

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040604**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.07.01

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

(21) Номер заявки
201791359

(22) Дата подачи заявки
2015.12.23

**(54) КОНЬЮГАТЫ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ БЕЛОК-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО,
СОДЕРЖАЩИЕ ПРОИЗВОДНЫЕ АНТРАЦИКЛИНА**

(31) 62/095,820

(56) WO-A2-2013177055
WO-A1-2009099741
WO-A2-2014140317

(32) 2014.12.23

(33) US

(43) 2017.11.30

(86) PCT/EP2015/081183

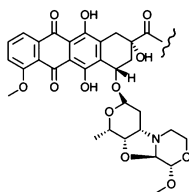
(87) WO 2016/102679 2016.06.30

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭнБиИ-ТЕРАПЬЮТИКС АГ (CH)

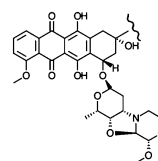
(72) Изобретатель:
**Гравундер Ульф, Берли Роджер Ренцо
(CH)**

(74) Представитель:
**Ловцов С.В., Левчук Д.В., Саленко
А.М. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к конъюгату производного антрациклина (PNU), содержащему производное антрациклина PNU-159682, имеющего формулу (i)



или формулу (ii)



который дополнительно содержит линкерную структуру X-L₁-L₂-L₃-Y.

B1**040604****040604****B1**

Настоящее изобретение относится к конъюогатам, связывающим белок-лекарственное средство, содержащим производные токсина антрациклина.

Введение

Ковалентные конъюогаты токсинов с малой молекулярной массой (MW предпочтительно <2500 дальтон) со связывающими белками, в частности с антителами, специфичными к опухолевым клеткам, являются мощным инструментом специфического нацеливания раковых клеток на их разрушение. Поэтому такие конъюогаты, связывающие белок-лекарственное средство (BPDC), в частности конъюогаты антитело-лекарственное средство (ADC), имеют высокий медицинский и коммерческий интерес для лечения рака. Для разработки эффективных и безопасных BPDC или ADC для лечения рака необходимо учитывать несколько аспектов: во-первых, связывающий белок или антитело должны быть специфическими к данному опухоль-специфическому антигену (TSA), который вряд ли может или в идеале не может экспрессироваться нормальными или здоровыми клетками ткани. Во-вторых, ковалентная связь, или соединение, между лекарственным средством и связывающим белком должна быть достаточно функционально-стабильной в кровотоке, предотвращая нежелательное высвобождение токсичной полезной нагрузки в кровотоке, но она должна эффективно высвобождать лекарственное средство при связывании с раковыми клетками и/или при интернализации в раковые клетки. В-третьих, токсичная полезная нагрузка должна обладать достаточно высокой токсичностью, или активностью, чтобы вызывать разрушение раковых клеток, даже если потенциально ограниченные количества TSA экспрессируются на раковых клетках, и поэтому только ограниченные количества ADC интернализируются, или если высвобождение токсичной полезной нагрузки не осуществляется при достаточно высокой эффективности при связывании с раковыми клетками или при интернализации в раковую клетку.

Хотя первый аспект успешного нацеливания на рак с помощью опухоль-специфического антигена (TSA) зависит от глубокого понимания биологии нацеливания и нацеливающих молекул, разработанных для специфического связывания, второй и третий аспекты, касающиеся оптимального линкера и полезной нагрузки токсина, обычно относятся к эффективности конъюогатов, связывающих белок-лекарственное средство (BPDC) или конъюогатов антитело-лекарственное средство (ADC).

Все ADC, которые в настоящее время проходят клинические испытания, и два ADC, получившие одобрение FDA для лечения рака, анти-CD30 ADC Adcetris® (брентуксимаб ведотин) от фирмы Takeda и анти-HER-2 ADC Kadcyla® (трастузумаб эмтансин, или T-DM1) от фирмы Roche/Genentech (см. Perez et al., 2014), создаются путем химической конъюогации токсичных полезных нагрузок с привлечением химии малеимидного линкера либо с первичными аминогруппами лизиновых остатков антитела, либо со свободными тиольными группами, полученными с помощью мягкого восстановления внутрицепочечных дисульфидных мостиков антитела. Химическая конъюогация имеет два ограничения: во-первых, было обнаружено, что химические линкеры на основе малеимида связаны с нежелательной неустойчивостью в присутствии человеческого сывороточного альбумина и, таким образом, приводят к высвобождению токсинов в кровотоке пациентов, получающих лечение с помощью ADC, содержащих малеимид-линкер (см. Alley et al., 2008). Во-вторых, классическая химическая конъюогация с помощью малеимид-линкерной химии дает в результате гетерогенные BPDC или ADC, поскольку нельзя проконтролировать, с какими амино- или тиольными группами происходит конъюогация. Таким образом, получается гауссовое распределение количества лекарственных средств, ковалентно связанных на одно антитело, так что конъюогированные ADC имеют среднее отношение лекарственное средство-антитело (DAR) в диапазоне от 3,5 до 4. Однако отдельные конъюогаты могут не иметь ни одного лекарственного средства, прикрепленного (DAR=0) к антителу, или могут иметь до 8 лекарственных средств, прикрепленных к антителу (DAR=8), в случае с конъюогатами цистеина и даже больше лекарственных средств на одно антитело (>DAR 10) в случае с конъюогатами лизина. Таким образом, классические химически конъюогированные ADC представляют собой гетерогенную смесь различных молекул, проявляющих различные функциональные свойства (см. Panowski et al., 2014), что явно нежелательно с нормативной точки зрения при разработке ADC для лечения больных раком.

Следовательно, существует коммерческая и медицинская потребность получения конъюогатов ADC или BPDC, которые сайт-специфически конъюогированы и, таким образом, являются гомогенными применительно к отношению лекарственное средство-антитело.

Кроме того, существует коммерческая и медицинская потребность получения ADC или BPDC с более устойчивым соединением лекарственного средства с белком, которые более устойчивы в кровотоке, чем традиционные конъюогаты на основе химии малеимидного линкера.

Также существует коммерческая и медицинская потребность получения ADC или BPDC, которые обладают более высокой эффективностью и меньшими побочными эффектами, чем ADC или BPDC, имеющиеся в настоящее время на рынке.

Основные признаки изобретения

Настоящее изобретение решает эти проблемы. В изобретении предлагаются токсины для применения в конъюогатах связывающий белок-лекарственное средство, а также дополнительная новая технология конъюогирования этих токсинов с указанными связывающими белками сайт-специфическим образом

за счет исключения классической химии малеимидного линкера.

Основные преимущества этих двух признаков будут представлены в описании далее.

Технология линкера

Как вышеупомянутая сывороточная неустойчивость, так и гетерогенность химически конъюгированных и содержащих малеимид-линкер BPDC или ADC несут значительную ответственность за безопасность этих лекарственных средств у больных раком, поскольку оба способствуют неспецифическому высвобождению токсина ("лекарственная деактивация" ("de-drugging")) таких ADC у пациентов.

С одной стороны, классические малеимидные линкеры могут разрушаться свободными тиолами в человеческой сыворотке, в частности цистеин-34 человеческого сывороточного альбумина, который как самый распространенный сывороточный белок обеспечивает наивысшую концентрацию свободных тиолов в человеческой сыворотке. Цистеин-34 человеческого сывороточного альбумина может разорвать тиозэфирную связь малеимидных линкеров с помощью так называемой ретро-реакции Михаэля, после которой токсин перемещается и ковалентно связывается с человеческим сывороточным альбумином (HSA). Конъюгат токсин-HSA может затем распределять токсин в кровотоке или в организме без какой-либо селективности в отношении опухоли (см. Alley et al., 2008).

С другой стороны, как известно, виды с более высоким DAR в химически конъюгированных гетерогенных ADC имеют более короткие периоды полураспада в сыворотке из-за более высокой гидрофобности этих ADC и склонности к агрегации. Поэтому эти виды с более высоким DAR подвергаются более быстрому выведению из сыворотки, деградации и высвобождению токсина до связывания этих ADC с нацеливанием на положительные раковые клетки. Кроме того, также известно, что виды с более высоким DAR приводят к более быстрой "лекарственной деактивации", поскольку отдельные сайты конъюгации имеют различную кинетику "лекарственной деактивации" в зависимости от структурного контекста аминокислоты, содержащей токсин.

Вышеупомянутая ответственность химически конъюгированных ADC мешала успеху развития ADC до клинического уровня, несмотря на то, что концепция доставки высокоактивного клеточного токсина в раковые клетки за счет его соединения со специфическим к опухолевым клеткам антителом является убедительной. Из-за ассоциированных с токсином побочных эффектов первый ADC, который был одобрен FDA в 2000 году, Mylotarg® (гемтузумаб-озогамицин) от фирмы Pfizer/Wyeth, был изъят из продажи через 10 лет после утверждения FDA (<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm216448.htm>).

Таким образом, ответственность химически конъюгированных ADC сужает нынешние усилия по разработке ADC до токсинов с промежуточной клеточной токсичностью, например ингибирующие тубулин-полимеризацию лекарственные средства на основе доластатина/ауристатина и на основе майтанзина. Фактически более 90% всех ADC, находящихся в настоящее время на этапе клинической оценки, содержат токсины, связанные с монометилауристатином E (MMAE) или F (MMAF) или с майтанзином (например, DM1 или DM4) (см. Mullard (2013)).

Однако лекарственные средства, ингибирующие тубулин-полимеризацию, не могут достигать активности ниже наномолярного диапазона, поскольку тубулин, компонент клеточного цитоскелета, является весьма распространенным внутриклеточным белком-мишенью, так что много молекул лекарственного средства должно диффундировать или транспортироваться в клетку, чтобы отключить метаболизм внутриклеточного цитоскелета, необходимого для деления клеток и выживания. Промежуточная активность ингибирующих тубулин-полимеризацию лекарственных средств, которые могут переносить определенную степень "лекарственной деактивации" конъюгатов, и их специфическое воздействие на деление и митотические клетки сделали токсины с таким особым способом воздействия наиболее популярными для разработки ADC.

Однако для конкретных опухолей с низким уровнем экспрессии TSA потребуются гораздо более сильные токсины. Таким образом, более новые стратегии ADC, все еще находящиеся на стадии доклинической разработки, включают токсины с высокой клеточной токсичностью и различным способом действия, в частности повреждающие ДНК токсины, такие как дуокармицины (см. Doktor et al. (2014)) и пирролобензодиазепины (PBD) (см. Hartley & Hochhauser (2012)).

Производные антрациклина

Весьма интересным классом интеркалирующих ДНК токсинов для использования в качестве полезных нагрузок для BPDC или ADC являются антрациклины из-за их доказанной клинической валидации в качестве химиотерапевтических препаратов при лечении рака (см. Minotti (2004)). Антрациклины - это поликетиды красной окраски с высокой противоопухолевой активностью, первоначально полученные из вида *Streptomyces*. За последние 40 лет были описаны многие производные, в том числе некоторые из них, которые обычно используются в качестве химиотерапевтического препарата для различных твердых и гематологических раковых опухолей, например доксорубицин (также называемый адриамицином), даунорубицин, эпирубицин, идарубицин или валрубицин. Существует даже один анти-CD74 ADC в фазе I/II клинических испытаниях для множественной миеломы и других гематологических раковых опухолей с доксорубицином в качестве токсичной полезной нагрузки, милатузумаб-доксорубицин (см. [clinicaltrials.gov identifier: NCT01101594](https://clinicaltrials.gov/identifiers/NCT01101594)).

Известно, что все химиотерапевтические препараты на основе антрациклина демонстрируют ограниченную активность на опухолевых клетках в качестве свободных лекарственных средств при IC_{50} в диапазоне $\mu\text{моль/мл}$ на большинстве опухолевых клеток (Crooke and Prestayko, 1981). Несмотря на пример первого доксорубин-ADC, который в настоящее время проходит оценку в клинических испытаниях, применение традиционных антрациклинов в качестве токсичных полезных нагрузок для ADC стратегий, вероятно, останется под вопросом.

Около десяти лет назад новое производное антрациклина, называемое PNU-159682, было описано как метаболит неморубидина (см. Quintieri et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11, 1608-1617), о котором недавно сообщалось как проявляющем чрезвычайно высокую активность по уничтожению клеток *in vitro* в пико-фемтомольном диапазоне с одной клеточной линией яичника (A2780) и одной клеточной линией рака молочной железы (MCF7) (WO 2012/073217 A1, Caruso et al.). Структура производного антрациклина PNU-159682, как описано в вышеупомянутых документах предшествующего уровня техники, представлена на фиг. 2 для целей ссылки и с официальной системой нумерации антрациклинов для реакционно-способных атомов углерода тетрациклической структуры агликона.

Исходя из вышеупомянутых ограничений химически конъюгированных ADC, в отношении неустойчивости малеимид-линкера и "лекарственной деактивации" в видах с более высоким DAR в гетерогенных химически конъюгированных ADC, высокоактивный антрациклин-токсин, такой как PNU-159682, как предполагается, будет очень проблематичным применительно к классической химической конъюгации из-за высвобождения токсина в кровотоке раньше нацеливания на опухолевые клетки.

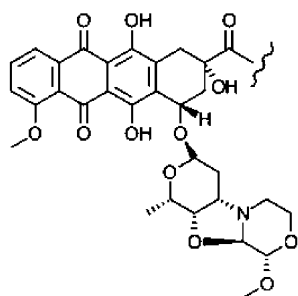
Следовательно, требуются активные токсины, например PNU-159682, гомогенные ADC с определенными фармакокинетическими свойствами и повышенной сывороточной устойчивостью, чтобы исключить или свести к минимуму побочные эффекты от преждевременно высвобожденных токсинов в кровотоке пациентов. Однако в то же время специфическое уничтожение опухолевых клеток, характеризующихся низкой экспрессией мишени, все еще должно быть возможным.

Хотя применение PNU-159682 в качестве полезной нагрузки для ADC, создаваемого с помощью классических химических подходов с малеимид-линкером, было описано ранее (WO 2009/099741 A1, Cohen и др.), функциональные данные в этом документе предшествующего уровня техники не приводились. Первые функциональные данные по PNU-159682, связанного с антителами с различными линкерными и спейсерными структурами в контексте химически конъюгированных и гетерогенных содержащих малеимид-линкеры конъюгатов на опухолевых клетках, были описаны в документе предшествующего уровня техники WO 2010/009124 A2 (Beria et al.), но данные по безопасности и фармакокинетические данные не были предоставлены.

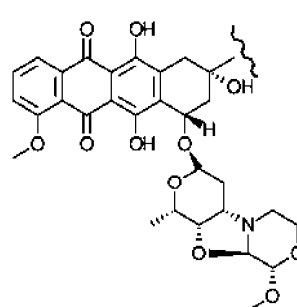
Предпочтительные варианты осуществления

В соответствии с первым предпочтительным вариантом осуществления описаны конъюгаты производных антрациклина (PNU), которые содержат производные PNU-159682, не имеющие углерод C14 и прикрепленную гидроксильную группу структуры тетрациклического агликона, характерную для антрациклинов. В качестве второго предпочтительного варианта осуществления описаны конъюгаты производных антрациклина (PNU), в которых отсутствуют как углерод C13, так и C14 с карбонильной функцией при C13 и гидроксильной группой при C14 структуры тетрациклического агликона, характерной для антрациклинов.

В этих вариантах осуществления конъюгаты производных антрациклина (PNU) содержат производное антрациклина PNU-159682, имеющее следующую формулу (i) или формулу (ii):



формула (i)



формула (ii)

Указанные конъюгаты содержат на своей волнистой линии линкерную структуру, которая может иметь разные элементы, $X-L_1-L_2-L_3-Y$, где L_1-L_3 представляют собой линкеры, и два из L_1-L_3 являются необязательными, и где X и Y дополнительно представляют каждый один или несколько необязательных линкеров.

