

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292069** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.09.26

(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.01.08

(54) **САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ
СРЕДСТВО С ПЕПТИДСОДЕРЖАЩИМИ ЛИНКЕРАМИ**

(31) **62/958,916; 63/040,735**

(32) **2020.01.09; 2020.06.18**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/012611**

(87) **WO 2021/142199 2021.07.15**

(71) Заявитель:
**МЕРСАНА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)**

(72) Изобретатель:
**Лаундджер Тимоти Б., Деймелин
Марк И., Тоадер Дорин (US)**

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

(57) Изобретение в целом относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство, содержащим пептидсодержащие линкеры, и к способам применения этих конъюгатов в качестве терапевтических и/или диагностических средств. Также в настоящем документе описаны пептидсодержащие каркасы, пригодные для конъюгирования с целевым компонентом (например, антителом), лекарственным средством или с тем и другим для получения конъюгатов антитело-лекарственное средство.

202292069

A1

A1

202292069

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574979EA/042

САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО С ПЕПТИД-СОДЕРЖАЩИМИ ЛИНКЕРАМИ

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет и преимущество предварительных заявок США №№ 62/958,916, поданной 9 января 2020, и 63/040,735, поданной 18 июня 2020. Содержание каждой из этих заявок настоящим включено посредством ссылки во всей их полноте.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПЕРЕЧНЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

Содержимое текстового файла с именем «MRSN-029_001WO_SeqList.txt», который был создан 6 января 2021 и имеет размер 49 КБ, настоящим полностью включено посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Традиционно, фармацевтические препараты в основном состоят из малых молекул, которые вводят перорально (в виде твердых пилюль и жидкостей) или в виде инъекций. За последние три десятилетия, составы (*m.e.* композиции, которые контролируют путь и/или скорость доставки лекарственного средства и обеспечивают доставку терапевтического агента в то место, где это необходимо) становятся все более распространенными и сложными. Тем не менее, многие вопросы и проблемы, связанные с разработкой новых методов лечения, а также механизмов их применения, еще предстоит решить. Например, многие лекарства обладают ограниченной или иным образом сниженной эффективностью и терапевтическим эффектом, поскольку они либо обычно подвергаются частичной деградации до того, как достигнут желаемой мишени в организме, либо накапливаются в тканях, отличных от мишени, и/или имеют короткий период полужизни.

Таким образом, одной из задач в области систем доставки лекарственных средств является доставка лекарственных средств в неповрежденном виде в специально предназначенные области тела с помощью системы, которая может стабилизировать лекарственное средство и/или продлить период полувыведения и контролировать перенос терапевтического агента *in vivo* с использованием либо физиологических, либо химических механизмов, либо обоих.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство были разработаны в качестве мишень-специфических терапевтических агентов. Антитела против различных антигенов поверхности раковых клеток были конъюгированы с различными цитотоксическими агентами, включая, но не ограничиваясь ими, ингибиторы микротубулина (например, майтанзиноиды, ауристатины и таксаны, см., например, патенты США №№ 5,208,020; 5,416,064; 6,333,410; 6,441,163; 6,340,701; 6,372,738; 6,436,931; 6,596,757; и 7,276,497) и взаимодействующие с ДНК терапевтические агенты (например, калихеамицин, доксорубин и аналоги СС-1065; см., например, патенты США №№ 5,475,092; 5,585,499;

5,846,545; 6,534,660; 6,756,397; и 6,630,579). Конъюгаты антитело-лекарственное средство с некоторыми из этих цитотоксических лекарственных средств активно исследуются в клинике для лечения рака (см., например, Ricart, A. D., and Tolcher, A. W., 2007, *Nature Clinical Practice*, 4, 245-255; Krop et al., 2010, *J. Clin. Oncol.*, 28, 2698-2704). Однако существующие конъюгаты антитело-лекарственное средство имеют ограничения. Основным ограничением является их неспособность доставить достаточную концентрацию лекарственного средства в сайт-мишень из-за ограниченного числа таргетируемых антигенов и/или относительно умеренной цитотоксичности противораковых лекарственных средств, таких как ауристатины, метотрексат, даунорубицин, майтансиноиды, таксаны и винкристин. Один из подходов к достижению значительной цитотоксичности заключается в связывании большого количества молекул лекарственного средства прямо или косвенно с антителом. Однако такие сильно модифицированные антитела часто демонстрируют ухудшенное связывание с антигеном-мишенью и/или быстрый клиренс из кровотока *in vivo*. Следовательно, существует потребность в улучшении способности доставлять достаточную концентрацию лекарственного средства в мишень, чтобы достичь максимальной цитотоксичности для лекарственного средства.

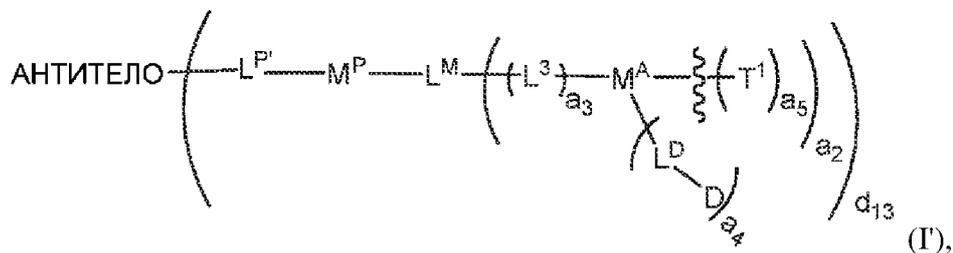
Конъюгация группы лекарственного средства с антителом через ковалентные связи обычно приводит к гетерогенной смеси молекул, где группы лекарственного средства присоединены на нескольких сайтах на антителе. В некоторых вариантах осуществления, цитотоксические лекарственные средства обычно конъюгируют с антителами через лизиновые или цистеиновые остатки антитела, тем самым создавая гетерогенную смесь конъюгата антитело-лекарственное средство. В зависимости от условий реакции, гетерогенная смесь обычно содержит от 0 до примерно 8 групп лекарственного средства, присоединенных к различным участкам антитела. Аналитические и препаративные способы являются недостаточными для разделения и характеристики этих молекул видов конъюгата антитело-лекарственное средство в гетерогенной смеси, образующейся в результате реакции конъюгации. Кроме того, процесс конъюгации может быть невозпроизводимым из-за трудностей контроля условий реакции. Следовательно, существует потребность в воспроизводимом получении конъюгатов антитело-лекарственное средство с сайт-специфичностью (относительно сайта конъюгации в антителе) и/или стехиометрией (относительно соотношения между антителом и лекарственным средством).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем описании представлены конъюгаты антитело-лекарственное средство с сайт-специфичностью. Эти сайт-специфические конъюгаты таргетная группа-лекарственное средство демонстрируют контролируемую лекарственную нагрузку, а также сильное связывание с антигеном-мишенью. В некоторых вариантах осуществления, таргетная группа представляет собой молекулу распознавания на основе белка (PBRM). В настоящем изобретении также представлен пептидсодержащий каркас, используемый для

конъюгирования с PBRM, лекарственным средством или обоими, чтобы получить конъюгат таргетная группа-лекарственное средство.

В некоторых аспектах, настоящее описание предлагает конъюгат антитело-лекарственное средство формулы (I):



в которой

a_2 представляет собой целое число от 1 до 3;

a_3 представляет собой целое число от 0 до 1;

a_4 представляет собой целое число от 1 до примерно 5;

a_5 представляет собой целое число от 1 до 3;

d_{13} представляет собой целое число от 1 до примерно 12;

АНТИТЕЛО представляет собой модифицированное антитело;

$\text{L}^{\text{P}'}$ представляет собой двухвалентную линкерную группу, соединяющую модифицированное антитело с M^{P} ; в котором соответствующая одновалентная группа L^{P} включает функциональную группу W^{P} , которая способна образовывать ковалентную связь с функциональной группой модифицированного антитела;

M^{P} представляет собой вставку;

L^{M} представляет собой связь, или трехвалентный или четырехвалентный линкер, и когда L^{M} представляет собой связь, a_2 равно 1, когда L^{M} представляет собой трехвалентный линкер, a_2 равно 2, или когда L^{M} представляет собой четырехвалентный линкер, a_2 равно 3;

L^{3} представляет собой карбонилсодержащую группу;

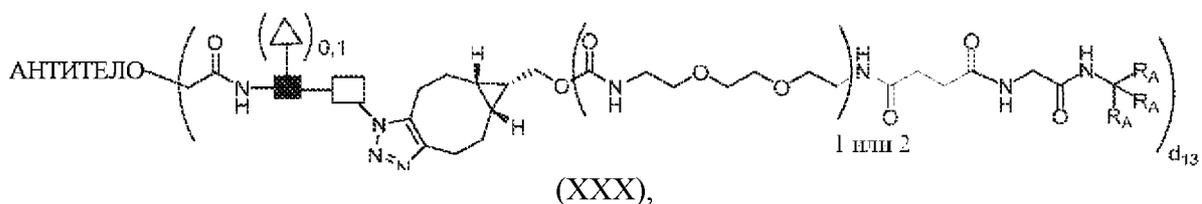
M^{A} содержит пептидную группу, которая содержит, по меньшей мере, две аминокислоты;

T^{1} представляет собой гидрофильную группу, и  между T^{1} и M^{A} обозначает прямое или не прямое присоединение T^{1} и M^{A} ;

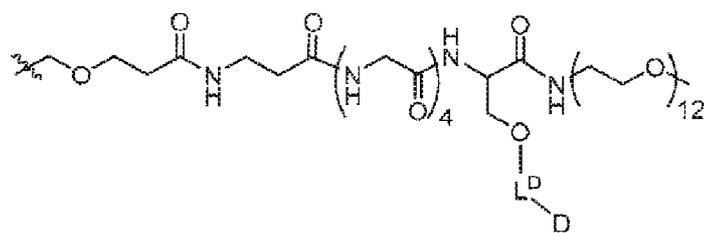
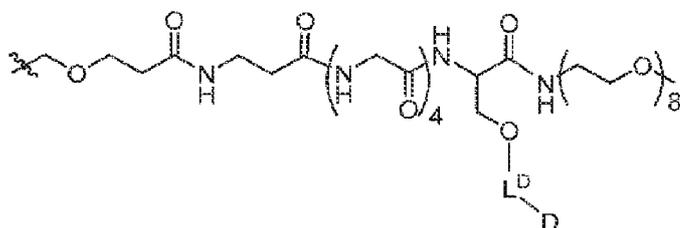
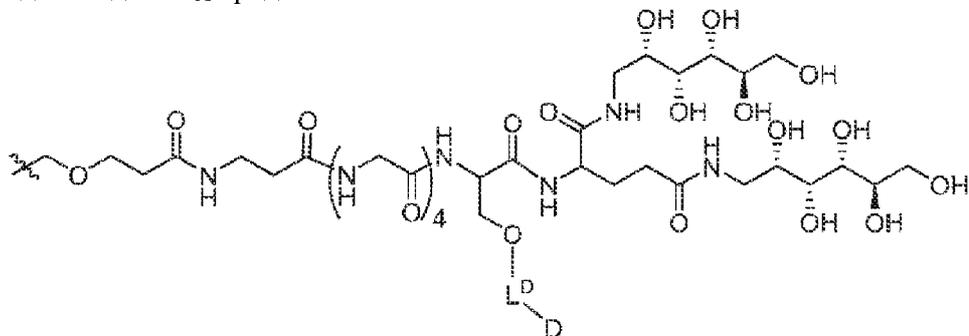
каждый случай D независимо представляет собой терапевтический агент, имеющий молекулярную массу \leq примерно 5 кДа; и

каждый случай L^{D} независимо представляет собой двухвалентную линкерную группу, соединяющую D с M^{A} и содержит, по меньшей мере, одну расщепляемую связь, так что при разрыве связи D высвобождается в активной форме для предполагаемого терапевтического эффекта.

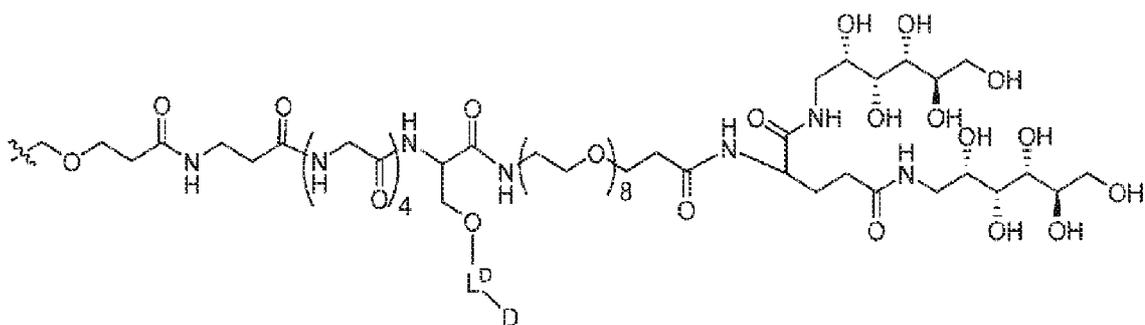
В некоторых аспектах, настоящее описание предлагает конъюгат антитело-лекарственное средство формулы (XXX):



где каждый R_A представляет собой



; или



;

где d_{13} равно 2; и антитело содержит одну или несколько групп аспарагина в положении N297, соединенных с остальной частью конъюгата.

В описании также предложены композиции, включающие конъюгаты, способы их получения и способы их применения для лечения различных заболеваний, включая, но не ограничиваясь ими, рак.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтической композиции, содержащей каркас или конъюгат, описанные в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способу получения конъюгата антитело-лекарственное средство.

В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к способу получения конъюгата антитело-лекарственное средство, включающему одну или несколько стадий, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к конъюгату или способу, где эффективное количество конъюгата вводят субъекту в дозе примерно от 7 мг/м^2 до 162 мг/м^2 в первый день лечения и каждые три недели или четыре недели после этого.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способу лечения нарушения (например, рака) у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способу лечения рака, экспрессирующего NaPi2b, у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание предлагает применение конъюгата, описанного в настоящем документе, при производстве лекарственного средства для лечения нарушения (например, рака) у субъекта, нуждающегося в этом.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание предлагает применение конъюгата, описанного в настоящем документе, в производстве лекарственного средства для лечения рака, экспрессирующего NaPi2b, у субъекта, нуждающегося в этом.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание предлагает применение конъюгата, описанного в настоящем документе, для лечения нарушения (например, рака) у нуждающегося в этом субъекта.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание предлагает применение конъюгата, описанного в настоящем документе, для лечения рака, экспрессирующего NaPi2b, у субъекта, нуждающегося в этом.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание предлагает конъюгат для применения при лечении нарушения (например, рака) у субъекта, нуждающегося в этом, включая введение субъекту эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание предлагает конъюгат для применения при лечении рака, экспрессирующего NaPi2b, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание относится к способу

диагностики нарушения у субъекта с подозрением на нарушение. Способ включает введение эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем документе, субъекту с подозрением на нарушение, или проведение анализа для обнаружения антигена/рецептора-мишени в образце, взятом у субъекта, чтобы определить, экспрессирует ли субъект антиген или рецептор-мишень.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится данное изобретение. В спецификации, формы единственного числа также включают множественное число, если контекст явно не указывает иное. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут быть использованы при практическом применении или тестировании настоящего изобретения, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, упомянутые в настоящем документе, включены посредством ссылки. Приведенные в настоящем документе ссылки не считаются предшествующим уровнем техники заявленного изобретения. В случае конфликта, настоящая спецификация, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

Другие признаки и преимущества изобретения будут очевидны из следующего подробного описания и формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На ФИГ. 1 представлен график, показывающий различные гликоформы гликана антитела (G0, G1, G2, G0F, GIF, G2F и M5).

На ФИГ. 2 представлена схема, показывающая дегликозилирование смеси гликоформ G0, G1, G2, G0F, GIF, G2F и M5 в присутствии эндогликозидазы.

На ФИГ. 3 представлена схема, показывающая процесс получения азидо-модифицированного антитела, где промежуточное антитело, содержащее концевую группу GlcNAc, взаимодействует с молекулой азидо-модифицированного производного UDP-GalNAc в присутствии гликозилтрансферазы.

На ФИГ. 4 представлена схема, показывающая вариант осуществления процесса получения азидо-модифицированного антитела.

На ФИГ. 5 представлена схема, показывающая вариант осуществления процесса получения конъюгата антитело-лекарственное средство, где азидо-модифицированное антитело конъюгировано с группой линкер-лекарственное средство, содержащей напряженную циклоалкинильную группу.

На ФИГ. 6 представлен график, показывающий модифицированное антитело.

На ФИГ. 7 представлен график, показывающий противоопухолевую эффективность конъюгатов ХМТ-1535 антитело-лекарственное средство, конъюгата **11** в дозе 0,05 мг/кг или 0,1 мг/кг полезной нагрузки, конъюгата **7** в дозе 0,025 мг/кг, 0,05 мг/кг или 0,1 мг/кг полезной нагрузки и несвязывающего контрольного конъюгата **10** в дозе 0,1 мг/кг

полезной нагрузки на модели мышей с опухолью OVCAR3.

На ФИГ. 8 представлен график, показывающий противоопухолевую эффективность конъюгатов ХМТ-1535 антитело-лекарственное средство, конъюгата **7** в дозе 0,025 мг/кг, 0,05 мг/кг или 0,1 мг/кг полезной нагрузки и несвязывающего контрольного конъюгата **10** в дозе 0,05 мг/кг или 0,1 мг/кг полезной нагрузки в модели мышей NSCLC PDX CTG-0852.

На ФИГ. 9 представлен график, показывающий противоопухолевую эффективность конъюгатов HER2 антитело-лекарственное средство, конъюгата **9** и конъюгата **13**, в дозе 0,067 мг/кг и 0,199 мг/кг полезной нагрузки в модели мышей с опухолью JIMT-1.

На ФИГ. 10 представлен график, показывающий противоопухолевую эффективность конъюгатов HER2 антитело-лекарственное средство, конъюгата **8** и конъюгата **12**, каждого в дозах 0,017 мг/кг, 0,033 мг/кг или 0,067 мг/кг полезной нагрузки и несвязывающего контрольного конъюгата антитело-лекарственное средство. Конъюгат **10** в дозе 0,067 мг/кг полезной нагрузки в модели мышей с опухолью JIMT-1.

На ФИГ. 11-18 показано повышение токсикологических параметров (AST, ALT, ALP, RBC, WBC, нейтрофилов, лимфоцитов и гемоглобина, соответственно) у крыс в ответ на воздействие конъюгата **11** или конъюгата **7**.

На ФИГ. 19-21 показано повышение ключевых токсикологических параметров (AST, ALT и ALP, соответственно) у крыс в ответ на воздействие конъюгата **8** или конъюгата **12**.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В настоящем изобретении предложены новые конъюгаты таргетная группа-лекарственное средство, каркасы для получения конъюгатов, синтетические способы получения конъюгатов или каркасов, фармацевтические композиции, содержащие каркасы и/или конъюгаты, и их различные применения.

Определения

В некоторых вариантах осуществления, соединения по настоящему изобретению и определения конкретных функциональных групп также описаны в настоящем документе более подробно. Для целей настоящего описания, химические элементы идентифицированы в соответствии с Периодической таблицей элементов, версия CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75th Ed., внутренняя обложка, и конкретные функциональные группы обычно определяются, как описано там. Кроме того, общие принципы органической химии, а также конкретные функциональные группы и реакционная способность описаны в "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Кроме того, специалисту в данной области техники должно быть понятно, что в описанных в настоящем документе способах синтеза используется множество защитных групп.

Использование артиклей «a», «an» и «the» как в последующем описании, так и в формуле изобретения должно толковаться как охватывающее как единственное, так и

множественное число, если иное не указано в настоящем документе или явно не противоречит контексту. Термины «содержащий», «имеющий», «имеющий», например, «имеющий химическую формулу», «включающий» и «содержащий» должны толковаться как открытые термины (т. е. означающие «включающий, но не ограниченный»), если не указано иное, и допускают, но не требуют включения дополнительных элементов или стадий. В некоторых вариантах осуществления, каркас определенной формулы включает все компоненты, указанные в формуле, и также может включать дополнительный компонент, не указанный в формуле. Кроме того, всякий раз, когда в варианте осуществления используется «содержащий» или другой открытый термин, следует понимать, что тот же вариант осуществления может быть сформулирован в более узком смысле с использованием промежуточного термина «состоящий по существу из» или закрытого термина «состоящий из».

Используемые в настоящем документе выражения «один или несколько из А, В или С», «один или несколько А, В или С», «один или несколько из А, В и С», «один или несколько А, В и С» и подобные используют взаимозаменяемо, и все они относятся к выбору из А, В и/или С, т.е. одного или нескольких А, одного или нескольких В, одного или нескольких С или любой их комбинации.

Термин «примерно», «приблизительно» или «приблизительно», когда он используется в связи с числовым значением, означает, что включен набор или диапазон значений. Например, «примерно X» включает диапазон значений, который составляет $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0,5\%$, $\pm 0,2\%$ или $\pm 0,1\%$ от X, где X является числовым значением.

Перечисление диапазонов значений просто предназначено для использования в качестве сокращенного способа ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в диапазон, если в настоящем документе не указано иное, и каждое отдельное значение включено в спецификацию, как если бы оно было указано в настоящем документе отдельно. Используемый в настоящем документе диапазон, если не указано иное, включает два предела диапазона. Например, выражения «x представляет собой целое число от 1 до 6» и «x представляет собой целое число 1-6» оба означают «x равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6», т. е. термины «от X до Y» и «диапазон от X до Y, включая X и Y и целые числа между ними».

«Защитная группа»: используемый в настоящем документе термин «защитная группа» означает, что конкретная функциональная группа, например, O, S или N, временно заблокирована, так что реакцию можно проводить селективно в другом реакционноспособном сайте в многофункциональном соединении. Как подробно описано в настоящем документе, могут быть использованы защитные группы кислорода, серы, азота и углерода. В некоторых вариантах осуществления, могут быть использованы типовые защитные группы кислорода. В некоторых вариантах осуществления, используются защитные группы азота. В некоторых вариантах осуществления, могут быть использованы типовые защитные группы серы. Кроме того, различные защитные группы

описаны в “Protective Groups in Organic Synthesis” Third Ed. Greene, T.W. and Wuts, P.G., Eds., John Wiley & Sons, New York: 1999, полное содержание которых настоящим включено посредством ссылки.

«Уходящая группа» относится к молекулярному фрагменту, который уходит с парой электронов при гетеролитическом расщеплении связи. Уходящие группы могут быть анионами или нейтральными молекулами. Уходящие группы включают, но не ограничены ими, галогениды, такие как Cl^- , Br^- и I^- , сложные эфиры сульфоновой кислоты, такие как пара-толуолсульфонат («тозилат», TsO^-) и RC(O)O^- , где R представляет собой H, алифатическую, гетероалифатическую, карбоциклическую или гетероциклоалкильную группу.

«Сахар» относится к моносахариду, например глюкозе (Glc), галактозе (Gal), маннозе (Man) и фукозе (Fuc). Термин «производное сахара» относится к производному моносахаридного сахара, т.е. моносахаридному сахару, содержащему заместители и/или функциональные группы. Примеры производного сахара включают, но не ограничены ими, аминсахара и сахарные кислоты. Примеры производного сахара также включают соединения, обозначаемые как $\text{S}'(\text{F}')_{x_1}$, где S' представляет собой сахар или производное сахара, F' представляет собой функциональную группу, и x_1 указывает количество функциональных групп.

Термин «группа ядро-GlcNAc», используемый в настоящем документе, относится к моносахаридной, полисахаридной или олигосахаридной группе, содержащей GlcNAc (например, ядро-GlcNAc), которая присоединена к антителу (например, через положение C1 GlcNAc). В некоторых вариантах осуществления, GlcNAc присоединен к антителу через N-гликозидную связь с атомом азота амида в боковой цепи аспарагиновой аминокислоты антитела. В некоторых вариантах осуществления, группа ядро-GlcNAc присутствует в нативном сайте гликозилирования антитела или вводится в другой сайт антитела. В некоторых вариантах осуществления, группа ядро-GlcNAc представляет собой моносахарид (например, группа ядро-GlcNAc также представляет собой группу конец-GlcNAc). В некоторых вариантах осуществления, группа ядро-GlcNAc дополнительно содержит фукозу, например, группа ядро-GlcNAc представляет собой дисахаридную группу ядро-GlcNAc-(α 1-6-Fuc) (которая может обозначаться как GlcNAc(Fuc)). Таким образом, когда антитело содержит группу ядро-GlcNAc, антитело может содержать моносахаридную или дисахаридную группу ядро-GlcNAc, и группа ядро-GlcNAc может дополнительно содержать фукозу (например, дисахаридную группу ядро-GlcNAc(Fuc)). Если группа ядро-GlcNAc дополнительно содержит фукозу, фукоза может быть связана α -1,6 с O-6 группы ядро-GlcNAc. Группа ядро-GlcNAc, дополнительно содержащая фукозу, может называться ядро-GlcNAc(Fuc).

Термин «ядро-GlcNAc» относится к внутреннему GlcNAc, который представляет собой часть полисахарида или олигосахиарида, где полисахарид или олигосахарид присоединен к антителу через внутренний GlcNAc.

Термин «группа конец-GlcNAc», используемый в настоящем документе,

относится к группе, содержащей GlcNAc, которая присоединена к антителу и имеет концевую функциональную группу, доступную для дальнейшей модификации (например, с соединением Р"-S"-А"). В некоторых вариантах осуществления, группа конец-GlcNAc дополнительно содержит фукозу. В некоторых вариантах осуществления, группа конец-GlcNAc образуется путем взаимодействия группы ядро-GlcNAc гликопротеина (например, гликана антитела) с эндогликозидазой.

«**Нуклеотид**» используется в его обычном научном значении и относится к молекуле, состоящей из нуклеинового основания, пятиуглеродного сахара (либо рибозы, либо 2-дезоксирибозы) и одной, двух или трех фосфатных групп. Без фосфатной группы, нуклеиновое основание и сахар составляют нуклеозид. Таким образом, нуклеотид также может называться нуклеозидмонофосфатом, нуклеозиддифосфатом или нуклеозидтрифосфатом. Нуклеотидным основанием может быть аденин, гуанин, цитозин, урацил или тимин.

«**Белок**» используется в его обычном научном значении и включает полипептиды, содержащие примерно 10 или более аминокислот. Белок может содержать природные или неприродные аминокислоты.

«**Гликопротеин**» используется в настоящем документе в его обычном научном значении и относится к белку, содержащему одну или несколько моносахаридных или олигосахаридных цепей («гликанов»), ковалентно связанных с белком. Гликан может быть присоединен к гидроксильной группе белка (О-связанный гликан), к амидной функциональной группе белка (N-гликопротеин) или к углероду белка (С-гликопротеин). Гликопротеин может содержать более одного гликана, может содержать комбинацию одного или нескольких моносахаридных и одного или нескольких олигосахаридных гликанов, и может содержать комбинацию N-, О- и С-связанных гликанов. Подсчитано, что более 50% всех белков имеют ту или иную форму гликозилирования и поэтому квалифицируются как гликопротеины.

«**Гликан**» используется в настоящем документе в его обычном научном значении и относится к моносахаридной или олигосахаридной цепи, которая связана с белком. Таким образом, гликан относится к углеводной части гликопротеина. Гликан присоединен к белку через С-1 углерод одного сахара, который может быть без дополнительной замены (моносахарид) или может быть дополнительно замещен на одной или нескольких его гидроксильных группах (олигосахарид). Встречающийся в природе гликан обычно содержит от 1 до примерно 10 сахаридных групп. Однако, когда более длинная сахаридная цепь связана с белком, указанная сахаридная цепь также считается гликаном. Гликан гликопротеина может представлять собой моносахарид. Гликан также может представлять собой олигосахарид. Олигосахаридная цепь гликопротеина может быть линейной или разветвленной. В олигосахариде, сахар, непосредственно присоединенный к белку, называется коровым сахаром. В олигосахариде, сахар, который не присоединен непосредственно к белку и присоединен, по меньшей мере, к двум другим сахарам, называется внутренним сахаром. В олигосахариде, сахар, который не присоединен

непосредственно к белку, но к одному другому сахару, т. е. не несет дополнительных сахарных заместителей на одной или нескольких своих других гидроксильных группах, называется концевым сахаром. Во избежание сомнений, в олигосахариде гликопротеина может существовать несколько концевых сахаров, но только один коровый сахар. Гликан может быть О-связанным гликаном, N-связанным гликаном или С-связанным гликаном. В разъединенном гликане, моносахаридный или олигосахаридный гликан связан с атомом С в аминокислоте белка.

«Гликозилтрансфераза» относится к суперсемейству ферментов, которые участвуют в синтезе сложных углеводов, присутствующих на гликопротеинах и гликолипидах.

«N-ацетилгалактозаминилтрансфераза» (GalNAc-T) представляет собой фермент N-ацетил-D-галактозаминилтрансферазы, который катализирует присоединение N-ацетил-D-галактозамина к белкам.

В настоящем документе, термин «биосовместимый» предназначен для описания соединений, которые вызывают минимальное разрушительное действие или ответ хозяина при контакте с жидкостями или живыми клетками или тканями. Таким образом, *биосовместимая группа*, используемая в настоящем документе, относится к алифатической, циклоалкильной, гетероалифатической, гетероциклоалкильной, арильной или гетероарильной группе, которая подпадает под определение термина *биосовместимая*, как определено выше и в настоящем документе. Термин «биосовместимость», используемый в настоящем документе, также означает, что соединения проявляют минимальные взаимодействия с распознающими белками, *например*, встречающимися в природе антителами, клеточными белками, клетками и другими компонентами биологических систем, если такие взаимодействия не являются особенно желательными. Таким образом, вещества и функциональные группы, специально предназначенные для того, чтобы вызвать указанные выше минимальные взаимодействия, *например*, лекарственные средства и пролекарства, считаются биосовместимыми. В некоторых вариантах осуществления, (за исключением соединений, которые должны быть цитотоксическими, таких как, например, противоопухолевые агенты), соединения являются «биосовместимыми», если их добавление к нормальным клеткам *in vitro* в концентрациях, сходных с предполагаемыми системными концентрациями *in vivo*, приводит к меньше или равно 1% гибели клеток в течение времени, эквивалентного периоду полужизни соединения *in vivo* (*например*, периоду времени, необходимому для элиминации/клиренса 50% соединения, вводимого *in vivo*), и их введение *in vivo* вызывает минимальное и приемлемое с медицинской точки зрения воспаление, реакцию на инородное тело, иммунотоксичность, химическую токсичность и/или другие подобные побочные эффекты. В приведенном выше предложении, термин «нормальные клетки» относится к клеткам, которые не предназначены для разрушения или иного значительного воздействия тестируемого соединения.

«Биоразлагаемый»: Используемый в настоящем документе термин

«биоразлагаемые» соединения или группы представляют собой такие, которые при поглощении клетками могут быть расщеплены лизосомным или другим химическим механизмом или гидролизом на компоненты, которые клетки могут либо повторно использовать, либо избавляться от них без выраженного токсического действия на клетки. Используемый в настоящем документе термин «биорасщепляемый» имеет то же значение, что и «биоразлагаемый». Биоразложение некоторых конъюгатов (или их компонентов, например, пептидсодержащих каркасов и линкеров между каркасами и антителом или молекулой лекарственного средства) также может усиливаться внеклеточно, *например*, в областях с низким рН тела животного, *например*, воспаленной области, в непосредственной близости от активированных макрофагов или других клеток, высвобождающих факторы, способствующие деградации. Целостность описанных в настоящем документе конъюгатов или каркасов может быть измерена, например, с помощью эксклюзионной ВЭЖХ или ЖХ/МС. Хотя более быстрая деградация может быть, в некоторых случаях, предпочтительнее, в целом может быть более желательным, чтобы описанные в настоящем документе конъюгаты или каркасы разлагались в клетках со скоростью, не превышающей скорость метаболизма или выведения их фрагментов клетками. В некоторых вариантах осуществления, побочные продукты биоразложения конъюгатов или каркасов, описанных в настоящем документе, являются биосовместимыми.

«Гидрофильный»: Термин «гидрофильный» по существу не отличается от общепринятого значения этого термина в данной области техники и обозначает химические группы, которые содержат ионизируемые, полярные или поляризуемые атомы или которые иным образом могут быть сольватированы молекулами воды. Таким образом, *гидрофильная часть или группа*, используемые в настоящем документе, относятся к алифатической, циклоалкильной, гетероалифатической, гетероциклоалкильной, арильной или гетероарильной группе, которые подпадают под определение термина *гидрофильная*, как определено выше. Гидрофильность соединений (включая лекарственные средства, конъюгаты и каркасы), описанных в настоящем документе, может быть непосредственно измерена посредством определения энергии гидратации, определяемой путем исследования между двумя жидкими фазами, с помощью ХГВ хроматографии или путем хроматографии на твердых фазах с известной гидрофобностью.

«Полисахарид», «углевод» или «олигосахарид»: Термины «полисахарид», «углевод» или «олигосахарид» известны в данной области техники и обычно относятся к веществам, имеющим химическую формулу $(C_nH_{2n}O)_n$, где обычно $n > 2$, и их производным. Углеводы представляют собой полигидроксиальдегиды или полигидроксикетоны, или превращаются в такие вещества путем простых химических превращений, таких как гидролиз, окисление или восстановление. Эти циклические единицы (моносахариды) могут быть соединены друг с другом с образованием молекул с небольшим количеством (олигосахариды) или большим количеством (полисахариды) моносахаридных единиц. Часто углеводы с четко определенным числом, типом и положением моносахаридных

единиц называют олигосахаридами, тогда как углеводы, состоящие из смесей молекул с переменным количеством и/или расположением моносахаридных единиц, называют полисахаридами. Термины «полисахарид», «углевод» и «олигосахарид» используются в настоящем документе взаимозаменяемо. Полисахарид может включать природные сахара и/или производные встречающихся в природе сахаров.

«Лекарственное средство»: Используемый в настоящем документе термин «лекарственное средство» относится к соединению, которое является биологически активным и обеспечивает желаемый физиологический эффект после введения нуждающемуся в этом субъекту (*например*, активному фармацевтическому ингредиенту).

«Пролекарство»: Используемый в настоящем документе термин «пролекарство» относится к предшественнику активного лекарственного средства, то есть к соединению, которое может быть превращено в активное лекарственное средство. Обычно такое пролекарство подвергают обработке *in vivo*, которая превращает лекарственное средство в физиологически активную форму. В некоторых случаях, пролекарство само по себе может оказывать желаемый физиологический эффект. Желаемый физиологический эффект может быть, например, терапевтическим, цитотоксическим, иммуномодулирующим или подобным.

«Цитотоксический»: Используемый в настоящем документе термин «цитотоксический» означает токсичный для клеток или выбранной клеточной популяции (*например*, раковых клеток). Токсический эффект может привести к гибели и/или лизису клеток. В некоторых вариантах осуществления, токсический эффект может представлять собой сублетальное разрушающее действие на клетку, *например*, замедление или остановку роста клеток. Для достижения цитотоксического эффекта, лекарственное средство или пролекарство может представлять собой агент, повреждающий ДНК, агент, разрушающий микротрубочки, или цитотоксический белок или полипептид, среди прочего.

«Цитостатический»: Используемый в настоящем документе термин «цитостатический» относится к лекарственному средству или другому соединению, которое ингибирует или останавливает рост и/или размножение клеток.

«Малая молекула»: Используемый в настоящем документе термин «малая молекула» относится к молекулам природного или искусственного происхождения (*например*, с помощью химического синтеза), которые имеют относительно низкую молекулярную массу. В некоторых вариантах осуществления, малые молекулы являются биологически активными в том смысле, что они оказывают местное или системное действие на животных (*например*, млекопитающих; людей). В некоторых вариантах осуществления, малая молекула представляет собой лекарственное средство, и малая молекула упоминается как «молекула лекарственного средства», «лекарственное средство» или «терапевтический агент». В некоторых вариантах осуществления, молекула лекарственного средства имеет ММ меньше или равную примерно 5 кДа (*например*, меньше или равную примерно 1,5 кДа). В некоторых вариантах осуществления, молекула

лекарственного средства выбрана из соединений, найденных в “Pharmaceutical Substances: Syntheses, Patents, Applications” by Axel Kleemann and Jurgen Engel, Thieme Medical Publishing, 1999 и “Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals”, Edited by Susan Budavari et al., CRC Press, 1996, оба которых включены сюда посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления, лекарственное средство, используемое в настоящем описании, представляет собой терапевтический агент, обладающий антипролиферативной (цитостатической и/или цитотоксической) активностью в отношении клетки-мишени или пути.

«Активная форма» относится к форме соединения, которая проявляет предполагаемую фармацевтическую эффективность *in vivo* или *in vitro*. В частности, когда молекула лекарственного средства, предназначенная для доставки конъюгатом по описанию, высвобождается из конъюгата, активной формой может быть само лекарственное средство или его производные, которые проявляют предполагаемые терапевтические свойства. Высвобождение лекарственного средства из конъюгата может быть достигнуто за счет расщепления биоразлагаемой связи линкера, которая прикрепляет лекарственное средство к каркасу или конъюгату по описанию.

«Диагностическая метка»: Используемый в настоящем документе термин *диагностическая метка* относится к атому, группе атомов, фрагменту или функциональной группе, нанокристаллу или другому дискретному элементу композиции вещества, который может быть обнаружен *in vivo* или *ex vivo* с использованием аналитических способов, известных в данной области техники. При связывании с конъюгатом по описанию, такие диагностические метки позволяют проводить мониторинг конъюгата *in vivo*. Альтернативно или дополнительно, конструкции и композиции, которые включают диагностические метки, можно использовать для мониторинга биологических функций или структур.

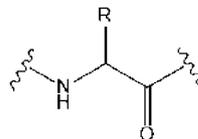
«Животное»: Термин *животное*, используемый в настоящем документе, относится к людям, а также к животным, отличным от человека, на любой стадии развития, включая, например, млекопитающих, птиц, рептилий, земноводных, рыб, червей и отдельные клетки. В некоторых вариантах осуществления, животным, отличным от человека, является млекопитающее (*например*, грызун, мышь, крыса, кролик, обезьяна, собака, кошка, примат или свинья). Животное может быть трансгенным животным или клоном человека. Термин «субъект» охватывает животных.

«Эффективное количество»: В целом, когда речь идет об активном агенте или устройстве для доставки лекарственного средства, термин *«эффективное количество»* относится к количеству, необходимому для получения желаемого биологического ответа. Как будет понятно специалистам в данной области техники, эффективное количество агента или устройства может варьироваться в зависимости от таких факторов, как желаемая биологическая конечная точка, доставляемый агент, состав инкапсулирующей матрицы, ткань-мишень, *и т.д.*

«Природная аминокислота», как используется в настоящем документе, относится

к любой из распространенных природных L-аминокислот, встречающихся в природных белках, или к их стереоизомеру. Если не указано иное, ссылка на аминокислоту включает саму аминокислоту и ее стереоизомеры.

«Аминокислота неприродного происхождения», как используется в настоящем документе, относится к любой аминокислоте, которая не является природной аминокислотой. Она включает, например, аминокислоты, которые содержат α -, β -, γ -, D-, L-аминоацильные остатки. В более общем смысле аминокислота неприродного



происхождения содержит остаток общей формулы , в которой боковая цепь R отличается от боковых цепей аминокислоты, встречающейся в природе.

«Алкил» сам по себе или как часть другого термина, используемого в настоящем документе, относится к замещенному или незамещенному линейному или разветвленному, насыщенному или ненасыщенному углеводороду, имеющему указанное число атомов углерода (например, «-C₁₋₈алкил» или «- C₁₋₁₀алкил» относится к алкильной группе, имеющей от 1 до 8 или от 1 до 10 атомов углерода, соответственно). Если число атомов углерода не указано, алкильная группа имеет от 1 до 8 атомов углерода. В некоторых вариантах осуществления, алкильная группа является незамещенной. Алкильная группа может быть замещена одной или несколькими группами. В некоторых вариантах осуществления, алкильная группа будет насыщенной.

«Алкилен» сам по себе или как часть другого термина, используемого в настоящем документе, относится к замещенному или незамещенному насыщенному или ненасыщенному углеводородному радикалу с разветвленной или прямой или циклической цепью с указанным числом атомов углерода, обычно 2-10 атомов углерода, и имеющему два одновалентных радикальных центра, полученных удалением двух атомов водорода от одного и того же или двух разных атомов углерода исходного алкана. В некоторых вариантах осуществления, алкилен представляет собой углеводород с разветвленной или прямой цепью (т.е. он не является циклическим углеводородом). В любом из вариантов осуществления, представленных в настоящем документе, алкилен может представлять собой насыщенный алкилен.

«Арил» сам по себе или как часть другого термина, используемого в настоящем документе, означает замещенный или незамещенный одновалентный карбоциклический ароматический углеводородный радикал, содержащий 6-20 атомов углерода (например, 6-14 атомов углерода), полученный удалением одного атома водорода из одного атома углерода исходной ароматической кольцевой системы. Некоторые арильные группы представлены в типовых структурах как «Ar».

«Арилен» сам по себе или как часть другого термина, используемого в настоящем документе, представляет собой арильную группу, как определена выше, в которой один из атомов водорода арильной группы заменен связью (т.е. он является двухвалентным) и

может находиться в орто, мета- или пара-ориентации.

В некоторых вариантах осуществления, например, когда многофункциональный линкер или единица лекарственного средства содержит арилен, арилен представляет собой арильную группу, определенную выше, в которой один или два атома водорода арильной группы заменены связью (т.е. арилен может быть двухвалентным или трехвалентным).

«Гетероцикл» сам по себе или как часть другого термина, используемого в настоящем документе, относится к одновалентной замещенной или незамещенной ароматической («гетероарил») или неароматической («гетероциклоалкил») моноциклической, бициклической, трициклической или тетрациклической кольцевой системе, имеющей определенное количество (например, от 3 до 8 или C_{3-8}) атомов углерода (также называемых членами кольца) и от одного до четырех гетероатомных членов кольца, независимо, N, O, P или S, полученной удалением одного атома водорода от кольцевого атома исходной кольцевой системы. Один или несколько атомов N, S или P в гетероцикле могут быть окислены. Кольцо, которое включает гетероатом, может быть ароматическим или не ароматическим. Если не указано иное, гетероцикл присоединен к боковой группе на любом гетероатоме или атоме углерода, что приводит к стабильной структуре.

