

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **039757**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2022.03.10**

(21) Номер заявки  
**201792590**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.11.22**

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 31/536* (2006.01)  
*A61K 39/07* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

---

(54) **КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ERBB2 И ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА И ЕГО КОМПОЗИЦИЯ, СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

---

(31) **201510824064.8**

(32) **2015.11.23**

(33) **CN**

(43) **2019.03.29**

(86) **PCT/CN2016/106802**

(87) **WO 2017/088734 2017.06.01**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**СЫЧУАНЬ КЭЛУНЬ-БАЙОТЕК  
БАЙОФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД.  
(CN)**

(72) Изобретатель:  
**Сюэ Тунтун (CN), Мяо Чженьвэй (US),  
Ван Цзин (CN), Чэнь Ган (US), Цин  
Янь (CN), Чжу Тун (US), Сяо Лян  
(CN), Чжан Хун (US), Ян Цюянь (CN),  
Дэн Дилан Далунь (US), Лю Липин,  
Цзэн Хун, Инь Ли, Ши Цифэн, Сун  
Хунмэй, Чжао Си, Ван Личунь, Ван  
Цзини (CN)**

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

(56) **WO-A2-2005117986  
CN-A-104892763  
CN-A-103319599  
CN-A-1938046  
CN-A-103269712**

---

(57) Предлагается конъюгат антитела против ErbB2 и лекарственного препарата, композиция, включающая его, способ его получения и его применение.

---

**B1**

**039757**

**039757**

**B1**

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области биомедицинской технологии. В частности, настоящее изобретение относится к конъюгатам антитела против ErbB2 и лекарственного средства, композициям, включающим эти конъюгаты, и к способам их получения и применения.

### Уровень техники, к которому относится изобретение

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADCs) в качестве новых препаратов для направленной терапии возвещают о начале новой эры в терапии рака. При лидерстве Seattle Genetics, Inc. и Immunogen, Inc. многие многонациональные фармацевтические проекты и развивающиеся компании вовлечены в исследования и разработки в этой области. В соответствии с сообщением от Market Research в настоящее время суммарно 45 ADCs проходят клинические испытания во всем мире.

ADC обычно включает три части (антитело, линкер(ы) и лекарственное(е) средство(а)), которые связаны определенным образом.

Антитела являются хорошими направляющими носителями для лекарственных средств. Лекарственное средство и антитело могут быть конъюгированы через специфическую функциональную группу, такую как гидроксильная, меркапто- или аминогруппа, с образованием хемииммуноконъюгата. Лекарственные средства, конъюгированные с антителами, могут транспортироваться точно к клеткам-мишеням благодаря направляющей способности антител, тем самым эффективно повышая локальную концентрацию лекарственного средства в области заболевания при этом существенно снижая концентрацию лекарственного средства в других тканях или органах с достижением повышенной эффективности и сниженной токсичности. Сообщалось о поликлональных и моноклональных антителах, используемых в этих методах (Rowland et al., 1986, Cancer Immunol. Immunother., 21: 183-87). Антитела в ADCs, клинически используемые в настоящее время, представляют собой главным образом гуманизированные антитела, например антитела в PSMA ADC (конъюгате антитела против PSMA и MMAE), SGN-75 (конъюгате антитела против CD70 и MMAF) и T-DM1 (конъюгате трастузумаб-DM1) все являются гуманизированными антителами. В настоящее время одобренные FDA ADCs включают Kadcyla® (T-DM1) и Adcetris® (брентуксимаб ведотин).

Лекарственные средства в качестве "поражающих агентов" в ADCs обычно представляют собой цитотоксические агенты, которые уничтожают опухолевые клетки главным образом за счет ингибирования синтеза ДНК или белка в клетках, ингибирования митозов клеток и тому подобного. Так как цитотоксические агенты являются также летальными для нормальных клеток, их разработка и применение обычно ограничены. Ранее в ADCs использовали традиционные антинеопластические агенты, но их клиническая активность обычно является более низкой, чем активность агентов *in vitro*. Цитотоксические агенты в имеющихся в настоящее время ADCs включают: мейтанзиноиды (см., например, патенты EP 0425235, US 5208020, US 5416064, US 7276497, US 7473796, US 7851432, US 2007/0269447, US 2011/0158991, WO 2004/103272, WO 2012/061590), ауристатины (смотри, например, патенты US 6884869, US 7498298), калихеамицины (см., например, патенты US 5606040, US 5770710), доксорубицины (см., например, Dubowchik et al., 2002, Bioconjugate Chem., 13: 855-869), дуокармицины и CC-1065 (см., например, патент US 7129261), метаболиты иринотекана (см., например, патент WO 2015/012904), пирролбензодиазепины (см., например, Biotechnol. Healthc. 2012 Winter, 9 (4): 28-31) и димеры пирролбензодиазепина (димеры PBD, см., например, патент WO 2005/040170). Эти цитотоксические агенты имеют очень сильную неселективную токсичность, будут повреждать нормальные клетки и, таким образом, не могут быть использованы в качестве лекарственных препаратов *per se*.

Линкеры в ADCs должны удовлетворять требованиям предотвращения отсоединения низкомолекулярных лекарственных средств от антител вне клеток, и в результате интернализации в клетки, например, для расщепляемых линкеров, расщепления при соответствующих условиях с высвобождением активных низкомолекулярных лекарственных средств, тогда как для нерасщепляемых линкеров, формирования активной части совместно с низкомолекулярными лекарственными средствами и аминокислотными остатками, происходящими в результате ферментативного гидролиза антител.

В ADCs, используемых в настоящее время в клинических испытаниях, цитотоксические агенты обычно соединены через линкеры с остатками лизина на поверхности антитела или с остатками цистеина в шарнирной области антитела (доступной после частичного восстановления дисульфидных связей внутри цепей). Когда агенты соединены с остатками лизина на поверхности антитела, то большое количество остатков лизина (более 80 остатков лизина) существует на поверхности антитела и реакция конъюгации является неселективной, существует неопределенность в плане сайтов конъюгации и количеств конъюгированных агентов, что ведет к гетерогенности получаемых ADCs. Например, T-DM1 имеет распределение величин DAR (отношения лекарственного средства к антителу) 0-8 и среднее DAR 3,5 (Lazar et al., 2005, Rapid Commun. Mass Spectrom., 19: 1806-1814). Обычно ADCs имеют DAR в диапазоне 2-4. Когда агенты соединяют с остатками цистеина в шарнирной области антитела, так как в шарнирной области существует только четыре дисульфидных связи внутри цепи, необходимо частично восстановить внутрицепочечные дисульфидные связи (Sun et al., 2005, Bioconjugate Chem., 16: 1282-1290). Имеющиеся в настоящее время восстанавливающие агенты, такие как дитиотреитол (DTT) и трихлорэтилфосфат (TCEP), однако, не могут селективно восстанавливать внутрицепочечные дисульфидные связи и в свою

очередь ADCs, получаемые таким образом, являются не гомогенными продуктами, а смесью множества компонентов, в которых DAR первичных компонентов составляет 0, 2, 4, 6 и 8, и для каждой величины DAR существуют различные изомеры в результате различных сайтов конъюгации. Гетерогенность продуктов ADCs невыгодна для их клинического применения из-за различной фармакокинетики, эффективности и токсичности различных компонентов в продуктах (например, компоненты с более высоким DAR высвобождаются *in vivo* более быстро и создают более тяжелую токсичность, см. Boswell et al., 2011, Bioconjugate Chem., 22: 1994-2004), создавая неудовлетворительную стабильность.

Семейство рецепторных тирозинкиназ ErbB является важным регулятором роста, дифференцировки и выживания клеток. Семейство включает четыре члена: рецептор эпидермального фактора роста (EGFR или ErbB1), Her2 (ErbB2), Her3 (ErbB3) и Her4 (ErbB4).

Антитело против ErbB2, трастузумаб, клинически используют для лечения рака молочной железы, гиперэкспрессирующего ErbB2. При клинических испытаниях 15% пациентов, имеющих иммуногистохимические (ИHC) уровни выше 2+, характеризовались клиническим ответом на трастузумаб, и медиана ответа составляла 9,1 месяцев (см., например, Cobleigh et al., 1996, Journal of Clinical Oncology, 14: 737-744). Трастузумаб (герцептин) одобрен управлением по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными средствами США (FDA) 25 сентября 1998 г. для лечения пациентов, страдающих раком молочной железы, гиперэкспрессирующим ErbB2.

Хотя трастузумаб спас некоторых больных раком молочной железы или продлил выживаемость пациентов, он эффективен только у пациентов с гиперэкспрессией ErbB2, и степень клинического ответа составляет только 15%. Следовательно, остается потребность в лекарственных средствах с лучшей эффективностью для большего количества пациентов.

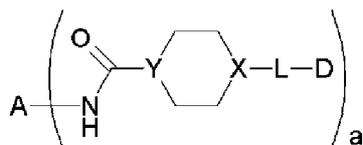
Трастузумаб конъюгировали с мейтанзином (DM1) с образованием трастузумаб-эманзина (T-DM1), для того, чтобы улучшить терапевтический индекс. T-DM1 используют у тех пациентов, у которых лечение трастузумабом, таксанами первой линии и другими терапевтическими агентами против Her2 не эффективно. T-DM1 доставляет лекарства к опухолям, снижая размер опухоли, задерживая прогрессию заболевания и продлевая выживаемость. При клинических испытаниях оценена безопасность и эффективность T-DM1. T-DM1 стал четвертым лекарственным средством, направленным на Her2, одобренным FDA. Однако после одобрения для T-DM1 существует предостережение в черной рамке, напоминающее пациентам и работникам здравоохранения о том, что T-DM1 может вести к гепатотоксичности, кардиотоксичности и смерти. Это главным образом обусловлено отсоединением DM1 и содержащих DM1 небольших молекул, высвобождаемых при деградации T-DM1 *in vivo*.

T-DM1 получают путем соединения аминогруппы боковой цепи лизина на трастузумабе с сульфосукцинимидил-4-[N-малеимидометил]циклогексан-1-карбоксилатом (сульфо-SMCC) и последующей конъюгации с DM1. В среднем 3,5 молекул DM1 конъюгируют с одной молекулой трастузумаба в T-DM1. Так как в трастузумабе есть 88 остатков лизина, T-DM1 представляет собой в действительности сочетание различных ADCs, в которых конъюгировано различное количество молекул DM1 и которые имеют различные сайты конъюгации. Однако эффективность, фармакокинетика и/или токсичность различаются у различных ADCs. В целом ADCs с высокой нагрузкой лекарственным средством имеет более высокую активность *in vitro*, хотя высокая нагрузка лекарственным средством также вызывает ряд проблем, таких как повышенное количество полимеров из-за агрегации ADCs, пониженная стабильность, повышенная токсичность, повышенная иммуногенность, высокая скорость клиренса *in vivo*, сниженный период полужизни и плохой терапевтический индекс.

Настоящее изобретение направлено на решение указанных выше проблем, существующих на предшествующем уровне техники. В настоящем изобретении предлагаются конъюгаты антител против Her2 и лекарственных средств, которые ингибируют рост опухолей у млекопитающих и могут быть использованы для лечения различных типов рака. Конъюгаты имеют улучшенную биологическую активность, стабильность, гомогенность и сниженные токсичные побочные эффекты.

#### Сущность изобретения

В первом аспекте в настоящем изобретении предлагается конъюгат антитело-лекарственное средство формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, стереоизомер или метаболит или их сольват



(I)

где

A представляет собой антитело против ErbB2 или его активный фрагмент или вариант; каждый X и Y независимо представляют собой N или CR<sup>1</sup> и R<sup>1</sup> в каждом положении независимо представляет собой H или C1-C10-алкил;

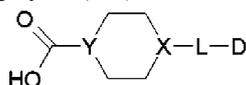
L представляет собой двухвалентный линкер;

D представляет собой группу цитотоксического агента;

a представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 2-10.

Во втором аспекте в настоящем изобретении предлагается способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство по первому аспекту, включающий следующие стадии:

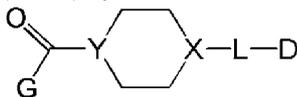
(1) получение соединения формулы (I-A)



(I-A)

где D, L, X и Y представляют собой определенное в формуле (I) выше;

(2) получение соединения формулы (I-A-G) путем активации соединения формулы (I-A) со стадии (1)



(I-A-G)

где G выбран из группы, состоящей из -F, -Cl, -Br, -I, -N<sub>3</sub>, -OR, -SR, -ONRR', RC(O)O-, -OP(O)RR',

RSO<sub>2</sub>-O-, и , где каждый из R и R' в каждом положении независимо выбран из группы, состоящей из C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкила, C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арила, гетероциклила, имеющего от 5 до 10 атомов кольца, или фенокси, и каждый из алкила, арила, гетероциклила и фенокси является незамещенным или независимо замещенным одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидрокси, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкила, C<sub>4</sub>-алкокси, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-циклоалкила, гетероциклила, имеющего от 5 до 8 атомов кольца, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-арила и гетероарила, имеющего от 5 до 10 атомов кольца;

(3) получение смеси конъюгатов антитело-лекарственное средство, имеющих различные величины a, путем конъюгации соединения формулы (I-A-G) со стадии (2) с антителом против ErbB2 или его активным фрагментом или вариантом;

(4) получение конъюгата антитело-лекарственное средство путем очистки смеси со стадии (3) с помощью одного или более хроматографических методов, выбранных из группы, состоящей из ионообменной хроматографии, гидрофобной хроматографии, хроматографии с обращенной фазой и аффинной хроматографии.

В третьем аспекте в настоящем изобретении предлагается фармацевтическая композиция, включающая конъюгат антитело-лекарственное средство по первому аспекту настоящего изобретения или его фармацевтически приемлемую соль, стереоизомер или метаболит или их сольват и фармацевтически приемлемый носитель.

В четвертом аспекте в настоящем изобретении предлагается применение конъюгата антитело-лекарственное средство по первому аспекту настоящего изобретения или его фармацевтически приемлемой соли, стереоизомера или метаболита или их сольвата для получения лекарственного средства для профилактики или лечения рака.

В пятом аспекте в настоящем изобретении предлагается фармацевтический препарат, включающий конъюгат антитело-лекарственное средство по первому аспекту настоящего изобретения или его фармацевтически приемлемую соль, стереоизомер или метаболит или их сольват.

В шестом аспекте в настоящем изобретении предлагается способ профилактики или лечения рака, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту конъюгата антитело-лекарственное средство по первому аспекту настоящего изобретения или его фармацевтически приемлемой соли, стереоизомера или метаболита или их сольвата или введение нуждающемуся в этом пациенту фармацевтической композиции по третьему аспекту настоящего изобретения или фармацевтического препарата по пятому аспекту настоящего изобретения.

#### Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлена хроматограмма ГИХ-ВЭЖХ неочищенного конъюгата I-1 антитело-лекарственное средство.

На фиг. 2 представлена хроматограмма ГИХ-УВЖХ конъюгата I-1 антитело-лекарственное средство.

На фиг. 3 представлены перекрывающиеся хроматограммы с восстановленной обращенной фазой конъюгата I-1 антитело-лекарственное средство и трастузумаба.

На фиг. 4 представлено картирование пептидов, полученных после гидролиза протеазами конъюгата I-1 антитело-лекарственное средство и трастузумаба в одинаковых условиях.

На фиг. 5 представлена хроматограмма ГИХ-ВЭЖХ неочищенного конъюгата I-2 антитело-лекарственное средство.

На фиг. 6 представлена хроматограмма ГИХ-ВЭЖХ конъюгата I-2 антитело-лекарственное средство.

На фиг. 7 представлены перекрывающиеся хроматограммы с восстановленной обращенной фазой конъюгата I-2 антитело-лекарственное средство и трастузумаба.

На фиг. 8 представлено картирование пептидов, полученных после гидролиза протеазами конъюгата I-2 антитело-лекарственное средство и трастузумаба в одинаковых условиях.

На фиг. 9 представлена хроматограмма ГИХ-ВЭЖХ неочищенного конъюгата I-3 антитело-лекарственное средство.

На фиг. 10 представлена хроматограмма ГИХ-ВЭЖХ конъюгата I-3 антитело-лекарственное средство.

На фиг. 11 представлены перекрывающиеся хроматограммы с восстановленной обращенной фазой конъюгата I-3 антитело-лекарственное средство и трастузумаба.

На фиг. 12 представлено картирование пептидов, полученных после гидролиза протеазами конъюгата I-3 антитело-лекарственное средство и трастузумаба в одинаковых условиях.

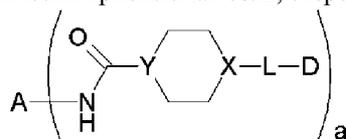
### Подробное описание изобретения

Если не указано иначе, все термины, используемые в настоящем описании, имеют то же самое значение, что и обычно понимаемое специалистом в данной области техники. Относящиеся к этому определения и термины могут быть найдены, например, в Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel).

Описанные в настоящем документе диапазоны числовых значений следует понимать как охватывающие любой и все поддиапазоны, включенные в них. Например, диапазон "от 1 до 10" следует понимать как включающий не только ясно определенные величины от 1 до 10, но также любые одиночные значения в диапазоне от 1 до 10 (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9) и поддиапазоны (например, от 1 до 2, от 1,5 до 2,5, от 1 до 3, от 1,5 до 3,5, от 2,5 до 4, от 3 до 4,5 и т.д.). Принцип также применяется для диапазона, в котором указана только одна величина в качестве минимальной или максимальной величины.

Все ссылки, упомянутые по ходу описания, включены в настоящий документ в качестве ссылок в полном объеме.

В первом аспекте в настоящем изобретении предлагается конъюгат антитело-лекарственное средство формулы (I) или его фармацевтически приемлемая соль, стереоизомер или метаболит или их сольват



(I)

где

A представляет собой антитело против ErbB2 или его активный фрагмент или вариант; каждый X и Y независимо представляют собой N или CR<sup>1</sup> (предпочтительно Y представляет собой CR<sup>1</sup> и X представляет собой N) и R<sup>1</sup> в каждом положении независимо представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкил, предпочтительно H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил (например, метил, этил, n-пропил, изопропил, n-бутил, изобутил, трет-бутил, пентил или гексил);

L представляет собой двухвалентный линкер;

D представляет собой группу цитотоксического агента; и

a представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 2-10, такое как 2, 3 или 4 и особенно предпочтительно 2.

### Антитело

Антитела, используемые в настоящем изобретении, представляют собой антитела против ErbB2 или их активные фрагменты или варианты, включая биспецифические антитела и функциональные производные антител.

Термины "ErbB2" и "HER2" используются в настоящем описании взаимозаменяемо и оба относятся к природному белку HER2 человека (номер поступления в Genbank X03363, см., например, Semba et al., (1985) PNAS, 82: 6497-6501; и Yamamoto et al., (1986) Nature, 319: 230-234) и к его функциональным производным, например вариантам аминокислотной последовательности. Термин "erbB2" относится к гену, кодирующему Her2 человека, и термин "neu" относится к гену, кодирующему p185neu крысы. Раковые клетки, такие как клетки рака молочной железы, клетки рака яичников, клетки рака желудка, клетки рака эндометрия, клетки рака слюнных желез, клетки рака легких, клетки рака почки, клетки рака толстой кишки, клетки рака щитовидной железы, клетки рака поджелудочной железы, клетки рака мочевого пузыря или клетки рака печени и т.д., обычно представляют собой клетки, экспрессирующие рецептор ErbB2.

Предпочтительный Her2 по настоящему изобретению представляет собой природную последовательность Her2 человека. Примеры антител против Her2, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются этим, MAbs4D5 (ATCC CRL 10463), 2C4 (ATCC HB-12697), 7F3 (ATCC HB-12216) и 7C2 (ATCC HB 12215), которые описаны, например, в патентах US 5772997, WO 98/77797 и US 5840525.

Гуманизированные антитела против Her2 включают huMAb4D5, huMAb4D5-I, huMAb4D5-2, hu-

MAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 и huMAb4D5-8, описанные в табл. 3 патента US 5821337; и 7C2, 7F3, 2C4, 7D3, 3E8 и 2C4, представленные на фиг. 1B патента CN 1370082 A.

Примеры антител против HER2, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, могут дополнительно включать: F243L, R292P и Y300L; F243L, R292P и V305I; F243L, R292P и P396L; и R292P, V305I и P396, описанные в патенте WO 2009/123894; MM-111 описанное в патенте WO 2012/079093; антитела TP<sub>s</sub>, TP<sub>L</sub>, PT<sub>s</sub> или PT<sub>L</sub>, описанные в пп.2-10 формулы изобретения патента CN 104418952 A; антитела DL, DL.5, DL.5-100, DLI, DLI Ib или DLI If, описанные на фиг. 33A и B патента WO 2010/108127; и гуманизованное антитело 520C9, описанное в патенте WO 93/21319.

Природная последовательность Her2 по настоящему изобретению может быть выделена из природного источника или может быть получена с помощью способа рекомбинантной ДНК, химического синтеза или с помощью их сочетания.

Термин "функциональное производное" включает варианты аминокислотной последовательности и природные полипептидные ковалентные производные (например, производные, полученные с помощью посттрансляционных модификаций, дериватизированные пироглутаминовой кислотой и тому подобное), предлагаемые так, что они сохраняют аффинность и биологическую активность, которые сравнимы с природным полипептидом или превышают их. Варианты аминокислотной последовательности и природная полипептидная аминокислотная последовательность обычно отличаются одной или более аминокислотными заменами, делециями и/или вставками в последней. Варианты с делециями включают фрагменты природного полипептида и укороченные варианты с N-конца и/или с C-конца. Обычно варианты аминокислотной последовательности и природный полипептид должны иметь по меньшей мере 70% или, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% гомологию. Природные полипептидные ковалентные производные могут представлять собой производные, полученные путем изменения посттрансляционного процессинга антитела, например изменения количества или положения сайтов гликозилирования.

Термины "гомология", "однородность", "идентичность" и "сходство" в настоящем описании применяются взаимозаменяемо и относятся к проценту идентичных нуклеотидов или идентичных аминокислотных остатков в двух сравниваемых последовательностях нуклеиновой кислоты или аминокислотных последовательностях, полученных после наилучшего выравнивания (оптимального выравнивания), этот процент является чисто статистическим, и различия между двумя последовательностями случайно распределены по всей их длине. Выравнивание двух последовательностей нуклеиновой кислоты или аминокислотных последовательностей обычно осуществляют с помощью сравнения этих последовательностей после их выравнивания оптимальным способом, и сравнение может быть выполнено по сегменту или по "окну сравнения". Оптимальное выравнивание может быть осуществлено в дополнение к ручному способу с помощью других методов, описанных в ссылках, например с помощью алгоритма локальной гомологии, описанного в Smith and Waterman, 1981, Ad. App. Math., 2: 482, алгоритма локальной гомологии, описанного в Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol., 48: 443, метода поиска сходства, описанного в Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444, и с помощью компьютерной программы, использующей эти алгоритмы (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), или с помощью программного обеспечения для сравнения BLAST N или BLAST P.

При применении в настоящем описании термин "антитело" используется в самом широком смысле и покрывает полные моноклональные антитела, поликлональные антитела и мультиспецифические антитела, образованные по меньшей мере из двух полных антител (например, биспецифические антитела), до тех пор, пока они проявляют желаемую биологическую активность.

При применении в настоящем описании термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных возникающих в природе мутаций, которые могут присутствовать в минимальном количестве. Моноклональные антитела являются высоко специфичными в отношении единственной антигенной детерминанты (эпитопа) и, напротив, поликлональные антитела включают различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов). Кроме специфичности моноклональные антитела имеют преимущества в том, что они могут быть синтезированы без загрязнения другими антителами. В настоящем описании определение "моноклональное" указывает на тип антитела как получаемого по существу из гомогенной популяции антител и не толкуется как требующий какого-либо конкретного метода получения.

Моноклональные антитела по настоящему изобретению конкретно включают химерные антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям антител определенного вида, определенного класса или определенного подкласса, тогда как оставшаяся (оставшиеся) цепь(и) идентична(ы) или гомологична(ы) соответствующим последовательностям в антителах другого вида, другого класса или другого подкласса до тех пор, пока они проявляют желаемую биологическую активность (см., например, патент US 4816567; и Morrison et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855). Химерные антитела, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, включают приматизированные антитела, включающие антигенсвязывающие последовательности варибельного домена от примата, не являющегося человеком (например, от марышки старо-

го света, гориллы и т.д.), и последовательность константной области от человека.

Термин "фрагменты антитела" относится к части антитела, предпочтительно к его антигенсвязывающей или вариабельной области. Примеры фрагментов антитела включают Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv фрагменты; диатела; линейные антитела; и одноцепочечный Fv.

Термины "биспецифическое антитело" и "бифункциональный конъюгат антитела" используются взаимозаменяемо и относятся к конъюгату, образованному первым антителом (фрагментом) и вторым антителом (фрагментом) через соединяющее плечо, и активность соответствующих антител сохраняется в конъюгате, который, таким образом, обладает двойной функцией и двойной специфичностью.

Термин "мультиспецифическое антитело" включает, например, три- и тетраспецифические антитела, первые представляют собой антитела, имеющие три различных типа антигенсвязывающей специфичности, а последние представляют собой антитела, имеющие четыре различных типа антигенсвязывающей специфичности.

Термин "интактное антитело" относится к антителу, включающему антигенсвязывающую вариабельную область, а также константный домен легкой цепи (CL) и константные домены тяжелой цепи (CH1, CH2 и CH3). Константные домены могут представлять собой природные последовательности (например, природную последовательность константных доменов человека) или варианты этой аминокислотной последовательности. Предпочтительным является интактное антитело, имеющее одну или более эффекторных функций.

