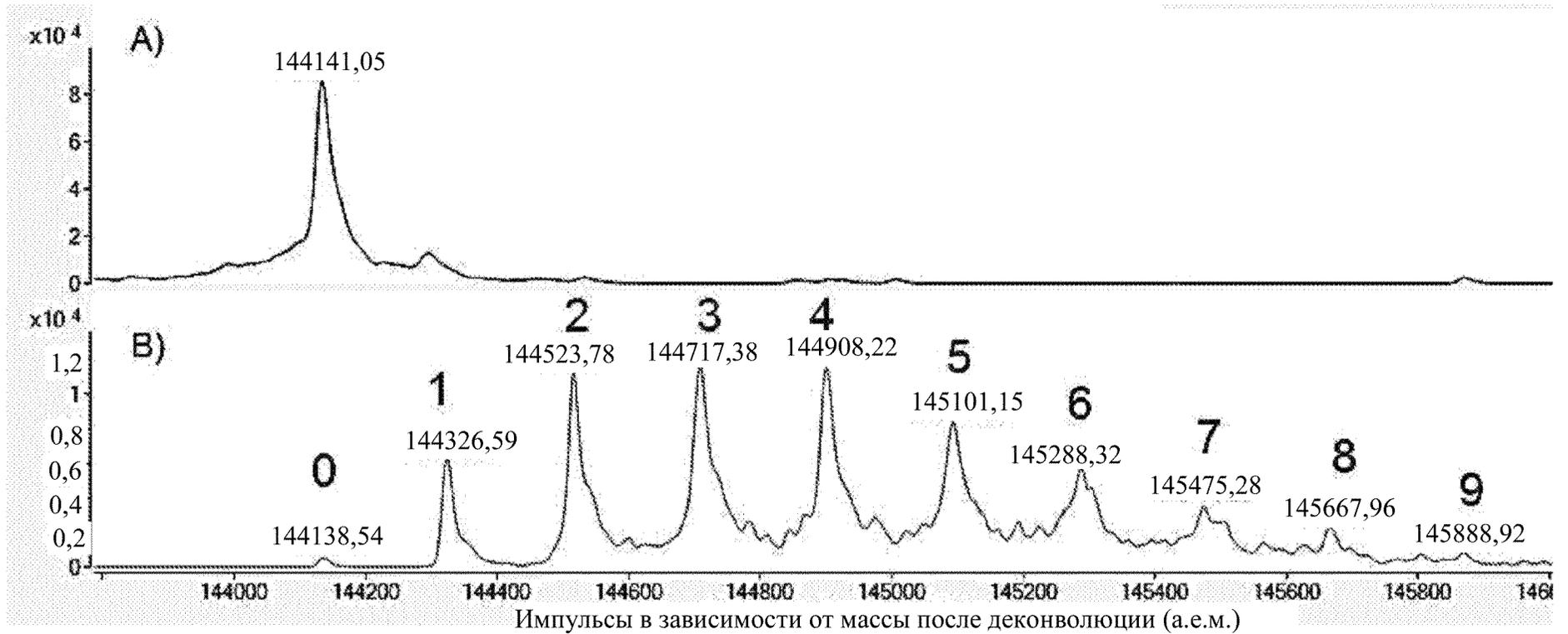
**Фигура 4.2.** Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного немодифицированного mAb, mAb-CP1-линкер и AM-MMAE-вступившего в реакцию с mAb-CP1-линкер (mAb-CP1 AM-MMAE) в 15 мин. и 2,5 ч



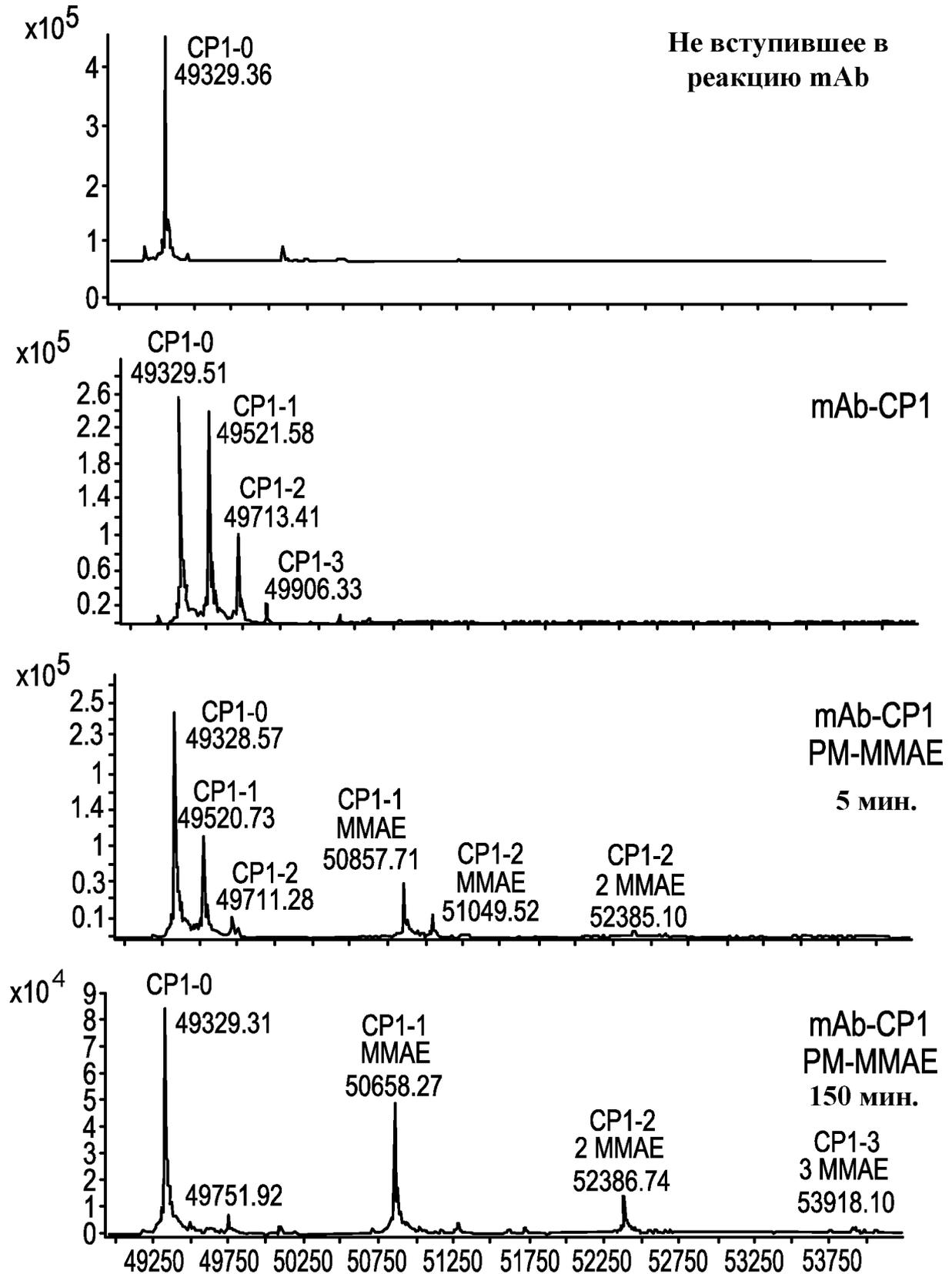
Фигура 4.3. Реакция mAb-CP1-линкер с maleimid-MMAE. Не вступивший в реакцию CP1-диен определяли по интенсивностям пиков масс-спектров восстановленного дегликозилированного образца



Фигура 5.1. Данные масс-спектрометрии интактного дегликозилированного образца до (А) и после (В) реакции mAb с CP1-NHS

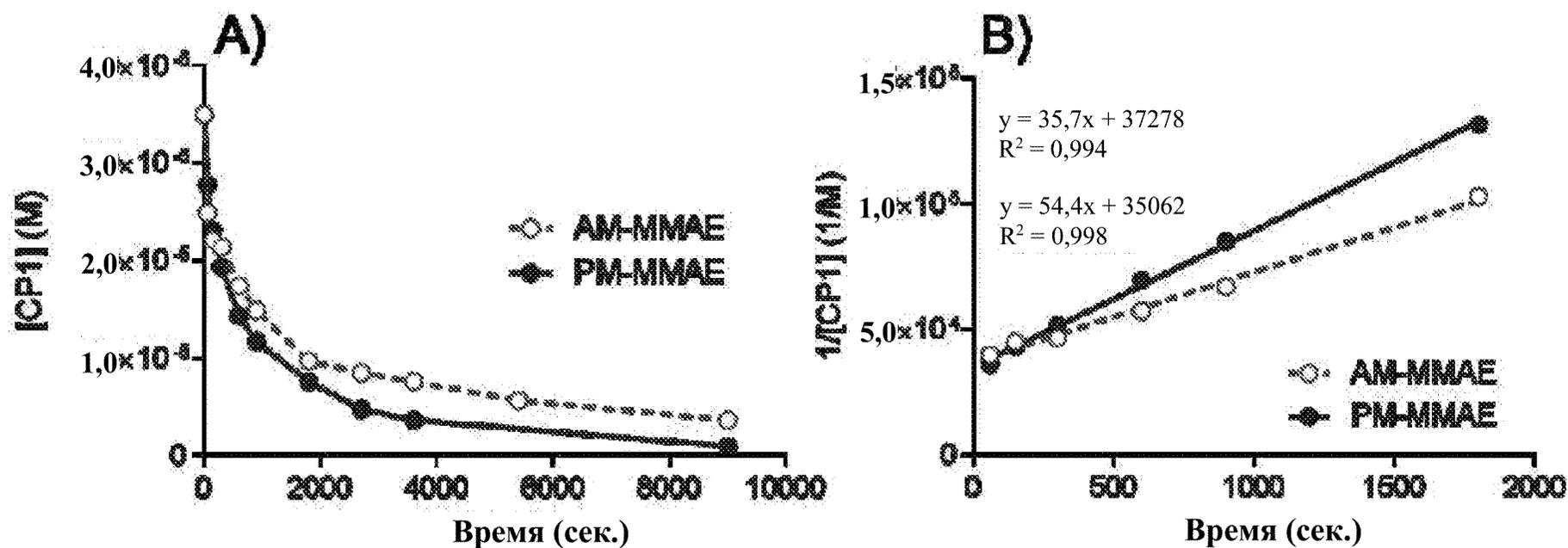


**Фигура 5.2. Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного немодифицированного mAb, mAb-CP1-линкер (mAb-CP1) и PM-MMAE-вступившего в реакцию с mAb-CP1-линкер в моменты времени 15 мин. и 150 мин**

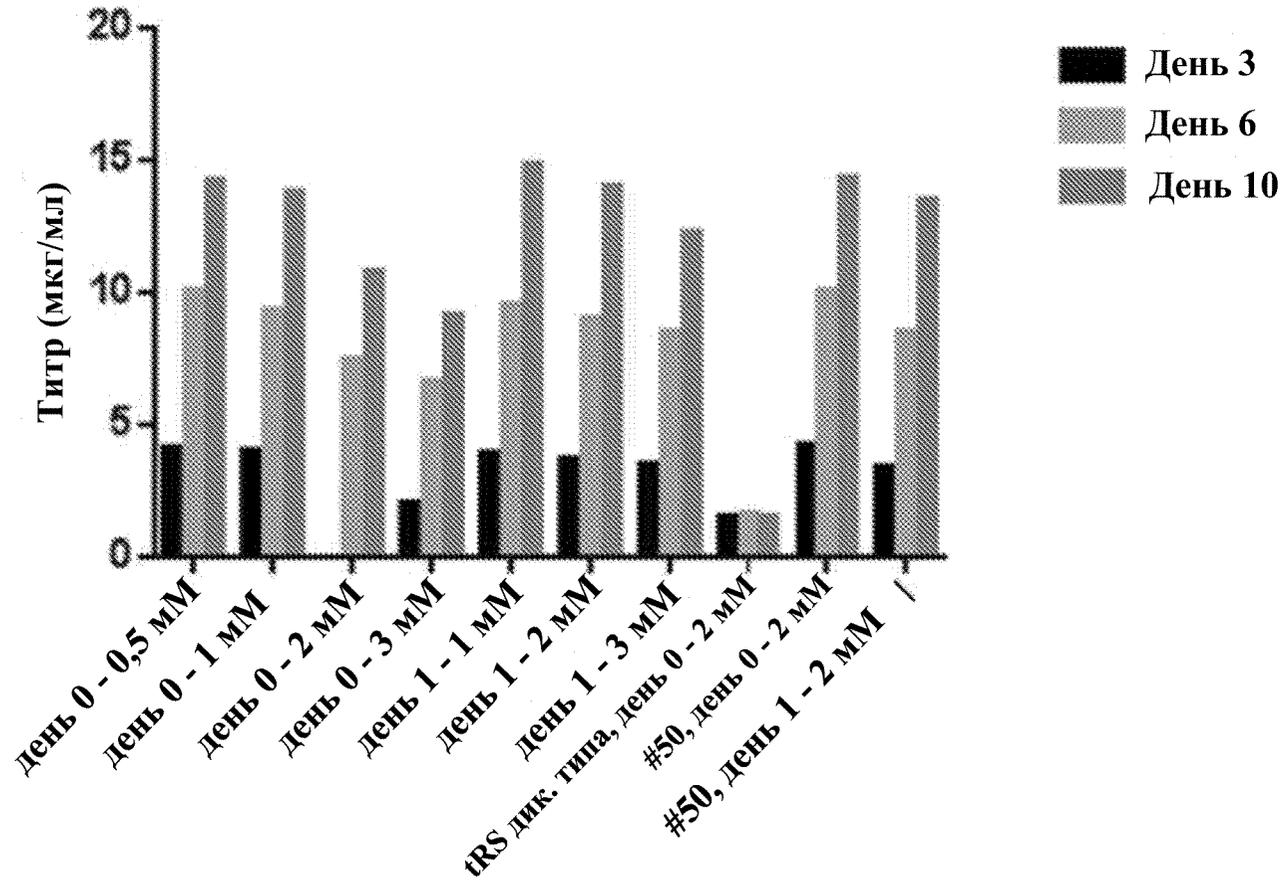


Импульсы в зависимости от массы после деконволюции (а.е.м.)

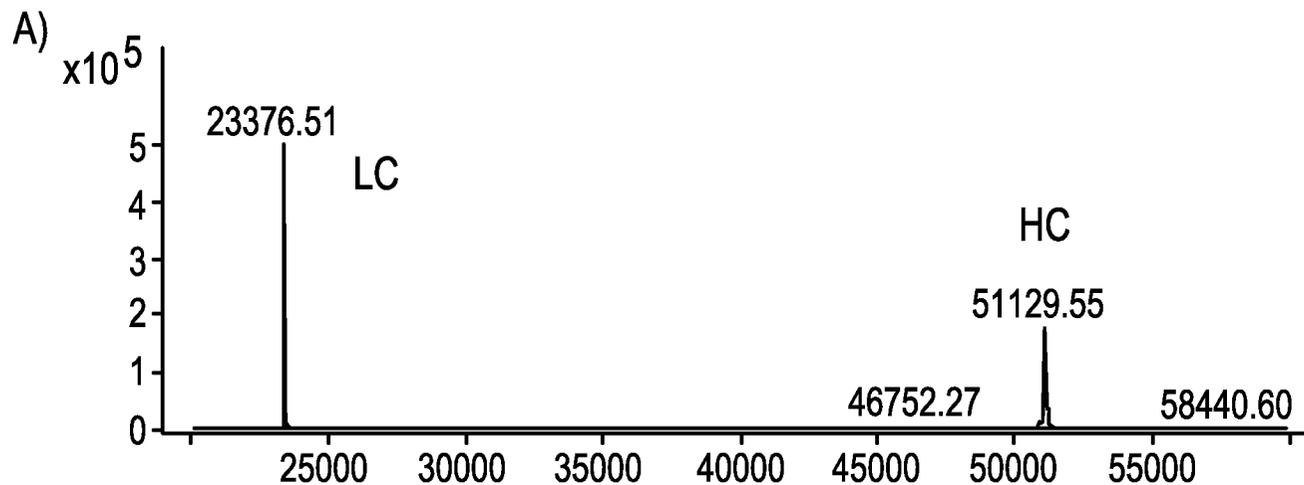
Фигура 5.3. Реакция mAb-CP1-линкер с малеимид-ММАЕ. А) Не вступившие в реакцию CP1-диены на mAb, определенные по интенсивностям пиков в масс-спектрах восстановленного дегликозилированного образца. В) График зависимости обратной концентрации от времени, используемый для расчета констант скоростей реакции



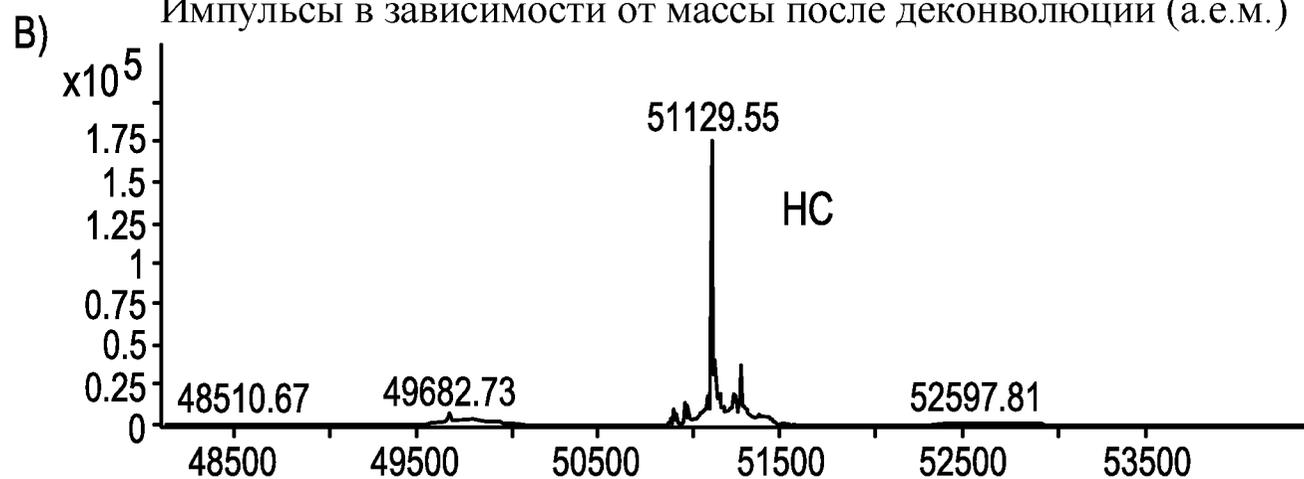
Фигура 6.1. Изображены титры mAb 12G3H11 K274CP1-NNAA после экспрессии в клетках млекопитающих, содержащих мутантную TRS или TRS дикого типа. Конечную концентрацию CP1-NNAA в средах и время добавления варьировали, что указано на оси x. Следует отметить, что структура не природной аминокислоты #50 показана на фигуре 6.8



**Фигура 6.2.** Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного образца mAb 12G3H11 K274CP1-NNAА. А) Диапазон масс, показывающий легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC) mAb. В) График с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать только тяжелую цепь mAb

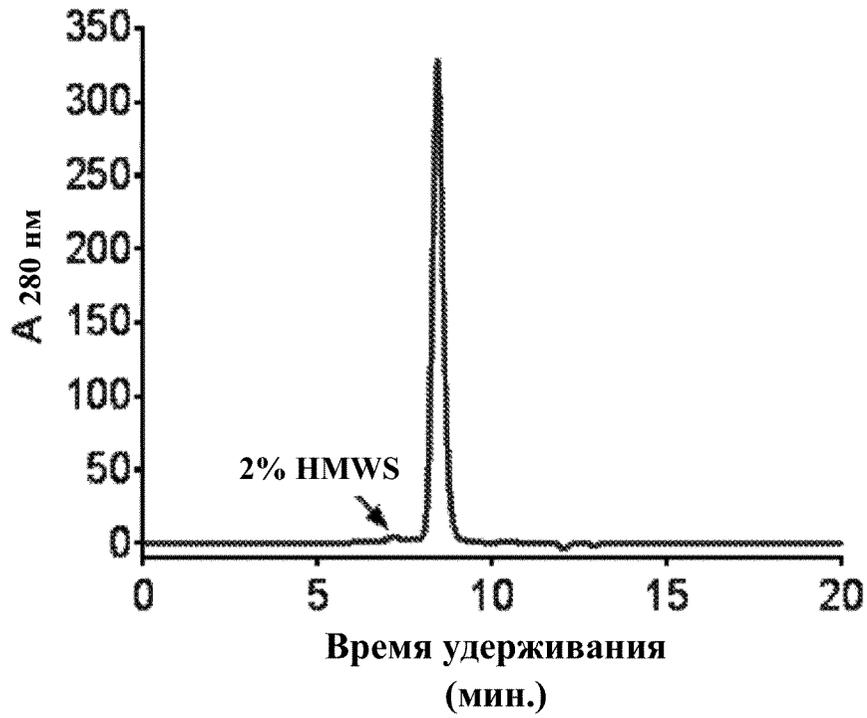


Импульсы в зависимости от массы после деконволюции (а.е.м.)

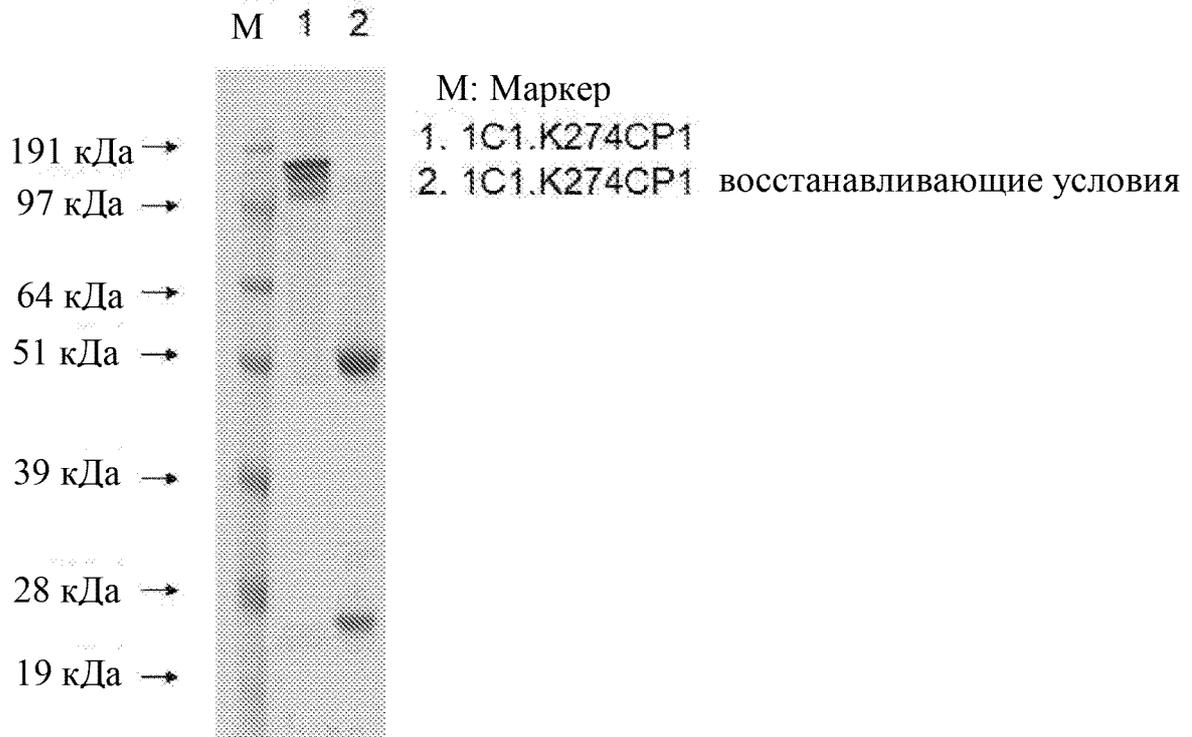


Импульсы в зависимости от массы после деконволюции (а.е.м.)

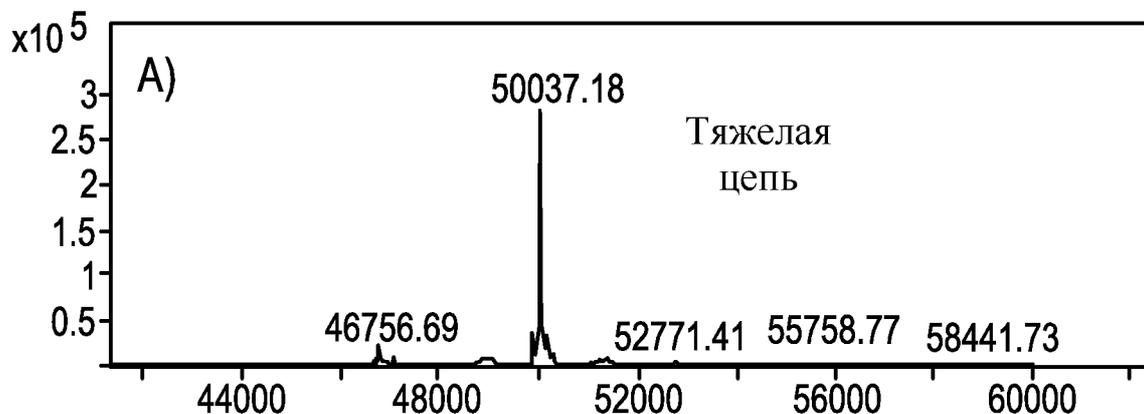
**Фигура 6.3.** По результатам SEC-анализа mAb 12G3H11 K274CP1-NNAА определили, что был получен мономерный продукт. Указаны высокомолекулярные фрагменты (HMWS)



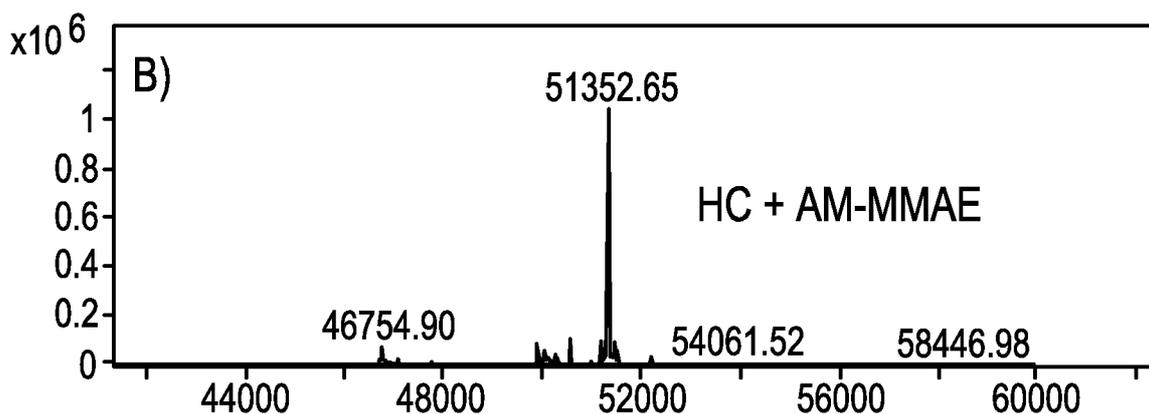
**Фигура 6.4. Анализ mAb 1C1-K274CP1-NNAА (1C1.K274CP1) с использованием SDS-PAGE**



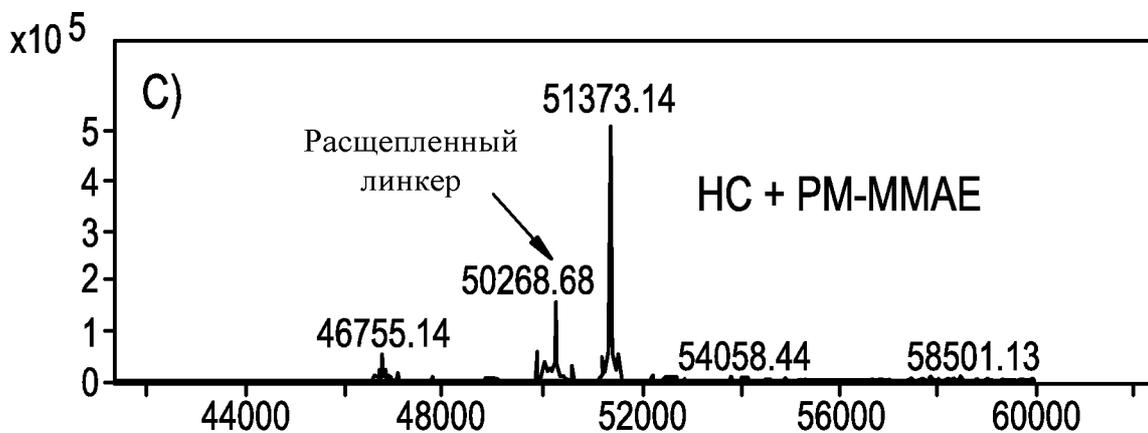
Фигура 6.5. Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного дегликозилированного продукта конъюгирования mAb 12G3H11K274 с CP1-NNAА-ММАЕ. А) Не вступившее в реакцию антитело, В) продукт реакции с АМ-ММАЕ. С) Продукт реакции с РМ\_ММАЕ. График с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать только тяжелую цепь (НС) mAb



Импульсы в зависимости от массы после деконволюции (а.е.м.)

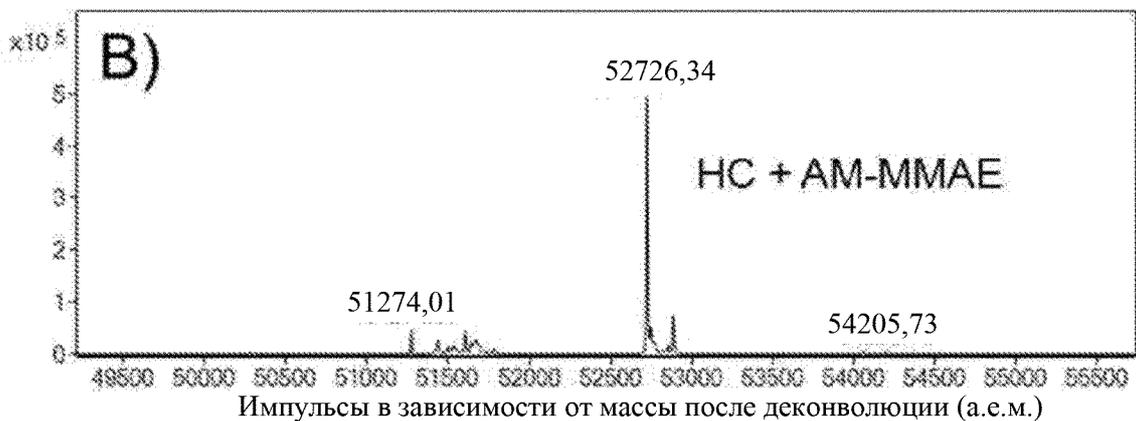
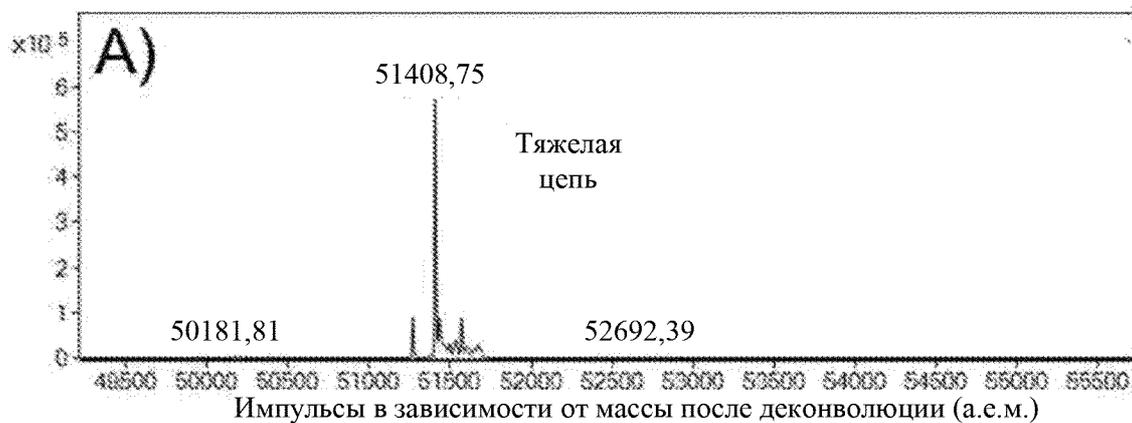


Импульсы в зависимости от массы после деконволюции (а.е.м.)