« Гетероцикло» или **«гетероцикло-»** в настоящем контексте относится к гетероциклической группе (например, C_{3-8} гетероциклу), определенной выше, в которой один или несколько дополнительных атомов водорода гетероцикла заменены связью (т.е. он является многовалентным, например, двухвалентным или трехвалентным). В некоторых вариантах осуществления, когда гидрофильная группа, многофункциональный линкер или группа линкер-лекарственное средство содержит гетероцикло, гетероцикло представляет собой гетероциклическую группу, определенную выше, в которой один или два атома водорода в гетероциклической группе заменены связью (т.е. гетероцикло может быть двухвалентной или трехвалентной).

«Карбоцикл» сам по себе или как часть другого термина, когда он используется в настоящем документе, является одновалентной, замещенной или незамещенной, ароматической («арил») или насыщенной или ненасыщенной неароматической («циклоалкил»), моноциклической, бициклической, трициклической или тетрациклической карбоциклической кольцевой системе, имеющей определенное количество (например, от 3 до 8 или C_{3-8}) атомов углерода (также называемых членами кольца), полученной путем удаления одного атома водорода из атома кольца исходной кольцевой системы. Карбоцикл может быть 3-, 4-, 5-, 6-, 7- или 8-членным.

«Карбоцикло» или **«Карбоцикло-»** сами по себе или как часть другого термина, когда они используются в настоящем документе, относятся к C_{3-8} карбоциклической группе, определенной выше, в которой другой из атомов водорода карбоциклической группы заменен связью (т.е. является двухвалентным). В некоторых вариантах осуществления, например, когда гидрофильная группа, многофункциональный линкер или

линкер-лекарственное средство содержит карбоцикло, карбоцикло представляет собой карбоциклическую группу, определенную выше, в которой один или два атома водорода карбоциклической группы заменены связью (т.е. карбоцикло может быть двухвалентным или трехвалентным).

«**Гетероалкил**» сам по себе или в сочетании с другим термином, используемый в настоящем документе, означает, если не указано иное, стабильный углеводород с прямой или разветвленной цепью или их комбинации, полностью насыщенный или содержащий от 1 до 3 степеней ненасыщенности, состоящий из указанного числа атомов углерода и от одного до десяти (например, от одного до трех, гетероатомы O, N, Si или S), и где атомы азота и серы могут быть необязательно окислены, и гетероатом азота может быть необязательно кватернизован. Гетероатом(ы) O, N и S могут находиться в любом внутреннем положении гетероалкильной группы или в положении, в котором алкильная группа присоединена к остальной части молекулы. Гетероатом Si может быть помещен в любое положение гетероалкильной группы, включая положение, в котором алкильная группа присоединена к остальной части молекулы. В некоторых вариантах осуществления, до двух гетероатомов могут быть последовательными. В некоторых вариантах осуществления, C₁₋₄ гетероалкил или гетероалкилен имеет от 1 до 4 атомов углерода и 1 или 2 гетероатома, и C₁₋₃ гетероалкил или гетероалкилен имеет от 1 до 3 атомов углерода и 1 или 2 гетероатома. В некоторых вариантах осуществления, гетероалкил или гетероалкилен являются насыщенными.

«**Гетероалкилен**» сам по себе или как часть другого заместителя, когда он используется в настоящем документе, означает двухвалентную группу, полученную из гетероалкила (как обсуждалось выше), как представлено -CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂- и -CH₂-S-CH₂-CH₂-NH-CH₂-. Для гетероалкиленовых групп, гетероатомы также могут занимать один или оба конца цепи. Кроме того, для алкиленовых и гетероалкиленовых связующих групп, ориентация связующей группы не подразумевается. В некоторых вариантах осуществления, например, когда гидрофильная группа, многофункциональный линкер или линкер-лекарственное средство содержит гетероалкилен, гетероалкилен представляет собой гетероалкильную группу, определенную выше, в которой один или два атома водорода гетероалкильной группы заменены связью (т.е. гетероалкилен может быть двухвалентным или трехвалентным).

«**Необязательно замещенный**» при использовании в настоящем документе означает, что химическая группа (такая как алкил, гетероалкил, карбоцикл и гетероцикл и т. д.) либо замещена, либо не замещена. Если не указано иное, химические группы, описанные в настоящем документе, необязательно замещены. Когда химическая группа замещена, один или несколько атомов водорода каждый независимо замещены заместителем. Типовые заместители включают, но не ограничены ими, -X', -R', -O, -OR', -SR', -S⁻, -N(R')₂, -N(R')₃, =NR', -C(X')₃, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, -NR'C(=O)R', -C(=O)R', -C(=O)N(R')₂, -SO₃⁻, -SO₃H, -S(=O)₂R', -OS(=O)₂OR', -S(=O)₂NR', -S(=O)R', -OP(=O)(OR')₂, -P(=O)(OR')₂, -PO₃⁻, -PO₃H₂, -AsO₂H₂, -C(=O)R', -

$C(=O)X'$, $-C(=S)R'$, $-CO_2R'$, $-CO_2^-$, $-C(=S)OR'$, $-C(=O)SR'$, $-C(=S)SR'$, $-C(=O)N(R')$, $-C(=S)N(R')$ или $-C(=NR')N(R')$, где каждый X' независимо представляет собой галоген: $-F$, $-Cl$, $-Br$ или $-I$, и каждый R' независимо представляет собой $-H$, $-C_{1-20}$ алкил, $-C_{6-20}$ арил, $-C_3-C_{14}$ гетероцикл, защитную группу или часть пролекарства. Типовые заместители также включают оксо ($=O$).

«Группа линкер-лекарственное средство», как используется в настоящем документе, относится к не таргетирующей (например, не антителу) части группы конъюгата, описанного в настоящем документе. Линкерный компонент группы линкер-лекарственное средство имеет механизм высвобождения, который упоминается как высвобождаемая сборочная единица, расположенная между многофункциональным линкером и единицей лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления, группа линкер-лекарственное средство представляет собой часть конъюгата, не относящуюся к антителу (например, не таргетирующую).

«Многофункциональный линкер», используемый в настоящем документе, относится к линкеру, который соединяет одну или несколько гидрофильных групп, одну или несколько единиц лекарственного средства и таргетную группу (например, антитело) с образованием конъюгата или каркаса, как описано в настоящем документе. Соединение этих компонентов с многофункциональным линкером может быть как параллельным, так и последовательным. В некоторых вариантах осуществления, многофункциональный линкер содержит пептидную группу между таргетной группой и гидрофильной группой, где пептидная группа включает, по меньшей мере, две аминокислоты. В других вариантах осуществления, многофункциональный линкер не обязательно должен содержать пептидную группу, по меньшей мере, из двух аминокислот, когда гидрофильная группа представляет собой многоатомный спирт или его производное. В других вариантах осуществления, многофункциональный линкер не обязательно должен содержать пептидную группу, по меньшей мере, из двух аминокислот, когда гидрофильная группа представляет собой глюкозиламин, диглюкозиламин, триглюкозиламин или его производное.

«Свободное лекарственное средство», используемое в настоящем документе, относится к биологически активной форме группы лекарственного средства, которая не связана ковалентно ни прямо, ни косвенно с гидрофильной группой или с продуктом разложения лигандной единицы. Свободное лекарственное средство может относиться к лекарственному средству, как он существует сразу после отщепления от многофункционального линкера посредством механизма высвобождения, который обеспечивается высвобождаемой сборочной единицей в группе линкер-лекарственное средство, или до последующего внутриклеточного превращения или метаболизма. В некоторых вариантах осуществления, свободное лекарственное средство будет иметь форму $H-D$ или может существовать в виде заряженной группы. В некоторых вариантах осуществления, фармакологически активный вид может не являться исходным лекарственным средством и может включать линкерный компонент, посредством

которого лекарственное средство соединяется с таргетной группой, которая не подвергалась последующему внутриклеточному метаболизму.

Гидрофобность может быть измерена с помощью clogP, или clogP определяется как log коэффициента разделения октанол/вода (включая неявные атомы водорода) и может быть рассчитана с использованием программы MOETM от Chemical Computing group (значения clogP рассчитаны с использованием Wildman, S.A., Crippen, G.M.; Prediction of Physicochemical Parameters by Atomic Contributions; J. Chem. Inf. Comput. Sci. 39 No. 5 (1999) 868-873).

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание предлагает композицию конъюгата таргетная группа-лекарственное средство, содержащую совокупность конъюгатов таргетная группа-лекарственное средство. Конъюгат таргетная группа-лекарственное средство содержит единицу таргетной группы и несколько присоединенных к нему групп линкер-лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления, имеется в среднем от примерно 2 до примерно 12, от примерно 2 до примерно 10, от примерно 2 до примерно 8, от примерно 2 до примерно 6, от примерно 2 до примерно 4 или от примерно 1 до примерно 2 групп линкер-лекарственное средство (например, d_{13} формулы (I)) на таргетную группу в конъюгате. Примером присоединения к конкретным сайтам таргетной группы является модификация таргетной группы N-гликана, чтобы он содержал азидогруппу, кетогруппу или алкинильную группу.

Настоящее описание предназначено для включения всех изотопов атомов, встречающихся в настоящих соединениях (например, изотопов водорода и изотопов углерода).

Соединение, каркас или конъюгат по настоящему описанию могут существовать более чем в одной изомерной форме. Понятно, что когда в настоящем документе описывается соединение, каркас или конъюгат, описание относится ко всем изомерам соединения, каркаса или конъюгата. Такое описание относится, где применимо, к региоизомерам, оптическим изомерам и таутомерным изомерам. Оптические изомеры включают энантиомеры и диастереомеры, хиральные изомеры и не хиральные изомеры. Оптические изомеры включают выделенные оптические изомеры, а также смеси оптических изомеров, включая рацемические и не рацемические смеси. Изомер может находиться в выделенной форме или в смеси с одним или несколькими другими изомерами. Если не указано иное, любое соединение, каркас или конъюгат, описанные в настоящем документе, относятся к каждому изомеру соединения, каркаса или конъюгата или любой их смеси. Когда соединение, каркас или конъюгат изображаются как конкретный изомер, подразумевается, что настоящее описание не ограничивается этим конкретным изомером, но может относиться к конкретному изомеру как к необязательному варианту осуществления.

Соединение, каркас или конъюгат по настоящему описанию могут существовать в виде цис- и/или транс-изомеров. Если не указано иное, любое соединение, каркас или конъюгат, описанные в настоящем документе, относятся к цис-изомеру или транс-изомеру

соединения, каркаса или конъюгата, а также к любой их смеси. Когда соединение, каркас или конъюгат изображаются как цис- или транс-изомер, подразумевается, что настоящее описание не ограничивается этим конкретным цис- или транс-изомером, но может относиться к конкретному цис- или транс-изомеру в качестве необязательного варианта осуществления.

Соединение, каркас или конъюгат по настоящему описанию могут существовать в виде региоизомеров. Если не указано иное, любое соединение, каркас или конъюгат, описанные в настоящем документе, относятся к каждому региоизомеру соединения, каркаса или конъюгата или любой их смеси. Когда соединение, каркас или конъюгат изображаются как конкретный региоизомер, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается этим конкретным региоизомером, но может относиться к конкретному региоизомеру как к необязательному варианту осуществления. Перечисление или изображение соединения, каркаса или конъюгата по настоящему описанию без конкретного обозначения стереоконфигурации, или с таким обозначением менее чем всех хиральных центров, предназначено для охвата таких необозначенных хиральных центров, рацемата, рацемических смесей, каждого отдельного энантиомера, смеси диастереоизомеров и каждого отдельного диастереомера соединения, где такие формы возможны благодаря наличию одного или нескольких центров асимметрии.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство и каркасы

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание предлагает конъюгат антитело-лекарственное средство с сайт-специфичностью. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат является биоразлагаемым и биосовместимым и/или обладает высокой лекарственной нагрузкой и сильным связыванием с антигеном-мишенью.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание предлагает конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащему таргетную группу (например, антитело) и одну или несколько групп линкер-лекарственное средство, где таргетная группа ковалентно связана с одним или несколькими фрагментами линкер-лекарственное средство.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание предлагает каркас, используемый для конъюгирования с таргетной группой (например, антителом) с образованием конъюгата, описанного в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, таргетная группа представляет собой антитело.

В некоторых аспектах, настоящее описание предлагает конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащее таргетную группу (например, антитело) и одну или несколько групп линкер-лекарственное средство, ковалентно связанных с таргетной группой, где:

каждая группа линкер-лекарственное средство содержит многофункциональный линкер, который соединяет таргетную группу с одной или несколькими единицами лекарственного средства (например, одним или несколькими терапевтическими агентами

(D)) посредством высвобождаемой сборочной единицы для каждой единицы лекарственного средства, и соединяет гидрофильную группу с единицей лекарственного средства каждой группы линкер-лекарственное средство;

высвобождаемая сборочная единица способна высвобождать свободное лекарственное средство вблизи сайта-мишени, таргетируемого таргетной группой; и

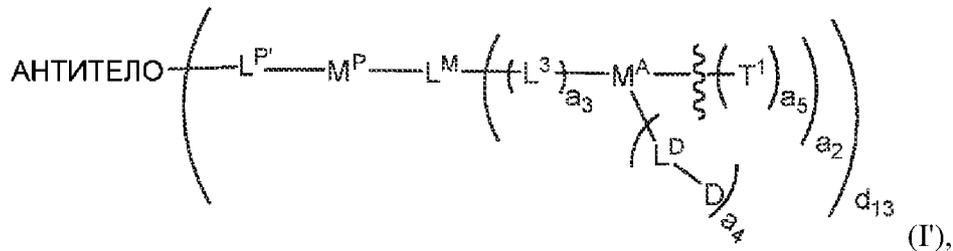
многофункциональный линкер содержит пептидную группу между таргетной группой и гидрофильной группой, где пептидная группа содержит, по меньшей мере, две аминокислоты.

В некоторых аспектах, настоящее описание предлагает конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащее таргетную группу (например, антитело) и одну или несколько групп линкер-лекарственное средство, ковалентно связанных с таргетной группой, где:

каждая группа линкер-лекарственное средство содержит многофункциональный линкер, который соединяет таргетную группу с одной или несколькими единицами лекарственного средства (например, одним или несколькими терапевтическими агентами (D)) посредством высвобождаемой сборочной единицы для каждой единицы лекарственного средства, и соединяет гидрофильную группу с единицами лекарственного средства каждой группы линкер-лекарственное средство; и

высвобождаемая сборочная единица способна высвобождать свободное лекарственное средство вблизи сайта-мишени, таргетируемого таргетной группой.

В некоторых аспектах, настоящее описание предлагает конъюгат антитело-лекарственное средство формулы (I):



где

a_2 представляет собой целое число от 1 до 3;

a_3 представляет собой целое число от 0 до 1;

a_4 представляет собой целое число от 1 до примерно 5;

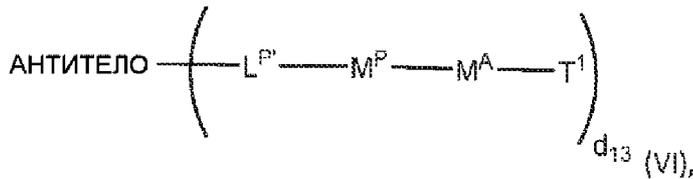
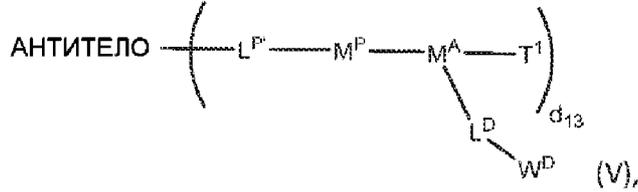
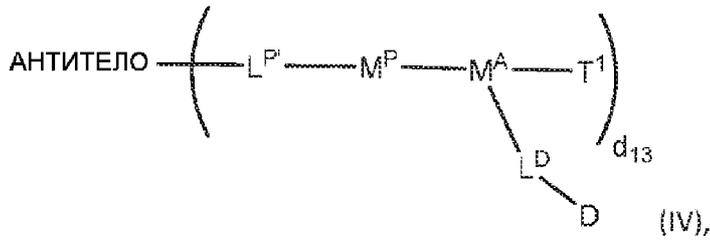
a_5 представляет собой целое число от 1 до 3;

d_{13} представляет собой целое число от 1 до примерно 12;

АНТИТЕЛО представляет собой модифицированное антитело;

$\text{L}^{\text{P}'}$ представляет собой двухвалентную линкерную группу, соединяющую модифицированное антитело с M^{P} ; в котором соответствующая одновалентная группа $\text{L}^{\text{P}'}$ включает функциональную группу W^{P} , которая способна образовывать ковалентную связь с функциональной группой модифицированного антитела;

M^{P} представляет собой вставку;



где

a_2 представляет собой целое число от 1 до 3;

a_3 представляет собой целое число от 0 до 1;

a_4 представляет собой целое число от 1 до примерно 5;

a_5 представляет собой целое число от 1 до 3;

d_{13} представляет собой целое число от 1 до примерно 12;

АНТИТЕЛО представляет собой модифицированное антителио;

$\text{L}^{\text{P}'}$ представляет собой двухвалентную линкерную группу, соединяющую модифицированное антителио с M^{P} ; в котором соответствующая одновалентная группа $\text{L}^{\text{P}'}$ включает функциональную группу $\text{W}^{\text{P}'}$, которая способна образовывать ковалентную связь с функциональной группой модифицированного антителиа;

M^{P} представляет собой вставку;

L^{M} , если присутствует, представляет собой связь, или трехвалентный или четырехвалентный линкер, и когда L^{M} представляет собой связь (т.е. двухвалентный линкер), a_2 равно 1, когда L^{M} представляет собой трехвалентный линкер, a_2 равно 2, или когда L^{M} представляет собой четырехвалентный линкер, a_2 равно 3;

L^3 представляет собой карбонилсодержащую группу;

M^{A} содержит пептидную группу, которая содержит, по меньшей мере, две аминокислоты;

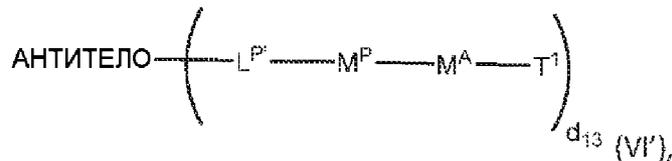
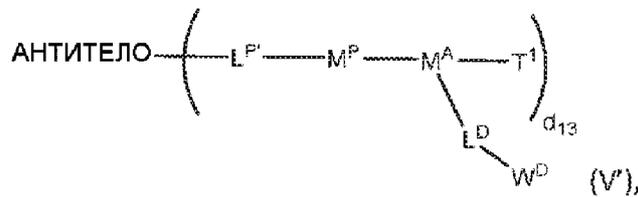
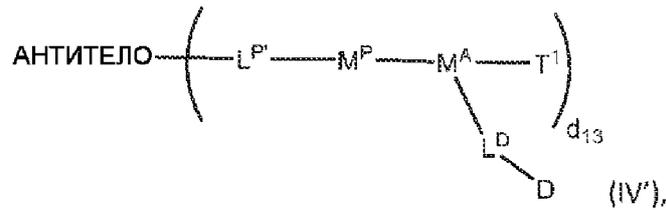
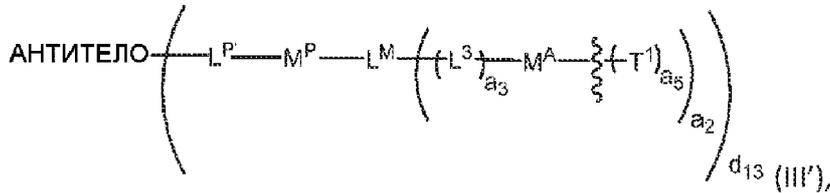
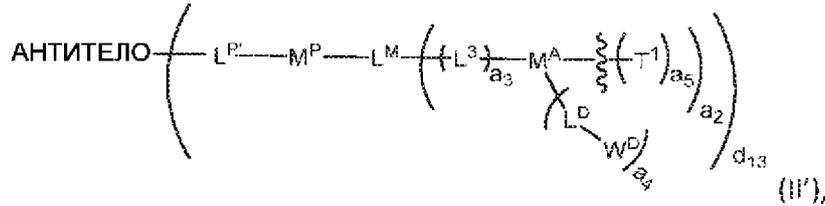
T^1 представляет собой гидрофильную группу, и  между T^1 и M^{A} обозначает прямое или не прямое присоединение T^1 и M^{A} ;

каждый случай W^{D} , если присутствует, независимо представляет собой функциональную группу, которая способна образовывать ковалентную связь с функциональной группой терапевтического агента («D»), имеющего молекулярную массу

≤ примерно 5 кДа; и

каждый случай L^D независимо представляет собой двухвалентную линкерную группу, соединяющую W^D или D с M^A , и L^D содержит, по меньшей мере, одну расщепляемую связь, так что при разрыве связи D высвобождается в активной форме для предполагаемого терапевтического эффекта.

В некоторых аспектах, настоящее описание предлагает изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство формулы (IV') или каркасу любой из формул (II')-(III') и (V')-(VI'):



где

a_2 представляет собой целое число от 1 до 3;

a_3 представляет собой целое число от 0 до 1;

a_4 представляет собой целое число от 1 до примерно 5;

a_5 представляет собой целое число от 1 до 3;

d_{13} представляет собой целое число от 1 до примерно 12;

АНТИТЕЛО представляет собой модифицированное антитело;

L^P представляет собой двухвалентную линкерную группу, соединяющую модифицированное антитело с M^P ; в котором соответствующая одновалентная группа L^P включает функциональную группу W^P , которая способна образовывать ковалентную связь

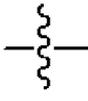
с функциональной группой модифицированного антитела;

M^P представляет собой вставку;

L^M , если присутствует, представляет собой связь, или трехвалентный или четырехвалентный линкер, и когда L^M представляет собой связь (т.е. двухвалентный линкер), a_2 равно 1, когда L^M представляет собой трехвалентный линкер, a_2 равно 2, или когда L^M представляет собой четырехвалентный линкер, a_2 равно 3;

L^3 представляет собой карбонилсодержащую группу;

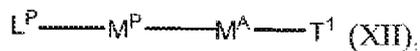
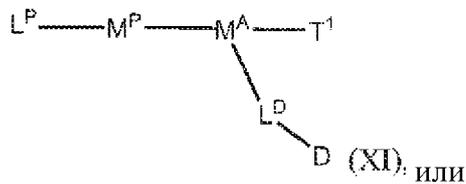
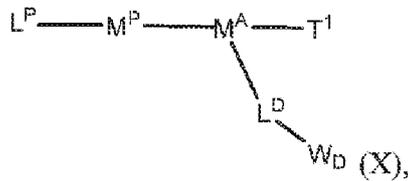
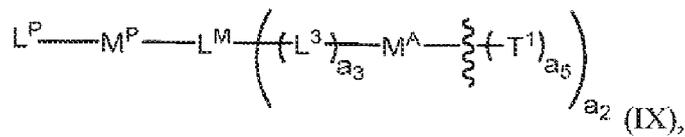
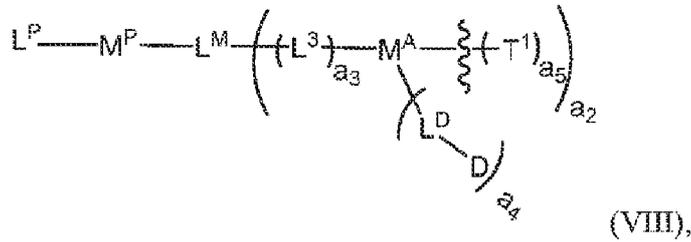
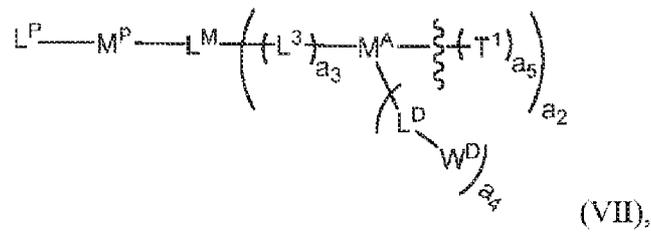
M^A содержит пептидную группу, которая содержит, по меньшей мере, две аминокислоты;

T^1 представляет собой гидрофильную группу, и  между T^1 и M^A обозначает прямое или не прямое присоединение T^1 и M^A ;

каждый случай W^D , если присутствует, независимо представляет собой функциональную группу, которая способна образовывать ковалентную связь с функциональной группой терапевтического агента («D»), имеющего молекулярную массу \leq примерно 5 кДа; и

каждый случай L^D независимо представляет собой двухвалентную линкерную группу, соединяющую W^D или D с M^A , и L^D содержит, по меньшей мере, одну расщепляемую связь, так что при разрыве связи D высвобождается в активной форме для предполагаемого терапевтического эффекта.

В некоторых аспектах, настоящее изобретение относится к пептид-содержащему каркасу любой из формул (VII)-(XII):



где

a_2 представляет собой целое число от 1 до 3;

a_3 представляет собой целое число от 0 до 1;

a_4 представляет собой целое число от 1 до примерно 5;

a_5 представляет собой целое число от 1 до 3;

L^P представляет собой одновалентную линкерную группу, которая включает функциональную группу W^P , которая способна образовывать ковалентную связь с функциональной группой модифицированного антителя;

M^P представляет собой вставку;

L^M , если присутствует, представляет собой связь, или трехвалентный или четырехвалентный линкер, и когда L^M представляет собой связь (т.е. двухвалентный линкер), a_2 равно 1, когда L^M представляет собой трехвалентный линкер, a_2 равно 2, или когда L^M представляет собой четырехвалентный линкер, a_2 равно 3;

L^3 представляет собой карбонилсодержащую группу;

M^A содержит пептидную группу, которая содержит, по меньшей мере, две

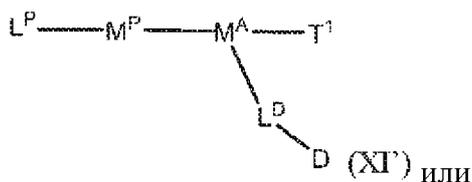
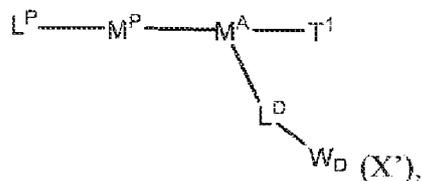
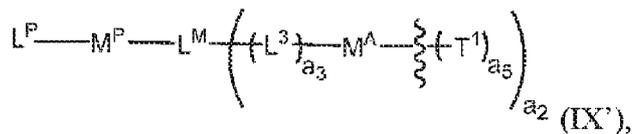
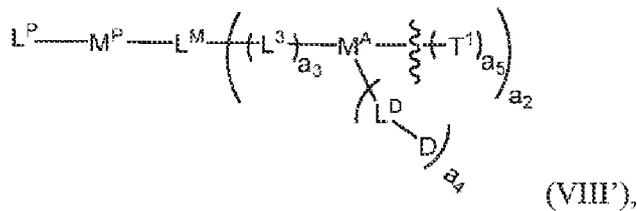
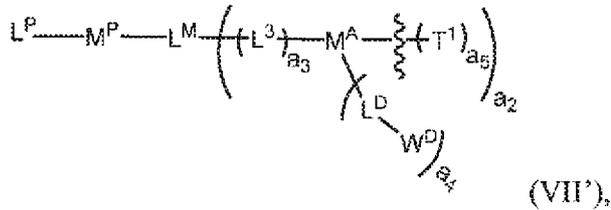
аминокислоты;

T^1 представляет собой гидрофильную группу, и  между T^1 и M^A обозначает прямое или не прямое присоединение T^1 и M^A ;

каждый случай W^D , если присутствует, независимо представляет собой функциональную группу, которая способна образовывать ковалентную связь с функциональной группой терапевтического агента («D»), имеющего молекулярную массу \leq примерно 5 кДа; и

каждый случай L^D независимо представляет собой двухвалентную линкерную группу, соединяющую W^D или D с M^A , и L^D содержит, по меньшей мере, одну расщепляемую связь, так что при разрыве связи D высвобождается в активной форме для предполагаемого терапевтического эффекта.

В некоторых аспектах, настоящее описание предлагает пептид-содержащий каркас любой из формул (VII')-(XII'):



где

a_2 представляет собой целое число от 1 до 3;

a_3 представляет собой целое число от 0 до 1;

a_4 представляет собой целое число от 1 до примерно 5;

a_5 представляет собой целое число от 1 до 3;

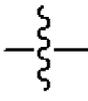
L^P представляет собой одновалентную линкерную группу, которая включает функциональную группу W^P , которая способна образовывать ковалентную связь с функциональной группой модифицированного антителя;

M^P представляет собой вставку;

L^M , если присутствует, представляет собой связь, или трехвалентный или четырехвалентный линкер, и когда L^M представляет собой связь, a_2 равно 1, когда L^M представляет собой трехвалентный линкер, a_2 равно 2, или когда L^M представляет собой четырехвалентный линкер, a_2 равно 3;

L^3 , если присутствует, представляет собой карбонилсодержащую группу;

M^A содержит пептидную группу, которая содержит, по меньшей мере, две аминокислоты;

T^1 представляет собой гидрофильную группу, и  между T^1 и M^A обозначает прямое или не прямое присоединение T^1 и M^A ;

каждый случай W^D независимо представляет собой функциональную группу, которая способна образовывать ковалентную связь с функциональной группой терапевтического агента («D»), имеющего молекулярную массу \leq примерно 5 кДа; и

каждый случай L^D независимо представляет собой двухвалентную линкерную группу, соединяющую W^D или D с M^A , и L^D содержит, по меньшей мере, одну расщепляемую связь, так что при разрыве связи D высвобождается в активной форме для предполагаемого терапевтического эффекта.

Конъюгаты и каркасы по настоящему изобретению могут включать один или несколько из следующих признаков, когда это применимо.

В некоторых вариантах осуществления, d_{13} представляет собой целое число от 2 до 12, от 2 до 10, от 2 до 8, от 2 до 6, от 2 до 4, от 1 до 2, от 4 до 10, от 4 до 8, от 4 до 6, от 6 до 12, от 6 до 10, от 6 до 8, от 8 до 14, от 8 до 12 или от 8 до 10.

В некоторых вариантах осуществления, d_{13} представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 2 (например, d_{13} равно 1 или 2). В некоторых вариантах осуществления, d_{13} представляет собой целое число в диапазоне от 2 до 4 (например, d_{13} равно 2, 3 или 4). В некоторых вариантах осуществления, d_{13} представляет собой целое число в диапазоне от 4 до 6 (например, d_{13} равно 4, 5 или 6). В некоторых вариантах осуществления, d_{13} представляет собой целое число в диапазоне от 6 до 8 (например, d_{13} равно 6, 7 или 8). В некоторых вариантах осуществления, d_{13} представляет собой целое число в диапазоне от 6 до 10 (например, d_{13} равно 6, 7, 8, 9 или 10). В некоторых вариантах осуществления, d_{13} равно 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления, d_{13} равно 1. В некоторых вариантах осуществления, d_{13} равно 2.

В некоторых вариантах осуществления, каждый L^3 , если присутствует, независимо

представляет собой $^*C_{1-12}\text{алкил}-C(O)-^{**}$, $^*NH-C_{1-12}\text{алкил}-C(O)-^{**}$ или $^*C_{1-12}\text{алкил}-C(O)-NH-C_{1-12}\text{алкил}-C(O)-^{**}$, где * указывает на присоединение к другому L^3 , если присутствует, или к L^M , и ** указывает на присоединение к другому L^3 , если присутствует, или к M^A .

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один L^3 представляет собой $^*CH_2CH_2-C(O)-^{**}$ или представляет собой $^*NH-CH_2CH_2-C(O)-^{**}$, где * указывает на присоединение к другому L^3 , если присутствует, или L^M , и ** указывает на присоединение к другому L^3 , если присутствует, или к M^A .

В некоторых вариантах осуществления, a_3 равно 2 или больше, по меньшей мере, один L^3 представляет собой $^*C_{1-12}\text{алкил}-C(O)-^{**}$, и, по меньшей мере, один L^3 представляет собой $^*NH-C_{1-12}\text{алкил}-C(O)-^{**}$.

В некоторых вариантах осуществления, $(L^3)_{a_3}$ представляет собой $^*CH_2CH_2-C(O)-NH-CH_2CH_2-C(O)-^{**}$ или $^*NH-CH_2CH_2-C(O)-CH_2CH_2-C(O)-^{**}$, где * означает присоединение к L^M , и ** указывает на присоединение к M^A .

В некоторых вариантах осуществления, a_4 равно 1. В некоторых вариантах осуществления, a_4 равно 2. В некоторых вариантах осуществления, a_4 равно 3.

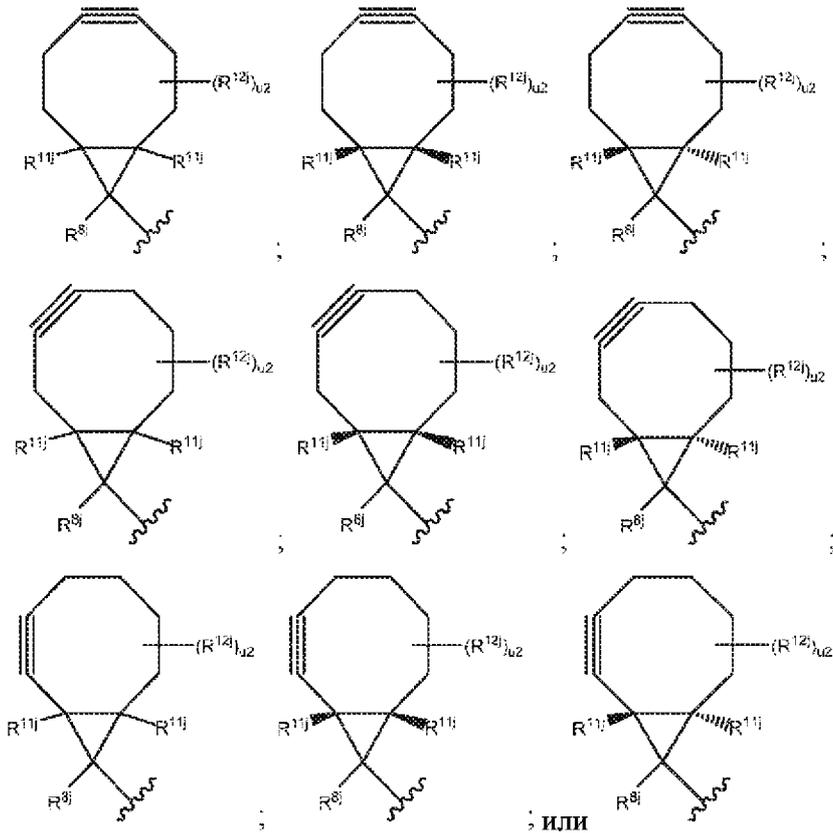
Переменная L^P и $L^{P'}$

В некоторых вариантах осуществления, $L^{P'}$ образуется в результате реакции между функциональной группой (например, W^P) L^P и реакционноспособной группой (например, модифицированной GlcNAc группой $^*GlcNAc-S''-A''$) модифицированного антитела.

В некоторых вариантах осуществления, $L^{P'}$ содержит триазилил, образованный между функциональной группой (например, W^P) L^P и реакционноспособной группой (например, модифицированной GlcNAc группой $^*GlcNAc-S''-A''$) модифицированного антитела.

В некоторых вариантах осуществления, каждый L^P , если он не связан с антителом, содержит концевую группу W^P .

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один W^P представляет собой



где

R^{8j} представляет собой водород, галоген, C_{1-24} алкил (например, C_{1-6} алкил), C_{6-24} циклоалкил, 6-24-членный гетероциклоалкил, C_{6-24} арил, 6-24-членный гетероарил, $-(C_{1-24}$ алкил)-(C_{6-24} циклоалкил), $-(C_{1-24}$ алкил)-(6-24-членный гетероциклоалкил), $-(C_{1-24}$ алкил)-(C_{6-24} арил) или $-(C_{1-24}$ алкил)-(6-24-членный гетероарил),

где C_{1-24} алкил необязательно прерывается одним из нескольких O, N или S, и где C_{1-24} алкил (например, C_{1-6} алкил), C_{6-24} циклоалкил, 6-24-членный гетероциклоалкил, C_{6-24} арил, 6-24-членный гетероарил, $-(C_{1-24}$ алкил)-(C_{6-24} циклоалкил), $-(C_{1-24}$ алкил)-(6-24-членный гетероциклоалкил), $-(C_{1-24}$ алкил)-(C_{6-24} арил) или $-(C_{1-24}$ алкил)-(6-24-членный гетероарил) необязательно замещен одним или несколькими C_1-C_{12} алкилом, C_2-C_{12} алкенилом, C_2-C_{12} алкинилом, C_3-C_{12} циклоалкилом, $-O(C_1-C_{12}$ алкилом), $-O(C_2-C_{12}$ алкенилом), $-O(C_2-C_{12}$ алкинилом), $-O(C_3-C_{12}$ циклоалкилом), галогеном, амино, оксо или силилом,

где C_1-C_{12} алкил, C_2-C_{12} алкенил, C_2-C_{12} алкинил, C_3-C_{12} циклоалкил, $-O(C_1-C_{12}$ алкил), $-O(C_2-C_{12}$ алкенил), $-O(C_2-C_{12}$ алкинил), $-O(C_3-C_{12}$ циклоалкил) необязательно замещен, и где C_1-C_{12} алкил, C_3-C_{12} циклоалкил, $-O(C_1-C_{12}$ алкил) или $-O(C_3-C_{12}$ циклоалкил) необязательно прерывается одним или несколькими O, N или S;

R^{10j} представляет собой водород, галоген, C_{1-24} алкил (например, C_{1-6} алкил), C_{6-24} циклоалкил, 6-24-членный гетероциклоалкил, C_{6-24} арил, 6-24-членный гетероарил, $-(C_{1-24}$ алкил)-(C_{6-24} циклоалкил), $-(C_{1-24}$ алкил)-(6-24-членный гетероциклоалкил), $-(C_{1-24}$ алкил)-(C_{6-24} арил) или $-(C_{1-24}$ алкил)-(6-24-членный гетероарил),

где C_{1-24} алкил (например, C_{1-6} алкил), C_{6-24} циклоалкил, 6-24-членный

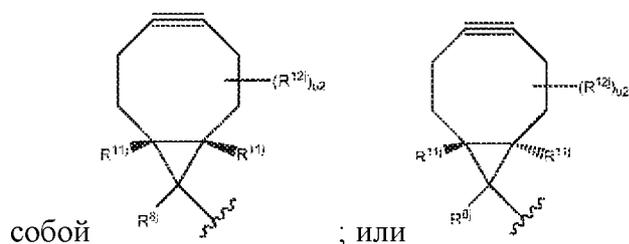
гетероциклоалкил, C₆₋₂₄ арил, 6-24-членный гетероарил, -(C₁₋₂₄ алкил)-(C₆₋₂₄ циклоалкил), -(C₁₋₂₄ алкил)-(6-24-членный гетероциклоалкил), -(C₁₋₂₄ алкил)-(C₆₋₂₄ арил), или -(C₁₋₂₄ алкил)-(6-24-членный гетероарил) необязательно замещен;

каждый R^{11j} независимо представляет собой водород, C₁₋₂₄ алкил (например, C₁₋₆ алкил), C₆₋₂₄ циклоалкил, 6-24-членный гетероциклоалкил, C₆₋₂₄ арил, 6-24-членный гетероарил, -(C₁₋₂₄ алкил)-(C₆₋₂₄ циклоалкил), -(C₁₋₂₄ алкил)-(6-24-членный гетероциклоалкил), -(C₁₋₂₄ алкил)-(C₆₋₂₄ арил) или -(C₁₋₂₄ алкил)-(6-24-членный гетероарил);

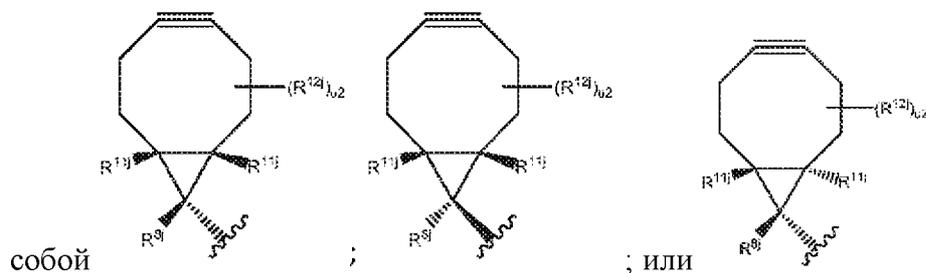
каждый R^{12j} независимо представляет собой галоген, -OR^{10j}, -NO₂, -CN, -S(O)₂R^{10j}, C₁₋₂₄ алкил (например, C₁₋₆ алкил), C₆₋₂₄ циклоалкил, 6-24-членный гетероциклоалкил, C₆₋₂₄ арил, 6-24-членный гетероарил, -(C₁₋₂₄ алкил)-(C₆₋₂₄ циклоалкил), -(C₁₋₂₄ алкил)-(6-24-членный гетероциклоалкил), -(C₁₋₂₄ алкил)-(C₆₋₂₄ арил) или -(C₁₋₂₄ алкил)-(6-24-членный гетероарил); и

u₂ представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 8.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один W^P представляет

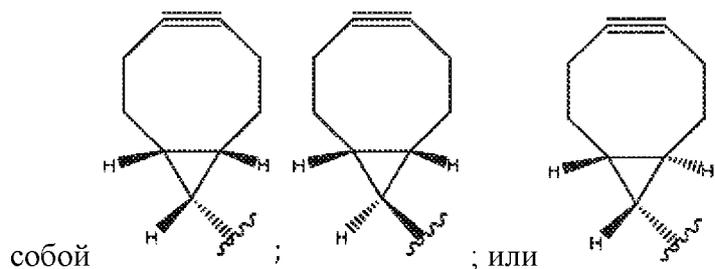


В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один W^P представляет

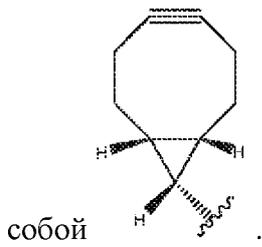


В некоторых вариантах осуществления, каждый R^{11j} является водородом. В некоторых вариантах осуществления, u₂ равно 0. В некоторых вариантах осуществления, R^{8j} представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один W^P представляет

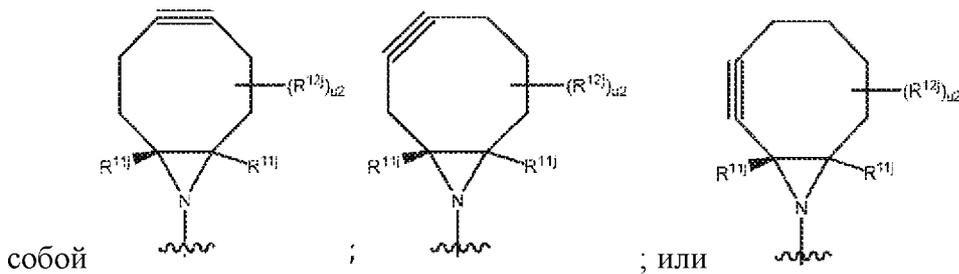


В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один W^P представляет

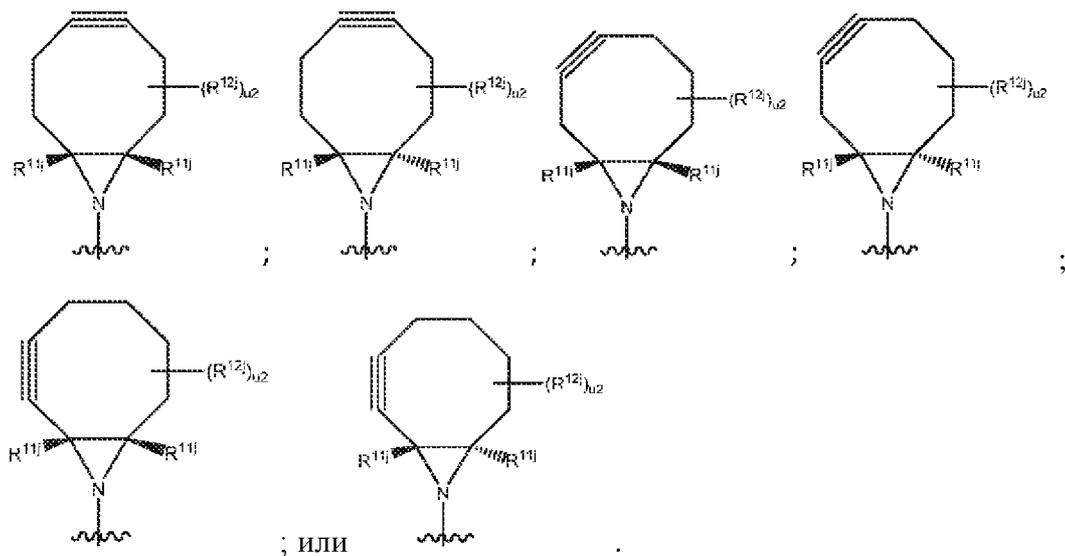


В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один R^{12j} представляет собой электроноакцепторную группу, *например*, группу с положительным значением константы заместителя Гаммета σ . В некоторых вариантах осуществления, подходящие электроноакцепторные группы известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один R^{12j} представляет собой галоген (например, F или Cl), $-OR^{10j}$, $-NO_2$, $-CN$, $-S(O)_2R^{7j}$, замещенный C_1-C_{12} алкил или замещенный C_6-C_{12} арил, где, по меньшей мере, один из заместителей представляет собой электроноакцепторную группу. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один R^{12j} представляет собой фторированный C_1-C_{12} алкил (например, $-CF_3$), фторированный C_5-C_{12} арил (например, $-C_6F_5$) или галогеналкилированный C_5-C_{12} арил (например, $-[3,5-(CF_3)_2(C_6H_3)]$).