"Гуманизированные" формы антител, не относящихся к человеку, (например, мышинных) относятся к химерным антителам, которые содержат минимальную последовательность, происходящую от иммуноглобулина, не относящегося к человеку. Наиболее гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (антитело-донор), в котором остатки из гипервариабельной области заменены остатками из гипервариабельной области видов, не относящихся к человеку (например, мыши, крысы, кролика или нечеловекообразного примата) (антитело-донор), имеющей желаемые специфичность, аффинность и емкость. В некоторых вариантах осуществления остатки области каркаса (FR) иммуноглобулина человека также заменяют остатками иммуноглобулина, не относящегося к человеку. Более того, гуманизированные антитела могут включать остатки, которых нет в антителе-реципиенте или в антителе-доноре. Эти модификации делают для дополнительной оптимизации работы антитела. Гуманизированное антитело обычно включает, по меньшей мере, один и обычно два вариабельных домена, в которых все или по существу все гипервариабельные петли соответствуют петлям иммуноглобулина, не относящегося к человеку, и все или по существу все FRs представляют собой FRs последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело может также включать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc, обычно Fc иммуноглобулина человека). Подробно см., например, Jones et al., 1986, Nature, 321: 522-525; Riechmann et al., 1988, Nature, 332: 323-329; и Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Bwl 2: 593-596.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей интактные антитела могут быть отнесены к разным "классам". Пять главных классов представляют собой IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно подразделены на "подклассы" (изотипы), например IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелых цепей различных классов антител известны как  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$  соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации иммуноглобулинов различных классов хорошо известны в данной области техники.

В настоящем изобретении, хотя аминокислотные замены в антителах представляют собой в большинстве случаев замены L-аминокислотами, замены ими не ограничиваются. В некоторых вариантах осуществления пептиды могут включать одну или более D-аминокислот. Пептиды, содержащие D-аминокислоты, как считается, являются более стабильными и менее склонны к деградации в ротовой полости, кишечнике или в плазме по сравнению с пептидами, включающими исключительно L-аминокислоты.

Моноклональные антитела, используемые в настоящем изобретении, могут быть получены с помощью различных методов. Например, моноклональные антитела для использования по настоящему изобретению могут быть получены с помощью гибридного метода, использующего различные виды (включая клетки мышей, хомячков, крыс и человека) (см., например, Kohler et al., 1975, Nature, 256: 495), или с помощью метода рекомбинантных ДНК (см., например, патент US 4816567), или путем выделения из фаговых библиотек антител (см., например, Clackson et al., 1991, Nature, 352: 624-628; и Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222: 581-597).

Предпочтительное антитело, используемое по настоящему изобретению, представляет собой антитело против ErbB2 человека, и предпочтительно CDR1, CDR2 и/или CDR3 антитела против ErbB2 человека представляют собой CDR1, CDR2 и/или CDR3 трастузумаба соответственно. Антитело против ErbB2 человека может представлять собой гуманизированное антитело или антитело полностью от человека.

Более предпочтительно антитело, используемое по настоящему изобретению, представляет собой гуманизированное мышинное антитело 4D5 против ErbB2 человека, представленное на фиг. 1 патента US 5821337.

Особенно предпочтительное антитело, используемое по настоящему изобретению, представляет со-

бой трастузумаб, последовательность которого раскрыта, например, в патенте CN 103319599A. Lys на конце тяжелой цепи трастузумаба имеет склонность к делеции, что, однако, не влияет на биологическую активность, смотри Dick, L. W. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 100: 1132-1143. Трастузумаб, в последовательности которого есть делеция Lys на конце тяжелой цепи, или его фрагмент, как указано выше, оба охватываются термином трастузумаб по настоящему изобретению.

Последовательность тяжелой цепи трастузумаба (SEQ ID NO: 1) представляет собой

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTR  
YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTIVTVSSAST  
KGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS  
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK  
DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD  
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD  
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKS  
LSLSPGK

Последовательность легкой цепи трастузумаба (SEQ ID NO: 2) представляет собой

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVP  
SRFSGSRSGTDFTLTISSSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE  
QLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYE  
KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Фрагменты антител могут быть получены разными методами, например с помощью протеолитического гидролиза интактных антител (см., например, Morimoto et al., 1992, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 24: 107-117; и Brennan et al., 1985, *Science* 229: 81), или прямо с помощью рекомбинантных клеток-хозяев и фаговых библиотек антител, обсуждаемых выше. Альтернативно фрагменты Fab'-SH могут быть прямо получены из *E. coli* и химически соединены с образованием фрагментов F(ab') (Carter et al., *Biotechnology (NY)*, Feb 1992, 10(2): 163-167). Кроме того, фрагменты F(ab') могут быть выделены прямо из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Другие методы получения фрагментов антител должны быть очевидны для специалистов в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела, используемый по настоящему изобретению, представляет собой одноцепочечный фрагмент Fv (scFv) (см., например, патенты WO 93/16185; US 5571894; и US 5587458). В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой линейный фрагмент антитела (см., например, патент US 5641870), который может быть моноспецифическим или биспецифическим.

Биспецифические антитела со специфичностью связывания по меньшей мере двух различных эпитопов (см., например, Millstein et al., 1983, *Nature*, 305: 537-539) могут связываться с двумя различными эпитопами белка ErbB2. Другие биспецифические антитела могут сочетать сайт связывания ErbB2 с сайтом(ми) связывания EGFR, ErbB3 и/или ErbB4. Альтернативно плечо против ErbB2 может быть объединено с плечом, которое связывает триггерную молекулу на лимфоците, такую как молекула T-клеточного рецептора (например, CD2 или CD3), или рецепторы Fc для IgG (FcγR), такие как FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16), так, чтобы ориентироваться на клеточные защитные механизмы относительно клеток, экспрессирующих ErbB2.

Биспецифические антитела можно также использовать для позиционирования цитотоксических агентов у клеток, экспрессирующих ErbB2 (см., например, патенты WO 96/16673, US 5837234, WO98/02463 и US 5821337). Раскрыты методы очистки биспецифических антител (см., например, патент WO 93/08829; Traunecker et al., 1991, *EMBO J.* 10: 3655-3659; WO 94/04690; Suresh et al., 1986, *Methods in Enzymology*, 121: 210; US 5731168). Биспецифические антитела могут быть получены с использованием лейциновых застежек (см., например, Kostelny et al., 1992, *J. Immunol.*, 148(5): 1547-1553) и одноцепочечных димеров Fv (sFv) (см., например, Gruber et al., 1994, *J. Immunol.* 152: 5368).

Описаны способы создания биспецифических антител из фрагментов антител, например способы, использующие химическую связь, где интактные антитела протеолитически расщепляют с получением фрагментов F(ab') (Brennan et al., 1985, *Science*, 229: 81). Фрагменты Fab'-SH могут быть получены из *E. coli* и химически соединены с образованием биспецифических антител (см. Shalaby et al., 1992, *J. Exp. Med.* 175: 217-225). Методы "диател" представляют собой альтернативные методы получения фрагментов биспецифических антител (см. Hollinger et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448).

Могут быть получены антитела с более чем двумя валентностями. Мультивалентные "осьминожные" антитела с тремя или более антигенсвязывающими сайтами и двумя или более вариабельными доменами могут быть легко получены с помощью рекомбинантной экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидные цепи антител (см., например, патенты US 2002/0004586 и WO 01/77342). Например, могут быть получены триспецифические антитела (см., например, Tutt et al., 1991, *J. Immunol.*,

147: 60). Домены СНЗ триспецифического или тетраспецифического антитела (в тяжелой цепи или в модифицированной тяжелой цепи) могут быть изменены с помощью метода "выступов во впадины", который подробно описан с несколькими примерами, например в патенте WO 96/027011, Ridgway, J. V. et al., 1996, *Protein Eng.*, 9: 617-621; и Merchant, A.M. et al., 1998, *Nat. Biotechnol.*, 16: 677-681. В этом методе поверхности взаимодействия двух доменов СНЗ изменяют для повышения гетеродимеризации обеих тяжелых цепей, содержащих эти два домена СНЗ. Каждый из двух доменов СНЗ (двух тяжелых цепей) может представлять собой "выступ", тогда как другой представляет собой "впадину". Введение дисульфидного мостика дополнительно стабилизирует гетеродимеры (см., например, Merchant, A.M. et al., 1998, *Nature Biotech.* 16: 677-681; и Atwell, S. et al., 1997, *J. Mol. Biol.*, 270: 26-35) и повышает выход.

Аминокислотную последовательность обычно изменяют путем изменения соответствующей ей последовательности нуклеиновой кислоты. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты аминокислотных последовательностей антитела, могут быть получены с помощью разнообразных методов, известных в данной области техники. Эти методы включают, но не ограничены этим, выделение из природного источника (в случае вариантов природных аминокислотных последовательностей) или получение с помощью опосредованного олигонуклеотидами (или сайт-направленного) мутагенеза, мутагенеза с помощью ПЦР и кассетного мутагенеза ранее полученного варианта или нонвариантной версии антитела. Сайты, представляющие наибольший интерес для мутагенеза с заменами, включают гипервариабельные области, но охватываются также изменения FR. Как в примере 2 патента CN 103319599 А, с использованием традиционных методов молекулярной биологии проводили сайт-направленный мутагенез целого гена, синтезированные фрагменты ДНК, кодирующие тяжелую цепь трастузумаба и тяжелую цепь мутанта трастузумаба, К30R, клонировали в экспрессионный вектор тяжелой цепи, где стадии гидролиза и лигирования проводили в соответствии с инструкциями коммерчески доступных наборов.

#### Лекарственное средство

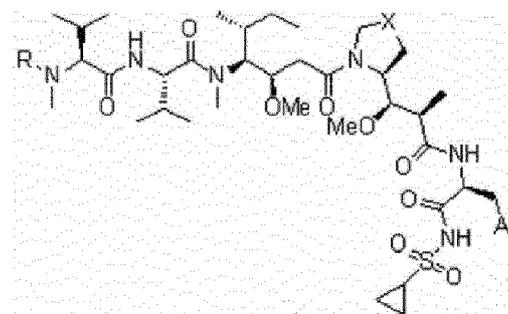
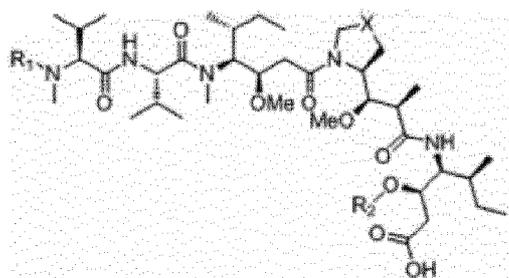
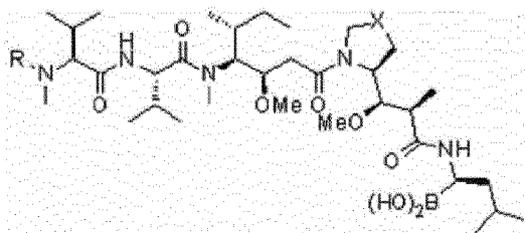
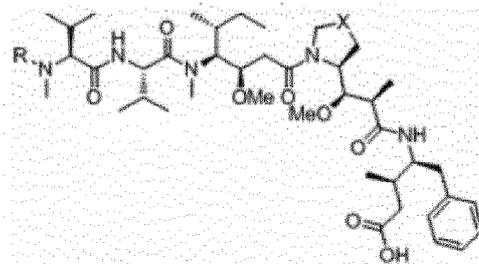
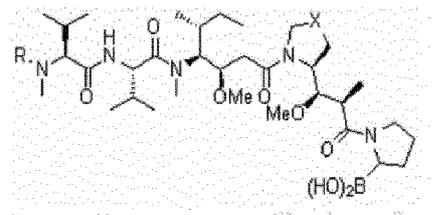
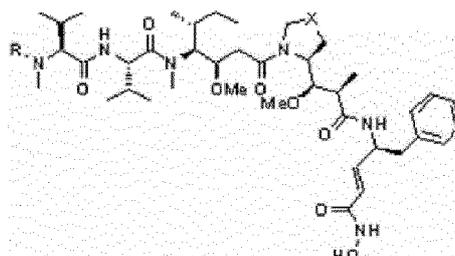
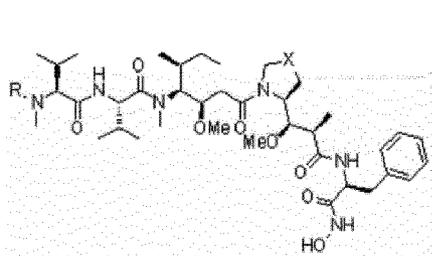
Лекарственное средство, используемое в настоящем изобретении, представляет собой цитотоксический агент. Термин "цитотоксический агент" при применении в настоящем описании относится к веществу, которое ингибирует функционирование клетки или препятствует ему и/или вызывает разрушение клеток.

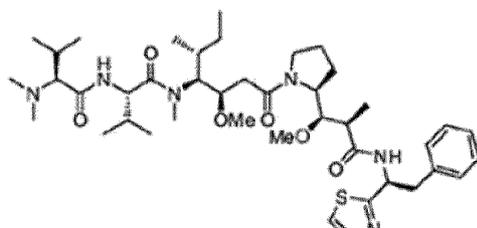
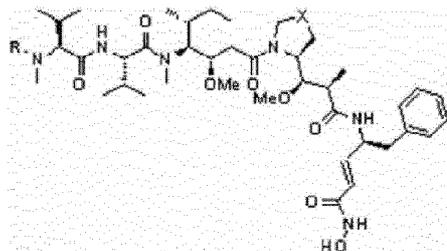
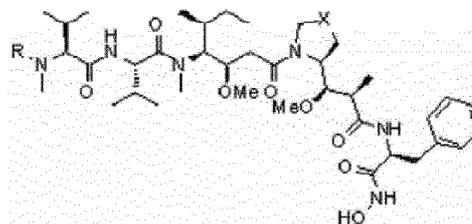
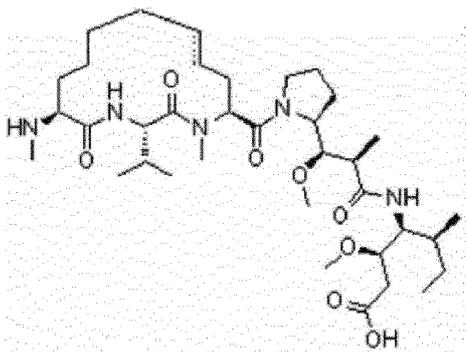
В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой ауристин Е (также известный как производное доластатина-10) или его производное (например, сложный эфир, образованный из ауристина Е и кетокислоты). Например, ауристин Е может быть введен в реакцию с пара-ацетилбензойной кислотой или бензоилвалериановой кислотой с получением АЕВ (ауристина ЕВ) и АЕВВ (сложного эфира ауристина Е и 5-бензоилвалериановой кислоты) соответственно. Другие типичные ауристины включают АФР (фенилендиамин-ауристин F), ММАФ (монометилауристин F) и ММАЕ (монометилауристин Е).

Синтез и структура иллюстративных ауристинов описаны в патентах US 6884869, US 7098308, US 7256257, US 7423116, US 7498298 и US 7745394. Синтез и структура других новых ауристинов описаны в патенте WO 2013/173393. Эти ссылки включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме.

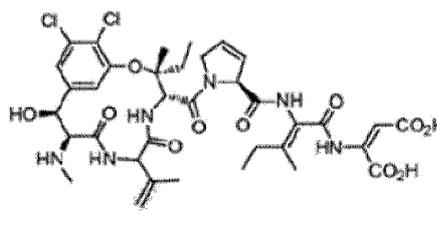
В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой агент группы мейтанзиноидов. Мейтанзин был впервые выделен Kurchan et al. из восточноафриканского кустарника *Maunus serrata* и, как показано, являлся от 100 до 1000 раз более цитотоксическим, чем традиционные химиотерапевтические агенты, такие как метотрексат, даунорубин и винкристин (см. патент US 3896111). В последующем было обнаружено, что некоторые микроорганизмы также продуцируют мейтанзиноиды, такие как мейтанзинол и С-3 сложные эфиры мейтанзинола (см. патент US 4151042). Сообщалось также о синтетических С-3 сложных эфирах мейтанзинола и аналогах мейтанзинола (см. Kurchan et al., 1978, *J. Med. Chem.*, 21: 31-37; Higashide et al., 1977, *Nature*, 270: 721-722; Kawai et al., 1984, *Chem. Pharm. Bull.*, 32: 3441-3451). С-3 сложные эфиры мейтанзинола получают из мейтанзинола. Примеры аналогов мейтанзинола включают мейтанзинол с модификациями в ароматическом кольце (например, с удалением хлора) или у С-15, С-18, С-20 и/или С-4, С-5.

В некоторых вариантах осуществления цитотоксические агенты представляют собой, например, но не ограничены этим, следующие соединения:

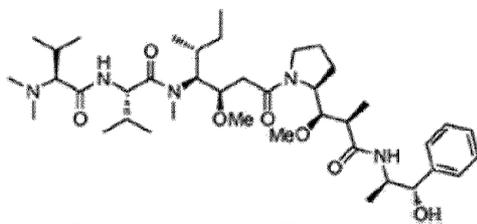




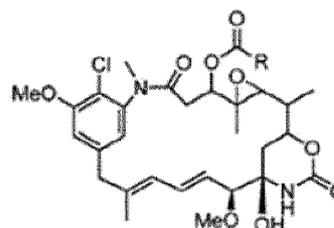
Долостатин 10



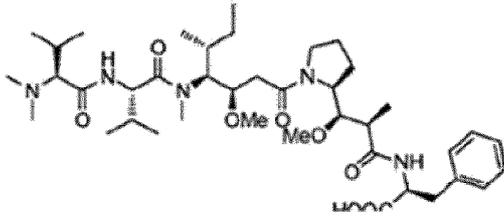
Фомопсин А



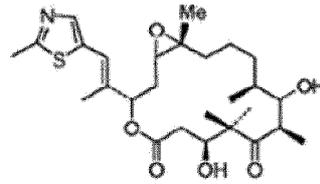
Ауристин Е



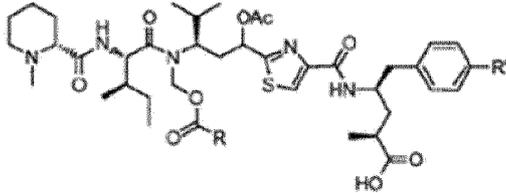
Мейтанзин



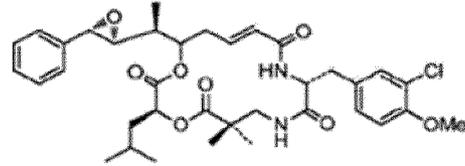
Ауристин F



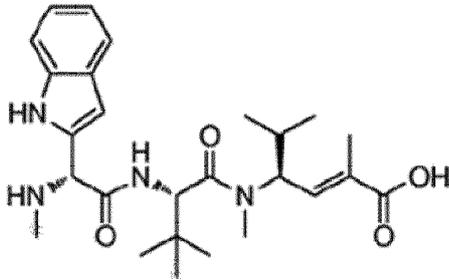
Эпотилон B



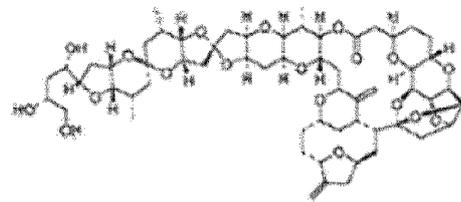
Тубулизинс



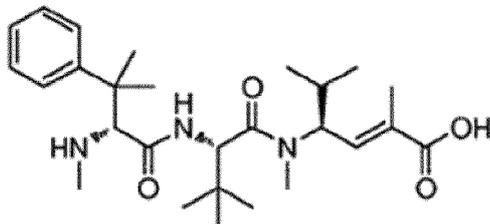
Криптофицин 55



Гемиастерин



Гайлихондрин B



HTI-286

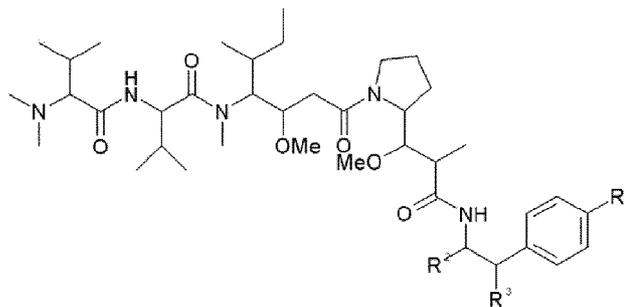
где R, R<sub>1</sub> и R<sub>2</sub>, каждый независимо выбран из группы, состоящей из H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкила или C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-циклоалкила в каждом положении, и алкил и циклоалкил необязательно замещены одним или более (например, 1, 2, 3, 4 или 5) заместителями, выбранными из галогенов (например, F, Cl, Br или I);

X представляет собой -S-, -CH<sub>2</sub>-, -CH(OH)-, -CH(OR)-, -CH(OH<sub>2</sub>)- или -C(O)-;

R' выбран из группы, состоящей из H, -NH<sub>2</sub>, Cl, Br, I, -OS(O)<sub>2</sub>R; и

Ar представляет собой C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил (например, фенил или нафтил).

В предпочтительных вариантах осуществления группа цитотоксического агента происходит от соединения формулы (D1) или (D2) или его стереоизомера



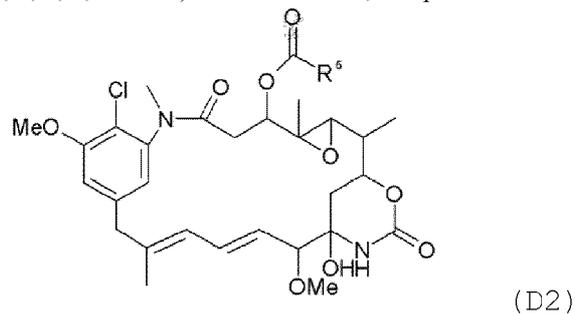
(D1)

где

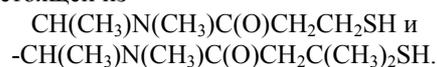
R<sup>2</sup> выбран из группы, состоящей из -CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, CONHSO<sub>2</sub> (циклопропил), тиазол-2-ил, -CH<sub>3</sub> и -COOH;

R<sup>3</sup> выбран из группы, состоящей из H и -OH; и

$R^4$  выбран из группы, состоящей из H,  $-NH_2$ , Cl, Br, I,  $OS(O)_2R^6$ , где  $R^6$  представляет собой H,  $C_1$ - $C_8$ -алкил,  $C_3$ - $C_8$ -циклоалкил или  $C_6$ - $C_{14}$ -арил, и алкил, циклоалкил и арил каждый необязательно замещены одним или более (например, 1, 2, 3, 4 или 5) заместителями, выбранными из галогенов, таких как F;

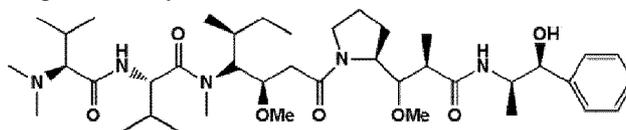


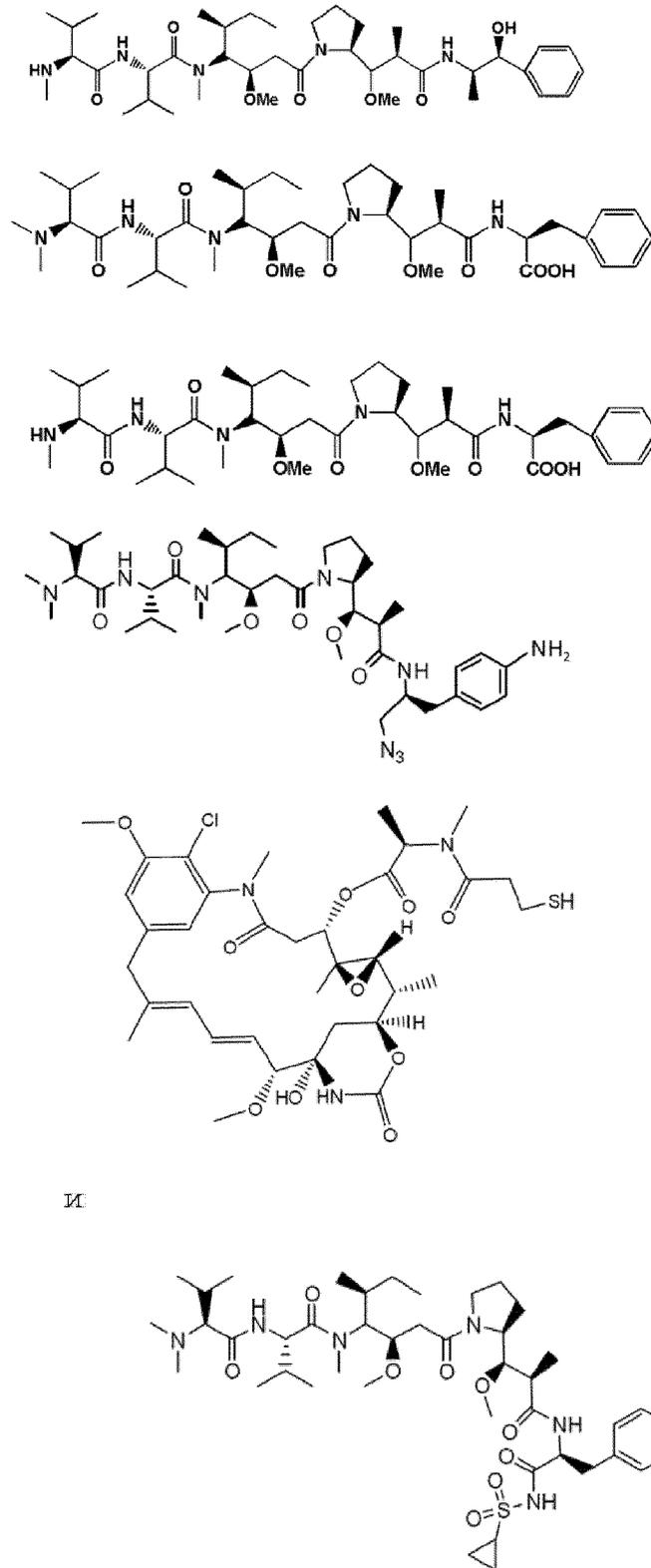
где  $R^5$  выбран из группы, состоящей из



В формуле (I) группа цитотоксического агента может представлять собой группу, полученную путем удаления  $R^4$  или  $R^5$  или путем удаления водорода или  $R^6$  в  $R^4$  или  $R^5$  из соединения формулы (D1) или (D2).