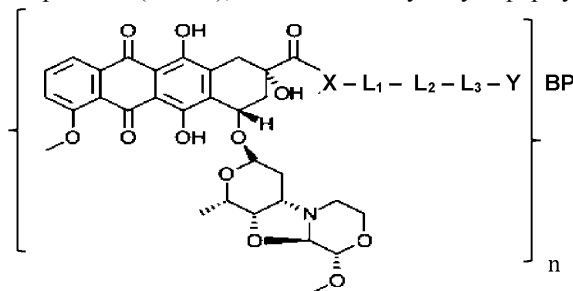
Оба производных заметно отличаются от PNU-159682, который является метаболитом антрациклинового неморубидина и впервые был описан авторами Quintieri et al. (2005).

Оба углерода C13 и C14 с их карбонильной функцией при C13 и гидроксильной группой при C14

являются обязательным структурным признаком PNU-159682, которые не входят в состав конъюгатов производных, описанных здесь.

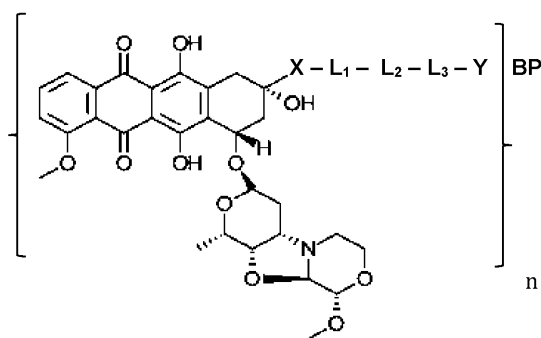
Как ни удивительно, и впервые, продемонстрировано, что PNU-производные без углерода 14 и присоединенной гидроксильной группой структуры тетрациклического агликона, характерной для антрациклинов, проявляют клеточную токсичность, например, в сайт-специфически конъюгированных конъюгатах антитело-лекарственное средство. Предпочтительные варианты осуществления этого показаны на фиг. 3А, 6А и 6В.

В соответствии с другим вариантом осуществления изобретения представляется конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC), имеющий следующую формулу:



формула (iii)

или



формула (iv)

где L_1 - L_3 представляют собой линкеры и два из L_1 - L_3 являются обязательными,
 X и Y представляют собой каждый один или несколько необязательных линкеров,
 BP является связывающим белком и

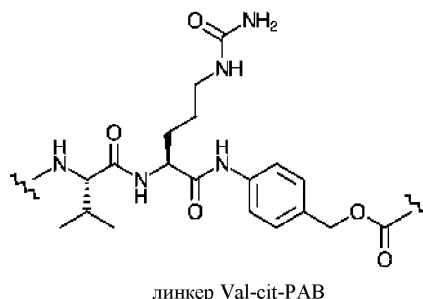
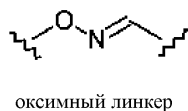
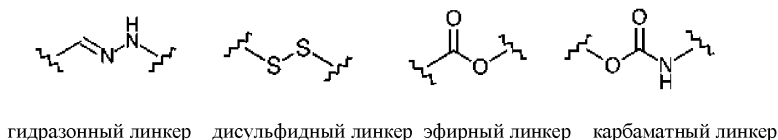
n представляет собой целое число между ≥ 1 и ≤ 10 .

В этой конструкции несколько линкеров могут образовывать одинарную цепь, которая конъюгирует один токсин с одним связывающим белком, и/или несколько линкеров могут соединять несколько токсинов с одним связывающим белком.

Аналогично, линкеры могут конъюгировать две или более субъединицы одного и того же связывающего белка с двумя или несколькими молекулами токсина.

Необязательный линкер X может представлять собой любую химическую линкерную структуру, известную в предшествующем уровне техники, которая использовалась в ADC для обеспечения специфического высвобождения токсина при интернализации в раковые клетки (см., например, Ducry & Stump (2010) или McCombs et al. (2015))

Некоторые примеры в отношении таких линкеров, описанных в предшествующем уровне техники, которые представлены только в качестве примера и не предполагаются как ограничивающие, показаны ниже.



Описание линкеров L_1 , L_2 и L_3 приводится ниже.

Необязательным линкером Y может быть любая цепь аминокислот, имеющая вплоть до 20 аминокислот, обеспечивающая оптимальную конъюгацию связывающего белка с одинарной цепью линкеров X , L_1 , L_2 , L_3 или их вариантами, в частности L_3 .

Кроме того, предусмотрены линкерные структуры, которые обеспечивают сайт-специфическую конъюгацию PNU-производных с подходящими связывающими белками, например, и предпочтительно с антителами. Таким образом, производные могут использоваться для получения сайт-специфически конъюгированных, гомогенных конъюгатов связывающий белок-лекарственное средство, которые могут использоваться в терапевтических применениях, таких как противораковая терапия.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления производного антрациклина (PNU) линкерная структура содержит в качестве L_2 олигоглициновый пептид (Gly_n), связанный с указанным производным антрациклина, непосредственно или с помощью другого линкера L_1 таким образом, что олигоглициновый (Gly_n) пептид имеет свободный amino-конец, и где n представляет собой целое число между ≥ 1 и ≤ 21 .

В каждом случае (Gly) $_n$ (также называемый в данном документе (Gly) $_n$ -NH $_2$ или Gly_n -отрезок) представляет собой отрезок олигоглициновый пептид. В одном особенно предпочтительном варианте осуществления n представляет собой целое число между ≥ 3 и ≤ 10 , предпочтительно ≥ 3 и ≤ 6 . Наиболее предпочтительно $n=5$.

Как уже описано в данном документе, производные антрациклина (PNU), описанные здесь, являются производными PNU-159682, либо не имеющими атом углерода 13 и 14, либо не имеющие только углерод 14 с прикрепленными функциональными группами.

Что касается формулы (i), то одним предпочтительным вариантом осуществления является то, что олигоглициновый пептид (Gly) $_n$ (≥ 1 и ≤ 21 , предпочтительно $n=3$ или $n=5$) конъюгирует с производным антрациклина с помощью алкилендиаминового линкера (NH $_2$ -(CH $_2$) $_m$ -NH $_2$, $m \geq 1$ и ≤ 11 , предпочтительно $m=2$), который конъюгирует с производным антрациклина с помощью первой амидной связи с углеродом 13 и конъюгирует с карбокси-концом олигоглицинового пептида с помощью второй амидной связи. Предпочтительное соединение, PNU-EDA-Gly $_5$, применимое для получения сайт-специфически конъюгированных конъюгатов производного антрациклина (PNU), изображено на фиг. 3А.

Что касается формулы (ii), предпочтительным вариантом осуществления является то, что олигоглициновый пептид (Gly) $_n$ (≥ 1 и ≤ 21 , предпочтительно $n=3$ или $n=5$) непосредственно соединен с кольцом А производного PNU (или углеродом 9 структуры агликona антрациклина), так что карбонильная группа углерода 13 представляет собой карбокси-конец глицинового пептидного линкера. Предпочтительное соединение, PNU-Gly $_5$, применимое для получения сайт-специфически конъюгированных конъюгатов производного антрациклина (PNU), изображено на фиг. 6А.

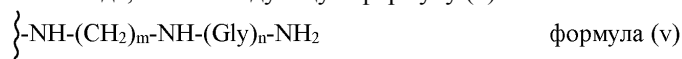
Что касается формулы (ii), еще одним предпочтительным вариантом осуществления является то, что олигоглициновый пептид (Gly) $_n$ (≥ 1 и ≤ 21 , предпочтительно $n=3$ или $n=5$) конъюгирует непосредственно с кольцом А производного PNU (или углеродом 9 структуры агликona антрациклина), с алкилендиаминовым линкером - (CH $_2$) $_m$ -NH $_2$, $m \geq 1$ и ≤ 11 , предпочтительно $m=2$), который конъюгирует с карбокси-концом олигоглицинового пептида с помощью амидной связи. Предпочтительное соединение, PNU-EA-Gly $_5$, применимое для получения сайт-специфически конъюгированных конъюгатов PNU-производного, изображено на фиг. 6В.

Далее конъюгаты производного антрациклина в соответствии с вышеприведенным описанием также называются "PNU-EDA-Gly $_n$ -NH $_2$ ", "PNU-Gly $_n$ -NH $_2$ " или "PNU-EA-Gly $_n$ -NH $_2$ ", или, в краткой форме, "PNU-EDA-Gly $_n$ ", "PNU-Gly $_n$ " или "PNU-EA-Gly $_n$ ", соответственно, или в предпочтительном варианте осуществления с 5 глициновыми остатками, "PNU-EDA-Gly $_5$ ", "PNU-Gly $_5$ " или "PNU-EA-Gly $_5$ ", соответ-

ственно.

Кроме того, в изобретении предлагается конъюгат связующий белок-лекарственное средство (BPDC), содержащий конъюгат производного антрациклина в соответствии с вышеприведенным описанием, и это производное дополнительно содержит связующий белок, конъюгированный со свободным аминоконцом олигоглицинового пептида (Gly)_n с помощью дополнительной амидной связи.

В соответствии с другим вариантом осуществления производного антрациклина (PNU) или конъюгата связывающий белок-лекарственное средство (BPDC), олигоглициновый пептид (Gly)_n, обозначенный как L₂, конъюгирует с производным антрациклина формулы (i) с помощью алкилендиаминового линкера, обозначенного как L₁, и этот алкилендиаминовый линкер конъюгирует с производным антрациклина с помощью первой амидной связи, тогда как с карбокси-концом олигоглицинового пептида он конъюгирует с помощью второй амидной связи, причем указанный конъюгат алкилендиаминового линкера и олигоглицинового пептида, имеет следующую формулу (v):



где волнистая линия показывает соединение с производным антрациклина формулы (i); m представляет собой целое число между ≥ 1 и ≤ 11 , а n представляет собой целое число между ≥ 1 и ≤ 21 . Предпочтительно, m представляет собой целое число между ≥ 2 и ≤ 4 , наиболее предпочтительно m=2 (этилендиаминовая группа, EDA).

Алкилендиаминовый линкер используется для обеспечения прикрепления линкера (Gly)_n для сортаза-конъюгации, так что соединение может происходить через С-конец пептида (Gly)_n, тем самым обеспечивая свободный N-конец конечного аддукта токсин-линкер для сортаза-конъюгации. Следует понимать, что любая метиленовая группа CH₂ в алкилендиаминовом линкере может быть замещена другой устойчивой связью, например -O-(эфир), -S-(тиоэфир), -NH-(амин) или любой другой алкильной, гетероалкильной, арильной или гетероарильной группой или любой их комбинацией для реализации изобретения.

В соответствии с другим вариантом осуществления производного антрациклина (PNU) или конъюгата связывающий белок-лекарственное средство (BPDC), олигоглициновый пептид (Gly)_n непосредственно соединен с кольцом А (или углеродом 9) производного антрациклина формулы (ii). Для иллюстрации этого см. фиг. 6А.

В соответствии с другим вариантом осуществления производного антрациклина (PNU) или конъюгата связывающий белок-лекарственное средство (BPDC), олигоглициновый пептид (Gly)_n конъюгирует с производным антрациклина формулы (ii) с помощью алкиленаминового линкера, обозначенного как L₁, и этот алкиленаминовый линкер конъюгирует с карбокси-концом олигоглицинового пептида с помощью амидной связи, указанный конъюгат алкиленаминового линкера и олигоглицин-пептида имеет следующую формулу (vi):



где волнистая линия показывает соединение с производным антрациклина формулы (ii), где m представляет собой целое число между ≥ 1 и ≤ 11 , а n представляет собой целое число между ≥ 1 и ≤ 11 . Предпочтительно m представляет собой целое число между ≥ 2 и ≤ 4 , наиболее предпочтительно m=2 (этиленаминовая группа, EA).

Алкиленаминовый линкер используется для обеспечения прикрепления линкера (Gly)_n для сортаза-конъюгации, так что соединение может происходить через С-конец пептида (Gly)_n, тем самым обеспечивая свободный N-конец конечного аддукта токсин-линкер для сортаза-конъюгации. Следует понимать, что любая метиленовая группа CH₂ в алкиленаминовом линкере может быть замещена другой устойчивой связью, например -O-(эфир), -S-(тиоэфир), -NH-(амин) или любой другой алкильной, гетероалкильной, арильной или гетероарильной группой или любой их комбинацией для реализации изобретения.

В другом варианте осуществления конъюгата связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) линкерная структура L₃ содержит пептидный мотив, который является результатом специфического расщепления мотива распознавания фермента сортазы.

Как описано в другом месте в данном изобретении, а также в WO 2014140317, содержание которого включено в данный документ по ссылке, сортазы (также называемые сортазные транспептидазы) образуют группу прокариотических ферментов, которые модифицируют поверхностные белки, распознавая и расщепляя специфический сигнал сортировки, содержащий конкретный пептидный мотив. Этот пептидный мотив также называется здесь "мотив распознавания фермента сортазы", "сортазная метка" или "метка распознавания сортазы". Обычно заданный фермент сортазы имеет один или несколько мотивов распознавания ферментов сортазы, которые распознаются. Ферменты сортазы могут быть природными или могут быть продуктом генной инженерии (Doerg et al., 2014).

В предпочтительном варианте осуществления конъюгата связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) указанный мотив распознавания фермента сортазы содержит пентапептид.

В предпочтительном варианте осуществления конъюгата связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) указанный мотив распознавания фермента сортазы содержит по меньшей мере одну из сле-

дующих аминокислотных последовательностей (показан N-конец->C-конец):

LPXTG,
LPXSG и/или
LAXTG.

Первые два мотива распознавания фермента сортазы распознаются сортазой A *Staphylococcus aureus* дикого типа. Второй мотив также распознается сконструированной *Staphylococcus aureus* сортазой A 4S9, а третий распознается сконструированной *Staphylococcus aureus* сортазой A 2A-9 (Doerr Et al, 2014). Во всех трех случаях X может быть любой из 20 пептидогенных аминокислот.

Эти мотивы распознавания ферментов сортазы, например, слиты с С-концом связывающего белка, или его доменом, или субъединицей, путем генетического слияния и коэкспрессированы с ним. Указанное слияние может выполняться напрямую или опосредованно через дополнительный линкер Y, описанный в данном документе в другом месте.

Следует отметить, что после интегрирования в структуру линкера и конъюгирования с L₂, L₃ не содержит 5-го аминокислотного остатка (С-конец G) мотивов распознавания фермента сортазы. В табл. 1 указанный С-конец G показан в скобках. В случае, когда мотив распознавания фермента сортазы представляет собой пентапептид, L₃ представляет собой, таким образом, тетрапептид.

Перед сортаза-конъюгацией мотивы распознавания фермента сортазы могут кроме того содержать другие метки, такие как His-метки, Мус-метки или Strep-метки (см. фиг. 4А в WO 2014140317, содержание которого включено в данный документ по ссылке), слитый С-конец с мотивами распознавания ферментов сортазы. Однако, поскольку пептидная связь между 4-й и 5-й аминокислотами мотива распознавания фермента сортазы расщепляется после сортаза-опосредованной конъюгации, эти дополнительные метки в конечном итоге будут удалены из полностью конъюгированного BPDC.

Мотивы распознавания фермента сортазы могут быть конъюгированы с линкером (Gly)_n, который конъюгирует с производным антрациклина с помощью сортазной технологии, описанной в данном документе и в WO 2014140317. Во время процесса конъюгации из линкера (Gly)_n высвобождается один глициновый остаток.

Следует отметить, что, хотя эти три пептидных отрезка показаны выше в классическом направлении N-конец->С-конец, остаток L представляет собой остаток, слитый с С-концом связывающего белка или С-концом линкера Y с помощью пептидной связи. 5-й аминокислотный остаток (G) из L₃ удаляется при конъюгации с пептидом (Gly)_n, тогда как 4-й Т или S аминокислотный остаток из L₃ представляет собой остаток, который фактически конъюгирует с N-концом пептида (Gly)_n.