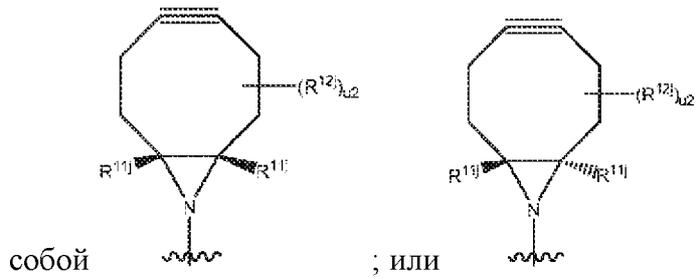
В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один W^P представляет



В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один W^P представляет собой

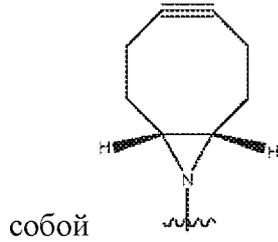


В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один W^P представляет

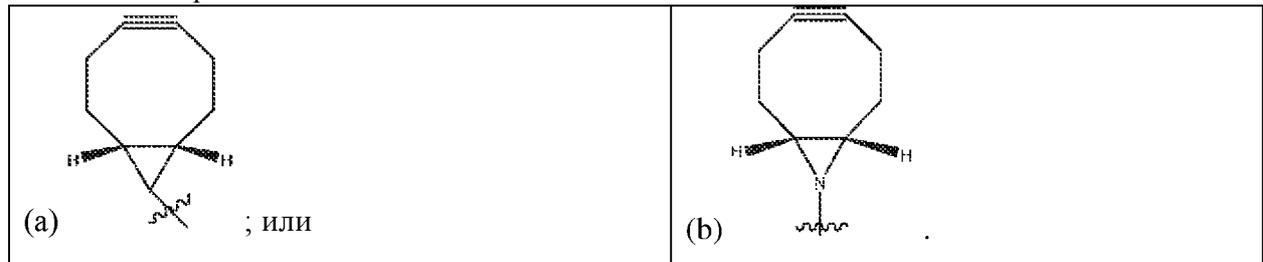


В некоторых вариантах осуществления, каждый R^{11j} является водородом. В некоторых вариантах осуществления, u_2 равно 0.

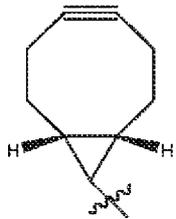
В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один W^P представляет



В некоторых вариантах осуществления, каждый W^P , когда присутствует, независимо представляет собой:

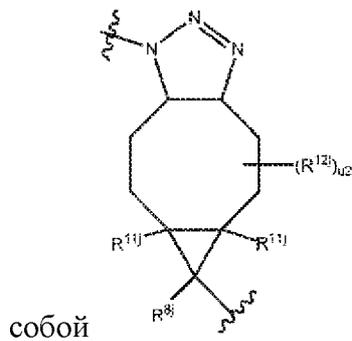


В некоторых вариантах осуществления, каждый W^P представляет собой

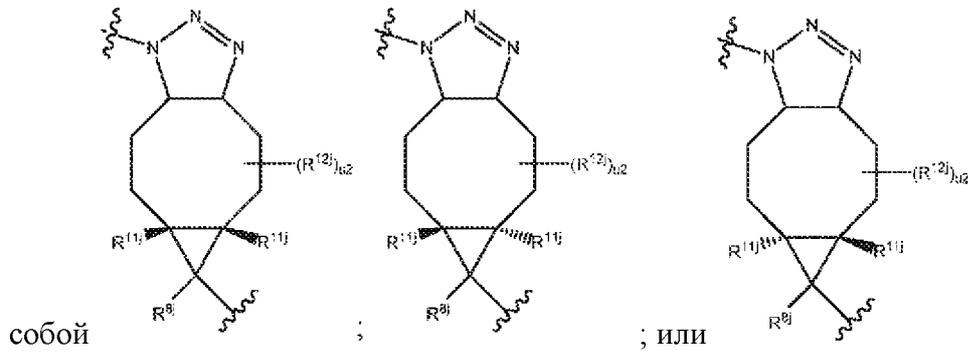


В некоторых вариантах осуществления, каждый L^P при соединении с антителом содержит связывающую группу W^P .

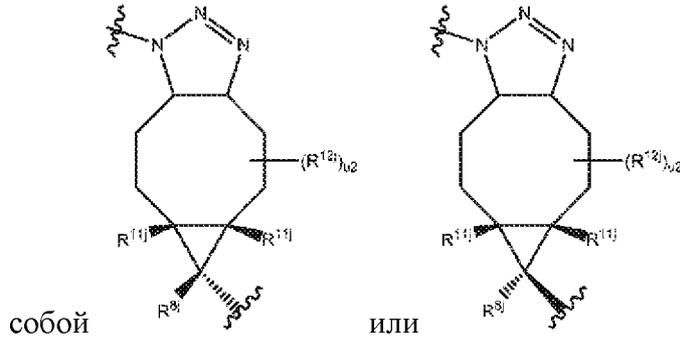
В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один W^P представляет



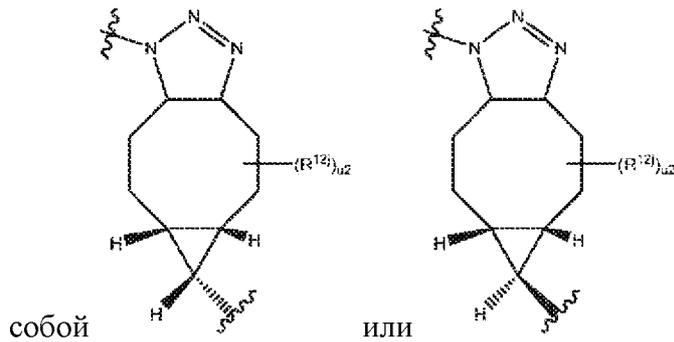
В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один W^P представляет



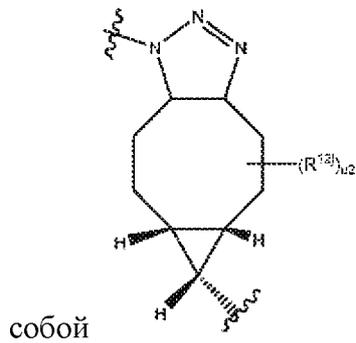
В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один W^P представляет



В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один W^P представляет

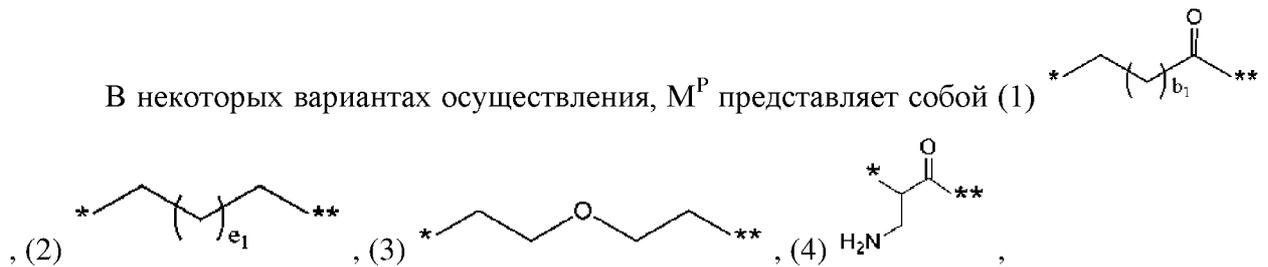


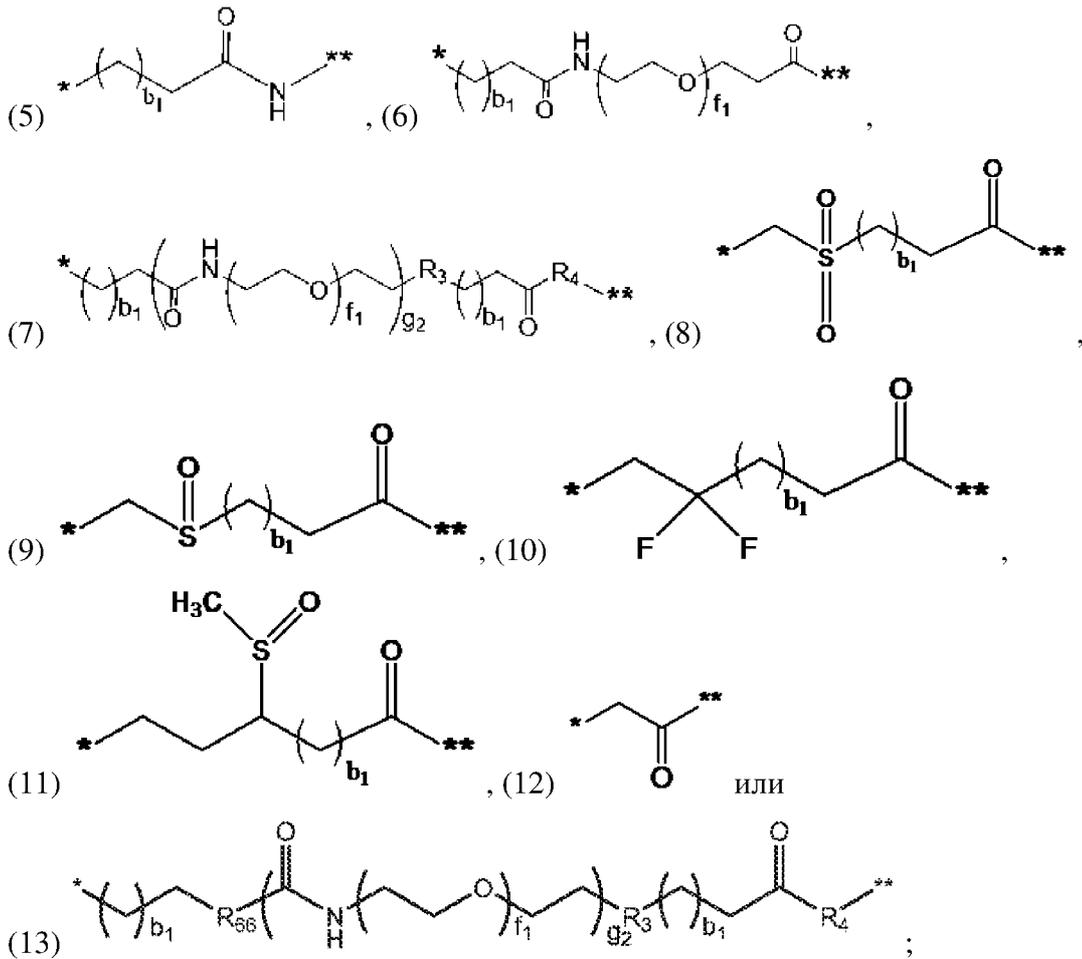
В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один W^P представляет



Вставка M^P

В некоторых вариантах осуществления, M^P представляет собой (1)





где * обозначает присоединение к L^P или L^P и ** обозначает присоединение к L^M или M^A ;

каждый R_{66} независимо представляет собой NH или O; каждый R_3 независимо представляет собой $-\text{C}(\text{O})-\text{NR}_5-$ или $-\text{NR}_5-\text{C}(\text{O})-$;

каждый R_5 независимо представляет собой водород, C_{1-6} алкил, C_{6-10} арил, C_{3-8} циклоалкил, COOH или COO- C_{1-6} алкил;

R_4 представляет собой связь или $-\text{NR}_5-(\text{CR}_{20}\text{R}_{21})-\text{C}(\text{O})-$;

каждый R_{20} и R_{21} независимо представляет собой водород, C_{1-6} алкил, C_{6-10} арил, гидроксированный C_{6-10} арил, полигидроксированный C_{6-10} арил, 5-12-членный гетероцикл, C_{3-8} циклоалкил, гидроксированный C_{3-8} циклоалкил, полигидроксированный C_{3-8} циклоалкил или боковую цепь природной или неприродной аминокислоты;

каждый b_1 независимо представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 6;

каждый e_1 независимо представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 8;

каждый f_1 независимо представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 6; и

каждый g_2 независимо представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 4.

В некоторых вариантах осуществления, b_1 равно 0. В некоторых вариантах осуществления, b_1 равно 1.

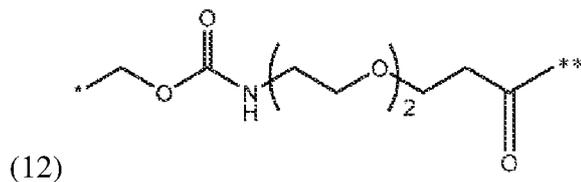
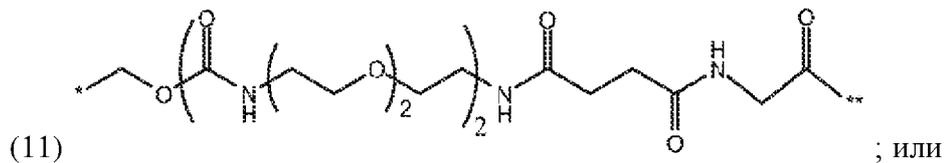
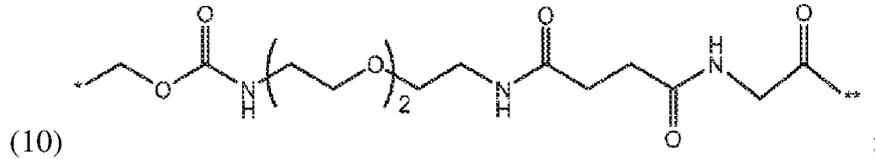
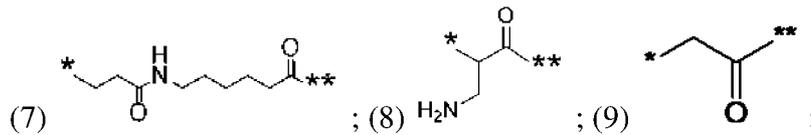
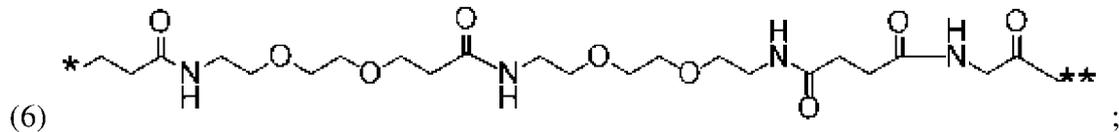
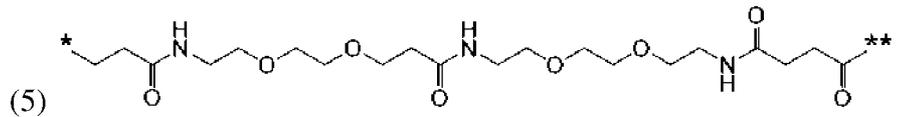
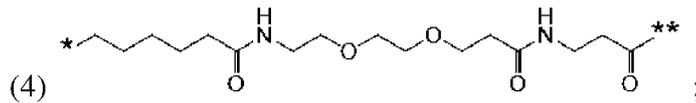
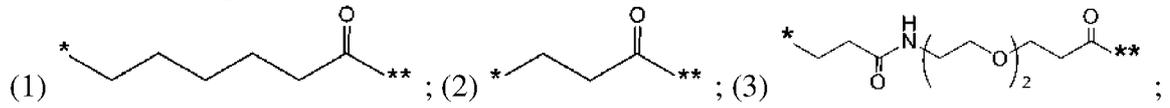
В некоторых вариантах осуществления, каждый f_1 независимо равен 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления, f_1 равен 1. В некоторых вариантах осуществления, f_1

равен 2.

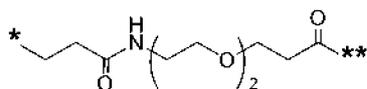
В некоторых вариантах осуществления, g_2 равно 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления, g_2 равно 1. В некоторых вариантах осуществления, g_2 равно 2.

Понятно, что для вариантов осуществления M^P , * обозначает присоединение к L^P или L^P и ** обозначает присоединение к L^M или M^A .

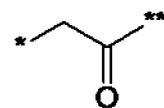
В некоторых вариантах осуществления, M^P представляет собой:



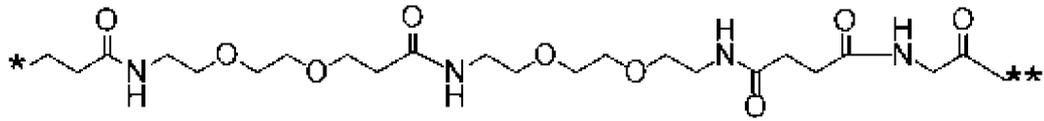
В некоторых вариантах осуществления, M^P представляет собой



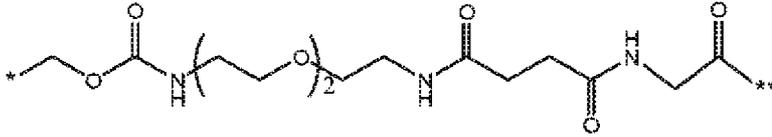
В некоторых вариантах осуществления, M^P представляет собой



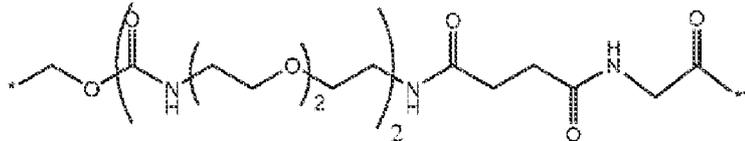
В некоторых вариантах осуществления, M^P представляет собой:



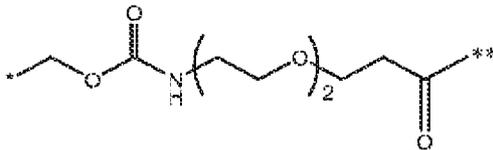
В некоторых вариантах осуществления, M^P представляет собой:



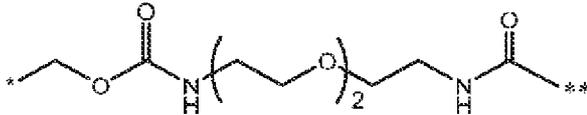
В некоторых вариантах осуществления, M^P представляет собой:



В некоторых вариантах осуществления, M^P представляет собой:



В некоторых вариантах осуществления, M^P представляет собой:



Переменная L^M и W^M

В некоторых вариантах осуществления, L^M представляет собой связь (т.е. двухвалентный линкер или имеющий 2 плеча) или многоплечевой линкер (например, трехвалентный или четырехвалентный или имеющий 3 или 4 плеча), где каждое плечо может быть одинаковым или разным.

В некоторых вариантах осуществления, L^M представляет собой связь (т.е. двухвалентный линкер или имеющий 2 плеча) или многоплечевой линкер (например, четырехвалентный или имеющий 4 плеча; или трехвалентный, имеющий 3 плеча), где каждое плечо может быть одинаковым или разным.

Понятно, что термин «плечо», используемый в настоящем документе, относится к части L^M , которая (1) присоединена к M^P или (2) присоединена к L^3 , когда она присутствует, или прикреплена к M^A , когда L^3 отсутствует.

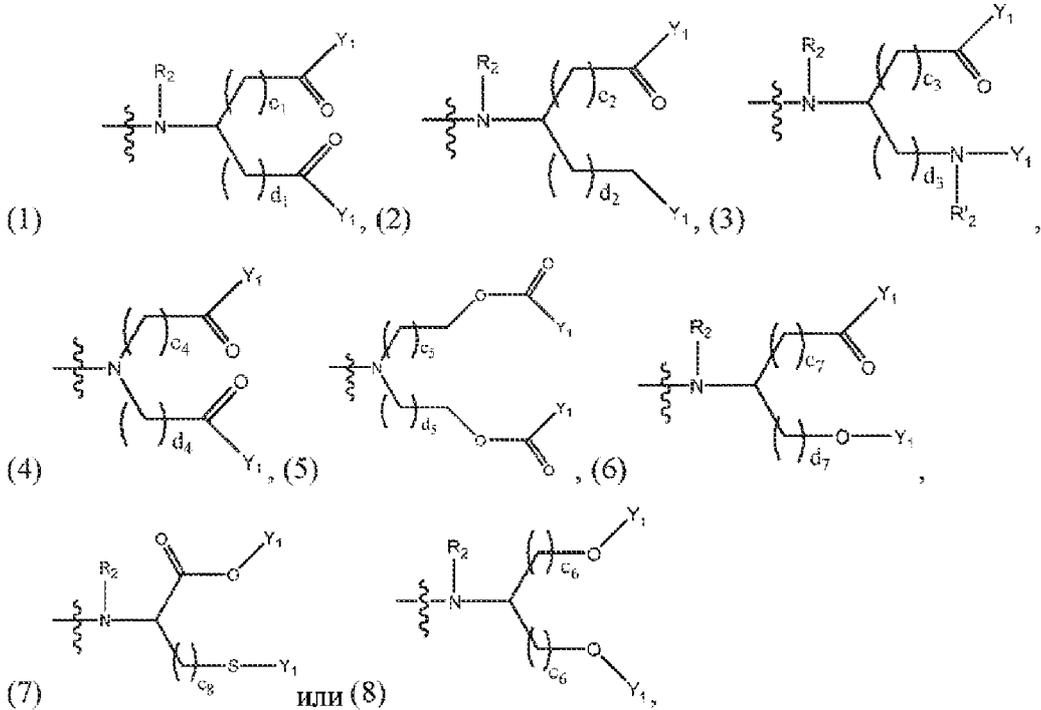
В некоторых вариантах осуществления, L^M представляет собой связь (т.е. двухвалентный линкер или имеет 2 плеча)

В некоторых вариантах осуществления, L^M представляет собой многоплечевой линкер (например, трехвалентный или четырехвалентный или имеющий 3 или 4 плеча), где каждое плечо может быть одинаковым или разным. В некоторых вариантах осуществления, L^M представляет собой многоплечевой линкер (например, трехвалентный или четырехвалентный или имеющий 3 или 4 плеча).

В некоторых вариантах осуществления, L^M представляет собой трехвалентный линкер, имеющий 3 плеча, где каждое плечо может быть одинаковым или разным.

В некоторых вариантах осуществления, L^M представляет собой четырехвалентный линкер, имеющий 4 плеча, где каждое плечо может быть одинаковым или разным.

В некоторых вариантах осуществления, a_2 равно 2, и L^M представляет собой



где:

 обозначает присоединение к M^P ;

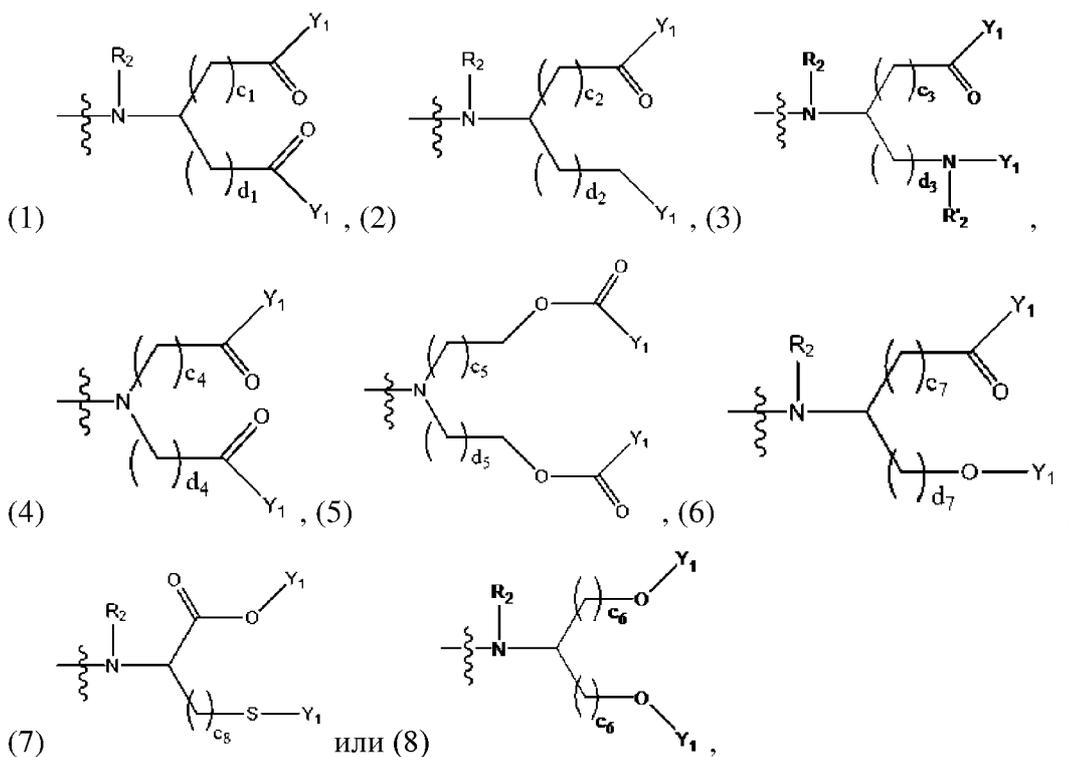
Y_1 обозначает присоединение к L^3 , когда он присутствует, или присоединение к M^A , когда L^3 отсутствует;

R_2 и R'_2 каждый независимо представляет собой водород, необязательно замещенный C_{1-6} алкил, необязательно замещенный C_{2-6} алкенил, необязательно замещенный C_{2-6} алкинил, необязательно замещенный C_{3-19} разветвленный алкил, необязательно замещенный C_{3-8} циклоалкил, необязательно замещенный C_{6-10} арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный C_{1-6} гетероалкил, C_{1-6} алкокси, арилокси, C_{1-6} гетероалкокси, C_{2-6} алканоил, необязательно замещенный арилкарбонил, C_{2-6} алкоксикарбонил, C_{2-6} алканоилокси, арилкарбонилокси, необязательно замещенный C_{2-6} алканоил, необязательно замещенный C_{2-6} алканоилокси, необязательно замещенный C_{2-6} замещенный алканоилокси, $-COOH$, или $-COO-C_{1-6}$ алкил;

каждый из $c_1, c_2, c_3, c_4, c_5, c_7$ и c_8 , если присутствует, представляет собой целое число, независимо лежащее в диапазоне от 0 до 10; и

каждый из d_1, d_2, d_3, d_4, d_5 и d_7 , если он присутствует, представляет собой целое число, независимо лежащее в диапазоне от 0 до 10.

В некоторых вариантах осуществления, a_2 равно 2, и L^M равно



где:

 обозначает присоединение к M^P ;

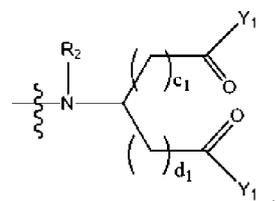
Y_1 обозначает присоединение к L^3 , когда присутствует, или присоединение к M^A , когда L^3 отсутствует;

R_2 и R'_2 каждый независимо представляет собой водород, необязательно замещенный C_{1-6} алкил, необязательно замещенный C_{2-6} алкенил, необязательно замещенный C_{2-6} алкинил, необязательно замещенный C_{3-19} разветвленный алкил, необязательно замещенный C_{3-8} циклоалкил, необязательно замещенный C_{6-10} арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный C_{1-6} гетероалкил, C_{1-6} алкокси, арилокси, C_{1-6} гетероалкокси, C_{2-6} алканойл, необязательно замещенный арилкарбонил, C_{2-6} алкоксикарбонил, C_{2-6} алканойлокси, арилкарбонийлокси, необязательно замещенный C_{2-6} алканойл, необязательно замещенный C_{2-6} алканойлокси, необязательно замещенный C_{2-6} замещенный алканойлокси, $-COOH$, или $-COO-C_{1-6}$ алкил;

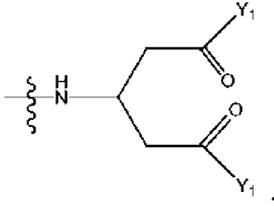
каждый из c_1 , c_2 , c_3 , c_4 , c_5 , c_7 и c_8 , если присутствует, представляет собой целое число, независимо лежащее в диапазоне от 0 до 10; и

каждый из d_1 , d_2 , d_3 , d_4 , d_5 и d_7 , если он присутствует, представляет собой целое число, независимо лежащее в диапазоне от 0 до 10.

В некоторых вариантах осуществления, a_2 равно 2, и L^M представляет собой



В некоторых вариантах осуществления, a_2 равно 2, и L^M представляет собой

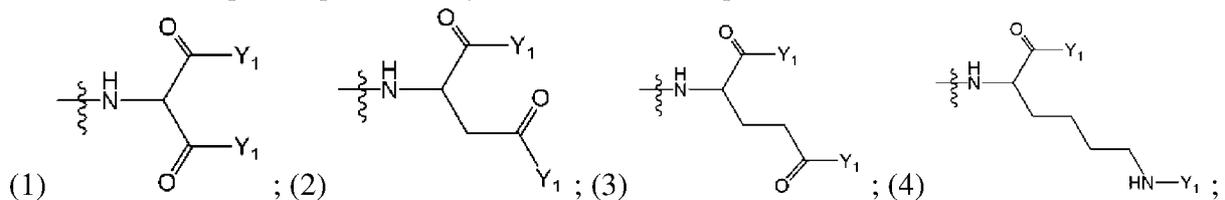


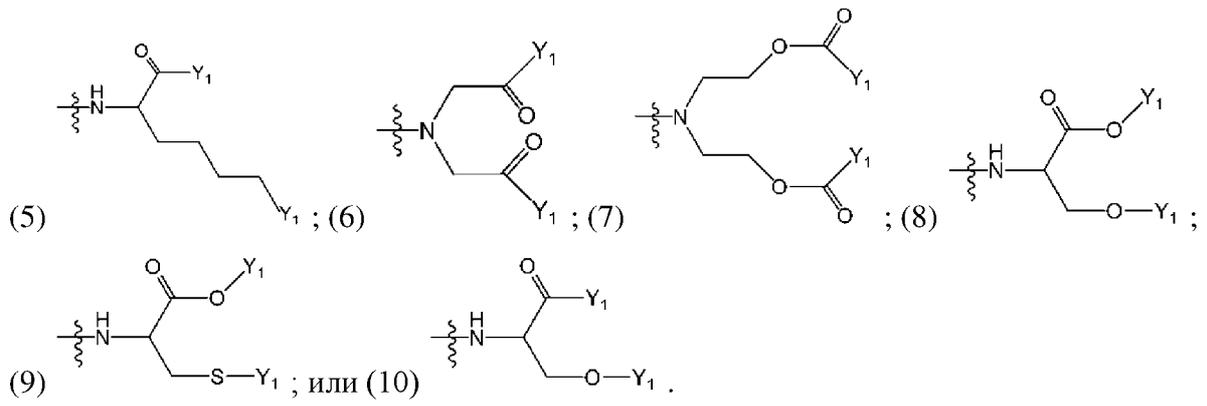
В некоторых вариантах осуществления, каждый из $c_1, c_2, c_3, c_4, c_5, c_7$ и c_8 , если присутствует, независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых вариантах осуществления, каждый из $c_1, c_2, c_3, c_4, c_5, c_7$ и c_8 независимо равен 0 или 1. В некоторых вариантах осуществления, $c_1, c_2, c_3, c_4, c_5, c_7$ и c_8 каждый независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых вариантах осуществления, $c_1, c_2, c_3, c_4, c_5, c_7$ и c_8 каждый независимо равен 0, 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления, $c_1, c_2, c_3, c_4, c_5, c_7$ и c_8 каждый независимо равен 0. В некоторых вариантах осуществления, $c_1, c_2, c_3, c_4, c_5, c_7$ и c_8 каждый независимо равен 1. В некоторых вариантах осуществления, $c_1, c_2, c_3, c_4, c_5, c_7$ и c_8 каждый независимо равен 2.

В некоторых вариантах осуществления, d_1, d_2, d_3, d_4, d_5 и d_7 , если присутствует, каждый независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых вариантах осуществления, d_1, d_2, d_3, d_4, d_5 и d_7 каждый независимо равен 0 или 1. В некоторых вариантах осуществления, d_1, d_2, d_3, d_4, d_5 и d_7 каждый независимо равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых вариантах осуществления, d_1, d_2, d_3, d_4, d_5 и d_7 каждый независимо равен 1, 2, 3 или 4. В некоторых вариантах осуществления, d_1, d_2, d_3, d_4, d_5 и d_7 каждый независимо равен 1. В некоторых вариантах осуществления, d_1, d_2, d_3, d_4, d_5 и d_7 каждый независимо равен 2. В некоторых вариантах осуществления, d_1, d_2, d_3, d_4, d_5 и d_7 каждый независимо равен 3. В некоторых вариантах осуществления, d_1, d_2, d_3, d_4, d_5 и d_7 каждый независимо равен 4.

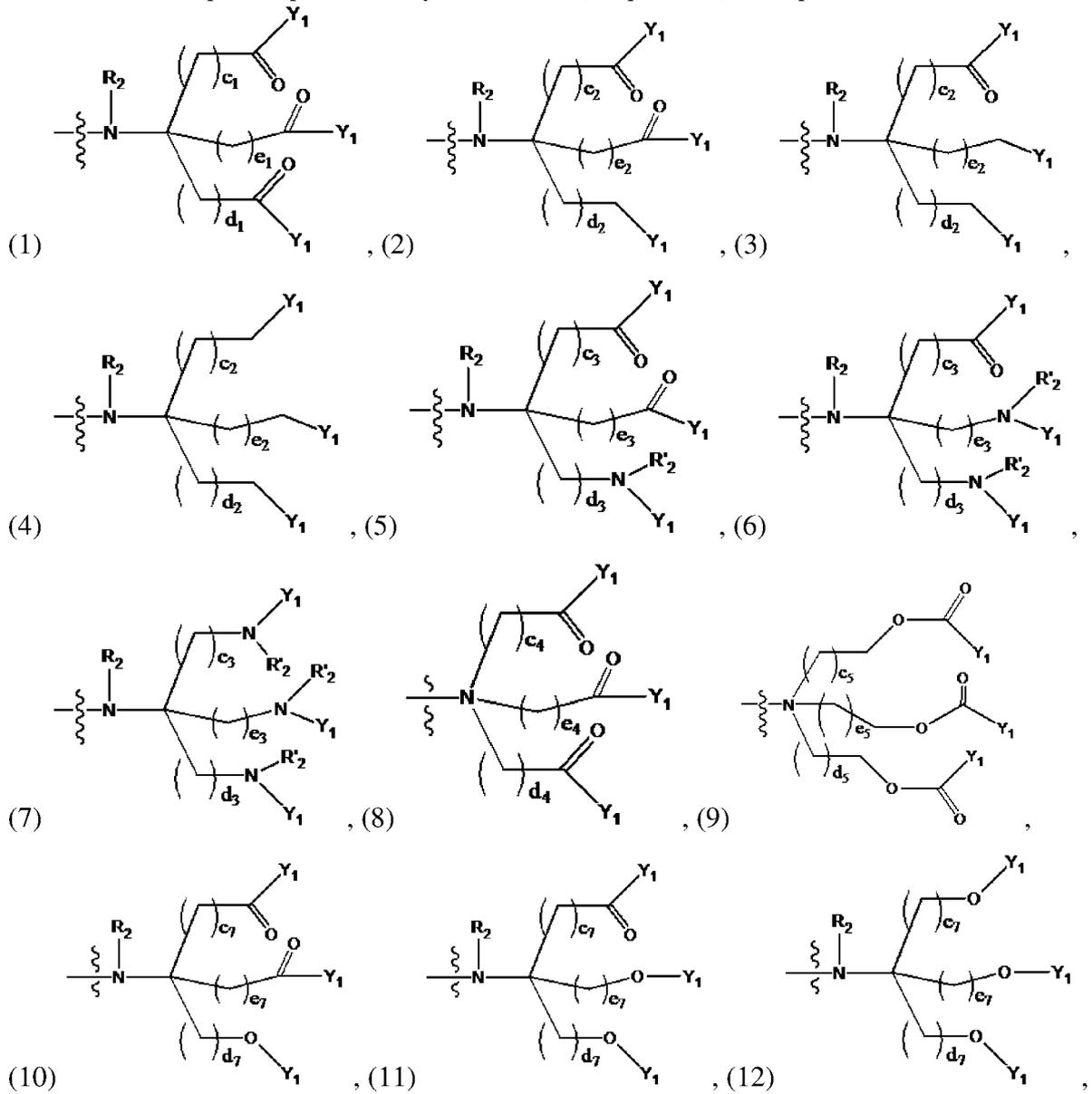
В некоторых вариантах осуществления, каждый из R_2 и R'_2 независимо представляет собой водород, C_{1-6} алкил, C_{6-10} арил, C_{3-8} циклоалкил, $-COOH$ или $-COO-C_{1-6}$ алкил. В некоторых вариантах осуществления, каждый из R_2 и R'_2 независимо представляет собой водород или C_{1-6} алкил. В некоторых вариантах осуществления, каждый из R_2 и R'_2 независимо представляет собой водород. В некоторых вариантах осуществления, каждый из R_2 и R'_2 независимо представляет собой C_{1-6} алкил.