В предпочтительных вариантах осуществления цитотоксический агент выбран из





И.

### Линкер

В конъюгате антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению группа цитотоксического агента связана с молекулой антитела через двухвалентный линкер.

Конъюгация линкера с антителом может быть осуществлена с помощью различных путей, например через остаток лизина на поверхности антитела или через восстановительное присоединение к окисленной алкильной группе антитела. Конъюгация может представлять собой конъюгацию на основе гидразона, дисульфидной связи или пептидной структуры. Эти пути конъюгации известны специалистам в данной области техники.

Линкеры, пригодные для настоящего изобретения, включают расщепляемые и нерасщепляемые линкеры. Расщепляемый линкер обычно представляет собой линкер, чувствительный к расщеплению во

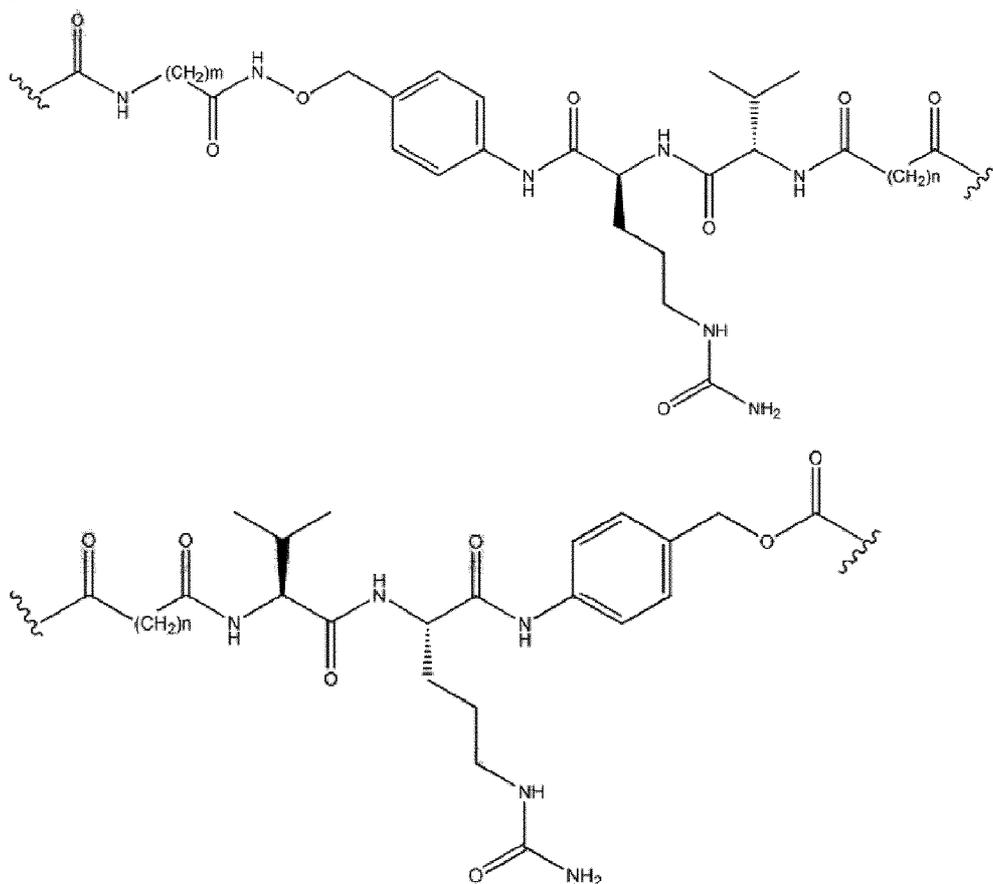
внутриклеточных условиях. Подходящие расщепляемые линкеры включают, например, пептидный линкер, расщепляемый внутриклеточной протеазой (такой как лизосомальная протеаза) или эндосомальной протеазой. В иллюстративных вариантах осуществления расщепляемый линкер может представлять собой дипептидный линкер, такой как линкер валин-цитруллин (val-cit), линкер фенилаланин-лизин (phe-lys) или линкер малеимидокапроил-валин-цитруллин-п-аминобензилоксикарбонил (mc-Val-Cit-PABA).

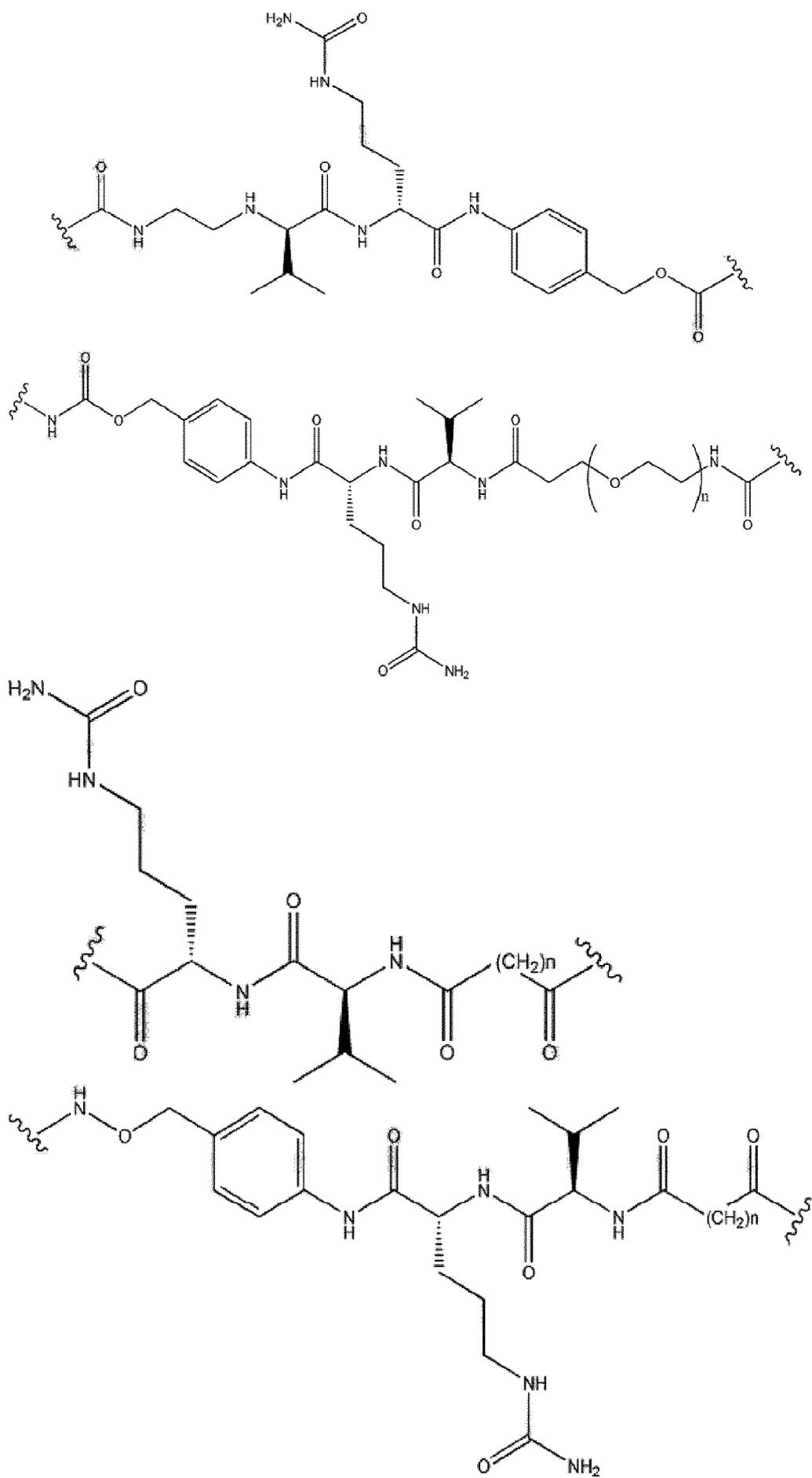
Другие подходящие расщепляемые линкеры включают линкеры, гидролизующиеся при конкретном pH или диапазоне pH (такие как гидразоновый линкер) и дисульфидный линкер. Нерасщепляемый линкер может представлять собой сульфо-SMCC. Сульфо-SMCC соединяют с белком через малеимидную группу, и ее сульфо-NHS эфир может быть введен в реакцию с первичным амином (таким как s-аминолизина и N-концевая  $\alpha$ -аминогруппа белка или пептида). Еще одним нерасщепляемым линкером является малеимидокапроил (MC). Линкер может быть ковалентно связан с антителом до такой степени, что антитело должно разрушаться внутриклеточно для высвобождения лекарственного средства.

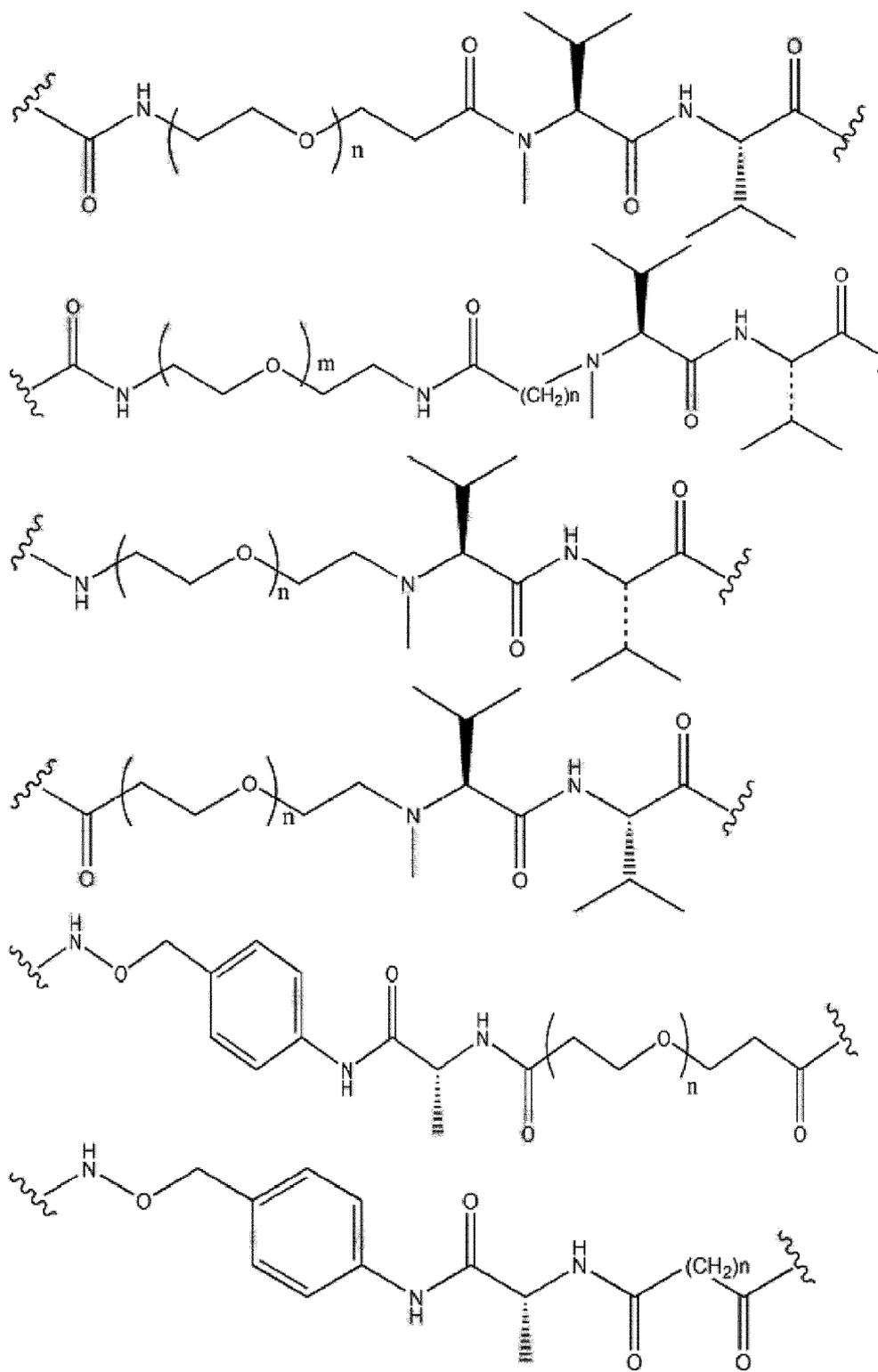
Линкер включает группу для связывания с антителом, например амино-, гидроксильную или карбоксильную группу. Линкер может происходить от, например, малеимида, галоацетамидов (например, йодацетамидов, бромацетамидов или хлорацетамидов), галогенметилкетонов (например, йодметилкетонов, бромметилкетонов или хлорметилкетонов), галоидных бензолов (например, йодистого бензила, бромистого бензила или хлористого бензила), винилсульфона и пиридилтио) (смотри, например, Wong, 1991, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, CRC Press, Inc., Boca Raton).

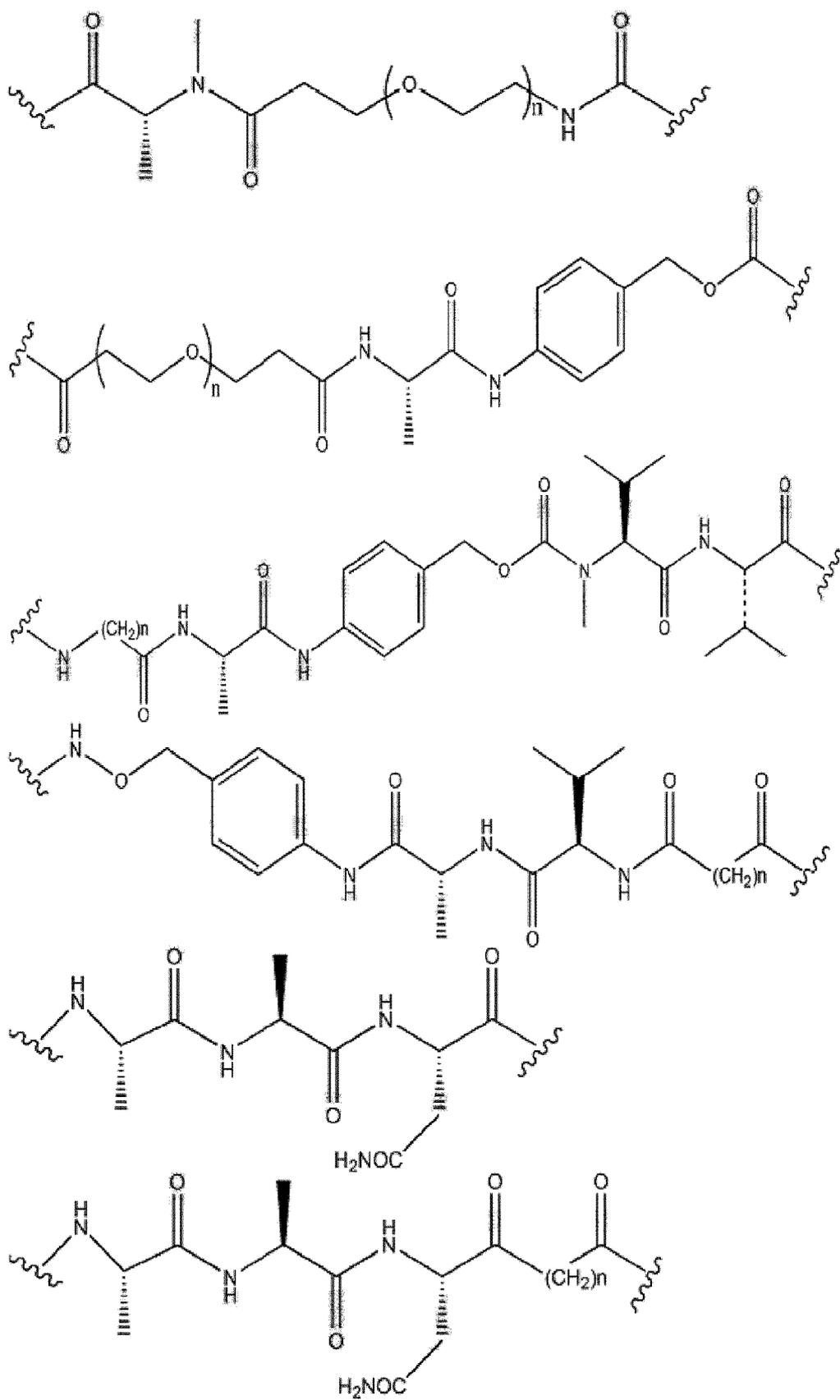
В некоторых вариантах осуществления линкеры включают, по меньшей мере, Val-Cit, Val-Cit-PAB, Val-Ala-PAB, Val-Lys(Ac)-PAB, Phe-Lys-PAB, Phe-Lys(Ac)-PAB, D-Val-Leu-Lys, Gly-Gly-Arg, Ala-Ala-Asn-PAB, Ala-PAB или PAB. В некоторых вариантах осуществления линкеры включают по меньшей мере пептиды, олигосахариды,  $-(CH_2)_n-$ ,  $-(CH_2CH_2O)_n-$ . В некоторых вариантах осуществления линкеры включают по меньшей мере  $-C(O)-$ ,  $-NH-C(O)-$ ,  $-C(O)-O-$ ,  $-NH-C(O)-NH-$  или  $-NH-C(O)-O-$ .

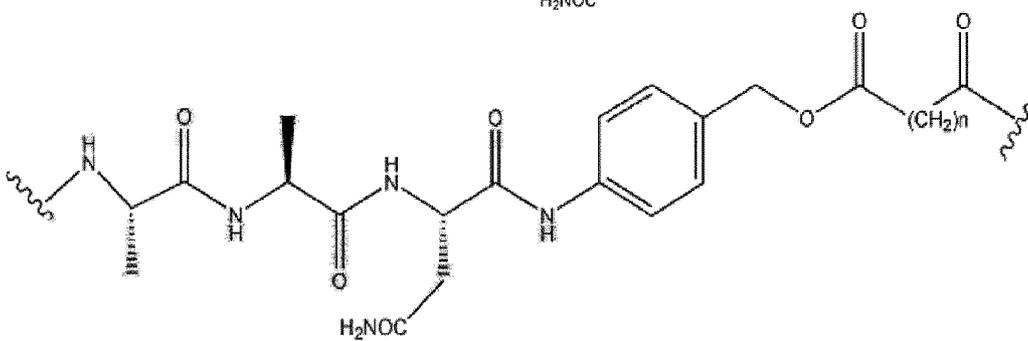
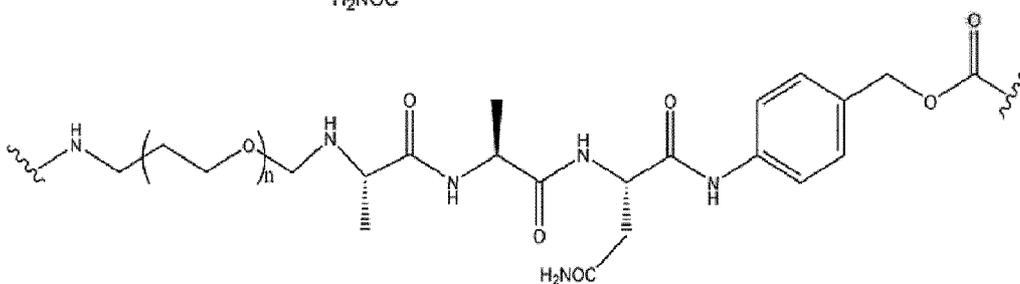
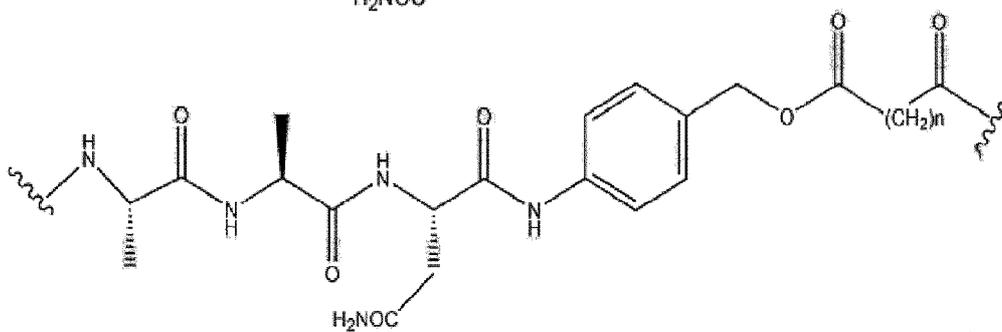
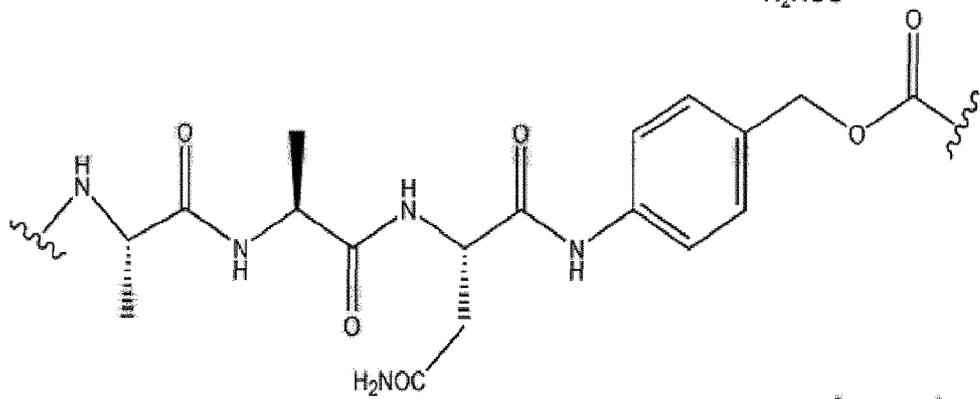
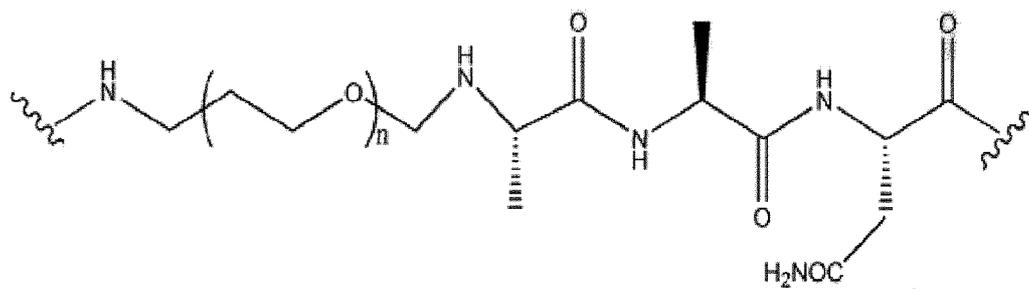
В некоторых вариантах осуществления линкер L в формуле (I) может быть выбран из группы, состоящей из

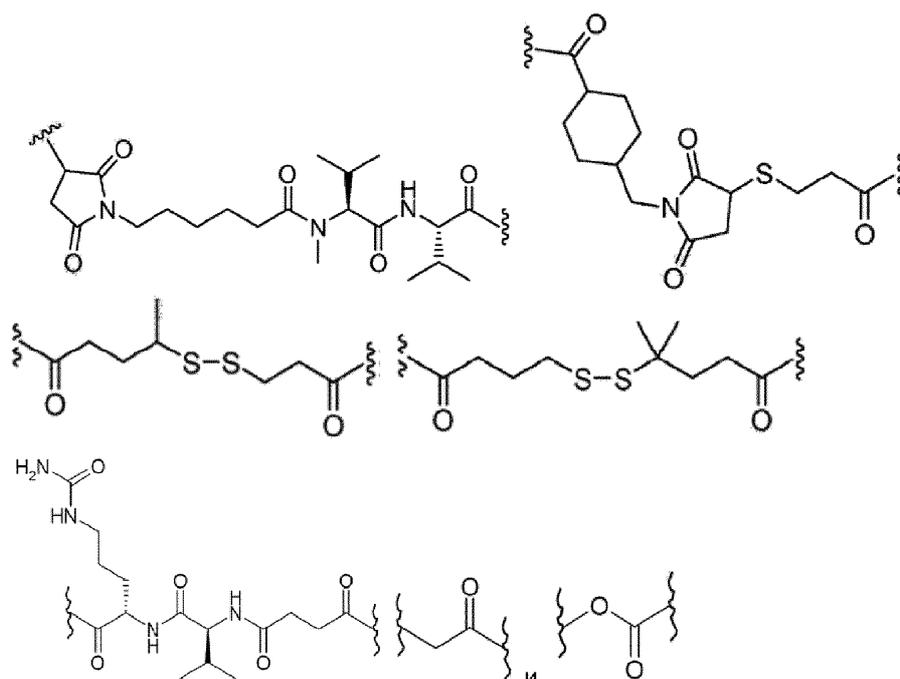










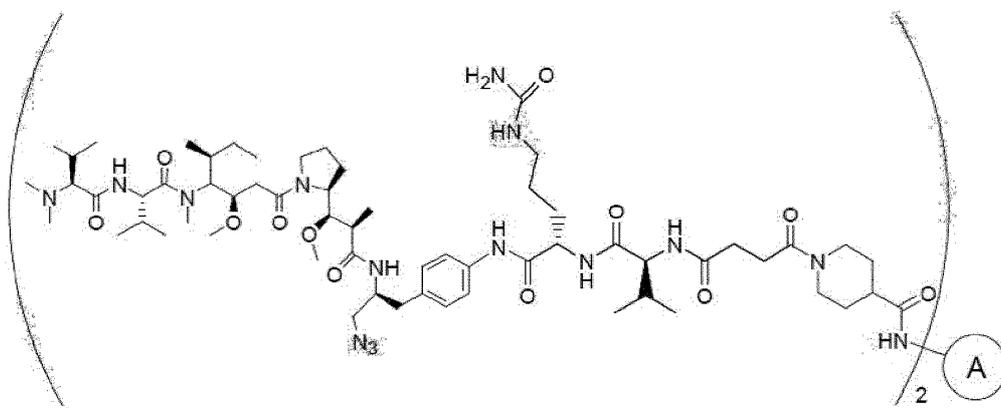


где каждый из  $m$  и  $n$  представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1-10, предпочтительно 1, 2, 3, 4, 5 или 6 в каждом положении.