Таким образом, в следующей таблице представлен обзор предпочтительных вариантов осуществления конъюгата связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) в соответствии с изобретением с указанием L₁-L₃.

Таблица 1. Типичные линкерные структуры.

Токсин	L ₁	L ₂	L ₃ (показан здесь C' -> N')	Связывающий белок
формула (i)	Алкилен-диаминовая группа	(Gly) _n	(G)TXPL (G)SXPL (G)TXAL	антитело
формула (ii)	Алкиленаминовая группа	(Gly) _n	(G)TXPL (G)SXPL (G)TXAL	антитело

Как было сказано, следует отметить, что после интеграции в структуру линкера и конъюгации с L₂, L₃ не содержит 5-го аминокислотного остатка (С-конец G). Таким образом, в табл. 1 указанный С-терминал G показан в скобках.

В соответствии с другим вариантом осуществления конъюгата связывающий белок-лекарственное средство (BPDC), производное антрациклина (PNU) конъюгирует с помощью одного или нескольких линкеров с карбокси-концом связывающего белка или с карбокси-концом его домена или субъединицы.

В другом предпочтительном варианте осуществления n в линкере олигоглицинового (Gly)_n пептида представляет собой целое число между ≥3 и ≤11, более предпочтительно между ≥3 и ≤7, предпочтительно n=3 или n=5. Наиболее предпочтительно n в линкере олигоглицинового (Gly)_n пептида составляет 5.

В одном предпочтительном варианте осуществления полезная нагрузка представляет собой полезную нагрузку из формулы (i).

Во втором предпочтительном варианте осуществления полезная нагрузка представляет собой полезную нагрузку из формулы (ii).

В соответствии с другим вариантом осуществления конъюгата связывающий белок-лекарственное средство (BPDC), связывающий белок конъюгирует со свободным аминоконцом олигоглицинового пептида (Gly_n) с помощью амидной связи.

В соответствии с другим вариантом осуществления конъюгата связывающий белок-лекарственное средство (BPDC), связывающий белок представляет собой по меньшей мере один белок, выбранный из группы, состоящей из:

- антитела,
- формата модифицированного антитела,
- производного или фрагмента антитела, сохраняющих свойства связывания с мишенью, связывающего белка на основе антитела,
- олигопептидного связующего и/или
- миметика антитела.

Термин "связывающий белок", используемый в данном контексте, эквивалентен термину "иммунолиганд", используемый в других публикациях авторами, включая приложение 1, которое содержит дополнительные технические данные, описание и внедрение в отношении технологии конъюгации ферментов сортазы.

"Антитела", также как синоним называемые "иммуноглобулины" (Ig), обычно содержат четыре полипептидные цепи, две тяжелые (H) цепи и две легкие цепи (L) и, следовательно, представляют собой мультимерные белки или их эквивалентный гомолог Ig (например, камелидные антитела, которые содержат только одноцепочечные антитела тяжелой цепи (dAb), которые могут быть получены либо из тяжелой, либо из легкой цепи); включая полноразмерные функциональные мутанты, их варианты или производные, включающие, но не ограничивающиеся этим, мышинные, химерные, гуманизированные и полностью человеческие антитела, которые сохраняют существенные характеристики эпитопного связывания молекулы Ig и включают иммуноглобулины двойные специфические, биспецифические, мультиспецифические иммуноглобулины, а также иммуноглобулины с двойным варибельным доменом; молекулы иммуноглобулина могут быть любого класса (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY) или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) и аллотипа.

При условии, что связывающий белок представляет собой антитело, конъюгат связывающий белок-лекарственное средство представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC).

Далее конъюгаты ADC в соответствии с настоящим изобретением также называются "PNU-EDA- Gly_n -Ab", "PNU- Gly_n -Ab" или "PNU-EA- Gly_n -Ab".

Термин "связывающий белок на основе антитела", используемый в данном контексте, может представлять собой любой белок, который содержит по меньшей мере один полученный из антител V_H , V_L или C_H иммуноглобулиновый домен в контексте других неиммуноглобулиновых или не полученных из антител компонентов. Такие белки на основе антител включают, но не ограничиваются ими, (i) Фс-слитые белки связывающих белков, включая рецепторы или рецепторные компоненты со всеми или частичными доменами C_H иммуноглобулина, (ii) связывающие белки, в которых V_H и/или V_L домены соединяются с альтернативными молекулярными каркасами, или (iii) молекулы, в которых иммуноглобулиновые V_H и/или V_L и/или C_H домены объединяются и/или собираются способом, обычно не встречающимся в природных антителах или фрагментах антител.

Термин "производное или фрагмент антитела", используемый в данном контексте, относится к молекуле, содержащей по меньшей мере одну полипептидную цепь, полученную из антитела, не полноразмерную, включающую, но не ограничивающуюся ими, (i) фрагмент Fab, который является моновалентным фрагментом, состоящим из варибельных легких (V_L), варибельных тяжелых (V_H), константных легких (C_L) и константных тяжелых 1 (C_{H1}) доменов; (ii) фрагмент $F(ab')_2$, который представляет собой бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) участок тяжелой цепи фрагмента F_{ab} (F_d), который состоит из доменов V_H и C_{H1} ; (iv) варибельный фрагмент фрагмента (F_v), который состоит из доменов V_L и V_H одного плеча антитела, (v) доменный фрагмент антитела (dAb), который содержит один варибельный домен; (vi) изолированную определяющую комплементарность область (CDR); (vii) одноцепочечный фрагмент F_v (scFv); (viii) диатело, которое представляет собой бивалентное биспецифическое антитело, в котором домены V_H и V_L экспрессируются на одной полипептидной цепи, но с использованием линкера, который слишком короткий для обеспечения спаривания между двумя доменами на одной и той же цепи, тем самым принуждая домены к спариванию с доменами комплементарности другой цепи и созданию двух антигенсвязывающих сайтов; и (ix) линейное антитело, которое содержит пару тандемных сегментов F_v (V_H - C_{H1} - V_H - C_{H1}), которые вместе с комплементарными полипептидами легкой цепи образуют пару антигенсвязывающих областей; и (x) другие неполноразмерные участки тяжелой и/или легкой цепи иммуноглобулина или их мутанты, варианты или производные, отдельные или в любой комбинации. В любом случае указанные производное или фрагмент сохраняет свойства связывания с мишенью.

Термин "формат модифицированного антитела", используемый в данном документе, охватывает конъюгаты антитело-лекарственное средство, модифицированные полиалкиленоксидом scFv, монотела, диатела, камелидные антитела, доменные антитела, би- или триспецифические антитела, IgA, или две

структуры IgG, соединенные J-цепью и секреторным компонентом, акульи антитела, каркасная область американских приматов + CDR не американских приматов, антитела IgG4 с удаленной шарнирной областью, IgG с двумя дополнительными сайтами связывания, сконструированными в доменах CH3, антитела с измененной областью Fc для повышения аффинности с Fc-гамма-рецепторами, димеризованные конструкции, содержащие CH3+VL+VH, и тому подобное.

Термин "миметик антитела", используемый в данном контексте, относится к белкам, не принадлежащим к семейству иммуноглобулинов, и даже к не белкам, таким как аптамеры, или синтетическим полимерам. Некоторые типы имеют антителоподобную структуру бета-листа. Потенциальными преимуществами "миметиков антител" или "альтернативных каркасов" по отношению к антителам являются лучшая растворимость, более высокое проникновение в ткани, более высокая устойчивость к теплу и ферментам, а также сравнительно низкие издержки производства.

Некоторые миметики антител могут быть предоставлены в больших библиотеках, в которых предлагаются конкретные кандидаты связывания по отношению ко всем возможным мишеням. Так же, как и с антителами, целевые специфические миметики антител могут быть разработаны с использованием технологий высокопроизводительного скрининга (HTS), а также с помощью установленной техники отбора, такой как фаговый дисплей, бактериальный дисплей, дисплей дрожжей или млекопитающих. В настоящее время разработанные миметики антител охватывают, например, белки с анкириновыми повторами (называемые DARPIn), лектины C-типа, белки A-домена *S. aureus*, трансферрины, липокалина, домены 10-го типа III фибронектина, ингибиторы протеазы домена Куница, полученные из убиквитина связывающие (называемые аффилинами), полученные из гамма-кристаллина связывающие, цистеиновые узлы или ноттины, связывающие на основе каркаса тиоредоксина A, домены SH-3, страдотела, "домены A" мембранных рецепторов, стабилизированные дисульфидными связями и Ca²⁺, соединениями на основе CTLA4, Fyn SH3, и аптамеры (молекулы пептидов, которые связываются с определенными молекулами-мишенями).

Термин "олигопептидное связующее", используемый в данном контексте, относится к олигопептидам, которые обладают способностью связываться с высокой аффинностью с данной мишенью. Термин "олиго" относится к пептидам, которые содержат от 5 до 50 аминокислотных остатков.

В соответствии с другим вариантом осуществления конъюгата связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) связывающий белок связывается по меньшей мере с одним объектом, выбранным из группы, состоящей из

- рецептора,
- антигена,
- фактора роста,
- цитокина и/или
- гормона.

Этот перечень определяет различные типы мишеней, с которыми может связываться связывающий белок. Термин "рецептор", используемый в данном контексте, означает молекулу клеточной поверхности, предпочтительно молекулу клеточной поверхности, которая (i) связывается со специфическими сигнальными молекулами или группами специфических сигнальных молекул (т.е. рецептор, такой как, например, рецептор VEGF) и/или (ii) не имеет известного лиганда (т.е. орфан-рецептор, такой как, например, HER2/neu). Природные рецепторы экспрессируются на поверхности популяции клеток или они просто представляют внеклеточный домен такой молекулы (независимо от того, существует такая форма в природе или нет) или растворимой молекулы, выполняющей природную функцию связывания в плазме, или внутри клетки или органа. Предпочтительно, такой рецептор является членом сигнального каскада, который участвует в конкретном патогенном процессе (например, рецептор, который принадлежит к сигнальному каскаду фактора роста), или экспрессируется на поверхности клетки или частицы, которая участвует в патологическом процессе, например раковой клетки.

Термин "антиген", используемый в данном контексте, означает вещество, которое обладает способностью индуцировать специфический иммунный ответ и может включать поверхностные белки или белковые комплексы (например, ионные каналы). Часто антигены ассоциируются с патогенными объектами, например, раковой клеткой.

Термин "цитокин", используемый в данном контексте, относится к мелкоклеточным сигнальным белковым молекулам, которые секретируются многочисленными клетками и являются категорией сигнальных молекул, широко используемых в межклеточной коммуникации. Цитокины можно классифицировать как белки, пептиды или гликопротеины, термин "цитокин" охватывает большое и разнообразное семейство регуляторов, продуцируемых по всему организму клетками разнообразного эмбриологического происхождения.

Термин "фактор роста", используемый в данном контексте, относится к природным веществам, способным стимулировать клеточный рост, пролиферацию и клеточную дифференцировку. Обычно фактором роста является белок или стероидный гормон. Факторы роста важны для регулирования различных клеточных процессов.

Термин "гормон", используемый в данном контексте, относится к химическому веществу, выделяе-

мому клеткой, железой или органом в одной части тела, которая отправляет сообщения, которые воздействуют на клетки в других частях организма. Этот термин охватывает пептидные гормоны, липид- и фосфолипид-производные гормоны, включая стероидные гормоны и моноамины.

В случае если связывающий белок связывается с рецептором или антигеном, конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) можно, например, направлять на конкретный сайт, например на патогенный объект, например раковую клетку, куда доставляется полезная нагрузка, например токсин. Таким образом, снижается системная токсичность токсина или химиотерапевтического агента, тогда как локальная концентрация последнего в месте действия увеличивается, тем самым повышается эффективность при снижении побочных эффектов. Кроме того, соответствующий сигнальный каскад может ингибироваться связыванием связывающего белка. В случае если полезная нагрузка представляет собой маркер, то последний может, таким образом, использоваться для маркировки конкретного сайта, например раковой клетки, характеризующейся данным поверхностным антигеном, обнаруженным связывающим белком, для диагностики.

В случае если связывающий белок связывается с фактором роста, цитокином и/или гормоном, конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) можно, например, направлять к сайту, с которым цитокин или гормон фактора роста обычно связывается, с целью доставки полезной нагрузки сайт-специфическим образом. Кроме того, соответствующий сигнальный каскад может ингибироваться связыванием связывающего белка.

Термин "связываться", используемый в данном контексте, означает хорошо понятное взаимодействие или другую неслучайную ассоциацию между связывающим белком, например антителами, или фрагментами антител, и их мишенями. Предпочтительно, такая реакция связывания характеризуется высокой специфичностью и/или чувствительностью к мишени. Предпочтительно, реакция связывания характеризуется константой диссоциации (K_d) $\leq 10^{-3}$ М, предпочтительно $\leq 10^{-4}$ М, $\leq 10^{-5}$ М, $\leq 10^{-6}$ М, $\leq 10^{-7}$ М, $\leq 10^{-8}$ М, $\leq 10^{-9}$ М и наиболее предпочтительно $\leq 10^{-10}$.

В соответствии с другим вариантом осуществления связывающий белок имеет по меньшей мере две субъединицы.

В этом варианте осуществления одна субъединица может быть конъюгирована с производным антрациклина PNU-159682, описанным в данном документе (см. фиг. 3А и 6А и 6В).

Предпочтительно, по меньшей мере два разных лекарственных средства могут конъюгировать по меньшей мере с двумя субъединицами сайт-специфическим образом. Этот опция предоставляет универсальный инструментальный, с помощью которого может быть создано большое количество различных конструкций связывающий белок-лекарственное средство.

Предпочтительно, по меньшей мере два разных лекарственных средства являются лекарственными средствами, сталкивающимися с разными клеточными путями. Это означает, что следующим за конъюгатом производного антрациклина, описанным здесь, второй токсин может конъюгировать с другой субъединицей одного и того же связывающего белка.

Такой вариант осуществления может быть реализован, например, путем конъюгации двух разных лекарственных средств с каждой из двух легких цепей полноразмерного антитела и с двумя тяжелыми цепями полноразмерного антитела, соответственно, при использовании двух разных ферментов сортазы, распознающих разные мотивы распознавания ("сортазные метки"), плюс антитело, которое содержит различные С-концевые модификации на тяжелых и легких цепях, содержащих соответствующие мотивы распознавания для указанных разных ферментов сортазы.

Таким образом может быть создан конъюгат антитело-лекарственное средство, который состоит из каждых двух полноразмерных легких цепей Ig и тяжелых цепей Ig, содержащих разные полезные нагрузки, ковалентно прикрепленные к указанным тяжелым и легким цепям.

Такой вариант осуществления приводит предпочтительно к сайт-специфической конъюгации по меньшей мере двух субъединиц с образованием конъюгатов связывающий белок-лекарственное средство с помощью сайт-специфической с равной полезной нагрузкой конъюгации с каждой из указанных субъединиц.

В одном варианте осуществления конъюгата связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) связывающий белок связывается с HER-2. Предпочтительно, связывающий белок представляет собой антитело, специфичное к HER-2.

В этом варианте осуществления специфическое антитело HER-2 предпочтительно:

- содержит области CDR 1-6 трастузумаба (гуманизированный hu4D5),
- содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи трастузумаба,
- имеет идентичность аминокислотной последовательности 90% или выше с областями или доменами из а) или б),
- представляет собой трастузумаб или его связывающийся с мишенью фрагмент или производное и/или
- конкурирует с трастузумабом за связывание с Her-2.

Анти-HER-2 моноклональное антитело трастузумаб связывается с доменом IV антитела HER-2.

Предпочтительно анти-HER-2 антитело содержит первичные аминокислотные последовательности цепей IgH и IgL, фиг. 11A (Seq ID Nos 1 и 2).