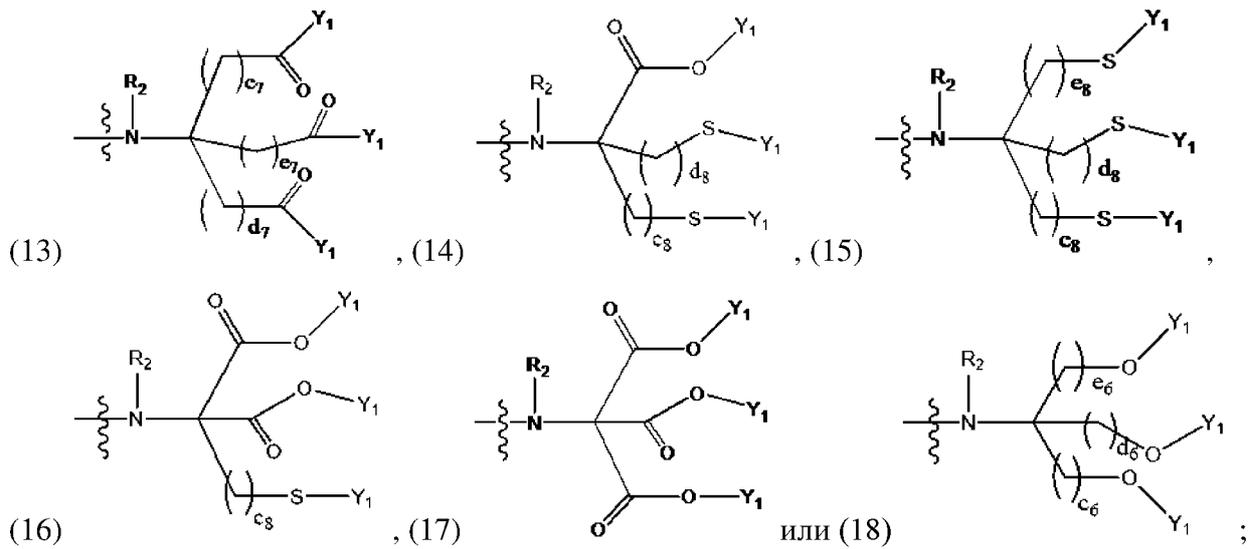
В некоторых вариантах осуществления, L^M представляет собой:





В некоторых вариантах осуществления, a_2 равно 3, и L^M равно





где:

 обозначает присоединение к M^P ;

Y_1 обозначает присоединение к L^3 , когда присутствует, или присоединение к M^A , когда L^3 отсутствует;

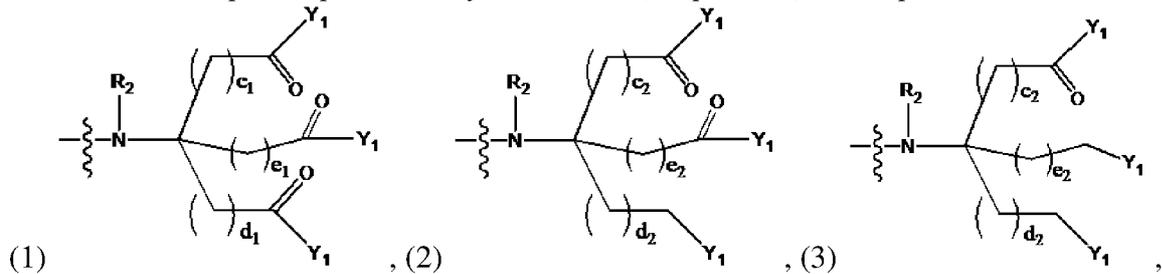
R_2 и R'_2 каждый независимо представляет собой водород, необязательно замещенный C_{1-6} алкил, необязательно замещенный C_{2-6} алкенил, необязательно замещенный C_{2-6} алкинил, необязательно замещенный C_{3-19} разветвленный алкил, необязательно замещенный C_{3-8} циклоалкил, необязательно замещенный C_{6-10} арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный C_{1-6} гетероалкил, C_{1-6} алкокси, арилокси, C_{1-6} гетероалкокси, C_{2-6} алканоил, необязательно замещенный арилкарбонил, C_{2-6} алкоксикарбонил, C_{2-6} алканоилокси, арилкарбонилокси, необязательно замещенный C_{2-6} алканоил, необязательно замещенный C_{2-6} алканоилокси, необязательно замещенный C_{2-6} замещенный алканоилокси, -COOH, или -COO- C_{1-6} алкил;

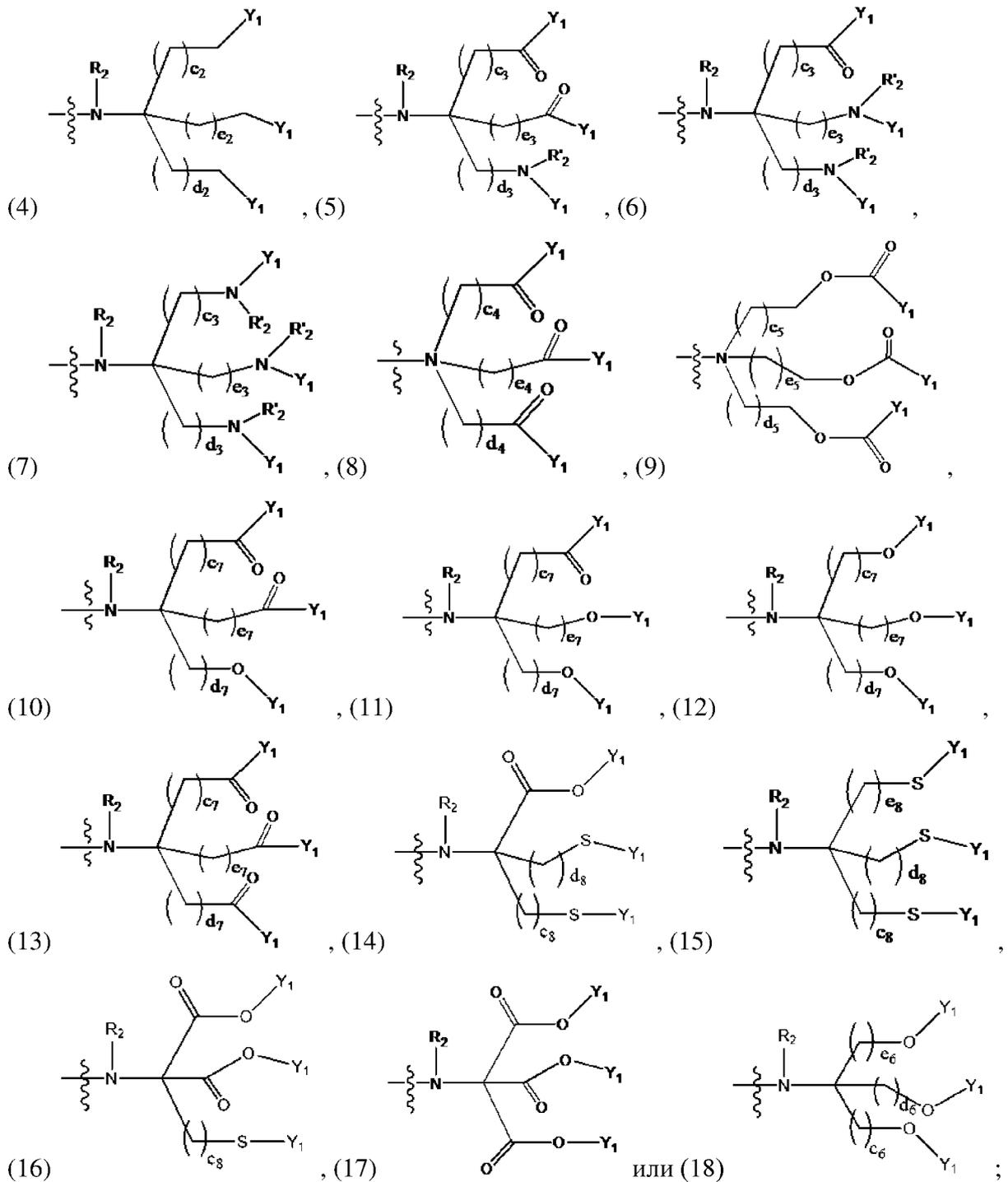
каждый из $c_1, c_2, c_3, c_4, c_5, c_6, c_7$ и c_8 независимо представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 10;

каждый из $d_1, d_2, d_3, d_4, d_5, d_6, d_7$ и d_8 независимо представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 10; и

каждый из $e_1, e_2, e_3, e_4, e_5, e_6, e_7$ и e_8 независимо представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 10.

В некоторых вариантах осуществления, a_2 равно 3, и L^M представляет собой





где:

обозначает присоединение к M^P ;

Y_1 обозначает присоединение к L^3 , когда присутствует, или присоединение к M^A , когда L^3 отсутствует;

R_2 и R'_2 каждый независимо представляет собой водород, необязательно замещенный C_{1-6} алкил, необязательно замещенный C_{2-6} алкенил, необязательно замещенный C_{2-6} алкинил, необязательно замещенный C_{3-19} разветвленный алкил, необязательно замещенный C_{3-8} циклоалкил, необязательно замещенный C_{6-10} арил, необязательно замещенный гетероарил, необязательно замещенный C_{1-6} гетероалкил, C_{1-6}

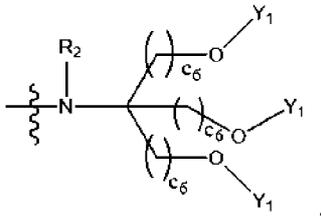
алкокси, арилокси, C_{1-6} гетероалкокси, C_{2-6} алканоил, необязательно замещенный арилкарбонил, C_{2-6} алкоксикарбонил, C_{2-6} алканоилокси, арилкарбонилокси, необязательно замещенный C_{2-6} алканоил, необязательно замещенный C_{2-6} алканоилокси, необязательно замещенный C_{2-6} замещенный алканоилокси, $-COOH$, или $-COO-C_{1-6}$ алкил;

каждый из $c_1, c_2, c_3, c_4, c_5, c_6, c_7$ и c_8 независимо представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 10;

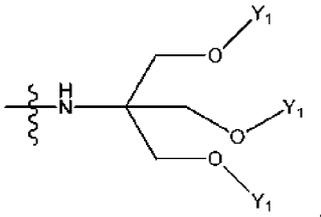
каждый из $d_1, d_2, d_3, d_4, d_5, d_6, d_7$ и d_8 независимо представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 10; и

каждый из $e_1, e_2, e_3, e_4, e_5, e_6, e_7$ и e_8 независимо представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 10.

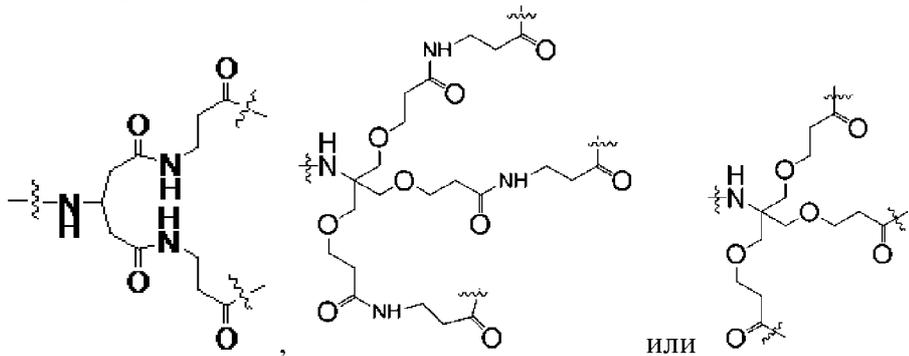
В некоторых вариантах осуществления, a_2 равно 3 и L^M представляет собой



В некоторых вариантах осуществления, a_2 равно 3 и L^M представляет собой



В некоторых вариантах осуществления, $-L^M-(L^3)_{a_2}-$ представляет собой:

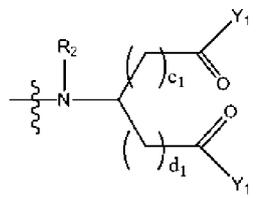


В некоторых вариантах осуществления, где аминокислотная единица имеет два сайта присоединения (т.е. концевая единица лекарственного средства), один из сайтов присоединения, показанных выше, может быть заменен, например, H, OH или C_{1-3} незамещенной алкильной группой.

В некоторых вариантах осуществления, когда L^M представляет собой многоплечевой линкер и еще не соединен с вставкой M^P , W^M представляет собой конец L^M , и каждый случай W^M независимо представляет собой водород, защитную группу, уходящую группу, или функциональную группу, которая способна соединять L^M с M^P посредством образования ковалентной связи.

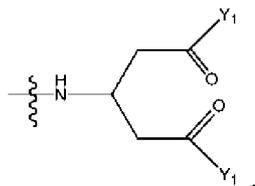
В некоторых вариантах осуществления, W^M представляет собой защитную группу амина. В некоторых вариантах осуществления, W^M представляет собой ВОС.

В некоторых вариантах осуществления, W^M представляет собой защитную группу



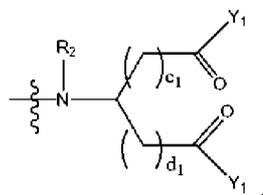
амина, и L^M представляет собой

В некоторых вариантах осуществления, W^M представляет собой защитную группу



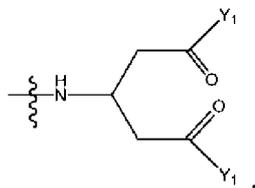
амина, и L^M представляет собой

В некоторых вариантах осуществления, W^M представляет собой ВОС, и L^M



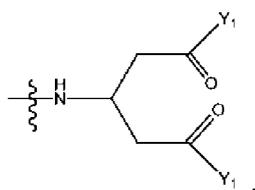
представляет собой

В некоторых вариантах осуществления, W^M представляет собой защитную группу



амина, и L^M представляет собой

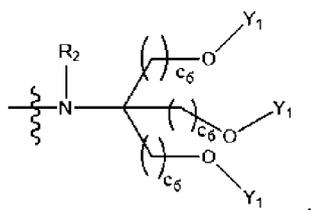
В некоторых вариантах осуществления, W^M представляет собой ВОС, и L^M



представляет собой

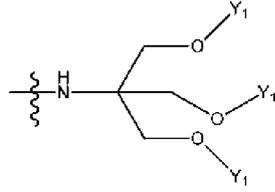
В некоторых вариантах осуществления, W^M содержит аминогруппу. В некоторых вариантах осуществления, W^M содержит $-C(O)-(CH_2)_w-NH_2$, где w представляет собой целое число от 1 до 6. В некоторых вариантах осуществления, W^M представляет собой $-C(O)-CH_2-NH_2$.

В некоторых вариантах осуществления, W^M представляет собой $-C(O)-CH_2-NH_2$ и



L^M представляет собой

В некоторых вариантах осуществления, W^M представляет собой $-C(O)-CH_2-NH_2$ и



L^M представляет собой

В некоторых вариантах осуществления, WM представляет собой H .

Переменная L^3

В некоторых вариантах осуществления, каждый L^3 , если присутствует, представляет собой карбонилсодержащую группу.

Понятно, что для вариантов осуществления L^3 , * указывает на присоединение к другому L^3 , если он присутствует, или к L^M ; и ** указывает на присоединение к другому L^3 , если он присутствует, или к M^A .

В некоторых вариантах осуществления, каждый L^3 , если присутствует, независимо представляет собой *- C_{1-12} алкил- $C(O)$ -**, *- $NH-C_{1-12}$ алкил- $C(O)$ -** или *- C_{1-12} алкил- $C(O)$ - $NH-C_{1-12}$ алкил- $C(O)$ -**.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один L^3 представляет собой *- C_{1-12} алкил- $C(O)$ -**.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один L^3 представляет собой *- $CH_2CH_2-C(O)$ -**.

В некоторых вариантах осуществления, L^3 представляет собой *- $CH_2CH_2-C(O)$ -**.

В некоторых вариантах осуществления, $(L^3)_{a3}$ представляет собой *- $CH_2CH_2-C(O)$ -**.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один L^3 представляет собой *- $NH-C_{1-12}$ алкил- $C(O)$ -**.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один L^3 представляет собой *- $NH-CH_2CH_2-C(O)$ -**.

В некоторых вариантах осуществления, L^3 представляет собой *- $NH-CH_2CH_2-C(O)$ -**.

В некоторых вариантах осуществления, $(L^3)_{a3}$ представляет собой *- $NH-CH_2CH_2-C(O)$ -**.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один L^3 представляет собой *- C_{1-12} алкил- $C(O)$ - $NH-C_{1-12}$ алкил- $C(O)$ -**.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один L^3 представляет собой *- $CH_2CH_2-C(O)$ - $NH-CH_2CH_2-C(O)$ -**.

В некоторых вариантах осуществления, L^3 представляет собой *- $CH_2CH_2-C(O)$ - $NH-CH_2CH_2-C(O)$ -**.

В некоторых вариантах осуществления, $(L^3)_{a3}$ представляет собой *- $CH_2CH_2-C(O)$ - $NH-CH_2CH_2-C(O)$ -**.

В некоторых вариантах осуществления, a_3 равно 2 или больше, по меньшей мере,

один L^3 представляет собой $^*C_{1-12}$ алкил- $C(O)^{**}$, и по меньшей мере, один L^3 представляет собой $^*NH-C_{1-12}$ алкил- $C(O)^{**}$.

В некоторых вариантах осуществления, $(L^3)_{a3}$ представляет собой $^*CH_2CH_2-C(O)-NH-CH_2CH_2-C(O)^{**}$.

В некоторых вариантах осуществления, $(L^3)_{a3}$ представляет собой $^*NH-CH_2CH_2-C(O)-CH_2CH_2-C(O)^{**}$.

Переменная M^A

В некоторых вариантах осуществления, M^A представляет собой линкерную группу, которая способна связывать одно или несколько лекарственных средств и одну или несколько гидрофильных групп с L^P или L^P . В некоторых вариантах осуществления, M^A содержит пептидную группу, по меньшей мере, из двух аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, аминокислота упоминается в настоящем документе как «АК», а аминокислоты как «АК».

В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа представляет собой группу, которая способна образовывать ковалентную связь с единицей $-L^D-D$ и позволяет присоединять несколько лекарственных средств. В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит одну АК единицу или имеет две или несколько АК единиц (например, от 2 до 10, от 2 до 6 или 2, 3, 4, 5 или 6), где каждая единица АК независимо представляет собой природную или неприродную аминокислоту, аминокислотный спирт, аминокислотный альдегид, диамин, полиамин или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления, для того, чтобы иметь необходимое количество присоединений, по меньшей мере, одна из АК единиц должна иметь функционализированную боковую цепь, обеспечивающую присоединение единицы $-L^D-D$. В некоторых вариантах осуществления, типовые функционализированные АК единицы (например, аминокислоты, аминокислотные спирты или аминокислотные альдегиды) включают, например, азидо- или алкин-функционализированные АК единицы (например, аминокислоту, аминокислотный спирт или аминокислотный альдегид, модифицированные так, чтобы они содержали азидную группу или алкиновую группу). В некоторых вариантах осуществления, азидная группа или алкиновая группа предназначена для присоединения с использованием клик-химии.

В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит от 2 до 12 АК единиц. В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит от 2 до 10 АК единиц. В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит от 2 до 6 АК единиц. В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит 2, 3, 4, 5 или 6 АК единиц.

В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит 2 АК единицы. В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит 3 АК единицы. В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит 4 АК единицы. В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит 5 АК единиц. В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит 6 АК единиц.

В некоторых вариантах осуществления, присоединение к пептидной группе или к

другим компонентам конъюгата, его промежуточным продуктам или каркасу может осуществляться, например, посредством amino-, карбокси- или других функциональных групп. В некоторых вариантах осуществления, каждая аминокислота пептидной группы может независимо представлять собой D или L изомер тиолсодержащей аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления, каждая аминокислота пептидной группы может независимо представлять собой D изомер тиолсодержащей аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления, каждая аминокислота пептидной группы может независимо представлять собой L изомер тиолсодержащей аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления, тиолсодержащая аминокислота может представлять собой, например, цистеин, гомоцистеин или пеницилламин.

В некоторых вариантах осуществления, каждая аминокислота, содержащая пептидную группу, может независимо представлять собой L или D изомер следующих аминокислот: аланина (включая β -аланин), аргинина, аспарагиновой кислоты, аспарагина, цистеина, гистидина, глицина, глутаминовой кислоты, глутамина, фенилаланина, лизина, лейцина, метионина, серина, тирозина, треонина, триптофана, пролина, орнитина, пеницилламина, аминоалкиновой кислоты, аминокандиновой кислоты, гетероциклокарбоновой кислоты, цитруллина, статина, диаминоалкановой кислоты, их стереоизомеров или их производных.

В некоторых вариантах осуществления, каждая аминокислота, содержащая пептидную группу, независимо представляет собой цистеин, гомоцистеин, пеницилламин, орнитин, лизин, серин, треонин, глицин, глутамин, аланин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, селеноцистеин, пролин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, валин, аланин или их стереоизомеры.

В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит монопептид, дипептид, трипептид, тетрапептид или пентапептид. В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит пентапептид.

В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит, по меньшей мере, примерно пять аминокислот (например, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит не более десяти аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления, каждая аминокислота, которая независимо содержит пептидная группа, представляет собой глицин, серин, глутаминовую кислоту, лизин, аспарагиновую кислоту и цистеин.

В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит, по меньшей мере, четыре глицина и, по меньшей мере, один серин, например, (глицин)₄ и серин, где серин находится в любом положении вдоль пептидной цепи, например, (серин)-(глицин)₄; (глицин)-(серин)-(глицин)₃; (глицин)₂-(серин)-(глицин)₂; (глицин)₃-(серин)-(глицин); или (глицин)₄-(серин).

В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит (глицин)₄-(серин) или (серин)-(глицин)₄. В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа

содержит (глицин)₄-(серин). В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит (серин)-(глицин)₄.

В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит, по меньшей мере, четыре глицина и, по меньшей мере, одну глутаминовую кислоту, например (глицин)₄ и глутаминовую кислоту, где глутаминовая кислота находится в любом положении вдоль пептидной цепи.

В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит (глутаминовую кислоту)-(глицин)₄ или (глицин)₄-(глутаминовую кислоту).

В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит (β-аланин)-(глицин)₄-(серин), где серин находится в любом положении вдоль пептидной цепи.

В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит (глицин)₄-(серин)-(глутаминовую кислоту), где серин находится в любом положении вдоль пептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит (β-аланин)-(глицин)₄-(серин)-(глутаминовую кислоту), где серин находится в любом положении вдоль пептидной цепи.

В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит (глицин)₁₋₄-(серин), где:

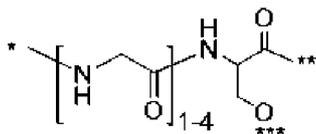
пептидная группа присоединена к L³, если присутствует, или к L^M, когда L³ отсутствует, через один из глицинов; пептидная группа присоединена к T¹, если присутствует, через серин; и пептидная группа присоединена к L^D, если присутствует, через серин.

В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит (серин)-(глицин)₁₋₄, где:

пептидная группа присоединена к L³, если присутствует, или к L^M, когда L³ отсутствует, через серин; пептидная группа присоединена к T¹, если присутствует, через глицин; и пептидная группа присоединена к L^D, если присутствует, через серин.

Понятно, что для вариантов осуществления пептидной группы, * указывает на присоединение к L³, если присутствует, или к L^M, когда L³ отсутствует. В некоторых вариантах осуществления, ** указывает на присоединение к T¹, если присутствует, или -ОН, если T¹ отсутствует. В некоторых вариантах осуществления, *** указывает на присоединение к L^D, если присутствует, или к водороду, если L^D отсутствует.

В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит



В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит (глицин)-(серин), где:

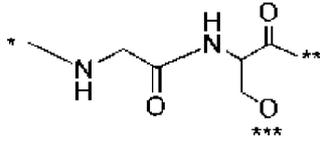
пептидная группа присоединена к L³, если присутствует, или к L^M, когда L³ отсутствует, через глицин; пептидная группа присоединена к T¹, если присутствует, через

серин; и пептидная группа присоединена к L^D , если присутствует, через серин.

В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит (глицин)- (серин), где:

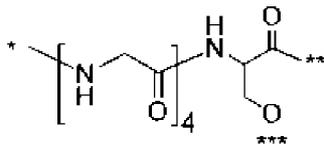
пептидная группа присоединена к L^3 , если присутствует, или к L^M , когда L^3 отсутствует, через серин; пептидная группа присоединена к T^1 , если присутствует, через глицин; и пептидная группа присоединена к L^D , если присутствует, через серин.

В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит



В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит (глицин)₄- (серин), где:

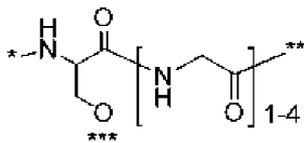
пептидная группа присоединена к L^3 , если присутствует, или к L^M , когда L^3 отсутствует, через один из глицинов; пептидная группа присоединена к T^1 , если присутствует, через серин; и пептидная группа присоединена к L^D , если присутствует, через серин. В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит



В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит (серин)- (глицин)₁₋₄, где:

пептидная группа присоединена к L^3 , если присутствует, или к L^M , когда L^3 отсутствует, через серин; пептидная группа присоединена к T^1 , если присутствует, через один из глицинов; и пептидная группа присоединена к L^D , если присутствует, через серин.

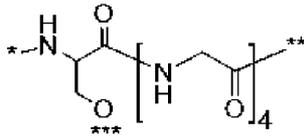
В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит



В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит (серин)- (глицин)₄, где:

пептидная группа присоединена к L^3 , если присутствует, или к L^M , когда L^3 отсутствует, через серин; пептидная группа присоединена к T^1 , если присутствует, через один из глицинов; и пептидная группа присоединена к L^D , если присутствует, через серин.

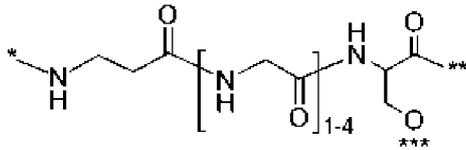
В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит



В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит (β-аланин)-(глицин)₁₋₄-(серин), где:

пептидная группа присоединена к L^3 , если присутствует, или к L^M , когда L^3 отсутствует, через β-аланин; пептидная группа присоединена к T^1 , если присутствует, через серин; и пептидная группа присоединена к L^D , если присутствует, через серин

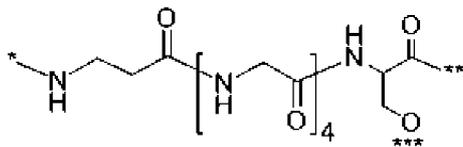
В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит



В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит (β-аланин)-(глицин)₄-(серин), где:

пептидная группа присоединена к L^3 , если присутствует, или к L^M , когда L^3 отсутствует, через β-аланин; пептидная группа присоединена к T^1 , если присутствует, через серин; и пептидная группа присоединена к L^D , если присутствует, через серин.

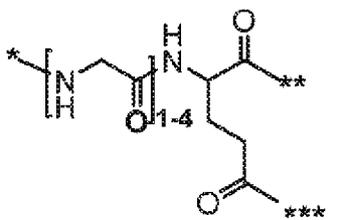
В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит



В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит (глицин)₁₋₄-(глутаминовую кислоту), где:

пептидная группа присоединена к L^3 , если присутствует, или к L^M , когда L^3 отсутствует, через один из глицинов; пептидная группа присоединена к T^1 , если присутствует, через глутаминовую кислоту; и пептидная группа присоединена к L^D , если присутствует, через глутаминовую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит

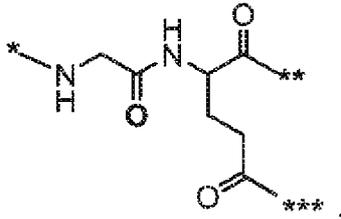


В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит (глицин)-(глутаминовую кислоту), где:

пептидная группа присоединена к L^3 , если присутствует, или к L^M , когда L^3 отсутствует, через глицин; пептидная группа присоединена к T^1 , если присутствует, через

глутаминовую кислоту; и пептидная группа присоединена к L^D , если присутствует, через глутаминовую кислоту.

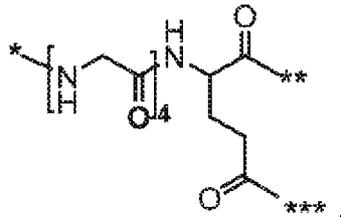
В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит



В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит (глицин)₄- (глутаминовую кислоту), где:

пептидная группа присоединена к L^3 , если присутствует, или к L^M , когда L^3 отсутствует, через один из глицинов; пептидная группа присоединена к T^1 , если присутствует, через глутаминовую кислоту; и пептидная группа присоединена к L^D , если присутствует, через глутаминовую кислоту.

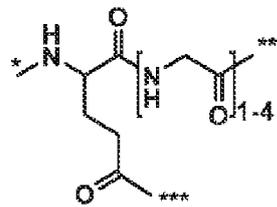
В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит



В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит (глутаминовую кислоту)-(глицин)₁₋₄, где:

пептидная группа присоединена к L^3 , если присутствует, или к L^M , когда L^3 отсутствует, через глутаминовую кислоту; пептидная группа присоединена к T^1 , если присутствует, через один из глицинов; и пептидная группа присоединена к L^D , если присутствует, через глутаминовую кислоту.

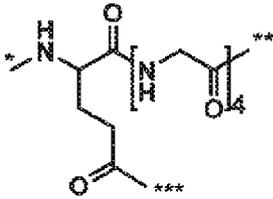
В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит



В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит (глутаминовую кислоту)-(глицин)₄, где:

пептидная группа присоединена к L^3 , если присутствует, или к L^M , когда L^3 отсутствует, через глутаминовую кислоту; пептидная группа присоединена к T^1 , если присутствует, через один из глицинов; и пептидная группа присоединена к L^D , если присутствует, через глутаминовую кислоту.

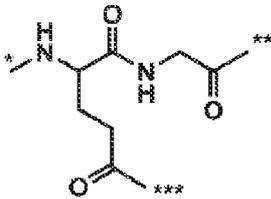
В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит



В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит (глутаминовую кислоту)-(глицин), где:

пептидная группа присоединена к L^3 , если присутствует, или к L^M , когда L^3 отсутствует, через глутаминовую кислоту; пептидная группа присоединена к T^1 , если присутствует, через один из глицинов; и пептидная группа присоединена к L^D , если присутствует, через глутаминовую кислоту.

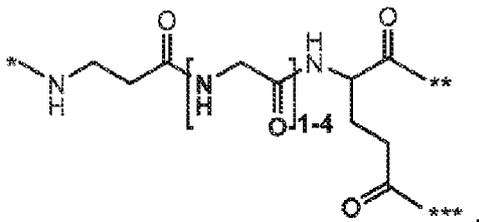
В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит



В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит (β -аланин)-(глицин)₁₋₄-(глутаминовую кислоту), где:

пептидная группа присоединена к L^3 , если присутствует, или к L^M , когда L^3 отсутствует, через β -аланин; пептидная группа присоединена к T^1 , если присутствует, через глутаминовую кислоту; и пептидная группа присоединена к L^D , если присутствует, через глутаминовую кислоту.

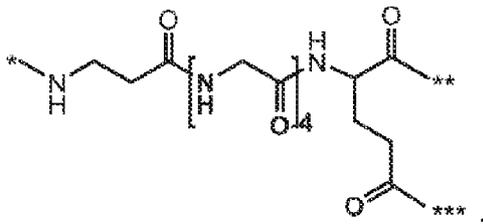
В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит



В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит (β -аланин)-(глицин)₄-(глутаминовую кислоту), где:

пептидная группа присоединена к L^3 , если присутствует, или к L^M , когда L^3 отсутствует, через β -аланин; пептидная группа присоединена к T^1 , если присутствует, через глутаминовую кислоту; и пептидная группа присоединена к L^D , если присутствует, через глутаминовую кислоту.

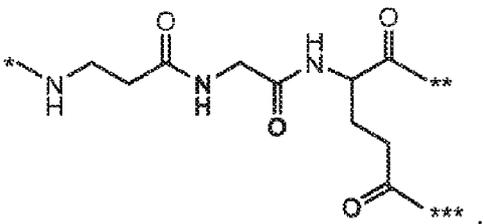
В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит



В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит (β-аланин)-(глицин)-(глутаминовую кислоту), где:

пептидная группа присоединена к L^3 , если присутствует, или к L^M , когда L^3 отсутствует, через β-аланин; пептидная группа присоединена к T^1 , если присутствует, через глутаминовую кислоту; и пептидная группа присоединена к L^D , если присутствует, через глутаминовую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления, пептидная группа содержит



Переменная L^D и W^D

В некоторых вариантах осуществления, каждый случай L^D независимо представляет собой двухвалентную линкерную группу, соединяющий D с M^A и содержит, по меньшей мере, одну расщепляемую связь, так что при расщеплении связи D высвобождается в активной форме для предполагаемого терапевтического эффекта.

В некоторых вариантах осуществления, L^D является компонентом высвобождаемой сборочной единицы. В некоторых вариантах осуществления, L^D представляет собой высвобождаемую сборочную единицу. В некоторых вариантах осуществления, L^D содержит одну расщепляемую связь. В некоторых вариантах осуществления, L^D содержит несколько сайтов расщепления или связей.

В некоторых вариантах осуществления, функциональные группы для образования расщепляемой связи могут включать, например, сульфгидрильные группы для образования дисульфидных связей, альдегидные, кетоновые или гидразиновые группы для образования гидразоновых связей, гидроксиламиновые группы для образования оксимных связей, карбоксильные или аминогруппы для образования пептидных связей, карбоксильные или гидроксильные группы для образования сложноэфирных связей и сахара для образования гликозидных связей. В некоторых вариантах осуществления, L^D включает дисульфидную связь, которая расщепляется посредством дисульфидного обмена, кислотолабильную связь, которая расщепляется при кислотном pH, и/или связи, которые расщепляются гидролазами. В некоторых вариантах осуществления, L^D включает карбаматную связь (т.е. $-OC(O)-NR-$, где R представляет собой водород или алкил или подобное).

В некоторых вариантах осуществления, структура и последовательность

расщепляемой связи в L^D могут быть такими, что связь расщепляется под действием ферментов, присутствующих в сайте-мишени. В некоторых вариантах осуществления, расщепляемая связь может быть расщеплена другими механизмами.

В некоторых вариантах осуществления, структура и последовательность расщепляемых связей в L^D могут быть такими, что связи расщепляются под действием ферментов, присутствующих в сайте-мишени. В некоторых вариантах осуществления, расщепляемые связи могут быть расщеплены другими механизмами.

В некоторых вариантах осуществления, расщепляемая(ые) связь(и) может быть ферментативно расщеплена одним или несколькими ферментами, включая опухолеассоциированную протеазу, с высвобождением единицы лекарственного средства или D, где конъюгат по настоящему изобретению, или его промежуточное соединение, или каркас, протонируется *in vivo* при высвобождении, чтобы обеспечить единицу лекарственного средства или D.

В некоторых вариантах осуществления, L^D может содержать одну или несколько аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, каждая аминокислота в L^D может быть природной или неприродной и/или D или L изомером, при условии, что существует расщепляемая связь. В некоторых вариантах осуществления, L^D содержит альфа, бета или гамма аминокислоту, которая может быть природной или неприродной. В некоторых вариантах осуществления, L^D составляет от 1 до 12 (например, от 1 до 6, или от 1 до 4, или от 1 до 3, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12) аминокислот в непрерывной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления, L^D может содержать природные аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления, L^D может содержать аминокислоты неприродного происхождения. В некоторых вариантах осуществления, L^D не содержит природные аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления, L^D не содержит аминокислоты не природного происхождения. В некоторых вариантах осуществления, L^D может содержать природную аминокислоту, связанную с аминокислотой неприродного происхождения. В некоторых вариантах осуществления, L^D может содержать природную аминокислоту, связанную с D изомером природной аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления, L^D содержит дипептид, такой как -Val-Cit-, -Phe-Lys- или -Val-Ala-.

В некоторых вариантах осуществления, L^D содержит монопептидную, дипептидную, трипептидную, тетрапептидную, пентапептидную, гексапептидную, гептапептидную, октапептидную, нонапептидную, декапептидную, ундекапептидную или додекапептидную единицу.

В некоторых вариантах осуществления, L^D содержит пептид (например, из 1-12 аминокислот), который конъюгирован непосредственно с единицей лекарственного средства. В некоторых таких вариантах осуществления, пептид представляет собой одну аминокислоту. В некоторых таких вариантах осуществления, пептид представляет собой дипептид.

В некоторых вариантах осуществления, каждая аминокислота в L^D независимо выбрана из аланина, β -аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, аспарагина, гистидина, глицина, глутаминовой кислоты, глутамина, фенилаланина, лизина, лейцина, серина, тирозина, треонина, изолейцина, пролина, триптофана, валина, цистеина, метионина, селеноцистеина, орнитина, пеницилламина, аминоалкановой кислоты, аминоалкиновой кислоты, аминоалкандикислоты, аминокислоты бензойной кислоты, аминокислоты гетероциклоалкановой кислоты, гетероциклокарбоновой кислоты, цитруллина, статины, диаминоалкановой кислоты и их производных.

В некоторых вариантах осуществления, каждая аминокислота независимо выбрана из аланина, β -аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, аспарагина, гистидина, глицина, глутаминовой кислоты, глутамина, фенилаланина, лизина, лейцина, серина, тирозина, треонина, изолейцина, пролина, триптофана, валина, цитруллина и их производных.

В некоторых вариантах осуществления, каждая аминокислота выбрана из протеиногенных и не протеиногенных аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления, каждая аминокислота в L^D может быть независимо выбрана из L или D изомеров следующих аминокислот: аланина, β -аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, аспарагина, цистеина, гистидина, глицина, глутаминовой кислоты, глутамина, фенилаланина, лизина, лейцина, метионина, серина, тирозина, треонина, триптофана, пролина, орнитина, пеницилламина, аминоалкиновой кислоты, аминоалкандикислоты, гетероциклокарбоновой кислоты, цитруллина, статины, диаминоалкановой кислоты, валина, цитруллина и их производных.

В некоторых вариантах осуществления, каждая аминокислота в L^D независимо представляет собой цистеин, гомоцистеин, пеницилламин, орнитин, лизин, серин, треонин, глицин, глутамин, аланин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, селеноцистеин, пролин, глицин, изолейцин, лейцин, метионин, валин, цитруллин или аланин.

В некоторых вариантах осуществления, каждая аминокислота в L^D независимо выбрана из L-изомеров следующих аминокислот: аланина, β -аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, аспарагина, гистидина, глицина, глутаминовой кислоты, глутамина, фенилаланина, лизина, лейцина, серина, тирозина, треонина, изолейцина, триптофана, цитруллина и валина.

В некоторых вариантах осуществления, каждая аминокислота в L^D независимо выбрана из D изомеров следующих аминокислот: аланина, β -аланина, аргинина, аспарагиновой кислоты, аспарагина, гистидина, глицина, глутаминовой кислоты, глутамина, фенилаланина, лизина, лейцина, серина, тирозина, треонина, изолейцина, триптофана, цитруллина и валина.

В некоторых вариантах осуществления, каждая аминокислота в L^D представляет собой аланин, β -аланин, глутамин, глутаминовую кислоту, изоглутаминовую кислоту, изоаспарагиновую кислоту, валин, цитруллин или аспарагиновую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления, L^D содержит β -аланин. В некоторых

вариантах осуществления, L^D содержит (β -аланин)-(аланин). В некоторых вариантах осуществления, L^D содержит (β -аланин) и, необязательно, аланин, глутаминовую кислоту, глутамин, изоглутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, изоаспарагиновую кислоту, валин, (валин)-(аланин), (аланин)-(аланин) или (валин)-(цитрулин).

В некоторых вариантах осуществления, L^D содержит (глутаминовую кислоту)-(аланин).

В некоторых вариантах осуществления, L^D содержит (β -аланин)-(глутамин).

В некоторых вариантах осуществления, L^D содержит (β -аланин)-(глутамин))-(аланин).

В некоторых вариантах осуществления, L^D содержит глутаминовую кислоту и, необязательно, аланин, глицин, изоглутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту, изоаспарагиновую кислоту, валин, (валин)-(аланин), (аланин)-(аланин) или (валин)-(цитрулин).

В некоторых вариантах осуществления, L^D содержит 2,3-диаминопропановую кислоту. В некоторых вариантах осуществления, W_w содержит (R)-2,3-диаминопропановую кислоту. В некоторых вариантах осуществления, W_w содержит глутаминовую кислоту. В некоторых вариантах осуществления, W_w содержит (глутаминовую кислоту)-(аланин). В некоторых вариантах осуществления, L^D содержит (глутаминовую кислоту)-(глицин)-(аланин).

В некоторых вариантах осуществления, L^D содержит L-глутаминовую кислоту, D-глутаминовую кислоту, (L-глутаминовую кислоту)-(L-аланин), (L-глутаминовую кислоту)-(D-аланин), (D-глутаминовую кислоту)-(L-аланин), (D-глутаминовую кислоту)-(D-аланин), (L-глутаминовую кислоту)-(глицин)-(L-аланин), (D-глутаминовую кислоту)-(глицин)-(D-аланин), (L-глутаминовую кислоту)-(глицин)-(D-аланин) или (D-глутаминовую кислоту)-(глицин)-(L-аланин). В некоторых вариантах осуществления, L^D содержит карбаматную связь в дополнение к одной или нескольким аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления, L^D может сконструирован и оптимизирован по селективности в отношении ферментативного расщепления конкретным ферментом. В некоторых вариантах осуществления, конкретный фермент представляет собой опухолеассоциированную протеазу. В некоторых вариантах осуществления, L^D содержит связь, расщепление которой катализируется катепсином В, С и D или плазминовой протеазой.

В некоторых вариантах осуществления, L^D содержит сайт расщепления сахара. В некоторых вариантах осуществления, L^D содержит фрагмент сахара (Su), связанный кислородной гликозидной связью с саморазрушающейся группой. В некоторых вариантах осуществления, «саморазрушающаяся группа» может представлять собой трехфункциональную химическую группу, которая способна ковалентно связывать вместе три разнесенные химические группы (т.е. сахарную группу (через гликозидную связь), единицу лекарственного средства (прямо или косвенно) и M^A (прямо или косвенно). В некоторых вариантах осуществления, гликозидная связь может быть расщеплена в сайте-

мишени, чтобы инициировать последовательность реакций самоуничтожения, которая приводит к высвобождению лекарственного средства.

Терапевтические агенты, группа лекарственного средства или D

В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент представляет собой малую молекулу с молекулярной массой \leq примерно 5 кДа (например, с молекулярной массой \leq примерно 4 кДа, \leq примерно 3 кДа, \leq примерно 1,5 кДа или \leq примерно 1 кДа).

В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент имеет IC_{50} примерно менее 1 нМ. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент имеет IC_{50} менее 1 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент имеет IC_{50} примерно больше 1 нМ (например, терапевтический агент имеет IC_{50} примерно от 1 до 50 нМ). В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент имеет IC_{50} примерно более 1 нМ. В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент имеет IC_{50} более 1 нМ (например, терапевтический агент имеет IC_{50} от 1 до 50 нМ). В некоторых вариантах осуществления, терапевтический агент имеет IC_{50} более 1 нМ.