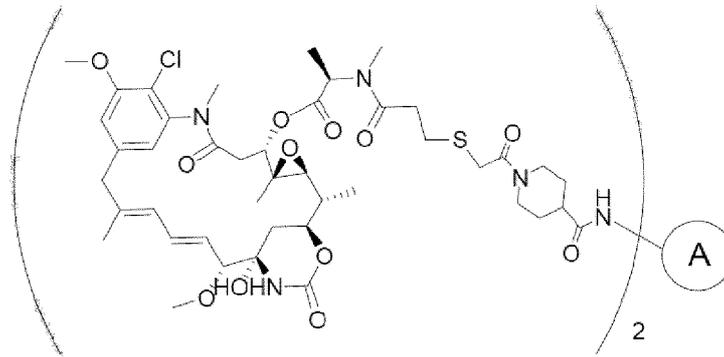
Конъюгат антитело-лекарственное средство

Конъюгат антитело-лекарственное средство по первому аспекту настоящего изобретения представлен формулой (I), как определено в настоящем описании выше.

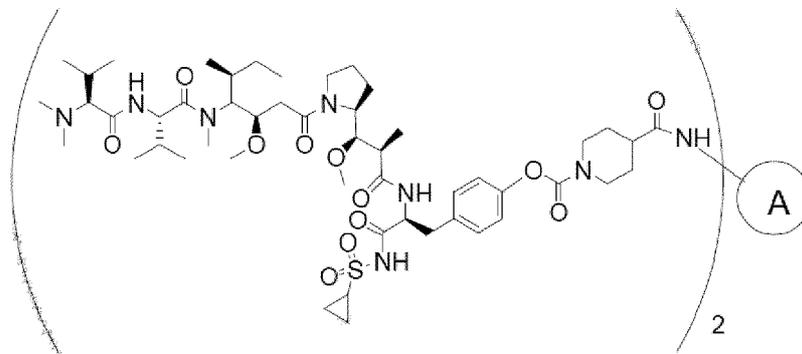
Наиболее предпочтительные конъюгаты антитело-лекарственное средство формулы (I) выбраны из I-1, I-2 и I-3:



I-1



I-2



I-3

где "А" представляет собой трастузумаб.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению могут быть в форме фармацевтически приемлемых солей, или стереоизомеров, или метаболитов, или сольватов, и соли, стереоизомеры или метаболиты также могут быть в форме сольватов.

Термин "фармацевтически приемлемые соли" относится к солям, которые сохраняют биологическую доступность и природу соединения и отвечают требованиям, предъявляемым к лекарственным средствам, в отношении биологических и других эффектов. Во многих случаях конъюгаты антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению образуют аддитивные соли кислот и/или аддитивные соли оснований через аминогруппы и/или карбоксильные группы или их другие сходные группы.

Фармацевтически приемлемые аддитивные соли кислоты могут представлять собой соли, образованные с неорганическими кислотами или с органическими кислотами. Неорганические кислоты включают, например, хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту и фосфорную кислоту и т.д. Органические кислоты включают, например, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, гидроксипропионовую кислоту, пировиноградную кислоту, щавелевую кислоту, малеиновую кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бензойную кислоту, коричную кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, *p*-толуолсульфоновую кислоту и салициловую кислоту и т.д.

Фармацевтически приемлемые аддитивные соли основания могут представлять собой соли, образованные с неорганическими основаниями или с органическими основаниями. Соли, образованные с неорганическими основаниями, включают, например, соли натрия, соли калия, соли лития, соли аммония, соли кальция, соли магния, соли железа, соли цинка, соли меди, соли марганца и соли алюминия и т.д., и соли аммония, соли калия, соли натрия, соли кальция и соли магния особенно предпочтительны. Органические основания включают, например, первичные амины, вторичные амины и третичные амины, замещенные амины (включая природные замещенные амины), цикламины, основные ионообменные смолы и т.д. Конкретными примерами органических оснований являются изопропиламин, триметиламин, диэтиламин, *N*-этилэтанами́н, трипропиламин и этаноламин.

Термин "стереоизомеры" относится к изомерам, образованным благодаря присутствию по меньшей мере одного асимметричного центра. Соединение с одним или более асимметричными центрами может образовывать рацемат, рацемическую смесь, единственный энантиомер, смесь диастереомеров и единственный диастереомер. Конкретные индивидуальные молекулы могут присутствовать в виде геометриче-

ских изомеров (цис-/транс-). Если не указано иначе, когда название или структура соединения, имеющего один или более асимметричных центров, раскрывается без специального указания на его стереохимию, должно быть понятно, что охватываются все возможные стереоизомеры соединений.

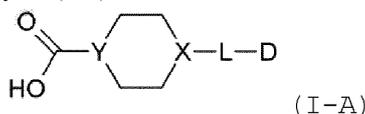
Термин "сольваты" относится к сольватам, образованным одной или более молекулами растворителя и любым из конъюгатов антитело-лекарственное средство формулы I, их фармацевтически приемлемыми солями или изомерами. Термин "сольваты" включает гидраты (например, гемигидрат, моногидрат, дигидрат, тригидрат, тетрагидрат и сходные гидраты).

Термин "метаболиты" относится к веществам, образованным в результате окисления, восстановления, гидролиза, амидирования, дезамидирования, этерификации и/или ферментативного гидролиза при введении *in vivo*.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению могут селективно доставлять эффективное количество цитотоксических агентов к опухолевой ткани, тем самым предоставляя улучшенную терапевтическую селективность и достигая желаемой эффективности при более низкой дозе.

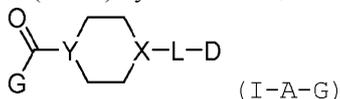
Во втором аспекте в настоящем изобретении предлагается способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство по первому аспекту, включающий следующие стадии:

(1) получение соединения формулы (I-A)



где D, L, X и Y представляют собой определенное в формуле (I) выше;

(2) получение соединения формулы (I-A-G) путем активации соединения формулы (I-A) со стадии (1)



где G выбран из группы, состоящей из -F, -Cl, -Br, -I, -N<sub>3</sub>, -OR, -SR, -ONRR', RC(O)O-, -OP(O)RR',

RSO<sub>2</sub>-O- и

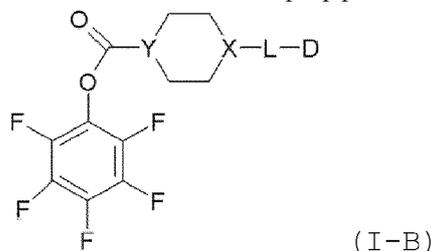
где каждый из R и R' в каждом положении независимо представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкил, C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, гетероцикл, имеющий от 5 до 10 атомов кольца, или фенокси, и каждый из алкила, арила, гетероцикла и фенокси является незамещенным или независимо замещенным одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидрокси, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкокси, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-циклоалкила, гетероцикла, имеющего от 5 до 8 атомов кольца, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-арила и гетероарила, имеющего от 5 до 10 атомов кольца;

(3) получение смеси различных конъюгатов антитело-лекарственное средство, имеющих различные величины a, путем конъюгации соединения формулы (I-A-G) со стадии (2) с антителом против EгbV2 или его активным фрагментом или вариантом; и

(4) получение конъюгата антитело-лекарственное средство путем очистки смеси со стадии (3) с помощью одного или более хроматографических методов, выбранных из группы, состоящей из ионообменной хроматографии, гидрофобной хроматографии, хроматографии с обращенной фазой и аффинной хроматографии.

Предпочтительно группа G в формуле (I-A-G) на стадии (2) выбрана из группы, состоящей из -ONRR' и -OP(O)RR', где каждый из R и R' в каждом положении независимо представляет собой фенокси.

Более предпочтительно, соединение формулы (I-A-G) на стадии (2) представляет собой соединение формулы (I-B), образованное путем взаимодействия пентафторфенола с соединением формулы (I-A)



где D, L, X и Y представляют собой определенное в формуле (I) выше, и реакцию проводят с использованием EDCI, NHS и/или DCM.

Предпочтительно очистку на стадии (4) осуществляют с помощью ВЭЖХ.

В третьем аспекте в настоящем изобретении предлагается фармацевтическая композиция, включающая конъюгат антитела и лекарственного средства по первому аспекту настоящего изобретения или его фармацевтически приемлемую соль, стереоизомер или метаболит или их сольват и фармацевтически приемлемый носитель. Необязательно фармацевтические композиции дополнительно включают один или более других противораковых агентов, таких как химиотерапевтические агенты и/или антитела.

Применяемый в настоящем описании термин "фармацевтическая композиция" относится к сочетанию по меньшей мере одного активного ингредиента и фармацевтически приемлемого носителя и/или наполнителя для конкретных целей. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция находится в форме смеси различных ингредиентов, тогда как в некоторых других вариантах осуществления различные ингредиенты фармацевтической композиции могут быть разделены в плане времени или пространства, но предлагаются так, что они могут работать совместно для достижения цели настоящего изобретения.

Когда в фармацевтическую композицию включены два или более активных ингредиента, активные ингредиенты могут применяться у индивидуума одновременно в виде смеси, или могут применяться у индивидуума раздельно. При раздельном применении активные ингредиенты применяются одновременно или последовательно.

Выбор фармацевтически приемлемого носителя зависит от лекарственной формы фармацевтической композиции, во-первых, от пути введения лекарственной формы (например, пероральной, интраназальной, внутримышечной, подкожной, внутримышечного пути или внутривенной инфузии), и, во-вторых, от формулы лекарственной формы. Например, фармацевтически приемлемый носитель может включать воду (например, воду для инъекций), буферный раствор, изотонический солевой раствор, такой как PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор), глюкозу, маннит, декстрозу, лактозу, крахмал, стеарат магния, целлюлозу, карбонат магния, 0,3% глицерин, гиалуроновую кислоту, аскорбиновую кислоту, молочную кислоту, спирт, полиалкиленгликоль, такой как полиэтиленгликоль (например, полиэтиленгликоль 4000) или полипропиленгликоль, триглицерид и т.д.

Кроме того, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может включать различные добавки, такие как увлажняющие агенты, эмульгаторы или буферы, если это необходимо.

В четвертом аспекте в настоящем изобретении предлагается применение конъюгата антители-лекарственное средство по первому аспекту настоящего изобретения или его фармацевтически приемлемой соли, стереоизомера или метаболита или их сольвата для получения лекарственного средства для профилактики или лечения рака. Рак представляет собой описанное ниже в шестом аспекте настоящего изобретения, например, включая, но не ограничиваясь этим, рак молочной железы, рак желудка, рак яичников, немелкоклеточный рак легких и рак печени, особенно рак молочной железы, например рак молочной железы с гиперэкспрессией ErbB2.

В пятом аспекте в настоящем изобретении предлагается фармацевтический препарат, включающий конъюгат антитела и лекарственного средства по первому аспекту настоящего изобретения или его фармацевтически приемлемую соль, стереоизомер или метаболит или их сольват.

Предпочтительно фармацевтическая композиция находится в форме твердого препарата, полутвердого препарата, жидкого препарата или газообразного препарата. Фармацевтическая композиция особенно предпочтительно представляет собой лиофилизированный порошок для инъекций, который имеет преимущества в виде меньшего количества вспомогательных материалов, хорошей стабильности и высокой безопасности при клиническом применении.

В шестом аспекте в настоящем изобретении предлагается способ профилактики или лечения рака, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту конъюгата антитела и лекарственного средства по первому аспекту настоящего изобретения или его фармацевтически приемлемой соли, стереоизомера или метаболита или их сольвата или введение нуждающемуся в этом пациенту фармацевтической композиции по третьему аспекту настоящего изобретения или фармацевтического препарата по пятому аспекту настоящего изобретения. Необязательно способ дополнительно включает введение пациенту одного или более других противораковых агентов, таких как химиотерапевтические агенты и/или антитела, которые могут быть введены одновременно или после конъюгата антители-лекарственное средство, фармацевтической композиции или фармацевтического препарата по настоящему изобретению.

Рак включает, но не ограничивается этим, карциному, бластому, саркому, лейкоз, лимфому и другие злокачественные заболевания лимфатической системы. Конкретные примеры рака включают: сквамозноклеточную карциному (например, карциному клеток плоского эпителия), рак легких (например, мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), аденокарциному легких и сквамозноклеточную карциному легких), перитонеальный рак и рак желудка или рак желудочно-кишечного тракта (например, рак желудочно-кишечного тракта и опухоль стромы желудочно-кишечного тракта (GIST)), рак поджелудочной железы, злокачественную глиому, рак шейки матки, рак яичников, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак прямой кишки, колоректальный рак, рак эндометрия или рак матки, рак слюнных желез, рак почки, рак простаты, рак влагалища, рак щитовидной железы, рак печени, рак анального канала, рак полового члена и рак головы и шеи. В частности, рак представляет собой рак с гиперэкспрессией ErbB2, такой как рак молочной железы, рак желудка, рак эндометрия, рак слюнных желез, рак легких, рак почки, рак толстой кишки, рак щитовидной железы, рак поджелудочной железы или рак мочевого пузыря.

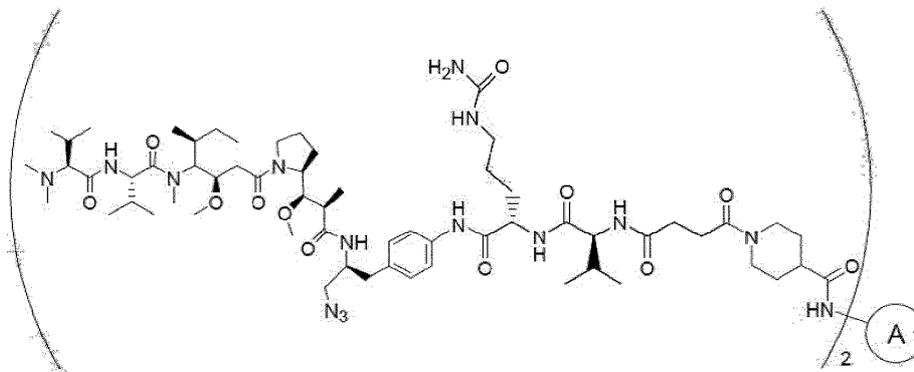
Настоящее изобретение будет дополнительно проиллюстрировано последующими примерами. Эти примеры используются только для иллюстрации настоящего изобретения, но никоим образом не ограничивают настоящее изобретение.

## Примеры

Расшифровка аббревиатур, используемых в каждом примере, представлена в следующей таблице.

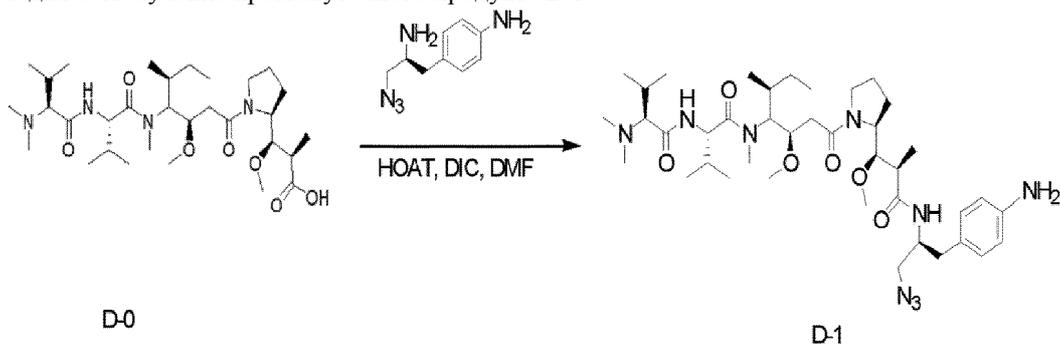
DMF	Диметилформамид
DIC	Диизопропилкарбодиимид
HOAt	1-гидроксил-7-азабензотриазол
EtOAc	Этилацетат
DIEA	Диизопропилэтиламин
HATU	2-(1H-7-азабензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметилурония гексафторфосфат
PyBOP	1H-бензотриазол-1-ил-окси-трипирролидинфосфония гексафторфосфат
HOBT	1-гидроксил-бензотриазол
LiOH	Гидрат лития
DCM	Дихлорметан
EDCI	1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид
NHS	N-гидроксилсукцинимид
DMA	N,N-диметилацетамид
HIC	Хроматография гидрофобного взаимодействия
HPLC	Высокоэффективная жидкостная хроматография
UPLC	Ультравысокоэффективная жидкостная хроматография
THF	Тetraгидрофуран
EtOAc	Этилацетат

Пример 1. Получение конъюгата I-1 антитело-лекарственное средство.



I-1

Стадия а. Получение промежуточного продукта D-I.



D-0

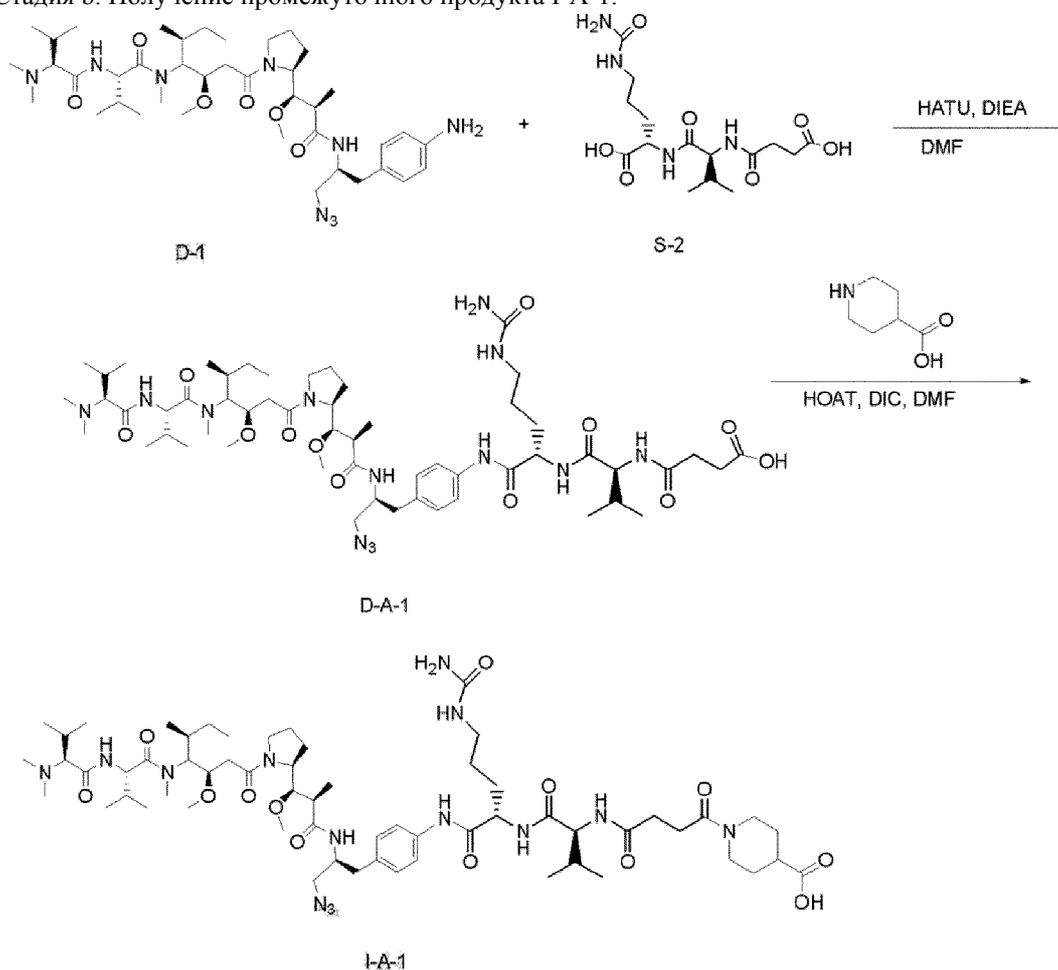
D-1

Соединение D-0 (1 ммоль, 1 экв.) при комнатной температуре растворяли в DMF (50 мл) и добавляли последовательно DIC (1,1 экв.), HOAt (1,1 экв.) и 4-(3-азидо-2-аминопропил)анилин (1,5 экв.). Реакци-

онную смесь перемешивали в течение 8 ч при комнатной температуре и затем добавляли воду (600 мл) и EtOAc (200 мл\*3). После экстракции органическую фазу собирали, концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с получением промежуточного продукта D-1.

МС m/z (ESI): 773 [M+H]<sup>+</sup>.

Стадия b. Получение промежуточного продукта I-A-1.

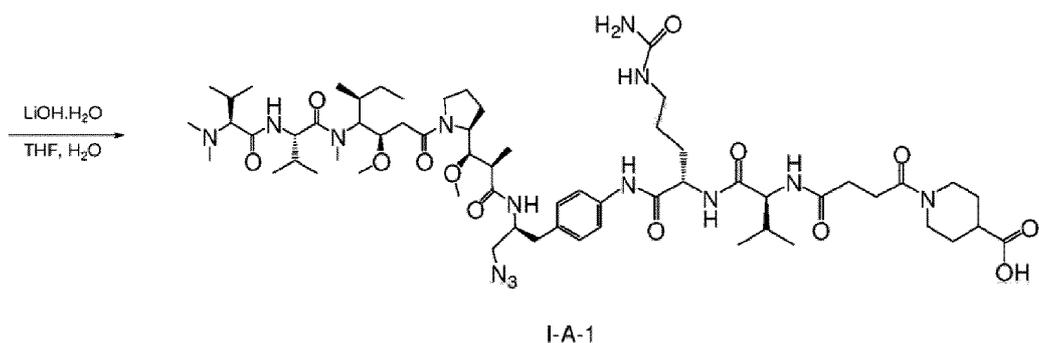
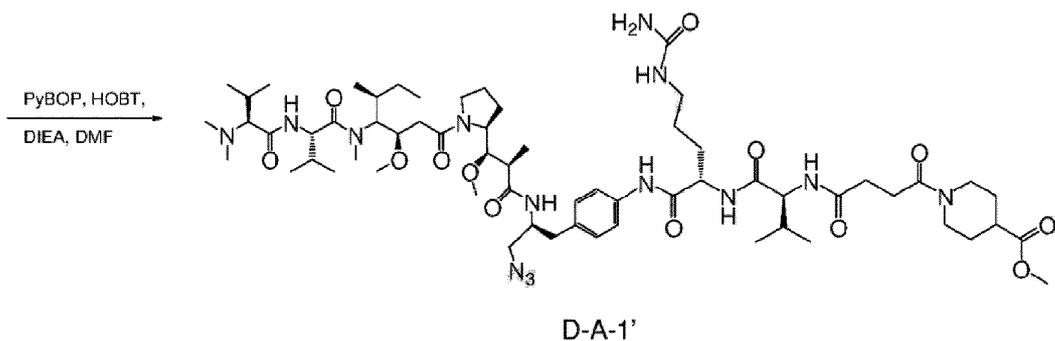
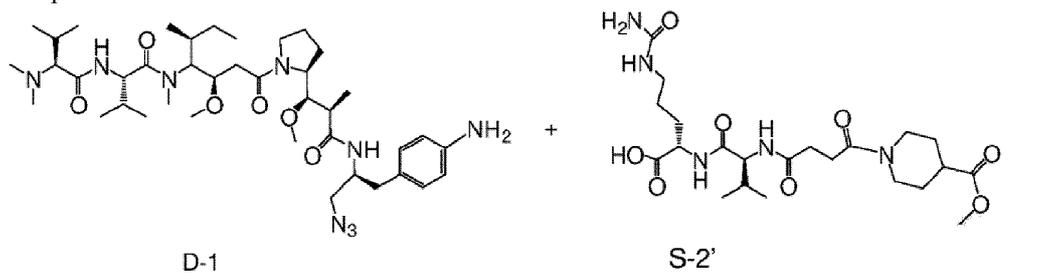


Соединение S-2 (0,1 ммоль, 1 экв.) растворяли при комнатной температуре в DMF (50 мл) и добавляли последовательно DIEA (2 экв.), HATU (1,05 экв.) и соединение D-1 (2,0 экв.). Реакцию проводили в течение 12 ч при комнатной температуре и затем добавляли воду (300 мл) и EtOAc (100 мл\*3). После экстракции органическую фазу собирали, концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с получением промежуточного продукта D-A-1.