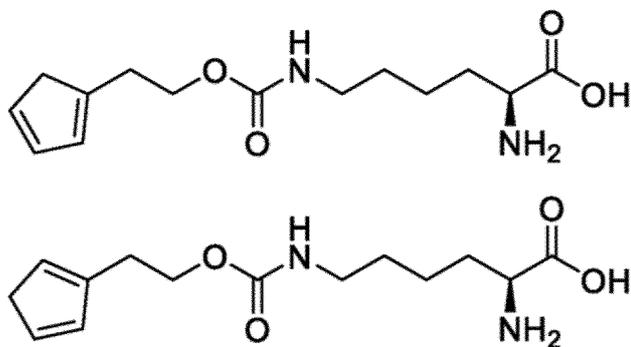


Импульсы в зависимости от массы после деконволюции (а.е.м.)

Фигура 6.6. Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта конъюгирования mAb 1C1 K274CP1-NNAА с AM-MMAE. А) Не вступившее в реакцию антитело, В) продукт реакции с AM-MMAE. График с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать только тяжелую цепь mAb. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую (HC), и легкую (LC) цепи, которые показаны на фигуре 6.9 и 6.7



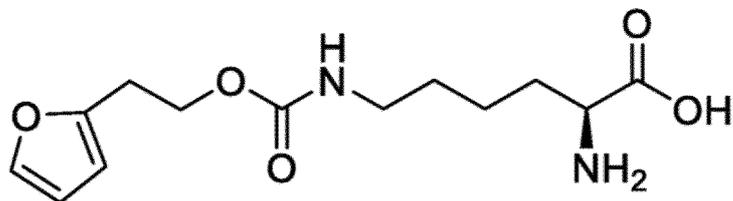
Фигура 6.7. Химическая структура CP1-NNAА, демонстрирующая изомеры соединения, которые встречаются в соотношении 1:1



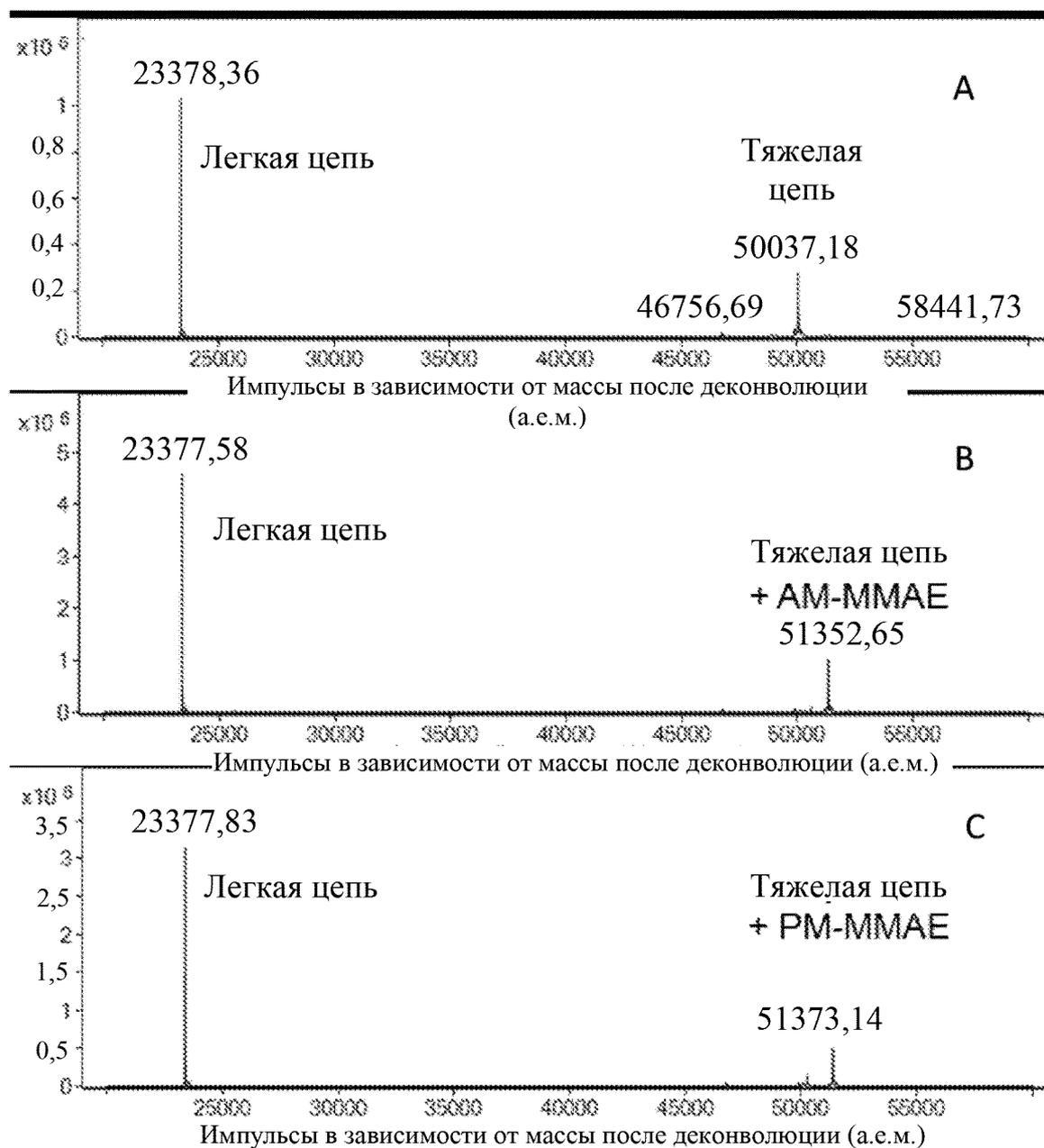
CP1-NNAА

Соотношение изомеров 1:1

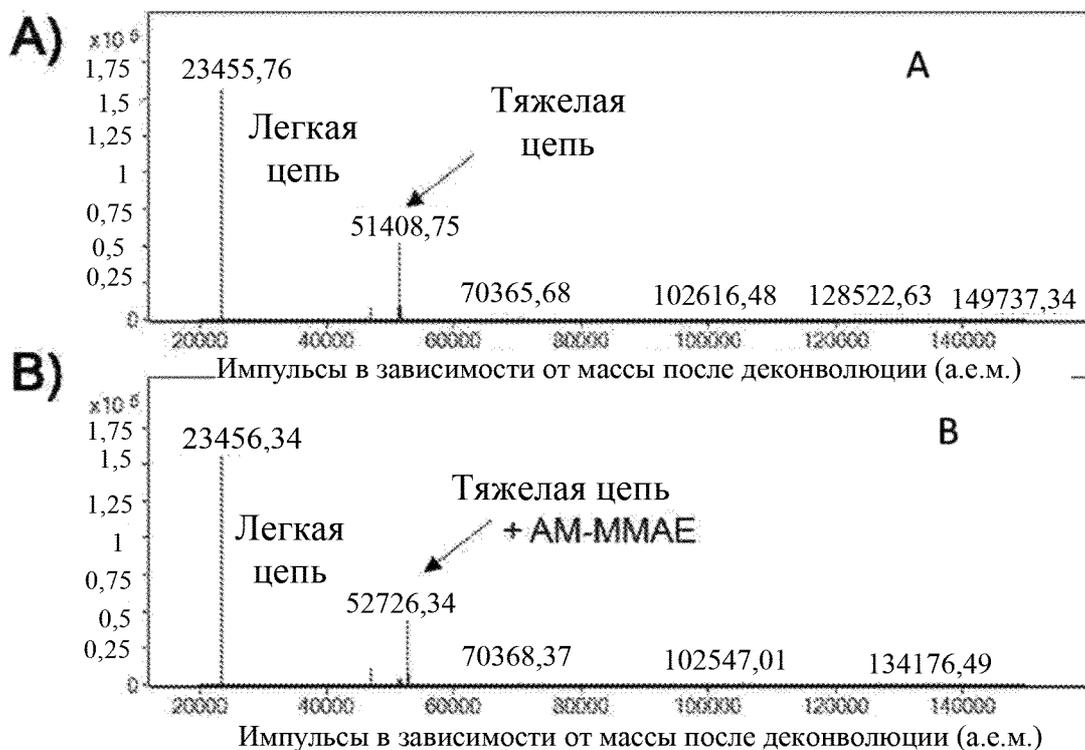
Фигура 6.8. Химическая структура соединения 50, фуранового аналога CP1-NNAА, описанного в литературе. Данное соединение использовали в качестве контроля для исследований экспрессии с использованием mAb 12G3H11



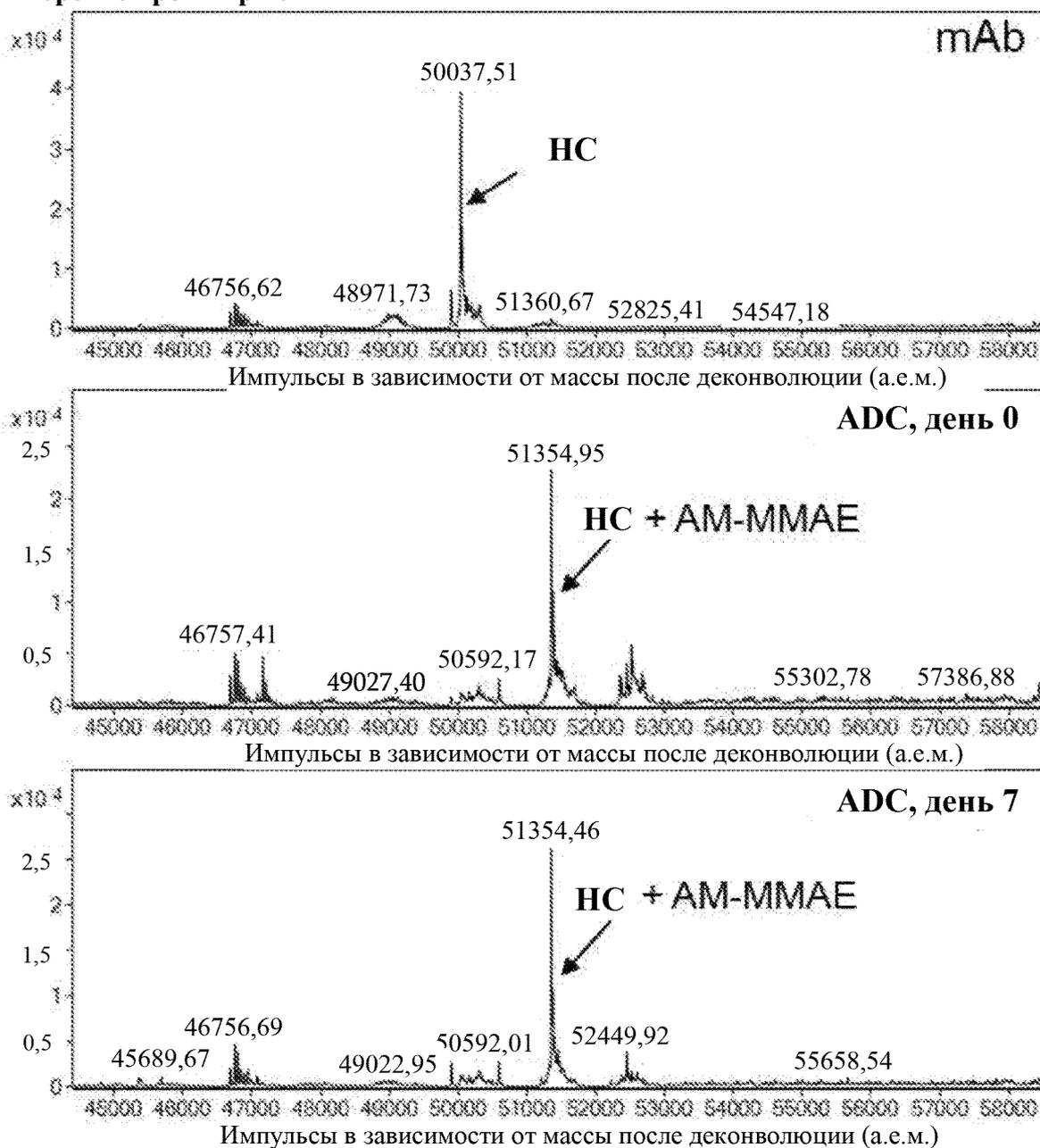
Фигура 6.9. Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного дегликозилированного продукта конъюгирования mAb 12G3H11K274 с CP1-NNAА-АМ-ММАЕ. А) Не вступившее в реакцию антитело, В) продукт реакции с АМ-ММАЕ. С) Продукт реакции с РМ-ММАЕ. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую, и легкую цепи антитела



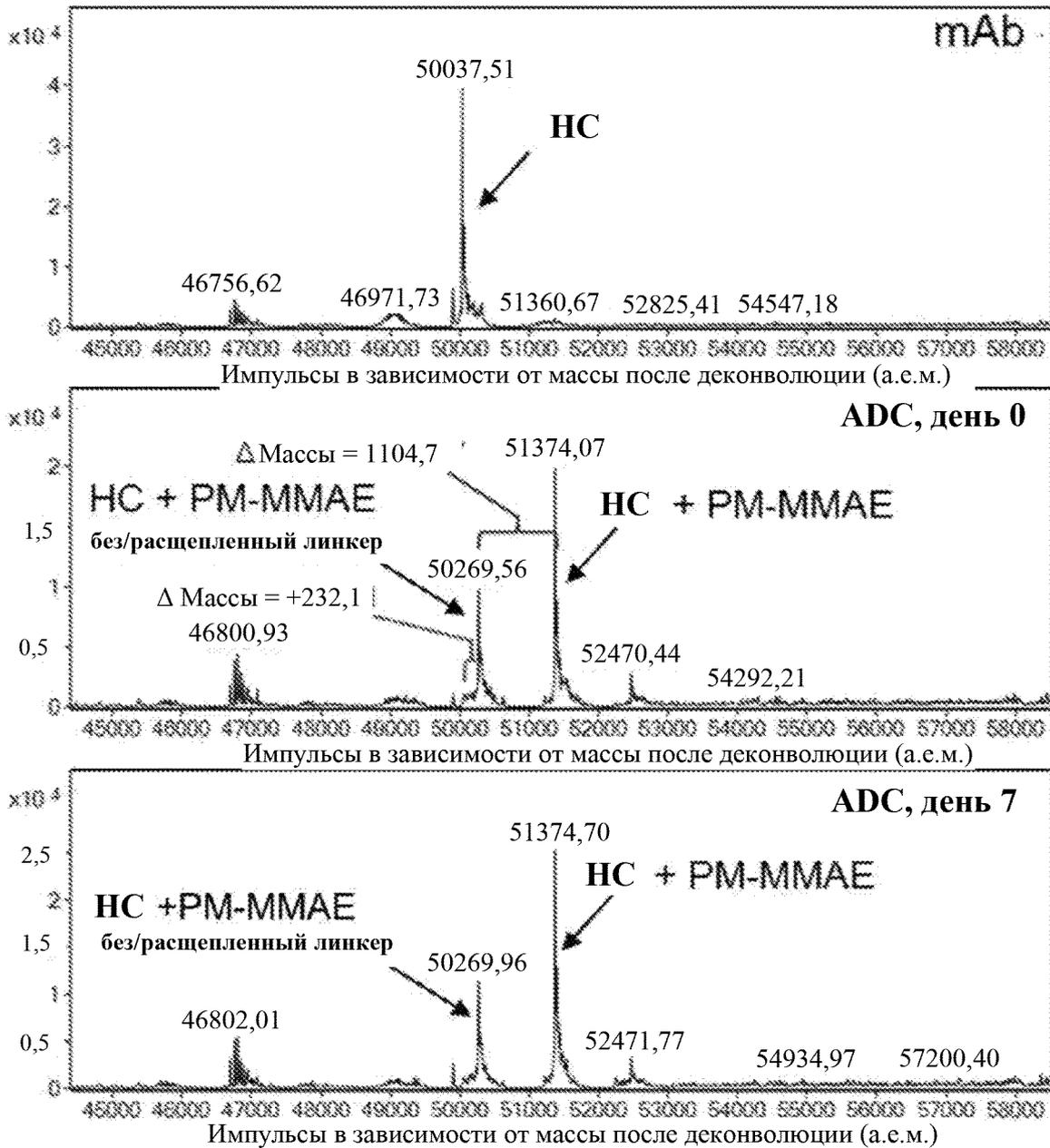
**Фигура 6.10.** Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта конъюгирования mAb 1C1 K274CP1-NNAА с АМ-ММАЕ. А) Не вступившее в реакцию антитело, В) продукт реакции с АМ-ММАЕ. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую, и легкую цепи антитела, а также высокомолекулярные фрагменты



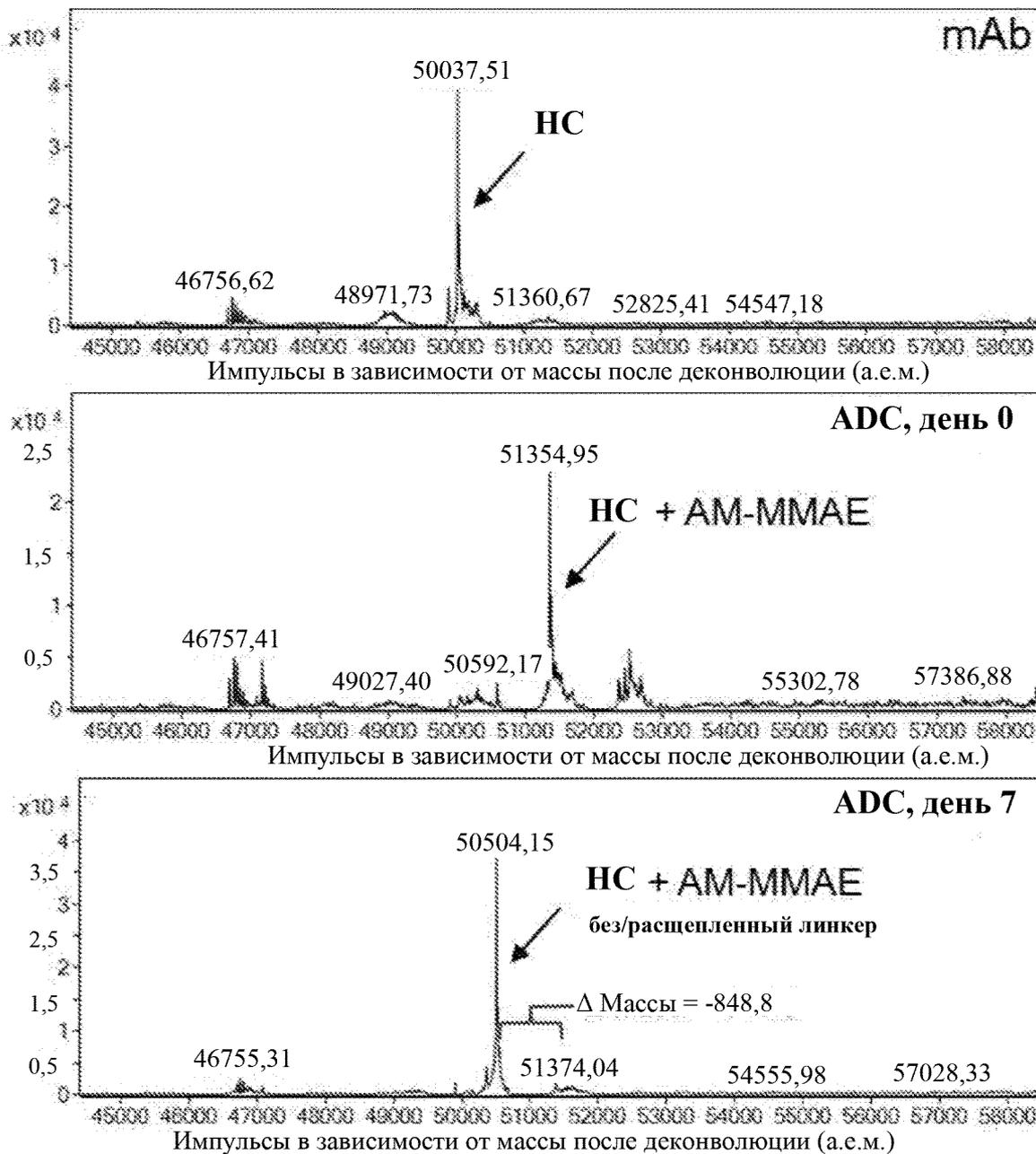
**Фигура 7.1. Стабильность ADC 12G3H11 K274CP1-NNAА АМ-ММАЕ в сыворотке крови крыс**



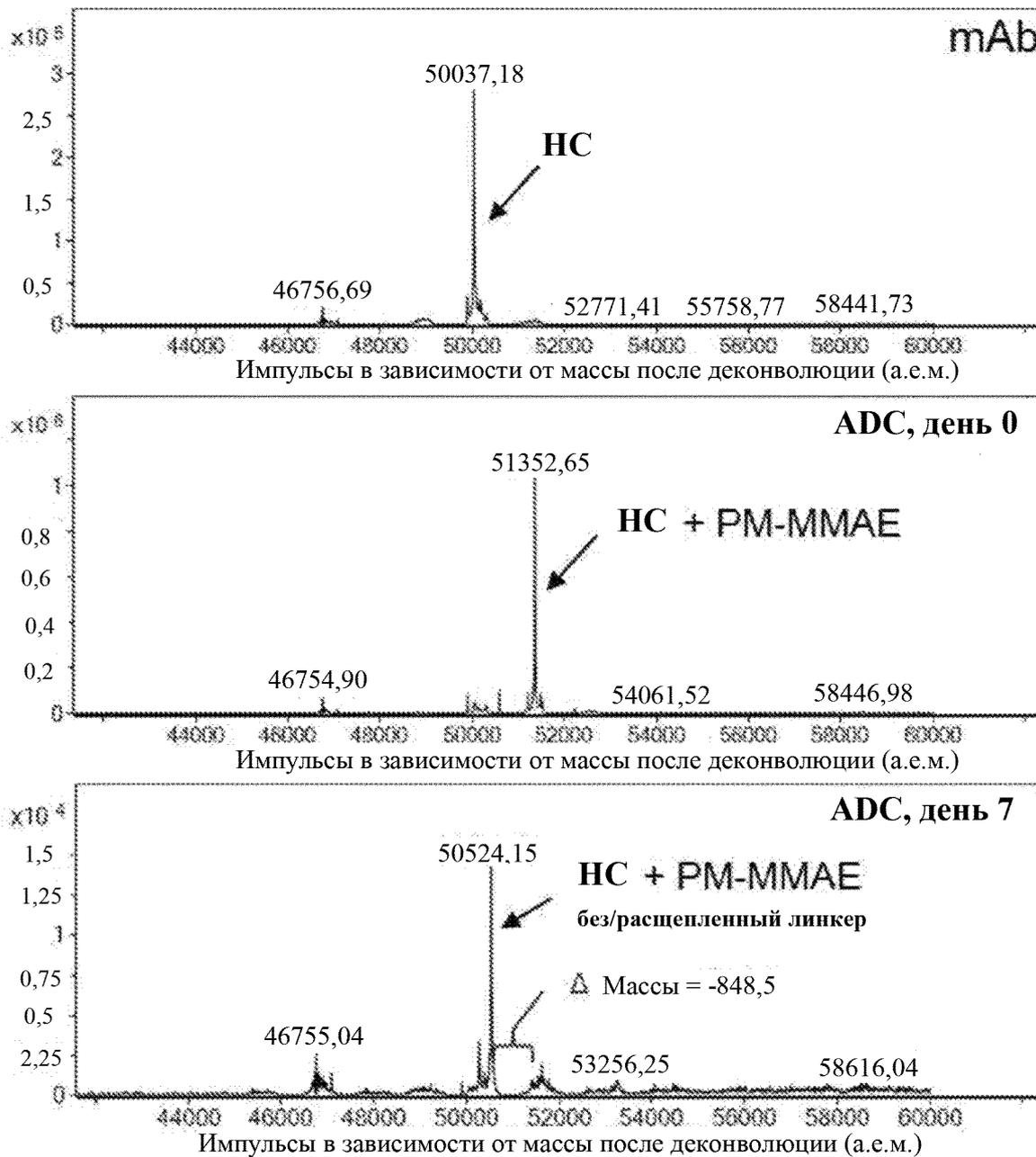
Фигура 7.2. Стабильность ADC 12G3H11 K274CP1-NNAА PM-MMAE в сыворотке крови крыс



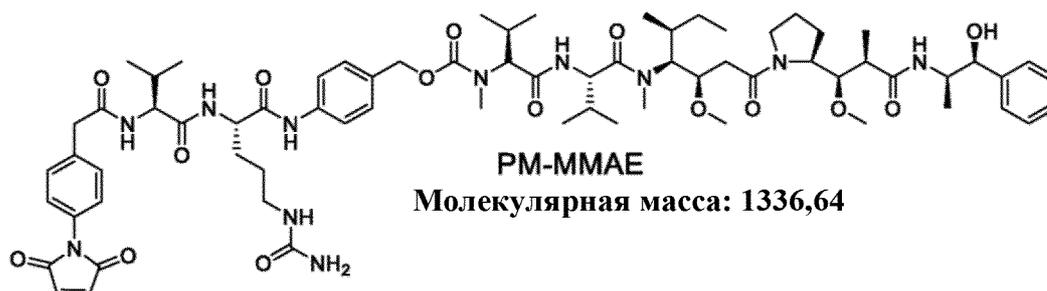
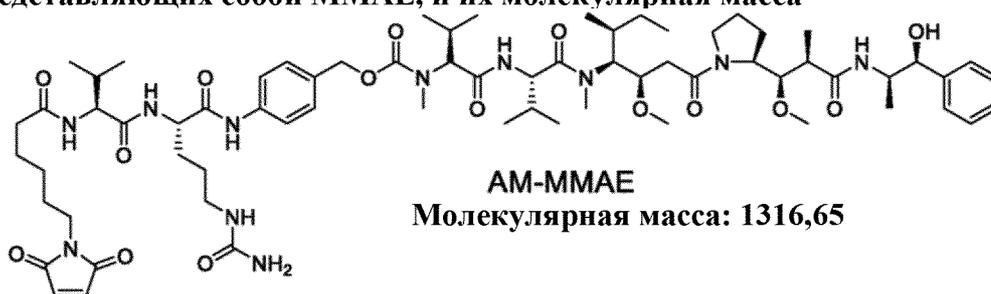
**Фигура 7.3. Стабильность ADC 12G3H11 K274CP1-NNAА AM-MMAE в сыворотке крови мышей**



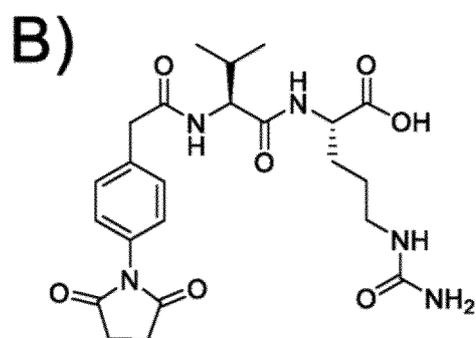
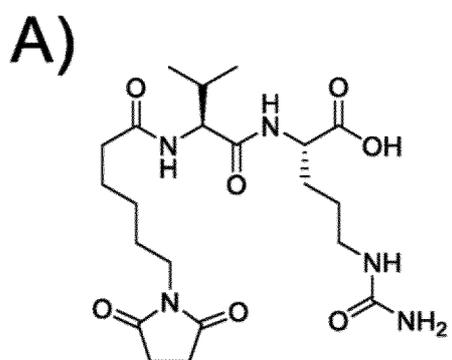
**Фигура 7.4. Стабильность ADC 12G3H11 K274CP1-NNAА PM-MMAE в сыворотке крови мышей**



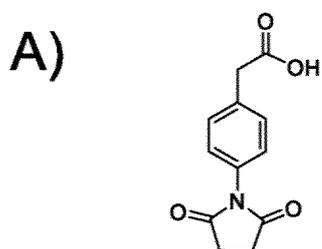
Фигура 7.5. Показаны химические структуры полезных нагрузок, представляющих собой MMAE, и их молекулярная масса



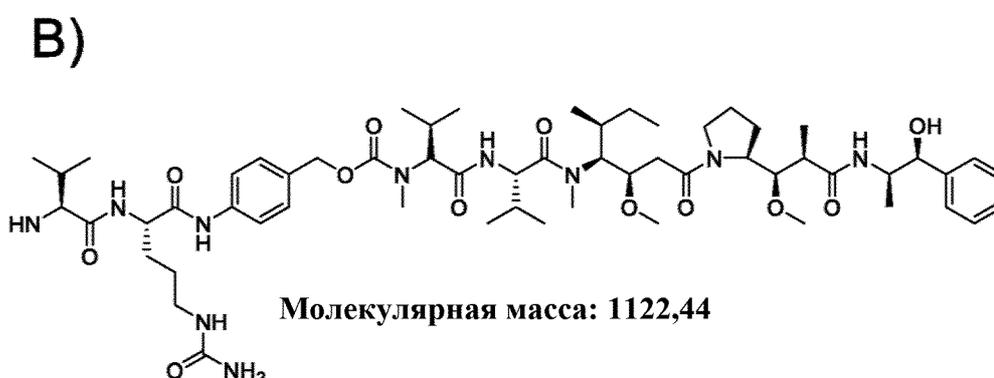
Фигура 7.6. Химическая структура преобладающих продуктов расщепления, которые выявили после инкубации ADC в сыворотке крови мышей. На А) и В) показаны фрагменты, оставшиеся связанными с антителом (CP1-маленимидная связь не показана), соответственно для конъюгатов с AM-MMAE и PM-MMAE, на С) показаны фрагменты, высвободившиеся после расщепления дипептида val-cit



Фигура 7.7. Химическая структура продуктов расщепления РМ-ММАЕ после инкубации в сыворотке крови крыс А) Фрагменты, оставшиеся связанными с антителом, и В) высвободившиеся фрагменты