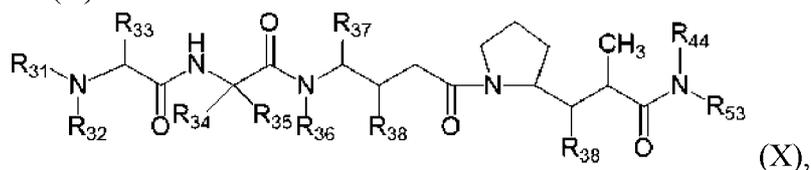
В некоторых вариантах осуществления, некоторые терапевтические агенты, имеющие IC_{50} более чем примерно 1 нМ (например, «менее эффективные лекарственные средства»), не подходят для конъюгации с антителом с использованием известных в данной области техники методов конъюгации. Не желая быть связанными какой-либо теорией, такие терапевтические агенты обладают эффективностью, недостаточной для использования в таргетных конъюгатах антитело-лекарственное средство с использованием традиционных методов, поскольку достаточное количество копий лекарственного средства (т.е. более 8) не может быть конъюгировано с использованием известных в данной области техники методов без снижения фармакокинетических и физико-химических свойств конъюгата. В некоторых вариантах осуществления, достаточно высокие нагрузки этих менее эффективных лекарственных средств могут быть достигнуты с использованием описанных в настоящем документе стратегий конъюгации, что приводит к высоким нагрузкам терапевтического агента при сохранении желаемых фармакокинетических и физико-химических свойств. В некоторых вариантах осуществления, описание относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, который включает антитело, каркас и, по меньшей мере, восемь групп терапевтического агента, где терапевтический агент имеет IC_{50} более чем примерно 1 нМ.

В некоторых вариантах осуществления, лекарственное средство представляет собой производное (a) соединения ауристатиона; (b) соединения калихеамицина; (c) соединения дуокармицина; (d) SN38, (e) пирролобензодиазепина; (f) соединения барвинка; (g) тубулизинового соединения; (h) неприродного соединения камптотецина; (i) соединения майтансиноида; (j) ДНК-связывающего лекарственного средства; (k) ингибитора киназы; (l) ингибитора MEK; (m) ингибитора KSP; (n) ингибитора топоизомеразы; (o) ДНК-алкилирующего препарата; (p) РНК-полимеразы; (q) ингибитора PARP; (r) ингибитора NAMPT; (s) ингибитора топоизомеразы; (t) ингибитора синтеза

белка; (u) ДНК-связывающего лекарственного средства; (v) лекарственного средства для интеркаляции ДНК; или (w) иммуномодулирующего соединения, как описано в US 2018/0154018, содержание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления, лекарственное средство, используемое в описании, представляет собой ауристин F-гидроксипропиламид-L-аланин.

В некоторых вариантах осуществления, ауристин представляет собой соединение Формулы (X):



где:

каждый из R_{31} и R_{32} независимо представляет собой водород или C_{1-8} алкил, и самое большее, один из R_{31} и R_{32} представляет собой H;

R_{33} представляет собой водород, C_{1-8} алкил, C_{3-8} карбоцикл, C_{6-10} арил, C_{1-8} алкил- C_{6-10} арил, X^1 -(C_{3-8} карбоцикл), C_{3-8} гетероцикл или X^1 -(C_{3-8} гетероцикл);

R_{34} представляет собой водород, C_{1-8} алкил, C_{3-8} карбоцикл, C_{6-10} арил, X^1 - C_{6-10} арил, X^1 -(C_{3-8} карбоцикл), C_{3-8} гетероцикл, или X^1 -(C_{3-8} гетероцикл);

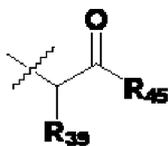
R_{35} представляет собой водород или метил;

или R_{34} и R_{35} вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют карбоциклическое кольцо, имеющее формулу $-(CR_{55}R_{41})_b-$, где каждый из R_{55} и R_{41} независимо представляет собой водород или C_{1-8} алкил и b представляет собой целое число от 3 до 7;

R_{36} представляет собой водород или C_{1-8} алкил;

R_{37} представляет собой водород, C_{1-8} алкил, C_{3-8} карбоцикл, C_{6-10} арил, $-X^1$ - C_{6-10} арил, $-X^1$ -(C_{3-8} карбоцикл), C_{3-8} гетероцикл или $-X^1$ -(C_{3-8} гетероцикл);

каждый R_{38} независимо представляет собой водород, OH, C_{1-8} алкил, C_{3-8} карбоцикл или O-(C_{1-8} алкил);



R_{53} представляет собой: R_{39} или R_{54} ;

R_{39} представляет собой водород, C_{1-8} алкил, C_{6-10} арил, $-X^1$ - C_{6-10} арил, C_{3-8} карбоцикл, C_{3-8} гетероцикл, $-X^1$ - C_{3-8} гетероцикл, $-C_{1-8}$ алкилен- NH_2 или $(CH_2)_2SCH_3$;

каждый X^1 независимо представляет собой C_{1-10} алкилен или C_{3-10} циклоалкилен;

R_{44} представляет собой водород или C_{1-8} алкил;

R_{45} представляет собой X^3 - R_{42} или $NH-R_{19}$;

X^3 представляет собой O или S;

R_{19} представляет собой водород, OH, аминогруппу, C_{1-8} алкиламино или -

$[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{22}$;

R_{42} представляет собой аминогруппу, C_{1-6} алкиламино или $-[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{22}$;

каждый из R_{20} и R_{21} независимо представляет собой водород, C_{1-6} алкил, C_{6-10} арил, гидроксильированный C_{6-10} арил, полигидроксильированный C_{6-10} арил, 5-12-членный гетероцикл, C_{3-8} циклоалкил, гидроксильированный C_{3-8} циклоалкил, полигидроксильированный C_{3-8} циклоалкил или боковую цепь природной или неприродной аминокислоты;

R_{22} представляет собой $-OH$, $-NHR_{23}$, $-COOH$, $-R_{82}-C(O)(CH_2)_e-C(H)(R_{23})-N(H)(R_{23})$, $-R_{82}-C(O)(CH_2)_d-(OCH_2-CH_2)_f-N(H)(R_{23})$ или $-R_{82}-C(O)-CH(X^2)-NH_d-R_{77}$;

каждый R_{23} независимо представляет собой водород, C_{1-6} алкил, C_{6-10} арил, C_{3-8} циклоалкил, $-COOH$ или $-COO-C_{1-6}$ алкил;

X^2 представляет собой боковую цепь природной или неприродной аминокислоты;

R_{77} представляет собой водород, или X^2 и NR_{77} образуют азотсодержащее циклическое соединение;

R_{82} представляет собой $-NR_{23}$ или кислород;

R_{54} представляет собой $-C(R_{56})_2-C(R_{56})_2-C_{6-10}$ арил, $-C(R_{56})_2-C(R_{56})_2-C_{3-8}$ гетероцикл или $-C(R_{56})_2-C(R_{56})_2-C_{3-8}$ карбоцикл;

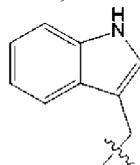
R_{56} независимо представляет собой H , OH , C_{1-8} алкил, C_{3-8} карбоцикл, $-OC_{1-8}$ алкил, $-OC(O)-R_{29}$ или $-OR_{23}-OC_{1-6}$ алкил- NH_2 ;

R_{29} представляет собой аминогруппу, 5-12-членный гетероциклоалкил, $-R_{28}-C_{1-6}$ алкил- R_{22} , $R_{28}-C_{5-12}$ гетероциклоалкил- C_{1-6} алкил- R_{22} , $-[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{22}$ или $-R_{28}-C_{1-6}$ алкил- C_{6-12} арил- C_{1-6} алкил- R_{22} ; или R_{29} представляет собой R_{47} , как определено в настоящем документе;

R_{28} отсутствует, представляет собой NR_{23} или кислород;

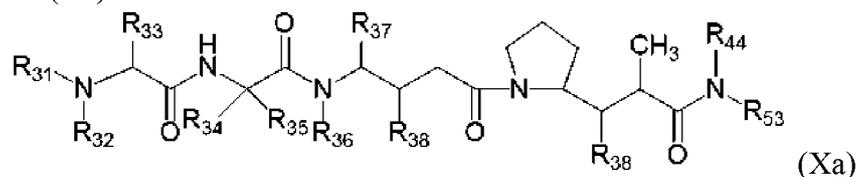
a представляет собой целое число от 1 до 6; c представляет собой целое число от 0 до 3; d представляет собой целое число от 1 до 3; и f представляет собой целое число от 1 до 12.

В некоторых вариантах осуществления, в соединении ауристатина Формулы (X):



R_{39} представляет собой бензил или ; и R_{44} представляет собой водород.

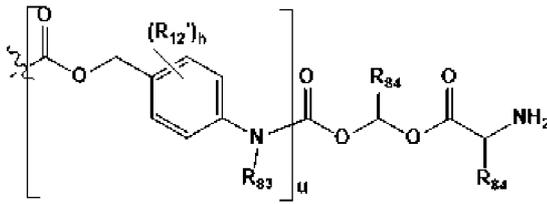
В некоторых вариантах осуществления, ауристатин представляет собой соединение формулы (Xa):



где:

R_{33} - R_{38} и R_{44} имеют значения, указанные в настоящем документе,

один из R_{31} и R_{32} представляет собой водород или C_{1-8} алкил, и другой представляет собой:



где:

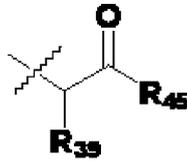
R_{83} представляет собой водород или CH_3 ;

R_{84} представляет собой C_{1-6} алкил или C_{6-10} арил;

каждый R_{12}' независимо представляет собой галоген, $-C_{1-8}$ алкил, $-OC_{1-8}$ алкил, нитро или циано;

h представляет собой целое число от 0 до 4;

u представляет собой целое число 0 или 1;



R_{53} представляет собой: R_{39} или R_{54}

R_{39} представляет собой водород, C_{1-8} алкил, C_{6-10} арил, $-X^1-C_{6-10}$ арил, C_{3-8} карбоцикл, C_{3-8} гетероцикл, $-X^1-C_{3-8}$ гетероцикл, $-C_{1-8}$ алкилен- NH_2 , или $(CH_2)_2SCH_3$,

каждый X^1 независимо представляет собой C_{1-10} алкилен или C_{3-10} циклоалкилен;

R_{45} представляет собой X^3-R_{42} или $NH-R_{19}$;

X^3 представляет собой O или S;

R_{19} представляет собой водород, OH, аминогруппу, C_{1-8} алкиламино или $-[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{22}$;

R_{42} представляет собой водород, аминогруппу, C_{1-6} алкиламино или $-[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{22}$;

каждый из R_{20} и R_{21} независимо представляет собой водород, C_{1-6} алкил, C_{6-10} арил, гидроксированный C_{6-10} арил, полигидроксированный C_{6-10} арил, 5-12-членный гетероцикл, C_{3-8} циклоалкил, гидроксированный C_{3-8} циклоалкил, полигидроксированный C_{3-8} циклоалкил или боковую цепь природной или неприродной аминокислоты;

R_{22} представляет собой $-OH$, $-NHR_{23}$, $-COOH$, $-R_{82}-C(O)(CH_2)_c-C(H)(R_{23})-N(H)(R_{23})$, $-R_{82}-C(O)(CH_2)_d-(O-CH_2-CH_2)_f-N(H)(R_{23})$ или $-R_{82}-(C(O)-CH(X^2)-NH)_d-R_{77}$;

каждый R_{23} независимо представляет собой водород, C_{1-6} алкил, C_{6-10} арил, C_{3-8} циклоалкил, $-COOH$ или $-COO-C_{1-6}$ алкил;

X^2 представляет собой боковую цепь природной или неприродной аминокислоты;

R_{77} представляет собой водород, или X^2 и NR_{77} образуют азотсодержащее циклическое соединение;

R_{82} представляет собой $-NR_{23}$ или кислород;

R_{54} представляет собой $-C(R_{56})_2-C(R_{56})_2-C_{6-10}$ арил, $-C(R_{56})_2-C(R_{56})_2-C_{3-8}$ гетероцикл или $-C(R_{56})_2-C(R_{56})_2-C_{3-8}$ карбоцикл;

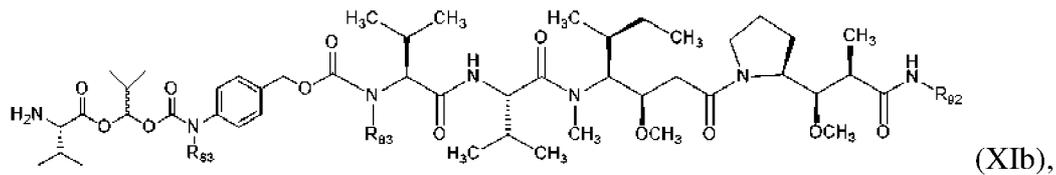
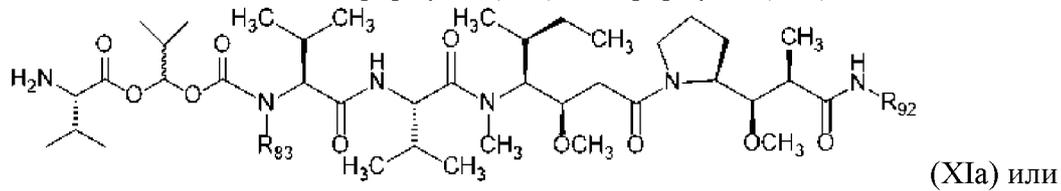
R_{56} независимо представляет собой водород, OH, C_{1-8} алкил, C_{3-8} карбоцикл, $-OC_{1-8}$ алкил, $-OC(O)-R_{29}$ или $-OR_{23}-OC_{1-6}$ алкил- NH_2 ;

R_{29} представляет собой аминогруппу, 5-12-членный гетероциклоалкил, $-R_{28}-C_{1-6}$ алкил- R_{22} , $R_{28}-C_{5-12}$ гетероциклоалкил- C_{1-6} алкил- R_{22} , $-[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{22}$ или $-R_{28}-C_{1-6}$ алкил- C_{6-12} арил- C_{1-6} алкил- R_{22} ; или R_{29} представляет собой R_{47} , как определено в настоящем документе;

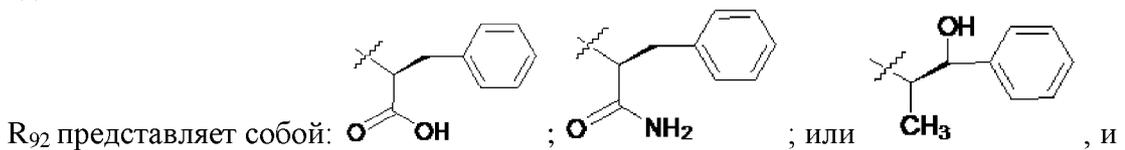
R_{28} отсутствует, NR_{23} или кислород;

a представляет собой целое число от 1 до 6; c представляет собой целое число от 0 до 3; d представляет собой целое число от 1 до 3; и f представляет собой целое число от 1 до 12.

В некоторых вариантах осуществления, соединение ауристатина формулы (Xa) представляет собой соединение формулы (XIa) или формулы (XIb):



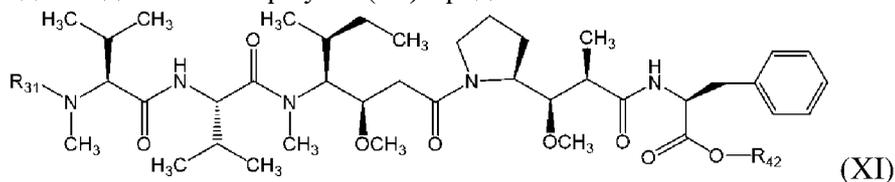
где:



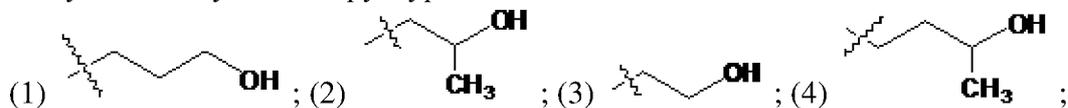
R_{83} представляет собой водород или CH_3 .

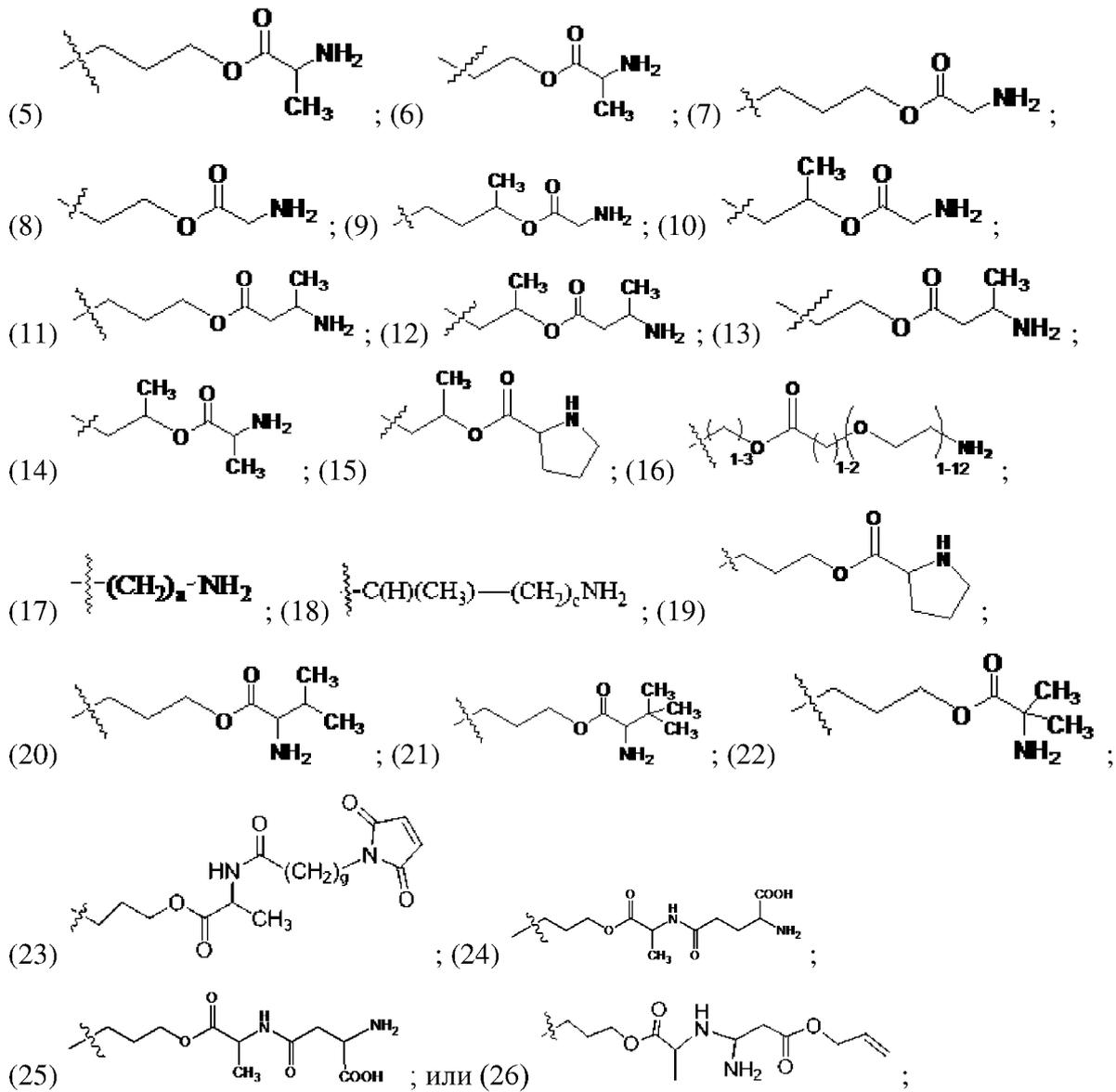
В некоторых вариантах осуществления, ауристатин формулы (X) представляет собой соединение формулы (XI), формулы (XII) или формулы (XIII):

где соединение Формулы (XI) представляет собой:



где R_{31} представляет собой водород или CH_3 , и R_{42} представляет собой $-CH_3$ или любую из следующих структур:

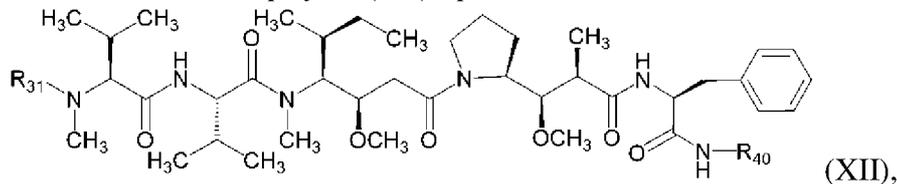




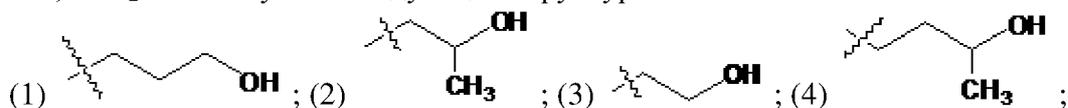
где:

a представляет собой целое число от 1 до 6; c представляет собой целое число от 0 до 3; и g представляет собой целое число от 2 до 6;

где соединение Формулы (XII) представляет собой:



где R₃₁ представляет собой водород или CH₃, и R₄₀ представляет собой водород, -OH, -NH₂ или любую из следующих структур:



где:

R_{31} представляет собой водород или CH_3 ;

R_{29} представляет собой аминогруппу, 5-12-членный гетероциклоалкил, $-R_{28}-C_{1-6}$ алкил- R_{22} , $R_{28}-C_{5-12}$ гетероциклоалкил- C_{1-6} алкил- R_{22} , $-R_{28}-[C(R_{20}R_{21})]_a-R_{22}$ или $-R_{28}-C_{1-6}$ алкил- C_{6-12} арил- C_{1-6} алкил- R_{22} ; или R_{29} представляет собой R_{47} , как определено в настоящем документе;

каждый из R_{20} и R_{21} независимо представляет собой водород, C_{1-6} алкил, C_{6-10} арил, гидроксильированный C_{6-10} арил, полигидроксильированный C_{6-10} арил, 5-12-членный гетероцикл, C_{3-8} циклоалкил, гидроксильированный C_{3-8} циклоалкил, полигидроксильированный C_{3-8} циклоалкил или боковая цепь природной или неприродной аминокислоты;

R_{22} представляет собой $-OH$, $-NHR_{23}$, $-COOH$, $-R_{82}-C(O)(CH_2)_c-C(H)(R_{23})-N(H)(R_{23})$, $-R_{82}-C(O)(CH_2)_d-(OCH_2-CH_2)_f-N(H)(R_{23})$ или $-R_{82}-C(O)-CH(X^2)-NH_d-R_{77}$;

каждый R_{23} независимо представляет собой водород, C_{1-6} алкил, C_{6-10} арил, C_{3-8} циклоалкил, $-COOH$ или $-COO-C_{1-6}$ алкил;

X^2 представляет собой боковую цепь природной или не встречающейся в природе аминокислоты;

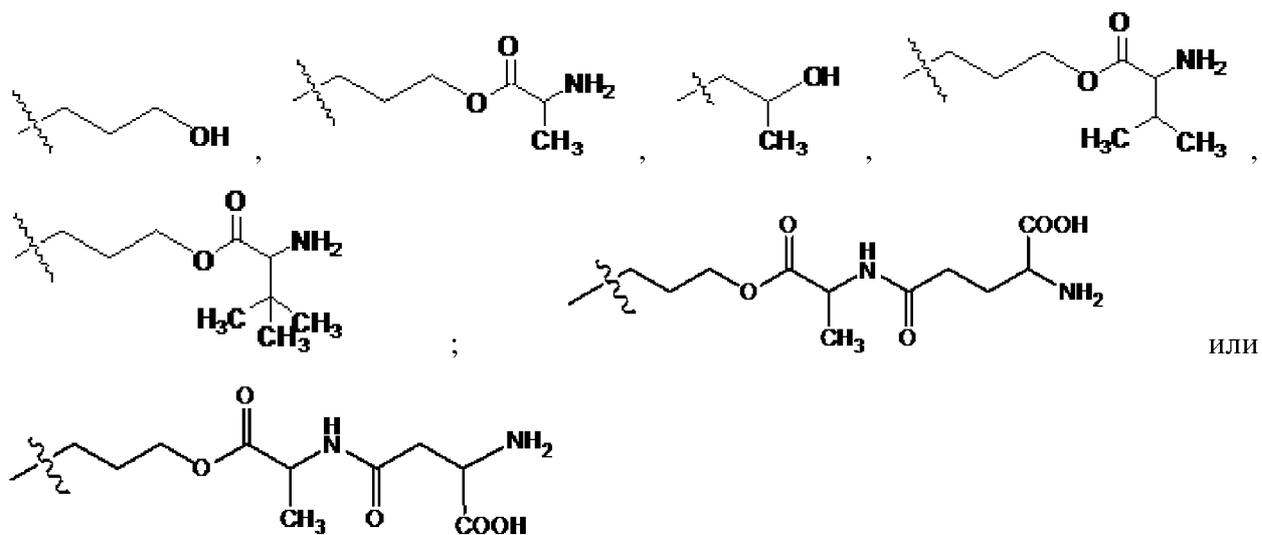
R_{77} представляет собой водород, или X^2 и NR_{77} образуют азотсодержащее циклическое соединение;

R_{82} представляет собой NR_{23} или кислород;

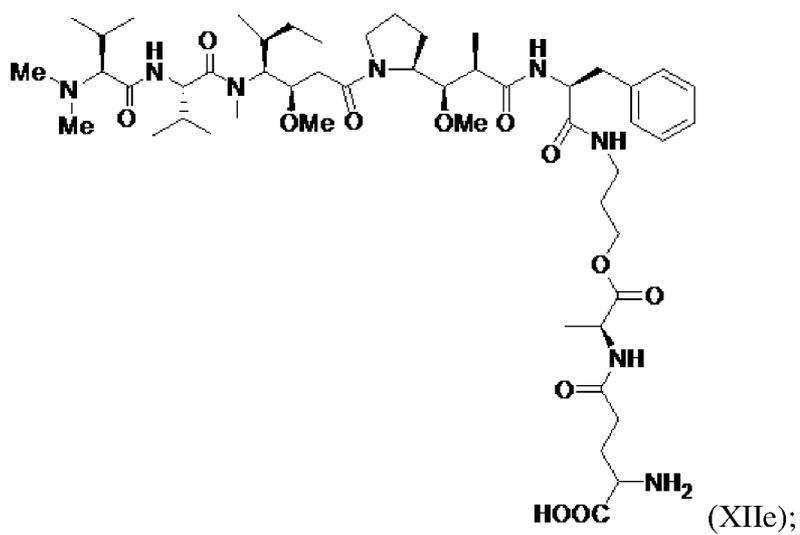
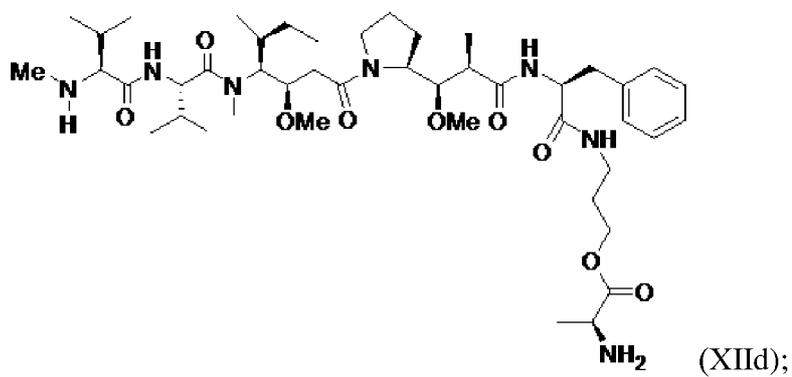
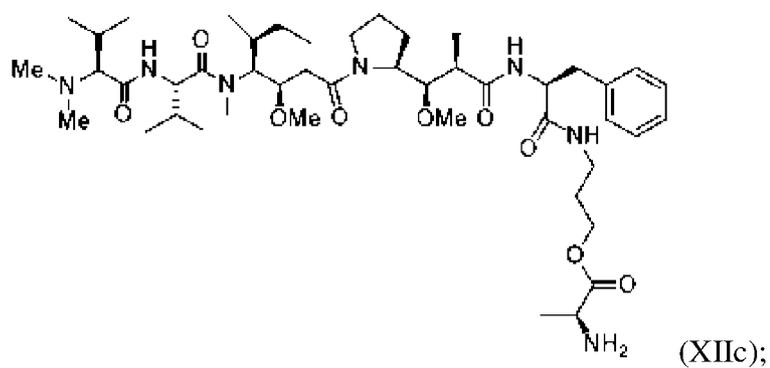
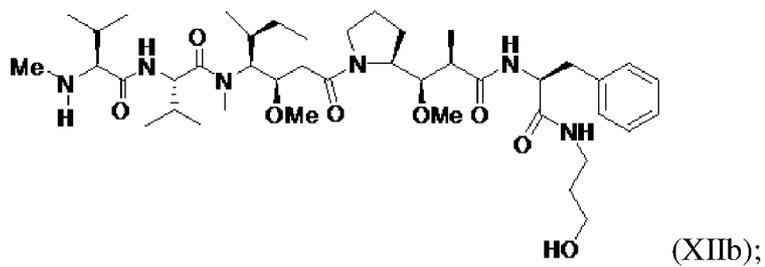
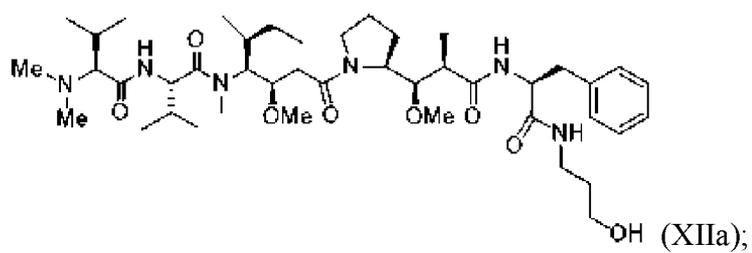
R_{28} отсутствует, представляет собой NR_{23} или кислород;

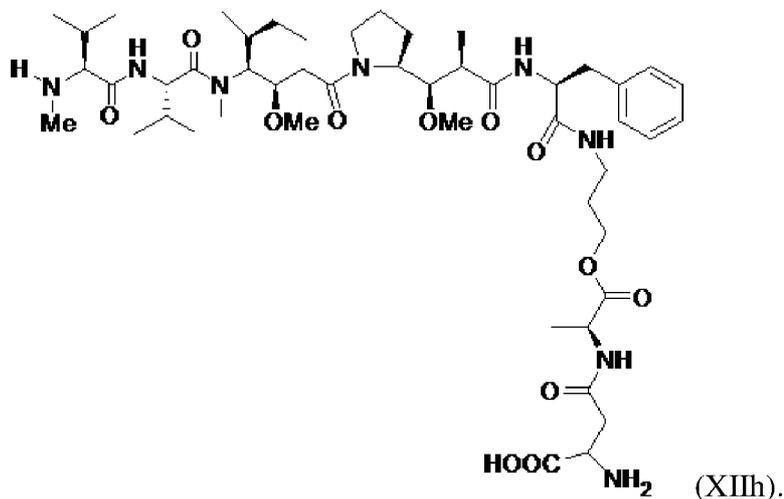
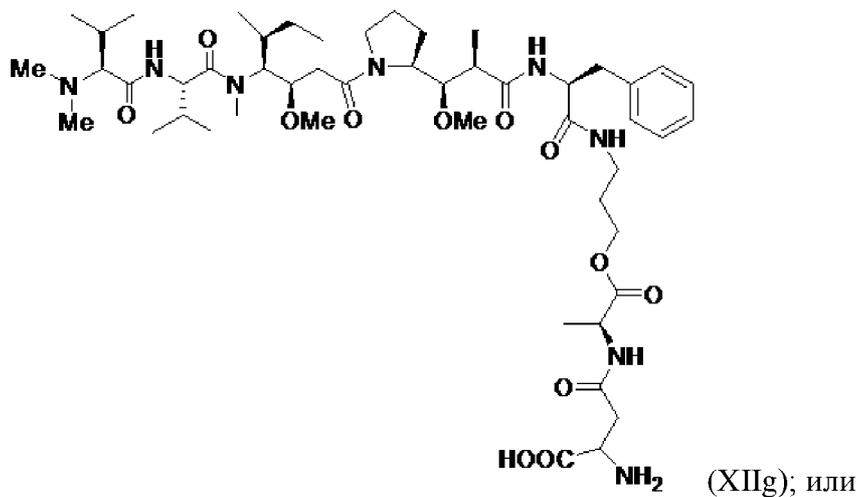
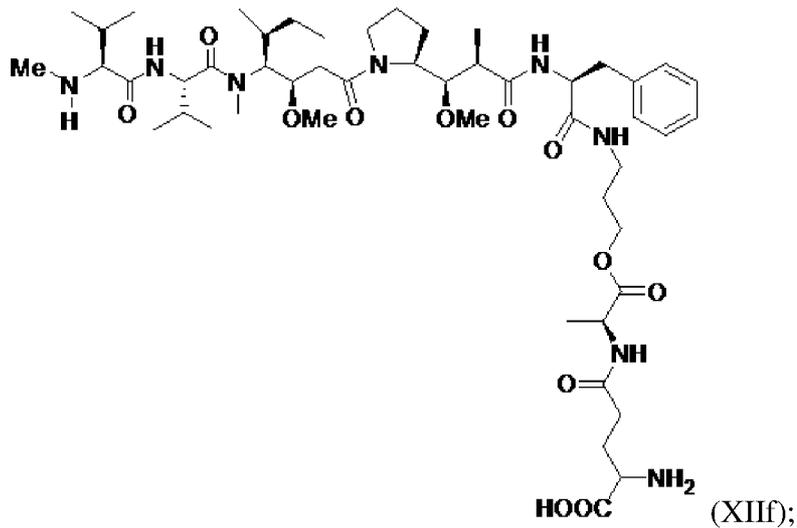
a представляет собой целое число от 1 до 6; c представляет собой целое число от 0 до 3; d представляет собой целое число от 1 до 3; и f представляет собой целое число от 1 до 12.

В некоторых вариантах осуществления, Формулы (XII), R_{40} представляет собой



В некоторых вариантах осуществления, соединение формулы (XII) представляет собой соединение формулы (XIIa), (XIIb), (XIIc), (XIId), (XIIe), (XII f), (XIIg) или (XIIh):





В некоторых вариантах осуществления, соединения формулы (XIII), R_{29} представляет собой $-NH_2$, 5-членный гетероциклоалкил, $-R_{28}-C_{1-6}$ алкил- R_{22} , $R_{28}-C_{5-12}$ гетероциклоалкил- C_{1-6} алкил- R_{22} или $-R_{28}-C_{1-6}$ алкил- C_{6-12} арил- C_{1-6} алкил- R_{22} ; или R_{29} представляет собой R_{47} , как определено в настоящем документе;

R_{28} отсутствует, представляет собой NR_{23} или кислород;

R_{22} представляет собой $-OH$, $-NHR_{23}$, $-COOH$, $-R_{82}-C(O)(CH_2)_c-C(H)(R_{23})-N(H)(R_{23})$, $-R_{82}-C(O)(CH_2)_d-(OCH_2-CH_2)_f-N(H)(R_{23})$ или $-R_{82}-(C(O)-CH(X^2)-NH)_d-R_{77}$;

каждый R_{23} независимо представляет собой водород, C_{1-6} алкил, C_{6-10} арил, C_{3-8} циклоалкил, $-COOH$ или $-COO-C_{1-6}$ алкил;

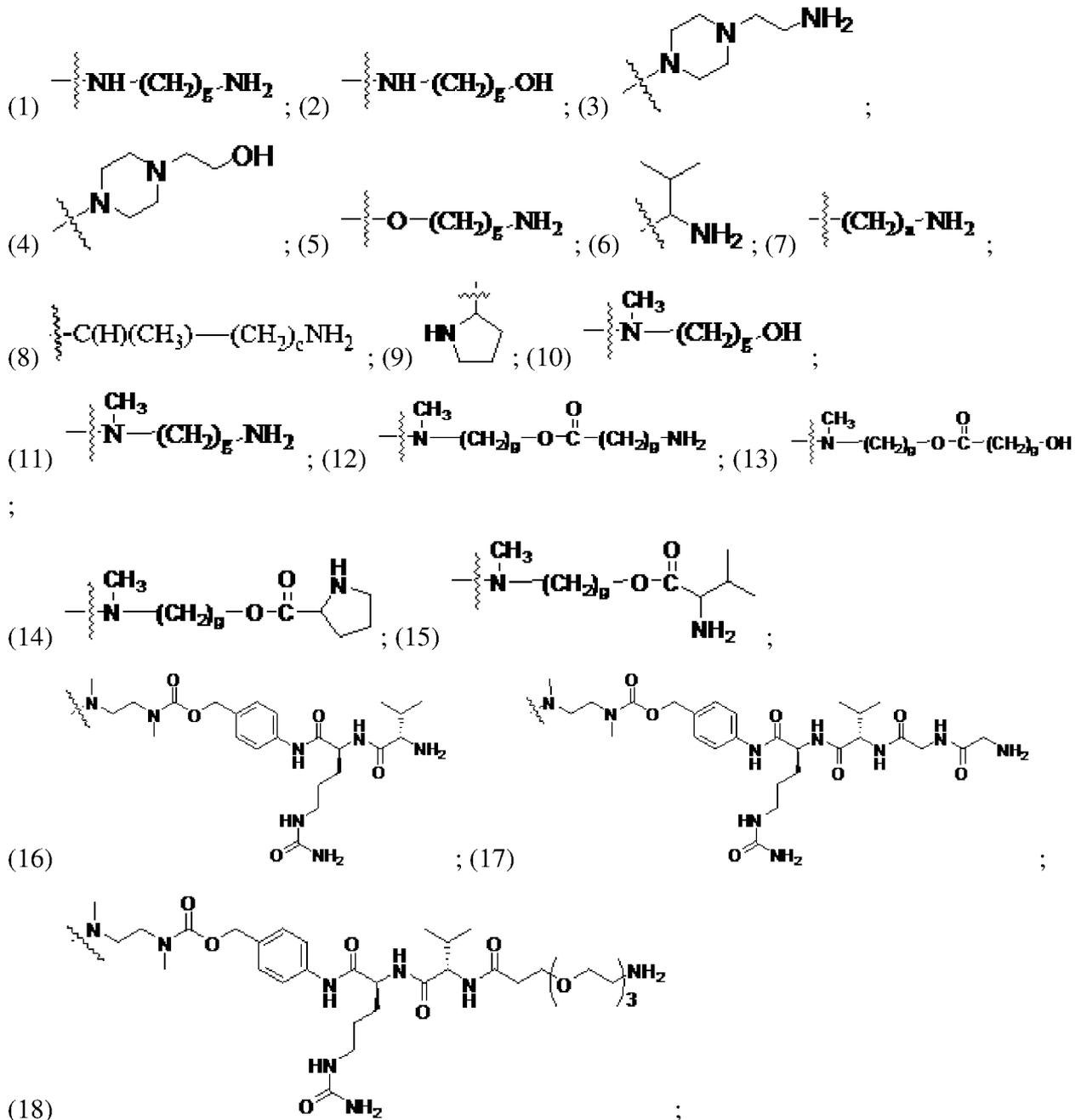
X^2 представляет собой боковую цепь природной или не встречающейся в природе аминокислоты;

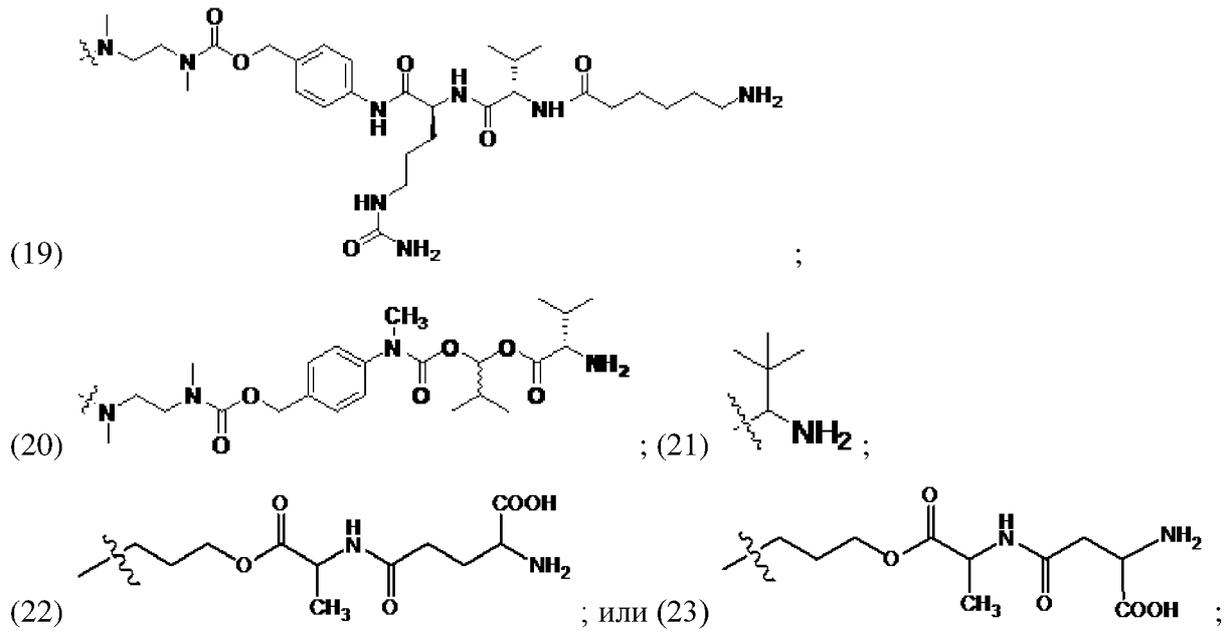
R_{77} представляет собой водород, или X^2 и NR_{77} образуют азотсодержащее циклическое соединение;

R_{82} представляет собой $-NR_{23}$ или кислород;

c представляет собой целое число от 0 до 3; d представляет собой целое число от 1 до 3; и f представляет собой целое число от 1 до 12.