Соединение D-A-1 (0,1 ммоль, 1 экв.) при комнатной температуре растворяли в DMF (5 мл) и добавляли последовательно DIC (1,1 экв.)/HOAt (1,1 экв.) и пиперидин-4-карбоновую кислоту (1,2 экв.). Реакционную смесь перемешивали в течение 6 ч при комнатной температуре и затем добавляли воду (60 мл) и EtOAc (20 мл\*3). После экстракции органическую фазу собирали, концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с получением промежуточного продукта I-A-1.

МС m/z (ESI): 1240 [M+H]<sup>+</sup>.

Альтернативно

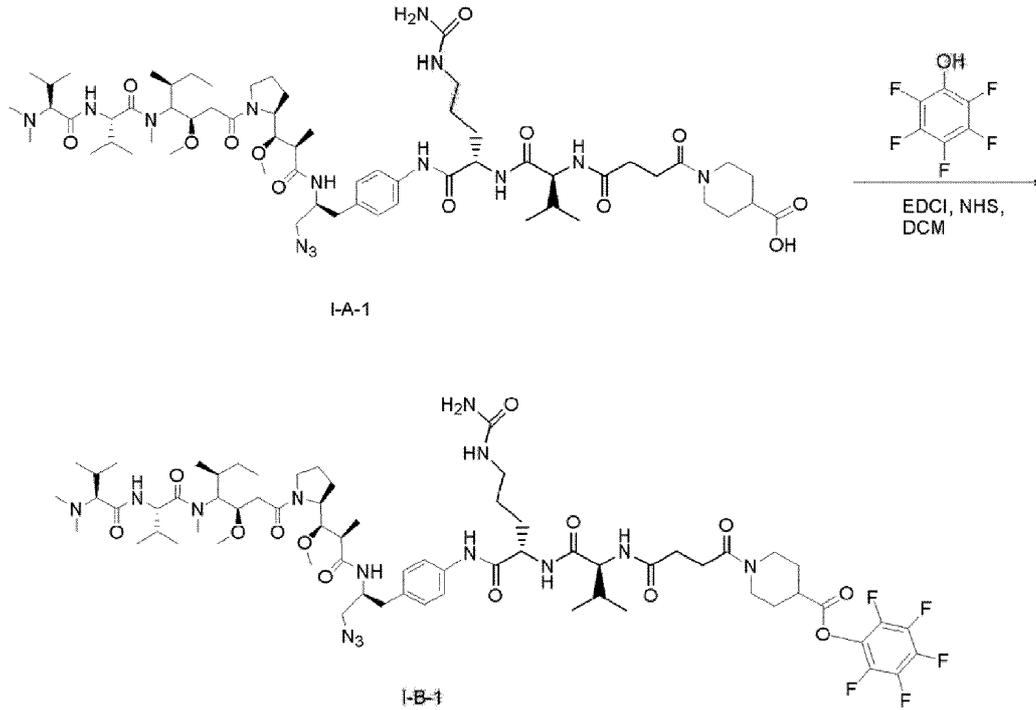


Соединение S-2' (0,1 ммоль, 1,0 экв.) в водяной бане со льдом растворяли в DMF (10 мл) и добавляли последовательно DIEA (2,0 экв.), PyBOP (1,0 экв.), HOBT (1,0 экв.) и соединение D-1 (0,2 ммоль, 2,0 экв.). Реакцию проводили в течение 12 ч при комнатной температуре и затем добавляли воду (30 мл) и EtOAc (10 мл\*3). После экстракции органическую фазу собирали, концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с получением промежуточного продукта D-A-1'.

Соединение D-A-1' (0,05 ммоль, 1,0 экв.) при комнатной температуре растворяли в THF/H<sub>2</sub>O (6 мл, об./об.=5:1) и добавляли моногидрат LiOH (3,0 экв.). Реакционную смесь перемешивали в течение 16 ч при комнатной температуре. После очистки получали промежуточный продукт I-A-1.

МС m/z (ESI): 1240 [M+H]<sup>+</sup>.

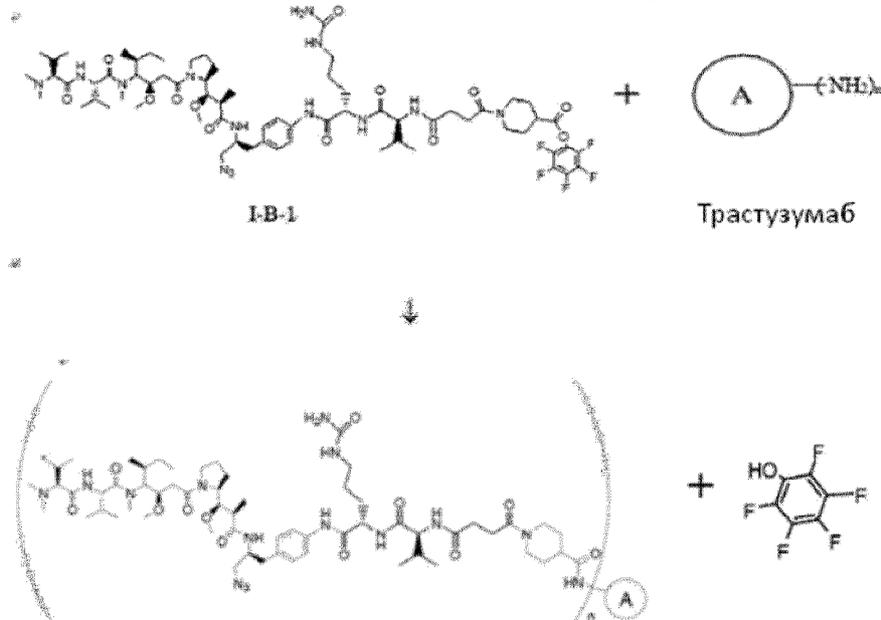
Стадия с. Получение промежуточного продукта I-B-1.



Соединение I-A-1 (0,1 ммоль, 1 экв.) при комнатной температуре растворяли в DCM (50 мл) и добавляли последовательно EDCI (1,5 экв.), NHS (1,5 экв.) и пентафторфенол (2,0 экв.). Реакцию проводили в течение 18 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь промывали последовательно водой (30 мл), 10% (мас./об.) водным раствором лимонной кислоты (20 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (20 мл). Органическую фазу собирали, концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с получением промежуточного продукта I-B-1.

МС  $m/z$  (ESI): 1406  $[M+H]^+$ .

Стадия d. Получение неочищенного конъюгата I-1 антитело-лекарственное средство.



Неочищенный I-1 (где  $n=1, 2, 3, 4$ ).

К 1 мл раствора 10-20 мг/мл трастузумаба, полученного в PBS буфере ( $pH=7,4$ ), добавляли 4-6-кратное молярное количество соединения I-B-1, растворенного в DMA. Реакцию проводили при осторожном перемешивании в течение 2-6 ч при температуре в диапазоне 2-40°C и под контролем ГИХ-ВЭЖХ с получением конъюгата I-1 антитело-лекарство. Хроматограмма ГИХ-ВЭЖХ представлена на фиг. 1.

## Условия ГИХ-ВЭЖХ:

Колонка:	Tosoh TSKgel бутил-NPR, 4,6×100 мм
Подвижная фаза А:	1,5 М водный раствор сульфата аммония
Подвижная фаза В:	25 мМ водный раствор фосфата натрия, рН=7,0, 25% (об./об.) водный раствор изопропанола
Скорость тока:	0,5 мл/мин
Градиент:	0-2 мин: 17% подвижная фаза В+83% подвижная фаза А; 2-15 мин: 17-40% подвижная фаза В+83-60% подвижная фаза А; 15-15,1 мин: 40-70% подвижная фаза В+60-30% подвижная фаза А; 15,1-17 мин: 70% подвижная фаза В+30% подвижная фаза А

Из фиг. 1 можно видеть, что неочищенный конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой смесь, включающую I-1-1 (DAR1 на фиг. 1, n=1), I-1-2 (DAR2 на фиг. 1, n=2), I-1-3 (DAR3 на фиг. 1, n=3) и I-1-4 (DAR4 на фиг. 1, n=4).

Стадия е. Очистка неочищенного конъюгата I-1 антитело-лекарственное средство.

Неочищенный конъюгат I-1 антитело-лекарственное средство, полученный на стадии d, очищали с помощью ГИХ, затем обессоливали заменой буфера и концентрировали ультрафильтрацией с получением конъюгата I-1 антитело-лекарственное средство.

## Условия ГИХ:

Материал упаковки:	Pheynl HP от GE
Подвижная фаза А:	1,5 М водный раствор сульфата аммония, 25 мМ водный раствор динатрия гидрофосфата, рН=7,0,
Подвижная фаза В:	25 мМ водный раствор динатрия гидрофосфата, рН=7,0, 10% водный раствор изопропанола
Скорость тока:	1,0 мл/мин
Градиент:	0%-40% подвижная фаза В, промывка 20 CV; 40%-100% подвижная фаза В, промывка 30 CV, сбор в пробирки

DAR полученного конъюгата I-1 антитело-лекарственное средство анализировали с помощью ГИХ-ВЭЖХ и получали хроматограмму, как показано на фиг. 2. На фиг. 2 можно видеть, что конъюгат I-1 антитело-лекарственное средство присутствует в виде одного пика, и анализ в сочетании с картированием пептидов на фиг. 4 указывает на то, что конъюгат I-1 антитело-лекарственное средство имеет DAR 2, т.е. n=2. Он представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, в котором две молекулы лекарственного средства конъюгированы с одной молекулой антитела, и продукт является чистым.

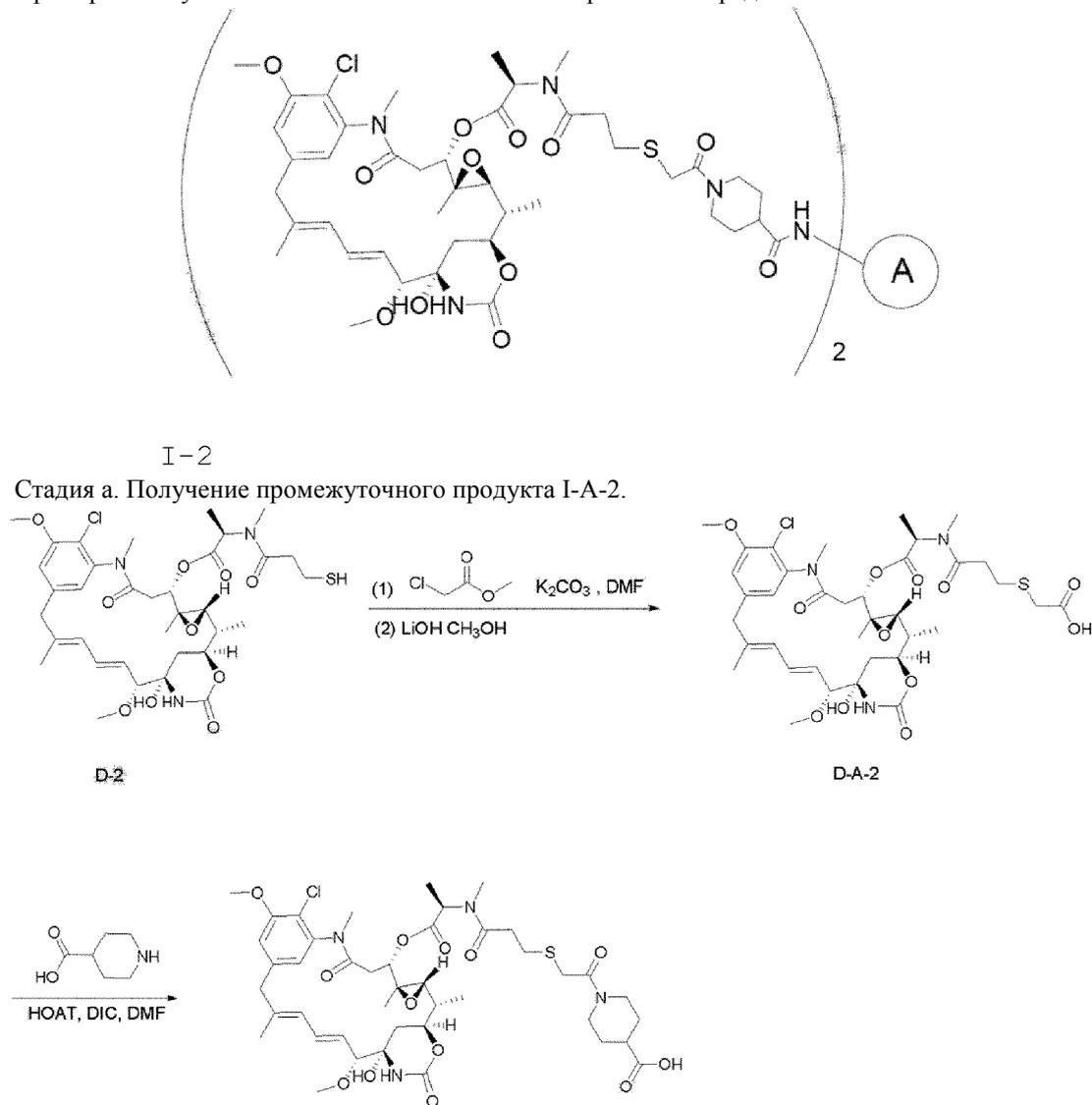
Кроме того, тяжелую и легкую цепи конъюгата I-1 антитело-лекарственное средство анализировали с помощью восстановленной жидкостной хроматографии и получили наложенные хроматограммы с обращенной фазой, как показано на фиг. 3. На фиг. 3 темная линия представляет собой хроматограмму трастузумаба, а светлая линия представляет собой хроматограмму конъюгата I-1 антитело-лекарственное средство. На обеих хроматограммах более высокий пик представляет собой тяжелую цепь, а более низкий пик представляет собой легкую цепь. Как можно видеть на фиг. 3, гидрофобность легкой цепи конъюгата I-1 антитело-лекарственное средство повышена по сравнению с гидрофобностью трастузумаба без конъюгации лекарственного средства, демонстрируя более длительное время удерживания. Это указывает на то, что все молекулы лекарственного средства конъюгированы с легкой цепью антитела.

Более того, после гидролиза в одинаковых условиях получали картирование пептидов как конъюгата I-1 антитело-лекарственное средство, так и трастузумаба, как показано на фиг. 4.

В картировании пептидов на фиг. 4 верхняя кривая представляет собой картирование пептидов антитела при 214 нм, а нижняя кривая представляет собой картирование пептидов конъюгата I-1 антитело-

лекарственное средство. Сравнение показывает, что конъюгат I-1 антитело-лекарственное средство имеет только один дополнительный пик с временем удерживания 65,5 мин. Учитывая восстановленные хроматограммы легкой и тяжелой цепей на фиг. 3, все цитотоксические агенты (D) конъюгированы с остатками лизина того же самого пептидного сегмента легкой цепи конъюгата I-1 антитело-лекарственное средство, полученного в этом примере, и сайт-специфическая конъюгация обеспечивает прекрасную гомогенность, контролируемость и воспроизводимость продукта.

Пример 2. Получение конъюгата I-2 антитело-лекарственное средство.



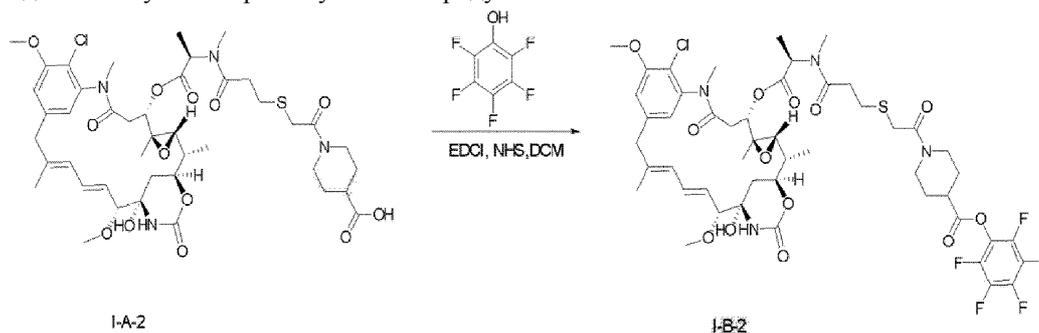
#### I-A-2

Соединение D-2 (полученное от Nanjing Levena Biopharma Co., Ltd., 1 ммоль, 1 экв.) при комнатной температуре растворяли в DMF (50 мл) и добавляли карбонат калия (2,5 экв.) и метил-2-хлорацетат (1,5 экв.). Реакционную смесь нагревали до 40-45°C и реакцию проводили в течение 4 ч. После завершения реакции твердый карбонат калия удаляли фильтрацией и фильтрат концентрировали. Полученное в результате концентрирования вещество растворяли в метаноле (30 мл) и добавляли 1 М водный раствор гидроксида лития для доведения pH до 13-14. Реакционную смесь нагревали до 55°C и перемешивали в течение 16 ч с последующим добавлением 10% (мас./об.) водного раствора лимонной кислоты, концентрирования и очистки с помощью ВЭЖХ с получением промежуточного продукта D-A-2.

Соединение D-A-2 (0,1 ммоль, 1 экв.) при комнатной температуре растворяли в DMF (5 мл) и добавляли последовательно DIC (1,1 экв.), HOAt (1,1 экв.) и пиперидин-4-карбоновую кислоту (1,2 экв.). Реакционную смесь перемешивали в течение 6 ч при комнатной температуре и затем добавляли воду (60 мл) и EtOAc (20 мл\*3). После экстракции органическую фазу собирали, концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с получением промежуточного продукта I-A-2.

Ms m/z (ESI): 907 [M+H]<sup>+</sup>.

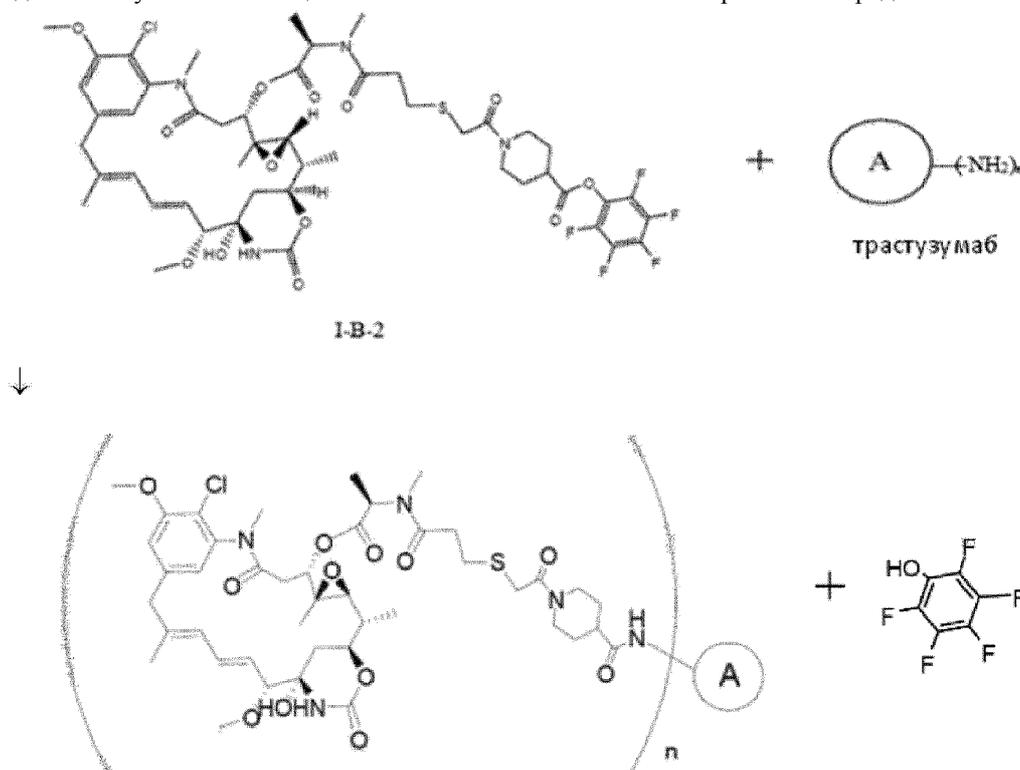
Стадия b. Получение промежуточного продукта I-B-2.



Соединение I-A-2 (0,1 ммоль, 1 экв.) при комнатной температуре растворяли в DCM (50 мл) и добавляли последовательно EDCI (1,5 экв.), NHS (1,5 экв.) и пентафторфенол (2,0 экв.). Реакцию проводили в течение 18 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь промывали последовательно водой (30 мл), насыщенным водным раствором лимонной кислоты (20 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (20 мл). После экстракции органическую фазу собирали, концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с получением промежуточного продукта I-B-2.

МС  $m/z$  (ESI): 1073  $[M+H]^+$ .

Стадия c. Получение неочищенного конъюгата I-2 антитело-лекарственное средство.



Неочищенный I-2 (где  $n=1, 2, 3$ ).

К 1 мл раствора 10 мг/мл трастузумаба, полученного в PBS буфере (pH=7,4), добавляли 8-кратный молярный избыток соединения I-B-2, растворенного в DMA. Реакцию проводили при осторожном перемешивании в течение 16 ч при комнатной температуре и за ней прослеживали с помощью ГИХ-ВЭЖХ (условия ГИХ-ВЭЖХ были теми же, что и условия на стадии d примера 1), с получением неочищенного конъюгата I-2 антитело-лекарственное средство. Хроматограмма ГИХ-ВЭЖХ представлена на фиг. 5.

Из фиг. 5 можно видеть, что неочищенный конъюгат I-2 антитело-лекарственное средство представляет собой смесь, включающую I-2-1 (DAR1 на фиг. 5,  $n=1$ ), I-2-2 (DAR2 на фиг. 5,  $n=2$ ) и I-2-3 (DAR3 на фиг. 5,  $n=3$ ).

Стадия d. Очистка неочищенного конъюгата I-2 антитело-лекарственное средство.

Неочищенный конъюгат I-2 антитело-лекарственное средство, полученный на стадии c, очищали с помощью ГИХ (условия ГИХ были теми же, что и условия на стадии e примера 1), затем обессоливали заменой буфера и концентрировали ультрафильтрацией с получением конъюгата I-2 антитело-лекарственное средство.

DAR полученного конъюгата I-2 антитело-лекарственное средство анализировали с помощью ГИХ-ВЭЖХ и получили хроматограмму, как показано на фиг. 6. На фиг. 6 можно видеть, что DAR конъюгата

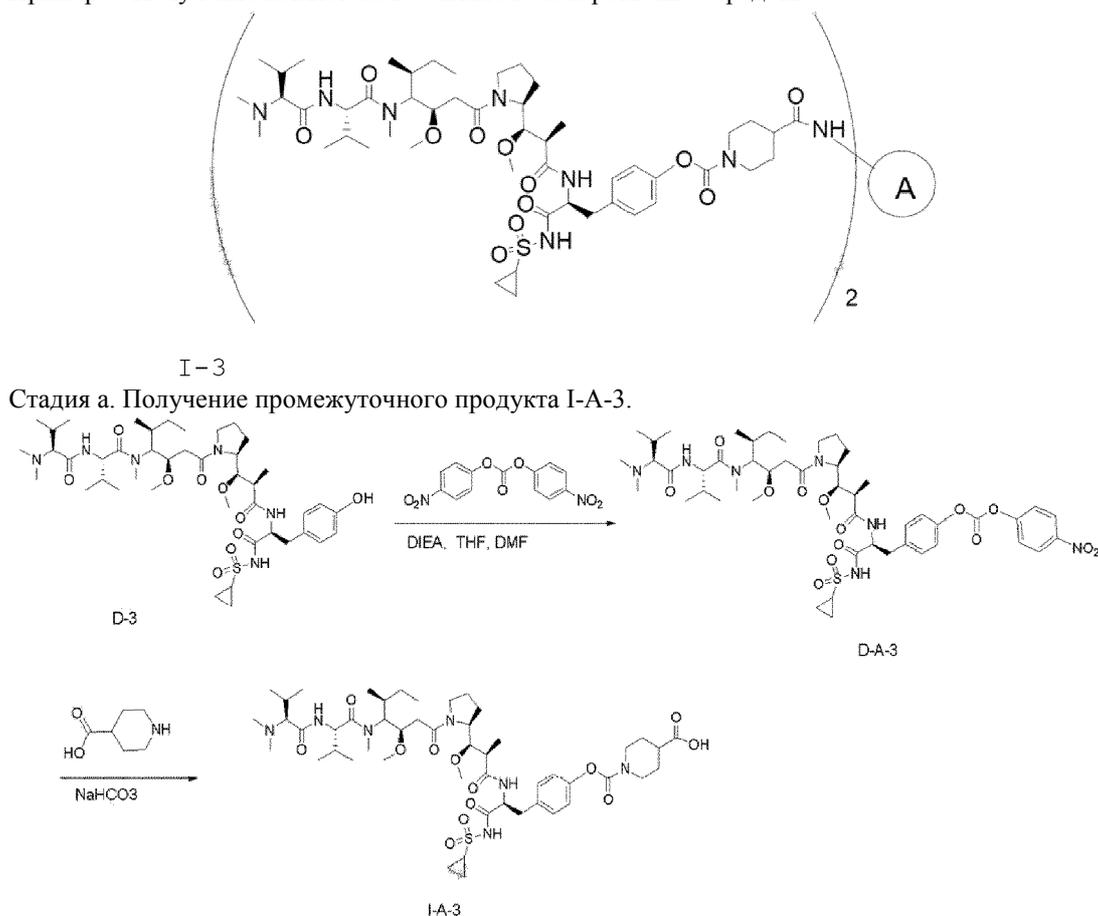
I-2 антитело-лекарственное средство составляет 2, указывая на  $n=2$  в конъюгате I-2 антитело-лекарственное средство. Он представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, в котором две молекулы лекарственного средства конъюгированы с одной молекулой антитела, и продукт является чистым.