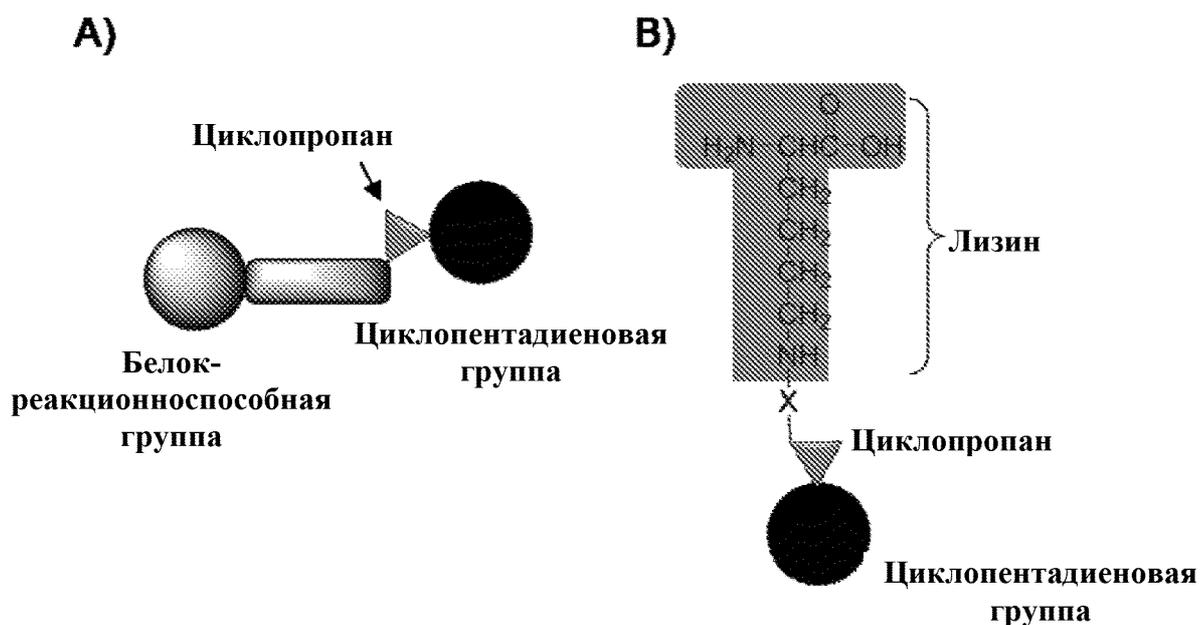


Молекулярная масса: 233,22

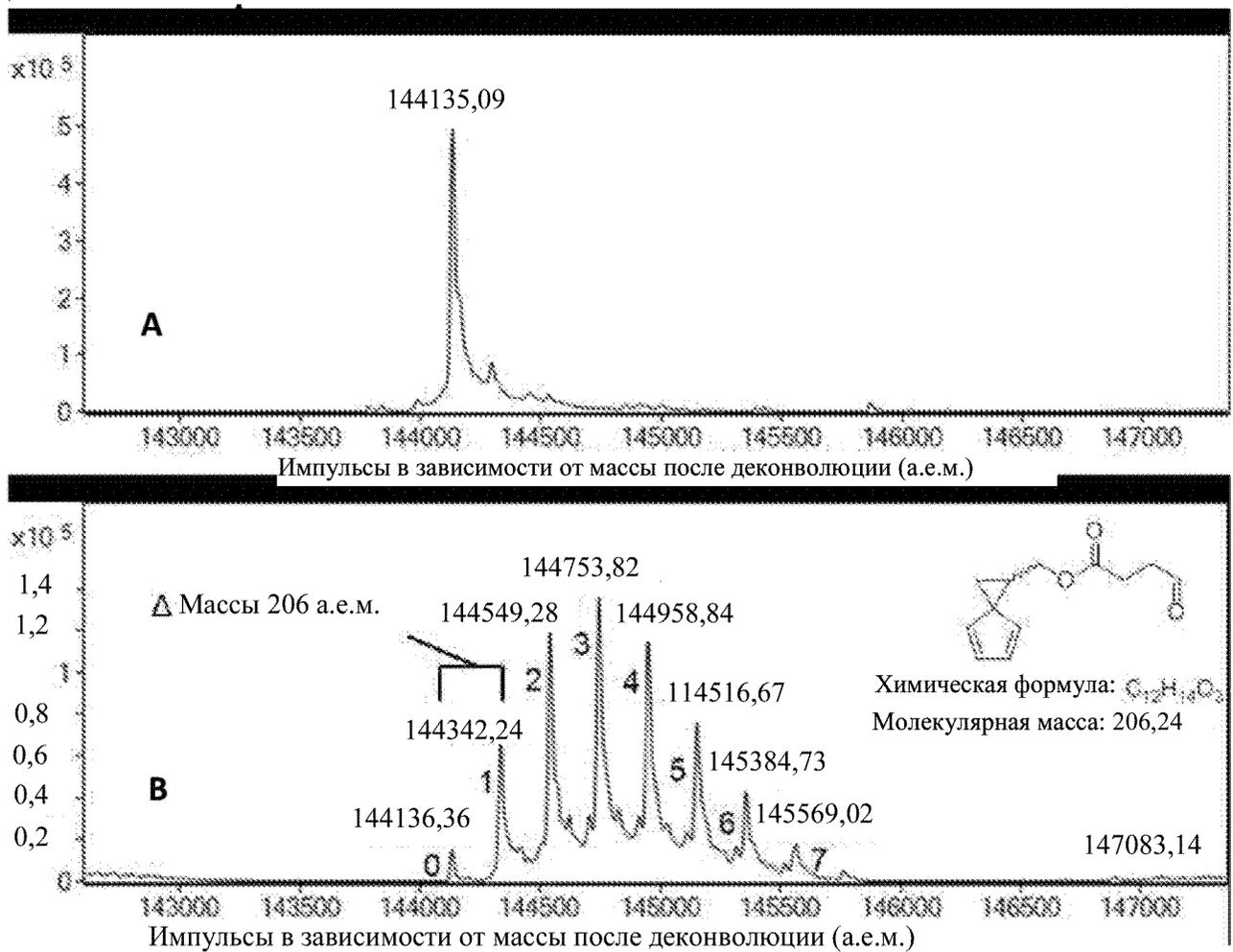


Молекулярная масса: 1122,44

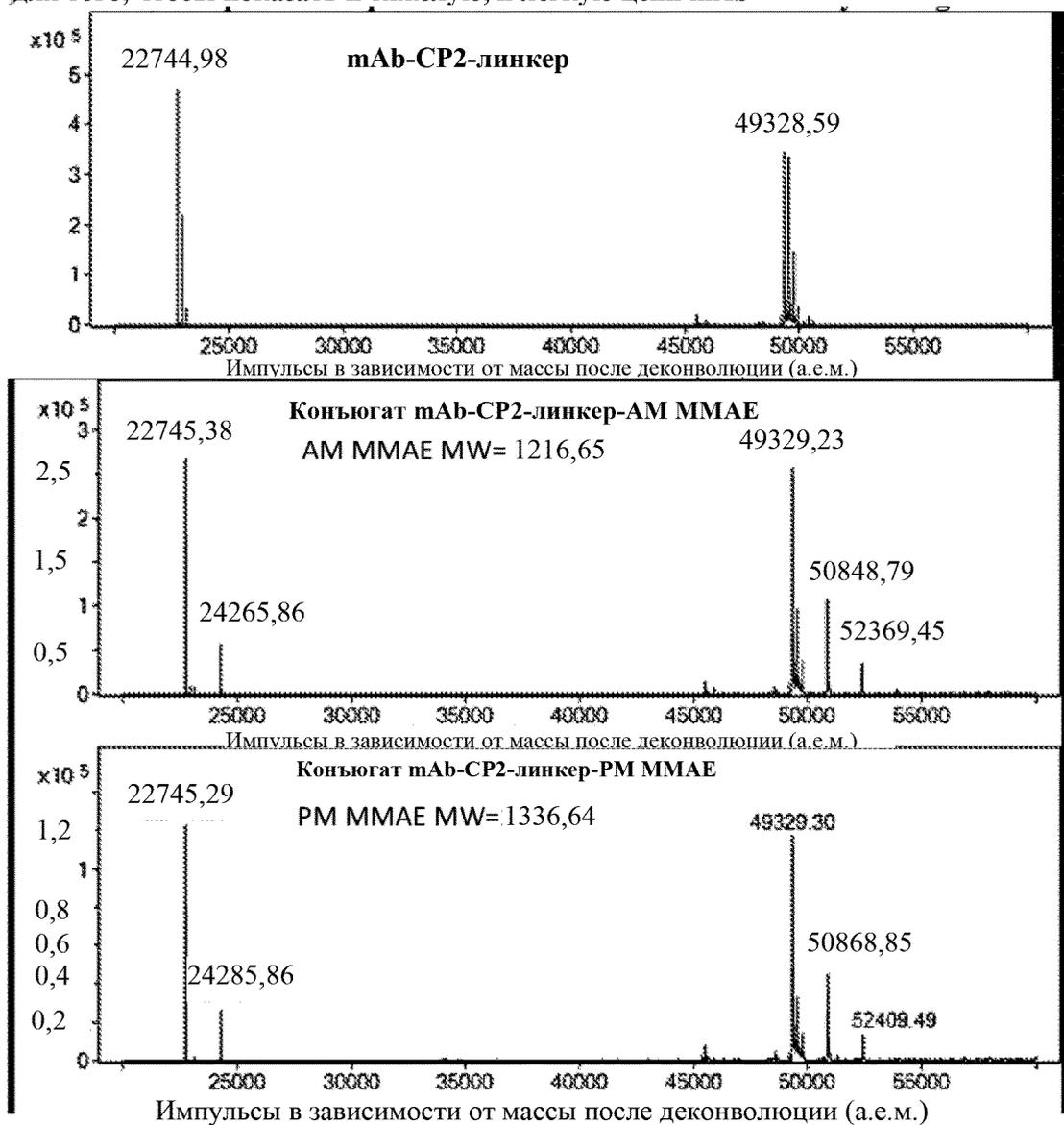
Фигура 8.1. Общая схема конструкции спироциклопентадиеновых сшивающих средств (А) и NNAA со спироциклопентадиеновой группой (В), описанных в примере 8



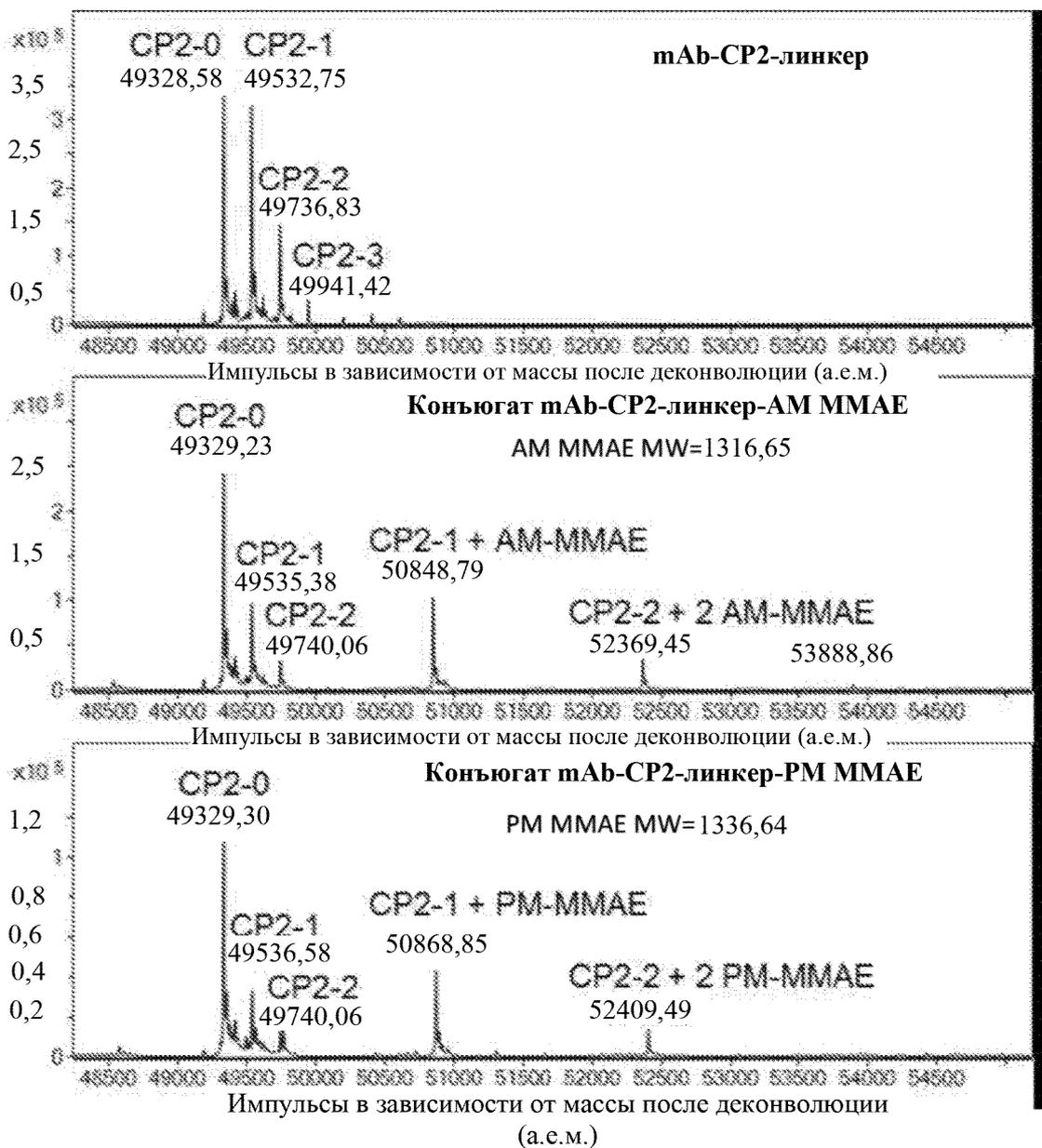
**Фигура 9.1.** Данные масс-спектрометрии интактного дегликозилированного образца до А) и после В) реакции с CP2-NHS. Числа под пиками в В) указывают на количество групп CP2-линкер, введенных в mAb. Оценка введения CP2-линкер по интенсивностям пиков дала 3,29 CP2-линкера на mAb



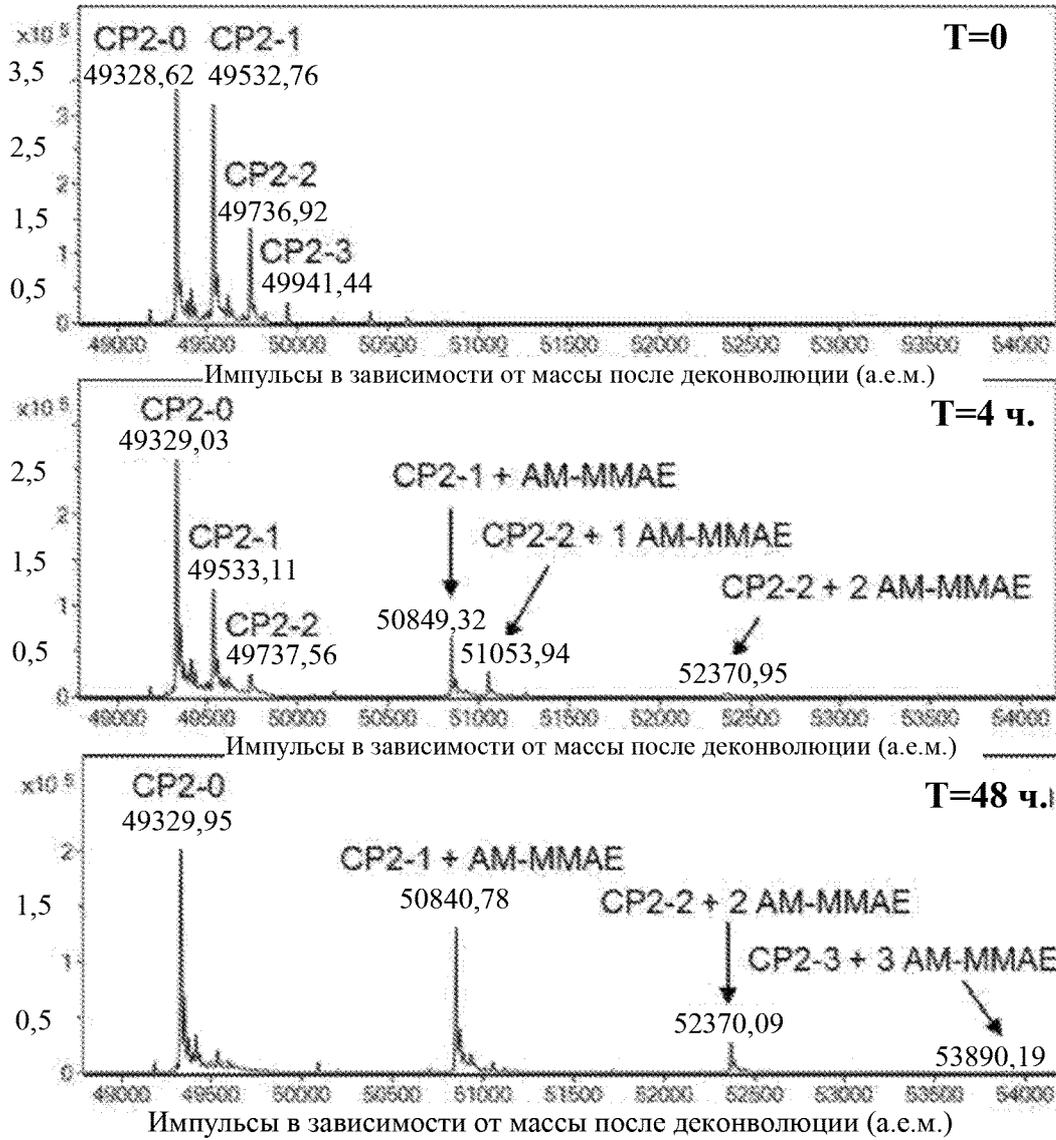
Фигура 9.2. Масс-спектры восстановленных дегликозилированных продуктов реакции mAb-CP2-линкер с малеимид-ММАЕ. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую, и легкую цепи mAb



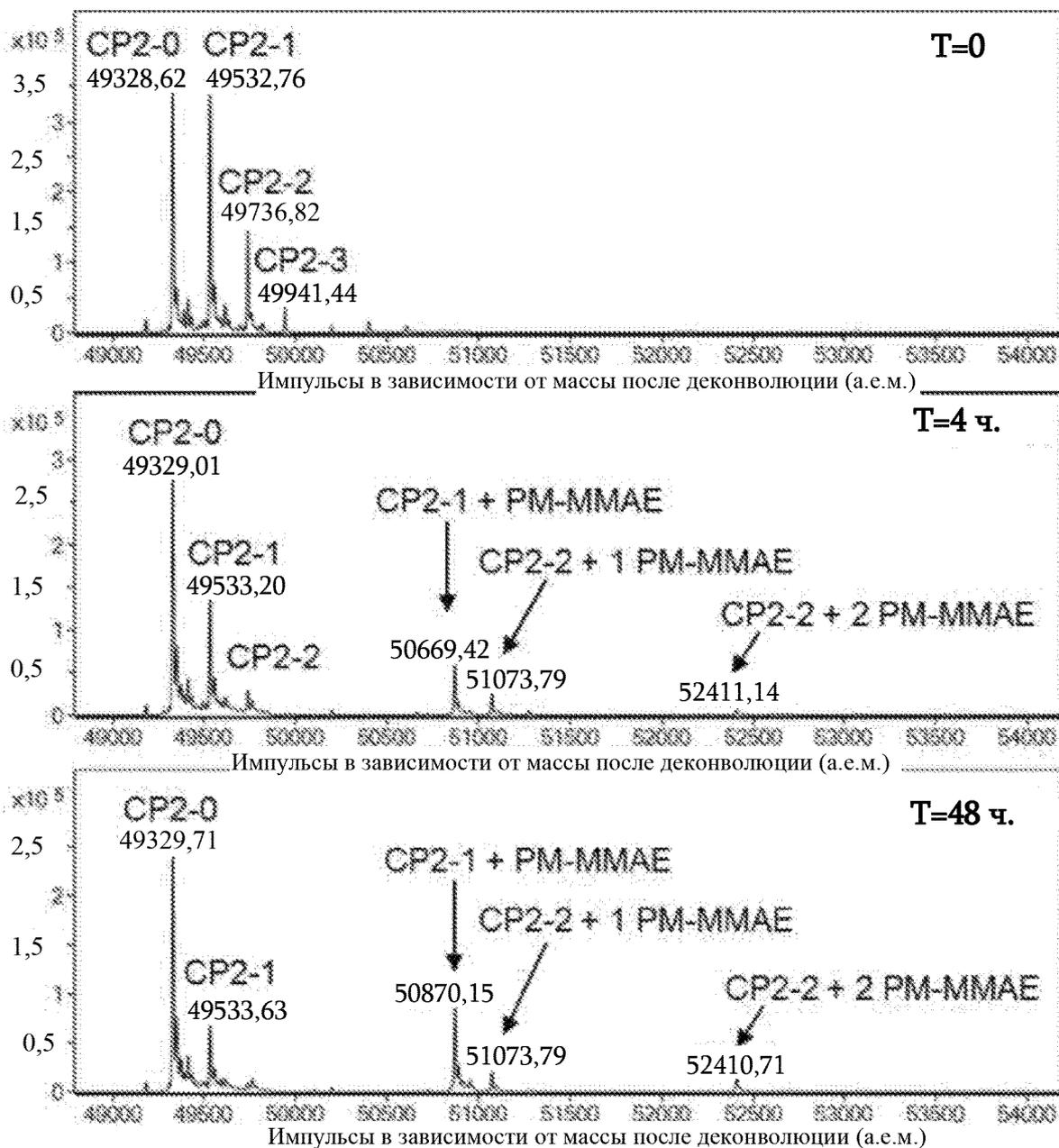
**Фигура 9.3. Данные с масс-спектрами для восстановленных дегликозилированных продуктов реакции mAb-CP2-линкера и малеимид-ММАЕ увеличили для того, чтобы показать участок тяжелой цепи mAb. Количество конъюгированных фрагментов указано над каждым пиком**



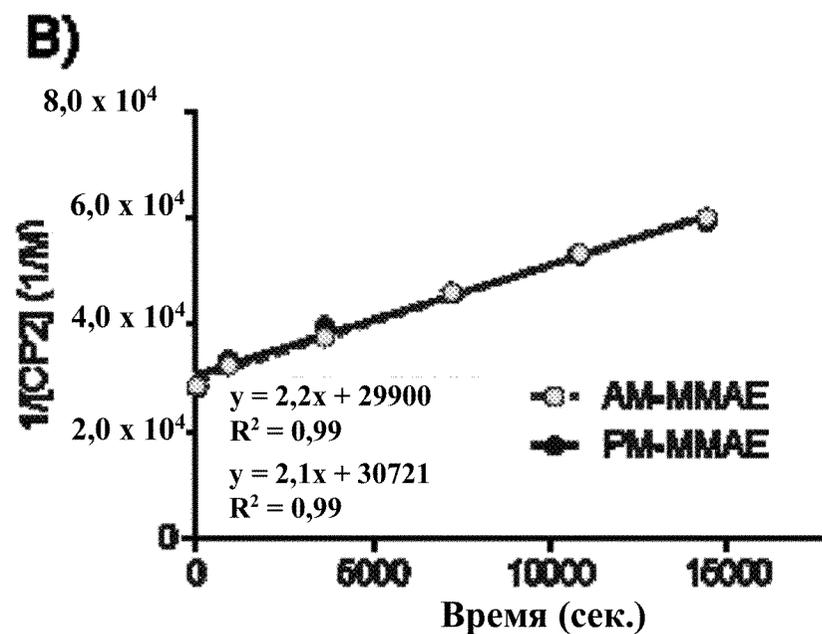
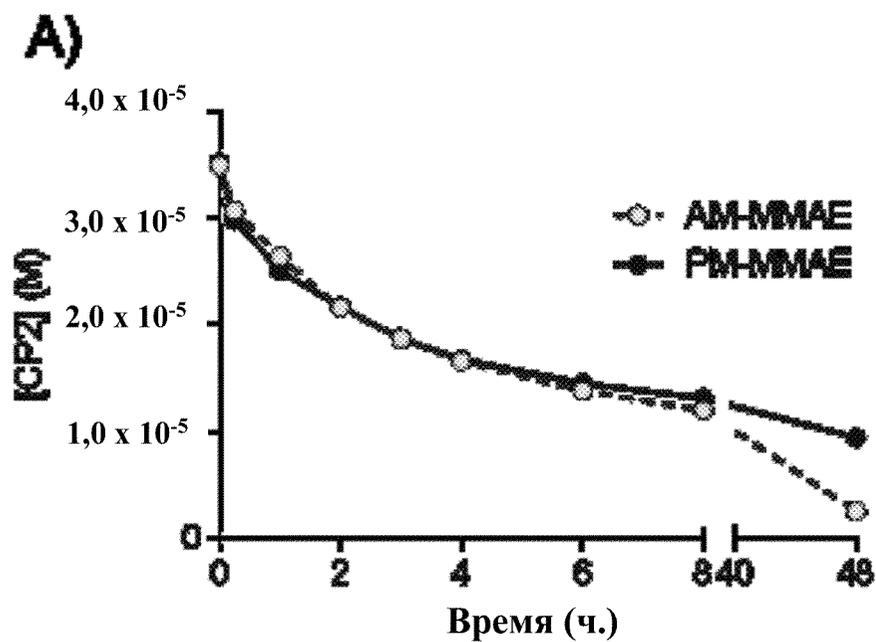
**Фигура 10.1. Масс-спектры восстановленного дегликозилированного образца mAb-CP2-линкер и AM-MMAE-вступивший в реакцию с mAb-CP2-линкер в моменты времени 4 ч. и 48 ч. График с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать только тяжелую цепь. Каждый пик отметили для указания количества конъюгированных фрагментов**



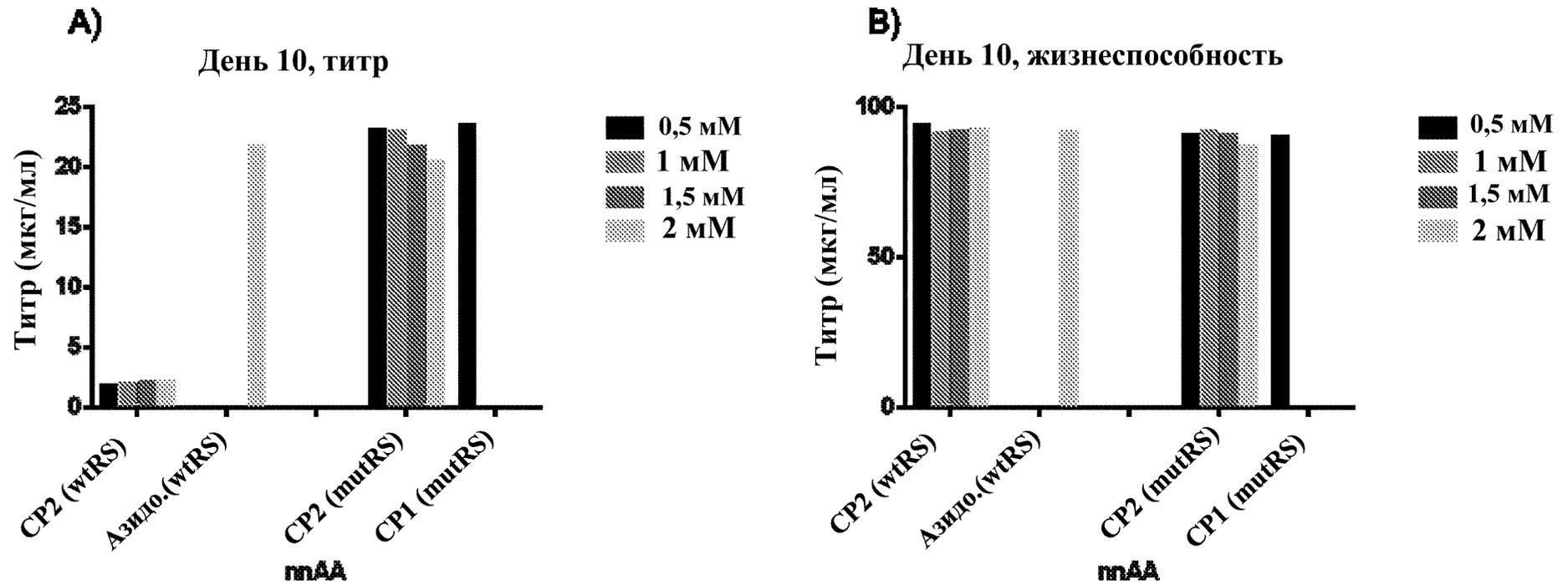
**Фигура 10.2.** Масс-спектры восстановленного дегликозилированного образца mAb-CP2 и PM-MMAE-вступившего в реакцию с mAb-CP2 в моменты времени 4 ч. и 48 ч. График с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать только тяжелую цепь. Каждый пик отметили для указания количества конъюгированных фрагментов



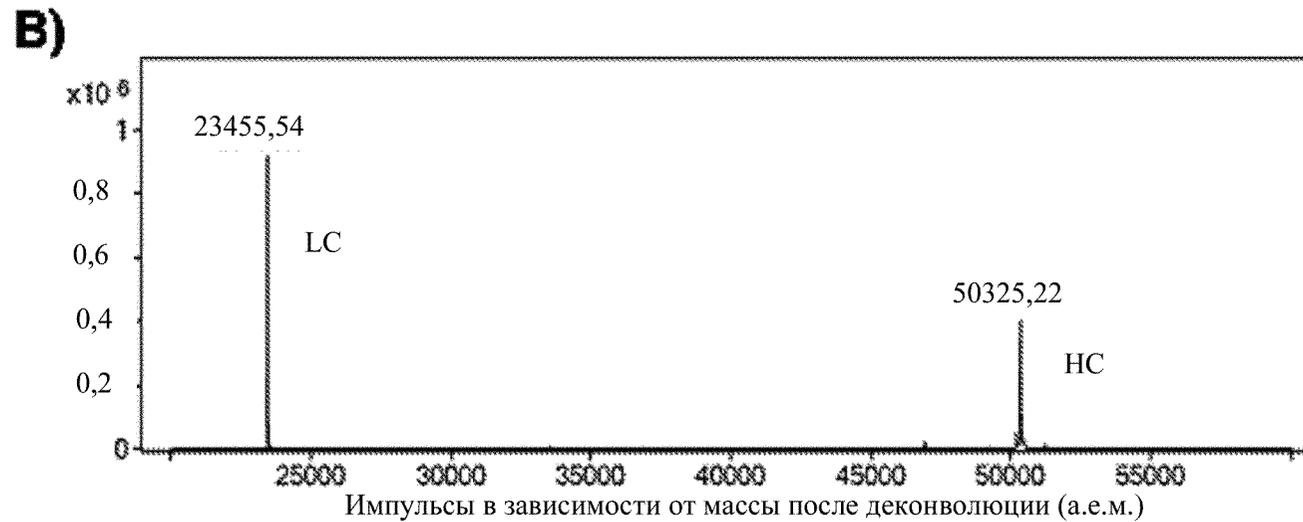
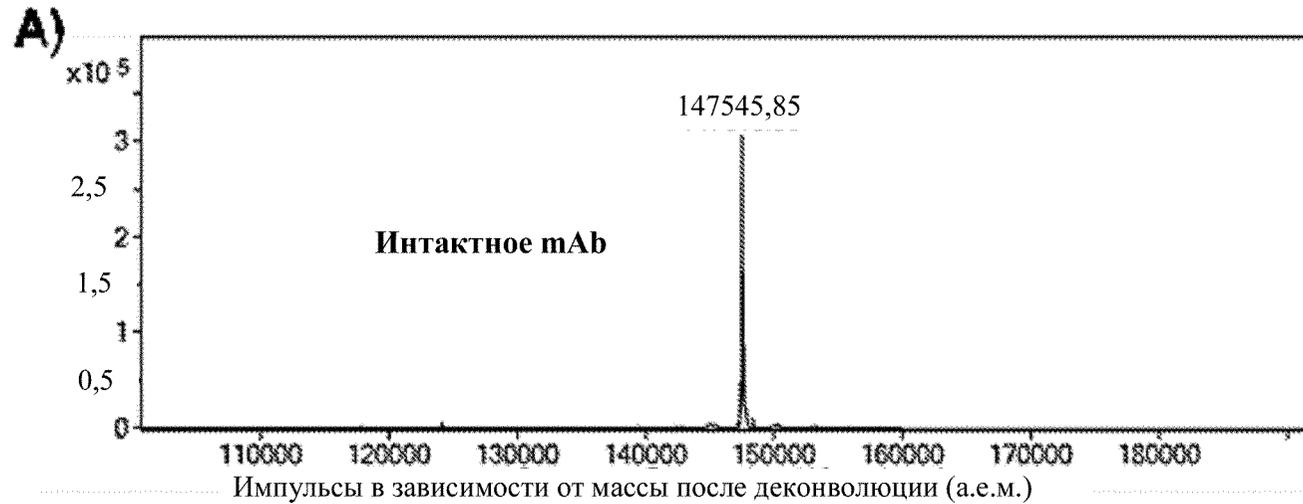
Фигура 10.3. Реакция mAb-CP2-линкер-диенов с малеимид-MMAE. А) Молярная концентрация не вступившего в реакцию CP2-диена на протяжении времени. Не вступивший в реакцию CP2-диен на mAb определяли по интенсивностям пиков в масс-спектрах восстановленного дегликозилированного образца. В) График зависимости обратной концентрации от времени, используемый для расчета скоростей реакции