Последовательности трастузумаба также представлены в номере доступа к банку данных лекарственных средств DB00072 (BIOD00098, BTD00098), который включен в данный документ по ссылке, а также в базе данных IMGT (VH: <http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/details.cgi?pdbcode=7637&Part=Chain&Chain=7637H> & VL: <http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/details.cgi?pdbcode=7637&Part=Chain&Chain=7637L>).

В другом варианте осуществления конъюгата связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) связывающий белок связывается с CD30. Предпочтительно, связывающий белок представляет собой антитело, специфичное к CD30.

В этом варианте осуществления антитело предпочтительно:

- a) содержит CDR-области 1-6 брентуксимаба (химерный сAc10),
- b) содержит вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи брентуксимаба,
- c) имеет идентичность аминокислотной последовательности 90% или выше с областями или доменами из a) или b),
- d) представляет собой брентуксимаб или его связывающийся с мишенью фрагмент или производное и/или

e) конкурирует с брентуксимабом за связывание с CD30.

Последовательности брентуксимаба (клон сAc10), который является компонентом антитела одобренного лекарственного средства адцетрис/брентуксимаб ведотин [Adcetris/Brentuximab vedotin], представлены в US2008213289A1.

Предпочтительно, анти-CD30 антитело содержит первичные аминокислотные последовательности цепей IgH и IgL, фиг. 11 (Seq ID Nos 3 и 4).

Предпочтительно, в этих вариантах осуществления токсин представляет собой токсин формулы (i),

L₁ представляет собой этилендиаминовый линкер,

L₂ представляет собой линкер олигоглицинового (Gly)_n пептида (причем n имеет предпочтительную длину 5 аминокислот) и

L₃ представляет собой аминокислотные остатки 1-4 обработанного сортазной меткой пентапептидного мотива (т.е. лишенный С-концевого остатка G (5-й аминокислотный остаток), который удаляется при сортаза-опосредованной конъюгации с пептидом (Gly)_n,

линкер X отсутствует и Y представляет собой линкер с 5 аминокислотами между С-концом легкой цепи Ig и L₃, предпочтительно с аминокислотной последовательностью GGGGS.

Альтернативно, токсин представляет собой токсин формулы (ii), тогда как

L₁ представляет собой этиленаминовый линкер,

L₂ представляет собой линкер олигоглицинового (Gly)_n пептида, (причем n имеет предпочтительную длину 5 аминокислот),

L₃ представляет собой аминокислотные остатки 1-4 обработанного сортазной меткой пентапептидного мотива (т.е. лишенный С-концевого остатка G (5-й аминокислотный остаток), который удаляется при сортаза-опосредованной конъюгации с пептидом (Gly)_n,

линкер X отсутствует и

Y представляет собой линкер с 5 аминокислотами между С-концом легкой цепи Ig и L₃, предпочтительно с аминокислотной последовательностью GGGGS.

Кроме того, в настоящем изобретении предлагается способ получения конъюгата связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) в соответствии с вышеприведенным описанием, в котором связывающий белок, содержащий мотив распознавания фермента сортазы, конъюгирует с помощью фермента сортазы по меньшей мере с одним конъюгатом производного антрациклина, который содержит в качестве L₂ олигоглициновый пептид (Gly)_n.

Сортаза-технология, ее преимущества (сайт-специфическая конъюгация, стехиометрически определяемая зависимость между токсином и связывающим белком, высокая эффективность конъюгации) подробно объясняется в заявке WO 2014140317 A1, содержание которой включено в данный документ по ссылке. Дополнительные объяснения в отношении меток сортазы приведены выше.

Предпочтительным вариантом осуществления настоящего изобретения является конъюгация полезных нагрузок PNU-производного с помощью технологии SMAC с С-концом связывающих белков и предпочтительно с С-концом цепей антитела или иммуноглобулина по меньшей мере с одной легкой цепью Ig или тяжелой цепью Ig. Это достигается за счет создания структур экспрессии клеток млекопитающих для связывания белковых или иммуноглобулиновых субъединиц, которые кодируют мотив распознавания С-концевого пентапептида на ферменты сортазы непосредственно после С-конца связывающего белка или полипептидной субъединицы мультимерного связывающего белка, как например антитело.

Следует понимать, что пентапептидный мотив сортазы A от *Staphylococcus aureus*, который представляет собой LPXTG или LPXSG и который упоминался ранее, приводится только в качестве неограничивающего примера и может быть заменен любым другим пентапептидным мотивом, распознаваемым

ферментами сортазы от других видов или других классов, таких как сортаза В от *Staphylococcus aureus*, который распознает пентапептидный мотив NPQTN. Могут также использоваться мотивы распознавания, которые распознаются сконструированными ферментами сортазы, как, например, LAETG, распознаваемый сконструированной версией сортазы А от *Staphylococcus aureus*, недавно описанной Dorr et al. (2014).

В WO 2014140317 также приводятся технические детали, описание и реализация в отношении технологии сортаза-конъюгации, которая также называется технологией SMAC (технология сортаза-опосредованной конъюгации антитела). Эта технология позволяет конъюгировать два объекта, один из которых маркируется (Gly_n)-отрезком (как сказано выше для токсина) и один с так называемой сортазной меткой, которая является пептидной меткой, которая может быть прикреплена, например, к связывающему белку.

Эти сортазные метки представляют собой олигопептиды, обычно пентапептидные мотивы, которые слиты с первым объектом (здесь: связывающий белок), который должен быть конъюгирован с вторым объектом (здесь: производное антрацилина), таким образом, что С-конец указанных олигопептидов сортазных меток остается свободными. Как описано в WO 2014140317, это может быть достигнуто путем экспрессии связывающих белков из векторов экспрессии, кодирующих дополнительные аминокислоты на сортазную метку пентапептида.

Такая сортазная метка представляет собой, например, LPXTG или LPXSG (для сортазы А от *Staphylococcus aureus*), LPXSG (для сконструированной сортазы А 4S9 от *Staphylococcus aureus*, описанной в Dorr et al., 2014) или LAXTG (для сконструированной сортазы А 2A9 от *Staphylococcus aureus*, описанной в Dorr et al., 2014), где X является любой из 20 природных аминокислот. Однако такие сортазные метки могут различаться последовательно по ферментам сортазы от других видов бактерий или по классам сортазы, как описано в WO 2014140317, и в известном уровне техники (Spirig et al., 2011).

Второй объект содержит глициновый отрезок (Gly_n-отрезок) со свободным N-концом (-NH₂), причем Gly_n-отрезок представляет собой олигоглициновый пептид. Предпочтительно n представляет собой целое число между ≥ 1 и ≤ 21 . В одном особенно предпочтительном варианте осуществления n представляет собой целое число между ≥ 3 и ≤ 10 , предпочтительно n=3 или n=5. Наиболее предпочтительно n=5.

Фермент сортазы, кроме того, способен сливать два объекта друг с другом посредством реакции транспептидирования, в ходе которой С-концевой аминокислотный остаток (например, G в LPXTG) отщепляется и затем замещается первым глицином из указанного глицинового отрезка.

В другом предпочтительном варианте осуществления мотив распознавания пентапептида может быть непосредственно присоединен к последней природной С-концевой аминокислоте легких цепей или тяжелых цепей иммуноглобулина, который в случае каппа легкой цепи иммуноглобулина человека представляет собой С-концевой цистеиновый остаток, который в случае ламбда легкой цепи иммуноглобулина человека представляет собой С-концевой сериновый остаток, и который в случае тяжелой цепи иммуноглобулина человека IgG₁ может представлять собой С-концевой лизиновый остаток, кодируемый человеческой Fcγ1 кДНК. Однако другой предпочтительный вариант осуществления также заключается в непосредственном присоединении мотива пентапептида сортазы ко второму последнему С-концевому глициновому остатку, кодируемому человеческой Fcγ1 кДНК, поскольку обычно концевые лизиновые остатки тяжелых цепей антител отсекаются с помощью пост-трансляционной модификации в клетках млекопитающих. Следовательно, в более чем 90% случаев у природного человеческого IgG1 отсутствуют С-концевые лизиновые остатки тяжелых цепей IgG1.

В другом предпочтительном варианте осуществления мотив распознавания пентапептида может быть прикреплен к С-концу тяжелой цепи IgG1 иммуноглобулина человека, где С-концевой лизиновый остаток, кодируемый человеческой Fcγ1 кДНК, замещается аминокислотным остатком, отличным от лизина.

Ранее авторы описали, что в некоторых случаях (например, на С-конце каппа легких цепей Ig, (Beerli et al., 2015) полезно добавить дополнительные аминокислоты между С-концом связывающего белка и сортазной меткой, L₃. Было продемонстрировано улучшение эффективности полезных нагрузок конъюгации ферментов сортазы с связывающим белком. В случае каппа легких цепей Ig было обнаружено, что при добавлении 5 аминокислот (GGGGS) между последней С-концевой цистеиновой аминокислотой каппа легкой цепи Ig и сортазной меткой улучшалась кинетика конъюгации, так что С-концы каппа легких цепей Ig и тяжелых цепей Ig могли конъюгировать с аналогичной кинетикой (см. Beerli et al. (2015). Следовательно, другой предпочтительный вариант осуществления необязательно включает линкер Y аминокислот в диапазоне ≥ 1 и ≤ 21 между последней С-концевой аминокислотой связывающего белка или субъединицы антитела и сортазной меткой L₃.

Кроме того, в настоящем изобретении предлагается применение конъюгата связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) в соответствии с вышеприведенным описанием или полученного с помощью вышеприведенного способа для лечения человека или животного, страдающего от данного патологического состояния, подвергающегося риску развития данного патологического состояния и/или у указанного человека или животного диагностировано данное патологическое состояние.

Кроме того, в настоящем изобретении предлагается применение конъюгата связывающий белок-лекарственное средство в соответствии с вышеприведенным описанием для изготовления лекарственного средства для лечения человека или животного, страдающего от данного патологического состояния, подвергающегося риску развития данного патологического состояния и/или у указанного человека или животного диагностировано данное патологическое состояние.

Предпочтительно, патологическое состояние представляет собой неопластическое заболевание. Более предпочтительно, неопластическое заболевание представляет собой рак, который имеет показатель экспрессии HER-2 1+, 2+ или 3+, как определено с помощью ИНС или ISH, и рак предпочтительно представляет собой рак молочной железы, рак, который является CD30-положительным, как определено с помощью ИНС, ELISA или проточной цитометрии, предпочтительно это лимфома, более предпочтительно лимфома Ходжкина (HL) или системная анапластическая крупноклеточная лимфома (sALCL).

Статус HER-2 может быть определен, например, в соответствии с указаниями ASCO/CAP, которые описаны в Wolff et al 2013.

Статус CD30 может быть определен, например, в соответствии с методом, изложенным в Young 2014.

Кроме того, в изобретении предлагается фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) в соответствии с вышеприведенным описанием или полученный описанным выше способом, и по меньшей мере один другой фармацевтически приемлемый ингредиент.

Подробное описание

Для преодоления основных ограничений традиционной малеимидной линкерной химии в отношении создания конъюгатов BPDC и ADC, авторами ранее был разработан ферментативный подход для создания BPDC или ADC с использованием последовательность-специфических ферментов транспептидазы либо с применением ферментов сортазы, либо так называемых расщепленных интеинов (см. WO 2014140317 A1). В частности, можно было продемонстрировать, что сайт-специфическая конъюгация полезных нагрузок малого молекулярного веса ферментами сортазы, в контексте антител, называемая SMAC-технологией (технология сортаза-опосредованной конъюгации антител), дает в результате ADC, которые в равной степени активны как химически конъюгированные ADC при уничтожении раковых клеток *in vitro*, если используется такой же связывающий белок и одна и такая же полезная нагрузка. Кроме того, ADC, созданные с помощью SMAC-технологии, специфические к мишени HER-2, приводили к аналогичной сильной регрессии опухоли в моделях ксенотрансплантации, если применяли такое же целевое антитело (анти-HER-2 трастузумаб) и такую же токсичную полезную нагрузку (DM1) (WO 2014140317 A1). Однако, во-первых, в созданных с помощью SMAC конъюгатах ADC не использовалась малеимидная линкерная химия, и, во-вторых, реакция конъюгации проводилась сайт-специфическим способом с C-концами либо IgH-, либо IgL-цепей антитела, так что были получены более гомогенные ADC.

В случае использования SMAC-технологии сайт-специфическая конъюгация может осуществляться, например, с помощью фермента рекомбинантной сортазы A от *Staphylococcus aureus*, который специфически распознает пентапептидный мотив LPXTG или LPXSG (X=любая из 20 природных аминокислот) и который может быть присоединен к рекомбинантному антителу, предназначенному для конъюгации. Сортаза A затем использует олигоглициновый отрезок в качестве нуклеофила, чтобы катализировать реакцию транспептидирования, с помощью которой аминокислотная группа олигоглицина совершает нуклеофильную атаку на пептидную связь между треонином или серином и глицином пентапептидного мотива LPXTG или LPXSG. Это приводит к разрыву этой пептидной связи и образованию новой пептидной связи между N-концевым глицином олигоглицинового пептида (см. фиг. 1), т.е. вызывает транспептидирование.

Хотя было показано, что конъюгаты трастузумаб-DM1, созданные с помощью сортаза-опосредованной конъюгации, обладают сравнимой активностью по отношению к химически конъюгированным конъюгатам DM1 (T-DM1 или Kadcyla®, которые уже применяются в клинической практике), более высокая активность ADC, полученных с помощью SMAC-технологии, не достигнута (WO 2014140317 A1). Этого и не ожидали, поскольку использовались такие же целевые антитела и такая же полезная нагрузка.

На основании этого, а также на других экспериментах с различными моноклональными антителами, специфически связывающимися с другими TSA, которые потенциально экспрессируются на более низких уровнях на раковых клетках, чем мишень HER-2, или которые потенциально менее эффективно интернализуются при связывании с ADC (данные не показаны), оказалось, что для получения достаточно эффективных ADC требуются токсичные полезные нагрузки с более высокой активностью, чем майтансины, и/или с потенциально другим способом действия. Кроме того, полезная нагрузка должна поддаваться модификации по меньшей мере в одной реактивностноспособной группе, позволяя добавлять олигоглициновый пептид для обеспечения сортаза-конъюгации полезной нагрузки с LPXTG- или LPXSG-модифицированными связывающими белками. Наконец, при использовании токсинов с более высокой активностью модификация должна приводить к стабильному соединению между глициновым отрезком и

полезной нагрузкой, чтобы предотвращалось нежелательное высвобождение токсичной полезной нагрузки в кровотоке, но в то же время токсин должен все же вызывать эффективное уничтожение раковых клеток при специфическом связывании и интернализации BPDC или ADC в опухолевые клетки.

Согласно эмпирической оценке различных токсичных полезных нагрузок, описанных в предшествующем уровне техники в контексте SMAC-технологии, был сделан вывод о том, что высокоактивное антрацилин-производное неморубицина, называемое PNU-159682 (Quintieri et al., 2005) (см. также фиг. 2), модифицированное с помощью этилендиамин-спейсера для обеспечения добавления пентаглицинового отрезка, можно было бы очень эффективно конъюгировать с модифицированными антителами LPXTG по SMAC-технологии с выходом почти полностью конъюгированных ADC на основании анализа продуктов с помощью HIC (хроматография с гидрофобным взаимодействием) и обращенно-фазовой хроматографии (данные не показаны). Кроме того, если это модифицированное производное PNU-159682, именуемое PNU-EDA-Gly₅, конъюгировано с помощью SMAC с различными моноклональными антителами, как описано в примерах, приведенных ниже, выполнено TSA-зависимое уничтожение опухолевых клеток с высокой активностью. В частности, удалось эффективно уничтожить in vitro раковые клетки молочной железы человека с низкой экспрессией HER-2 с помощью конъюгатов PNU-EDA-Gly₅, конъюгированных по SMAC-технологии, тогда как конъюгаты майтанзин-токсин дали очень слабый эффект. Это демонстрирует потенциальную пользу производного PNU-EDA-Gly₅ для создания активных BPDC и ADC, предпочтительно содержащих PNU-EDA-Gly₅, или любого PNU-производного с олигоглициновым пептидом, имеющего по меньшей мере два прикрепленных к нему глицина. Кроме того, это демонстрирует пользу BPDC и ADC, содержащих предпочтительно PNU-EDA-Gly₅ или любое PNU-производное с олигоглициновым пептидом в качестве полезной нагрузки для лечения онкологических заболеваний.