Кроме того, тяжелую и легкую цепи конъюгата I-2 антитело-лекарственное средство анализировали с помощью восстановленной жидкостной хроматографии и получили наложенные хроматограммы, как показано на фиг. 7. На фиг. 7 темная линия представляет собой хроматограмму трастузумаба, а светлая линия представляет собой хроматограмму конъюгата I-2 антитело-лекарственное средство. На обеих хроматограммах более высокий пик представляет собой тяжелую цепь, а более низкий пик представляет собой легкую цепь. Как можно видеть на фиг. 7, гидрофобность легкой цепи конъюгата I-2 антитело-лекарственное средство повышена по сравнению с гидрофобностью трастузумаба без конъюгации лекарственного средства, демонстрируя более длительное время удерживания. Это указывает на то, что все молекулы лекарственного средства конъюгированы с легкой цепью антитела.

Более того, после гидролиза в одинаковых условиях получали картирование пептидов как конъюгата I-2 антитело-лекарственное средство, так и трастузумаба, как показано на фиг. 8.

В картировании пептидов на фиг. 8 верхняя кривая представляет собой картирование пептидов антитела при 214 нм, а нижняя кривая представляет собой картирование пептидов конъюгата I-2 антитело-лекарственное средство. Сравнение показывает, что конъюгат I-1 антитело-лекарственное средство имеет только один дополнительный пик с временем удерживания 33,0 мин. Учитывая восстановленные хроматограммы легкой и тяжелой цепей на фиг. 7, все цитотоксические агенты (D) конъюгированы с остатками лизина того же самого пептидного сегмента легкой цепи конъюгата I-2 антитело-лекарственное средство, полученного в этом примере, и сайт-специфическая конъюгация обеспечивает прекрасную однородность, контролируемость и воспроизводимость продукта.

Пример 3. Получение конъюгата I-3 антитело-лекарственное средство.



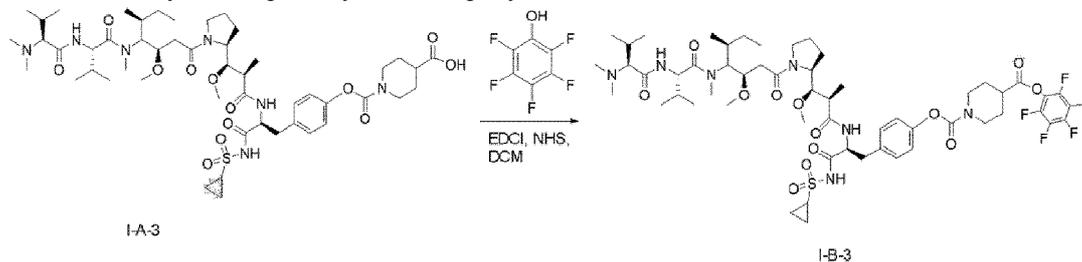
Соединение D-3 (синтезированное в соответствии с примером V-3 на странице 65 патента CN 104662000A, 1 ммоль, 1 экв.) при комнатной температуре растворяли в смеси THF (60 мл) и DMF (30 мл) и добавляли последовательно ди-(*p*-нитрофенил)карбонат (3 экв.) и DIEA (2 экв.). Реакционную смесь перемешивали в течение 12 ч при комнатной температуре и добавляли воду (600 мл) и EtOAc (200 мл\*3). После экстракции органическую фазу собирали и концентрировали с получением неочищенного промежуточного продукта D-A-3, который использовали для реакции на следующей стадии прямо без очистки.

Пиперидин-4-карбоновую кислоту (5 экв.) при комнатной температуре растворяли в насыщенном водном растворе  $\text{NaHCO}_3$  (5 мл) и добавляли неочищенный D-A-3 (1 экв.). Реакционную смесь переме-

шивали в течение 8 ч при комнатной температуре; 10% (мас./об.) водный раствор лимонной кислоты добавляли для доведения pH до 4-5 с последующей экстракцией с помощью EtOAc (150 мл \*2). Органическую фазу сушили и концентрировали с получением неочищенного промежуточного продукта I-A-3.

МС m/z (ESI): 1020 [M+H]<sup>+</sup>.

Стадия b. Получение промежуточного продукта I-B-3.

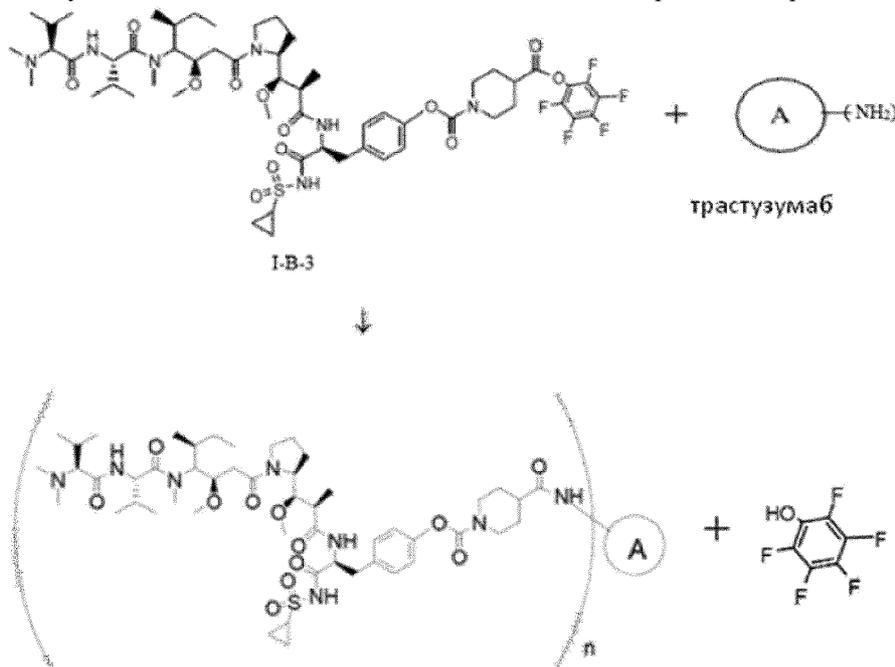


Соединение I-A-3 (0,1 ммоль, 1 экв.) при комнатной температуре растворяли в DCM (50 мл) и добавляли последовательно EDCI (1,5 экв.), NHS (1,5 экв.) и петафторфенол (2,0 экв.). Реакцию проводили в течение 18 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь промывали последовательно водой (30 мл), 10% (масс./об.) водным раствором лимонной кислоты (20 мл) и насыщенным водным раствором хлорида натрия (20 мл). После экстракции органическую фазу собирали, концентрировали и очищали с помощью ВЭЖХ с получением промежуточного продукта I-B-3.

МС m/z (ESI): 1186 [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H-ЯМР (400 МГц, DMSO-d<sub>6</sub>) ###: 7,02-7,09 (м, 4H), 4,92 (м, 1H), 4,52 (м, 1H), 3,89 (д, 1H), 3,77 (м, 1H), 3,68-3,55 (м, 3H), 3,46 (м, 2H), 3,24 (м, 6H), 3,05 (д, 2H), 2,92-2,90 (м, 4H), 2,68 (м, 1H), 2,33-2,27 (м, 11H), 1,97-1,93 (м, 4H), 1,73-1,72 (м, 5H), 1,29-1,24 (м, 5H), 1,06-1,01 (м, 15H), 0,96 (м, 3H), 0,74 (м, 4H), 3,34 (м, 4H).

Стадия c. Получение неочищенного конъюгата I-3 антитело-лекарственное средство.



Неочищенный I-3 (где n=1, 2, 3).

К 1 мл раствора 10 мг/мл трастузумаба, полученного в PBS буфере (pH=7,4), добавляли 8-кратный молярный избыток соединения I-B-3, растворенного в DMA. Реакцию проводили при осторожном перемешивании в течение 4 ч при комнатной температуре и за ней прослеживали с помощью ГИХ-ВЭЖХ (условия ГИХ-ВЭЖХ были теми же, что и условия на стадии d примера 1), с получением неочищенного конъюгата I-3 антитело-лекарственное средство. Хроматограмма ГИХ-ВЭЖХ представлена на фиг. 9.

Из фиг. 9 можно видеть, что неочищенный конъюгат I-3 антитело-лекарственное средство представляет собой смесь, включающую I-3-1 (DAR1 на фиг. 9, n=1), I-3-2 (DAR2 на фиг. 9, n=2) и I-3-3 (DAR3 на фиг. 8, n=3).

Стадия d. Очистка неочищенного конъюгата I-3 антитело-лекарственное средство.

Неочищенный конъюгат I-3 антитело-лекарственное средство, полученный на стадии c, очищали с помощью ГИХ (условия ГИХ были теми же, что и условия на стадии e примера 1), затем обессоливали заменой буфера и концентрировали ультрафильтрацией с получением конъюгата I-3 антитело-лекарственное средство.

DAR полученного конъюгата I-3 антитело-лекарственное средство анализировали с помощью ГИХ-ВЭЖХ, и получали хроматограмму, как показано на фиг. 10. На фиг. 10 можно видеть, что DAR конъюгата I-3 антитело-лекарственное средство составляет 2, указывая на  $n=2$  в конъюгате антитело-лекарственное средство. Он представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, в котором две молекулы лекарственного средства конъюгированы с одной молекулой антитела, и продукт является чистым.

Кроме того, тяжелую и легкую цепи конъюгата I-3 антитело-лекарственное средство анализировали с помощью восстановленной жидкостной хроматографии и получили наложенные хроматограммы, как показано на фиг. 11. На фиг. 11 темная линия представляет собой хроматограмму трастузумаба, а светлая линия представляет собой хроматограмму конъюгата I-3 антитело-лекарственное средство. На обеих хроматограммах более высокий пик представляет собой тяжелую цепь, а более низкий пик представляет собой легкую цепь. Как можно видеть на фиг. 11, гидрофобность легкой цепи конъюгата I-3 антитело-лекарственное средство повышена по сравнению с гидрофобностью трастузумаба без конъюгации лекарственного средства, демонстрируя более длительное время удерживания. Это указывает на то, что все молекулы лекарственного средства конъюгированы с легкой цепью антитела.

Более того, после гидролиза в одинаковых условиях получали картирование пептидов как конъюгата I-3 антитело-лекарственное средство, так и трастузумаба, как показано на фиг. 12.

В картировании пептидов на фиг. 12 верхняя кривая представляет собой картирование пептидов антитела при 214 нм, а нижняя кривая представляет собой картирование пептидов конъюгата I-3 антитело-лекарственное средство. Сравнение показывает, что конъюгат I-1 антитело-лекарственное средство имеет только один дополнительный пептидный фрагмент с временем удерживания 39,0 мин. Учитывая восстановленные хроматограммы легкой и тяжелой цепей на фиг. 11, цитотоксические агенты (D) все конъюгированы с остатками лизина того же самого пептидного сегмента легкой цепи конъюгата I-3 антитело-лекарственное средство, полученного в этом примере, и сайт-специфическая конъюгация обеспечивает прекрасную гомогенность, контролируемость и воспроизводимость продукта.

Пример 4. Тест на активность *in vivo*.

В этом примере конъюгаты антитело-лекарственное средство примеров 1-3 оценивали на ингибирование пролиферации опухолей у мышей с подкожной трансплантацией клеток опухоли человека. Конкретно в этом примере конъюгаты антитело-лекарственное средство примеров 1-3 вводили путем однократной внутривенной инъекции в каудальную вену мышам с трансплантированной линией клеток NCI-N87 рака желудка человека или линией клеток SK-OV-3 рака яичников. Для расчета эффективности (ингибирующей опухоли эффективности) конъюгатов антитело-лекарственное средство измеряли изменение объема опухолей и массы животных у мышей-опухоленосителей.

Подходящее количество трастузумаба, T-DM1 (положительный контроль, KADCYLA® (адо-трастузумаб эмтанзин), Roche) и конъюгатов антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению (I-3, I-1 или I-2, полученных в примерах 1-3) взвешивали и готовили маточные растворы определенной концентрации с использованием стерильной ультрачистой воды. После осторожного встряхивания маточные растворы распаковывали и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Лечебные растворы для использования получали путем разведения нормальным физиологическим раствором, и нормальный физиологический раствор в той же самой концентрации использовали в качестве контрольного растворителя.

Мышей-опухоленосителей (модели, полученные в 1.2) с объемом опухолей  $100-200 \text{ мм}^3$  случайным образом распределяли по 7 мышей на группу (число образцов в каждой группе определяли в соответствии с количеством образца). Дозировка составляла 10 мл/кг. Путь введения представлял собой однократную внутривенную инъекцию в каудальную вену. После введения диаметр опухоли измеряли штангенциркулем с нониусом два раза в неделю в течение периода наблюдения 8 недель, и объем опухоли рассчитывали в соответствии со следующим равенством:  $V=0,5a^2 \times b$ , где  $a$  и  $b$  представляют собой наибольший диаметр опухоли и наименьший диаметр опухоли соответственно. Наблюдали за смертностью животных и ее регистрировали ежедневно.

Для оценки противоопухолевой эффективности конъюгатов антитело-лекарственное средство рассчитывали ингибирование роста опухоли TGI (%) с помощью следующего уравнения:

$$\text{TGI (\%)} = [1 - (V_{Te} - V_{Ts}) / (V_{Ce} - V_{Cs})] \times 100\%$$

где  $V_{Te}$  - средний объем опухоли группы с лечением в конце периода наблюдения;

$V_{Ts}$  - средний объем опухоли группы с лечением при введении;

$V_{Ce}$  - средний объем опухоли контрольной группы в конце периода наблюдения;

$V_{Cs}$  - средний объем опухоли контрольной группы при введении.

Результаты представлены в табл. 1-4.

Таблица 1. Модель рака молочной железы BT-474

Группа	Образец	Доза (мг/кг)	TGI (%)
1	растворитель	/	/
2	T-DM1	3	54,80%
3	I-1	3	104,75%
4	I-3	3	107,52%

Конъюгаты антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению имеют сходную эффективность в отношении ингибирования опухоли для разных линий клеток рака молочной железы.

Таблица 2. Модель рака желудка NCI-N87

Группа	Образец	Доза (мг/кг)	Исходный объем опухоли (мм <sup>3</sup> )	Конечный объем опухоли (мм <sup>3</sup> )
1	растворитель	/	132,80	чрезмерная опухоль, эвтаназия
2	T-DM1	6	133,46	774,76
3	I-2	6	132,54	560,45
4	I-3	6	132,44	3,84

Таблица 3. Модель рака желудка NCI-N87

Группа	Образец	Доза (мг/кг)	TGI (%)
1	Растворитель	/	/
2	T-DM1	2	30,136%
3	I-1	2	114,99%
4	I-3	2	87,04%
5	T-DM1	3	65,28%
6	I-3	3	102,72%

Таблица 4. Модель рака яичников SK-OV-3

Группа	Образец	Доза (мг/кг)	TGI (%)
1	Растворитель	/	/
2	T-DM1	6	-11,04%
3	I-2	6	54,72%
4	I-3	6	72,27%

Как показано в табл. с 1 по 4, конъюгаты антитело-лекарственное средство I-1, I-3 и I-2 по настоящему изобретению, очевидно, имеют превосходную ингибирующую опухоль активность в отношении различных опухолей, например рака желудка, рака яичников, рака молочной железы по сравнению с T-DM1, и гибель животных указывает на их высокую безопасность.

Пример 5. Тест на стабильность *in vivo*.

В этом примере оценивали стабильность конъюгатов антитело-лекарственное средство из примеров 1-3 у крыс. Конкретно в этом примере конъюгаты антитело-лекарственное средство из примеров 1-3 вводили крысам путем однократной внутривенной инъекции в каудальную вену в дозе 2 мг/кг. Кровь регулярно собирали из яремной вены и концентрации конъюгатов антитело-лекарственное средство и суммарного антитела в крови измеряли с помощью ELISA для расчета периода полужизни конъюгатов антитело-лекарственное средство у крыс. Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 5. Периоды полужизни конъюгатов антитело-лекарственное средство

Конъюгат антитело-лекарственное средство	T <sub>1/2</sub> (час)
T-DM1*	114*
I-1	247,6
I-2	211,3
I-3	259,8

\*Период полужизни T-DM1 у крыс составлял 114 ч в соответствии со статьей Bender et al., The AAPS Journal, Vol. 16, No. 5, September 2014

Из табл. 5 можно видеть, что конъюгаты I-1, I-3 и I-2 антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению имеют более длительные периоды полужизни, указывая, очевидно, на прекрасную стабильность по сравнению с T-DM1.

Пример 6. Получение лиофилизованного порошка для инъекций конъюгата I-1 антитело-лекарственное средство.

Материалы, представленные в следующей таблице, использовали для получения лиофилизованного порошка для инъекций конъюгата I-1 антитело-лекарственное средство.

Конъюгат I-1 антитело-лекарственное средство	28 г
Аскорбиновая кислота	20 г
Молочная кислота	10 г
Полиэтиленгликоль 4000	63 г
Вода для инъекций	2000 мл

Метод получения.

1. 20 г аскорбиновой кислоты и 10 г молочной кислоты добавляли к 1000 мл воды для инъекций и затем нагревали до 50-55°C и растворяли при перемешивании. К раствору добавляли 28 г конъюгата антитело-лекарственное средство, растворяли при перемешивании и затем перемешивали в течение 15 мин.

2. 63 г полиэтиленгликоля 4000 добавляли к 800 мл воды для инъекций и перемешивали в течение 15 мин.

3. После объединения растворов 1 и 2 добавляли оставшуюся воду для инъекций. Добавляли 0,15% активированный иголь уголь, смесь перемешивали 25 мин. После удаления угля фильтрацией исследовали промежуточный продукт и если признавали годным, фильтровали для стерилизации через 0,22 мкм мембрану.

4. Фильтрат помещали во флаконы и лиофилизовали с получением лиофилизованного порошка для инъекций. После проверки признанный годным продукт упаковывали.

Пример 7. Получение лиофилизованного порошка для инъекций конъюгата I-2 антитело-лекарственное средство.

Материалы, представленные в следующей таблице, использовали для получения лиофилизованного порошка для инъекций конъюгата I-2 антитело-лекарственное средство.

Конъюгат I-2 антитело-лекарственное средство	20 г
Сукцинат натрия	1,62 г
Сахароза	60 г
Твин 20	0,2 г
Вода для инъекций	1000 мл

Метод получения.

1. 16,2 г сукцината натрия, 2 г твин 20 и 600 г сахарозы добавляли к воде для инъекций до постоянного объема 10 л и растворяли при перемешивании. Раствор использовали в качестве буфера композиции после стерильной фильтрации. Количество маточного раствора, эквивалентное количеству, содержащему 20 г конъюгата I-2 антитело-лекарственное средство, подвергали ультрафильтрации с буфером композиции для замены последним и затем концентрировали до 1000 мл.

2. Раствор из 1 фильтровали для стерилизации через 0,22 мкм мембрану.

3. Фильтрат помещали во флаконы и лиофилизовали с получением лиофилизованного порошка для инъекций. После проверки признанный годным продукт упаковывали.

Пример 8. Получение лиофилизованного порошка для инъекций конъюгата I-3 антитело-лекарственное средство.

Материалы, представленные в следующей таблице, использовали для получения лиофилизованного порошка для инъекций конъюгата I-3 антитело-лекарственное средство.

Конъюгат I-3 антитело-лекарственное средство	20 г
L-гистидин	0,32 г
L-гистидин гидрохлорид	0,495 г
Трегалозы дигидрат	20 г
Твин 20	0,09 г
Вода для инъекций	1000 мл

1. 3,2 г L-гистидина, 4,95 г L-гистидина гидрохлорида, 200 г трегалозы дигидрата и 0,9 г твин 20 добавляли к воде для инъекций до постоянного объема 10 л и растворяли при перемешивании. Раствор использовали в качестве буфера композиции после стерильной фильтрации. Количество маточного раствора, эквивалентное количеству, содержащему 20 г конъюгата I-3 антитело-лекарственное средство, подвергали ультрафильтрации с буфером композиции для замены последним и затем концентрировали до 1000 мл.

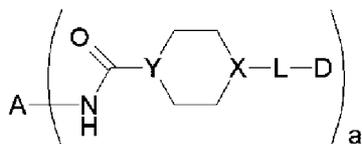
2. Раствор из 1 фильтровали для стерилизации через 0,22 мкм мембрану.

3. Фильтрат помещали во флаконы и лиофилизовали с получением лиофилизованного порошка для инъекций. После проверки признанный годным продукт упаковывали.

Хотя настоящее изобретение проиллюстрировано конкретными примерами, представленными выше, оно не должно интерпретироваться как ограниченное этими примерами. Настоящее изобретение охватывает общие аспекты, раскрытые выше, и специалисты в данной области техники могут делать различные модификации или изменения различных деталей настоящего изобретения, не выходя за рамки сущности и объема настоящего изобретения. Следовательно, описание предназначено только для иллюстративных целей, но никак не для каких-либо ограничений.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат антитело-лекарственное средство формулы (I) для лечения рака, или его фармацевтически приемлемая соль, или стереоизомер, или их сольват



(I)

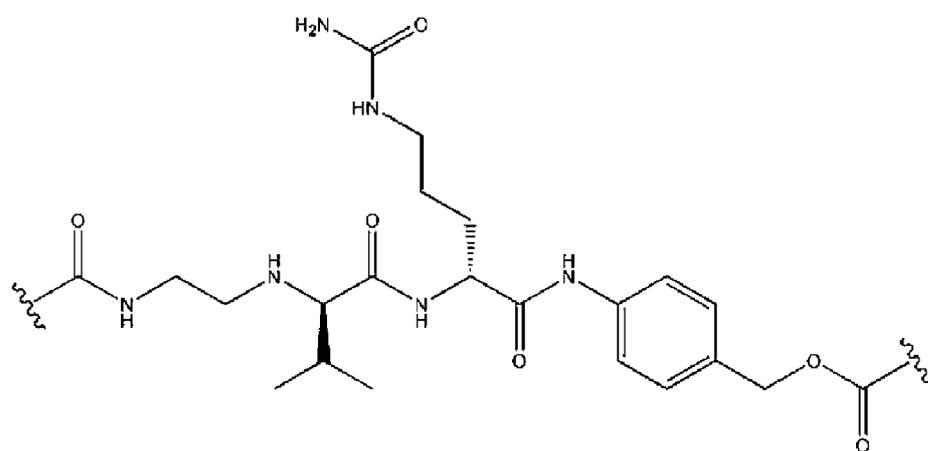
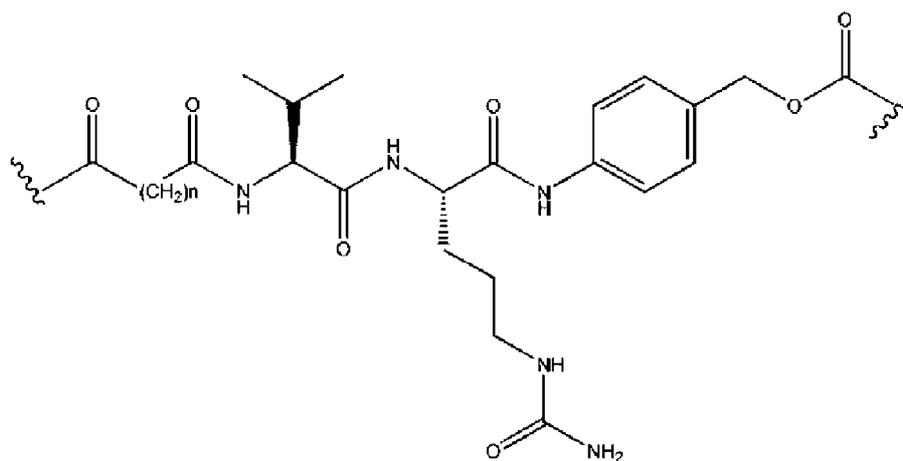
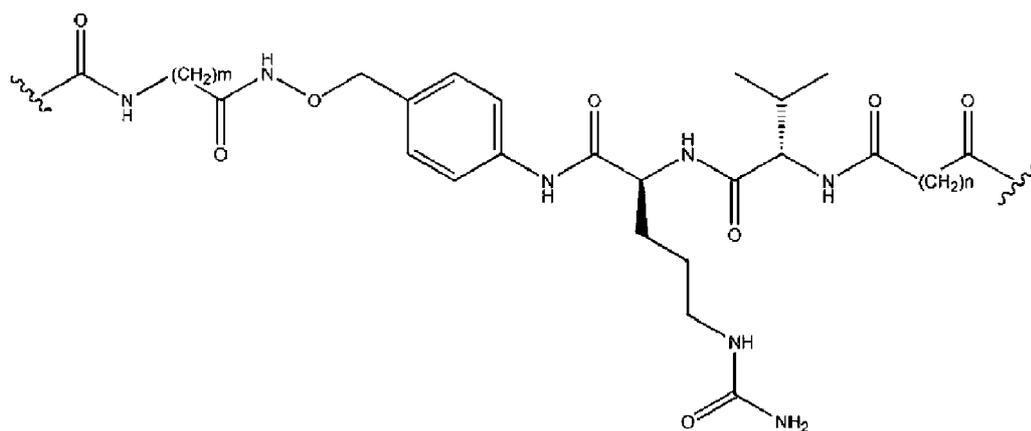
где