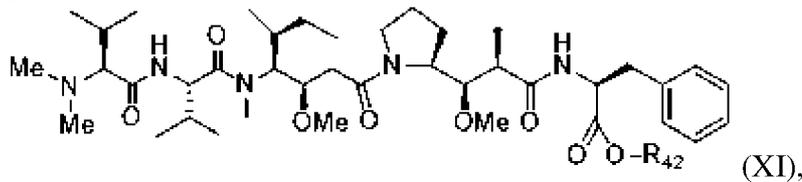
В некоторых вариантах осуществления, R_{29} представляет собой любую из следующих структур:

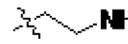
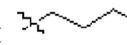


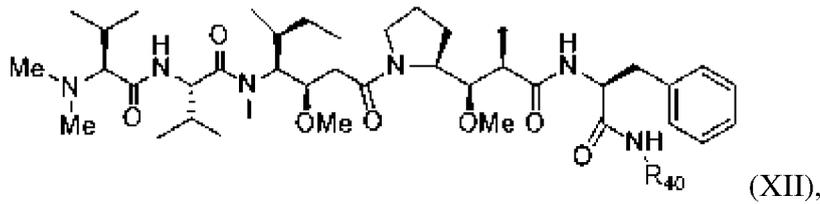


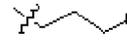
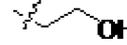
где:

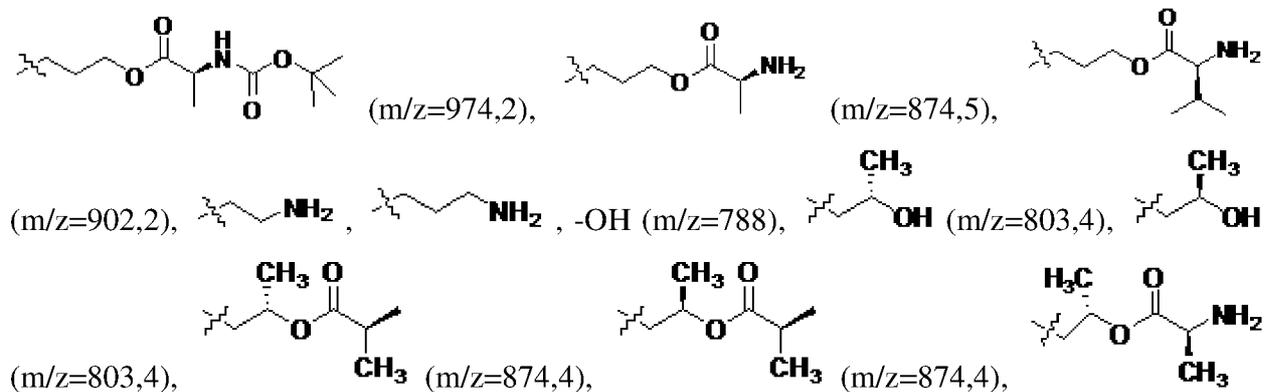
a представляет собой целое число от 1 до 6; c представляет собой целое число от 0 до 3; и g представляет собой целое число от 2 до 6.

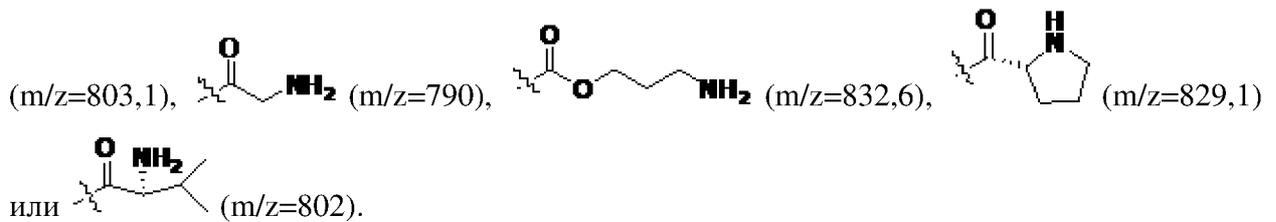
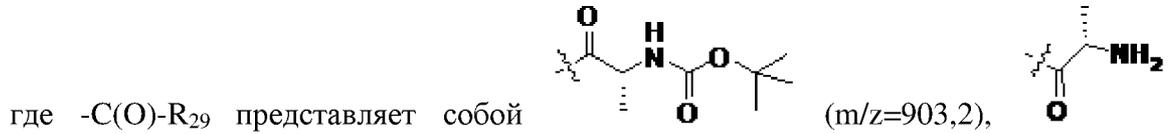
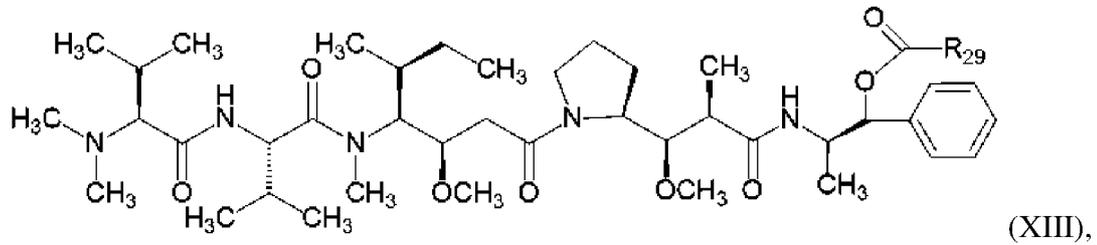
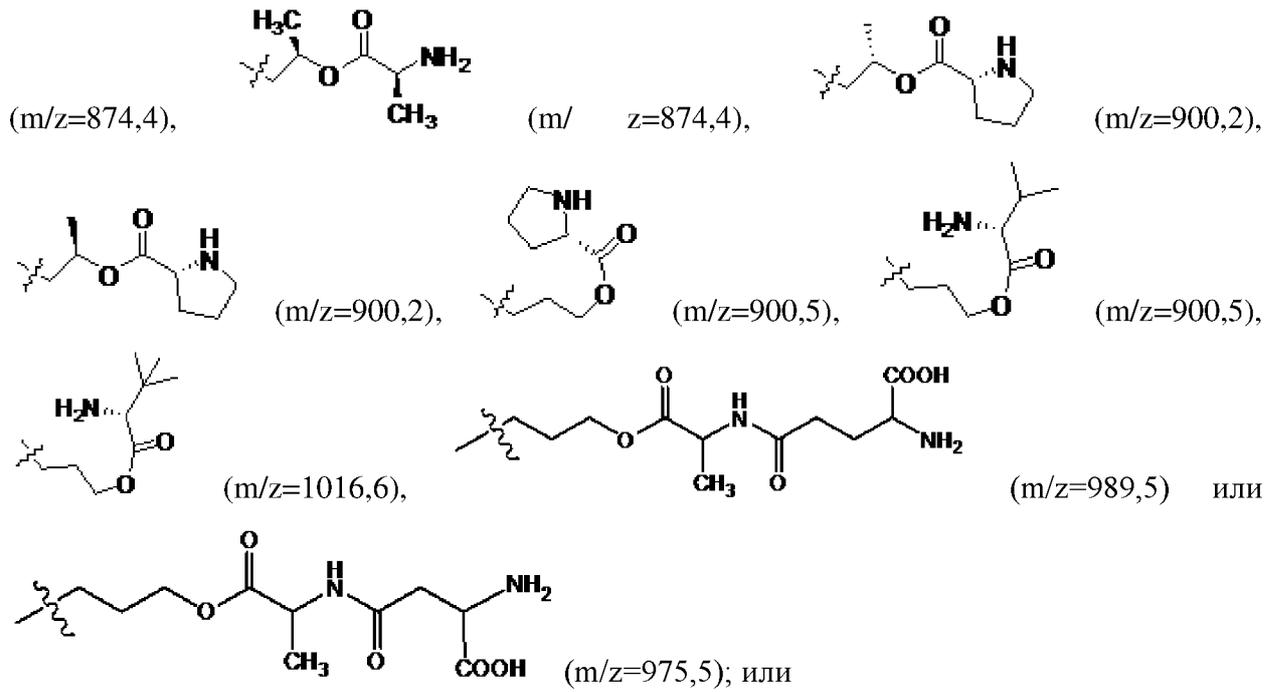


где R_{42} представляет собой H, $-CH_3$ ($m/z=760$),  NH_2 ($m/z=802,6$),  NH_2 ($m/z=790$) или  NH_2 ($m/z=804$);

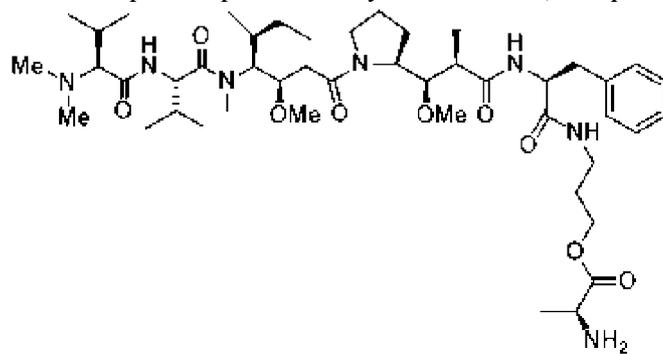


где R_{40} представляет собой H,  OH ($m/z=803,5$),  OH ($m/z=789,1$),

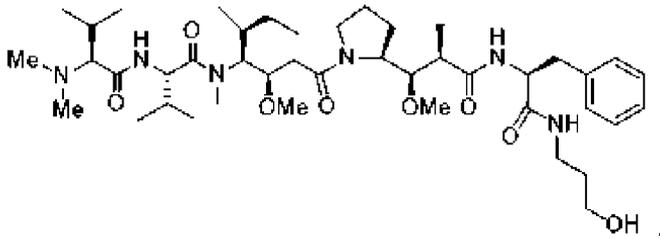




В некоторых вариантах осуществления, D представляет собой:



В некоторых вариантах осуществления, D представляет собой:



Гидрофильная группа или T¹

В некоторых вариантах осуществления, гидрофильная группа, включенная в конъюгаты или каркасы по настоящему изобретению, представляет собой водорастворимый и по существу неантигенный полимер. В некоторых вариантах осуществления, примеры гидрофильной группы включают, но не ограничены ими, полиспирты, простые полиэфиры, полианионы, поликатионы, полифосфорные кислоты, полиамины, полисахариды, полигидроксисоединения, полилизины и их производные. В некоторых вариантах осуществления, один конец гидрофильной группы может быть функционализирован таким образом, чтобы его можно было ковалентно присоединить к многофункциональному линкеру или линкеру M^A (например, к аминокислоте в линкере M^A) с помощью нерасщепляемой связи или через расщепляемую связь. В некоторых вариантах осуществления, функционализация может осуществляться, например, посредством амина, тиола, сложного эфира NHS, малеимида, алкина, азиды, карбонила или другой функциональной группы. В некоторых вариантах осуществления, другой конец (или концы) гидрофильной группы будет свободным и непривязанным. В некоторых вариантах осуществления, термин «несвязанный» означает, что гидрофильная группа не будет присоединена к другому фрагменту, такому как D или единица лекарственного средства, высвобождаемая сборочная единица или другие компоненты конъюгатов или каркасов по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления, свободный и несвязанный конец гидрофильной группы может включать метокси, карбоновую кислоту, спирт или другую подходящую функциональную группу. В некоторых вариантах осуществления, метокси, карбоновая кислота, спирт или другая подходящая функциональная группа действует как кэп для конца или концов гидрофильной группы.

В некоторых вариантах осуществления, расщепляемая связь относится к связи, которая по существу не чувствительна к расщеплению во время циркуляции в плазме, но чувствительна к расщеплению во внутриклеточной или внутриопухолевой среде. В некоторых вариантах осуществления, нерасщепляемая связь по существу не чувствительна к расщеплению в любой биологической среде. В некоторых вариантах осуществления, примерами расщепляемых связей являются химический гидролиз гидразона, восстановление дисульфида и ферментативное расщепление пептидной связи или гликозидной связи. В некоторых вариантах осуществления, типовые присоединения гидрофильной группы осуществляются через амидные связи, простые эфирные связи, сложноэфирные связи, гидразонные связи, оксимные связи, дисульфидные связи,

пептидные связи или триазольные связи. В некоторых вариантах осуществления, присоединение гидрофильной группы к многофункциональному линкеру или линкеру M^A (например, к аминокислоте в линкере M^A) осуществляется посредством амидной связи.

В некоторых вариантах осуществления, в которых конъюгат или каркас по описанию содержит более одной гидрофильной группы, несколько гидрофильных групп могут представлять собой одинаковые или разные химические группы. В некоторых вариантах осуществления, несколько гидрофильных групп могут быть присоединены к многофункциональному линкеру или M^A линкеру в одном сайте присоединения или в разных сайтах.

В некоторых вариантах осуществления, добавление гидрофильной группы может иметь два потенциальных воздействия на фармакокинетику полученного конъюгата. В некоторых вариантах осуществления, желаемое воздействие представляет собой снижение клиренса (и, как следствие, увеличение воздействия), которое возникает в результате уменьшения неспецифических взаимодействий, вызванных экспонированными гидрофобными элементами лекарственного средства или лекарственного средства-линкера. В некоторых вариантах осуществления, нежелательным воздействием является уменьшение объема и скорости распределения, которое может возникнуть в результате увеличения молекулярной массы конъюгата. В некоторых вариантах осуществления, увеличение молекулярной массы гидрофильной группы увеличивает гидродинамический радиус конъюгата, что приводит к снижению диффузионной способности, что может снижать способность конъюгата проникать в опухоль. В некоторых вариантах осуществления, гидрофильная группа, которая является достаточно большой, используется для уменьшения клиренса конъюгата, тем самым увеличивая экспозицию в плазме, но не настолько большая, чтобы значительно уменьшить его диффузионную способность, что может снизить способность конъюгата достигать намеченной популяции клеток-мишеней.

В некоторых вариантах осуществления, гидрофильная группа включает, но не ограничена ими, сахарный спирт (также известный как полиспирт, многоатомный спирт, альдит или глицит) или его производное (например, аминополиспирт), углевод (например, сахарид), поливиниловый спирт, полимер на основе углеводов (например, декстраны), гидроксипропилметакриламид (HPMA), полиалкиленоксид и/или их сополимер.

В некоторых вариантах осуществления, гидрофильная группа содержит множество гидроксильных групп, таких как группы, которые включают моносахариды, олигосахариды, полисахариды и подобные. В некоторых вариантах осуществления, гидрофильная группа включает множество $-(CR_{58}OH)-$ групп, где R_{58} представляет собой -H или C_{1-8} алкил.

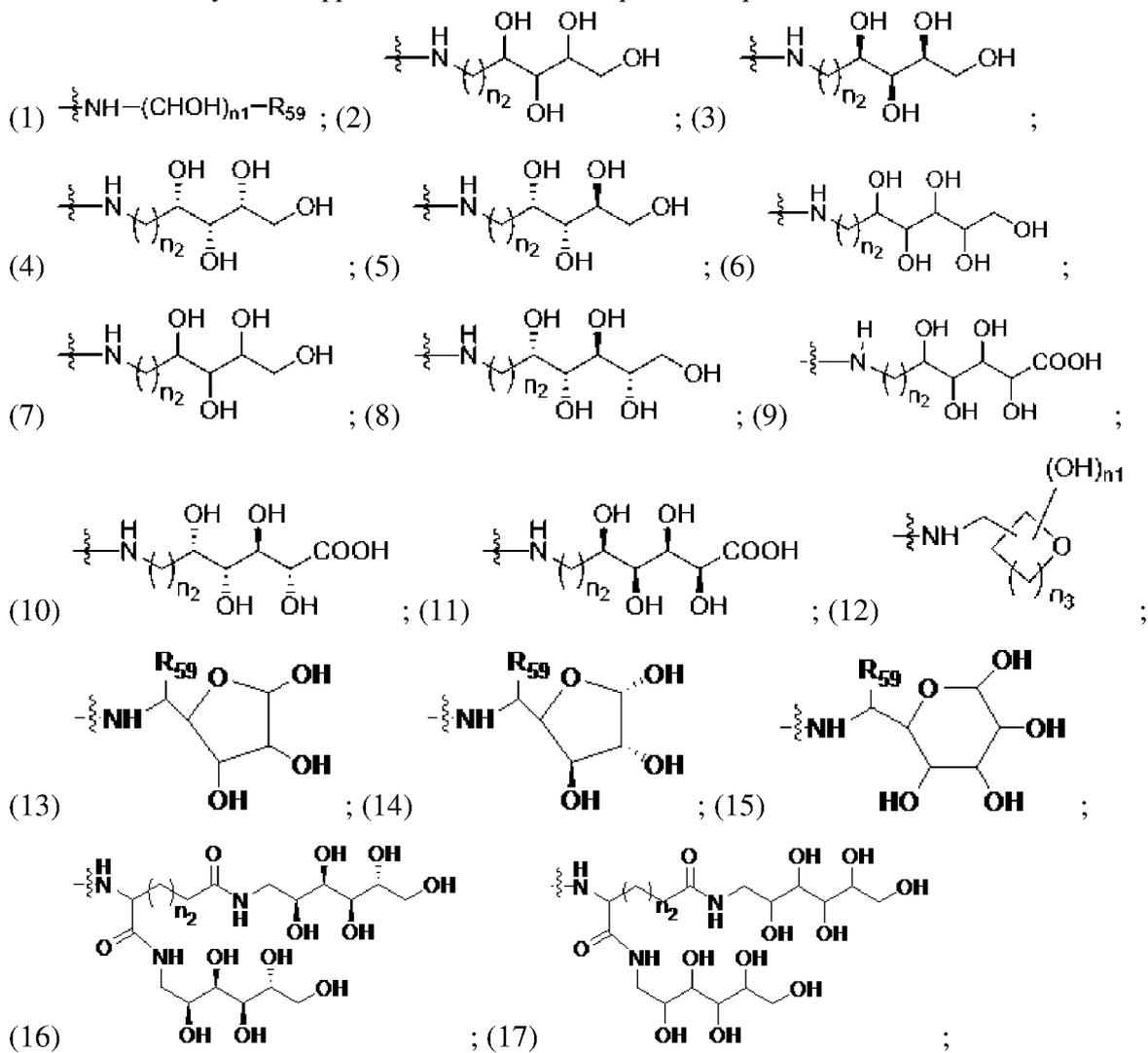
В некоторых вариантах осуществления, гидрофильная группа содержит один или несколько следующих фрагментов формулы: $\frac{1}{2}NH-R_{80}-(CR_{58}OH)_{n_1}-R_{61}$, где n_1 представляет собой целое число от 0 до примерно 6; каждый R_{58} независимо представляет

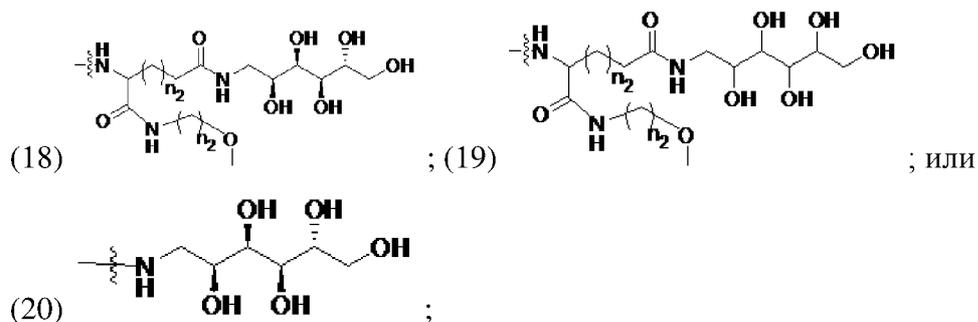
собой водород или C₁₋₈ алкил; R₆₀ представляет собой связь, C₁₋₆ алкильный линкер или -CHR₅₉-, где R₅₉ представляет собой водород, алкил, циклоалкил или арилалкил; R₆₁ представляет собой CH₂OR₆₂, COOR₆₂, -(CH₂)_{n₂}COOR₆₂, или гетероциклоалкил, замещенный одним или несколькими гидроксилами; R₆₂ представляет собой водород или C₁₋₈ алкил; и n₂ представляет собой целое число от 1 до примерно 5.

В некоторых вариантах осуществления, R₅₈ представляет собой водород; R₆₀ представляет собой связь или C₁₋₆ алкильный линкер; n₁ представляет собой целое число от 1 до примерно 6; и R₆₁ представляет собой CH₂OH или COOH. В некоторых вариантах осуществления, R₅₈ представляет собой водород, R₆₀ представляет собой -CHR₅₉-; n₁ равно 0; и R₆₁ представляет собой гетероциклоалкил, замещенный одним или несколькими гидроксилами, например моносахарид.

В некоторых вариантах осуществления, гидрофильная группа включает глюкозиламин, диамин или триамин.

В некоторых вариантах осуществления, гидрофильная группа содержит один или несколько следующих фрагментов или их стереоизомеров:





где:

R_{59} представляет собой водород, C_{1-8} алкил, циклоалкил или арилалкил;

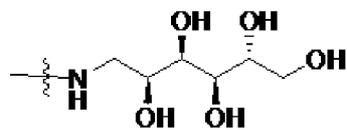
n_1 представляет собой целое число от 1 до примерно 6; n_2 представляет собой целое число от 1 до примерно 5; и n_3 представляет собой целое число от примерно 1 до примерно 3.

Понятно, что в настоящем документе рассматриваются все стереохимические формы гидрофильных групп. В приведенной выше формуле, гидрофильная группа может быть получена из рибозы, ксилозы, глюкозы, маннозы, галактозы или другого сахара и сохранять стереохимическое расположение боковых гидроксильных и алкильных групп, присутствующих в этих молекулах. В некоторых вариантах осуществления, следует понимать, что в приведенных выше формулах также рассматриваются различные дезоксисоединения. Иллюстративно, для гидрофильных групп предусмотрены одна или несколько из следующих характеристик, когда это применимо:

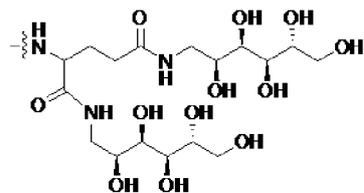
В некоторых вариантах осуществления, n_3 равно 2 или 3. В некоторых вариантах осуществления, n_3 равно 2. В некоторых вариантах осуществления, n_3 равно 3. В некоторых вариантах осуществления, n_1 равно 1, 2 или 3. В некоторых вариантах осуществления, n_1 равно 1. В некоторых вариантах осуществления, n_1 равно 2. В некоторых вариантах осуществления, n_1 равно 3. В некоторых вариантах осуществления, n_2 равно 1.

В некоторых вариантах осуществления, R_{59} представляет собой H.

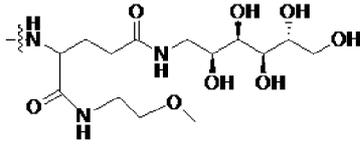
В некоторых вариантах осуществления, гидрофильная группа содержит:



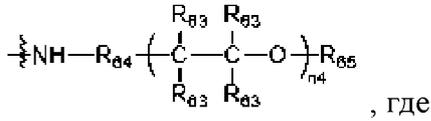
В некоторых вариантах осуществления, гидрофильная группа содержит:



В некоторых вариантах осуществления, гидрофильная группа содержит:



В некоторых вариантах осуществления, гидрофильная группа содержит



n_4 представляет собой целое число от 1 до примерно 25;

каждый R_{63} независимо представляет собой водород или C_{1-8} алкил;

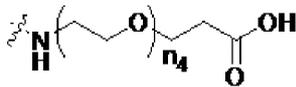
R_{64} представляет собой связь или C_{1-8} алкильный линкер;

R_{65} представляет собой водород, C_{1-8} алкил или $-(\text{CH}_2)_{n_2}\text{COOR}_{62}$;

R_{62} представляет собой водород или C_{1-8} алкил; и

n_2 представляет собой целое число от 1 до примерно 5.

В некоторых вариантах осуществления, гидрофильная группа содержит:



В некоторых вариантах осуществления, n_4 представляет собой целое число от примерно 2 до примерно 20, от примерно 4 до примерно 16, от примерно 6 до примерно 12 или от примерно 8 до примерно 12.

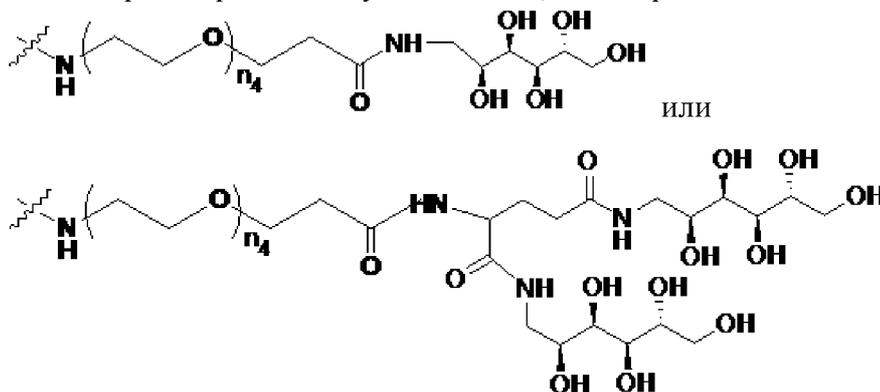
В некоторых вариантах осуществления, n_4 представляет собой целое число от примерно 2 до примерно 20. В некоторых вариантах осуществления, n_4 представляет собой целое число от примерно 4 до примерно 16. В некоторых вариантах осуществления, n_4 представляет собой целое число от примерно 6 до примерно 12. В некоторых вариантах осуществления, n_4 представляет собой целое число от примерно 6 до примерно 12. В некоторых вариантах осуществления, n_4 представляет собой целое число от примерно 8 до примерно 12.

В некоторых вариантах осуществления, n_4 равно 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12.

В некоторых вариантах осуществления, n_4 равно 8 или 12.

В некоторых вариантах осуществления, n_4 равно 8.

В некоторых вариантах осуществления, T' содержит:



где n_4 представляет собой целое число от примерно 2 до примерно 20, от примерно 4 до примерно 16, от примерно 6 до примерно 12 или от примерно 8 до примерно 12.

В некоторых вариантах осуществления, n_4 равно 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12.

В некоторых вариантах осуществления, n_4 равно 8 или 12.

В некоторых вариантах осуществления, n_4 равно 8.

В некоторых вариантах осуществления, гидрофильная группа содержит простой полиэфир, например, полиалкиленгликоль (РАО). В некоторых вариантах осуществления, РАО включает, но не ограничена ими, полимеры C_{1-6} алкиленоксидов, в частности полимеры этиленоксида. В некоторых вариантах осуществления, полиалкиленгликоль представляет собой полиэтиленгликоль (PEG). В некоторых вариантах осуществления, полиэтиленгликоль представляет собой mPEG.

В некоторых вариантах осуществления, гидрофильная группа содержит единицу PEG, которая включает одну или несколько цепей PEG. В некоторых вариантах осуществления, цепи PEG могут быть связаны друг с другом, например, в виде линейной, разветвленной или звездообразной конфигурации. В некоторых вариантах осуществления, единица PEG, помимо включения повторяющихся субъединиц PEG, может также содержать материал, не являющийся PEG (например, для облегчения связывания нескольких цепей PEG друг с другом или для облегчения связывания с аминокислотой).

В некоторых вариантах осуществления, единица PEG может быть ковалентно связана с многофункциональным линкером или линкером M^A (например, с аминокислотой в линкере M^A) через реакционноспособную группу. В некоторых вариантах осуществления, реакционноспособные группы представляют собой группы, с которыми может быть связана активированная молекула PEG (например, свободная амино- или карбоксильная группа). В некоторых вариантах осуществления, N-концевые аминокислоты и лизины (K) имеют свободную аминогруппу; и C-концевые аминокислотные остатки имеют свободную карбоксильную группу. Сульфгидрильные группы (например, обнаруженные на цистеиновых остатках) также можно использовать в качестве реакционноспособной группы для присоединения PEG.

В некоторых вариантах осуществления, единица PEG может быть присоединена к многофункциональному линкеру или линкеру M^A (например, к аминокислоте в линкере M^A) с использованием метоксилированного PEG («mPEG»), имеющего различные реакционноспособные группы, включая, но не ограничиваясь ими, сукцинимидилсукцинат (SS), сукцинимидилкарбонат (SC), mPEG-имидат, паранитрофенилкарбонат (NPC), сукцинимидилпропионат (SPA) и цианурхлорид. В некоторых вариантах осуществления, можно использовать различные виды PEG, и по существу можно использовать любой подходящий реакционноспособный реагент PEG. В некоторых вариантах осуществления, реакционноспособный PEG реагент будет приводить к образованию карбаматной или амидной связи при присоединении к многофункциональному линкеру или линкеру M^A (например, к аминокислоте в линкере M^A).

дериватизированную линейную одиночную цепь PEG, содержащую, по меньшей мере, 2 субъединицы, по меньшей мере, 3 субъединицы, по меньшей мере, 4 субъединицы, по меньшей мере, 5 субъединиц, по меньшей мере, 6 субъединиц, по меньшей мере, 7 субъединиц, по меньшей мере, 8 субъединиц, по меньшей мере, 9 субъединиц, по меньшей мере, 10 субъединиц, по меньшей мере, 11 субъединиц, по меньшей мере, 12 субъединиц, по меньшей мере, 13 субъединиц, по меньшей мере, 14 субъединиц, по меньшей мере, 15 субъединиц, по меньшей мере, 16 субъединиц, по меньшей мере, 17 субъединиц, по меньшей мере, 18 субъединиц, по меньшей мере, 19 субъединиц, по меньшей мере, 20 субъединиц, по меньшей мере, 21 субъединицу, по меньшей мере, 22 субъединицы, по меньшей мере, 23 субъединицы или по меньшей мере, 24 субъединицы.

В некоторых вариантах осуществления, единица PEG представляет собой дериватизированную линейную одиночную цепь PEG, содержащую от 6 до 72, от 6 до 60, от 6 до 48, от 6 до 36 или от 6 до 24 субъединиц; от 7 до 72, от 7 до 60, от 7 до 48, от 7 до 36 или от 7 до 24 субъединиц; от 8 до 72, от 8 до 60, от 8 до 48, от 8 до 36 или от 8 до 24 субъединиц; от 9 до 72, от 9 до 60, от 9 до 48, от 9 до 36 или от 9 до 24 субъединиц; от 10 до 72, от 10 до 60, от 10 до 48, от 10 до 36 или от 10 до 24 субъединиц; от 11 до 72, от 11 до 60, от 11 до 48, от 11 до 36 или от 11 до 24 субъединиц; от 12 до 72, от 12 до 60, от 12 до 48, от 12 до 36 или от 12 до 24 субъединиц; от 13 до 72, от 13 до 60, от 13 до 48, от 13 до 36 или от 13 до 24 субъединиц; от 14 до 72, от 14 до 60, от 14 до 48, от 14 до 36 или от 14 до 24 субъединиц; от 15 до 72, от 15 до 60, от 15 до 48, от 15 до 36 или от 15 до 24 субъединиц; от 16 до 72, от 16 до 60, от 16 до 48, от 16 до 36 или от 16 до 24 субъединиц; от 17 до 72, от 17 до 60, от 17 до 48, от 17 до 36 или от 17 до 24 субъединиц; от 18 до 72, от 18 до 60, от 18 до 48, от 18 до 36 или от 18 до 24 субъединиц; от 19 до 72, от 19 до 60, от 19 до 48, от 19 до 36 или от 19 до 24 субъединиц; от 20 до 72, от 20 до 60, от 20 до 48, от 20 до 36 или от 20 до 24 субъединиц; от 21 до 72, от 21 до 60, от 21 до 48, от 21 до 36 или от 21 до 24 субъединиц; от 22 до 72, от 22 до 60, от 22 до 48, от 22 до 36 или от 22 до 24 субъединиц; от 23 до 72, от 23 до 60, от 23 до 48, от 23 до 36 или от 23 до 24 субъединиц; или от 24 до 72, от 24 до 60, от 24 до 48, от 24 до 36 субъединиц.

В некоторых вариантах осуществления, примеры гидрофильных групп, подходящих для конъюгатов, каркасов и способов, описанных в настоящем документе, можно найти, например, в US 8,367,065, колонка 13; US 8,524,696, колонка 6; WO 2015/057699 и WO 2014/062697, содержание каждой из которых настоящим полностью включено посредством ссылки.

Антитела

Термин «антитело», используемый в настоящем документе, относится к белку, создаваемому иммунной системой, который способен распознавать и связываться со специфическим антигеном. В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой гликопротеин. В некоторых вариантах осуществления, антитела могут существовать в различных формах, включая, например, поликлональные антитела, моноклональные антитела, верблужьи однодоменные антитела, внутриклеточные

антитела («интратела»), рекомбинантные антитела, анти-идиотипические антитела, доменные антитела, линейные антитела, мультиспецифическое антитело, фрагменты антител (например, Fv, Fab, F(ab)₂, F(ab)₃, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂), антитела с одноцепочечным переменным фрагментом (scFv), тандемные/bis-scFv, Fc, pFc', scFvFc (или scFv-Fc), дисульфид Fv (dsfv), биспецифические антитела (bc-scFv), такие как антитела BiTE; антитела верблюдовых, антитела с измененной поверхностью, гуманизированные антитела, полностью человеческие антитела, однодоменные антитела (sdAb, также известные как NANOBODY®), химерные антитела, химерные антитела, содержащие, по меньшей мере, одну константную область человека, антитела с двойной аффинностью, такие как белки ретаргетинга с двойной аффинностью (DART™), двухвалентные (или бивалентные) одноцепочечные переменные фрагменты (di-scFv, bi-scFv), включая, но не ограничиваясь ими, минитела, диатела, триатела или тритела, тетратела и подобные, а также мультивалентные антитела.

Термин «фрагмент антитела», используемый в настоящем документе, относится, по меньшей мере, к части переменной области молекулы иммуноглобулина, которая связывается со своей мишенью, т.е. к антигенсвязывающей области. Используемый в настоящем документе термин «антитело» относится как к полноразмерному антителу, так и к фрагментам антител, если не указано иное. В некоторых вариантах осуществления, термин включает генетически сконструированные антитела, производные антитела, фрагменты антител, и могут быть получены способами, известными в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, антитело может быть сконструировано таким образом, чтобы оно содержало, по меньшей мере, одну химически реактивную группу.

В некоторых вариантах осуществления, гликопротеин, содержащий заместитель N-ацетилглюкозамина ядра (группа ядро-GlcNAc), представляет собой антитело, содержащее заместитель ядро-N-ацетилглюкозамин (группу ядро-GlcNAc). В некоторых вариантах осуществления, гликопротеин представляет собой моноклональное антитело (mAb) IgA, IgD, IgE, IgG или IgM антитела. В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой IgG антитело. В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой IgG1 антитело. В некоторых вариантах осуществления, когда указанное антитело представляет собой цельное антитело, антитело содержит одну или несколько (например, одну) группу ядро-GlcNAc на каждой тяжелой цепи, где указанная часть ядро-GlcNAc необязательно фукозилирована. В некоторых вариантах осуществления, полное антитело содержит две или несколько (например, две) необязательно фукозилированных группы ядро-GlcNAc. В некоторых вариантах осуществления, когда указанное антитело представляет собой одноцепочечное антитело или фрагмент антитела, например, Fab или Fc фрагмент, антитело содержит одну или несколько групп ядро-GlcNAc, которые необязательно фукозилированы. В некоторых вариантах осуществления, в антителе, содержащем группу ядро-GlcNAc, указанная группа ядро-GlcNAc может быть расположена в любом месте антитела при условии, что

указанный заместитель не мешает антигенсвязывающему сайту антитела. В некоторых вариантах осуществления, указанная группа ядро-GlcNAc присутствует в нативном сайте N-гликозилирования антитела. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит или сконструировано таким образом, чтобы содержать, по меньшей мере, одну химически реактивную группу или химически реактивную аминокислотную группу или боковые цепи.

В некоторых вариантах осуществления, антитело способно направлять конъюгат в определенные ткани, клетки или места в клетке. В некоторых вариантах осуществления, антитело способно направлять конъюгат в культуру или в целый организм, или в оба. В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит лиганд, присутствующий на клеточной поверхности клетки(ок)-мишени(ей), с которой оно связывается с эффективной специфичностью, аффинностью и авидностью. В некоторых вариантах осуществления, антитело направляет конъюгат к тканям, отличным от печени. В некоторых вариантах осуществления, антитело направляет конъюгат в конкретную ткань, такую как печень, почка, легкое или поджелудочная железа. В некоторых вариантах осуществления, антитело направляет конъюгат к клетке-мишени (например, раковой клетке), рецептору, экспрессированному на клетке (например, раковой клетке), ткани матрикса или белку, ассоциированному с раком (например, опухолевому антигену). В некоторых вариантах осуществления, мишенью могут быть клетки, составляющие сосудистую сеть опухоли. В некоторых вариантах осуществления, антитело способно направлять конъюгат на определенные типы клеток, например, специфически направлять на гепатоциты в печени, а не на клетки Купфера. В некоторых вариантах осуществления, антитело способно направлять конъюгат к клеткам ретикулярной эндотелиальной или лимфатической системы, или к профессиональным фагоцитирующим клеткам, таким как макрофаги или эозинофилы. В некоторых вариантах осуществления, сам конъюгат представляет собой эффективную систему доставки, не требующую специфического таргетирования.

В некоторых вариантах осуществления, антитело способно направлять конъюгат в определенную локацию внутри клетки (например, в ядро, цитоплазму или эндосому). В некоторых вариантах осуществления, антитело усиливает клеточное связывание с рецепторами или цитоплазматический транспорт в ядро и проникновение в ядро или высвобождение из эндосом или других внутриклеточных везикул.

В некоторых вариантах осуществления, конъюгат содержит Her-2 или NaPi2b антитело. В некоторых вариантах осуществления, Her-2 антитело, подходящее для конъюгата, представляет собой трастузумаб. В некоторых вариантах осуществления, Her-2 антитела, подходящие для конъюгата, включают антитела, описанные в WO 2015/195917 и PCT/US 2018/019873, каждое из которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

NaPi2b антитела

В некоторых вариантах осуществления, NaPi2b антитела, подходящие для конъюгации, связываются с внеклеточной областью SLC34A2. В некоторых вариантах

осуществления, настоящее описание предлагает моноклональные антитела, таргетирующие NaPi2b, которые специфически распознают NaPi2b, также известный как натрий-зависимый белок транспорта фосфатов 2В. В некоторых вариантах осуществления, антитела NaPi2b, используемые в описанных в настоящем документе конъюгатах, способны и полезны для модулирования, *например*, блокирования, ингибирования, снижения, противодействия, нейтрализации или иного вмешательства, по меньшей мере, в одну биологическую активность NaPi2b. В некоторых вариантах осуществления, описанные в настоящем документе антитела также включают антитела, которые связывают растворимый NaPi2b. В некоторых вариантах осуществления, антитела NaPi2b специфически связываются с эпитопом внеклеточного домена (ECD) NaPi2b человека. Эти антитела в совокупности называются в настоящем документе антителами «NaPi2b».

В некоторых вариантах осуществления, конъюгаты NaPi2b антитело-лекарственное средство, предложенные в настоящем документе, включают антитела, которые связываются с эпитопом NaPi2b с равновесной константой диссоциации (K_d или KD), равной ≤ 1 мкМ (*например*, ≤ 100 нМ; ≤ 10 нМ и ≤ 1 нМ). В некоторых вариантах осуществления, антитела NaPi2b, используемые в описанных в настоящем документе конъюгатах антитело-лекарственное средство, имеют K_d в диапазоне примерно от ≤ 1 нМ до примерно 1 пМ.

В некоторых вариантах осуществления, конъюгаты NaPi2b антитело-лекарственное средство, предложенные в настоящем документе, могут включать антитела, которые служат для модулирования, блокирования, ингибирования, уменьшения, противодействия, нейтрализации или иного вмешательства в функциональную активность NaPi2b. В некоторых вариантах осуществления, функциональная активность NaPi2b включает, *например*, участие в трансцеллюлярной абсорбции неорганических фосфатов (Pi), тем самым способствуя поддержанию гомеостаза фосфатов в организме. В некоторых вариантах осуществления, антитела NaPi2b полностью или частично ингибируют функциональную активность NaPi2b путем частичного или полного модулирования, блокирования, ингибирования, уменьшения антагонизма, нейтрализации или иного вмешательства в трансклеточную абсорбцию неорганических фосфатов.

В некоторых вариантах осуществления, считается, что антитела NaPi2b полностью модулируют, блокируют, ингибируют, снижают, противодействуют, нейтрализуют или иным образом мешают функциональной активности NaPi2b, когда уровень функциональной активности NaPi2b в присутствии антитела NaPi2b снижается, по меньшей мере, на 95%, *например*, на 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, по сравнению с уровнем функциональной активности NaPi2b в отсутствие связывания с описанным в настоящем документе антителом NaPi2b. В некоторых вариантах осуществления, считается, что антитела NaPi2b частично модулируют, блокируют, ингибируют, снижают, противодействуют, нейтрализуют или иным образом мешают функциональной активности NaPi2b, когда уровень активности NaPi2b в присутствии антитела NaPi2b

снижается менее чем на 95%, например, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% или 90% по сравнению с уровнем активности NaPi2b в отсутствие связывания с NaPi2b антителом, описанным в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, типовые антитела, описанные в настоящем документе, включают антитело XMT-1535. Эти антитела проявляют специфичность в отношении NaPi2b человека, и было показано, что они ингибируют активность NaPi2b.

Человеческое или гуманизованное моноклональное антитело NaPi2b, XMT-1535, включает тяжелую цепь (HC), переменную область тяжелой цепи (VH), легкую цепь (LC) и переменную область легкой цепи (VL), как показано на аминокислоте и соответствующие последовательности нуклеиновых кислот представлены в Таблице 1 ниже. Переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи для каждого антитела заштрихованы в аминокислотных последовательностях ниже. Определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи и легкой цепи, подчеркнуты в аминокислотных последовательностях, представленных ниже. Аминокислоты, охватывающие определяющие комплементарность области (CDR) для антитела XMT-1535, соответствуют определениям E.A. Kabat et al. (см. Kabat, E.A., et al., Sequences of Protein of immunological interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office (1991)) и описаны в патенте США 8,603,474.