Хотя производное антрацилина PNU-159682 (фиг. 2) и его применение в контексте химической конъюгации и ADC описаны в известном уровне техники (например, WO 2009099741 A1, WO 2010009124, WO 2012073217, приведенные в данном документе по ссылке), соединение, подобное PNU-EDA-Gly_n, или ADC, содержащие сортаза-конъюгированный PNU-EDA-Gly_n, предлагаемый в данном документе, еще не были описаны в предшествующем уровне техники и не являются конкретной структурой PNU-производного со спейсером EDA и линкером Gly_n, описанном или заявленном в любом из документов предшествующего уровня техники. Стабильные аддукты, в которых PNU-производные стабильно связаны с белками через пептидные связи, а не с помощью сложноэфирных связей, и малеимидные линкеры могут оказаться лучшими с точки зрения устойчивости и фармакокинетического поведения in vivo благодаря, как правило, высокой стабильности пептидных связей в сыворотке, как описано далее в примерах. Кроме того, PNU-производные с Gly_n-отрезком, которые, как ожидается, будут отображать устойчивые конъюгаты лекарственного средства после конъюгации по SMAC-технологии, представлены на фиг. 6A и 6B.

Эксперименты и фигуры

Хотя изобретение было проиллюстрировано и подробно представлено на рисунках и в вышеприведенном описании, такая иллюстрация и описание должны рассматриваться как иллюстративные или примерные, а не ограничительные; изобретение не ограничивается описанными вариантами осуществления. Другие модификации описанных вариантов осуществления понятны специалистам в данной области техники и могут быть выполнены ими при практическом осуществлении заявленного изобретения после изучения рисунков, описания и прилагаемой патентной формулы. В патентной формуле слово "содержащий" не исключает других элементов или этапов, а единственное число не исключает множественность. Сам факт того, что определенные меры перечислены во взаиморазличных зависимых пунктах, не указывает на то, что в интересах выгоды нельзя использовать комбинацию этих мер. Любые ссылочные признаки в патентной формуле не должны толковаться как ограничивающие объем.

Все аминокислотные последовательности, представленные в данном документе, показаны от N-конца до C-конца; все нуклеинокислотные последовательности, представленные в данном документе, показаны 5'→3'.

Пример 1. Создание сайт-специфически конъюгированных на C-конце моноклональных антител брентуксимаб и трастузумаб с PN-EDA-Gly_n-полезной нагрузкой с помощью сортаза-опосредованной технологии конъюгации антител (SMAC-технология).

Последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепи моноклонального антитела брентуксимаб (клон cAc10), специфического к человеческой CB30-мишени, были получены из патента US 2008213289 A1, последовательности человеческого HER-2-специфического антитела трастузумаб, содержащиеся в коммерческом антителе герцептин (трастузумаб) или ADC Kadcyla®, извлеченном из него, были получены из онлайн IMGT базы данных (VH: <http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/details.cgi?pdbcode=7637&Part=Chain&Chain=7637H> & VL: <http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/details.cgi?pdbcode=7637&Part=Chain&Chain=7637L>). Были получены химерное mAb cAc10 и гуманизированное mAb трастузумаб, их тяжелые и легкие цепи мечены на C-конце с последовательностью распознавания сортазы A и дополнительной меткой очистки аффинности Strep II (последовательность с HC-меткой: LPETGGWSHPQFEK, последовательность с LC-меткой: GGGGSLPETGGWSHPQFEK), с

использованием способов, известных специалистам в данной области техники (см. фиг. 11А и 11В).

Производное антрациклина PNU-EDA-Gly₅ (фиг. 3А) было предоставлено фирмой Levana Biopharma, Сан-Диего, Калифорния, которое синтезировало пентаглицин-пептид в карбонильную группу PNU159682 с помощью этилендиамин (EDA) линкера в соответствии со схемой синтеза, изображенного на фиг. 3В. Для этого коммерчески доступный PNU159682 сначала окисляли с получением его карбоновой кислоты (1 на фиг. 3В) с помощью NaIO₄ в 60% метаноле при комнатной температуре в течение 3 ч. Затем к раствору 1 (51 мг, 81 мкмоль) в 6 мл DCM добавляли N-гидроксисукцидимид (NHS, 46 мг, 400 мкмоль) и этил(диметиламинопропил) карбодиимид (EDC, 100 мг, 523 мкмоль) в дихлорметане (DCM). Через 30 мин смесь промывали водой (2×6 мл), сушили над Na₂SO₄ и выпаривали. Остаток затем растворяли в 2 мл диметилформамида (DMF) перед добавлением амина (2 на фиг. 3В, 55 мг, 81 мкмоль в виде трифторацетатной соли), затем добавляли N,N-диизопропилэтиламин (DIEA, 50 мкл). Смесь перемешивали в течение 1 ч перед добавлением пиперидина (40 мкл), после чего еще в течение 20 мин перемешивали. Смесь очищали с помощью HPLC до получения PNU-EDA-Gly₅ (3 на фиг. 3В, 34 мг, 44%) в виде красного твердого вещества; MS m/z 955,2 (M+H).

PNU-EDA-Gly₅ конъюгировали с mAb путем инкубации mAb с LTETG-меткой [10 мМ] с PNU-EDA-Gly₅, [200 мМ] в присутствии 0,62 мМ сортазы А в 50 мМ Hepes, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂, pH 7,5, в течение 3,5 ч при 25°C. Реакцию останавливали путем пропускания ее через колонку Protein A HiTrap (GE Healthcare), уравновешенную 25 мМ фосфата натрия, pH 7,5, с последующим промыванием 5 объемами колонки (CV) буфера. Связанный конъюгат элюировали буфером для элюирования, 5 CV, (0,1 М янтарной кислоты, pH 2,8), 1 CV фракций собирали в пробирки, содержащие 25% об./об. 1 М Трис-основы [Tris Base] для нейтрализации кислоты. Содержащие белок фракции объединяли в пул и вносили в 10 мМ сукцинат натрия, pH 5,0, 100 мг/мл трегалозы, 0,1% вес./об. полисорбата или фосфата 20 с помощью G25-колоночной хроматографии с использованием колонок NAP 25 (GE Healthcare) в соответствии с инструкциями производителя.

Совокупное содержание каждого конъюгата оценивали с помощью хроматографии на колонке TOSOH TSKgel G3000SWXL 7,8 мм×30 см, 5 мкм, со скоростью 0,5 мл/мин в 10% IPA, 0,2 М фосфата калия, 0,25 М хлорида калия, pH 6,95. Нагрузку лекарственного средства оценивали как с помощью гидрофобной интерактивной хроматографии (HIC), так и с помощью обращенной фазовой хроматографии. HIC проводили на колонке TOSOH Butyl-NPR 4,6 мм×3,5 см, 2,5 мкм со скоростью 0,8 мл/мин с 12-минутным линейным градиентом между А-1,5М (NH₄)₂SO₄, 25 мМ NaPi, pH = 6,95±0,05 и В - 75% 25 мМ NaPi, pH = 6,95±0,05, 25% IPA. Обратную фазовую хроматографию проводили на колонке Polymer Labs PLRP 2,1 мм×5 см, 5 мкм со скоростью 1 мл/мин/80°C с 25-минутным линейным градиентом между 0,05% TFA/H₂O и 0,04% TFA/CH₃CN. Образцы сначала восстанавливали путем инкубации с DTT при pH=8,0 при 37°C в течение 15 мин. Оба конъюгата ADC на основе PNU-EDA-Gly₅ были преимущественно мономерными и имели отношение лекарственное средство-антитело, близкое к теоретическому максимуму, соответственно 4. В табл. 2 приведены результаты получения ADC.

Таблица 2. Сведения о полученных ADC на основе PNU-EDA-Gly₅.

mAb	мишень	HC-метка	LC-метка	% моно	DAR
Брентуксимаб	CD30	Да	Да	99,6	4,0
Трастузумаб	HER-2	Да	Да	98,2	3,9

HC - тяжелая цепь; LC - легкая цепь; "% моно" - %-е содержание мономера;

DAR - соотношение "лекарственное средство-антитело".

Пример 2. Анализ цитотоксичности in vitro с использованием сортазы-А конъюгированных конъюгатов ADC брентуксимаб-PNU-EDA-Gly₅ и трастузумаб-PNU-EDA-Gly₅.

Цитотоксичность брентуксимаб-PNU-EDA-Gly₅ была исследована с использованием Karpas-299, линии клеток неходжкинской лимфомы, экспрессирующей высокие уровни CD30, и L428, линии клеток лимфомы Ходжкина, экспрессирующей низкие или умеренные уровни CD30 (фиг. 4). В качестве контролей эффективность cAc10-PNU-EDA-Gly₅ сравнивали с эффективностью коммерчески доступного конъюгата CD30-специфичного cAc10-vcPAB-MMAE AdCetrin® (в качестве положительного контроля) и коммерчески доступного конъюгата HER-2-специфичного трастузумаб-DM1 Kadcyla® (в качестве отрицательного контроля). Для этого клетки высевали на 96-луночные планшеты в 100 мкл RPMI/10% FCS с плотностью 10⁴ клеток на лунку и выращивали при 37°C во влажном инкубаторе при 5% CO₂ атмосфере. После суточной инкубации 25 мкл среды осторожно удаляли из каждой лунки и заменяли на 25 мкл 3,5-кратных серийных разведений каждого ADC в питательной среде, в результате чего достигались конечные концентрации ADC в диапазоне от 20 мкг/мл до 0,25 нг/мл. Каждое разведение выполнялось в двух повторностях. Еще через 4 дня планшеты удаляли из инкубатора и уравнивали до комнатной температуры. Приблизительно через 30 мин в каждую лунку добавляли 100 мкл люминесцентного раствора CellTiter-Glo® (Promega, Cat.No G7570) и после встряхивания планшетов при 450 об/мин в течение 5 мин

и последующей инкубации в течение 10 мин без встряхивания измеряли люминесценцию на Tecan Infinity F200, время интегрирования составляло 1 с на лунку.

Как ожидалось, анти-CD30 ADC Adcetris®, используемый в качестве положительного контроля, эффективно убивал клетки CD30^{HI} Karpas-299 при EC50 8,2 нг/мл (фиг. 4А), но был неэффективен по уничтожению клеток CD30^{LO} L428 (фиг. 4В). Напротив, анти-HER-2 ADC Kadcyla®, используемый в качестве отрицательного контроля, не показал специфического уничтожения клеток и был неэффективен ни на одной из клеточных линий (фиг. 4). Примечательно, что сортаза-конъюгированный ADC cAc10-PNU-EDA-Gly₅ эффективно убивал клетки CD30^{HI} Karpas-299 при величине EC50 6,9 нг/мл (фиг. 4А). cAc10-PNU-EDA-Gly₅ убивал клетки CD30^{HI} L428 только при более высоких концентрациях, аналогично используемым контрольным ADC, что указывает на то, что эффективность этого ADC действительно специфична и опосредована связыванием с CD30 (фиг. 4В). Таким образом, сортаза-опосредованная конъюгация PNU-EDA-Gly₅ дала конъюгат ADC с очень высокой активностью, даже превышающей активность ADC Adcetris®.

Активность по уничтожению опухолевых клеток созданного с помощью SMAC ADC трастузумаб-PNU-EDA-Gly₅ исследовали при использовании клеток SKBR3, клеточная линия рака молочной железы человека, сверхэкспрессирующей HER-2, и клеток T47D, клеточная линия рака молочной железы, естественным образом экспрессирующая низкие уровни HER-2, и данные сравнивали с коммерчески доступным HER-2-специфичным ADC трастузумаб-DM1 конъюгатом Kadcyla® (фиг. 5). Для этого клетки высаживали на 96-луночные планшеты в 100 μ л DMEM/10% FCS с плотностью 10⁴ клеток на лунку, анализы проводили точно так же, как описано выше.

Как ожидалось, положительный контроль ADC Kadcyla® эффективно убивал HER-2-сверхэкспрессирующие клетки рака груди человека SKBR3 при EC50 23,7 нг/мл (фиг. 5А), но был неэффективен по уничтожению клеток HER-2^{LO} T47D (фиг. 5В). Примечательно, что трастузумаб-PNU-EDA-Gly₅, созданный с помощью SMAC-технологии, показал превосходную цитотоксичность и не только убивал клетки SKBR3, сверхэкспрессирующие HER-2, но также клетки HER2^{LO} T47D, при значениях EC50 соответственно 4,8 и 11,0 нг/мл (фиг. 5). Таким образом, сортаза-опосредованная конъюгация PNU-EDA-Gly₅ с трастузумабом дает ADC с очень высокой активностью, превосходящей активность коммерчески доступного и одобренного FDA эталонного ADC Kadcyla®, и даже эффективный на клетках рака молочной железы человека HER2^{LO}.

Пример 3. Сывороточная устойчивость *in vitro* сортаза А-конъюгированного cAc10-PNU-EDA-Gly₅ ADC по сравнению с малеимидным линкером, содержащим трастузумаб эмтанзин (Kadcyla®).

Сывороточную устойчивость *in vitro* брентуксимаб-PNU-EDA-Gly₅ (cAc10-PNU-EDA-Gly₅) и конъюгатов ADC Kadcyla оценивали с помощью анализа на сывороточную устойчивость на основе ELISA. Вкратце, cAc10-PNU-EDA-Gly₅ разводили в мышинной (Sigma, M5905), крысиной (Sigma, R9759) и человеческой сыворотке (Sigma, H6914) и инкубировали при 37°C. Образцы мгновенно замораживали в жидком азоте в дни 0, 3, 7, 14 и хранили при минус 80°C до проведения анализа ELISA. Для сывороток грызунов серию разведений образцов сыворотки cAc10-PNU-EDA-Gly₅ фиксировали на планшетах ELISA, покрытых 2 μ г/мл мышинного анти-PNU mAb (собственного производства путем иммунизации мышей конъюгатом IgG-PNU человека и скрининга с помощью конъюгата BSA-PNU) для связывания с ADC, или покрытых античеловеческим Fc F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch) для связывания с общим IgG, и детектировали с помощью 1:2500 разведения HRP-конъюгированного античеловеческого IgG F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch). Для сывороток приматов 2 μ г/мл рекомбинантного человеческого CD30 (Sino Biologicals, 10777-H08H) наносили на планшеты ELISA и разведение 1:2500 HRP-конъюгированного античеловеческого IgG F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch) или 1 μ г/мл мышинного анти-PNU IgG (собственного производства), а затем HRP-конъюгированный антимышинный Fc F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch) использовали для детектирования общего IgG и ADC соответственно. В случае Kadcyla, такой же протокол, как указано выше, использовали для определения устойчивости в мышинной, крысиной и человеческой сыворотке, но с помощью анти-майтанин mAb собственного производства для связывания с ADC. Концентрации сыворотки ADC и общих IgG рассчитывали из половины максимальных значений титрований образцов путем сравнения с образцом того же ADC известной концентрации.

На фиг. 7А показана отличная устойчивость ADC cAc10-PNU-EDA-Gly₅, в частности, по сравнению с устойчивостью малеимидного линкера, содержащего Kadcyla (фиг. 7В), практически без снижения уровней ADC на протяжении всего эксперимента в любой сыворотке из четырех исследуемых видов. Путем аппроксимации временных точек между днями 0 и 14 к однофазной экспоненциальной функции распада, ограниченной для достижения конечной концентрации 0, значения полувыведения cAc10-PNU-EDA-Gly₅ и Kadcyla определялись в каждой сыворотке. Период полувыведения Kadcyla составлял 3,7 дня, 4,4 дня и 2,9 дня в мышинной, крысиной и человеческой сыворотке соответственно, тогда как период полувыведения cAc10-PNU-EDA-Gly₅ составлял более 14 дней в мышинной, крысиной и человеческой сыворотке.