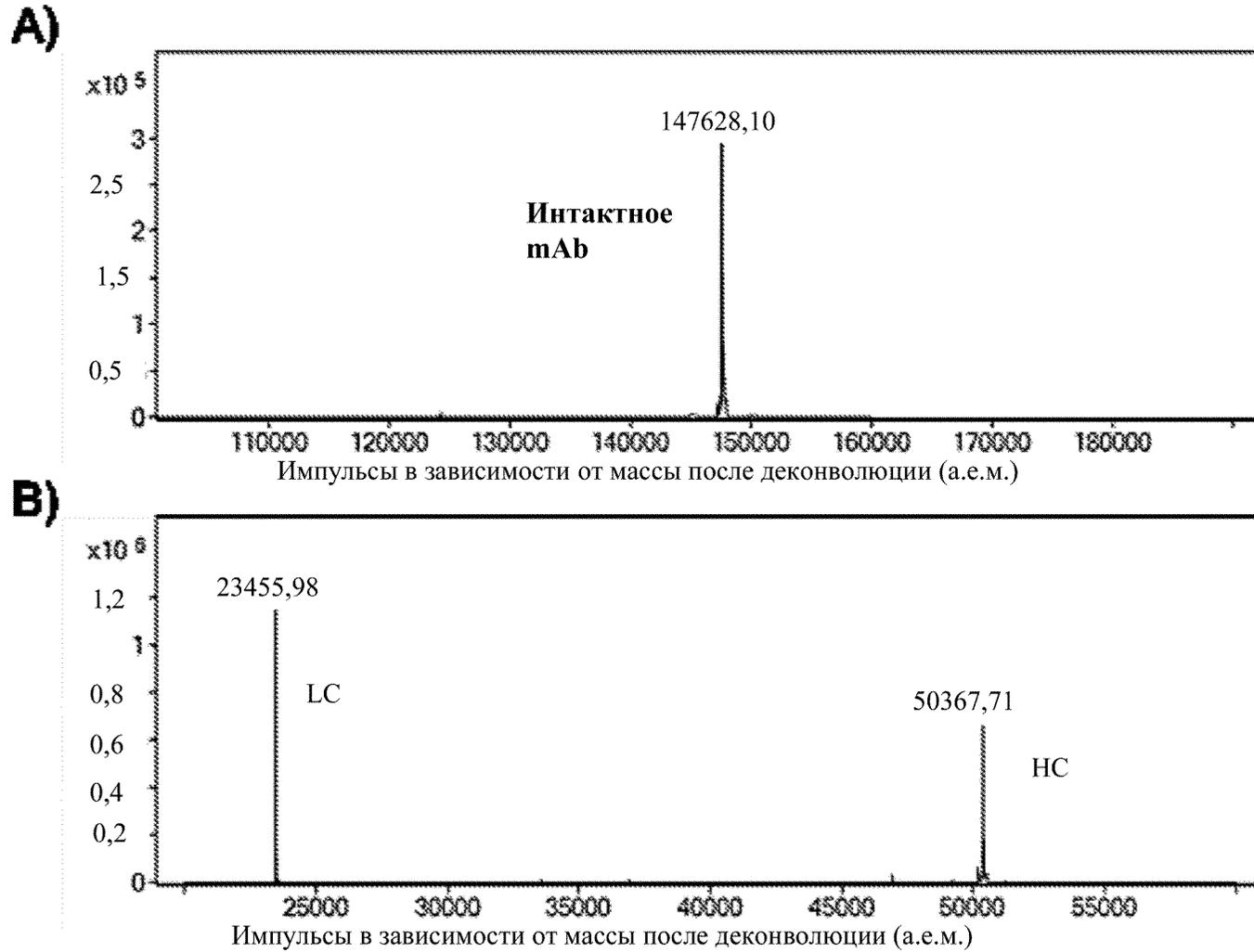
Фигура 11.1. Титры 12G3H11 K274CP2-NNAА-mAb после экспрессии в клетках млекопитающих, содержащих мутантную TRS или TRS дикого типа и жизнеспособность клеток. Конечная концентрация CP2-NNAА в средах указана на подписи к фигуре. Экспрессия mAb 12G3H11 K274CP2-NNAА с мутантной tRS была сопоставима с азидо-лизином с tRS дикого типа при минимальной токсичности



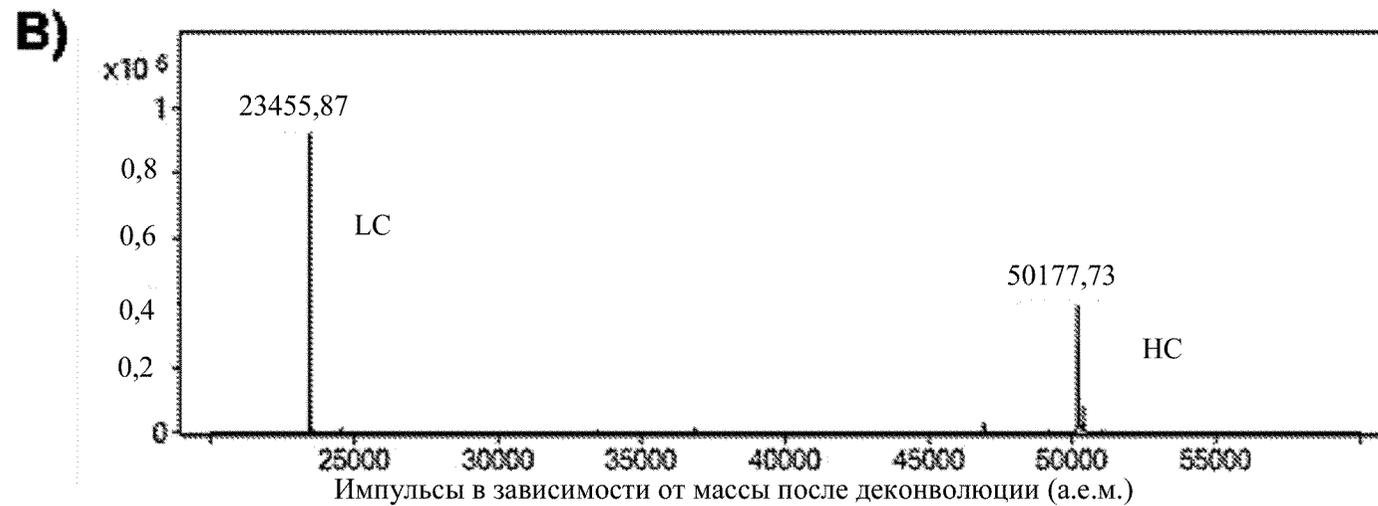
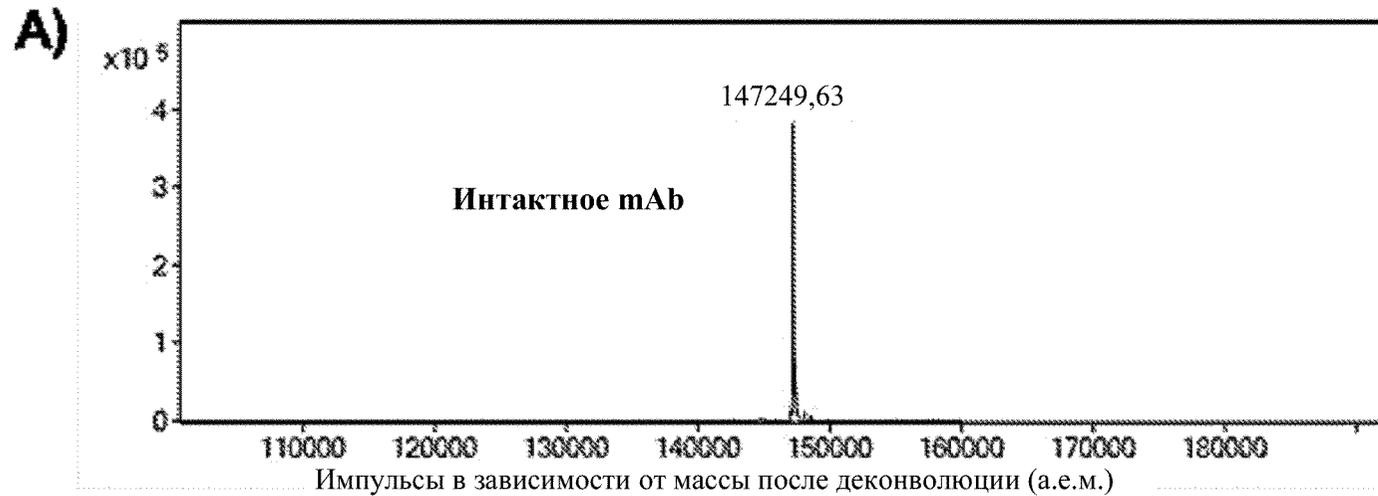
Фигура 11.2. Данные масс-спектрометрического анализа дегликозилированного образца mAb 1C1 K274CP2-NNAA. А) Интактное mAb. В) Изображение данных анализа восстановленного mAb увеличили для того, чтобы показать легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC)



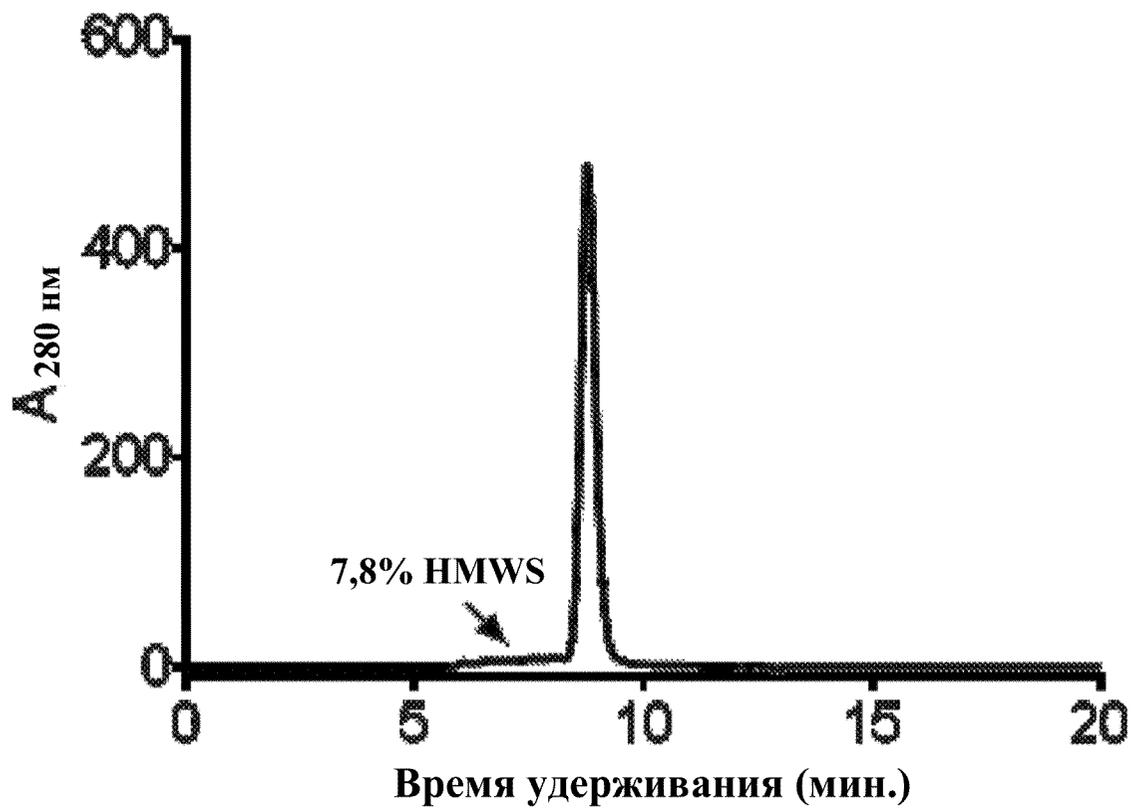
Фигура 11.3. Данные масс-спектрометрического анализа дегликозилированного образца mAb 1C1 S239CP2-NNAА. А) Интактное mAb. В) Изображение данных анализа восстановленного mAb увеличили для того, чтобы показать легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC)



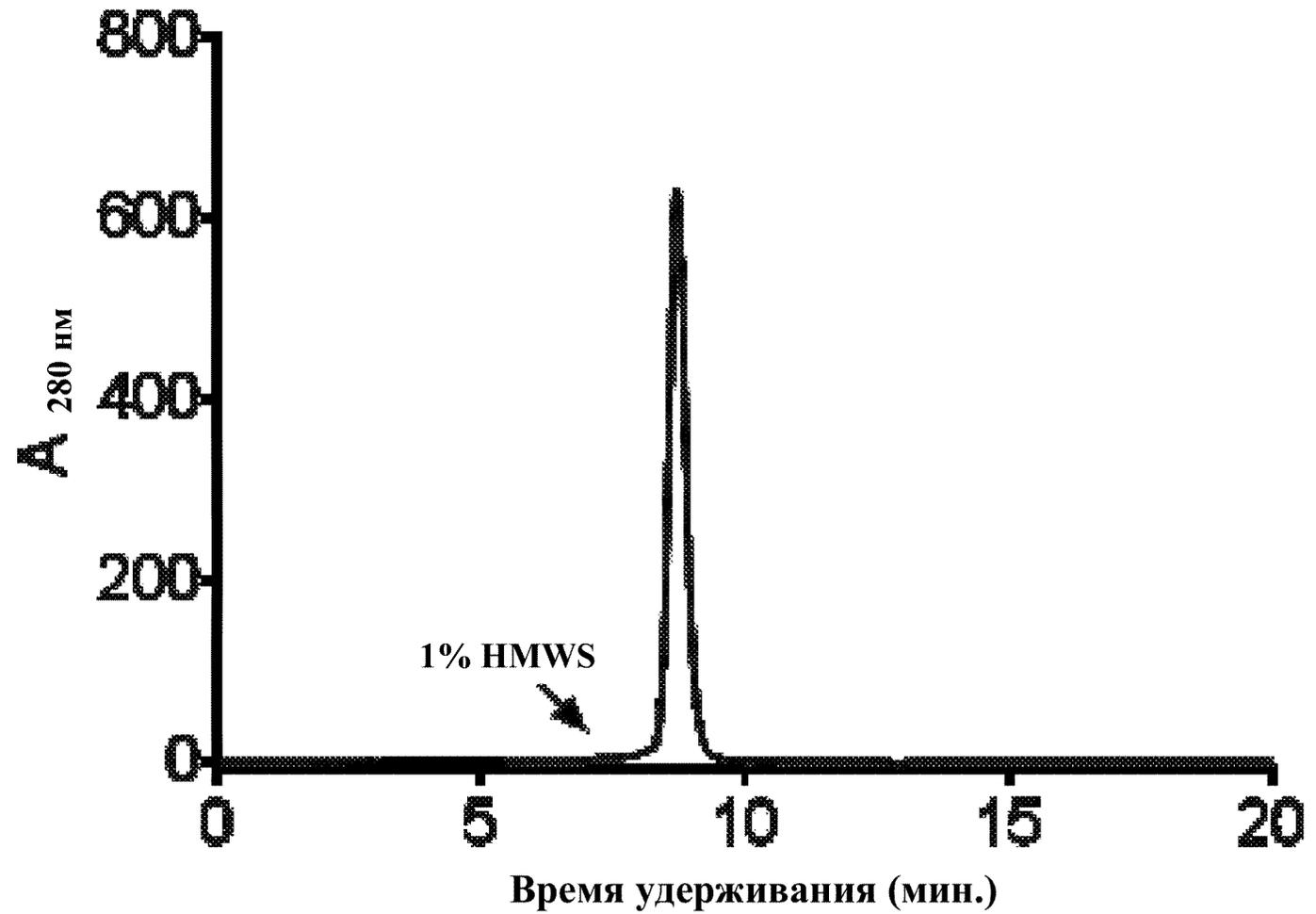
Фигура 11.4. Данные масс-спектрометрического анализа дегликозилированного образца mAb 1C1 дикого типа. А) Интактное mAb. В) Изображение данных анализа восстановленного mAb увеличили для того, чтобы показать легкую цепь (LC) и тяжелую цепь (HC)



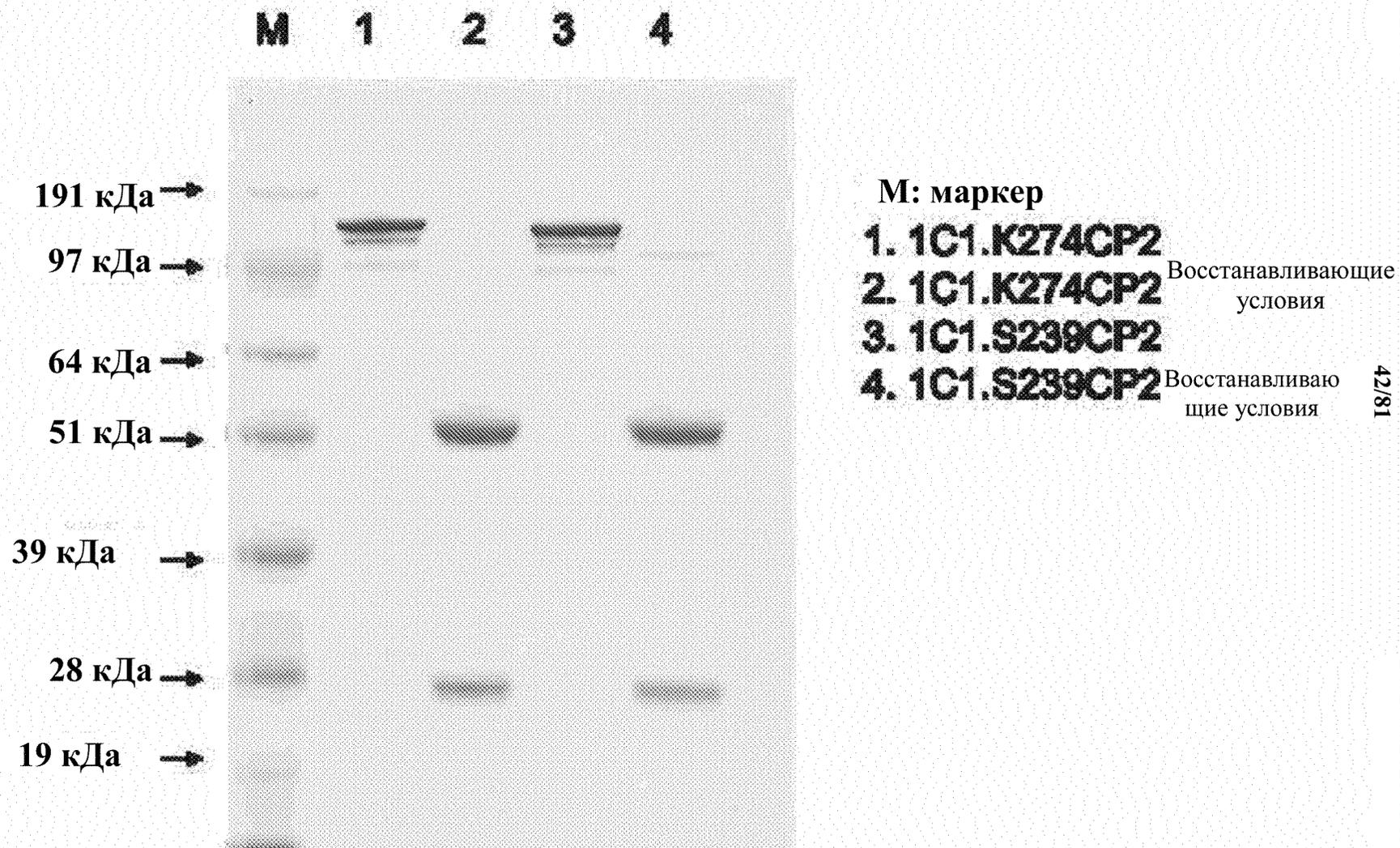
Фигура 11.5. По результатам SEC-анализа mAb 1C1 K274CP2-NNAА определили, что был получен мономерный продукт. Указаны высокомолекулярные фрагменты (HMWS)



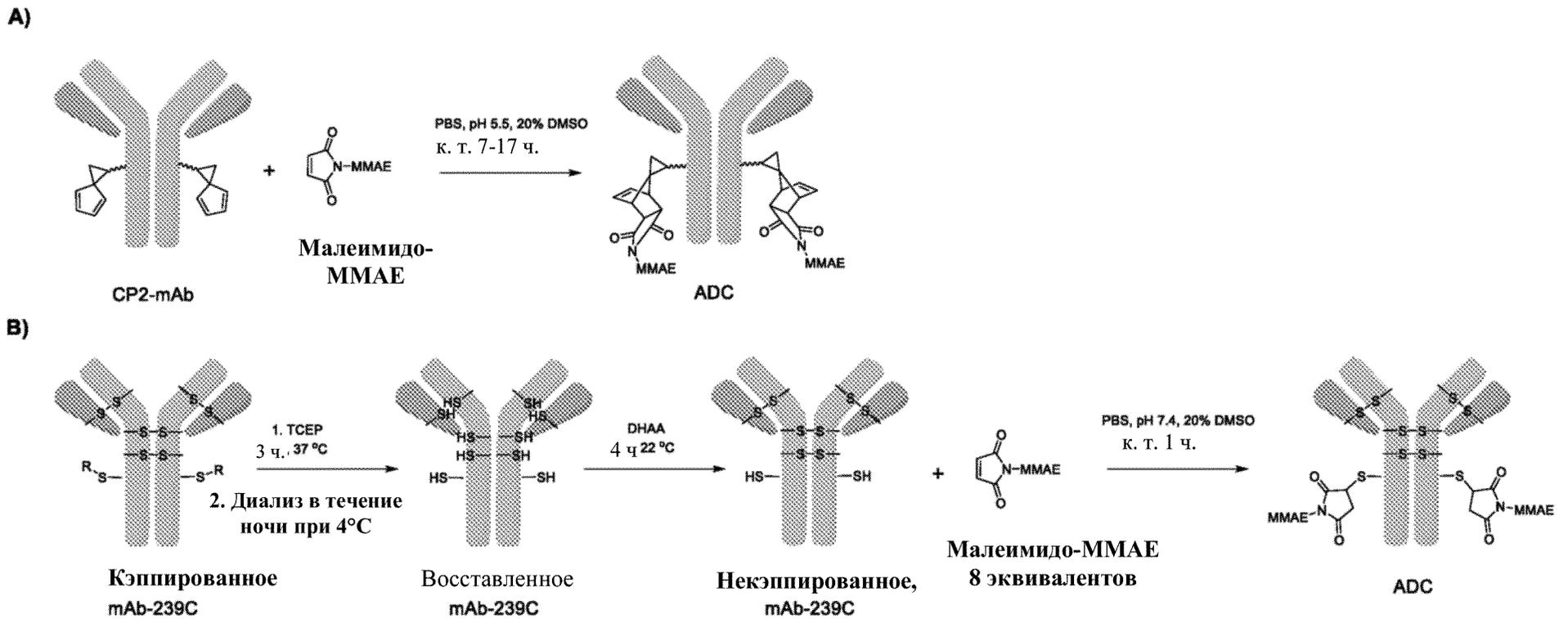
Фигура 11.6. По результатам SEC-анализа mAb 1C1 S239CP2 определили, что был получен мономерный продукт



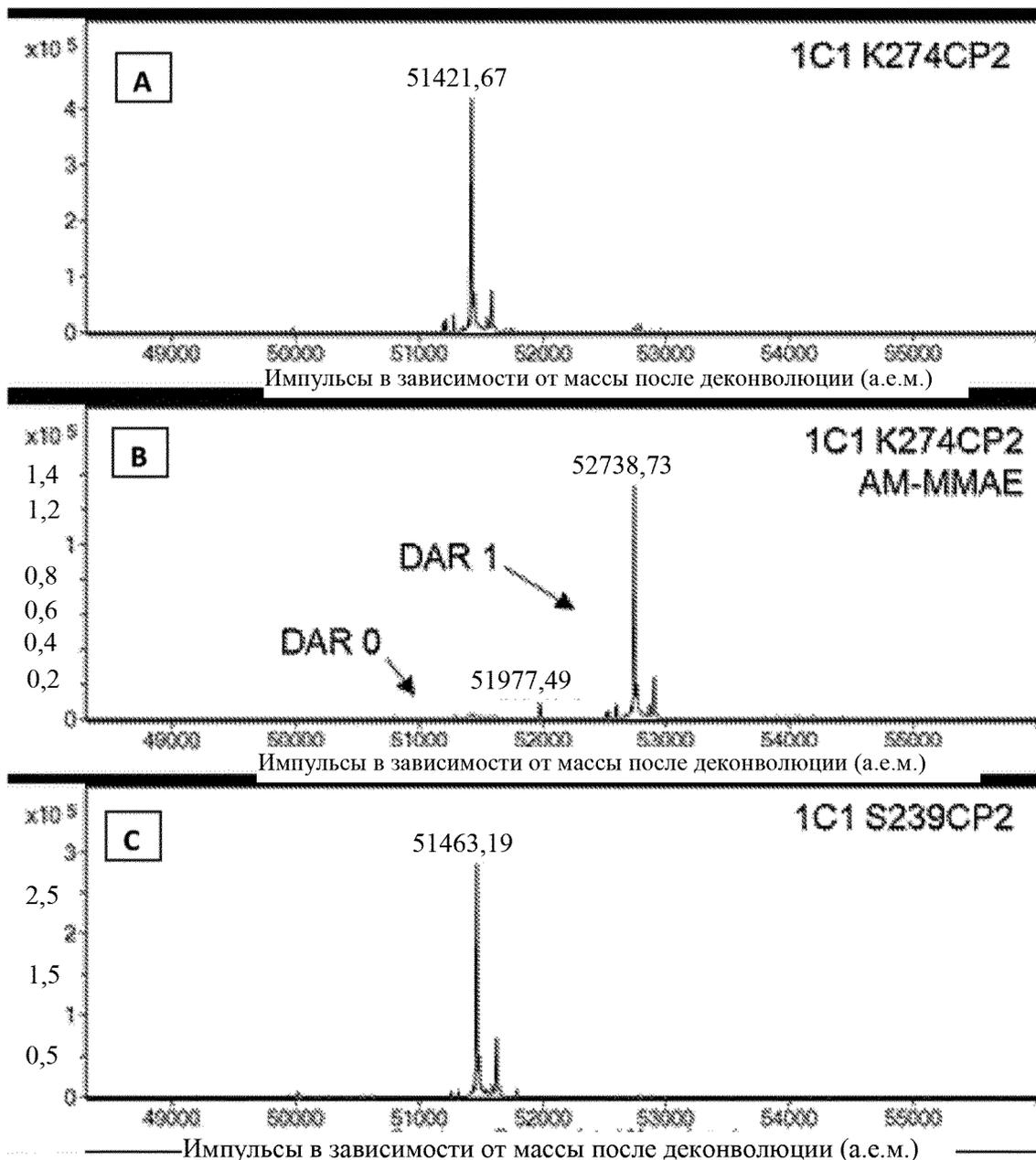
Фигура 11.7. Анализ mAb 1C1 K274CP2 и mAb 1C1-S239CP2 с использованием SDS-PAGE



Фигура 12.1. Получение ADC mAb-CP2-NNAA и ADC mAb-239C

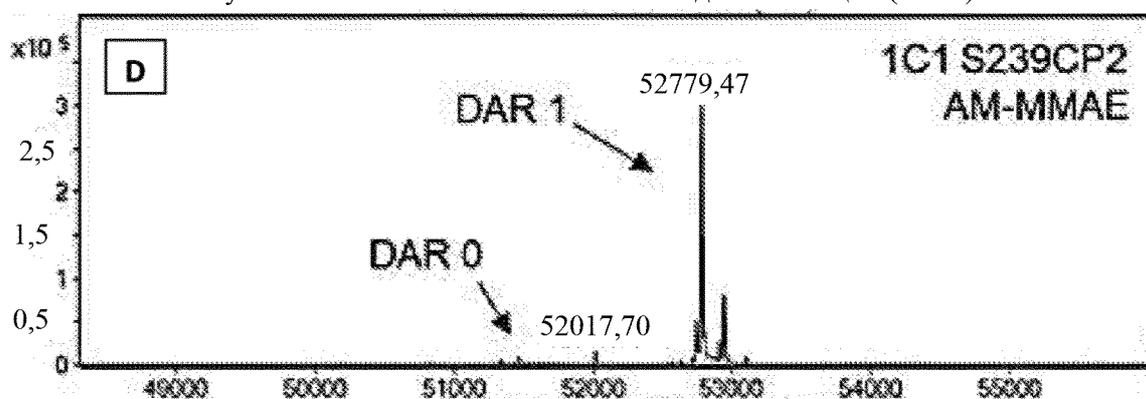


Фигура 12.2. Данные масс-спектрометрического анализа восстановленных гликозилированных образцов mAb-CP2-NNAА и mAb-цистеин до и после реакции с АМ-ММАЕ. График с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать только тяжелую цепь mAb (HC). DAR-0 указывает на отсутствие лекарственного средства, конъюгированного с тяжелой цепью mAb, а DAR-1 указывает на одно лекарственное средство, конъюгированное с тяжелой цепью mAb

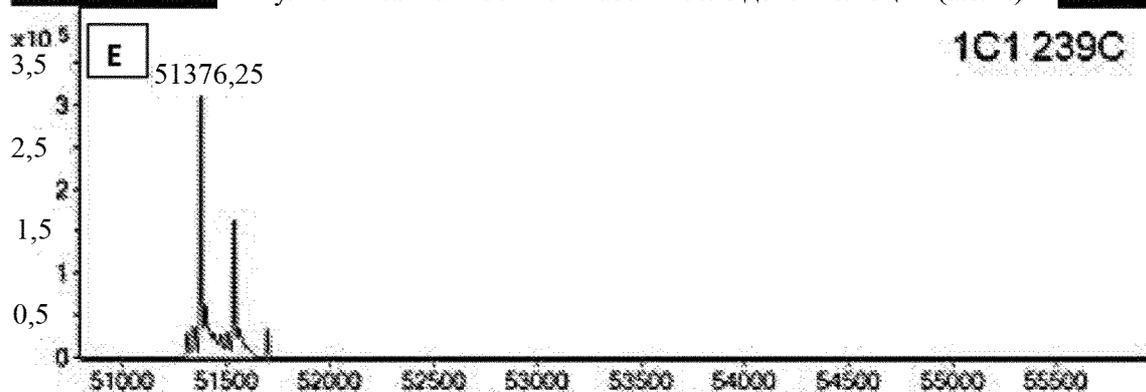


**Фигура 12.2. (Продолжение)** Данные масс-спектрометрического анализа восстановленных гликозилированных образцов mAb-CP2-NNAА и mAb-цистеин до и после реакции с АМ-ММАЕ. График с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать только тяжелую цепь mAb (HC)

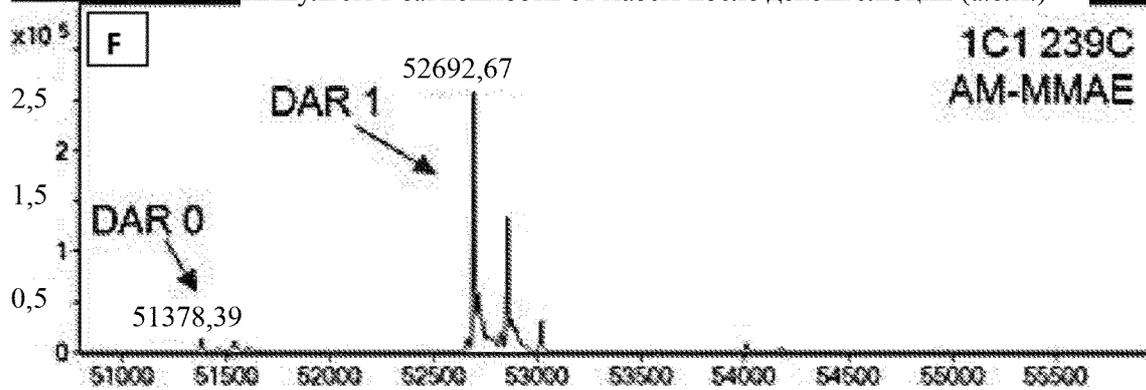
Импульсы в зависимости от массы после деконволюции (а.е.м.)