Таблица 1: Последовательности NaPi2b человеческого или гуманизованного моноклонального антитела XMT-1535

SEQ ID NO:	Описание последовательности
1	Последовательность аминокислот тяжелой цепи XMT-1535
2	Последовательность аминокислот легкой цепи XMT-1535
3	Переменная область тяжелой цепи XMT-1535
4	Переменная область легкой цепи XMT-1535
5	CDRH1 XMT-1535
6	CDRH2 XMT-1535
7	CDRH3 XMT-1535
8	CDRL1 XMT-1535
9	CDRL2 XMT-1535
10	CDRL3 XMT-1535
11	Константная область тяжелой цепи IgG1 XMT-1535
12	Константная область легкой цепи XMT-1535
13	Последовательность нуклеиновой кислоты переменной области тяжелой цепи XMT-1535
14	Последовательность нуклеиновой кислоты переменной области легкой цепи XMT-1535

SEQ ID NO:	Описание последовательности
	цепи ХМТ-1535
15	Полноразмерная последовательность NaPi2b человека

Описанные в настоящем документе антитела специфически связываются с эпитопом внеклеточного домена (ECD) NaPi2b человека.

В некоторых вариантах осуществления, специалистам в данной области техники будет понятно, что можно определить, без излишнего экспериментирования, обладает ли моноклональное антитело той же специфичностью, что и моноклональное антитело, описанное в настоящем документе (*например*, ХМТ-1535, 10Н1.11.4В), путем установления того, предотвращает ли первое связывание последнего с естественным партнером по связыванию или другой молекулой, о которой известно, что она связана с NaPi2b. Если тестируемое моноклональное антитело конкурирует с моноклональным антителом, описанным в настоящем документе, о чем свидетельствует снижение связывания описанным в настоящем документе моноклональным антителом, то два моноклональных антитела связываются с одним и тем же или близкородственным эпитопом.

Альтернативный способ определения того, обладает ли моноклональное антитело специфичностью описанного в настоящем документе моноклонального антитела, состоит в том, чтобы предварительно инкубировать описанное в настоящем документе моноклональное антитело с растворимым NaPi2b (с которым оно обычно реагирует), и затем добавить тестируемое моноклональное антитело для определения того, ингибирует ли тестируемое моноклональное антитело его способность связывать NaPi2b. Если тестируемое моноклональное антитело ингибируется, то, по всей вероятности, оно имеет такую же или функционально эквивалентную эпитопную специфичность, что и описанное в настоящем документе моноклональное антитело.

Скрининг моноклональных антител, описанных в настоящем документе, также можно проводить, *например*, путем измерения NaPi2b-опосредованной активности и определения того, способно ли тестируемое моноклональное антитело модулировать, блокировать, ингибировать, уменьшать, противодействовать, нейтрализовывать или иным образом препятствовать активности NaPi2b.

В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем документе, содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем

документе, содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи по меньшей мере, на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере, на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем документе, содержат аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 3 и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления, изобретения антитела, описанные в настоящем документе, содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 1 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем документе, содержат аминокислотную последовательность CDRH1 SEQ ID NO: 5, аминокислотную последовательность CDRH2 SEQ ID NO: 6, аминокислотную последовательность CDRH3 SEQ ID NO: 7, аминокислотную последовательность CDRL1 последовательность SEQ ID NO: 8, аминокислотную последовательность CDRL2 SEQ ID NO: 9 и аминокислотную последовательность CDRL3 SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления, описанные в настоящем документе антитела содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5; CDRH2, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6; CDRH3, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7; CDRL1, которая содержит аминокислотную последовательность, на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; CDRL2, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 9; и CDRL3, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем документе, включают одну или несколько консервативных аминокислотных замен в

последовательности переменного домена, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более консервативных замен в последовательности переменного домена. В некоторых вариантах осуществления, эти консервативные аминокислотные замены находятся в области CDR, *например*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более консервативных замены производятся суммарно во всех CDR, и в некоторых конкретных вариантах осуществления, до 1, 2, 3 или 4 консервативных аминокислотных замен могут присутствовать в каждой последовательности CDR, *например*, SEQ ID NO: 5-10.

В некоторых вариантах осуществления, специалистам в данной области техники будет понятно, что можно определить, без излишнего экспериментирования, обладает ли моноклональное антитело той же специфичностью, что и моноклональное антитело ХМТ-1535, установив, предотвращает ли первое связывание последнего с природным партнером по связыванию или другой молекулой, о которой известно, что она связана с NaPi2b. Если тестируемое моноклональное антитело конкурирует с моноклональным антителом, описанным в настоящем документе, о чем свидетельствует снижение связывания описанным в настоящем документе моноклональным антителом, то два моноклональных антитела связываются с одним и тем же или близкородственным эпитопом.

В некоторых вариантах осуществления, альтернативный способ определения того, обладает ли моноклональное антитело специфичностью описанного в настоящем документе моноклонального антитела, заключается в предварительной инкубации описанного в настоящем документе моноклонального антитела с растворимым NaPi2b (с которым оно обычно реагирует), с последующим добавлением тестируемого моноклонального антитела, чтобы определить, ингибируется ли тестируемое моноклональное антитело в его способности связывать NaPi2b. В некоторых вариантах осуществления, если тестируемое моноклональное антитело ингибируется, то оно имеет такую же или функционально эквивалентную эпитопную специфичность, что и моноклональное антитело, описанное в настоящем документе.

Скрининг моноклональных антител, описанных в настоящем документе, также можно проводить, *например*, путем измерения NaPi2b-опосредованной активности и определения того, способно ли тестируемое моноклональное антитело модулировать, блокировать, ингибировать, уменьшать, противодействовать, нейтрализовывать или иным образом препятствовать активности NaPi2b.

В некоторых вариантах осуществления, антитела NaPi2b, подходящие для конъюгации, могут быть получены и очищены с помощью хорошо известных методик, *например*, WO 2009/097128, WO 2017/160754 и US 16/136,706, каждая из которых включена в настоящий документ в полном объеме посредством ссылки.

Антитела HER2

В некоторых вариантах осуществления, антитела HER2 подходящей конъюгации связывают HER2 человека в растворимой форме или в мембраносвязанной форме (*т.е.* при экспрессии на клеточной поверхности). В некоторых вариантах осуществления,

настоящее описание предлагает моноклональные антитела, которые связывают HER2 и являются гуманизированными или полностью человеческими. В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание предлагает моноклональные антитела, которые специфически связываются с HER2. Эти антитела в совокупности называются в настоящем документе антителами «HER2».

В некоторых вариантах осуществления, антитела HER2, подходящие для конъюгации, связываются с эпитопом HER2 с равновесной константой диссоциации (K_d или KD) ≤ 1 мкМ (*например*, ≤ 100 нМ; ≤ 10 нМ; ≤ 1 нМ). В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание предлагает моноклональные антитела, которые связывают HER2 и являются гуманизированными или полностью человеческими. *например*, представленные в настоящем документе антитела HER2 демонстрируют K_d в диапазоне примерно от ≤ 1 нМ до примерно 1 пМ.

В некоторых вариантах осуществления, описанные в настоящем документе антитела HER2 служат для модулирования, блокирования, ингибирования, уменьшения, противодействия, нейтрализации или иного вмешательства в функциональную активность HER2. В некоторых вариантах осуществления, функциональная активность HER2 включает, *например*, модуляцию активности пути PI3K-Akt. В некоторых вариантах осуществления, антитела HER2 полностью или частично ингибируют функциональную активность HER2 путем частичного или полного модулирования, блокирования, ингибирования, уменьшения антагонизма, нейтрализации или иного вмешательства в активность пути PI3K-Akt. Активность пути PI3K-Akt оценивают с использованием любого признанного в данной области техники способа определения активности пути PI3K-Akt, включая, помимо прочего, определение уровней фосфорилированного Akt в присутствии и в отсутствие антитела или антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, считается, что антитела HER2 полностью модулируют, блокируют, ингибируют, снижают, противодействуют, нейтрализуют или иным образом мешают функциональной активности HER2, когда уровень функциональной активности HER2 в присутствии антитела HER2 снижается, по меньшей мере, на 80%, *например*, на 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% по сравнению с уровнем функциональной активности HER2 в отсутствие связывания с описанным в настоящем документе антителом HER2. В некоторых вариантах осуществления, считается, что антитела HER2 частично модулируют, блокируют, ингибируют, снижают, противодействуют, нейтрализуют или иным образом мешают функциональной активности HER2, когда уровень активности HER2 в присутствии антитела HER2 снижается менее чем на 95%, *например*, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% или 90% по сравнению с уровнем активности HER2 в отсутствие связывания с антителом HER2, описанным в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, описанные в настоящем документе

типовые антитела включают антитело ХМТ-1519. Эти антитела проявляют специфичность в отношении HER2 человека, и было показано, что они ингибируют функциональную активность HER2 *in vitro*.

Моноклональное антитело HER-2 ХМТ-1519 включает тяжелую цепь (HC), переменную область тяжелой цепи (VH), легкую цепь (LC) и переменную область легкой цепи (VL), как показано в аминокислотных и соответствующих последовательностях нуклеиновых кислот, представленных в Таблице 2 ниже. Переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи для каждого антитела заштрихованы в аминокислотных последовательностях ниже. Определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи и легкой цепи, подчеркнуты в аминокислотных последовательностях, представленных ниже. Аминокислоты, охватывающие области, определяющие комплементарность (CDR), соответствуют определениям E.A. Kabat et al. (см. Kabat, E.A., et al., Sequences of Protein of immunological interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office (1991)).

Таблица 2: Последовательности человеческого или гуманизированного моноклонального антитела HER2 ХМТ-1519

SEQ ID NO:	Описание последовательности
16	Полноразмерный рецептор HER2 человека
17	Переменная область тяжелой цепи ХМТ-1519
18	Константная область тяжелой цепи IgG1 ХМТ-1519
19	Последовательность аминокислот тяжелой цепи ХМТ-1519
20	CDRH1 ХМТ-1519
21	CDRH2 ХМТ-1519
22	CDRH3 ХМТ-1519
23	Последовательность нуклеиновой кислоты переменной области тяжелой цепи ХМТ-1519
24	Переменная область легкой цепи ХМТ-1519
25	Константная область легкой цепи ХМТ-1519
26	Последовательность аминокислот легкой цепи ХМТ-1519
27	CDRL1 ХМТ-1519
28	CDRL2 ХМТ-1519
29	CDRL3 ХМТ-1519
30	Последовательность нуклеиновой кислоты переменной области легкой цепи ХМТ-1519
31	Внеклеточный домен (ECD) рецептора HER2 человека

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем

документе, специфически связываются с эпитопом на полноразмерном рецепторе HER2 человека, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, специфически связываются с эпитопом на внеклеточном домене (ECD) рецептора HER2 человека, содержащем аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31.

В некоторых вариантах осуществления, антитела по настоящему изобретению демонстрируют характеристики связывания с HER2, которые отличаются от антител, описанных в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем документе, связываются с другим эпитопом HER2, поскольку они перекрестно блокируют связывание друг друга, но не трастуумаба, пертузумаба, Fab37 или chA21, с HER2. Кроме того, в отличие от известных антител, описанные в настоящем документе, антитела могут эффективно интернализироваться в клетки, экспрессирующие HER2, без стимулирования клеточной пролиферации.

В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем документе, представляют собой полностью человеческие моноклональные антитела, которые связываются с новыми эпитопами и/или обладают другими благоприятными свойствами для терапевтического применения. В некоторых вариантах осуществления, иллюстративные свойства включают, но не ограничены ими, благоприятные характеристики связывания с раковыми клетками, экспрессирующими HER2 человека на высоких или низких уровнях, специфическое связывание с рекомбинантным HER2 человека и яванского макака, эффективную интернализацию при связывании с HER2, высокую способность к уничтожению раковых клеток, экспрессирующих высокие или низкие уровни HER2 при введении в виде конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), не оказывают существенного агонистического действия на пролиферацию раковых клеток, экспрессирующих HER2, и/или обеспечивают медирированное эффективной антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) уничтожение клеток, экспрессирующих HER2, а также любую комбинацию вышеуказанных свойств.

В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем документе, также включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с эпитопом рецептора HER2 человека, который включает остатки с 452 по 531 внеклеточного домена рецептора HER2 человека, остатки с 474 по 553 SEQ ID NO: 16 или остатки с 452 по 531 SEQ ID NO: 31.

В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем документе, включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает, по меньшей мере, часть N-конца домена IV рецептора HER2 человека, но не конкурирует перекрестно с антителом, которое связывается с эпитопом 4D5 рецептора HER2 человека. В некоторых вариантах осуществления, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, не конкурируют перекрестно с трастуумабом за связывание с рецептором HER2 человека, поскольку

известно, что трастузумаб связывает эпитоп 4D5 рецептора HER2 человека. Используемый в настоящем документе термин эпитоп 4D5 рецептора HER2 человека относится к аминокислотным остаткам с 529 по 627 внеклеточного домена рецептора HER2 человека, остаткам с 551 по 649 SEQ ID NO: 16 или остаткам с 529 по 627 SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также связывает, по меньшей мере, один эпитоп на рецепторе HER2 яванского макака.

В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем документе, также включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с эпитопом рецептора HER2 человека, который включает остатки с 452 по 500 внеклеточного домена рецептора HER2 человека, остатки с 474 по 522 SEQ ID NO: 16 или остатки с 452 по 500 SEQ ID NO: 31.

В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем документе, также включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с эпитопом рецептора HER2 человека, который включает, по меньшей мере, один из аминокислотных остатков, выбранных из аминокислотных остатков E521, L525 и R530 внеклеточного домена рецептора HER2 человека, например, остатков 543, 547 и 552 SEQ ID NO: 16 и остатков 521, 525 и 530 SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем документе, включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с эпитопом внеклеточного домена рецептора HER2 человека, который включает, по меньшей мере, два аминокислотных остатка, выбранных из аминокислотных остатков E521, L525 и R530 внеклеточного домена рецептора HER2 человека. В некоторых вариантах осуществления, описанные в настоящем документе антитела также включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с эпитопом рецептора HER2 человека, который включает, по меньшей мере, аминокислотные остатки E521, L525 и R530 внеклеточного домена рецептора HER2 человека. В некоторых вариантах осуществления, любое или все эти антитела или их антигенсвязывающие фрагменты также связывают, по меньшей мере, один эпитоп на рецепторе HER2 яванского макака.

В некоторых вариантах осуществления, описанные в настоящем документе антитела также включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются, по меньшей мере, с частью домена III и, по меньшей мере, с частью N-конца домена IV рецептора HER2 человека, но не участвуют в перекрестной конкуренции с моноклональным антителом Fab37 или антителом, которое связывается с эпитопом 4D5 рецептора HER2 человека. В некоторых вариантах осуществления, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в настоящем документе, не конкурируют перекрестно с моноклональным антителом Fab37 и/или трастузумабом за связывание с рецептором HER2 человека. В некоторых вариантах осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент также связывает, по меньшей мере, один эпитоп на

рецепторе HER2 яванского макака.

В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем документе, также включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с эпитопом рецептора HER2 человека, который включает остатки с 520 по 531 внеклеточного домена рецептора HER2 человека, остатки с 542 по 553 SEQ ID NO: 16 или остатки с 520 по 531 SEQ ID NO: 31.

В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем документе, также включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с эпитопом рецептора HER2 человека, который включает, по меньшей мере, один аминокислотный остаток, выбранный из остатков C453, H456, H473, N476, R495, G496, H497 и W499 внеклеточного домена рецептора HER2 человека, например, остатков 475, 478, 495, 498, 517, 518, 519 и 521 SEQ ID NO: 16 или остатков 453, 456, 473, 476, 495, 496, 497 и 499 SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем документе, включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с эпитопом внеклеточного домена рецептора HER2 человека, который включает, по меньшей мере, два аминокислотных остатка, по меньшей мере, три аминокислотных остатка, по меньшей мере, четыре аминокислотных остатка, по меньшей мере, пять аминокислотных остатков или, по меньшей мере, шесть аминокислотных остатков, выбранных из аминокислотных остатков C453, H456, H473, N476, R495, G496, H497, и W499 внеклеточного домена рецептора HER2 человека. В некоторых вариантах осуществления, описанные в настоящем документе антитела включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом внеклеточного домена рецептора HER2 человека, который включает, по меньшей мере, аминокислотные остатки C453, H456, H473, N476, R495, G496, H497 и W499 внеклеточного домена рецептора HER2 человека. В некоторых вариантах осуществления, любое или все эти антитела или их антигенсвязывающие фрагменты также связывают, по меньшей мере, один эпитоп на рецепторе HER2 яванского макака.

В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем документе, также включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с эпитопом рецептора HER2 человека, который включает, по меньшей мере, один аминокислотный остаток, выбранный из остатков C453, H473, N476, R495, H497 и W499 внеклеточного домена рецептора HER2 человека, например, остатков 475, 495, 498, 517, 519 и 521 SEQ ID NO: 16 или остатков 453, 473, 476, 495, 497 и 499 SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем документе, включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с эпитопом внеклеточного домена рецептора HER2 человека, который включает, по меньшей мере, два аминокислотных остатка, по меньшей мере, три аминокислотных остатка, по меньшей мере, четыре аминокислотных остатка, по меньшей мере, пять аминокислотных остатков или по меньшей мере, шесть

аминокислотных остатков, выбранных из аминокислотных остатков C453, H473, N476, R495, H497 и W499 внеклеточного домена рецептора HER2 человека. В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем документе, включают антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с эпитопом внеклеточного домена рецептора HER2 человека, который включает, по меньшей мере, аминокислотные остатки C453, H473, N476, R495, H497 и W499. внеклеточного домена рецептора HER2 человека. В некоторых вариантах осуществления, любое или все эти антитела или их антигенсвязывающие фрагменты также связывают, по меньшей мере, один эпитоп на рецепторе HER2 яванского макака.

В некоторых вариантах осуществления, эти антитела проявляют специфичность в отношении HER2 человека, и было показано, что они модулируют, *например*, блокируют, ингибируют, снижают, противодействуют, нейтрализуют или иным образом мешают пути PI3K-Akt, который способствует выживанию клеток за счет снижения уровней фосфорилированного АКТ. В некоторых вариантах осуществления, эти антитела интернализуются с клеточной поверхности клеток, экспрессирующих HER2, со скоростью, которая является такой же или практически аналогичной скорости, с которой интернализуется трастузумаб или его биоаналог. В некоторых вариантах осуществления, эти антитела и антигенсвязывающие фрагменты имеют скорость интернализации, которая составляет примерно 50% от общей поверхности, связанной в момент времени 0, и интернализуется через 4 часа.

В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем документе, содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 17, и вариабельную область легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, по меньшей мере, на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 24.

В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем документе, содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи, по меньшей мере, на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19, и аминокислотную последовательность легкой цепи, по меньшей мере, на 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 26.

В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем документе, содержат аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 17 и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 24.

В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем документе, содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи SEQ ID NO: 19 и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 26.

В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем документе, содержат аминокислотную последовательность CDRH1 SEQ ID NO: 20, аминокислотную последовательность CDRH2 SEQ ID NO: 21, аминокислотную последовательность CDRH3 SEQ ID NO: 22, аминокислотную последовательность CDRL1 последовательность SEQ ID NO: 27, аминокислотную последовательность CDRL2 SEQ ID NO: 28 и аминокислотную последовательность CDRL3 SEQ ID NO: 29.

В некоторых вариантах осуществления, антитела, описанные в настоящем документе, включают одну или несколько консервативных аминокислотных замен в последовательности переменного домена, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более консервативных замен в последовательности переменного домена. В некоторых вариантах осуществления, эти консервативные аминокислотные замены находятся в области CDR, *например*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более консервативных замен производятся суммарно во всех CDR. В некоторых вариантах осуществления, в каждой последовательности CDR может присутствовать до 1, 2, 3 или 4 консервативных аминокислотных замен, например, SEQ ID NO: 20-22 и 27-29.

Специалистам в данной области техники будет понятно, что можно без ненужных экспериментов определить, обладает ли моноклональное антитело той же специфичностью, что и моноклональное антитело XMT-1519, установив, препятствует ли первое связывание последнего связыванию с природным партнером по связыванию или другой молекулой, которая, как известно, связана с HER2. В некоторых вариантах осуществления, если тестируемое моноклональное антитело конкурирует с моноклональным антителом, описанным в настоящем документе, о чем свидетельствует снижение связывания моноклональным антителом, описанным в настоящем документе, то два моноклональных антитела связываются с одним и тем же или близкородственным эпитопом.

В некоторых вариантах осуществления, альтернативный способ определения того, обладает ли моноклональное антитело специфичностью описанного в настоящем документе моноклонального антитела, заключается в предварительной инкубации описанного в настоящем документе моноклонального антитела с растворимым HER2 (с которым оно в норме реагирует), с последующим добавлением тестируемого моноклонального антитела чтобы определить, ингибируется ли тестируемое моноклональное антитело в его способности связывать HER2. Если тестируемое моноклональное антитело ингибируется, то, по всей вероятности, оно имеет такую же или функционально эквивалентную эпитопную специфичность, что и описанное в настоящем документе моноклональное антитело.

В некоторых вариантах осуществления, скрининг моноклональных антител, описанных в настоящем документе, также можно проводить, *например*, путем измерения

активности HER2-опосредованного пути PI3K-Akt и определения того, способно ли тестируемое моноклональное антитело модулировать, блокировать, ингибировать, снижать, противодействовать, нейтрализовать или иным образом вмешиваться в активность пути PI3K-Akt. В некоторых вариантах осуществления, антитела HER2, подходящие для конъюгации, могут быть получены и очищены с помощью хорошо известных методик, например, WO 2015/195917 и PCT/US 2018/019873, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Модифицированные антитела

В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой модифицированное антитело.

В некоторых вариантах модифицированного антитела, * означает прямое или не прямое присоединение к остальной части модифицированного антитела. В некоторых вариантах осуществления, S'' представляет собой сахар или дериватизированный сахар. В некоторых вариантах осуществления, A'' представляет собой функциональную группу, способную образовывать ковалентную связь с функциональной группой группы линкер-лекарственное средство,

В некоторых вариантах осуществления, модифицированное антитело, перед конъюгацией, содержит группу производного сахара *—S''—A'' .

В некоторых вариантах осуществления, модифицированное антитело содержит группу аспарагина в области 290-305 (например, на N297). В некоторых вариантах осуществления, группа производного сахара прямо или косвенно присоединена к группе аспарагина (например, на N297).

В некоторых вариантах осуществления, модифицированное антитело, перед конъюгацией, содержит группу модифицированного GlcNAc *—GlcNAc—S''—A'' , где GlcNAc представляет собой N-ацетилглюкозамин.

В некоторых вариантах осуществления, группа модифицированного GlcNAc соединена с остальной частью модифицированного антитела через положение C1 GlcNAc. В некоторых вариантах осуществления, группа модифицированного GlcNAc дополнительно содержит фукозу.

В некоторых вариантах осуществления, фрагмент модифицированного GlcNAc прямо или косвенно присоединен к группе аспарагина (например, на N297).

В некоторых вариантах осуществления, модифицированное антитело конъюгировано с группой линкер-лекарственное средство посредством ковалентной связи, образованной между A'' и функциональной группой группы линкер-лекарственное средство.

В некоторых вариантах осуществления, модифицированное антитело по настоящему изобретению получают способом, включающим:

(а) контакт гликопротеина (например, гликана антитела), содержащего антитело и группу ядро-GlcNAc, с эндогликозидазой, в результате чего образуется промежуточное

антитело, содержащее антитело и концевую группу-GlcNAc, и, необязательно, концевая группа GlcNAc дополнительно содержит фукозу; и

(b) контакт промежуточного антитела с соединением, имеющим структуру $P''-S''-A''$, в присутствии гликозилтрансферазы, в результате чего образуется модифицированное антитело, содержащее антитело и модифицированную группу GlcNAc, $*-GlcNAc-S''-A''$, и, необязательно, модифицированную группу GlcNAc присоединяют к остальной части модифицированного антитела в положении C1 GlcNAc; где

GlcNAc представляет собой N-ацетилглюкозамин;

S'' представляет собой сахар или дериватизированный сахар;

A'' представляет собой азидо, кето или алкинил; и

P'' представляет собой дифосфат уридина (UDP), гуанозиндифосфат (GDP) или цитидиндифосфат (CDP).

В некоторых вариантах осуществления, стадии (a) и (b) проводят последовательно. В некоторых вариантах осуществления, стадии (a) и (b) проводят одновременно.

В некоторых вариантах осуществления, гликан антитела содержит смесь гликоформ G0, G1, G2, G0F, GIF, G2F и M5 (например, гликоформ, показанных на ФИГ. 1).

В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой моноклональное антитело (mAb).

В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой антитело IgA, IgD, IgE, IgG или IgM.

В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой антитело IgG, например, антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой антитело IgG1.

В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой полноразмерное антитело, а гликан антитела содержит одну или несколько групп ядро-GlcNAc.

В некоторых вариантах осуществления, изобретения антитело представляет собой полноразмерное антитело, и гликан антитела содержит одну или несколько групп ядро-GlcNAc, соединенных с каждой тяжелой цепью антитела.

В некоторых вариантах осуществления, группа ядро-GlcNAc дополнительно содержит фукозу.

В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой полноразмерное антитело, и гликан антитела содержит две или несколько групп ядро-GlcNAc, соединенных с полноразмерным антителом.

В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой полноразмерное антитело, и гликан антитела содержит две группы ядро-GlcNAc, соединенные с полноразмерным антителом.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одна из двух или нескольких групп ядро-GlcNAc дополнительно содержит фукозу.

В некоторых вариантах осуществления, каждая из двух или нескольких групп ядро-GlcNAc дополнительно содержит фукозу.

В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой одноцепочечное антитело или фрагмент антитела (например, Fab или Fc фрагмент), гликан антитела содержит одну или несколько групп ядро-GlcNAc (которые необязательно дополнительно содержат фукозу), соединенных с антителом.

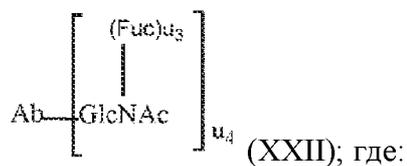
В некоторых вариантах осуществления, группа ядро-GlcNAc соединена с положением антитела, где группа ядро-GlcNAc по существу не затрудняет антигенсвязывающий сайт антитела.

В некоторых вариантах осуществления, группа ядро-GlcNAc соединена с Fc фрагментом антитела. В некоторых вариантах осуществления, группа ядро-GlcNAc соединена с доменом CH. В некоторых вариантах осуществления, группа ядро-GlcNAc соединена с Fab или Fc фрагментом антитела. В некоторых вариантах осуществления, группа ядро-GlcNAc соединена с антителом через N-гликозидную связь с атомом азота амида в боковой цепи аспарагиновой аминокислоты антитела. В некоторых вариантах осуществления, группа ядро-GlcNAc соединена с нативным сайтом N-гликозилирования антитела.

В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой IgG, и группа ядро-GlcNAc соединена с нативным сайтом N-гликозилирования IgG.

В некоторых вариантах осуществления, антитело представляет собой IgG, антитело и группа ядро-GlcNAc соединено с нативным сайтом N-гликозилирования IgG (например, N297 сайт N-гликозилирования IgG). В некоторых вариантах осуществления, N297 сайт N-гликозилирования присутствует в консервативной Fc области тяжелой цепи антитела IgG в области аспарагина в области 290-305 (например, на N297).

В некоторых вариантах осуществления, промежуточное антитело имеет Формулу (XXII):



Ab представляет собой антитело; GlcNAc представляет собой N-ацетилглюкозамин; Fuc представляет собой фукозу; u_3 равно 0 или 1; и u_4 представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 16.

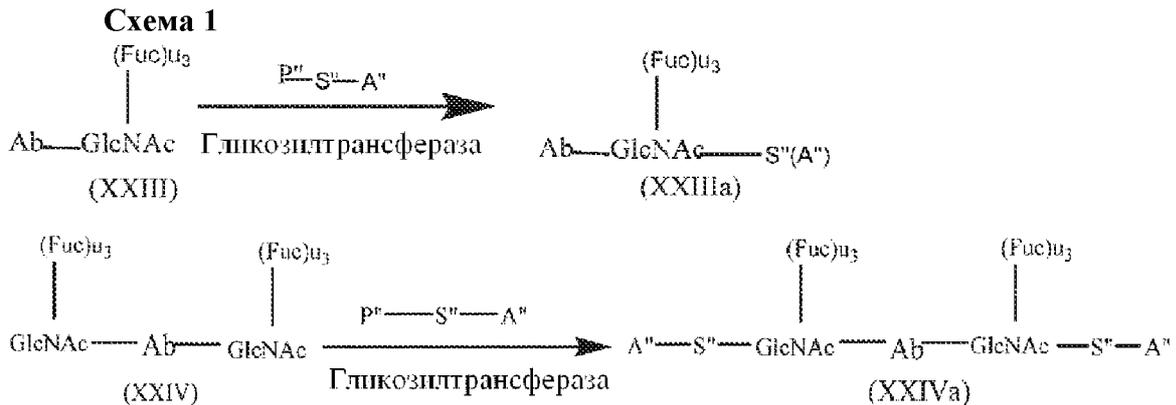
В некоторых вариантах осуществления, u_4 равно целому числу в диапазоне от 1 до 10. В некоторых вариантах осуществления, u_4 равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. В некоторых вариантах осуществления, u_4 равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления, u_4 равно 1, 2, 3 или 4. В некоторых вариантах осуществления, u_4 равно 2 или 4. В некоторых вариантах осуществления, u_4 равно 1 или 2. В некоторых вариантах

осуществления, u_4 равно 1. В некоторых вариантах осуществления, u_4 равно 2.

В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит одну группу ядро-GlcNAc (например, u_4 равно 1). В некоторых вариантах осуществления, антитело содержит две группы ядро-GlcNAc (например, u_4 равно 2).

В некоторых вариантах осуществления, модифицированное антитело получают способом, показанным на Схеме 1. Как показано ниже, взаимодействие промежуточного антитела формулы (XXIII), содержащего одну концевую группу GlcNAc, с соединением, имеющим структуру $P''-S''-A''$, в присутствии гликозилтрансферазы, обеспечивает модифицированное антитело, содержащее одну группу модифицированного GlcNAc (например, модифицированное антитело формулы (XXIIIa)).

В некоторых вариантах осуществления, модифицированное антитело получают контактом промежуточного антитела формулы (XXIV), содержащего две группы концев-GlcNAc, с соединением, имеющим структуру $P''-S''-A''$, в присутствии гликозилтрансферазы, что дает модифицированное антитело, содержащее две модифицированные группы GlcNAc (например, модифицированное антитело формулы (XXIVa)).



где u_3 , Ab, S'' , A'' и P'' имеют значения, указанные в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, гликан антитела, подлежащий модификации в способе по настоящему описанию, содержит гликан, где указанный гликан содержит группу ядро-GlcNAc, т. е. группу GlcNAc, которая присутствует на невосстанавливаемом конце гликана. В некоторых вариантах осуществления, гликан содержит одну или несколько сахаридных групп и может быть линейным или разветвленным.

В некоторых вариантах осуществления, при взаимодействии с эндогликозидазой может образовываться промежуточное антитело, которое содержит группу концев-GlcNAc (например, промежуточное антитело формулы (XXIII) или (XXIV)).

В некоторых вариантах осуществления, стадия (а) процесса (дегликозилирования или укорачивания) показана на ФИГ. 2, где смесь гликоформ антитела G2F, GIF, G0F, G2, G1, G0 и M5 (например, см. ФИГ. 1) и, возможно, дополнительных гликоформ (например,

триантеннарных гликанов) превращается в промежуточные антитела, содержащие концевую группу GlcNAc, которая необязательно содержит фукозу (например, u_3 равно 0 или 1).

В некоторых вариантах осуществления, эндогликозидаза представляет собой эндогликозидазу Endo S, Endo SH, Endo S2, Endo S49, Endo F1, Endo F2, Endo F3 или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления, эндогликозидаза представляет собой Endo S, Endo SH, Endo S2, Endo S49 или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления, эндогликозидаза представляет собой Endo S или Endo SH или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, эндогликозидаза представляет собой Endo SH.

В некоторых вариантах осуществления, стадия (b) процесса (образования модифицированного антитела) показана на ФИГ. 3, где промежуточное антитело содержит моноклональное антитело (mAb) и концевую группу GlcNAc (которая необязательно содержит фукозу (например, u_3 равно 0 или 1)) на каждой тяжелой цепи моноклонального антитела (mAb). В некоторых вариантах осуществления, на стадии (b) группа конец-GlcNAc преобразуется в модифицированную группу GlcNAc. В некоторых вариантах осуществления, указанное превращение может быть осуществлено посредством реакции концевой группы GlcNAc с соединением P"---S"---A" в присутствии гликозилтрансферазы.

В некоторых вариантах осуществления, соединение P"---S"---A" представляет собой GalNAz-UDP (например, 4-AzGalNAc-UDP). В некоторых вариантах осуществления, группа конец-GlcNAc представляет собой *-GlcNAc-GalNAz или *-GlcNAc(Fuc)-GalNAz, где * означает присоединение к остальной части модифицированного антитела.

В некоторых вариантах осуществления, стадии дегликозилирования/укорачивания и формирования модифицированного антитела проводят последовательно.

В некоторых вариантах осуществления, стадии дегликозилирования/укорачивания и образования модифицированного антитела проводят одновременно.

В некоторых вариантах осуществления, процесс получения модифицированного антитела проводят в подходящем буферном растворе, например, в забуференном солевом растворе (например, в фосфатно-солевом буфере, в трис-буферном солевом растворе), цитрате, HEPES, Tris и глицине. В некоторых вариантах осуществления, буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой раствор (PBS) или забуференный Tris солевой раствор. В некоторых вариантах осуществления, буферный раствор представляет собой фосфатно-солевой буфер (PBS).

В некоторых вариантах осуществления, процесс проводят при температуре от примерно 4 до примерно 50°C. В некоторых вариантах осуществления, процесс проводят

при температуре от примерно 10 до примерно 45°C. В некоторых вариантах осуществления, процесс проводят при температуре от примерно 20 до примерно 40°C. В некоторых вариантах осуществления, процесс проводят при температуре от примерно 30 до примерно 37°C. В некоторых вариантах осуществления, процесс проводят при температуре примерно 30°C. В некоторых вариантах осуществления, процесс проводят при температуре 30°C.

В некоторых вариантах осуществления, процесс проводят при значении pH в диапазоне от примерно 5 до примерно 9 (например, от примерно 5,5 до примерно 8,5, от примерно 6 до примерно 8 или от примерно 7 до примерно 8). В некоторых вариантах осуществления, процесс проводят при значении pH примерно 7,4.

В некоторых вариантах осуществления, процесс получения модифицированного антитела показан на ФИГ. 4.

В некоторых вариантах осуществления, способ получения модифицированного антитела включает:

контакт гликопротеина (например, гликана антитела), содержащего антитело, и группы ядро-GlcNAc, связанной с сайтом N297 антитела, с эндогликозидазой Endo SH, в результате чего образуется промежуточное антитело, содержащее концевую группу GlcNAc; и

контакт промежуточного антитела с 4-AzGalNAc-UDP в присутствии фермента β -(1,4)-GalNAcT с образованием модифицированного антитела, содержащего группу модифицированного GlcNAc;

где стадии (a) и (b) проводят одновременно.

В некоторых вариантах осуществления, эндогликозида представляет собой Endo SH, гибрид двух эндогликозидаз, Endo S и Endo H, связанных Gly-богатым спейсером, содержащим внутреннюю метку 6xHis, что дает общую молекулярную массу 139 кДа.

В некоторых вариантах осуществления, фермент β -(1,4)-GalNAcT содержит N-концевую метку 6xHis и имеет общую молекулярную массу 45,7 кДа. В некоторых вариантах осуществления, фермент β -(1,4)-GalNAcT, содержащий N-концевую метку 6xHis, получен из *Trichopulsia ni*.

В некоторых вариантах процесс проводят в буфере PBS при значении pH примерно 7,4 и при температуре примерно 30°C.

Эндогликозидазы

Эндогликозидазы представляют собой ферменты, способные расщеплять внутренние гликозидные связи в гликановых структурах, тем самым ремоделируя или сокращая структуру гликанов. Например, эндогликозидазы можно использовать для легкой гомогенизации гетерогенных популяций гликанов, когда они расщепляются в прогнозируемых сайтах в пределах консервативных областей гликанов. Один класс эндогликозидаз включает эндо- β -N-ацетилглюкозаминидазы (EC 3.2.1.96, широко известные как Endo S или ENGases), класс гидролитических ферментов, которые удаляют N-гликаны из гликопротеинов путем гидролиза β -1,4-гликозидной связи в ядре N,N'-

диацетилхитобиозы (как описано в Wong et al. Chem. Rev. 2011, 111, 4259, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки), оставляя одно ядро N-связанного остатка GlcNAc. Эндо- β -N-ацетилглюкозаминидазы широко распространены в природе с обычными хемоферментными вариантами, включая Endo D, который специфичен для пауциманнозы; Endo A и Endo H, специфичные для высокого содержания маннозы; подтипы Endo F, которые варьируются от высокоманнозных до двухантенных комплексов; и Endo M, которые могут расщеплять большинство N-гликановых структур (высокоманнозных/комплексного типа/гибридного типа), за исключением фукозилированных гликанов, и гидролитическая активность олигосахаридов высокоманножного типа значительно выше, чем у олигосахаридов комплексного и гибридного типа. В некоторых вариантах осуществления, эти ENGases проявляют специфичность в отношении дистальной N-гликановой структуры, а не белка, отображающего ее, что делает их полезными для отщепления большинства N-связанных гликанов от гликопротеинов в нативных условиях.

В некоторых вариантах осуществления, эндогликозидазы F1, F2 и F3 подходят для дегликозилирования нативных белков. Специфичность связывания Endo F1, F2 и F3 позволяет предположить общую стратегию дегликозилирования белков, которая может удалять все классы N-связанных олигосахаридов без денатурации белка. В некоторых вариантах осуществления, биантеннарные и триантеннарные структуры могут быть немедленно удалены эндогликозидазами F2 и F3, соответственно. В некоторых вариантах осуществления, олигоманнозные и гибридные структуры могут быть удалены с помощью Endo F1.

Endo S представляет собой секретируемую эндогликозидазу из *Streptococcus pyogenes* и также принадлежит к семейству 18 гликозидгидролаз, как описано Collin et al. (EMBO J., 2001, 20, 3046), которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. В отличие от ENGases, упомянутых выше, Endo S обладает более определенной специфичностью и специфична для расщепления только консервативного N-гликана в Fc домене IgG человека (до настоящего времени не было идентифицировано никакого другого субстрата), что позволяет предположить, что взаимодействие белок-белок между ферментом и IgG обеспечивает эту специфичность.

Endo S49, также известная как Endo S2, описана в WO 2013/037824, полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки, выделена из *Streptococcus pyogenes* NZ131 и является гомологом Endo S. Endo S49 обладает специфической эндогликозидазной активностью в отношении нативного IgG и расщепляет большее количество Fc гликанов, чем Endo S.

Endo SH представляет собой слияние двух эндогликозидаз, Endo S и Endo H, связанных спейсером, богатым Gly. Endo SH специфически расщепляет N-связанные гликаны между двумя группами N-ацетилглюкозама (GluNAc) в коровой области гликановой цепи.

В некоторых вариантах осуществления, эндогликозидаза для дегликозилирования

антитела представляет собой Endo S, Endo SH, Endo S2, Endo S49, Endo F1, Endo F2, Endo F3, Endo H, Endo M, Endo A или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, эндогликозидаза для дегликозилирования антитела представляет собой Endo S, Endo SH, Endo S2, Endo S49, Endo F1, Endo F2, Endo F3, Endo H или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, эндогликозидаза представляет собой Endo S, Endo SH, Endo S2 или Endo S49.

В некоторых вариантах осуществления, когда гликан, подлежащий укорачиванию, представляет собой двухантенную структуру сложного типа, эндогликозидаза представляет собой Endo S, Endo SH, Endo S2, Endo S49, Endo F1, Endo F2, Endo F3 или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления, когда гликопротеин представляет собой антитело, и олигосахарид, подлежащий укорачиванию, представляет собой двухантенную структуру сложного типа и присутствует в консервативном сайте N-гликозилирования IgG на N297, эндогликозидаза представляет собой Endo S, Endo SH, Endo S2, Endo S49, Endo F1, Endo F2, Endo F3 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, эндогликозидаза представляет собой Endo S, Endo SH, Endo S2, Endo S49 или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления, когда гликопротеин представляет собой антитело, и гликан, подлежащий укорачиванию, представляет собой двухантенную структуру сложного типа и не присутствует в консервативном сайте N-гликозилирования IgG на N297, эндогликозидаза представляет собой Endo F1, Endo F2, Endo F3 или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления, когда гликан, подлежащий обрезке, имеет высокое содержание маннозы, эндогликозидаза представляет собой Endo H, Endo M, Endo A, Endo F1 или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления, когда гликопротеин представляет собой антитело, и олигосахарид, подлежащий укорачиванию, имеет высокое содержание маннозы в дополнение к диантенной структуре сложного типа, присутствующей в консервативном сайте N-гликозилирования IgG на N297, эндогликозидаза представляет собой Endo S, Endo SH, Endo S2, Endo S49 или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления, эндогликозидаза представляет собой Endo S или Endo SH. В некоторых вариантах осуществления, эндогликозидаза представляет собой Endo SH.

В некоторых вариантах осуществления, фермент эндогликозидаза, как определено в настоящем документе, содержит последовательность, кодирующую метку для облегчения очистки. В некоторых вариантах осуществления, указанная метка включает, но не ограничена ими, FLAG-метку, поли(His)-метку, HA-метку, Мус-метку, SUMO-метку, GST-метку, MBP-метку или CBP-метку. В некоторых вариантах осуществления, указанная метка представляет собой 6xHis метку. В некоторых вариантах осуществления, указанная метка ковалентно связана с эндогликозидным ферментом на С-конце фермента или на внутреннем остатке. В некоторых вариантах осуществления, указанная метка

ковалентно связана с ферментом эндогликозида на N-конце фермента.