Пример 4. Устойчивость *in vivo* сортаза А-конъюгированного Ac10-Gly₅-PNU у мышей.

ADC AcC-Gly₅-PNU оттаивали при комнатной температуре и разбавляли до 0,2 мг/мл в стерильном

PBS до концентрации дозирования 1 мг/кг. Образцы инъектировали внутривенно в объеме 5 мл/кг девяти самкам мышей Swiss Webster. Кровь собирали у животных через 1 ч, 24 ч, 72 ч, 7 дней, 14 дней и 21 день. Индивидуальные животные в соответствии с этическими стандартами использовались только для двух моментов времени взятия крови, по меньшей мере, с интервалом одна неделя. Таким образом, у трех мышей брали кровь через 1 ч и 7 дней, у трех других мышей кровь брали через 24 ч и 14 дней, а еще у трех мышей кровь брали через 72 ч и 21 день, всего девять мышей на группу. По каждой группе животных приблизительно 200 μ л крови собирали путем прокалывания ланцетом подчелюстной вены во время первого сбора и приблизительно 600 μ л крови путем прокалывания ланцетом подчелюстной вены во время окончательного сбора (заключительное кровопускание). Всю кровь собирали в пробирки, содержащие K2-EDTA. Плазму выделяли из крови путем центрифугирования при 1500g в течение 10 мин и переносили в стерильные криофлаконы для хранения при -80°C до проведения анализа с помощью ELISA, как описано в примере 4.

Данные на фиг. 8 показывают высокую устойчивость ADC, созданного с помощью SMAC-технологии. На протяжении всего эксперимента концентрации ADC были лишь незначительно ниже, чем концентрации, измеренные для общего IgG, что подразумевает, что линкер между лекарственным средством и антителом является устойчивым *in vivo*. Путем аппроксимации временных точек между днями 3 и 21 к функции однофазного экспоненциального распада, ограниченной для достижения конечной концентрации 0, период полувыведения *in vivo* в медленной фазе определили равным 8,3 и 7,8 дней для общего IgG и ADC соответственно.

Пример 5. Описание и характеристика клонов EMT-6, экспрессирующих HER-2.

Цитотоксичность анти-HER-2 ADC исследовали с использованием мышиной линии клеток опухоли молочной железы EMT-6, сконструированной для сверхэкспрессии человеческого HER-2. Клетки EMT-6 культивировали как монослои в DMEM (модифицированная по Дульбекко среда Eagle - высокая глюкоза), дополненная 10% (об./об.) FCS (сыворотка эмбрионального теленка), 1% (об./об.) 10000 ME/мл пенициллина-стрептомицина и 1% (об./об.) 200 мМ L-глутамин.

Клетки EMT-6 электропорировали с помощью вектора экспрессии, кодирующего ген HER-2 человека, и маркера устойчивости к пуromycinu, и клеточные пулы, устойчиво экспрессирующие HER-2 человека, выбирали с использованием способов, известных специалистам в данной области.

Экспрессия HER-2 была подтверждена проточной цитометрией. Вкратце, после трипсинизации, 10^6 клеток центрифугировали в пробирках FACS; полученные гранулы ресуспендировали в PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор), дополненный 2% FCS. Затем клетки инкубировали с анти-HER-2 антителом трастузумаб (30 мин, 4°C) с последующим центрифугированием и промыванием (3 мл PBS с 2% FCS). Затем клетки ресуспендировали, как и ранее, и инкубировали с античеловеческим IgG антителом (Fc-гамма-специфическим) PE (Ebioscience) в темноте (30 мин, 4°C), перед промыванием (4 мл PBS с 2% FCS). Затем проводили проточную цитометрию на FACS Calibur (BD).

HER-2-трансфицированные клетки EMT-6 были отсортированы по одной клетке с помощью проточной цитометрии с использованием FACS ARIA II для выделения одноклеточных клонов. Они были размножены и экспрессия HER-2 была подтверждена проточной цитометрией.

На фиг. 9 показаны данные анализа FACS для клона, выбранного для исследований *in vivo* (пример 6).

Пример 6. Эффективность *in vivo* сортаза A-конъюгированного ADC трастузумаб-PNU-EDA-Gly₅ на ортотопической модели рака молочной железы.

Эффективность *in vivo* трастузумаб-PNU-EDA-Gly₅ оценивали на иммунокомпетентной ортотопической мышиной модели HER-2-положительного рака молочной железы. Для этого 10^6 клеток рака молочной железы мыши EMT6, экспрессирующих человеческий HER-2 (пример 6), ранее определенный как подходящий для выращивания *in vivo*, имплантировали в правые жировые подушки молочной железы самок мышей Balb/c. Кроме того, контрольным животным имплантировали HER-2-отрицательные клетки EMT6. Далее первичные объемы опухоли измеряли штангенциркулем. Через 13 дней, когда был достигнут средний объем опухоли 100-150 мм³, животные с опухолями были рандомизированы на группы по 6 животных в зависимости от размеров опухоли. Животных обрабатывали в тот же день (день 13-й, т.е. день рандомизации) и 7 дней спустя (день 20-й) путем внутривенной инъекции эталонного ADC Kadcyla® (15 мг/кг), трастузумаб-PNU-EDA-Gly₅ (1 мг/кг) или контрольного носителя [vehicle control]. Размеры опухолей контролировали путем измерения штангенциркулем и на животных, у которых объем опухолей достигал 1000-1500 мм³, проведение испытания прекращали (фиг. 10).

Опухоли у мышей с контрольным носителем росли быстро и достигали среднего размера приблизительно 1000 мм³ в течение 30 дней после трансплантации клеток (фиг. 10A). Обработка с помощью Kadcyla® мало повлияла на рост опухоли у большинства животных. Только у одного из шести животных наблюдалась значительная задержка роста опухоли (фиг. 10C). В поразительном контрасте, у всех животных, получивших трастузумаб-PNU-EDA-Gly₅, опухоли непрерывно регрессировали во время лечения и по существу не определялись на день 30-й после трансплантации клеток (фиг. 10D). У большинства животных до дня 60-го опухоль не выявляли, и рецидив опухоли наблюдался только у одного животного приблизительно на день 40-й. Существенно, противоопухолевая активность трастузумаба-PNU-

EDA-Gly₅ была высоко специфичной и лечение мышей, имеющих HER-2-отрицательные опухоли, не приводило к регрессии опухоли (фиг. 10B). Взятые совокупности, данные демонстрируют, что сортаза-опосредованные сайт-специфически конъюгированные ADC трастузумаб-EDA-Gly₅-PNU дали ADC с активностью по уничтожению опухолевых клеток *in vivo*, намного превосходящей эталонный ADC Kadcyla®.

Перечень фигур

Фиг. 1. Схематическое изображение сайт-специфической сортаза-опосредованной конъюгации антитела (SMAC-технология). Моноклональные антитела должны создаваться с С-концевыми сортазными метками LPXTG. Необходимо создать токсичную полезную нагрузку для содержания отрезка олигоглицинового пептида (Gly_n-отрезок) с определенным количеством глициновых остатков в ряду ($n \geq 1$ и ≤ 21 , предпочтительно $n \geq 3$ и ≤ 10 , предпочтительно $n=3$ или $n=5$, наиболее предпочтительно $n=5$). Фермент сортазы A от *Staphylococcus aureus* специфически распознает мотив пентапептида LPXTG и катализирует транспептидирование отрезка олигоглицинового пептида до треонин-глицин-пептидной связи LPXTG, тем самым создавая новую устойчивую пептидную связь между треонином и N-концевым глицином олигоглицинового отрезка.

Фиг. 2. Структура PNU-159682, как описано в предшествующем уровне техники (например, WO 2009099741 или Quintieri et al. (2005)), включая официальную систему нумерации антрациклинов для реакционноспособных углеродов тетрациклической структуры агликона.

Фиг. 3(A). Структура PNU производное-EDA-Gly₅, называемая в данном описании "PNU-EDA-Gly₅", как используется для конъюгации по SMAC-технологии с С-концевыми LPETG сортаза-мечеными моноклональными антителами при использовании фермента сортазы, как описано в примерах в данном документе; (B) Схема синтеза производного антрациклина PNU-EDA-Gly₅.

Фиг. 4. Доза-ответ цитотоксических эффектов указанных ADC на клеточной линии неходжкинской лимфомы человека Каграс-299, экспрессирующей высокие уровни мишени CD30 на поверхности клетки (A), и на клетках L428 клеточной линии лимфомы Ходжкина человека, экспрессирующих очень низкие уровни мишени CD30 на поверхности клетки (B). Adcetris относится к коммерчески доступному анти-CD30 ADC брентуксимаб-ведотин. Kadcyla относится к коммерчески доступному анти-HER-2/neu ADC T-DM1 (трастузумаб-энтансин). Обе клеточные линии отрицательны в отношении HER-2/neu, и поэтому Kadcyla действует как отрицательный контрольный ADC, который не должен выполнять уничтожение клеток мишень-специфическим образом. Клетки инкубировали с серийными разведениями ADC в течение 4 дней, после чего добавляли люминесцентный раствор CellTiter-Glo® (Promega) и жизнеспособные клетки определяли количественно путем измерения люминесценции на Tecan Infinity F200.

Фиг. 5. Доза-ответ цитотоксических эффектов указанных ADC на клеточной линии рака молочной железы человека SKBR3, экспрессирующей высокие уровни HER-2/neu (A) и клеточной линии рака молочной железы человека T47D, экспрессирующей низкие уровни HER-2/neu (B). Клетки инкубировали с серийными разведениями ADC в течение 4 дней, после чего добавляли люминесцентный раствор CellTiter-Glo® (Promega), и жизнеспособные клетки определяли количественно путем измерения люминесценции на Tecan Infinity F200.

Фиг. 6. Дополнительные связанные с PNU-159682 производные антрациклина, применимые для сайт-специфической конъюгации с LPXTG-мечеными связывающими белками или антителами с помощью SMAC-технологии с получением BPDC или ADC. Показаны только предпочтительные версии с Gly₅-отрезком. На фиг. 6A изображено производное, в котором аминокислотный отрезок Gly₅ непосредственно соединен с помощью его карбокси-конца с А-кольцом тетрациклической агликонной структуры производного PNU. На фиг. 6B изображено производное, в котором предпочтительный этиленаминовый линкер и аминокислотный отрезок Gly₅ непосредственно соединены с А-кольцом тетрациклической агликоновой структуры производного PNU.

Фиг. 7 (A) Измерение концентрации *in vitro* ADC брентуксимаб-PNU-EDA-Gly₅ (обозначенное как "cAc10-PNU ADC") и общего IgG в мышинной (A), крысиной (B), человеческой (C) сыворотке в течение 14 дней. (B) Измерение концентрации *in vitro* ADC трастузумаб-энтансин (Kadcyla®) и общего IgG в мышинной (A), крысиной (B) и человеческой (C) сыворотке в течение 14 дней.

Фиг. 8. Концентрации плазмы *in vivo* ADC и общий IgG, измеренные в 6 моментах времени в течение 21-дневного периода после введения ADC Ac10-Gly₅-PNU у мышей.

Фиг. 9. Данные FACS-анализа клона HER-2 EMT-6, выбранного для исследований *in vivo*, после инкубации с анти-HER-2-антителом трастузумаб, а затем инкубации с содержащим флуорофор античеловеческим IgG-антителом (Fc-гамма-специфичное) PE.

Фиг. 10. Оценка *in vivo* HER-2-специфичных ADC на ортотопической модели иммунокомпетентной мыши HER2-положительного рака молочной железы. Клетки рака молочной железы мыши EMT6, экспрессирующие HER-2 человека (A, C, D) или нерелевантный антиген ROR-1 выращивали в молочных жировых подушечках мышей Balb/c. В дни 13 и 20 животным вводили внутривенно контрольный носитель (A), 1 мг/кг трастузумаб-PNU159682 (B, D) или 15 мг/кг Kadcyla (C). Рост опухоли контролировали до тех пор, пока животных не приходилось умерщвлять по этическим соображениям.

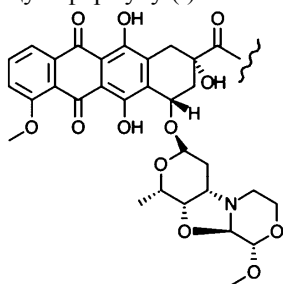
Фиг. 11 А и В: Аминокислотные композиции конъюгированных по SMAC-технологии™ на С-конце IgH и IgL цепей производного PNU-токсина трастузумаб (А) и брентуксимаб (В), содержащего используемые для исследований ADC, содержащие PNU-производное, изображенное на фиг. 3В, связанное через аминокислотную группу Gly₅-отрезка с 4-й аминокислотой сортирующей метки (выделено жирным шрифтом) с помощью пептидной связи после конъюгации фермента сортирующей метки.

Список литературы

- Beerli et al. (2015) PloS One 10, e0131177
 Dorr et al. (2014) PNAS 111, 13343-8
 Quintieri L et al (2005), Clin Cancer Res. 2005 Feb 15;11(4):1608-17.
 Roguska et al. (1994) PNAS 91, pp969-971
 Perez et al. (2014) Drug Discovery Today 19, pp.869-881
 Alley et al. (2008) Bioconjug. Chem. 19, pp. 759-765
 Panowski et al. (2014) mAbs 6, pp. 34-45
 Wolff AC et al (2013), J Clin Oncol. 2013 Nov 1;31(31):3997-4013
 Young KH (2014) Clinical Advances in Hematology & Oncology, Volume 12, Issue 4, Supplement 10
 Spirig et al. (2011) Mol. Microbiol. 82, 1044-1059
 Ducry & Stump (2010) Bioconjug. Chem. 21,5-13,
 McCombs et al. (2015) The AAPS Journal 17, 339-351
 Mullard (2013) Nature Rev Drug Disc 12, 329-332
 Doktor et al. (2014) Mol Cancer Ther 13, 2618-2629
 Hartley & Hochhauser (2012) Curr. Opin. Pharmacol. 12, 398-402
 Minotti (2004) Pharmacol. Rev 56, 185-229
 Cancer and Chemotherapy - Antineoplastic Agents Vol. III, Stanley T. Crooke and Archie W. Prestayko (eds.), Academic Press 1981).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат производного антрациклина (PNU), содержащий производное антрациклина PNU-159682, имеющее следующую формулу (i):



формула (i)

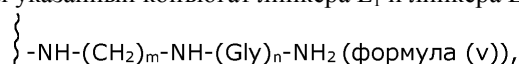
причем указанный конъюгат содержит на своей волнистой линии } линкерную структуру L₁-L₂-L₃, где

L₁ представляет собой алкилендиаминовый линкер?

L₂ представляет собой олигоглициновый пептидный линкер (Gly_n),

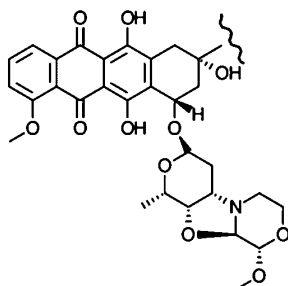
L₃ представляет собой аминокислотные остатки 1-4 пентапептидного мотива распознавания фермента сортирующей метки, лишённого С-концевого остатка глицина, и

два из L₁-L₃ являются обязательными, и причем L₂ соединен с указанным производным антрациклина формулы (i) с помощью линкера L₁, где линкер L₁ соединен с указанным производным антрациклина с помощью первой амидной связи, тогда как с карбокси-концом линкера L₂ он соединен с помощью второй амидной связи, причем указанный конъюгат линкера L₁ и линкера L₂ имеет следующую формулу:



где волнистая линия показывает соединение с указанным производным антрациклина формулы (i), где m представляет собой целое число не меньше 1 и не больше 11, а n представляет собой целое число не меньше 1 и не больше 21.