Импульсы в зависимости от массы после деконволюции (а.е.м.)

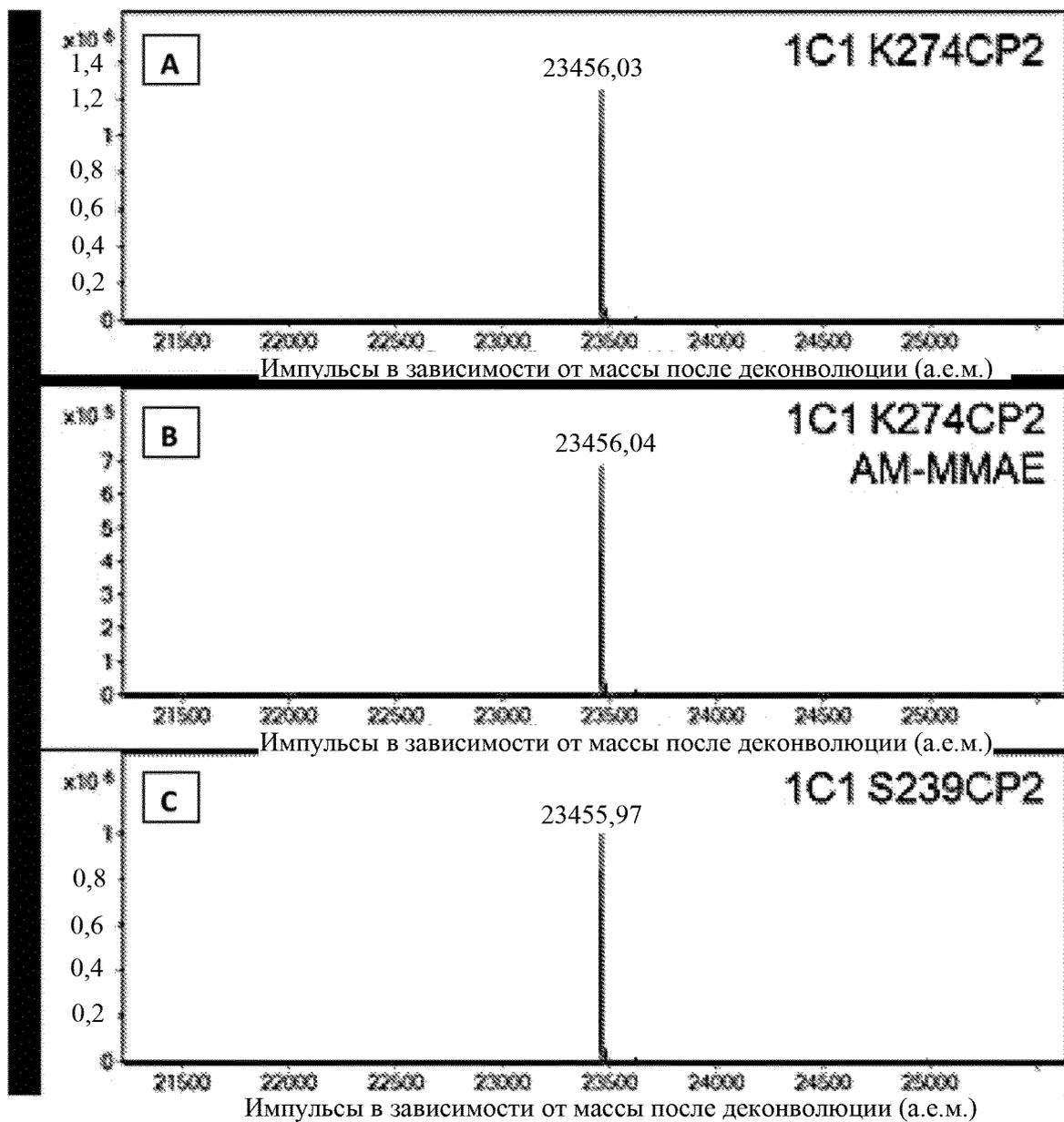


Импульсы в зависимости от массы после деконволюции (а.е.м.)

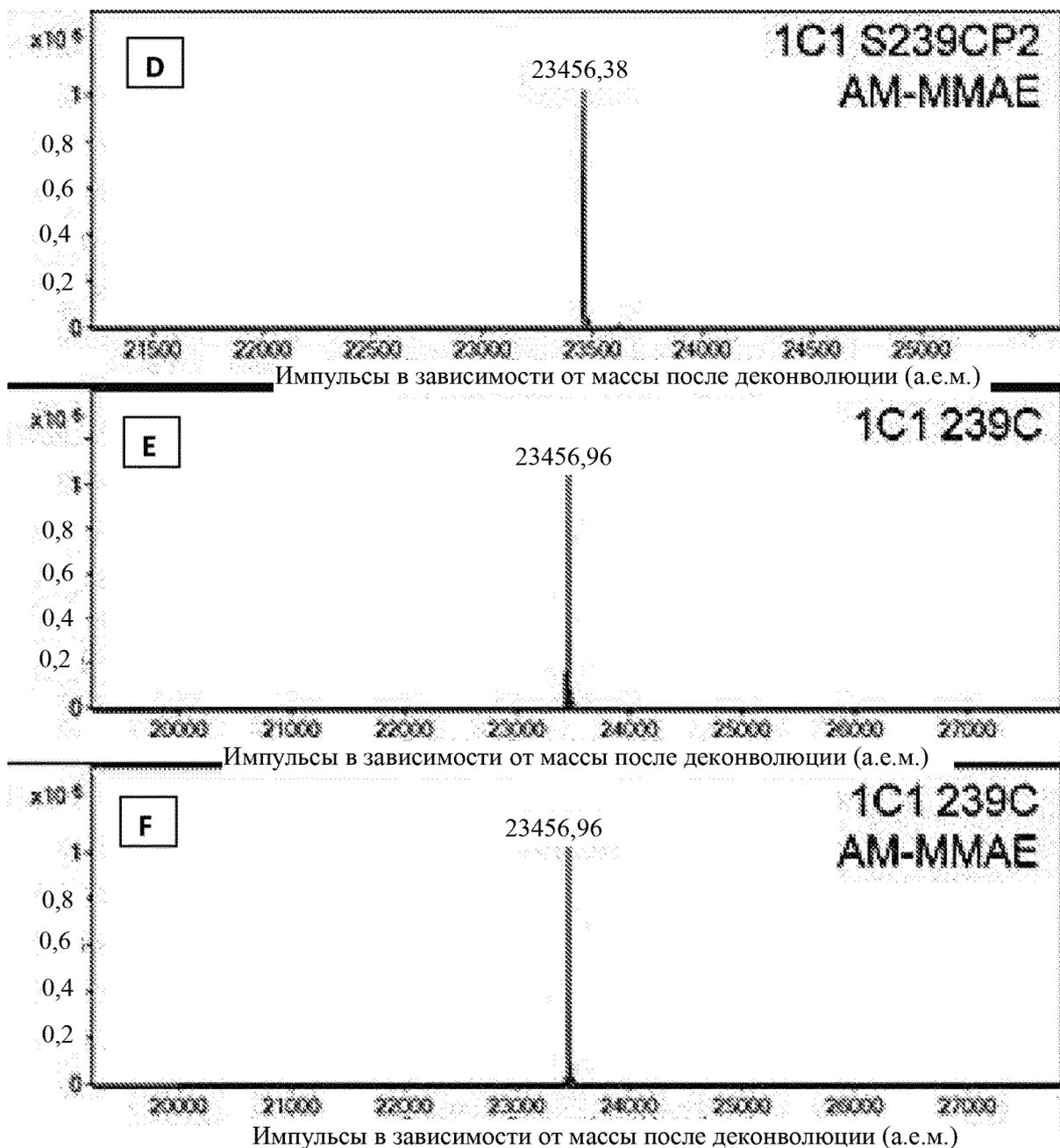


Импульсы в зависимости от массы после деконволюции (а.е.м.)

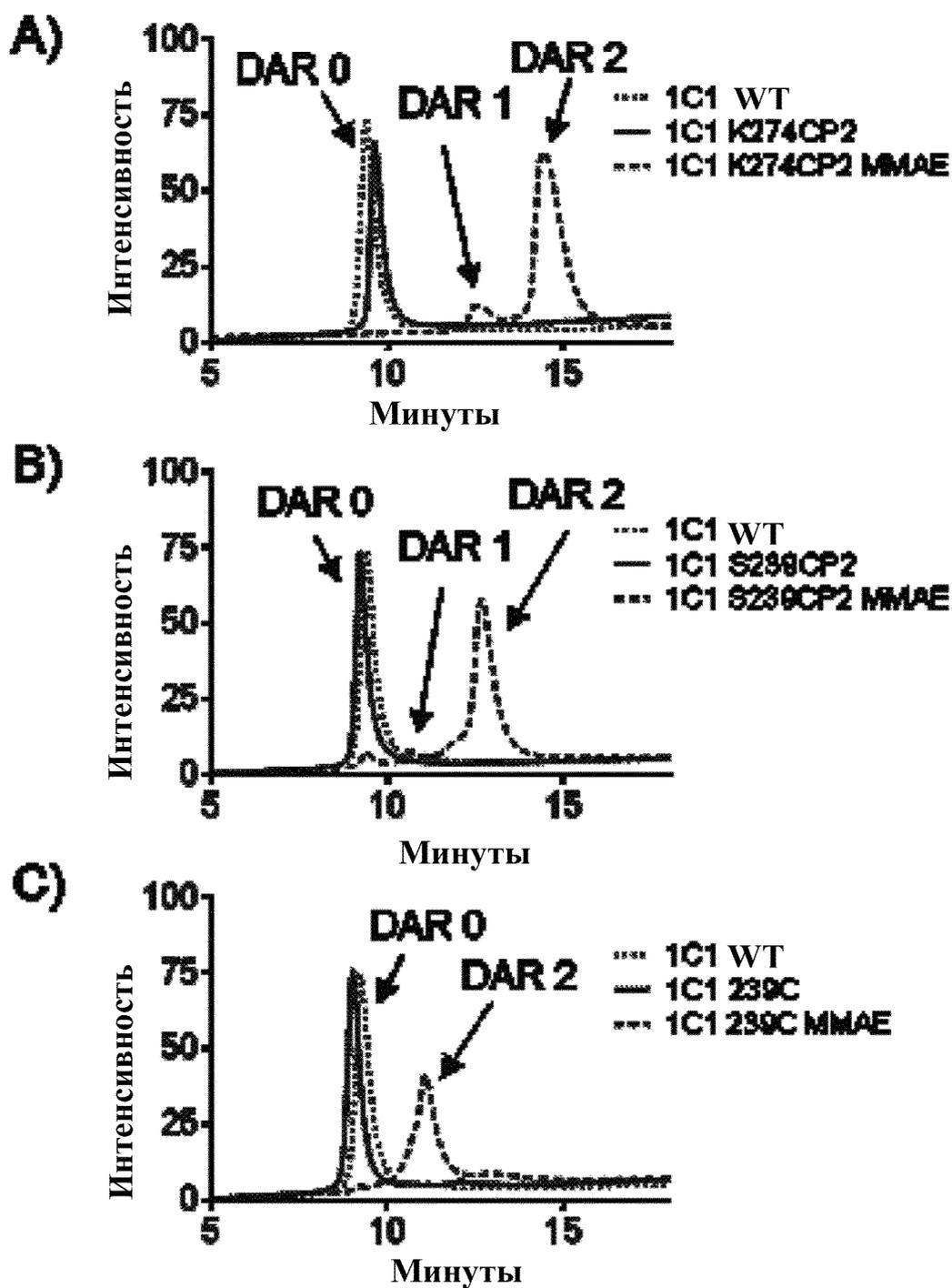
Фигура 12.3. Данные масс-спектрометрического анализа восстановленных гликозилированных образцов mAb-CP2-NNAА и mAb-цистеин до и после реакции с АМ-ММАЕ. График с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать только легкую цепь mAb (LC)



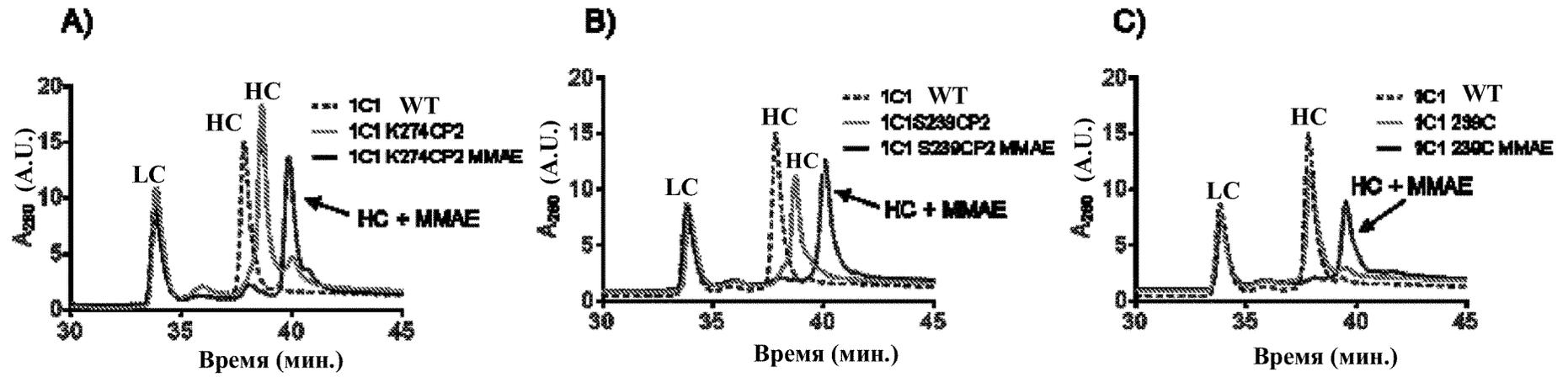
Фигура 12.3. (Продолжение) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленных гликозилированных образцов mAb-CP2-NNAА и mAb-цистеин до и после реакции с AM-MMAE. График с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать легкую цепь mAb



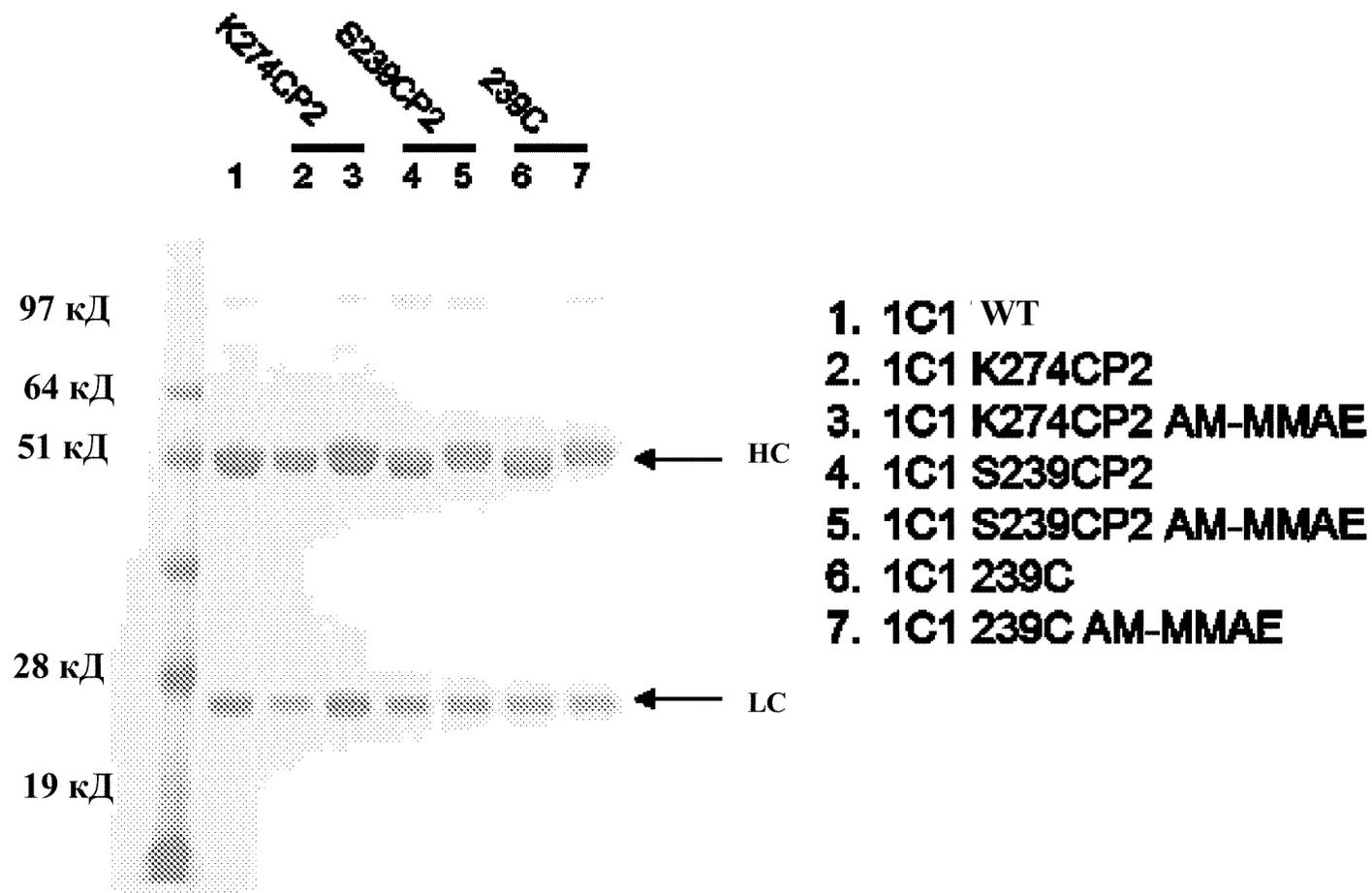
Фигура 12.4. Хроматографический анализ гидрофобных взаимодействий ADC mAb-CP2-NNAА и ADC mAb-цистеин



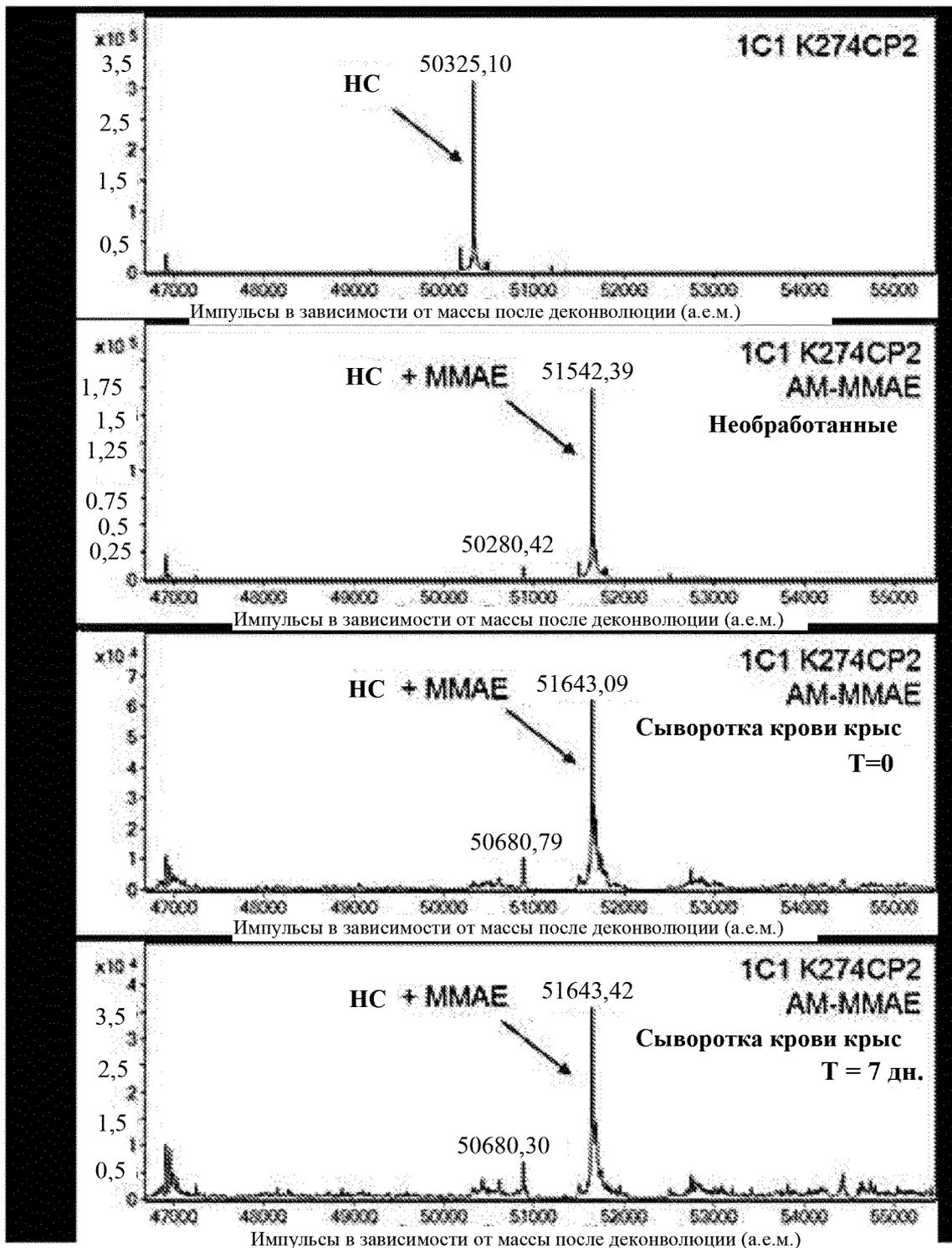
Фигура 12.5. Данные обращенно-фазового высокоэффективного хроматографического анализа восстановленных образцов ADC mAb-CP2-NNAА и mAb-цистеин



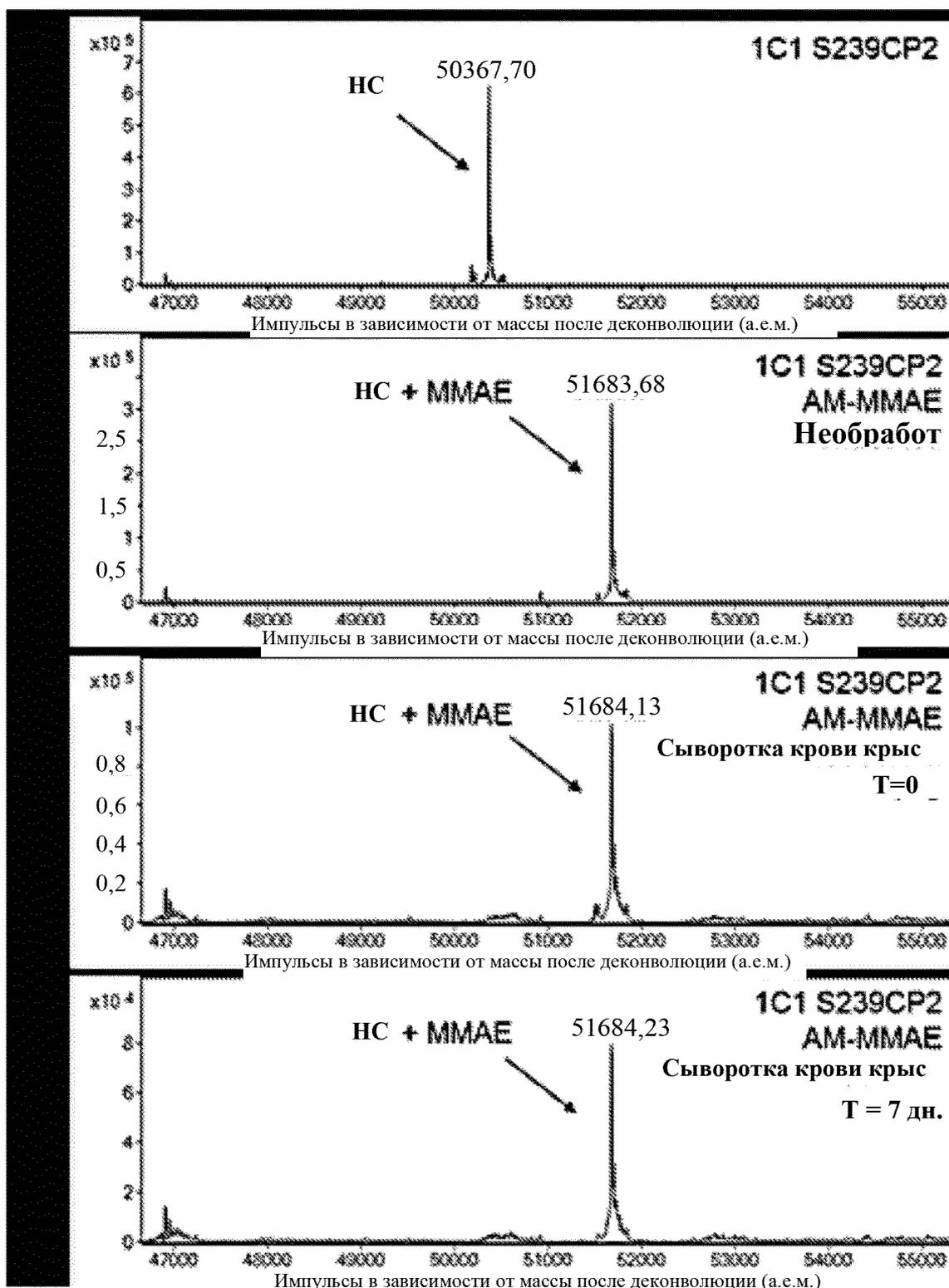
Фигура 12.6. Анализ SDS-PAGE в восстанавливающих условиях ADC mAb-CP2-NNAА и mAb-цистеина



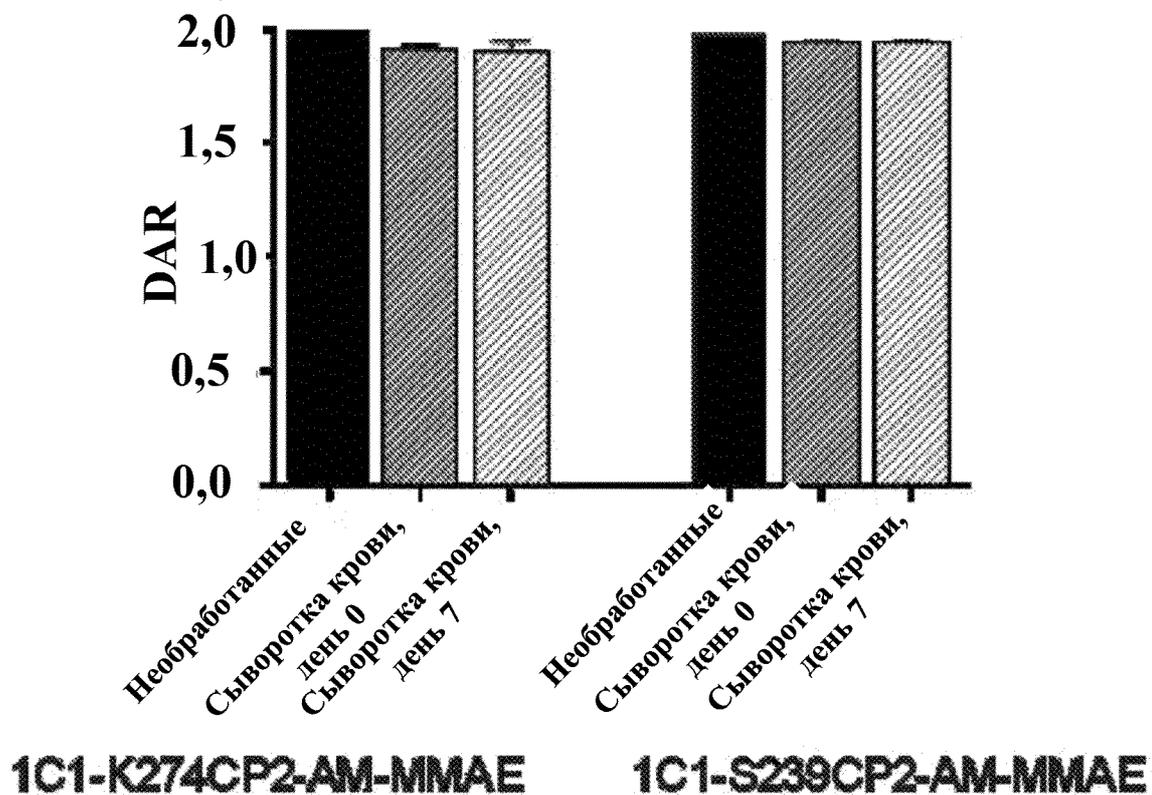
**Фигура 12.7. Изображены данные масс-спектрометрического анализа восстановленного дегликозилированного образца ADC mAb-CP2-NNAА до и после инкубации в сыворотке крови крыс в течение 7 дней при 37°С**