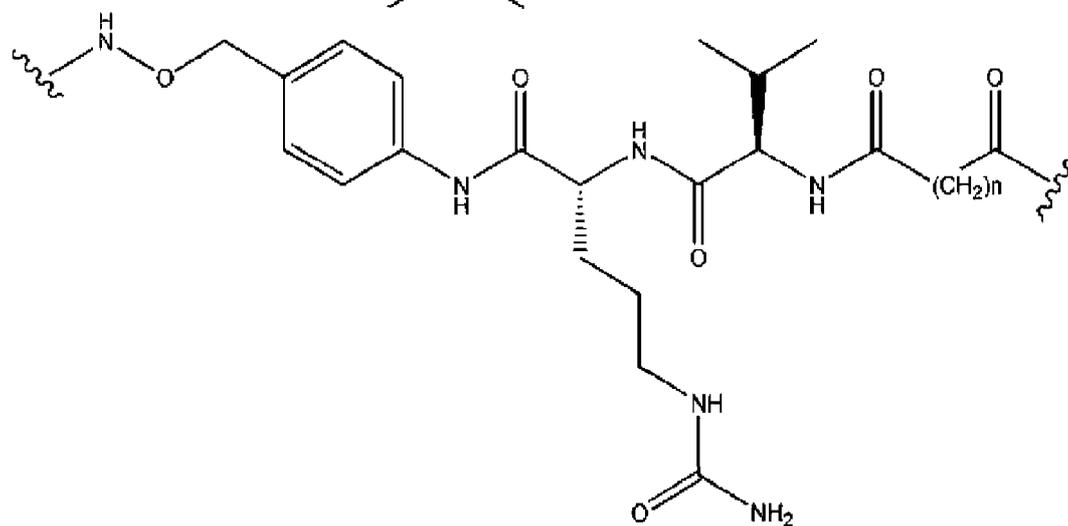
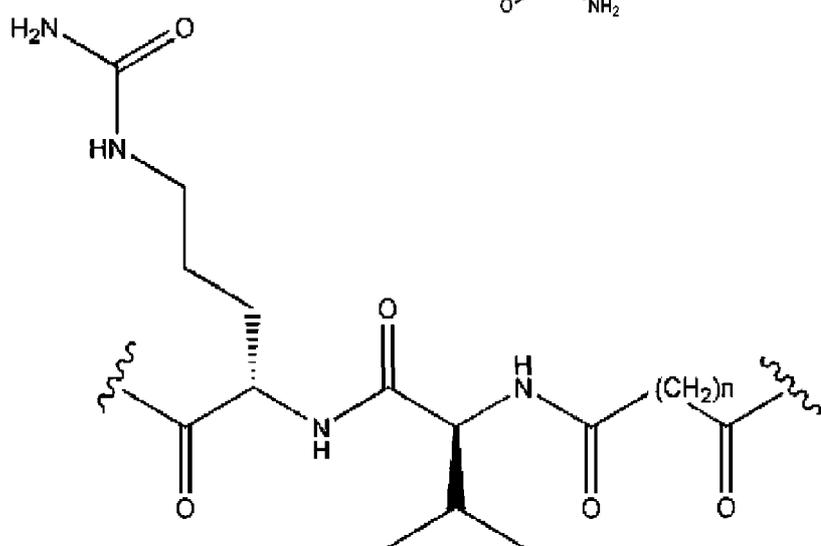
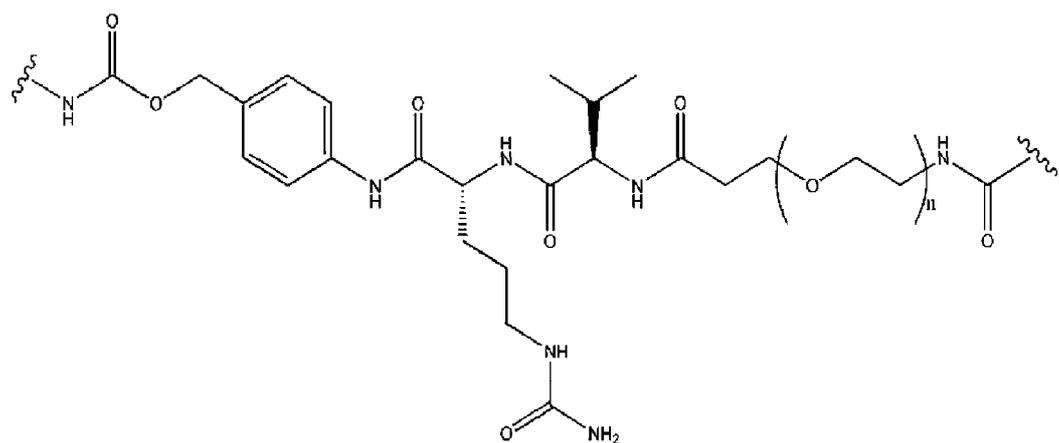
A представляет собой антитело против ErbB2 или его активный фрагмент, где активный фрагмент выбран из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv фрагментов, диател, линейных антитела и одноцепочечного Fv;

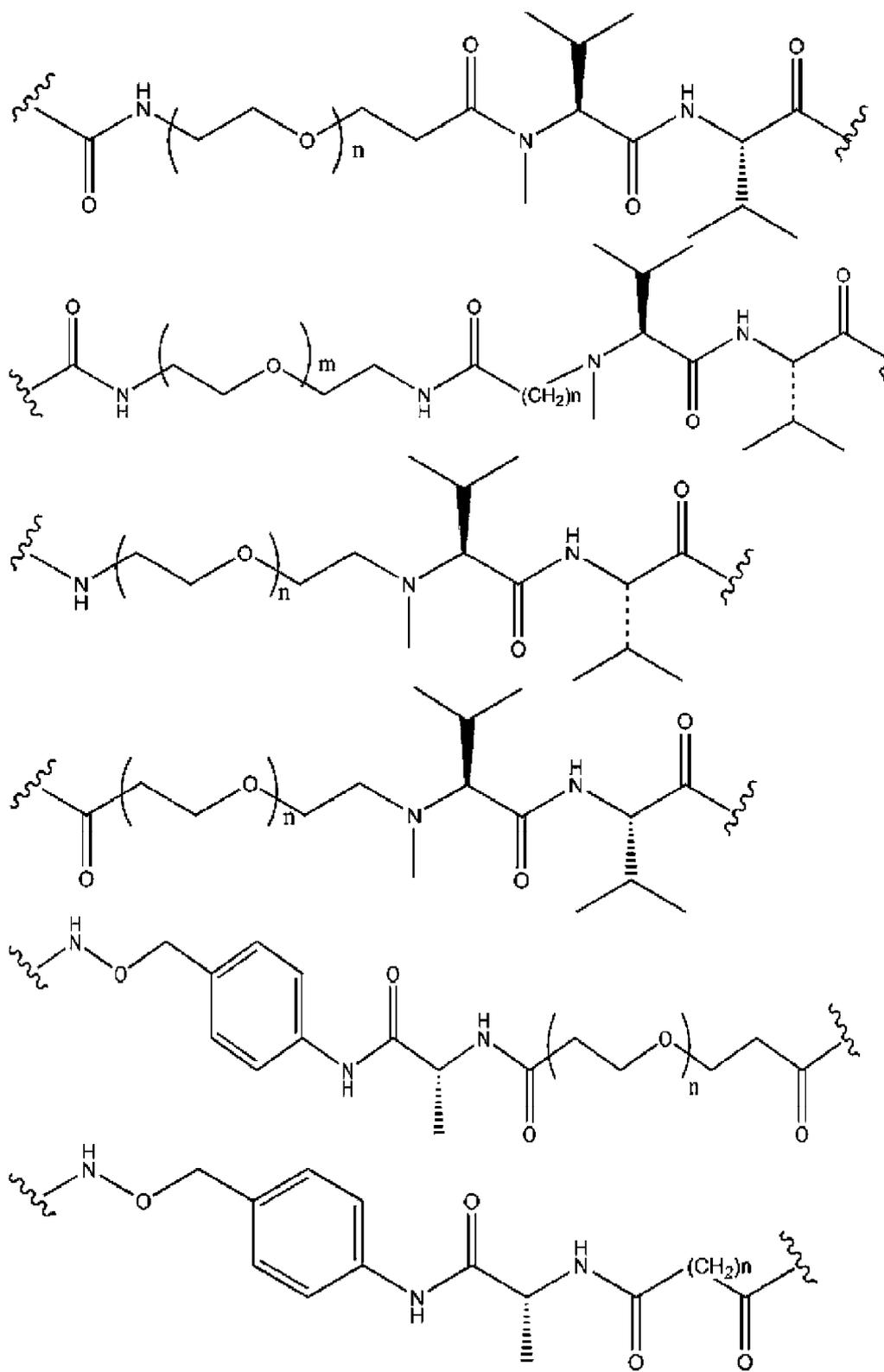
X представляет собой N;

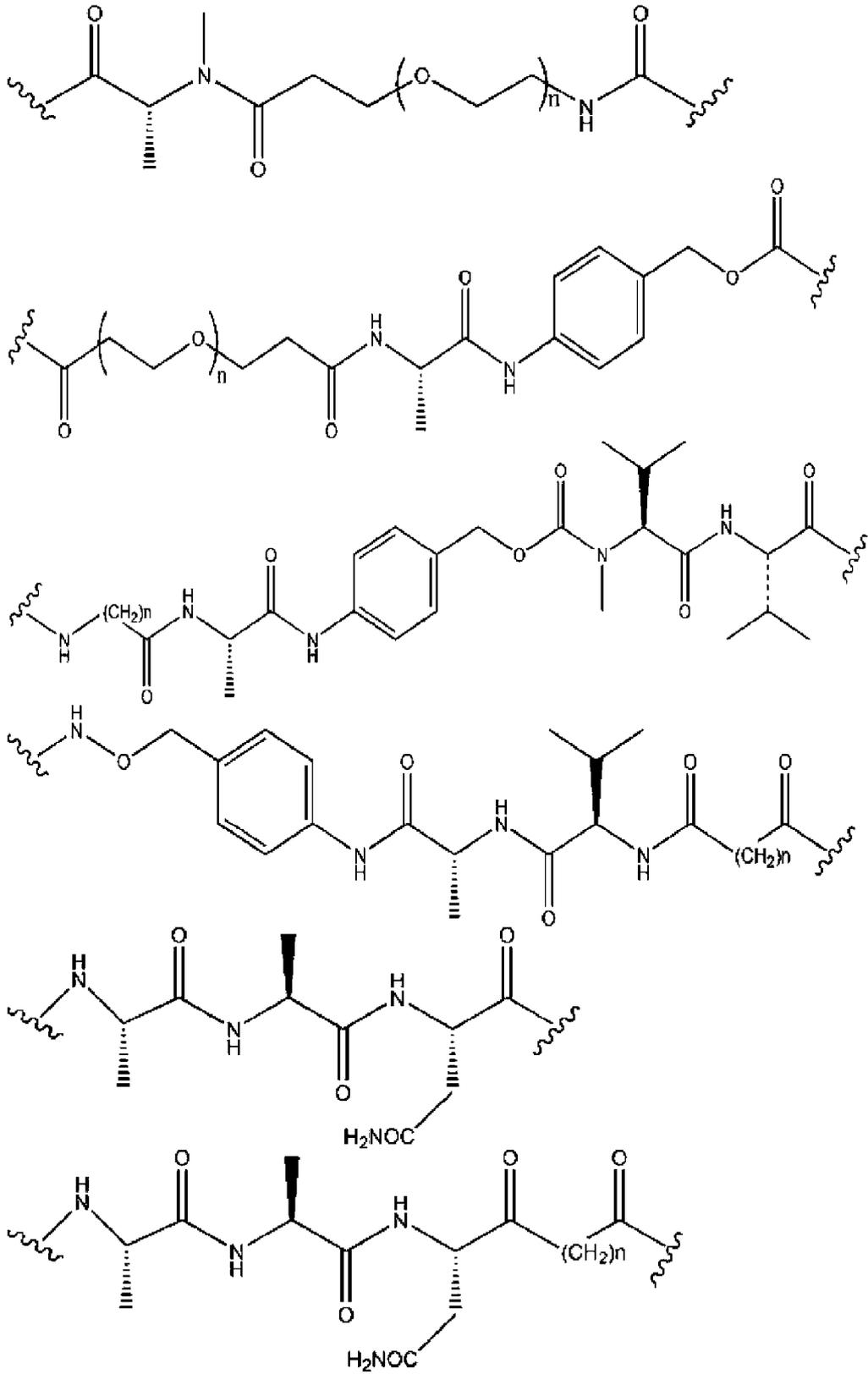
Y представляет собой N или CR<sup>1</sup>, R<sup>1</sup> представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкил;

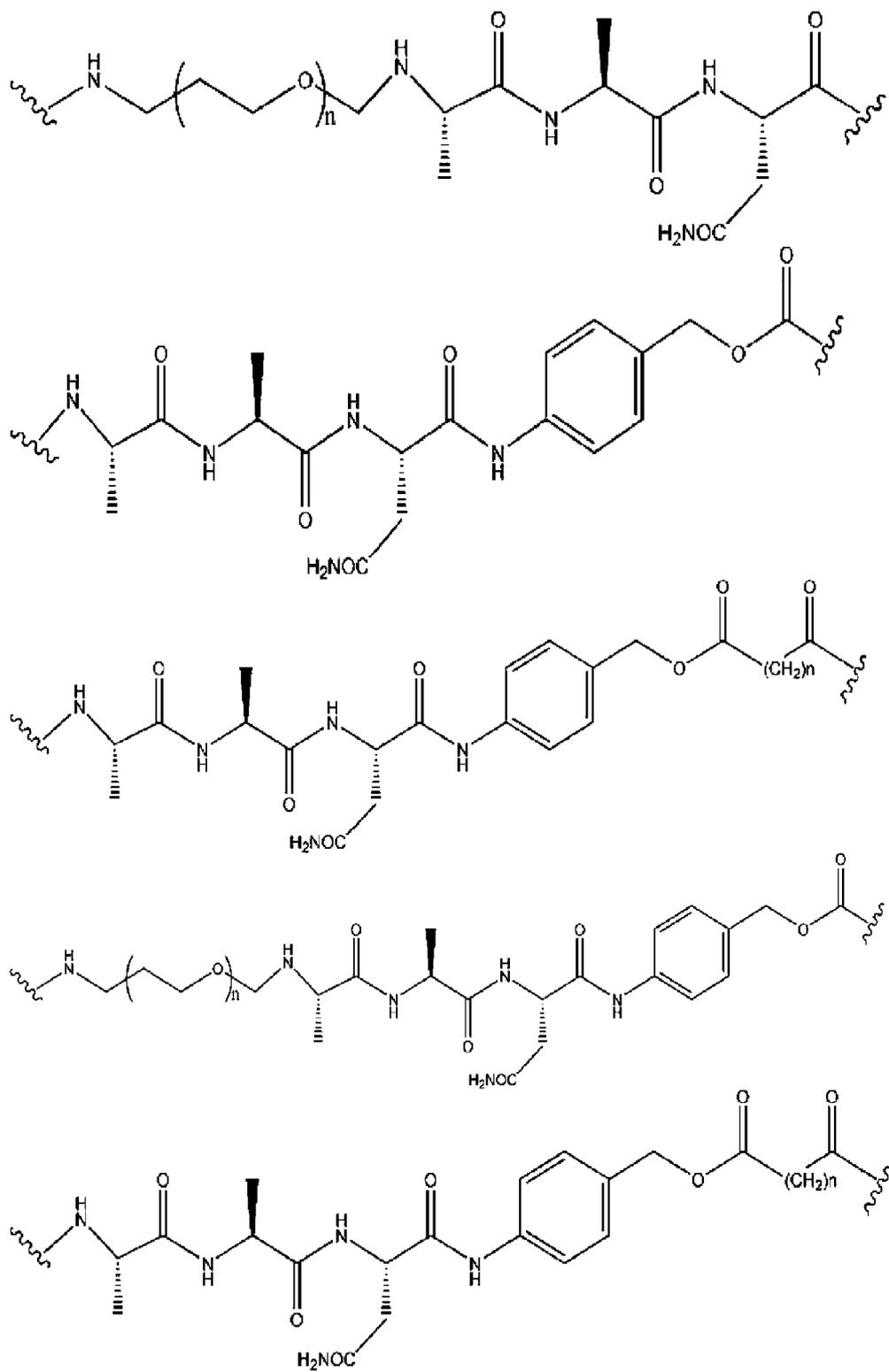
L представляет собой двухвалентный линкер, выбранный из группы, состоящей из

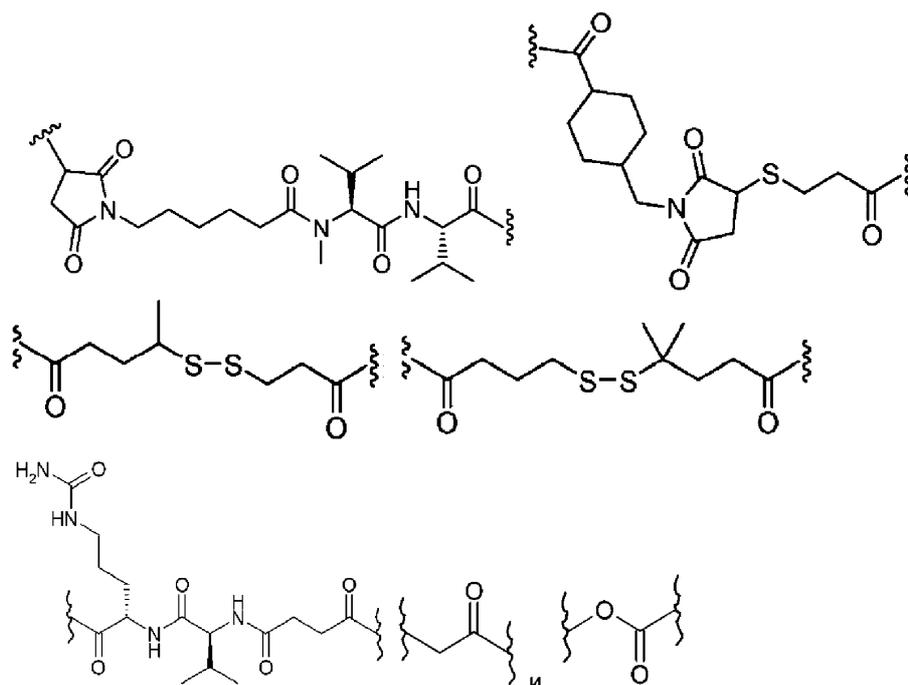






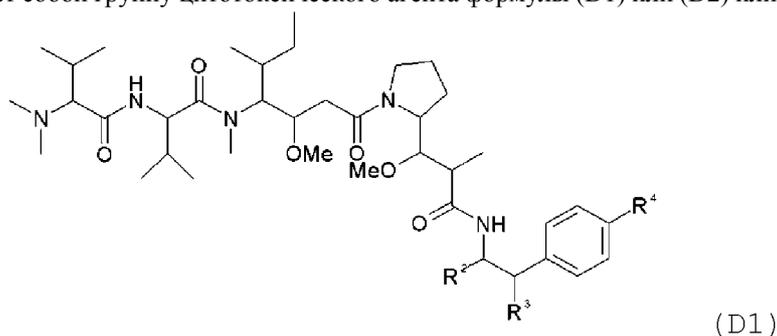






где каждый из  $m$  и  $n$  представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 1-10 в каждом положении;

D представляет собой группу цитотоксического агента формулы (D1) или (D2) или его стереоизомера



(D1)

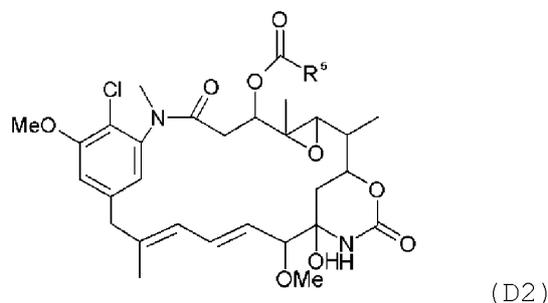
где

R<sup>2</sup> выбран из группы, состоящей из -CH<sub>2</sub>N<sub>3</sub>, -CONHSO<sub>2</sub> (циклопропил), тиазол-2-ил, -CH<sub>3</sub> и -COOH;

R<sup>3</sup> выбран из группы, состоящей из H и -OH; и

R<sup>4</sup> выбран из группы, состоящей из H, -NH<sub>2</sub>, Cl, Br, I, -OS(O)<sub>2</sub>R<sup>6</sup>,

где R<sup>6</sup> представляет собой H, C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкил, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-циклоалкил или C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил и алкил, циклоалкил и арил каждый является незамещенным или замещенным одним или более заместителями, выбранными из галогенов;



(D2)

где R<sup>5</sup> выбран из группы, состоящей из

-CH(CH<sub>3</sub>)N(CH<sub>3</sub>)C(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SH и

-CH(CH<sub>3</sub>)N(CH<sub>3</sub>)C(O)CH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SH;

а представляет собой целое число, выбранное из группы, состоящей из 2-10.

2. Конъюгат антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемая соль, или стереоизомер, или их сольват по п.1, где R<sup>6</sup> представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>-алкил, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-циклоалкил или C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил, алкил, циклоалкил и арил каждый является незамещенным или замещенным 2, 3, 4 или 5 заместителями.

3. Конъюгат антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемая соль, или сте-

реоизомер, или их сольват по п.1 или 2, где  $R^6$  замещен F.

4. Конъюгат антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемая соль, или стереоизомер, или их сольват по п.1, где Y представляет собой  $CR^1$ ,  $R^1$  представляет собой H.

5. Конъюгат антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемая соль, или стереоизомер, или их сольват по любому из пп.1-4, где n представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6 при каждом положении.

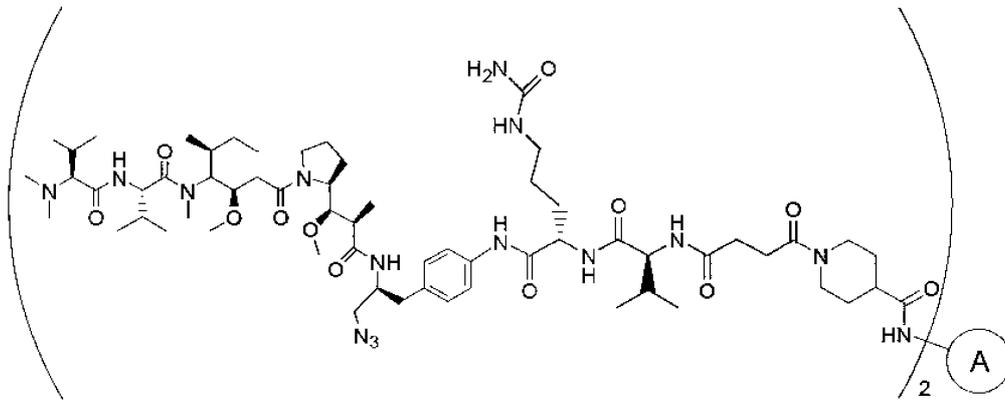
6. Конъюгат антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемая соль, или стереоизомер, или их сольват по пп.1-5, где a представляет собой 2, 3 или 4.

7. Конъюгат антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемая соль, или стереоизомер, или их сольват по любому из пп.1-6, где антитело против ErbB2 представляет собой антитело против ErbB2 человека, и CDR1, CDR2 и/или CDR3 тяжелой и легкой цепей антитела против ErbB2 человека представляют собой CDR1, CDR2 и/или CDR3 трастузумаба соответственно.

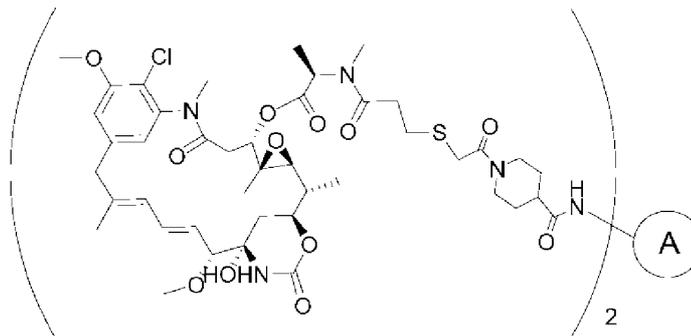
8. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль, или стереоизомер, или их сольват по п.7, где антитело против ErbB2 представляет собой гуманизированное антитело или полностью антитело человека.

9. Конъюгат антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемая соль, или стереоизомер, или их сольват по п.8, где антитело против ErbB2 представляет собой трастузумаб.