2. Конъюгат производного антрациклина (PNU), содержащий производное антрациклина, имеющее следующую формулу (ii):

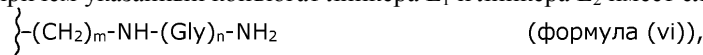


причем указанный конъюгат содержит на своей волнистой линии линкерную структуру $L_1-L_2-L_3$, где L_1 представляет собой алкиленаминовый линкер,

L_2 представляет собой олигоглициновый пептидный линкер (Gly_n),

L_3 представляет собой аминокислотные остатки 1-4 пентапептидного мотива распознавания фермента сортазы, лишённого С-концевого остатка глицина, и

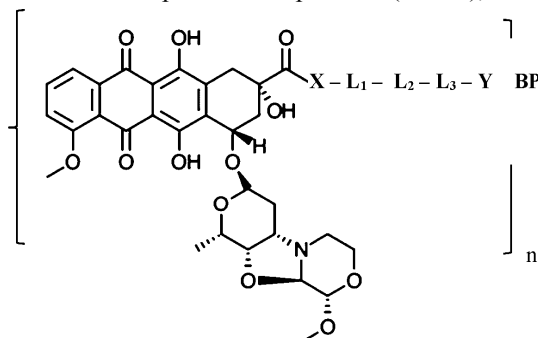
два из L_1-L_3 являются обязательными, и причем L_2 соединен с указанным производным антрациклина формулы (ii) с помощью линкера L_1 , где линкер L_1 соединен с карбокси-концом линкера L_2 с помощью амидной связи, причем указанный конъюгат линкера L_1 и линкера L_2 имеет следующую формулу:



где волнистая линия показывает соединение с указанным производным антрациклина формулы (ii), где m представляет собой целое число не меньше 1 и не больше 11, а n представляет собой целое число не меньше 1 и не больше 21.

3. Конъюгат производного антрациклина (PNU) по п.1, где L_3 выбран из TXPL, SXPL и TXAL, где X - любая из 20 пептидогенных аминокислот.

4. Конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC), имеющий следующую формулу:



формула (iii),

где L_1 представляет собой алкилендиаминовый линкер,

L_2 представляет собой олигоглициновый пептидный линкер (Gly_n),

а L_3 представляет собой аминокислотные остатки 1-4 пентапептидного мотива распознавания фермента сортазы, лишённого С-концевого остатка глицина,

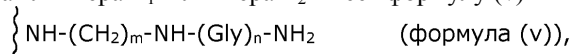
где два из L_1-L_3 являются обязательными, и где линкер X отсутствует, а линкер Y отсутствует или состоит из по меньшей мере одной и по большей мере 20 аминокислот между С-концевым аминокислотным остатком связывающего белка и мотивом распознавания фермента сортазы, L_3 ,

BP является связывающим белком,

n представляет собой целое число между ≥ 1 и ≤ 10

и где линкер L_2 соединен с производным антрациклина формулы (iii) с помощью линкера L_1 , где линкер L_1 соединен с производным антрациклина формулы (iii) с помощью первой амидной связи, тогда как с карбокси-концом линкера L_2 линкер L_1 соединен с помощью второй амидной связи,

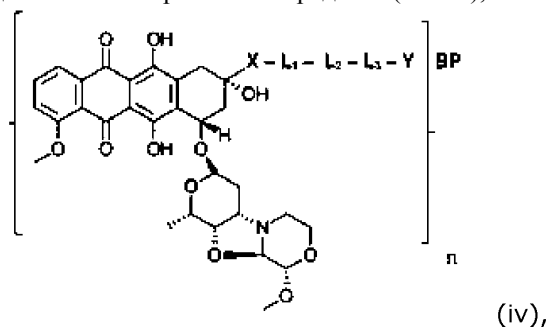
где указанный конъюгат линкера L_1 и линкера L_2 имеет формулу (v)



где волнистая линия $\sim$ показывает соединение с указанным производным антрациклина формулы (v), где m представляет собой целое число не меньше 1 и не больше 11, а n представляет собой целое чис-

ло не меньше 1 и не больше 21.

5. Конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC), имеющий следующую формулу:



где L_1 представляет собой алкиленаминовый линкер,

L_2 представляет собой олигоглициновый пептидный линкер (Gly_n),

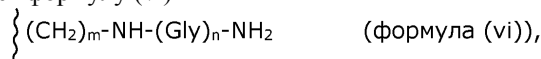
а L_3 представляет собой аминокислотные остатки 1-4 пентапептидного мотива распознавания фермента сортазы, лишённого С-концевого остатка глицина,

где два из L_1 - L_3 являются обязательными, и где линкер X отсутствует, а линкер Y отсутствует или состоит из по меньшей мере одной и по большей мере 20 аминокислот между С-концевым аминокислотным остатком связывающего белка и мотивом распознавания фермента сортазы, L_3 ,

BP представляет собой связывающий белок,

n представляет собой целое число не меньше 1 и не больше 10,

и где линкер L_2 соединен с производным антрациклина формулы (iv) посредством линкера L_1 , где линкер L_1 соединен с карбокси-концом линкера L_2 с помощью амидной связи, где указанный конъюгат линкера L_1 и линкера L_2 имеет формулу (vi)



где волнистая линия $\{$ показывает соединение с указанным производным антрациклина формулы (vi), где m представляет собой целое число не меньше 1 и не больше 11, а n представляет собой целое число не меньше 1 и не больше 21.

6. Конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) по п.4, отличающийся тем, что L_3 выбран из TXPL, SXPL и TXAL, где X - любая из 20 пептидогенных аминокислот.

7. Конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) по п.4, отличающийся тем, что L_3 непосредственно соединен с С-концом связывающего белка.

8. Конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) по п.4, отличающийся тем, что L_3 соединен с С-концом связывающего белка.

9. Конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) по п.4, отличающийся тем, что линкер Y представляет собой любую цепь аминокислот, имеющую вплоть до 20 аминокислот, обеспечивающую оптимальную конъюгацию связывающего белка с L_3 .

10. Конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) по п.9, отличающийся тем, что линкер Y представляет собой линкер из 5 аминокислот, расположенный между С-концом легкой цепи иммуноглобулина и L_3 .

11. Конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) по п.10, отличающийся тем, что линкер Y имеет аминокислотную последовательность GGGGS.

12. Конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) по любому из пп.4 и 6-11, отличающийся тем, что линкерная структура содержит пептидный мотив, который является результатом специфического расщепления мотива распознавания фермента сортазы.

13. Конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) по п.12, отличающийся тем, что указанный мотив распознавания фермента сортазы содержит пентапептид.

14. Конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) по п.12 или 13, отличающийся тем, что указанный мотив распознавания фермента сортазы содержит по меньшей мере одну из следующих аминокислотных последовательностей: LPXTG, LPXSG и/или LAXTG.

15. Конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) по любому из пп.4 и 6-14, отличающийся тем, что производное антрациклина (PNU) конъюгирует с помощью одного или нескольких линкеров с карбокси-концом связывающего белка.

16. Конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) по любому из пп.4 и 6-15, отличающийся тем, что связывающий белок конъюгирует с свободным амино-концом олигоглицинового пептида (Gly_n) с помощью амидной связи.

17. Конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) по любому из пп.4 и 6-16, отличающийся тем, что связывающий белок представляет собой по меньшей мере один белок, выбранный из группы, состоящей из антитела, формата модифицированного антитела, производного или фрагмента антитела, связывающего белка на основе антитела, олигопептидного связующего и/или миметика анти-

тела.

18. Конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) по любому из пп.4 и 6-17, отличающийся тем, что связывающий белок связывается по меньшей мере с одним объектом, выбранным из группы, состоящей из

рецептора,
антигена,
фактора роста,
цитокина и/или
гормона.

19. Конъюгат связывающий белок- лекарственное средство (BPDC) по любому из пп.4 и 6-18, отличающийся тем, что связывающий белок имеет по меньшей мере две субъединицы.

20. Конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) по п.19, отличающийся тем, что по меньшей мере одна субъединица содержит производное антрациклина PNU-159682 по п.1.

21. Конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) по любому из пп.4 и 6-20, отличающийся тем, что связывающий белок связывается с HER-2.

22. Конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) по любому из пп.4 и 6-21, отличающийся тем, что связывающий белок представляет собой антитело, которое связывается с HER-2.

23. Конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) по любому из пп.4 и 6-22, отличающийся тем, что антитело

а) содержит CDR области 1-6 трастузумаба,
б) содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи трастузумаба,
с) имеет идентичность аминокислотной последовательности 90% или выше с областями или доменами из а) или б),
д) представляет собой трастузумаб или его связывающийся с мишенью фрагмент или производное и/или

е) конкурирует с трастузумабом за связывания с Her-2.

24. Конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) по любому из пп.4 и 6-20, отличающийся тем, что связывающий белок связывается с CD30.

25. Конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) по любому из пп.4 и 6-20 или 23, отличающийся тем, что связывающий белок представляет собой антитело, которое связывается с CD30.

26. Конъюгат связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) по любому из пп.4 и 6-20 и 24-25, отличающийся тем, что антитело

а) содержит CDR области 1-6 брентуксимаба,
б) содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи брентуксимаба,
с) имеет идентичность аминокислотной последовательности 90% или выше с областями или доменами из а) или б),
д) представляет собой брентуксимаб или его связывающийся с мишенью фрагмент или производное и/или

е) конкурирует с брентуксимабом за связывания с CD30.

27. Способ получения конъюгата связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) по любому из пп.4 и 6-26, отличающийся тем, что связывающий белок, содержащий мотив распознавания фермента сортазы, конъюгирует с помощью фермента сортазы по меньшей мере с одним конъюгатом производного антрациклина по п.1, который содержит олигоглициновый пептид (Gly_n).

28. Применение конъюгата связывающий белок-лекарственное средство (BPDC) по любому из пп.4 и 6-26 для лечения человека или животного, страдающего от, подвергающегося риску развития и/или имеющего диагноз неопластического заболевания.

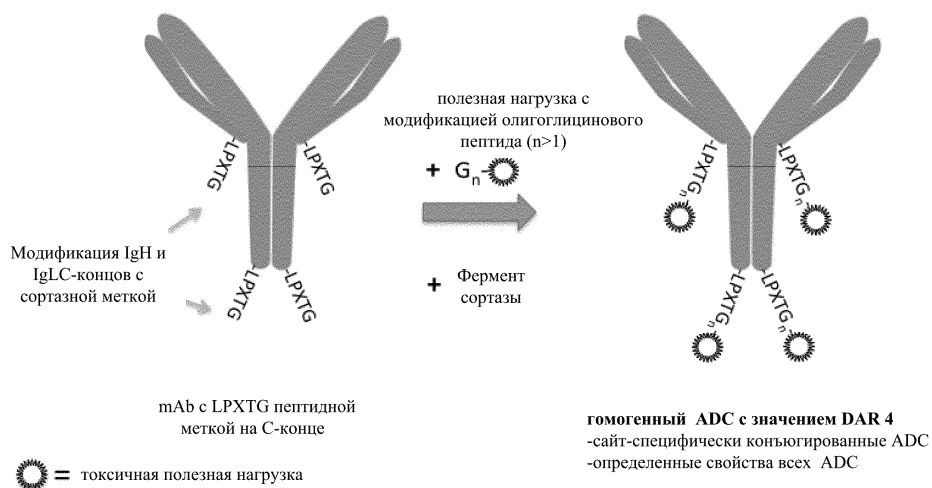
29. Применение по п.28, отличающееся тем, что неопластическое заболевание представляет собой рак, который имеет показатель экспрессии HER-2 1+, 2+ или 3+, как определено с помощью иммуногистохимии или гибридизации *in situ*;

рак, который является CD30-положительным, как определено с помощью иммуногистохимии, ELISA или проточной цитометрии.

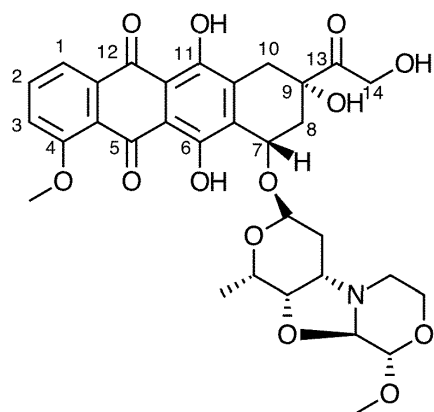
30. Применение по п.29, где рак представляет собой рак молочной железы.

31. Применение по п.29, где рак представляет собой по крайней мере одно из

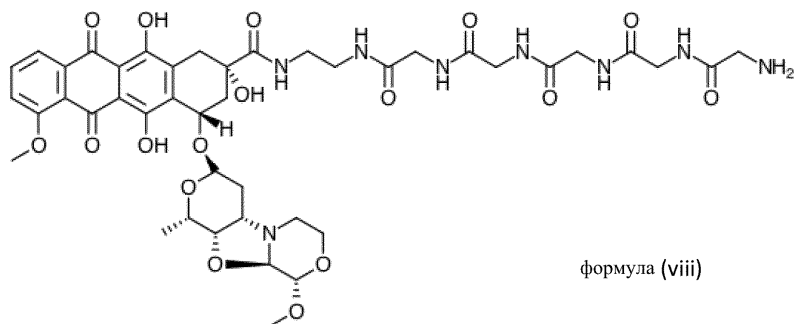
лимфомы,
неходжкинской лимфомы,
системной анапластической крупноклеточной лимфомы (САККЛ).