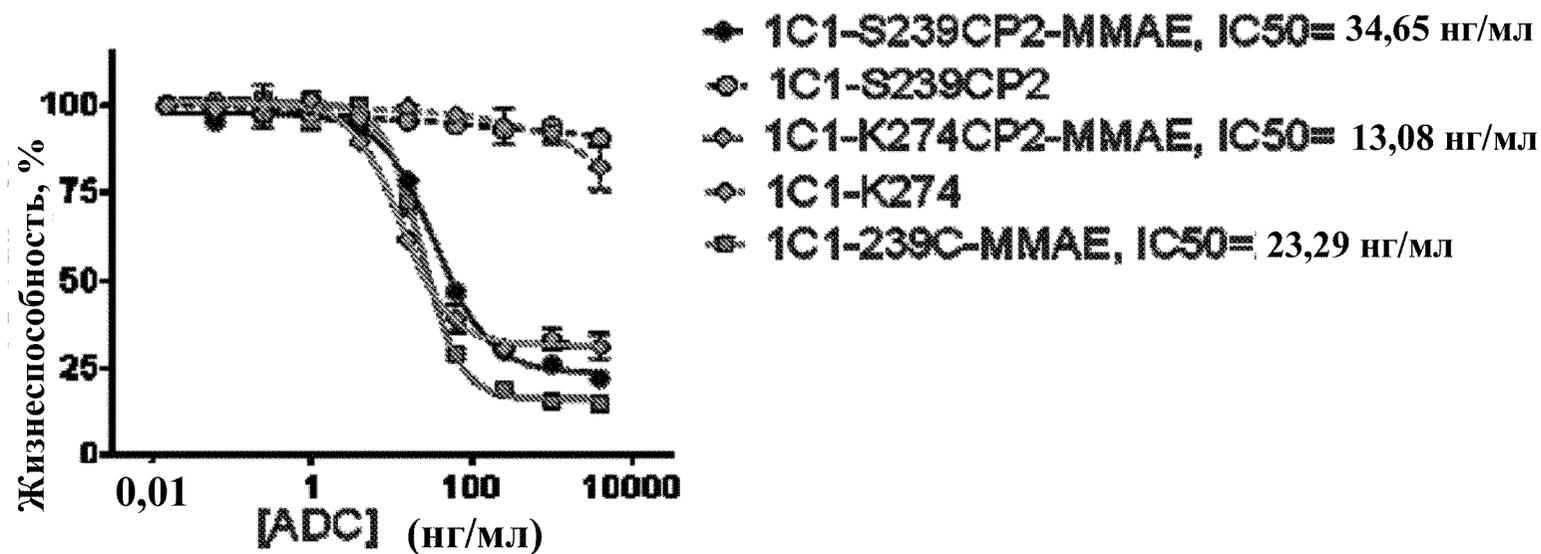
Фигура 12.7. (Продолжение) Изображены данные масс-спектрометрического анализа восстановленного дегликозилированного образца ADC mAb-CP2-NNAА до и после инкубации в сыворотке крови крыс в течение 7 дней при 37°С



Фигура 12.8. Количественно определение DAR ADC mAb-CP2-NNAА до и после инкубации в сыворотке крови крысы в течение 7 дней при 37°C. DAR рассчитывали исходя из высот пиков масс-спектров, показанных на фигуре 12.7. Значения представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение, n=3. В данных условиях потерю лекарственного средства не выявили

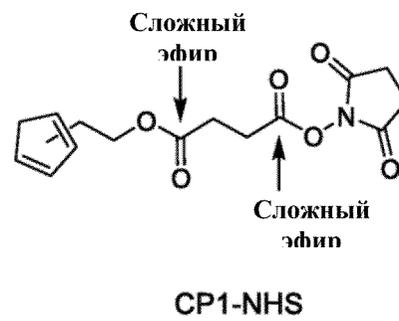


Фигура 12.9. Цитотоксичность ADC mAb-CP2-NNAА и mAb-цистеин по отношению к раковым клеткам PC3 in vitro. ADC mAb-CP2-NNAА AM-MMAE проявляли активность, сходную с аналогичными активностями аналогичного ADC, полученного с помощью сайт-специфического конъюгирования цистеинов с AM-MMAE

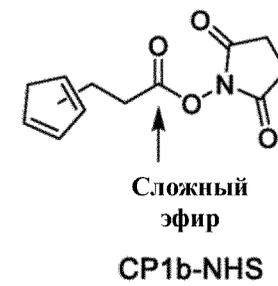


Фигура 13.1. Обзор положений сложноэфирных связей в линкерах А) CP1-NHS и В) CP1b-NHS

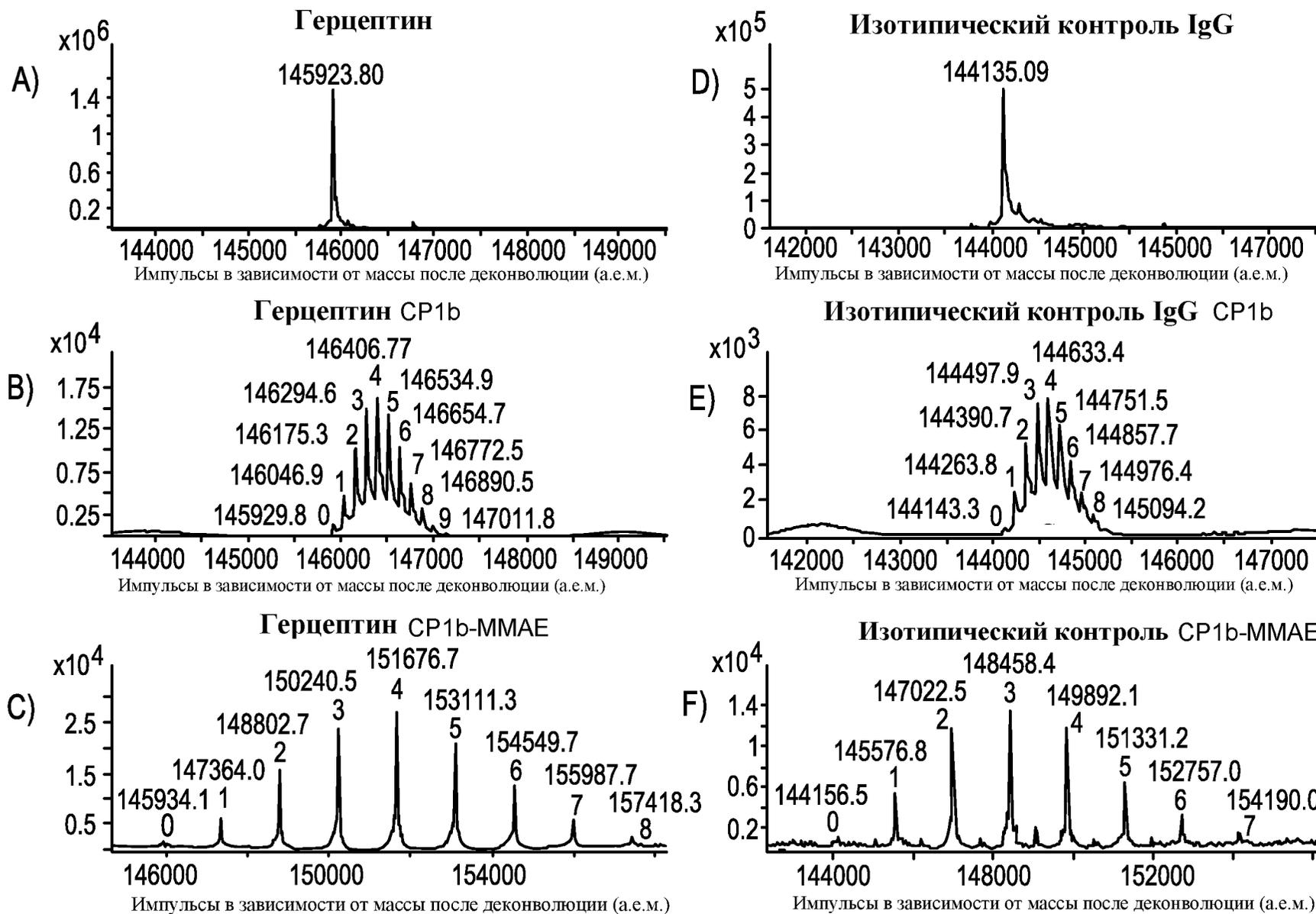
A)



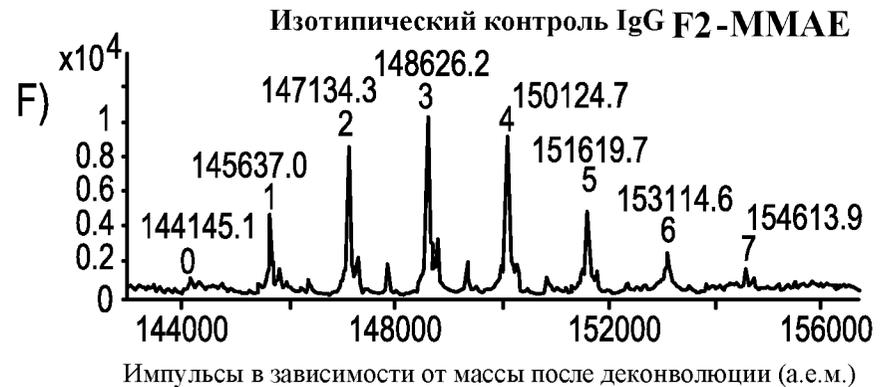
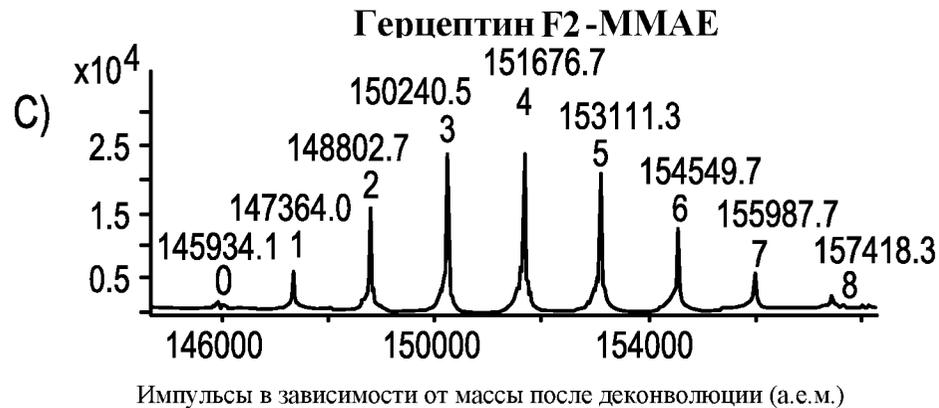
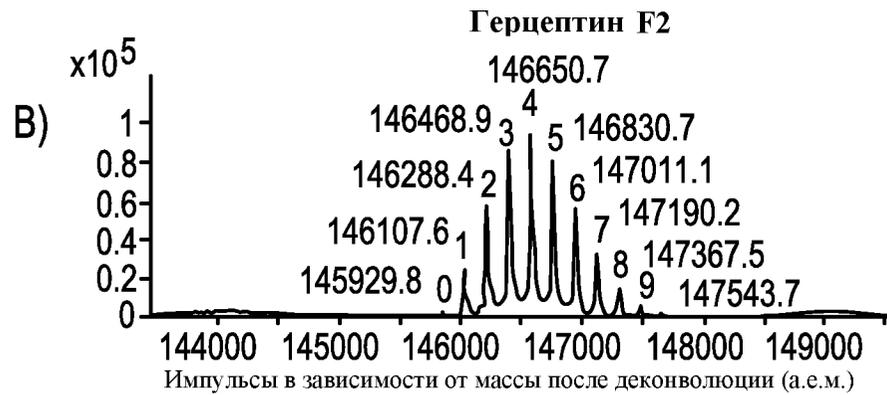
B)



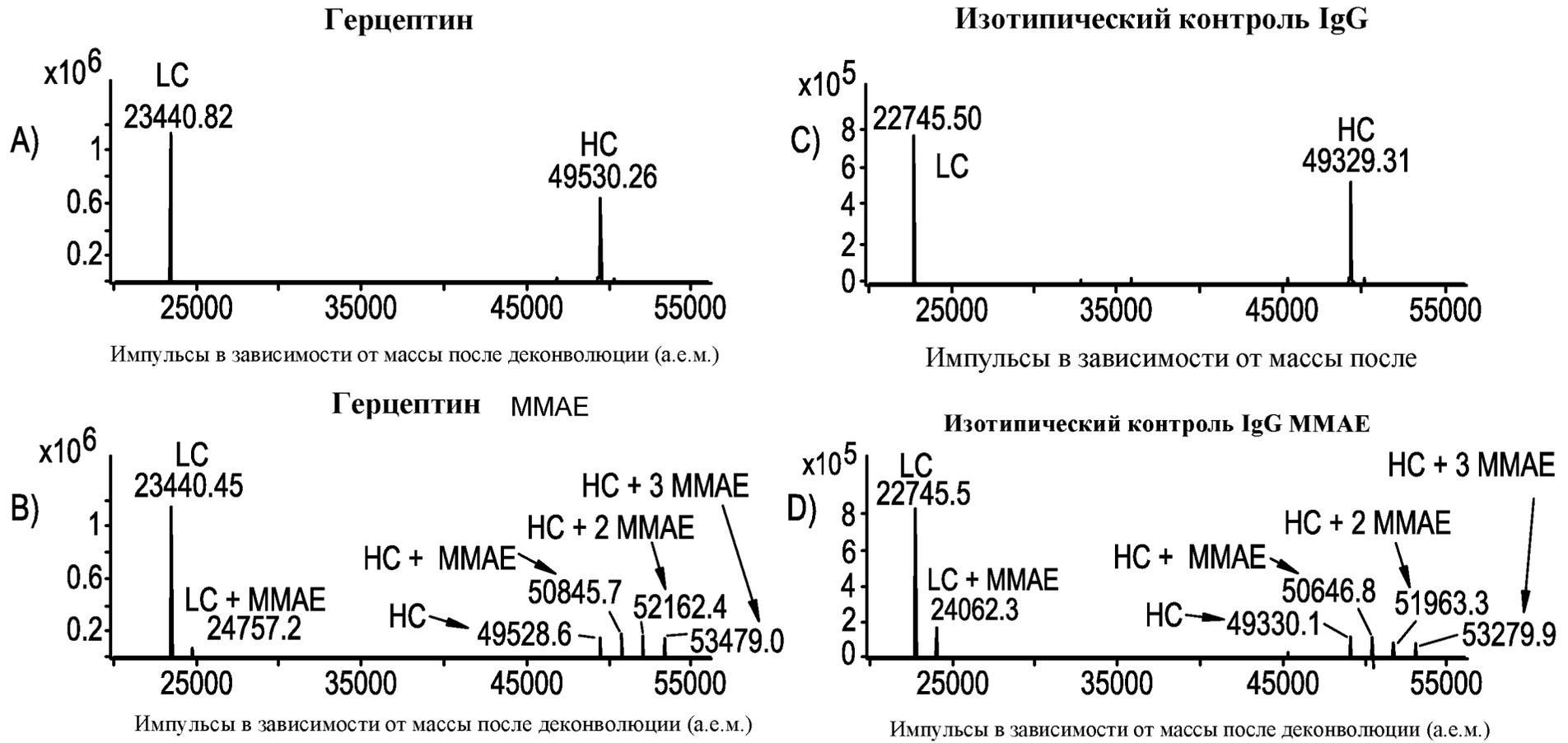
Фигура 14.1. Данные масс-спектрометрического анализа конъюгатов mAb-CP1b



Фигура 14.2. Данные масс - спектрометрического анализа конъюгатов mAb-F2

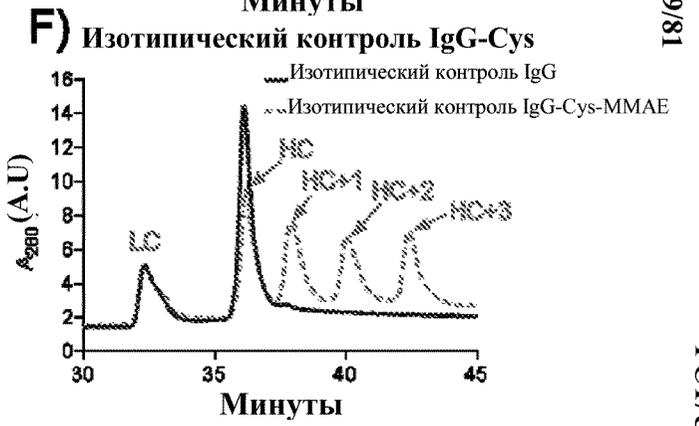
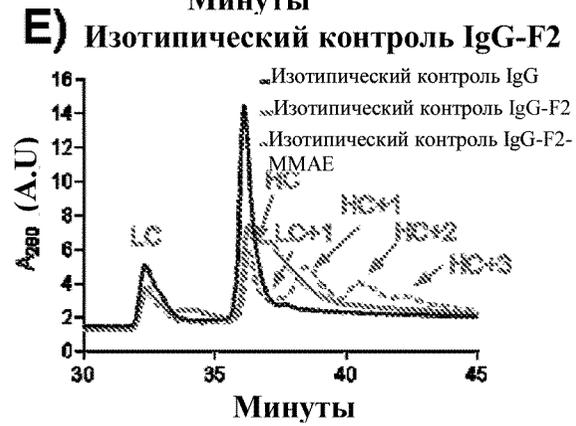
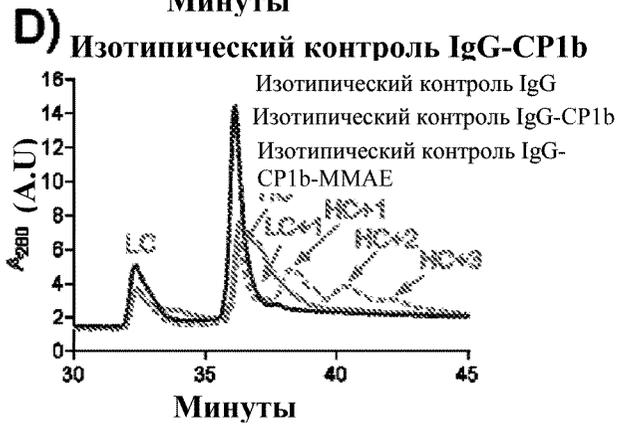
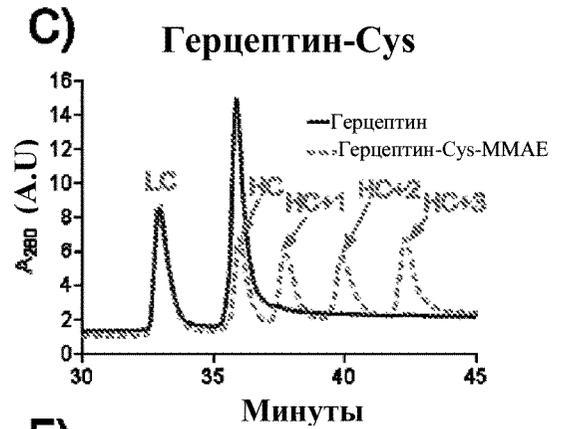
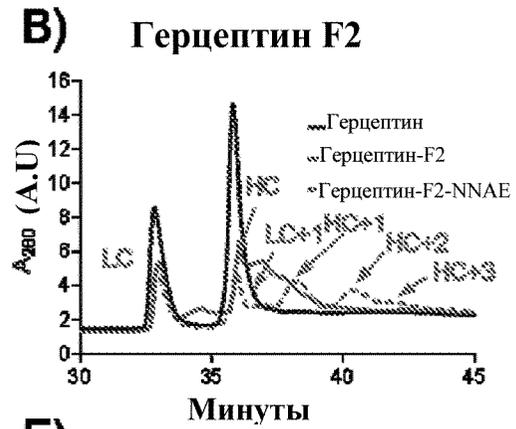
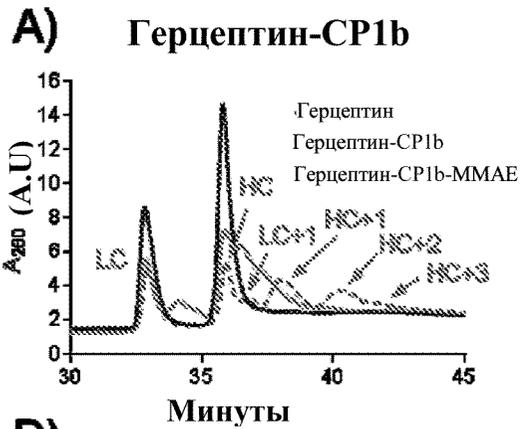


Фигура 14.3. Данные масс-спектрометрического анализа конъюгатов mAb-Cys

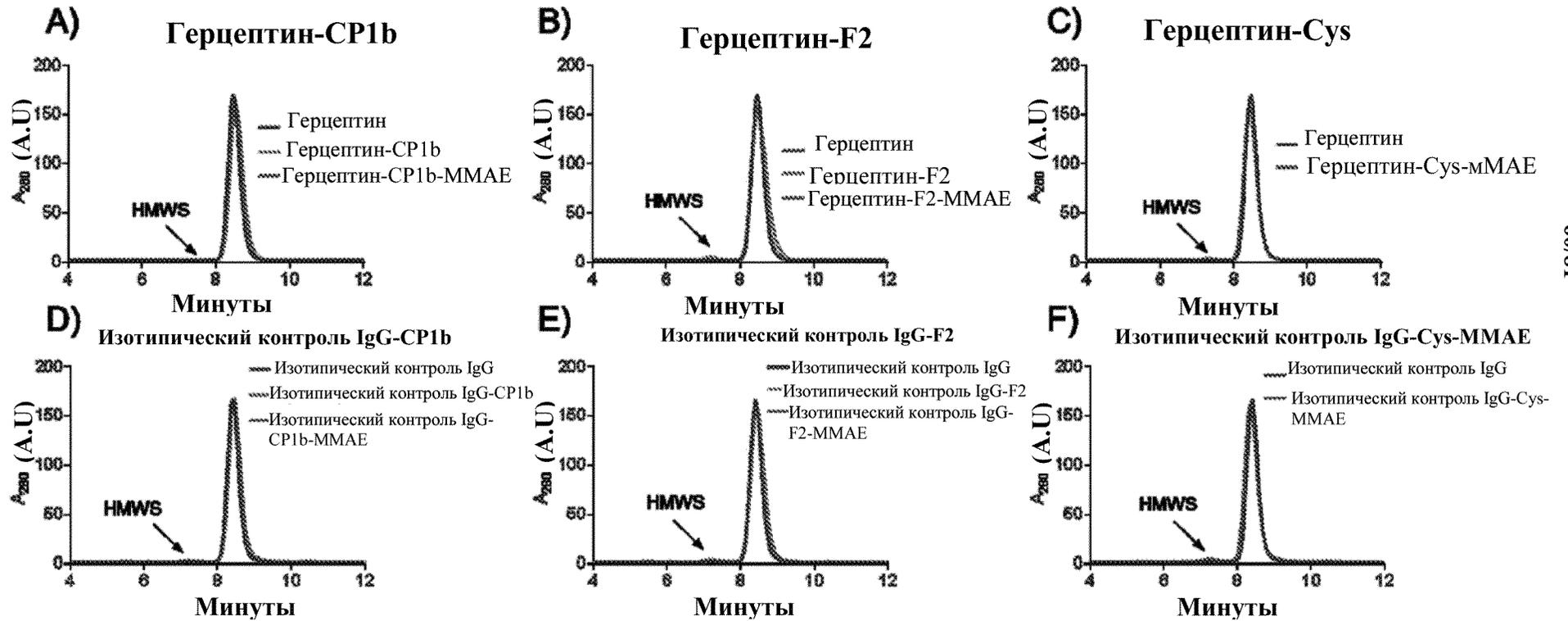


Фигура 14.4. rRp-HPLC-анализ mAb, конъюгатов mAb-линкер и ADC

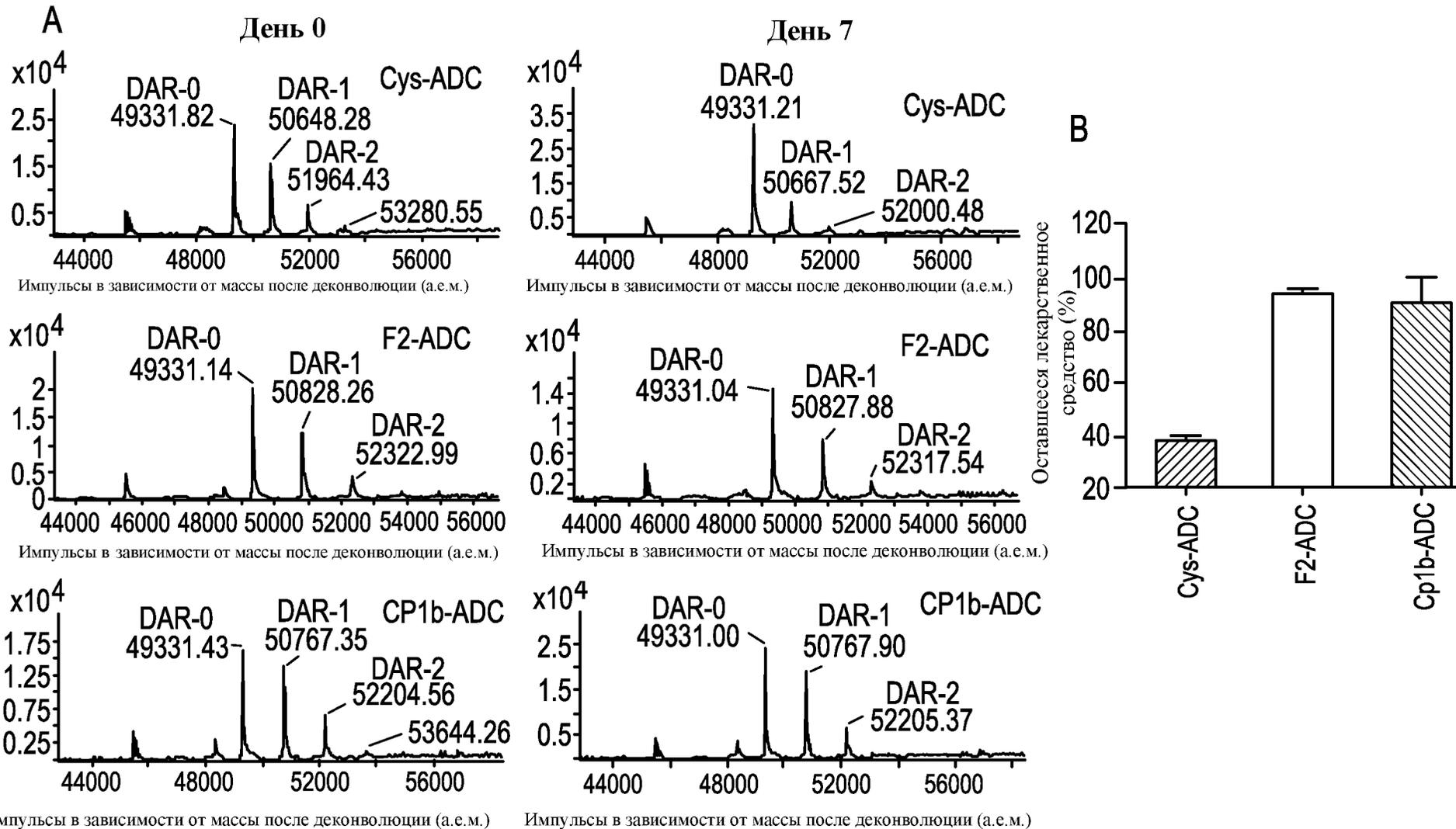
ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ  
к ответу на запрос формальной экспертизы от 01.04.2020



Фигура 14.5. SEC-анализ mAb, конъюгатов mAb-линкер и ADC

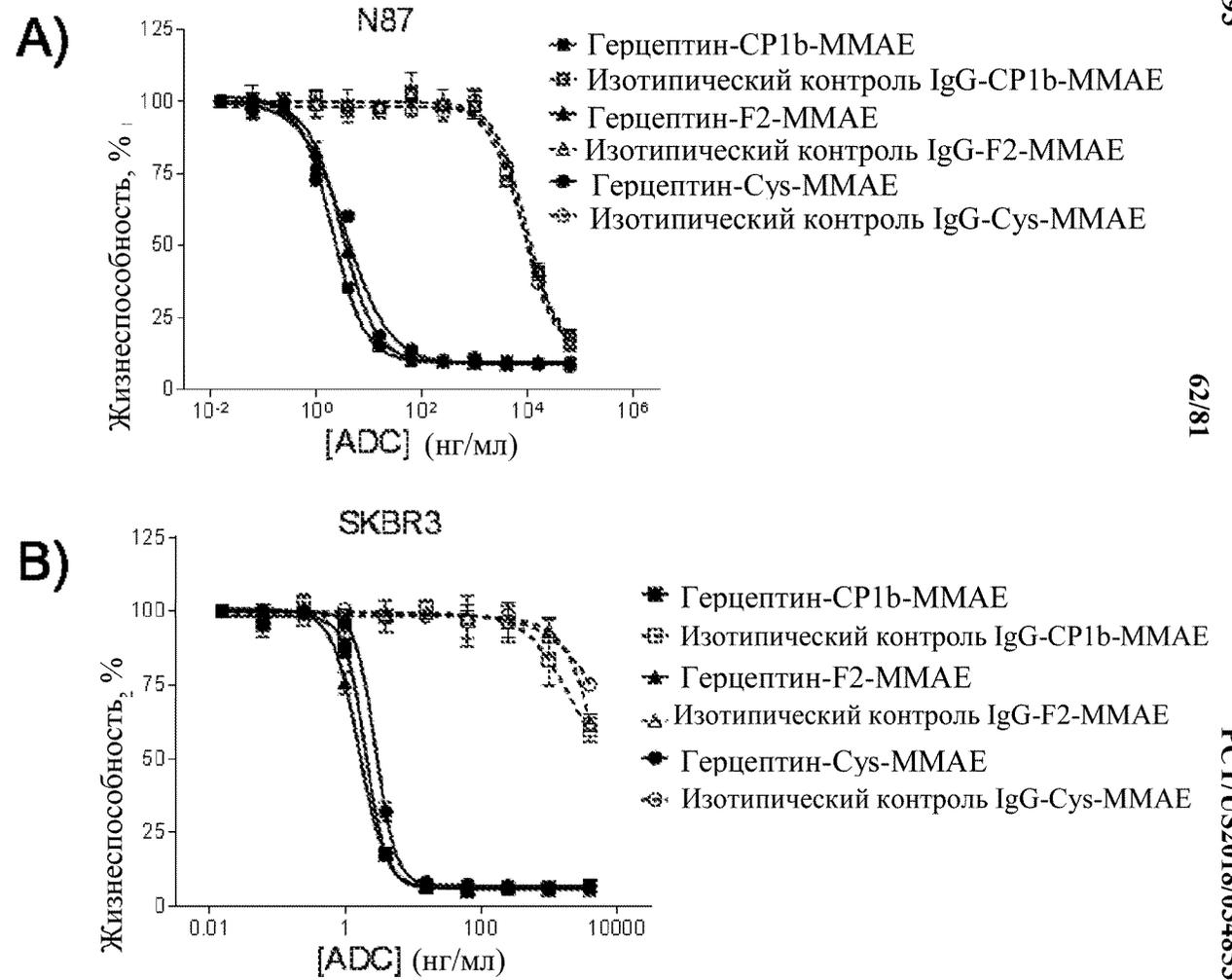


**Фигура 14.6. А) Данные масс спектрометрического анализа ADC после инкубации в сыворотке крови крысы в течение 7 дн. В) Количественные показатели остаточного лекарственного средства (%), рассчитанные с использованием данных масс-спектрометрии. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение, n=3. ADC получали с помощью реакции присоединения малеимид-мМАЕ по Дильсу-Альдеру или Михаэлю**