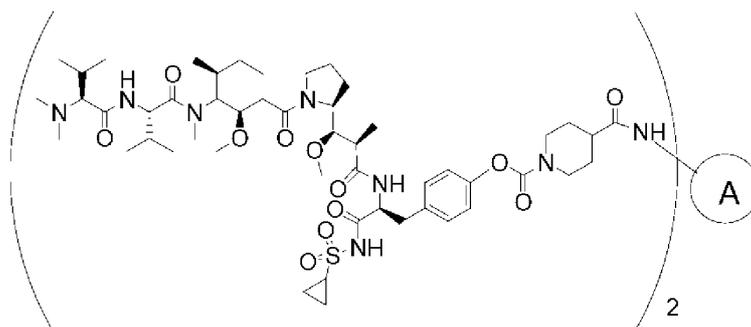
10. Конъюгат антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемая соль, или стереоизомер, или их сольват по любому из пп.1-9, где конъюгат антитело-лекарственное средство выбран из группы, состоящей из I-1, I-2 и I-3



I-1



I-2

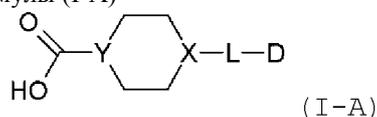


I-3

где А представляет собой трастузумаб.

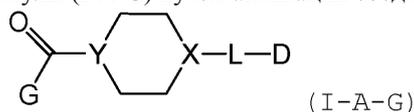
11. Способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп.1-10, включающий стадии:

(1) получение соединения формулы (I-A)



где D, L, X и Y представляют собой определенное в любом из пп.1-10 для формулы (I);

(2) получение соединения формулы (I-A-G) путем активации соединения формулы (I-A) со стадии (1)



где G выбран из группы, состоящей из -F, -Cl, -Br, -I, -N<sub>3</sub>, -OR, -SR, -ONRR', RC(O)O-, -OP(O)RR',

RSO<sub>2</sub>-O- и

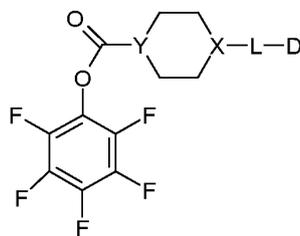
где каждый из R и R' в каждом положении независимо представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-алкил, C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub>-арил или фенокси и каждый из алкила, арила и фенокси является незамещенным или независимо замещенным одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидрокси, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкила, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-алкокси, C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>-циклоалкила, C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-арила и гетероарила, имеющего от 5 до 10 членов кольца;

(3) получение смеси различных конъюгатов антитело-лекарственное средство, имеющих различные величины а, путем конъюгации соединения формулы (I-A-G) со стадии (2) с антителом против ErbB2; и

(4) получение конъюгата антитело-лекарственное средство путем очистки смеси со стадии (3) с помощью одного или более хроматографических методов, выбранных из группы, состоящей из ионообменной хроматографии, гидрофобной хроматографии, хроматографии с обращенной фазой и аффинной хроматографии.

12. Способ получения по п.11, где G выбирают из группы, состоящей из -ONRR' и -OP(O)RR', и каждый из R и R' в каждом положении представляет собой независимо фенокси.

13. Способ получения по п.11 или 12, где соединение формулы (I-A-G) в стадии (2) представляет собой соединение формулы (I-B), образованное путем взаимодействия соединения формулы (I-A) с пентафторфенолом



(I-B)

где D, L, X и Y представляют собой такие, как определено в любом из пп.1-10 для формулы (I), и реакцию проводят с использованием 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида, N-гидроксисукцинимидом и/или дихлорметана.

14. Фармацевтическая композиция, включающая конъюгат антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемую соль, или стереоизомер, или их сольват по любому из пп.1-10 и фармацевтически приемлемый носитель, и

фармацевтическая композиция находится в форме твердого препарата, полутвердого препарата,

жидкого препарата или газообразного препарата.

15. Фармацевтическая композиция по п.14, которая находится в форме лиофилизированного порошка.

16. Фармацевтическая композиция по п.14 или 15, дополнительно содержащая один или более других противораковых агентов, таких как химиотерапевтические агенты и/или антитела.

17. Применение конъюгата антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемой соли, или стереоизомера, или их сольвата по любому из пп.1-10 для получения лекарственного средства для лечения рака.

18. Применение по п.17, где рак представляет собой рак молочной железы, рак желудка, рак яичников, немелкоклеточный рак легких, рак печени, рак эндометрия, рак слюнных желез, рак почки, рак толстой кишки, рак щитовидной железы, рак поджелудочной железы или рак мочевого пузыря.

19. Применение по п.18, где рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с гиперэкспрессией ErbB2.

20. Способ лечения рака, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, конъюгата антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемой соли, или стереоизомера, или их сольвата по любому из пп.1-10, или фармацевтической композиции по любому из пп.14-16.

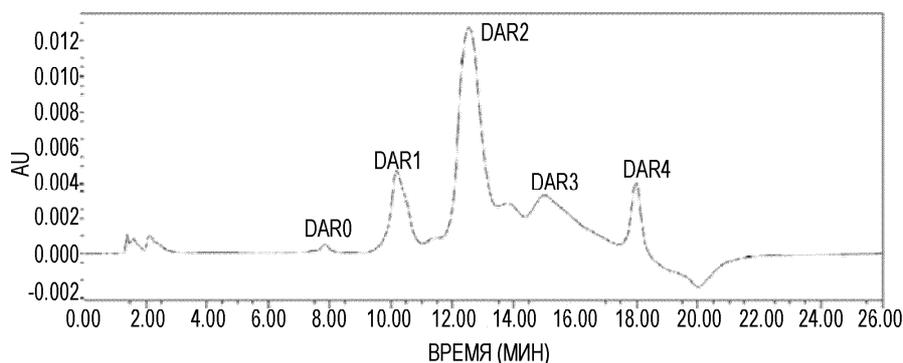
21. Способ по п.20, где рак представляет собой рак молочной железы, рак желудка, рак яичников, немелкоклеточный рак легких, рак печени, рак эндометрия, рак слюнных желез, рак почки, рак толстой кишки, рак щитовидной железы, рак поджелудочной железы или рак мочевого пузыря.

22. Способ по п.21, где рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с гиперэкспрессией ErbB2.

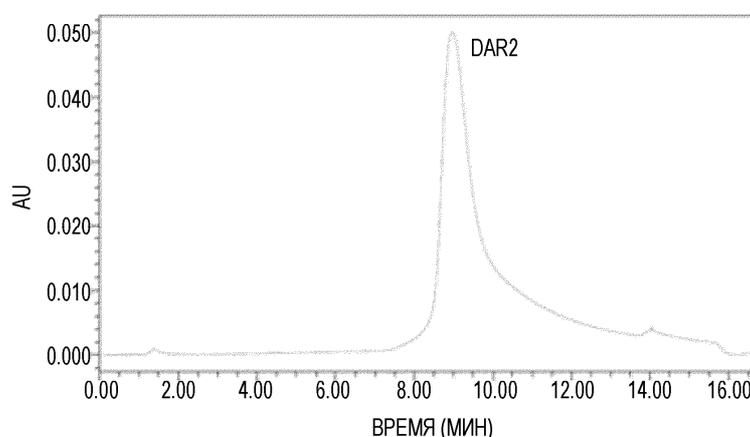
23. Применение конъюгата антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемой соли, или стереоизомера, или их сольвата по любому из пп.1-10 для лечения рака.

24. Применение по п.23, где рак представляет собой рак молочной железы, рак желудка, рак яичников, немелкоклеточный рак легких, рак печени, рак эндометрия, рак слюнных желез, рак почки, рак толстой кишки, рак щитовидной железы, рак поджелудочной железы или рак мочевого пузыря.

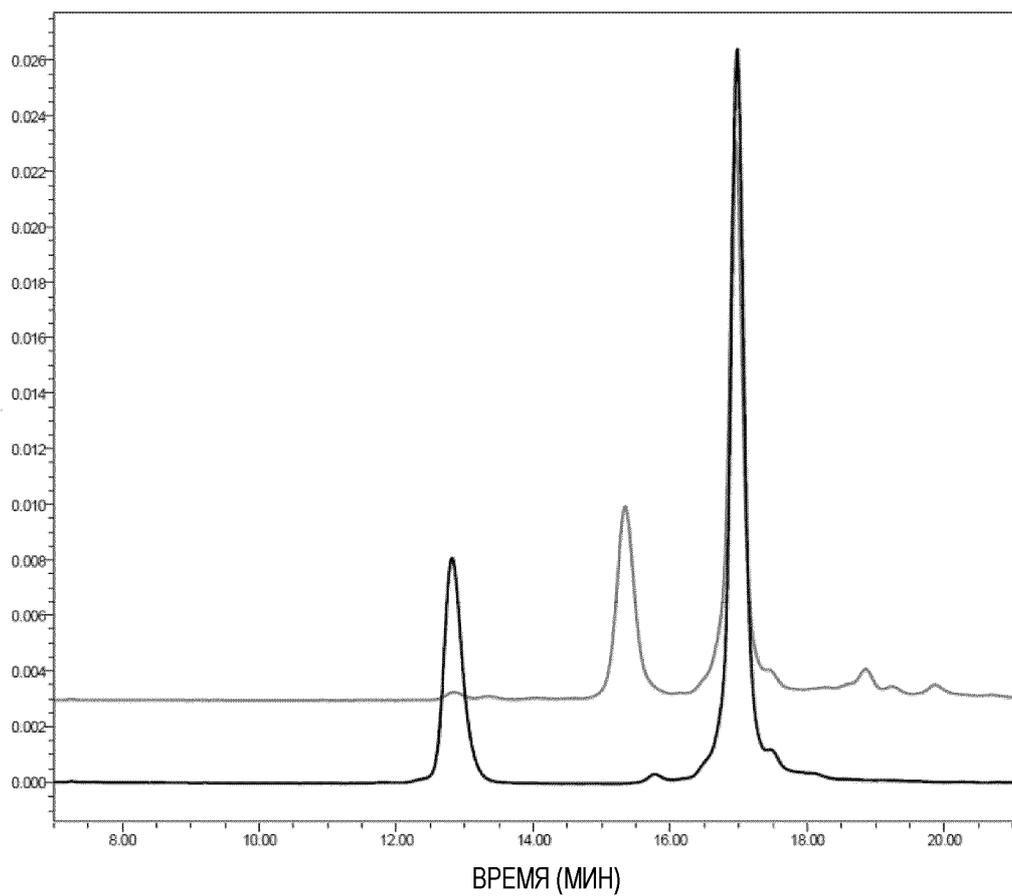
25. Применение по п.24, где рак молочной железы представляет собой рак молочной железы с гиперэкспрессией ErbB2.



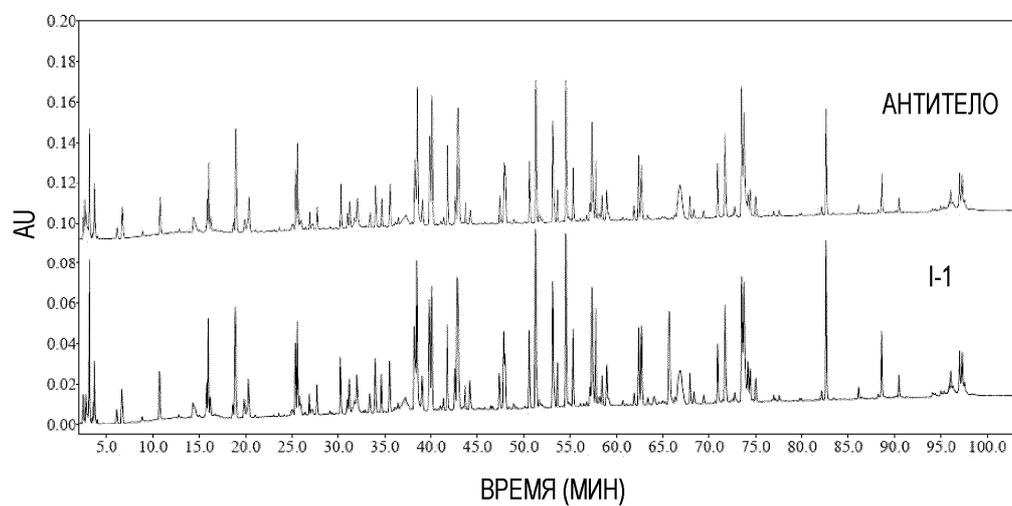
Фиг. 1



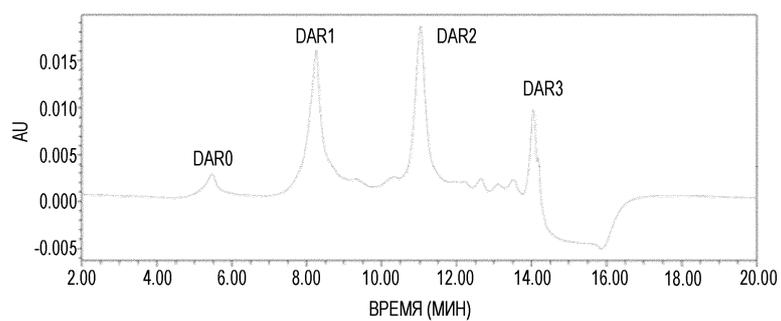
Фиг. 2



Фиг. 3

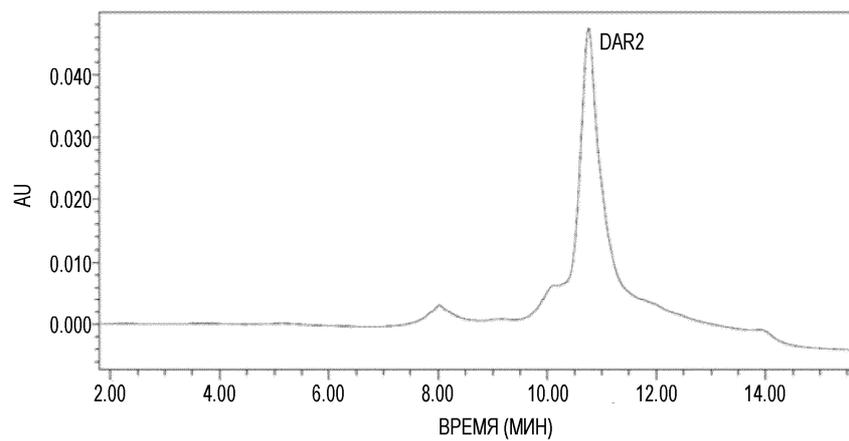


Фиг. 4

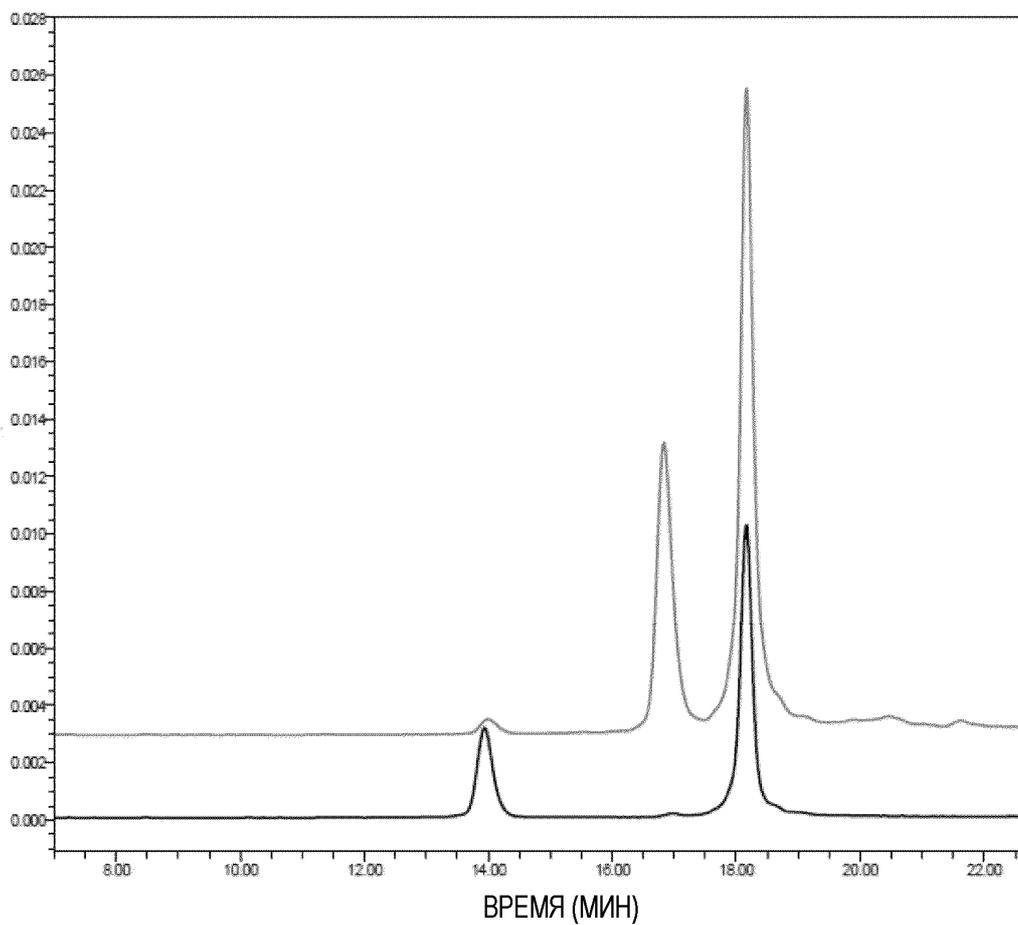


Фиг. 5

039757

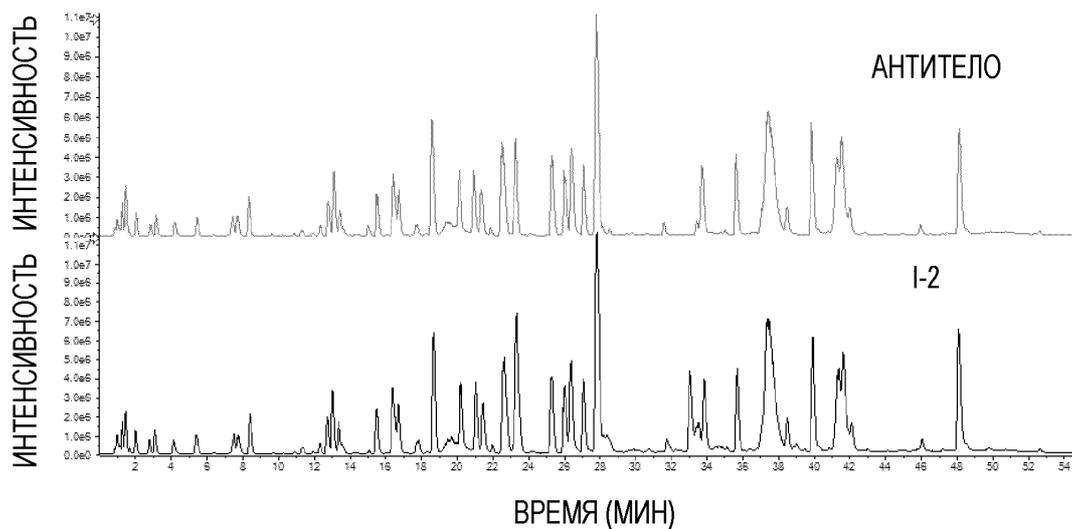


Фиг. 6

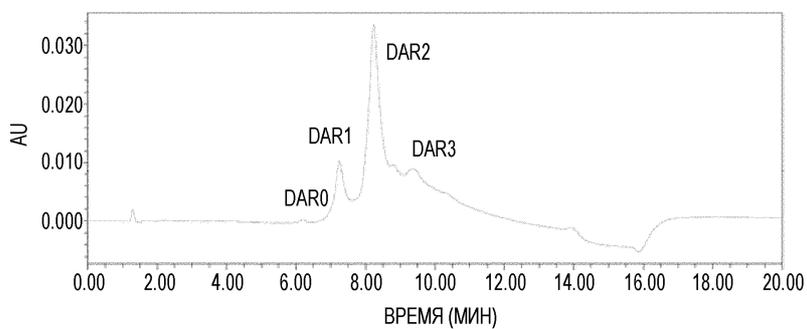


Фиг. 7

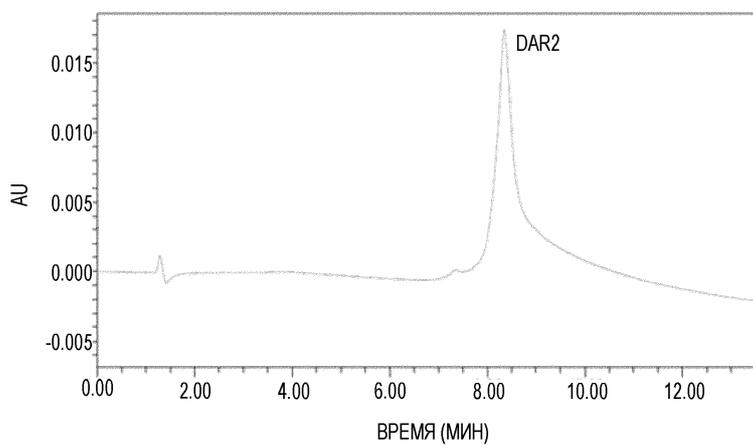
039757



Фиг. 8

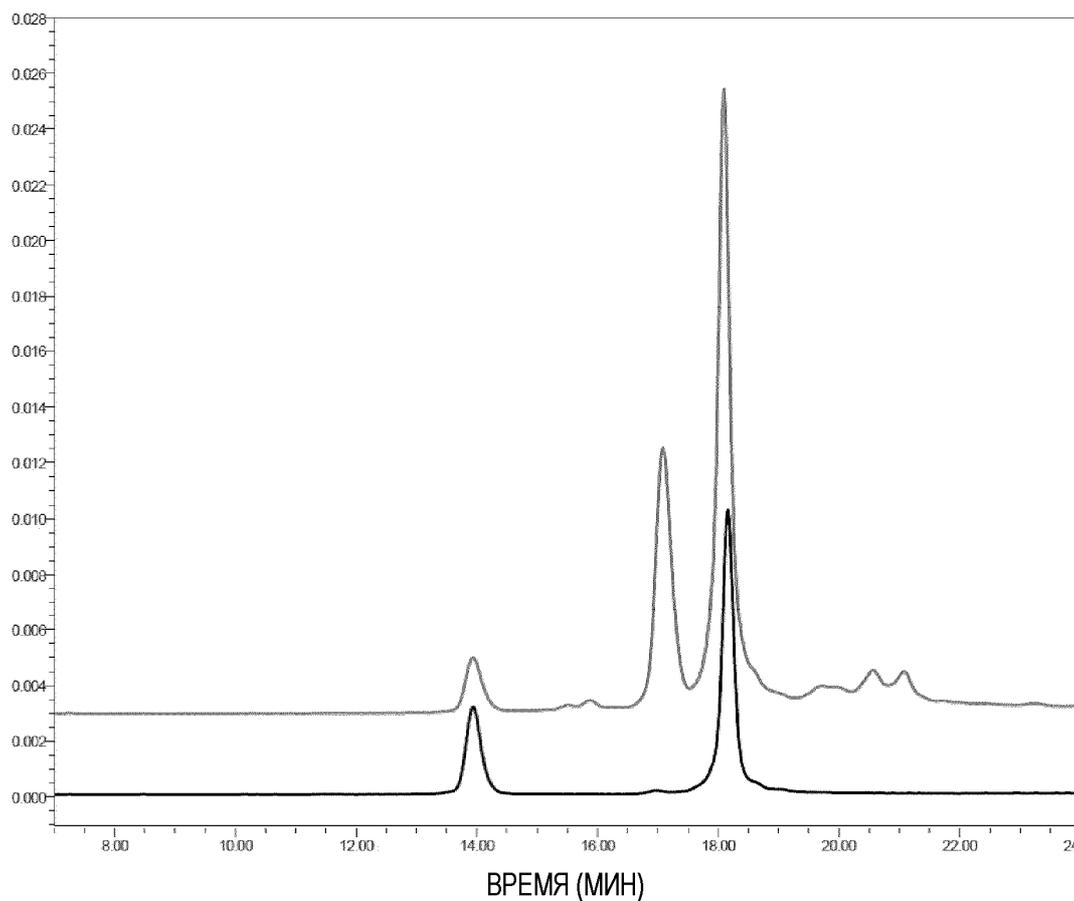


Фиг. 9

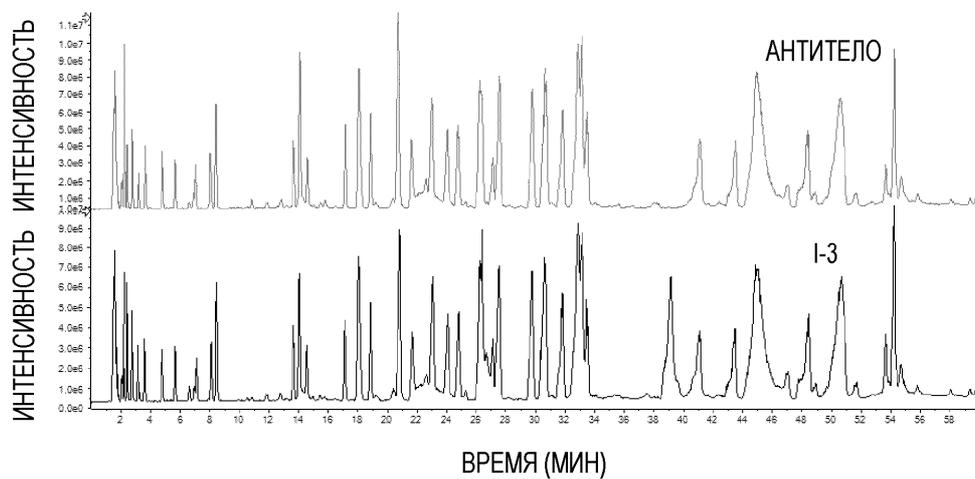


Фиг. 10

039757



Фиг. 11



Фиг. 12