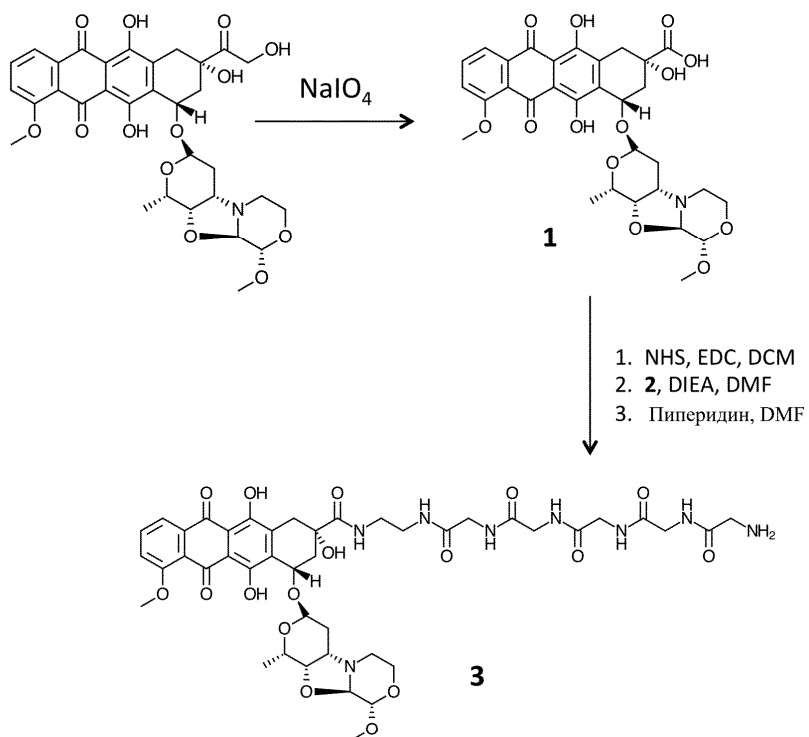
Фиг. 1



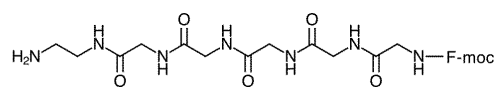
Фиг. 2



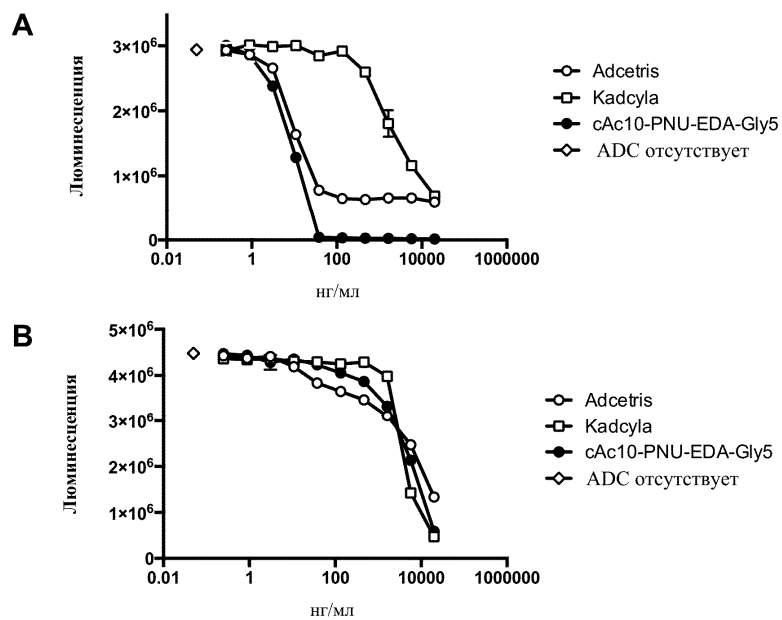
Фиг. 3А

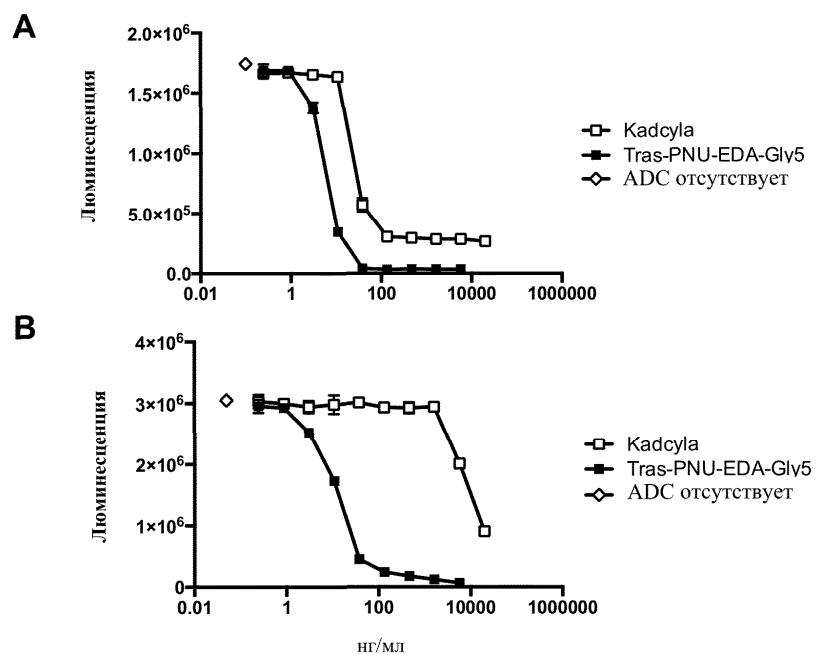


Где **2** соответствует:

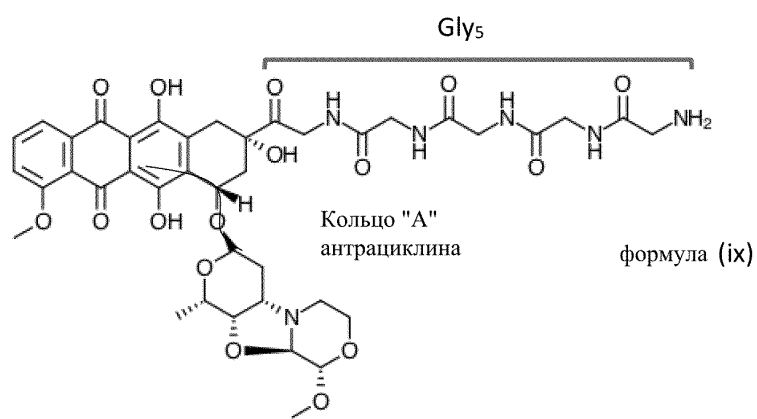
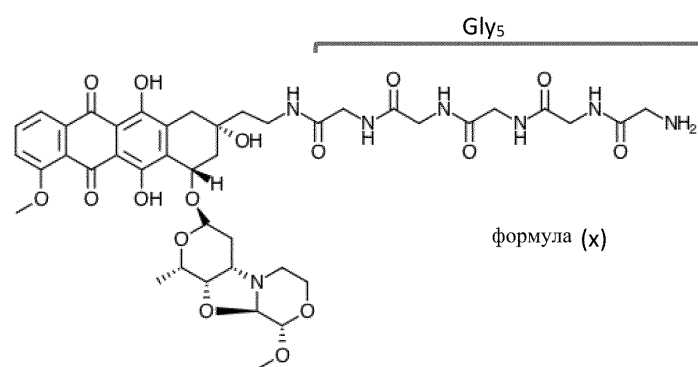


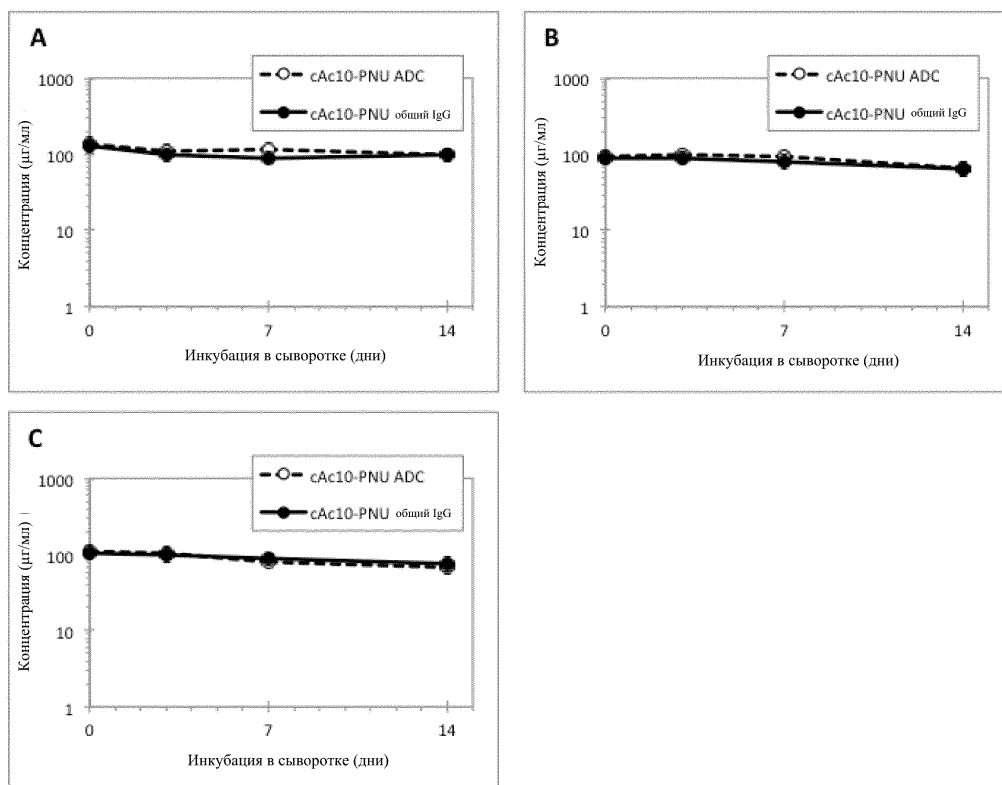
Фиг. 3В



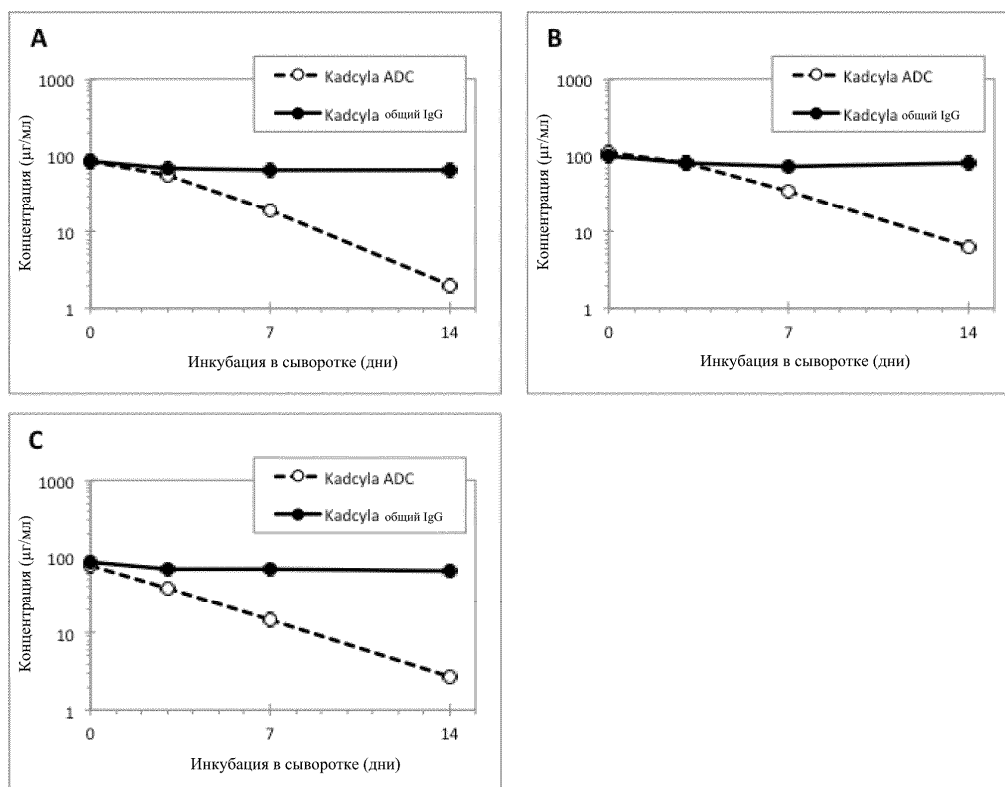


Фиг. 5

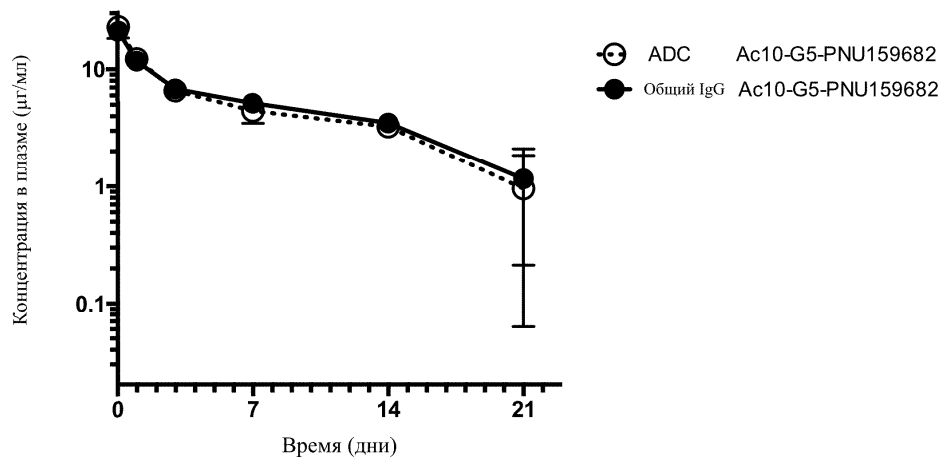
Фиг. 6A: PNU-Gly₅Фиг. 6B: PNU-EA-Gly₅



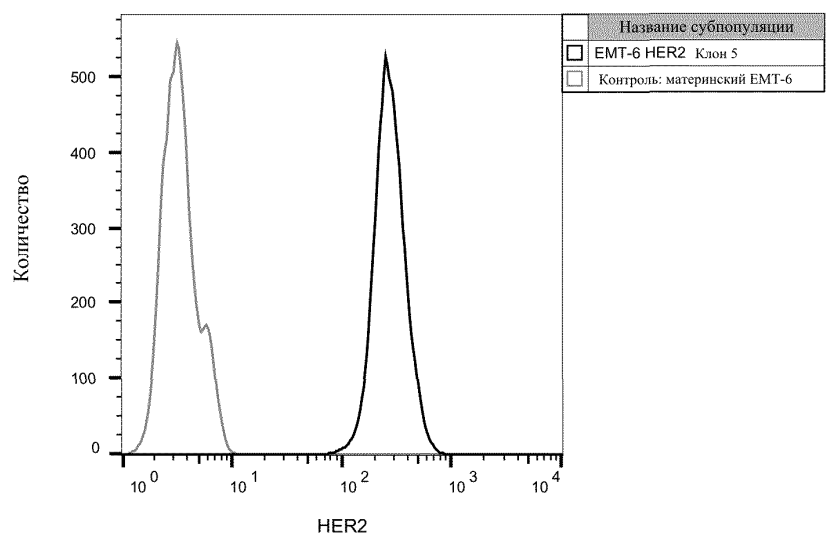
Фиг. 7А



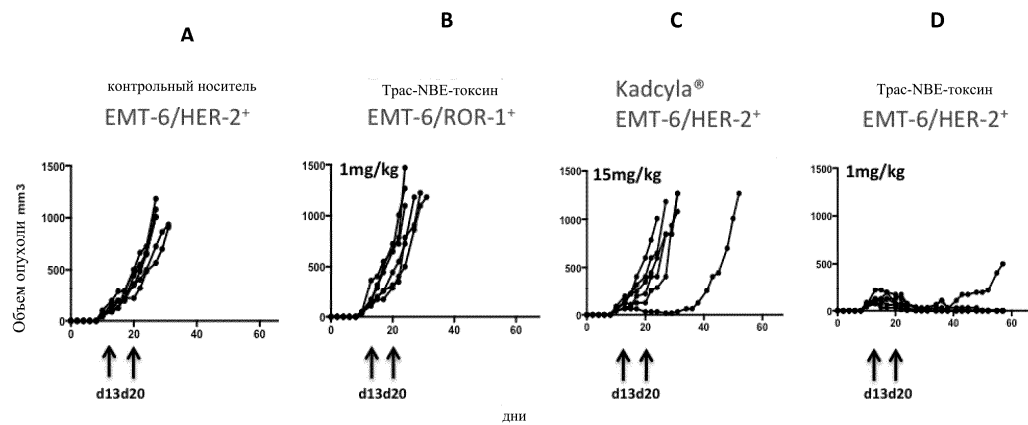
Фиг. 7В



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

Трастузумаб-НС-LPETGGGGG-PNU-токсин

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV
 YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
 VDGEVHNAAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
 YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK**LPETGGGGG-PNU-**
ТОКСИН

Трастузумаб -LC-GGGGS-LPETGGGGG-PNU-токсин

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFVLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPP
 TFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKV
 YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGG**LPETGGGGG-PNU-ТОКСИН**

Фиг. 11А

Брентуксимаб -НС-LPETGGGGG-PNU-токсин

QIQLQQSGPEVVKPGASVKISKASGYFTDYYITWVKQKPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTVDTSSSTAFMQLSSLTSED
 AVYFCANYGNYWFAYWGQGTQVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
 LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
 KFNWYVDGEVHNAAKTPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
 VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK**LPETG**
GGGG-PNU-ТОКСИН

Брентуксимаб -LC-GGGGS-LPETGGGGG-PNU-токсин

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGSYMNWYQQKPGQPPKVLIAASNLESIGIPARFSGSGSGTDFTLNHPVEEEDAATYYC
 QQSNEDPWTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSST
 LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGG**LPETGGGGG-PNU-ТОКСИН**

Фиг. 11В



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2