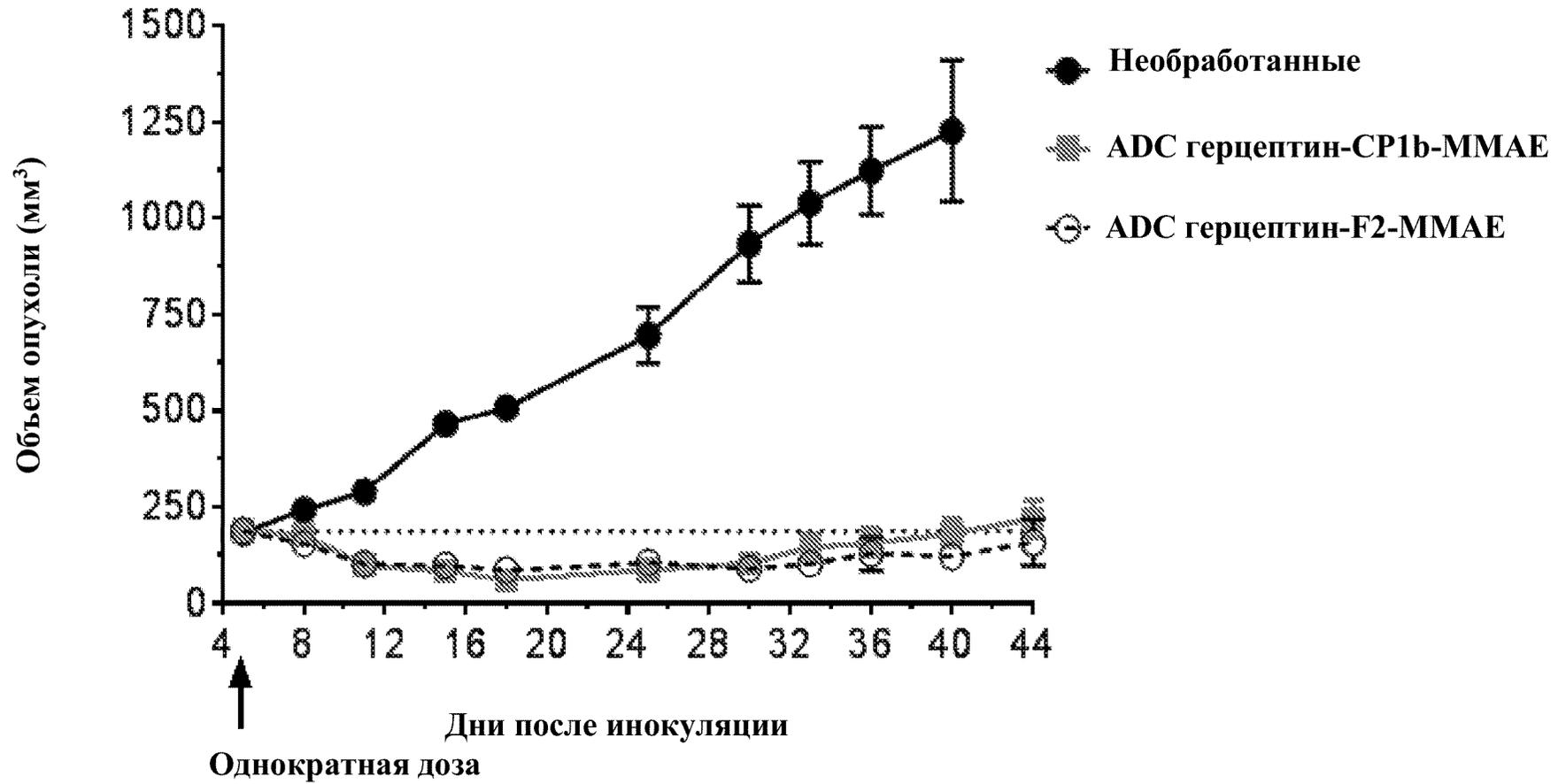


ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ  
к ответу на запрос формальной экспертизы от 01.04.2020

Фигура 14.7. Активность ADC in vitro



Фигура 14.8. Активность ингибирования опухолевого роста с помощью ADC герцептин-линкер MMAE в отношении опухолевой модели мышей, полученной с помощью подкожного введения N87



**Фигура 15.1.** Анализ с помощью SDS-PAGE mAb 1C1 K274CP1-NNAА. А) Необработанное mAb. В) ADC, полученные с AZ1508

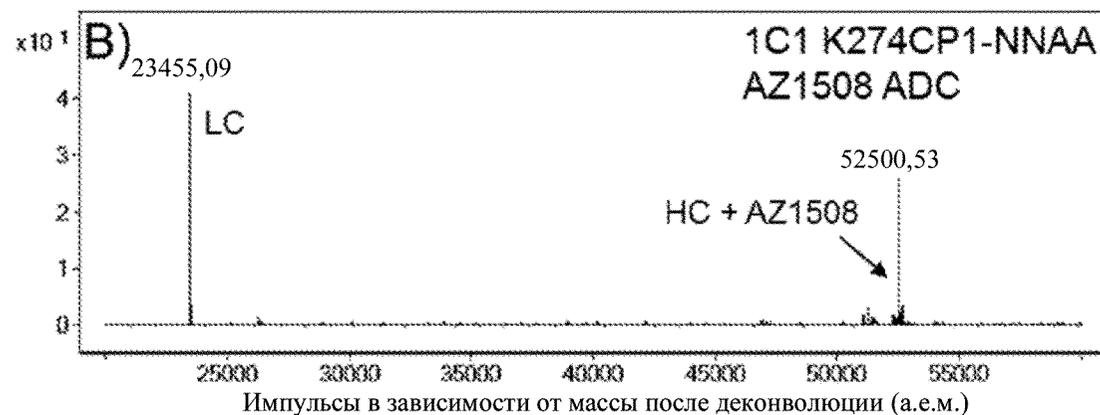
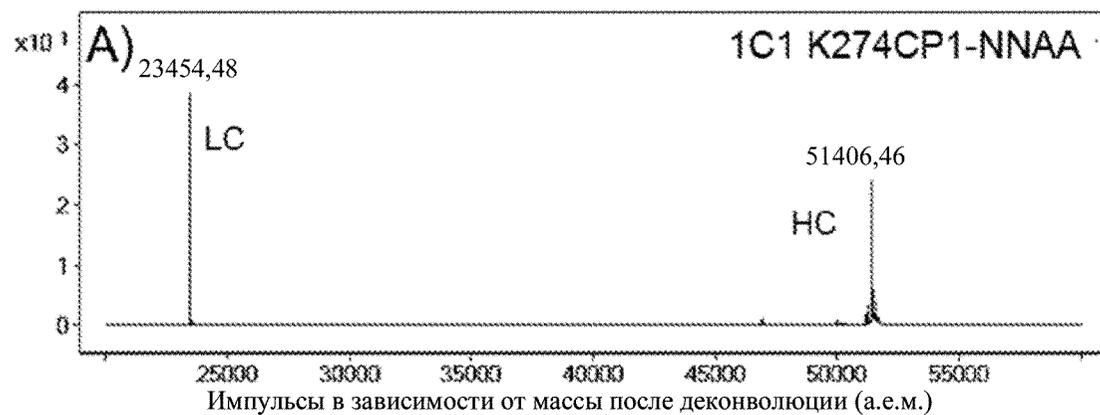


**М = маркер**

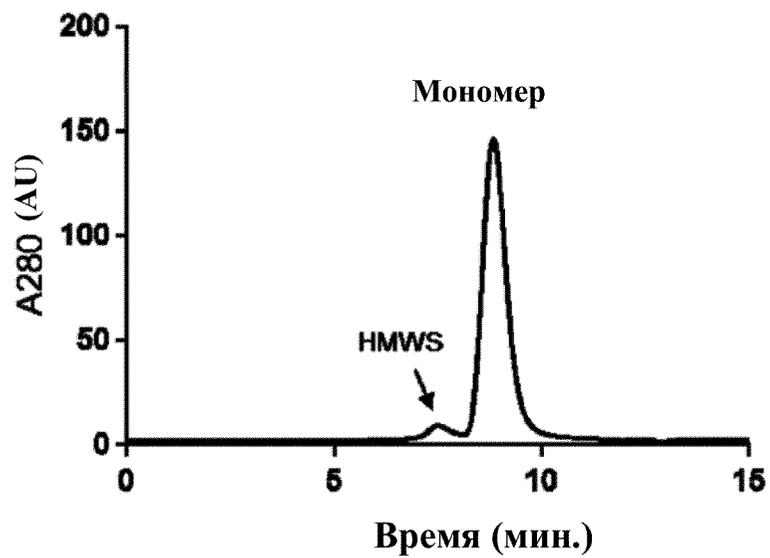
**А = 1C1 K274CP1-NNAА AZ1508 Невосстанавливающие условия**

**В = 1C1 K274CP1-NNAА AZ1508 Восстанавливающие условия**

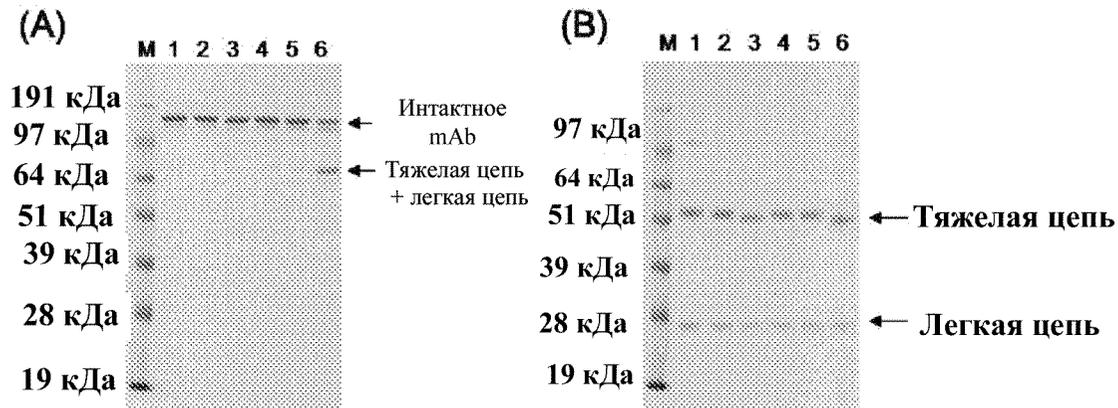
Фигура 15.2. Изображены данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта конъюгирования mAb 1C1 K274CP1-NNAA с AZ1508. А) Необработанный mAb. В) Продукт реакции с AZ1508. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую (HC) цепь, и легкую (LC) цепь антитела



Фигура 15.3. Результаты SEC-анализа ADC 1C1 K274CP1-NNAА AZ1508, указывающие, что был получен высокомономерный продукт. Указаны высокомолекулярные твердые вещества (HMWS)



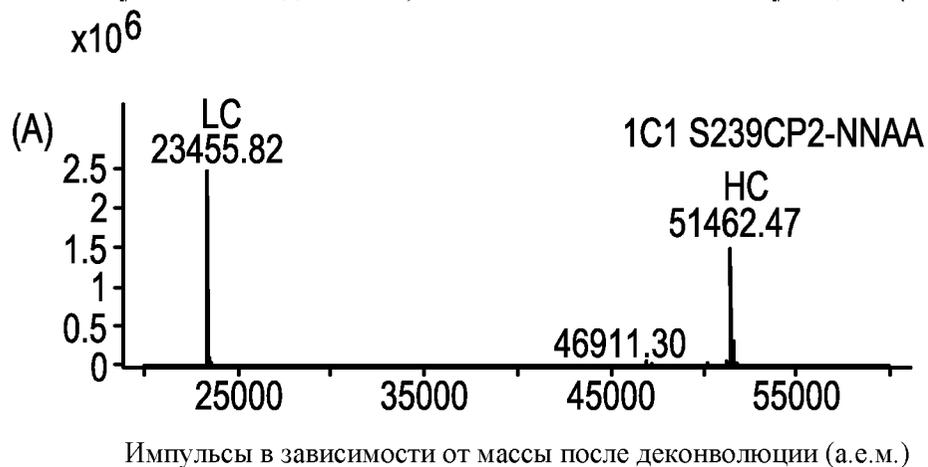
Фигура 16.1. Анализ SDS-PAGE ADC 1C1 CP2-NNAА AZ1508 и ADC 1C1-цистеин AZ1508. А) Невосстановленные образцы. В) восстановленные образцы



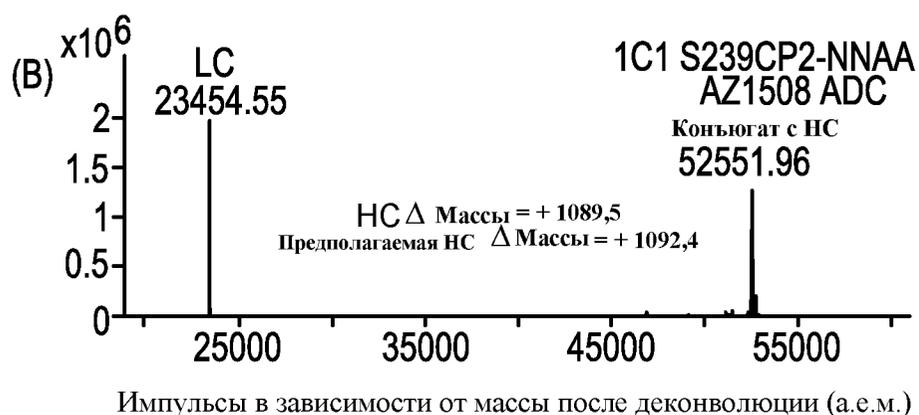
**М:** маркер

- 1 = 1C1 S239CP2-NNAА AZ1508
- 2 = 1C1 K274CP2-NNAА AZ1508
- 3 = 1C1 N297CP2-NNAА AZ1508
- 4 = 1C1 S239C AZ1508
- 5 = 1C1 K274C AZ1508
- 6 = 1C1 N297C AZ1508

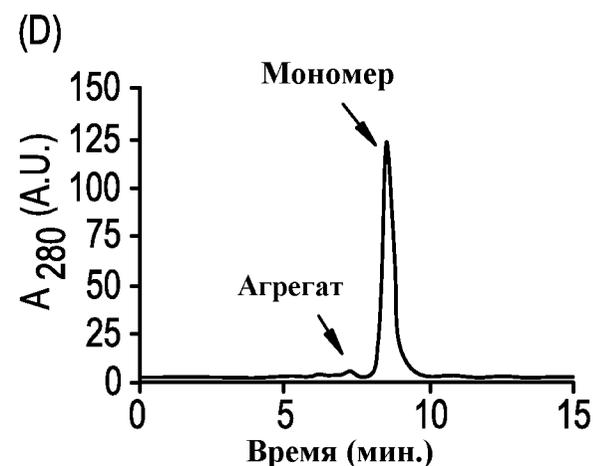
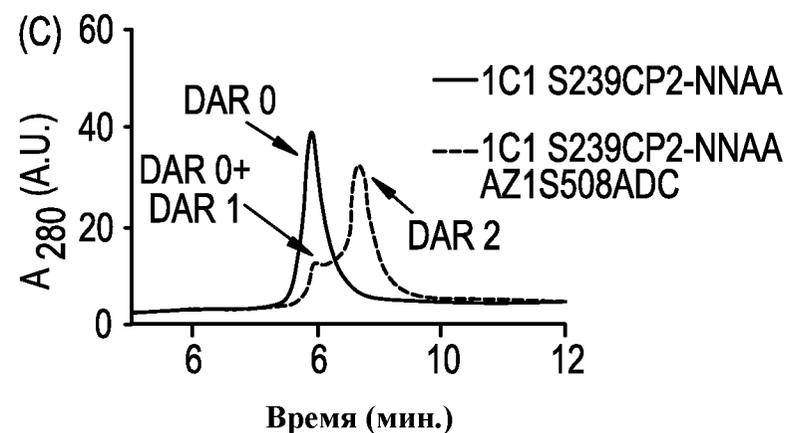
Фигура 16.2. Результаты анализа ADC 1C1 S239CP2-NNAА AZ1508. А) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного образца mAb, не вступившего в реакцию. В) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта реакции с AZ1508. С) HIC-анализ продуктов конъюгирования не вступившего в реакцию антитела с AZ1508. D) SEC-анализ продукта реакции с AZ1508. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую цепь (HC), и легкую (LC) цепи в (А) и (В)



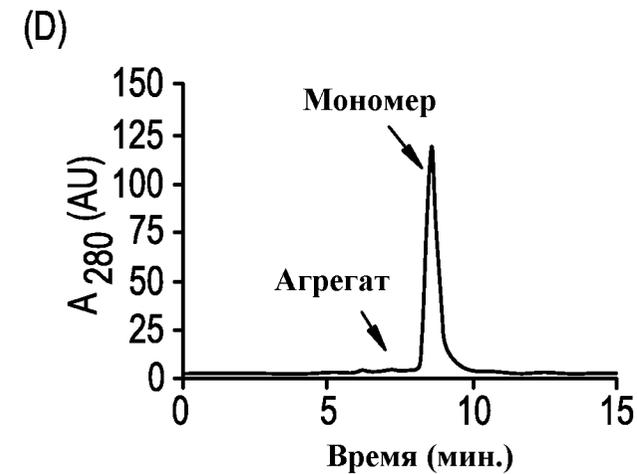
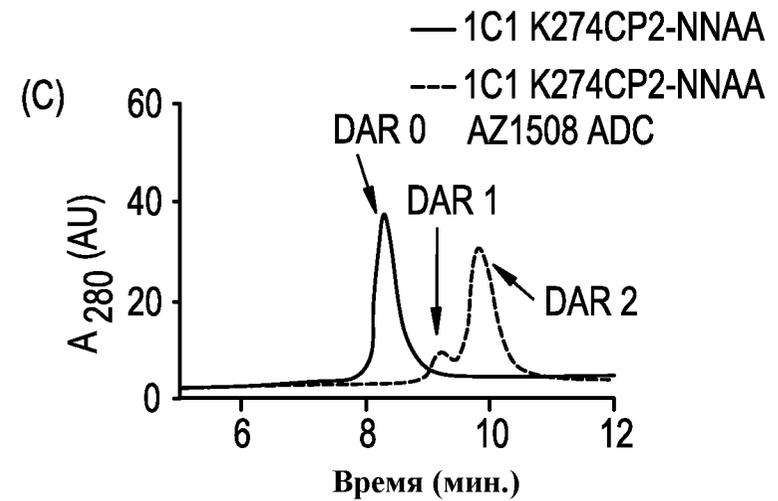
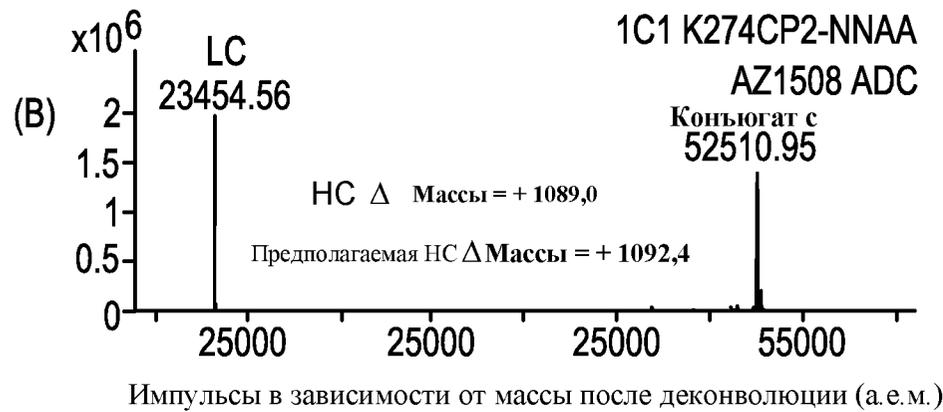
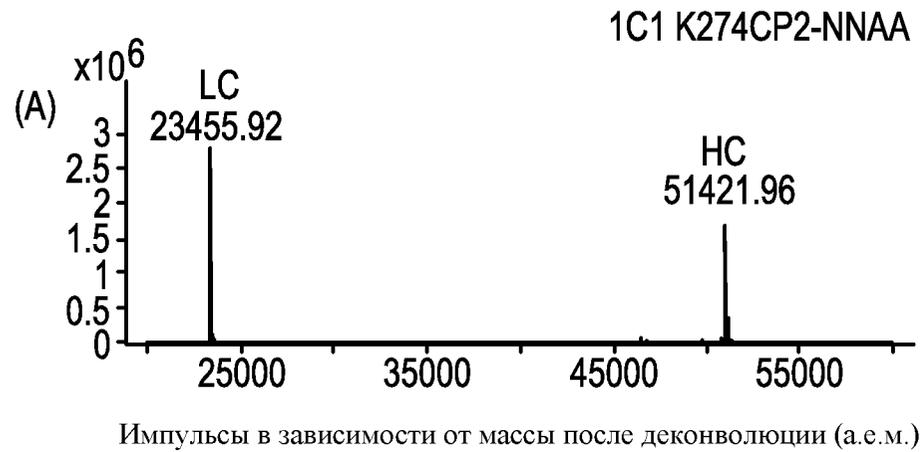
Импульсы в зависимости от массы после деконволюции (а.е.м.)



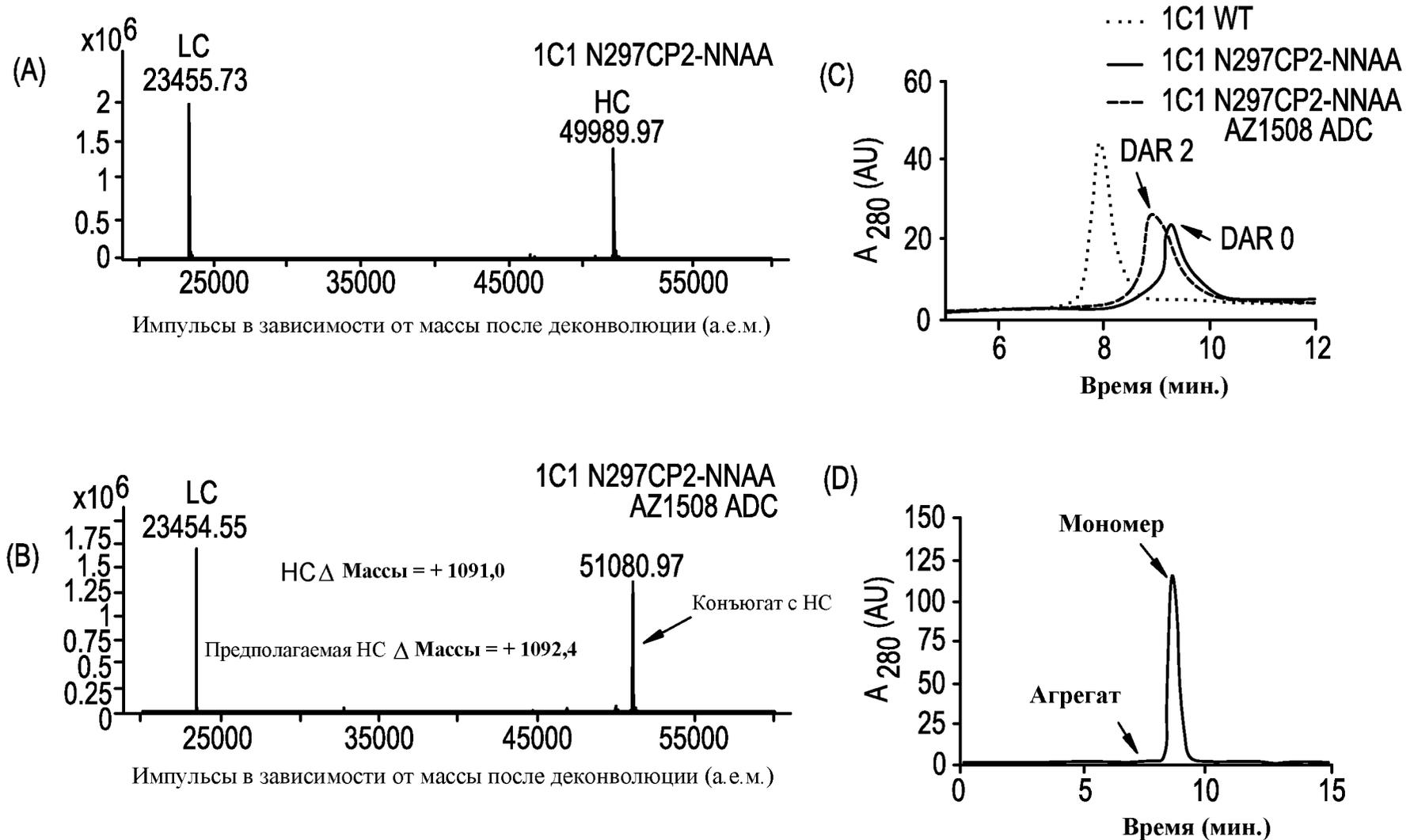
Импульсы в зависимости от массы после деконволюции (а.е.м.)



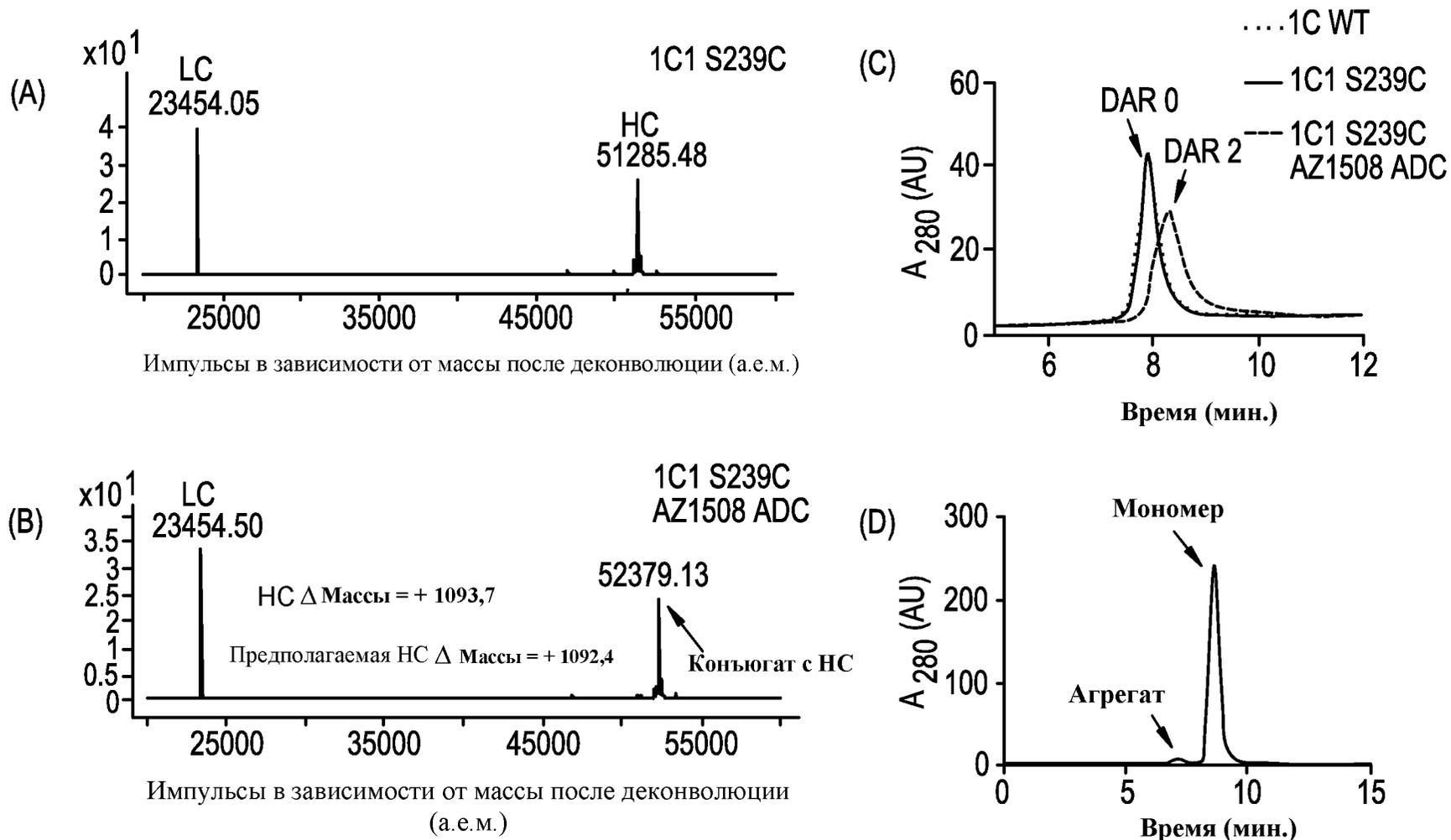
Фигура 16.3. Анализ ADC 1C1 K274CP2-NNAА AZ1508. А) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного образца mAb, не вступившего в реакцию. В) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта реакции с AZ1508. С) НИС-анализ продуктов конъюгирования не вступившего в реакцию антитела с AZ1508. D) SEC-анализ продукта реакции с AZ1508. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую (HC), и легкую (LC) цепи в (А) и (В)



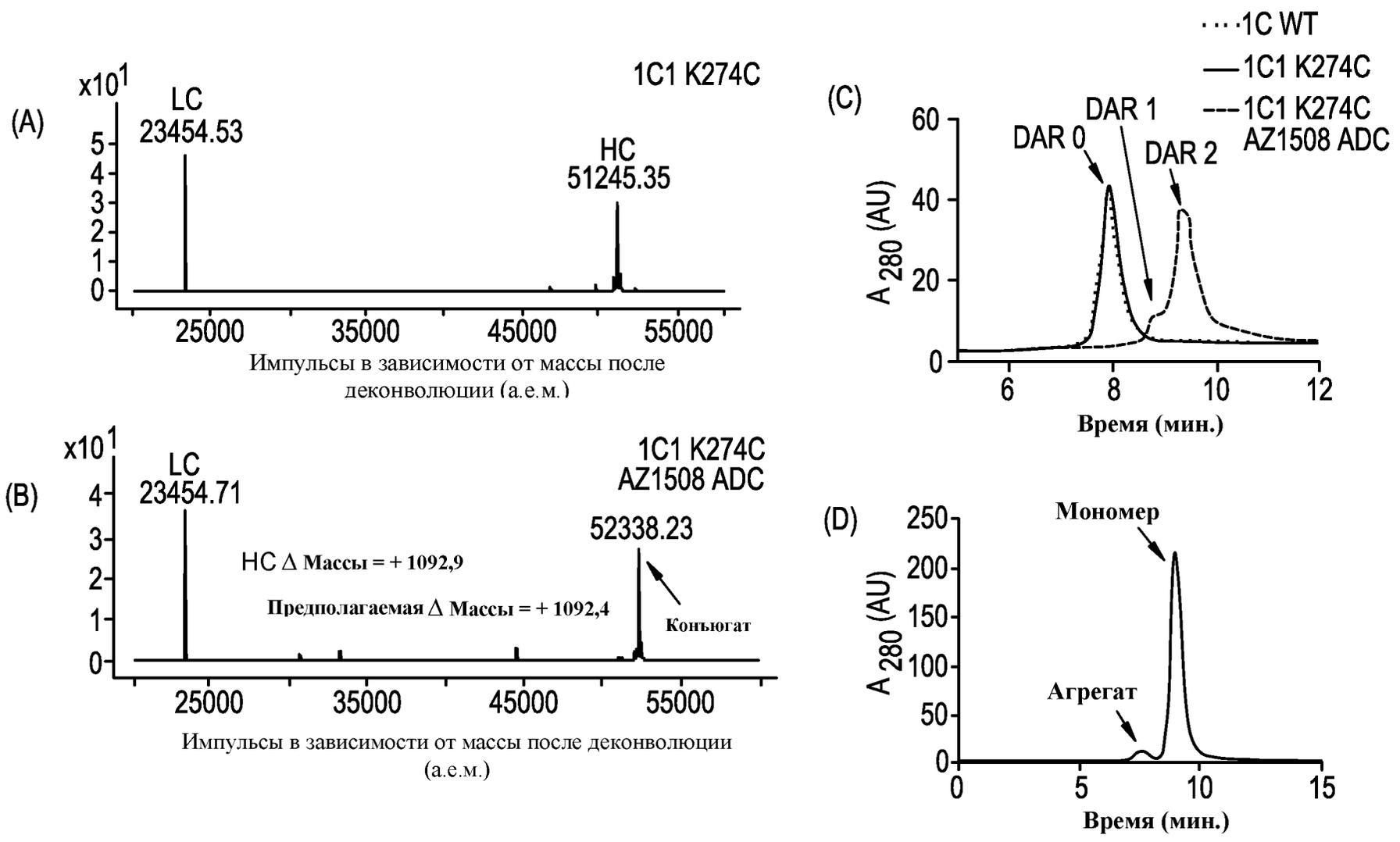
Фигура 16.4. Анализ ADC 1C1 N297CP2-NNAА AZ1508. А) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного образца mAb, не вступившего в реакцию. В) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта реакции с AZ1508. С) HIC-анализ продуктов конъюгирования не вступившего в реакцию антитела с AZ1508. D) SEC-анализ продукта реакции с AZ1508. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую (HC), и легкую (LC) цепи в (А) и (В)



Фигура 16.5. Анализ ADC 1C1 S239C AZ1508. А) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного образца mAb, не вступившего в реакцию. В) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта реакции с AZ1508. С) НИС-анализ продуктов конъюгирования не вступившего в реакцию антитела с AZ1508. D) SEC-анализ продукта реакции с AZ1508. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую (HC), и легкую (LC) цепи в (А) и (В)

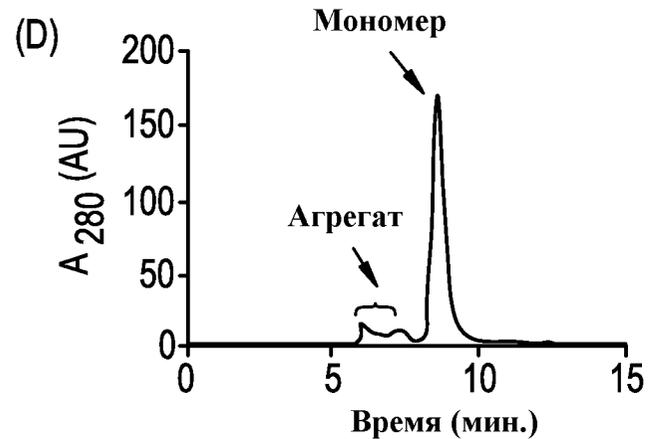
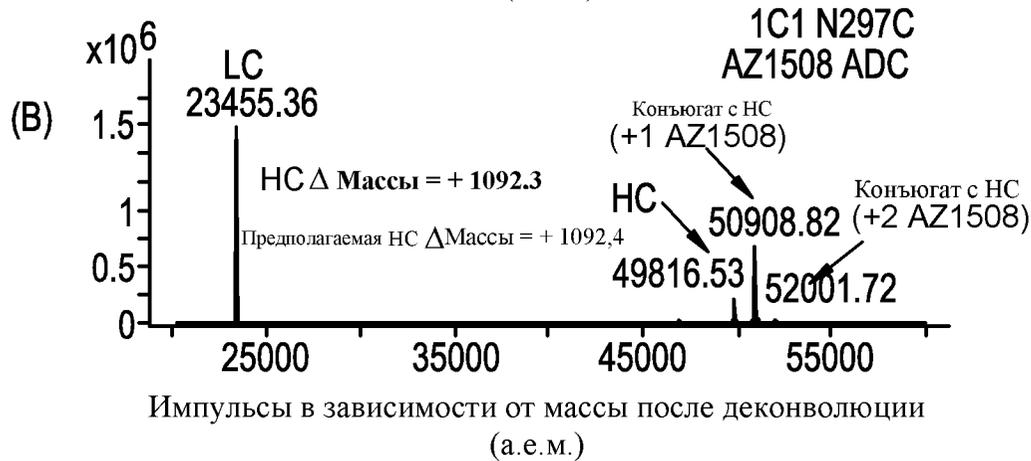
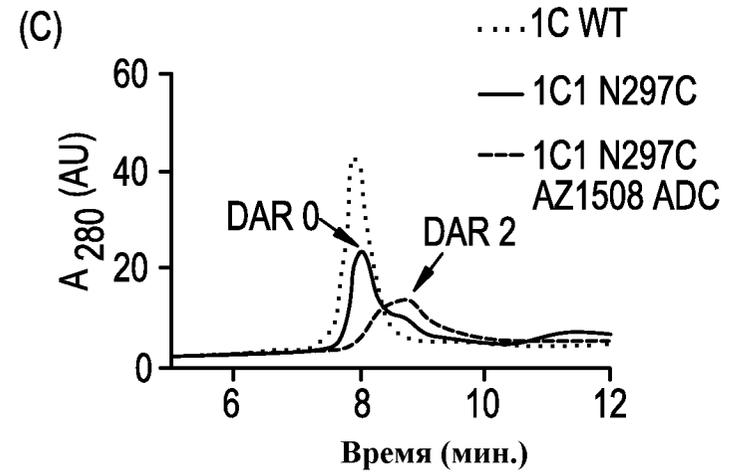
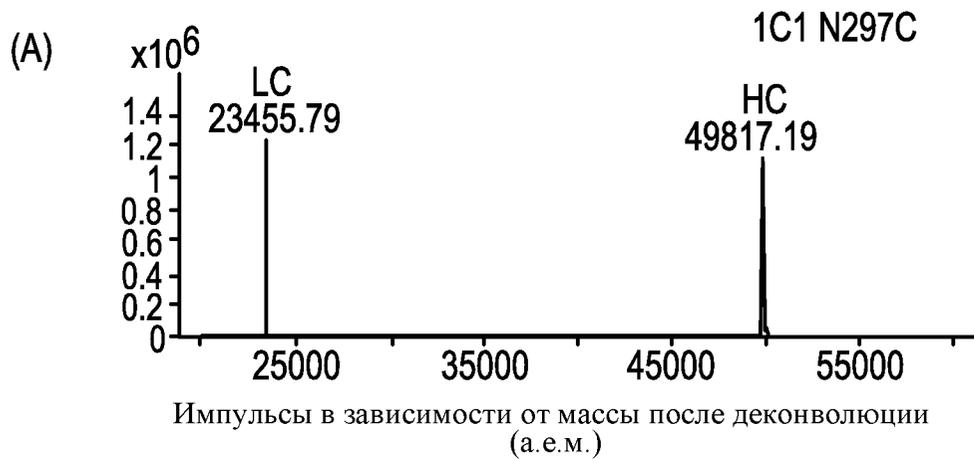


Фигура 16.6. Анализ ADC 1C1 K274C AZ1508. А) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного образца mAb, не вступившего в реакцию. В) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта реакции с AZ1508. С) HIC-анализ продуктов конъюгирования не вступившего в реакцию антитела с AZ1508. D) SEC-анализ продукта реакции с AZ1508. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую (HC), и легкую (LC) цепи в (А) и (В)

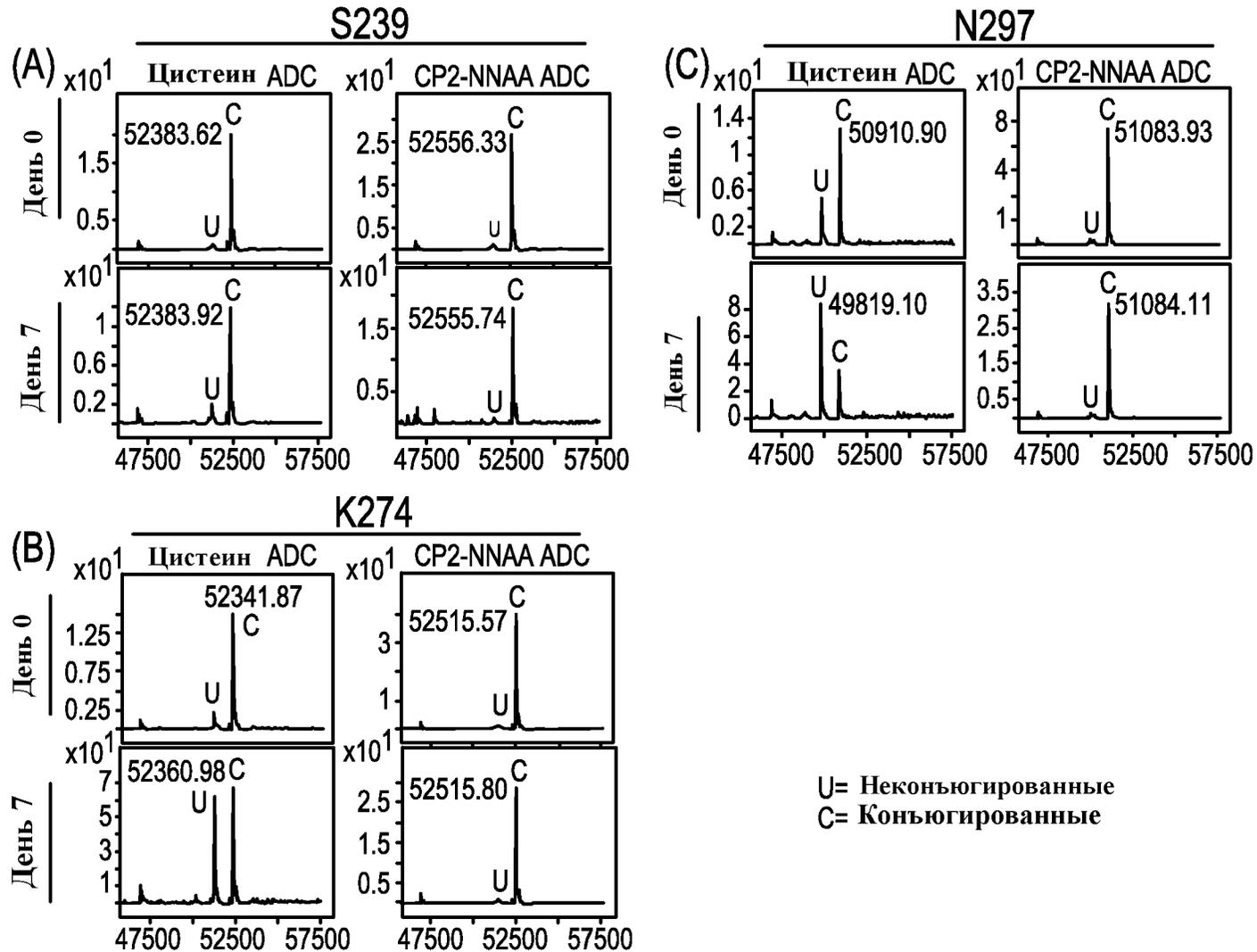


ЗАМЕНЯЮЩИЙ ЛИСТ  
 к ответу на запрос формальной экспертизы от 01.04.2020

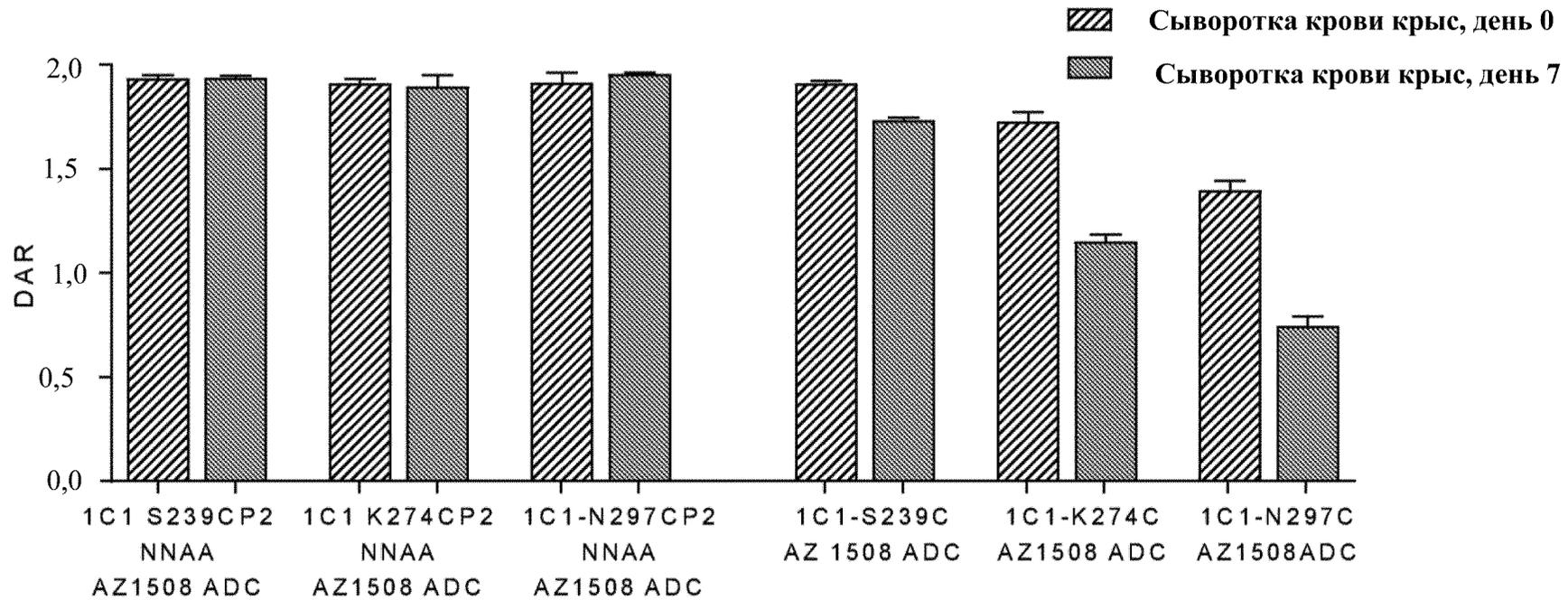
**Фигура 16.7. Анализ ADC 1C1 N297C AZ1508.** А) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного образца mAb, не вступившего в реакцию. В) Данные масс-спектрометрического анализа восстановленного гликозилированного продукта реакции с AZ1508. С) HIC-анализ продуктов конъюгирования не вступившего в реакцию антитела с AZ1508. D) SEC-анализ продукта реакции с AZ1508. Графики с масс-спектрами увеличили для того, чтобы показать и тяжелую (HC), и легкую (LC) цепи в (А) и (В)



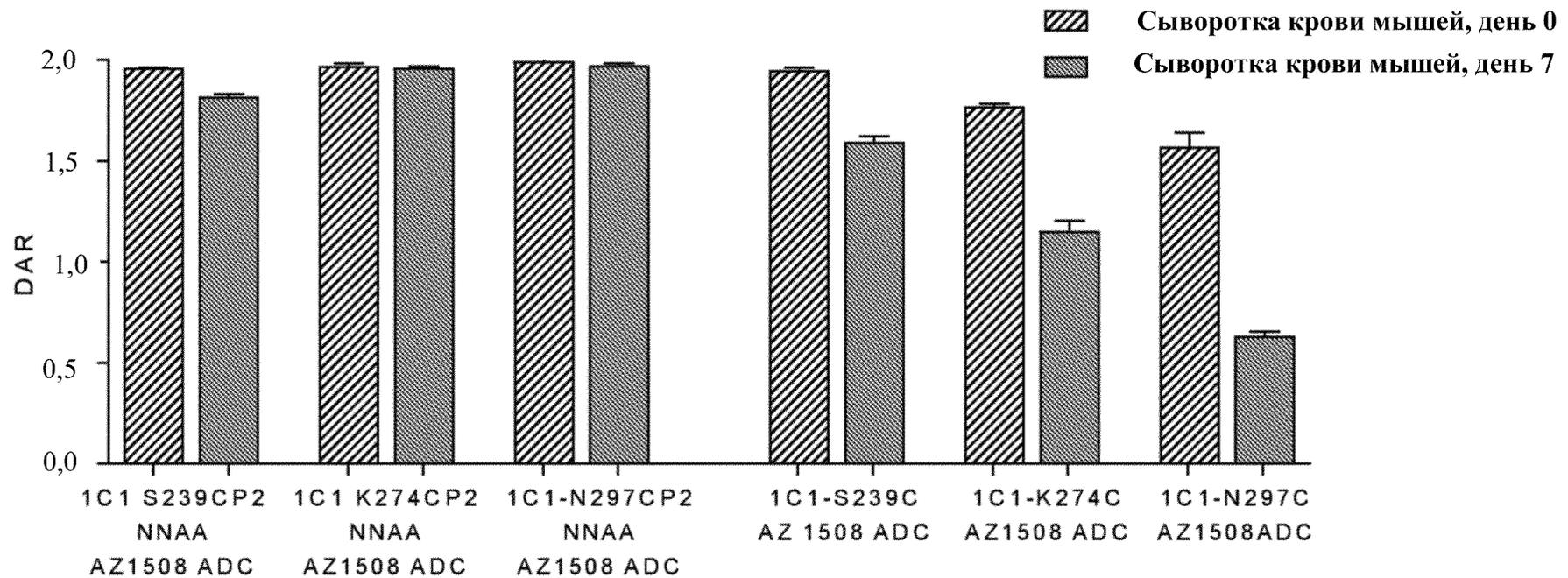
Фигура 17.1. Репрезентативные данные масс-спектров восстановленных гликозилированных образцов ADC 1C1 CP2-NNAА и 1C1 цистеин-AZ1508 до и после инкубации в сыворотке крови крыс. Природные аминокислоты подвергли мутации в CP2-NNAА или цистеин, как указано, (А) в положении S239, (В) в положении K274, (С) в положении N297. Указаны неконъюгированные и конъюгированные фрагменты



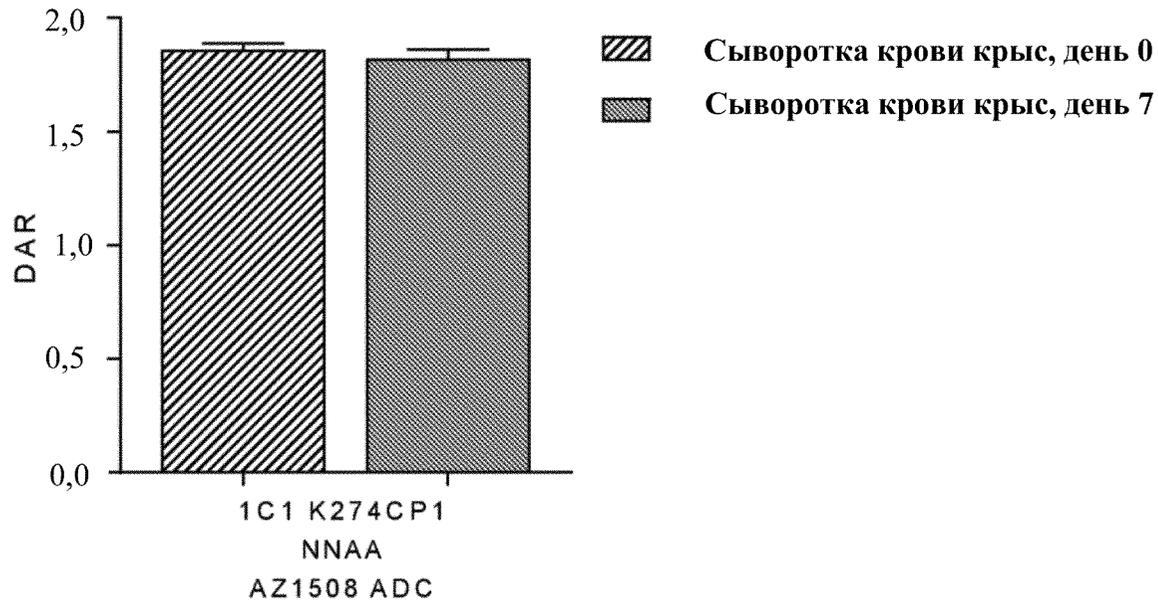
**Фигура 17.2.** Количественные показатели остаточного AZ1508, присоединенного к CP2-NNAА или к антителам, сконструированным с цистеином, после инкубации в сыворотке крови крысы в течение 7 дн. при 37°C. Соотношения лекарственное средство:антитело (DAR) рассчитывали на основе масс-спектров восстановленных гликозилированных образцов. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение, n=3



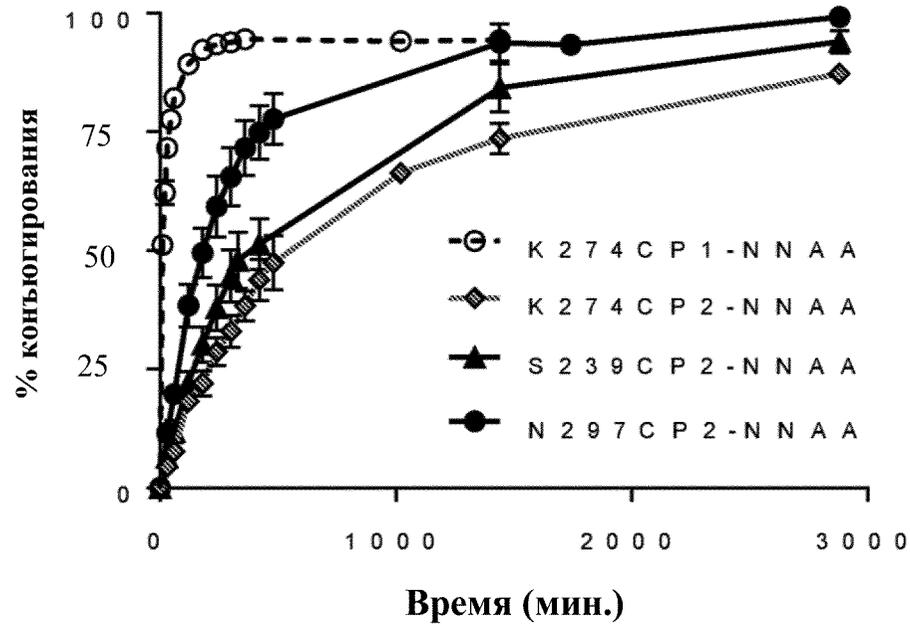
Фигура 17.3. Количественные показатели остаточного AZ1508, присоединенного к CP2-NNAА или к антителам, сконструированным с цистеином, после инкубации в сыворотке крови мышей в течение 7 дн. при 37°C. Соотношения лекарственное средство:антитело (DAR) рассчитывали на основе масс-спектров восстановленных гликозилированных образцов. В случае проведения анализа деацетилированный ZA1508 расценивали как конъюгированный фрагмент. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение, n=3



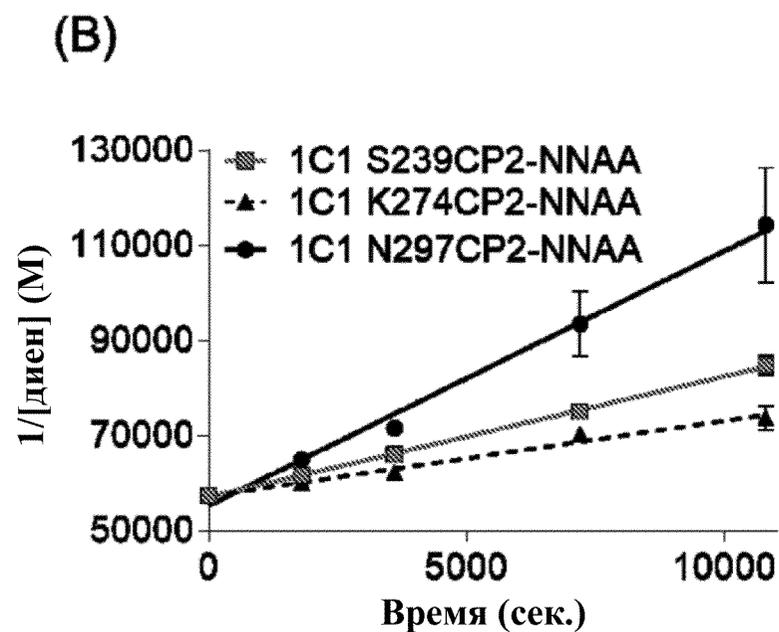
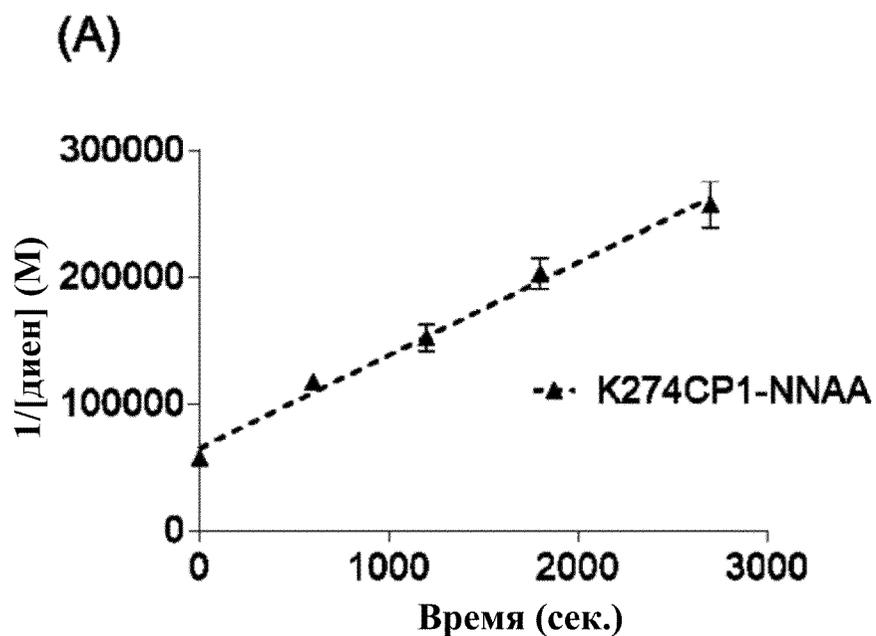
**Фигура 17.4.** Количественные показатели остаточного AZ1508, присоединенного к антителам с CP1-NNAА, после инкубации в сыворотке крови крыс в течение 7 дн. при 37°C. Соотношения лекарственное средство:антитело (DAR) рассчитывали на основе масс-спектров восстановленных гликозилированных образцов. Данные представлены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение, n=3



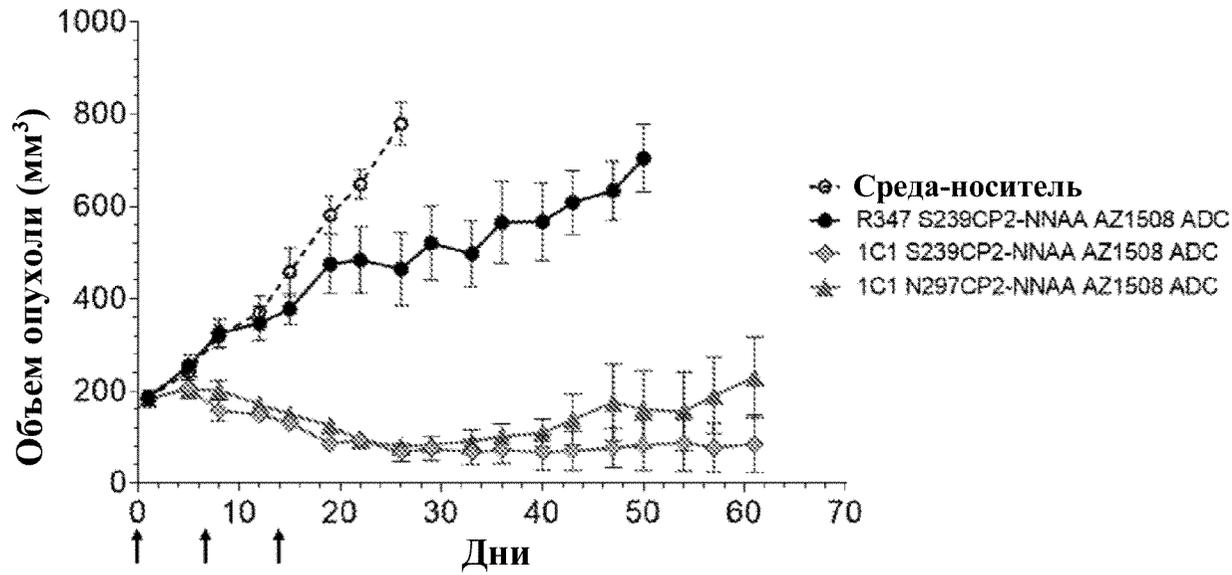
Фигура 18.1. Кинетические параметры конъюгирования mAb 1C1 CP1-NNAА и mAb 1C1 CP2-NNAА с AZ1508, измеренные с помощью масс-спектрометрии восстановленного гликозилированного образца. Данные нанесены на график в виде среднего  $\pm$  абсолютная погрешность,  $n=2$  1C1 K274CP1-NNAА, 1C1 K274CP2-NNAА и 1C1 N297CP2-NNAА, и среднего  $\pm$  стандартное отклонение,  $n=3$ , для 1C1 S239CP2-NNAА



Фигура 18.2. График зависимости обратной концентрации от времени, показывающий расход диенов в ходе реакции mAb CP1-NNAА и CP2-NNAА с AZ1508. (А) mAb 1С1 К274СР1-NNAА, (В) mAb 1С1 S239СР2, mAb 1С1 К274СР2-NNAА и mAb N297СР2-NNAА. Данные нанесены на график в виде среднего ± абсолютная погрешность, n=2, 1С1 К274СР1-NNAА, 1С1 К274СР2-NNAА и 1С1 N297СР2-NNAА, и среднего ± стандартное отклонение, n=3, для 1С1 S239СР2-NNAА



Фигура 19.1. Ингибирование опухолевого роста у мышей с ксенотрансплантатами PC3 после введения ADC CP2-NNAА AZ1508. Целевые ADC mAb 1C1 получали с использованием соединения CP2-NNAА, встроенного в положение S239 или N297, тогда как нецелевой ADC на основе изотипического контрольного mAb R347 получали путем встраивания CP2 в положение S239 ADC вводили внутривенно по 3 мг/кг в дни 0,7 и 14 (указано стрелками)



Фигура 20.1. Анализ динамического светорассеяния (DLS) малеимид-функционализированных наночастиц золота размером 60 нм до и после инкубации с антителами 1С1 дикого типа (WT) или 1С1 K274CP1-NNAA (mAb CP1-NNAA) в течение 2 ч. при 25°C