В некоторых вариантах осуществления, Endo SH представляет собой слияние двух эндогликозидаз, Endo S и Endo H, связанных Gly-богатым спейсером, содержащим внутреннюю bхHis метку, что дает общую молекулярную массу 139 кДа.

Гликозилтрансферазы

Способ получения модифицированного антитела включает обработку дегликозилированного/укороченного антитела, имеющего необязательно фукозилированную концевую группу N-ацетилглюкозамина (Gal-NAc), с соединением формулы S"(A")-P" в присутствии гликозилтрансферазы с образованием модифицированного антитела, имеющего заместитель GlcNAc-S"(A"), связанный с антителом на C1 группы GalNAc через β -1,4-О-гликозидную связь.

В некоторых вариантах осуществления, гликозилтрансфераза представляет собой β -1,4-галактозилтрансферазу (4Gal-T), β -(1,4)-ацетилгалактозаминилтрансферазу (β -(1,4)-GalNAcT или GalNAcT) или ее мутант.

β -(1,4)-Ацетилгалактозаминилтрансферазы (β -(1,4)-GalNAcTs или GalNAcTs) были идентифицированы в ряде организмов, включая человека, *Caenorhabditis elegans* (Kawar et al, J. Biol. Chem. 2002, 277, 34924, полностью включенная в настоящий документ посредством ссылки), *Drosophila melanogaster* (Hoskins et al. Science 2007, 316, 1625, полностью включенная в настоящий документ посредством ссылки) и *Trichoplusia ni* (Vadaie et al, J. Biol. Chem. 2004, 279, 33501, полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки).

β -(1,4)-N-ацетилгалактозаминилтрансферазы (β -(1,4)-GalNAcT) известны в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, β -(1,4)-GalNAcT представляет собой фермент, который катализирует перенос N-ацетилгалактозамина (GalNAc) от уридиндифосфата-GalNAc (UDP-GalNAc, также обозначаемого как GalNAc-UDP) к концевой группе GlcNAc гликопротеинового гликана, где C1 группы GalNAc присоединен к антителу через β -1,4-О-гликозидную связь. В некоторых вариантах осуществления, концевая группа GlcNAc фукозилирована

В некоторых вариантах осуществления, фермент β -(1,4)-GalNAcT, используемый в способе по изобретению, представляет собой или является производным фермента β -(1,4)-GalNAcT беспозвоночных, например, представляет собой или является производным β -(1,4)-GalNAcT, который происходит из беспозвоночных видов животных. Фермент β -(1,4)-GalNAcT может быть или может быть получен из любого фермента β -(1,4)-GalNAcT беспозвоночных, известного специалисту в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, фермент β -(1,4)-GalNAcT представляет собой или является производным из фермента β -(1,4)-GalNAcT, происходящего из типа Nematoda, такого как, например, класса Chromadorea или Secernentea, или типа Arthropoda, такого как, например, класс Insecta. В некоторых вариантах осуществления, фермент β -(1,4)-GalNAcT представляет собой или является производным из фермента β -(1,4)-GalNAcT, происходящего из *Caenorhabditis elegans*, *Caenorhabditis remanei*, *Caenorhabditis briggsae*,

Ascaris suum, *Trichoplusia ni*, *Drosophila melanogaster*, *Wuchereria bancrofti*, *Loa loa*, *Cerapachys biroi*, *Zootermopsis nevadensis*, *Camponotus floridanus*, *Crassostrea gigas* или *Danaus plexippus*, (например, из *Caenorhabditis elegans*, *Ascaris suum*, *Trichoplusia ni* или *Drosophila melanogaster*). В некоторых вариантах осуществления, фермент β -(1,4)-GalNAcT представляет собой или является производным из фермента β -(1,4)-GalNAcT, происходящего из *Caenorhabditis elegans*, *Ascaris suum* или *Trichoplusia ni*. В других вариантах осуществления, фермент β -(1,4)-GalNAcT представляет собой или является производным из фермента β -(1,4)-GalNAcT, происходящего из *Trichoplusia ni*.

Термин «производный из» включает, например, усеченные ферменты, мутантные ферменты, ферменты, содержащие метку для облегчения очистки, или комбинацию этих модификаций. Таким образом, «производный из» относится к аминокислотной последовательности, которая изменена по сравнению с встречающимся в природе ферментом β -(1,4)-GalNAcT путем замены, вставки, удаления или добавления одной или нескольких (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20 и более) аминокислот, соответственно. Фермент β -(1,4)-GalNAcT, полученный из фермента β -(1,4)-GalNAcT, также упоминается в настоящем документе как производный фермент β -(1,4)-GalNAcT или модифицированный фермент β -(1,4)-GalNAcT или мутантный фермент β -(1,4)-GalNAcT.

В некоторых вариантах осуществления, полученный фермент β -(1,4)-GalNAcT модифицирован путем добавления дополнительных N- или C-концевых аминокислот или химических групп, или удаления N- или C-концевых аминокислот для повышения стабильности, растворимости, активности и/или легкости очистки.

В некоторых вариантах осуществления, фермент β -(1,4)-GalNAcT модифицируют путем удаления N-концевого цитоплазматического домена и трансмембранного домена, что называется усеченным ферментом.

Фермент β -(1,4)-GalNAcT, в котором одна или несколько аминокислот заменены, добавлены или удалены, в настоящем документе также называется мутантным ферментом β -(1,4)-GalNAcT или производным ферментом β -(1,4)-GalNAcT. В некоторых вариантах осуществления, фермент β -(1,4)-GalNAcT модифицируют путем делеции N-концевого цитоплазматического домена и трансмембранного домена и мутируют путем замены одной или нескольких аминокислот. Замена одной или нескольких аминокислот в настоящем описании также называется мутацией. Фермент, содержащий одну или несколько замененных аминокислот, также называют мутантным ферментом.

В некоторых вариантах осуществления, когда гликозилтрансфераза представляет собой фермент β -(1,4)-GalNAcT или усеченный фермент β -(1,4)-GalNAcT, фермент дополнительно содержит одну или несколько мутаций. В некоторых вариантах осуществления, эти мутации включают, но не ограничены ими, замену изолейцина (He, также обозначаемого как I) в положении 257 на лейцин (Leu, также обозначаемый как L), метионин (Met, также обозначаемый как M) или аланин (Ала, также называемый А). В некоторых вариантах осуществления, также включена замена метионина (Met, также

обозначаемого как М) в положении 312 на гистидин (His, также обозначаемый как Н). Следует отметить, что нумерация позиций аминокислот в настоящем документе основана на нумерации позиций аминокислот в ферменте β -(1,4)-GalNAcT дикого типа. Когда фермент β -(1,4)-GalNAcT представляет собой, например, усеченный фермент, число, используемое в настоящем документе для обозначения положения аминокислотной замены, соответствует нумерации положения аминокислоты в соответствующем ферменте β -(1,4)-GalNAcT дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления, гликозилтрансфераза представляет собой фермент β (1,4)-GalT, содержащий мутантный каталитический домен.

Каталитический домен может иметь аминокислотную последовательность, обнаруженную в ферменте дикого типа, или иметь аминокислотную последовательность, которая отличается от аминокислотной последовательности дикого типа. Каталитический домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности дикого типа, в настоящем документе называется мутантным каталитическим доменом. В некоторых вариантах осуществления, мутация может включать замену одной аминокислоты (например, точечная мутация) или замену нескольких аминокислот (например, от 1 до 10, или от 1 до 6, или 1, 2, 3 или 4, или 1 или 2 аминокислоты), или делецию или вставку одной или нескольких аминокислот (например, от 1 до 10, или от 1 до 6, или 1, 2, 3 или 4, или 1 или 2) аминокислот. В некоторых вариантах осуществления, указанный мутантный каталитический домен может присутствовать в полноразмерном ферменте, например, β (1,4)-галактозилтрансферазе или α (1,3)-N-галактозилтрансферазе, а также в полипептидном фрагменте или рекомбинантном полипептиде, содержащий указанный мутантный каталитический домен, необязательно связанный с дополнительными аминокислотами.

β (1,4)-галактозилтрансфераза I в настоящем документе обозначается как GalT. Такие мутантные каталитические домены GalT описаны, например, в WO 2004/063344, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки. В WO 2004/063344 также описаны Tyr-289 мутанты GalT и способы их получения. Эти мутанты обозначаются как Y289L, Y289N или Y289I.

В некоторых вариантах осуществления, мутантный каталитический домен GalT представляет собой Y289L, Y289N, Y289I, Y284L или R228K. В некоторых вариантах осуществления, мутантный каталитический домен GalT представляет собой Y289L.

В некоторых вариантах осуществления, мутанты GalT Y289F, GalT Y289M, GalT Y289V, GalT Y289G, GalT Y289I, GalT Y289A, GalT Y289N и GalT Y289L могут быть получены с помощью процессов сайт-направленного мутагенеза, описанных, например, в WO 2004063344, Qasba et al, *Prot. Expr. Pur.* 2003, 30, 219 и Qasba et al, *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 20833 (все полностью включены в настоящий документ посредством ссылки). В GalT Y289F аминокислота тирозин (Y) в положении 289 заменена на аминокислоту фенилаланин (F), в GalT Y289M указанный тирозин заменен на аминокислоту метионин (M), в GalT Y289V, на аминокислоту валин (V), в GalT Y289G, на аминокислоту глицин

(G), в GalT Y289I, на аминокислоту изолейцин (I) и в Y289A, на аминокислоту аланин (A).

В некоторых вариантах осуществления, фермент β -(1,4)-GalNAcT содержит последовательность, кодирующую метку для облегчения очистки. В некоторых вариантах осуществления, указанная метка включает, но не ограничена ими, FLAG-метку, поли(His)-метку, HA-метку, Мус-метку, SUMO-метку, GST-метку, MBP-метку или CBP-метку. В других вариантах осуществления, указанная метка представляет собой 6xHis метку. В некоторых вариантах осуществления, указанная метка ковалентно связана с ферментом β -(1,4)-GalNAcT на С-конце фермента. В некоторых вариантах осуществления, указанная метка ковалентно связана с ферментом β -(1,4)-GalNAcT на N-конце фермента.

В некоторых вариантах осуществления, фермент β -(1,4)-GalNAcT содержит N-концевую 6xHis метку и имеет общую молекулярную массу 45,7 кДа. В некоторых вариантах осуществления, фермент β -(1,4)-GalNAcT, содержащий N-концевую 6xHis метку, получен из *Trichopulsia ni*.

Молекулы P''-S''-A''

В некоторых вариантах осуществления, молекула P''-S''-A'', для применения в процессе получения модифицированного антитела по настоящему изобретению, может представлять собой любое нуклеотидное производное сахара, которое является субстратом для подходящего катализатора галактозилтрансферазы.

В некоторых вариантах осуществления, S''-A'' представляет собой группу производного сахара, где:

S'' представляет собой сахар или дериватизированный сахар; и A'' представляет собой функциональную группу, способную образовывать ковалентную связь с функциональной группой группы линкер-лекарственное средство.

В некоторых вариантах осуществления, A'' представляет собой азидо, кето или алкинильную группу. В некоторых вариантах осуществления, A'' представляет собой азидо или кетогруппу. В некоторых вариантах осуществления, A'' представляет собой азидогруппу. В некоторых вариантах осуществления, A'' представляет собой -N³. В некоторых вариантах осуществления, A'' представляет собой кетогруппу.

В некоторых вариантах осуществления, A'' представляет собой $-[C(R^{8k})_2]_{x_2}C(O)R^{9k}$, где:

R^{9k} представляет собой метил или необязательно замещенный C₂₋₂₄ алкил;

каждый R^{8k} независимо представляет собой водород, галоген или R^{9k}; и

x₂ представляет собой целое число от 0 до 24.

В некоторых вариантах осуществления, x₂ представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 10. В некоторых вариантах осуществления, x₂ представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В некоторых вариантах осуществления, каждый R^{8k} представляет собой водород.

В некоторых вариантах осуществления, A'' представляет собой алкинильную группу. В некоторых вариантах осуществления, A'' представляет собой концевую алкинильную, циклоалкинильную или гетероциклоалкинильную группу. В некоторых

вариантах осуществления, А'' представляет собой концевую алкинильную группу. В некоторых вариантах осуществления, А'' представляет собой циклоалкинильную группу. В некоторых вариантах осуществления, А'' представляет собой гетероциклоалкинильную группу.

В некоторых вариантах осуществления, А'' представляет собой группу $-[C(R^{8k})_2]_{x_2}-C\equiv C-R^{8k}$, где R^{8k} и x_2 имеют значения, указанные в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, А'' представляет собой $-[CH_2]_{x_2}-C\equiv CH$.

В некоторых вариантах осуществления, S''-A'' получают из сахара или дериватизированного сахара, например, аминасахара или иным образом дериватизированного сахара. В некоторых вариантах осуществления, примеры сахаров и производных сахаров включают, но не ограничены ими, галактозу (Gal), маннозу (Man), глюкозу (Glc), глюкуроновую кислоту (Gcu) и фукозу (Fuc). Подразумевается, что аминасахар представляет собой сахар, в котором гидроксильная (OH) группа заменена аминогруппой. Примеры аминасахаров включают, но не ограничены ими, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) и N-ацетилгалактозамин (GalNAc). Примеры других производных сахаров включают, но не ограничены ими, глюкуроновую кислоту (Gcu) и N-ацетилнейраминовою кислоту (сиаловую кислоту).

В некоторых вариантах осуществления, S''-A'' получают из галактозы (Gal), маннозы (Man), N-ацетилглюкозамина (GlcNAc), глюкозы (Glc), N-ацетилгалактозамина (GalNAc), глюкуроновой кислоты (Gcu), фукозы (Fuc) или N-ацетилнейраминовой кислоты (сиаловой кислоты). В некоторых вариантах осуществления, S''-A'' получают из GlcNAc, Glc, Gal или GalNAc. В некоторых вариантах осуществления, S''-A'' получают из GlcNAc. В некоторых вариантах осуществления, S''-A'' получают из Glc. В некоторых вариантах осуществления, S''-A'' получают из Gal или GalNAc. В некоторых вариантах осуществления, S''-A'' получают из Gal. В некоторых вариантах осуществления, S''-A'' получают из GalNAc.

В некоторых вариантах осуществления, функциональная группа «А» может быть присоединен к S'' различными способами.

В некоторых вариантах осуществления, А'' непосредственно присоединен к атому углерода в положении C2, C3, C4 или C6 сахара или производного сахара S'' (например, вместо гидроксила в соответствующем положении).

В некоторых вариантах осуществления, S'' представляет собой фукозу или дериватизированную фукозу, в которой отсутствует какое-либо гидроксильное положение C6. В некоторых вариантах осуществления, когда А'' присоединен к положению C6 фукозы или дериватизированной фукозы, А'' непосредственно присоединен к атому углерода в положении C6.

В некоторых вариантах осуществления, А'' представляет собой азидогруппу, и А'' присоединен к положению C2, C4 или C6 сахара или дериватизированного сахара S''.

В некоторых вариантах осуществления, А'' представляет собой азидогруппу, и А'' непосредственно присоединен к атому углерода в положении C2, C3, C4 или C6 сахара

или дериватизированного сахара S'' (например, вместо гидроксила в соответствующем положении). В некоторых вариантах осуществления, S''-A'' представляет собой 6-азидофукозу (6-AzFuc). В некоторых вариантах осуществления, A'' представляет собой азидогруппу, и A'' присоединен к N-ацетильной группе аминсахара или дериватизированного аминсахара (например, путем замены ацетильной группы на азидоацетильную группу). В некоторых вариантах осуществления, S''-A'' представляет собой 2-азидоацетамидогалактозу (GalNAz), 6-азидо-6-дезоксигалактозу (6-AzGal), 6-азидо-6-дезоксидо-2-ацетамидогалактозу (6-AzGalNAc), 4-азидо-4-дезоксидо-2-ацетамидогалактозу (4-AzGalNAc), 6-азидо-6-дезоксидо-2-азидоацетамидогалактозу (6-AzGalNAz), 2-азидоацетамидоглюкозу (GlcNAz), 6-азидо-6-дезоксиглюкозу (6-AzGlc), 6-азидо-6-дезоксидо-2-ацетамидоглюкозу (6-AzGlcNAc), 4-азидо-4-дезоксидо-2-ацетамидоглюкозу (4-AzGlcNAc) или 6-азидо-6-дезоксидо-2-азидоацетамидоглюкозу (6-AzGlcNAz). В некоторых вариантах осуществления, S''-A'' представляет собой GalNAz, 4-AzGalNAc, GlcNAz или 6-AzGlcNAc.

В некоторых вариантах осуществления, P''-S''-A'' представляет собой соединение формулы (XXIVb), (XXXIVc) или (XXIVd) или его соль.

В некоторых вариантах осуществления, A'' кето, и A'' непосредственно присоединен к атому углерода в положении C2 сахара или дериватизированного сахара S'' (например, вместо гидроксила в соответствующем положении).

В некоторых вариантах осуществления, A'' присоединен к атому азота аминсахара или дериватизированного аминсахара, например C2-дериватизированного аминсахара. В некоторых вариантах осуществления, дериватизированный аминсахар содержит группу -NC(O)-R^{9k}, где R^{9k} представляет собой метил или необязательно замещенный C₂₋₂₄ алкил (например, этил).

В некоторых вариантах осуществления, R^{9k} представляет собой этил.

В некоторых вариантах осуществления, S''-A'' представляет собой 2-дезоксидо-(2-оксопропил)галактозу (2-кето-Gal), 2-N-пропионилгалактозамин (2-N-пропионил-GalNAc), 2-N-(4-оксопентаноил)-галактозамин (2-N-Lev-Gal) или 2-N-бутирилгалактозамин (2-N-бутирил-GalNAc). В некоторых вариантах осуществления, S''-A'' представляет собой 2-кетоGalNAc или 2-N-пропионил-GalNAc.

В некоторых вариантах осуществления, P''-S''-A'' представляет собой соединение формулы (XXIVe) или (XXIVf) или его соль.

В некоторых вариантах осуществления, A'' представляет собой концевой алкинил, циклоалкинил или гетероциклоалкинил. В некоторых вариантах осуществления, A'' присоединен к C2-дериватизированному аминсахару S''.

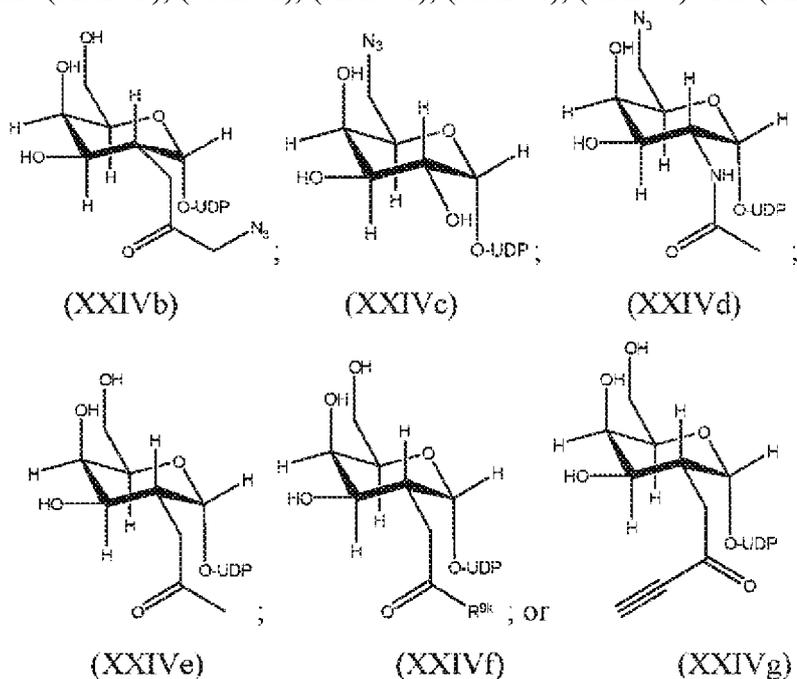
В некоторых вариантах осуществления, S''-A'' представляет собой 2-(бут-3-иновую кислоту амидо)-2-дезоксигалактозу.

В некоторых вариантах осуществления, P''-S''-A'' представляет собой соединение формулы (XXIVg) или его соль. В некоторых вариантах осуществления, P''-S''-A'' представляет собой соединение формулы (XXIVd) или его соль.

В некоторых вариантах осуществления, соединения P''-S''-A'' могут быть синтезированы в соответствии с различными способами, известными в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления, соединения синтезируют путем связывания нуклеозидмонофосфата или нуклеозиддифосфата P'' с производным сахара S''-A'', например, как описано в Wang et al. (Chem. Eur. J. **16**:13343-13345 (2010)), Piller et al. (ACS Chem. Biol. **7**:753 (2012)), Piller et al. (Bioorg. Med. Chem. Lett. **15**:5459-5462 (2005)) и публикации заявки PCT WO/2009/102820, каждая из которых полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления, P'' представляет собой нуклеозидмоно- или дифосфат. В некоторых вариантах осуществления, P'' представляет собой уридиндифосфат (UDP), гуанозиндифосфат (GDP), тимидиндифосфат (TDP), цитидиндифосфат (CDP) или цитидинмонофосфат (CMP). В некоторых вариантах осуществления, P'' представляет собой уридиндифосфат (UDP).

В некоторых вариантах осуществления, P''-S''-A'' представляет собой соединение формулы (XXIVb), (XXIVc), (XXIVd), (XXIVe), (XXIVf) или (XXIVg):



или его соли, где R^{9k} представляет собой C₂₋₂₄ алкильную группу.

В некоторых вариантах осуществления, P''-S''-A'' представляет собой GalNAz-UDP (например, формулы (XXIVb)), 6-AzGal-UDP (например, формулы (XXIVc)), 6-AzGalNAc-UDP (например, формулы (XXIVd)), 4-AzGalNAz-UDP, 6-AzGalNAz-UDP, 6-AzGlc-UDP, 6-AzGlcNAz-UDP, 2-кето-Gal-UDP (например, Формулы (XXIVe)), 2-N-пропионил-GalNAc-UDP (например, Формулы (XXIVf), где R^{9k} представляет собой этил), или 2-(бут-3-иновой кислоты амидо)-2-дезоксигалактоза-UDP (например, Формулы (XXIVg)).

В некоторых вариантах осуществления, P''-S''-A'' представляет собой GalNAz-UDP или 4-AzGalNAc-UDP. В некоторых вариантах осуществления, P''-S''-A'' представляет

собой соединение формулы (XXIVb) или (XXIVd). Синтезы GalNAz-UDP (например, формулы (XXIVb)) и 6-AzGalNAc-UDP (например, формулы (XXIVd)) описаны в Piller et al. (Bioorg. Med. Chem. Lett. **15**:5459-5462 (2005)) и Wang et al. (Chem. Eur. J. **16**:13343-13345 (2010)), каждый из которых полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

В некоторых вариантах осуществления, P^{''}-S^{''}-A^{''} представляет собой 4-AzGalNAc-UDP. В некоторых вариантах осуществления, P^{''}-S^{''}-A^{''} представляет собой соединение формулы (XXIVd) или его соль. Синтез 2-ketoGal-UDP (XXIVe) описан в Qasba et al. (J. Am. Chem. Soc. **125**:16162 (2003)), и в дополнительной информации, которые полностью включены в настоящий документ посредством ссылки.

Синтез 2-(бут-3-иновой кислоты амидо)-2-дезоксигалактозы-UDP описан в публикации заявки РСТ № WO/2009/102820, которая полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство

В некоторых вариантах осуществления, конъюгаты антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению могут быть получены путем взаимодействия модифицированного антитела по настоящему изобретению с группой линкер-лекарственное средство, содержащей функциональную группу (например, W^P), которая способна образовывать ковалентную связь с функциональной группой A^{''} группы модифицированного GlcNAc, *—GlcNAc—S^{''}—A^{''}, в модифицированном антителе.

В некоторых вариантах осуществления, W^P включает алкинил, например, циклоалкинил, гетероциклоалкинил или концевой алкинил.

В некоторых вариантах осуществления, функциональная группа A^{''} модифицированного антитела представляет собой азидо, кето или алкинил. В некоторых вариантах осуществления, функциональная группа A^{''} модифицированного антитела представляет собой азидо. В некоторых вариантах осуществления, азидофункциональная группа A^{''} модифицированного антитела взаимодействует с алкинилом W^P (например, циклоалкинилом, гетероциклоалкинилом или концевым алкинилом) группы линкер-лекарственное средство, с образованием триазольной группы (например, посредством реакции циклоприсоединения). Реакция циклоприсоединения азидогруппы к алкинильной группе известна в данной области техники как «клик-химия».

В некоторых вариантах осуществления, W^P группы линкер-лекарственное средство содержит концевой алкинил, и реакцию циклоприсоединения можно проводить в присутствии катализатора (например, катализатора Cu(I)).

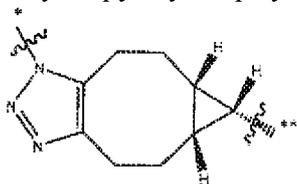
В некоторых вариантах осуществления, W^P группы линкер-лекарственное средство включает циклоалкинил или гетероциклоалкинил (например, напряженный циклоалкинил или гетероциклоалкинил).

В некоторых вариантах осуществления, W^P группы линкер-лекарственное средство содержит напряженный циклоалкинил или гетероциклоалкинил, и реакцию

циклоприсоединения можно проводить в присутствии или в отсутствие катализатора. В некоторых вариантах осуществления, реакция циклоприсоединения может протекать спонтанно в результате реакции, называемой облегченным напряжением азид-алкиновым циклоприсоединением (SPAAC), которая известна в данной области техники как «клик-химия без использования металлов». В некоторых вариантах осуществления, напряженный циклоалкинил или гетероциклоалкинил является таким, как описано в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, при конъюгации, функциональная группа А" модифицированного антитела и W^P группы линкер-лекарственное средство образуют триазольную группу.

В некоторых вариантах осуществления, при конъюгации, функциональная группа А" модифицированного антитела и W^P группы линкер-лекарственное средство образуют триазольную группу Формулы (XXXV):



(XXXV), где * обозначает прямое или не прямое присоединение к остальной части модифицированного антитела; и ** указывает на присоединение к M^P.

В некоторых вариантах осуществления, когда азид-модифицированное антитело по настоящему изобретению взаимодействует с группой линкер-лекарственное средство, содержащей алкинильную группу, с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство посредством реакции циклоприсоединения, образованная триазольная группа в конъюгате антитело-лекарственное средство может быть устойчивой к гидролизу и/или другим путям деградации.

В некоторых вариантах осуществления, когда модифицированное альдегидом или кетоном антитело по настоящему описанию взаимодействует с группой линкер-лекарственное средство, содержащей гидроксилмин или гидразин, образующая группа оксима или гидразона в конъюгате антитело-лекарственное средство может быть относительно инертной в нейтральных условиях.

В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению может обладать высокой стабильностью.

В некоторых вариантах осуществления, модифицированное антитело и конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению могут быть синтезированы практическими синтетическими путями, поскольку процесс введения функциональной группы А" (например, азидо, кето или алкинила) в антитело является прямым и общеприменимым.

В некоторых вариантах осуществления, сайт-специфический конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему описанию получают с помощью процесса,

включающего взаимодействие модифицированного антитела с группой линкер-лекарственное средство, где:

группа линкер-лекарственное средство содержит циклоалкинил или гетероциклоалкинил,

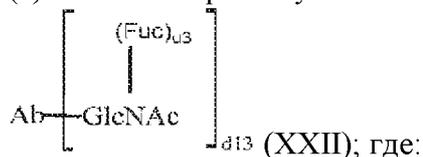
модифицированное антитело, до конъюгации, содержит антитело и модифицированную группу $\text{GlcNAc}^*-\text{GlcNAc}-\text{S}''-\text{A}''$, присоединенную к антителу через положение C1 GlcNAc; GlcNAc представляет собой N-ацетилглюкозамин; S'' представляет собой сахар или дериватизированный сахар; и A'' представляет собой азидо.

В некоторых вариантах осуществления, A'' представляет собой циклоалкинил или гетероциклоалкинил. В некоторых вариантах осуществления, A'' представляет собой циклоалкинил. В некоторых вариантах осуществления, A'' представляет собой гетероциклоалкинил.

В некоторых вариантах осуществления, A'' представляет собой напряженный циклоалкинил или гетероциклоалкинил. В некоторых вариантах осуществления, A'' представляет собой напряженный циклоалкинил. В некоторых вариантах осуществления, A'' представляет собой напряженный гетероциклоалкинил.

В некоторых вариантах осуществления, сайт-специфический конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению получают с помощью процесса, включающего следующие стадии:

(a) контакт с промежуточным антителом формулы (XXII):



Ab представляет собой антитело; GlcNAc представляет собой N-ацетилглюкозамин; Fuc представляет собой фукозу; u_3 равно 0 или 1; и d_{13} представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 12;

с соединением $\text{P}''-\text{S}''-\text{A}''$, где:

S'' представляет собой сахар или дериватизированный сахар; A'' представляет собой азидо; и P'' представляет собой уридиндифосфат (UDP), гуанозиндифосфат (GDP) или цитидиндифосфат (CDP);

в присутствии галактозилтрансферазы с образованием модифицированного антитела, содержащего группу модифицированной $\text{GlcNAc}^*-\text{GlcNAc}-\text{S}''-\text{A}''$ (необязательно, группу модифицированной GlcNAc, присоединенную к остальной части модифицированного антитела в положении C1 GlcNAc); и

(b) взаимодействие модифицированного антитела с группой линкер-лекарственное средство, содержащей напряженный циклоалкинил или гетероциклоалкинил, с получением конъюгата антитело-лекарственное средство.

В некоторых вариантах осуществления, процесс получения сайт-специфического

конъюгата антитело-лекарственное средство показан на ФИГ. 5.

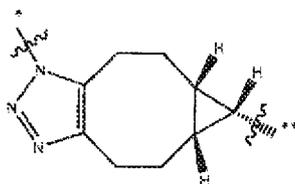
В некоторых вариантах осуществления, модифицированное антитело, содержащее азидо в каждой аминокислоте N297 антитела, конъюгируют с группой линкер-лекарственное средство, содержащей напряженный циклоалкинил или гетероциклоалкинил, с помощью клик-химии без использования металла, с образованием сайт-специфического конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему описанию.

В некоторых вариантах осуществления, когда модифицированное антитело содержит, по меньшей мере, одну азидогруппу, и группа линкер-лекарственное средство содержит напряженный циклоалкинил, присутствие медного катализатора не является необходимым для реакции циклоприсоединения между азидом в модифицированном антителе и напряженным циклоалкинилом или гетероциклоалкинилом группы линкер-лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления, реакция циклоприсоединения протекает в отсутствие медного катализатора, что может смягчить несколько возможных недостатков использования медного катализатора в процессе.

В некоторых вариантах осуществления, обычно требуется катализатор Cu(I) при циклоприсоединении азидной группы антитела и концевой алкиновой группе. В некоторых вариантах осуществления, может потребоваться обширная оптимизация и точная настройка условий, чтобы найти оптимальные параметры для эффективного превращения. Тем не менее, даже в таких условиях нельзя полностью избежать сопутствующего образования активных форм кислорода, что, в свою очередь, может вызвать окислительное повреждение антитела/белка (например, окисление метиониновых, гистидиновых, цистеиновых или дисульфидных связей). Другие протоколы использовали источники Cu(I), такие как CuBr, для мечения фиксированных клеток и синтеза гликопротеинов. В этих случаях, нестабильность Cu(I) на воздухе требует большого избытка Cu (например, более 4 мм) и лиганда для эффективных реакций, что также может повысить риск повреждения или осаждения антител/белков, плюс наличие остаточного металла после очистки. Таким образом, конъюгация азидосодержащего антитела с концевым алкином в присутствии медного катализатора может привести к обширному образованию побочных продуктов в результате нежелательного окисления аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления, модифицированное антитело, содержащее азидо (например, в каждой аминокислоте N297 антитела), конъюгируют с группой линкер-лекарственное средство, содержащей напряженный циклоалкинил или гетероциклоалкинил (например, с помощью клик-химии без использования металлов).

В некоторых вариантах осуществления, при конъюгации, азидогруппа модифицированного антитела и напряженный циклоалкинил или гетероциклоалкинил группы линкер-лекарственное средство образуют триазольную группу Формулы (XXXV):



(XXXV), где * обозначает прямое или не прямое

присоединение к остальной части модифицированного антитела; и ** указывает на присоединение к M^P .

В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению содержит один или несколько D, где каждый D независимо представляет собой терапевтический агент (например, лекарственное средство), где один или несколько D могут быть одинаковыми или разными.

В некоторых вариантах осуществления, один или несколько конкретных сайтов антитела присоединены к группе линкер-лекарственное средство, где группы линкер-лекарственное средство, присоединенные к одному или нескольким конкретным сайтам, могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления, к одному антителу присоединены одна или несколько групп линкер-лекарственное средство, которые содержат один или несколько D.

В некоторых вариантах осуществления, D представляет собой (a) соединение ауристатина; (b) соединение калихеамицина; (c) соединение дуокармицина; (d) SN38, (e) пирролобензодиазепин; (f) соединение барвинка; (g) соединение тубулизина; (h) неприродное соединение камптотецина; (i) соединение майтансиноида; (j) ДНК-связывающее лекарственное средство; (k) ингибитор киназы; (l) ингибитор MEK; (m) ингибитор KSP; (n) ингибитор топоизомеразы; (o) ДНК-алкилирующее лекарственное средство; (p) РНК-полимеразу; (q) ингибитор PARP; (r) ингибитор NAMPT; (s) ингибитор топоизомеразы; (t) ингибитор синтеза белка; (u) ДНК-связывающее лекарственное средство; (v) лекарственное средство для интеркаляции ДНК; или (w) иммуномодулирующее соединение.

В некоторых вариантах осуществления, D представляет собой (a) соединение ауристатина; (b) соединение калихеамицина; (c) соединение дуокармицина; (d) соединение камптотецина, (e) соединение пирролобензодиазепина; (f) соединение барвинка; или его аналог.

В некоторых вариантах осуществления, соединение ауристатина представляет собой ауристатин, доластатин, монометилауристатин E (ММАЕ), монометилауристатин F (ММАF), ауристатин F, AF-HPA, ММАF-HPA или фенилендиамин (AFP).

В некоторых вариантах осуществления, дуокармицин или его аналог представляет собой дуокармицин A, дуокармицин B1, дуокармицин B2, дуокармицин C1, дуокармицин C2, дуокармицин D, дуокармицин SA, CC-1065, адозелезин, бизелезин или карзелезин.

В некоторых вариантах осуществления, соединение камптотецина представляет собой камптотецин, СРТ-11 (иринотекан), SN-38 или топотекан.

В некоторых вариантах осуществления, соединение пирролобензодиазепина

представляет собой мономер пирролобензодиазепина, симметричный димер пирролобензодиазепина или несимметричный димер пирролобензодиазепина.

В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению содержит модифицированное антитело с молекулярной массой примерно 40 кДа или более (например, примерно 60 кДа или более; примерно 80 кДа или более; примерно 100 кДа или более; примерно 120 кДа или более, примерно 140 кДа или более, примерно 160 кДа или более, примерно 180 кДа или более, или примерно 200 кДа или более, или примерно 40-200 кДа, примерно 40-180 кДа, примерно 40-140 кДа, примерно 60-200 кДа, примерно 60-180 кДа, примерно 60-140 кДа, примерно 80-200 кДа, примерно 80-180 кДа, примерно 80-140 кДа, примерно 100-200 кДа, примерно 100-180 кДа или примерно 100-140 кДа).

В некоторых вариантах осуществления, модифицированное антитело имеет молекулярную массу примерно 40 кДа или более (например, примерно 60 кДа или более; примерно 80 кДа или более; примерно 100 кДа или более; примерно 120 кДа или более; примерно 140 кДа или более; примерно 160 кДа или более, примерно 180 кДа или более, или примерно 200 кДа или более, или примерно 40-200 кДа, примерно 40-180 кДа, примерно 40-140 кДа, примерно 60-200 кДа, примерно 60-180 кДа, примерно 60-140 кДа, примерно 80-200 кДа, примерно 80-180 кДа, примерно 80-140 кДа, примерно 100-200 кДа, примерно 100-180 кДа или примерно 100-140 кДа) и модифицировано на аминокислотной кислоте N297.

В некоторых вариантах осуществления, общее количество специфических связей, образованных между группой линкер-лекарственное средство и антителом (или общее количество точек присоединения), составляет 12 или меньше. В некоторых вариантах осуществления, общее количество специфических связей, образованных между группой линкер-лекарственное средство и антителом (или общее количество точек присоединения), составляет 10 или меньше. В некоторых вариантах осуществления, общее количество специфических связей, образованных между группой линкер-лекарственное средство и антителом (или общее количество точек присоединения), составляет 8 или меньше. В некоторых вариантах осуществления, общее количество специфических связей, образованных между группой линкер-лекарственное средство и антителом (или общее количество точек присоединения), составляет 6 или меньше. В некоторых вариантах осуществления, общее количество специфических связей, образованных между группой линкер-лекарственное средство и антителом (или общее количество точек присоединения), составляет 4 или меньше. В некоторых вариантах осуществления, общее количество специфических связей, образованных между группой линкер-лекарственное средство и антителом (или общее количество точек присоединения), составляет 2 или меньше.

В некоторых вариантах осуществления, общее количество специфических связей, образованных между группой линкер-лекарственное средство и антителом (или общее количество точек присоединения), равно 2.

В некоторых вариантах осуществления, (например, для конъюгации с одним или несколькими фрагментами линкер-лекарственное средство) модифицированное антитело имеет молекулярную массу от примерно 140 кДа до примерно 180 кДа. В некоторых вариантах осуществления, для конъюгации с одним или несколькими фрагментами линкер-лекарственное средство модифицированное антитело имеет молекулярную массу от 140 кДа до 180 кДа.

В некоторых вариантах осуществления, антитела в этом диапазоне молекулярной массы включают, но не ограничены ими, например, полноразмерные антитела, такие как IgG или IgM.

В некоторых вариантах осуществления, модифицированное антитело, линкер или терапевтический агент, описанные в настоящем документе, могут быть собраны в конъюгат или каркас по настоящему изобретению в соответствии с различными методами и способами, известными в данной области техники. Конъюгат по настоящему изобретению и способ получения конъюгата описаны в настоящем документе (например, посредством неограничивающих вариантов осуществления и примеров).

В некоторых вариантах осуществления, общее количество связей, образованных между группой линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом (или общее количество точек присоединения), составляет 12 или меньше.

В некоторых вариантах осуществления, соотношение между группой линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом составляет более 1:1 и менее или равно 12:1. В некоторых вариантах осуществления, соотношение между группой линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом составляет примерно 12:1, примерно 11:1, примерно 10:1, примерно 9:1, примерно 8:1, примерно 7:1, примерно 6:1, примерно 5:1, примерно 4:1, примерно 3:1, примерно 2:1 или примерно 1:1. В некоторых вариантах осуществления, соотношение между группой линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом составляет от 2:1 до 10:1. В некоторых вариантах осуществления, соотношение между группой линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом составляет примерно 10:1, примерно 9:1, примерно 8:1, примерно 7:1, примерно 6:1, примерно 5:1, примерно 4:1, примерно 3:1 или примерно 2:1. В некоторых вариантах осуществления, соотношение между группой линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом составляет от примерно 2:1 до примерно 4:1. В некоторых вариантах осуществления, соотношение между группой линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом составляет примерно 4:1, примерно 3:1 или примерно 2:1. В некоторых вариантах осуществления, соотношение между группой линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом составляет примерно 2:1 или 1:1.

В некоторых вариантах осуществления, a_2 равно 3, соотношение между группой линкер-лекарственное средство и модифицированным антителом составляет 2:1, и соотношение между терапевтическим агентом (D) и модифицированным антителом составляет примерно 8:1, примерно 7:1, примерно 6:1, примерно 5:1, примерно 4:1,

конъюгировано с группой линкер-лекарственное средство посредством ковалентной связи, образованной между А" и функциональной группой группы линкер-лекарственное средство.

В некоторых вариантах осуществления, группа линкер-лекарственное средство содержит, по меньшей мере, две функциональные группы, каждая из которых способна образовывать ковалентную связь с функциональной группой А" производного сахарной группы модифицированного антитела (например, на аминокислоте N297 антитела) с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство.

В некоторых вариантах осуществления (например, для конъюгации с группой линкер-лекарственное средство), модифицированное антитело имеет молекулярную массу 40 кДа или больше (например, 60 кДа или больше; 80 кДа или больше; или 100 кДа или больше; 120 кДа или больше; 140 кДа или больше; 160 кДа или больше или 180 кДа или больше). В некоторых вариантах осуществления, соотношение между модифицированным антителом и группой линкер-лекарственное средство составляет от примерно 1:1 до примерно 1:2.

В некоторых вариантах осуществления, антитела в этом диапазоне молекулярной массы включают, но не ограничены ими, полноразмерные антитела (например, IgG и IgM).

В некоторых вариантах осуществления (например, для конъюгации с одной или несколькими группами линкер-лекарственное средство), модифицированное антитело имеет молекулярную массу от 60 кДа до 120 кДа. В некоторых вариантах осуществления, соотношение между модифицированным антителом и группой линкер-лекарственное средство составляет от примерно 1:1 до примерно 1:2.

В некоторых вариантах осуществления, антитела в этом диапазоне молекулярной массы включают, но не ограничены ими, группы антител (например, Fab2, scFcFv и верблюдовые).

В некоторых вариантах осуществления (например, для конъюгации с одной или несколькими группами линкер-лекарственное средство), модифицированное антитело имеет молекулярную массу от 40 кДа до 80 кДа. В некоторых вариантах осуществления, соотношение между модифицированным антителом и группой линкер-лекарственное средство составляет от примерно 1:1 до примерно 1:2.

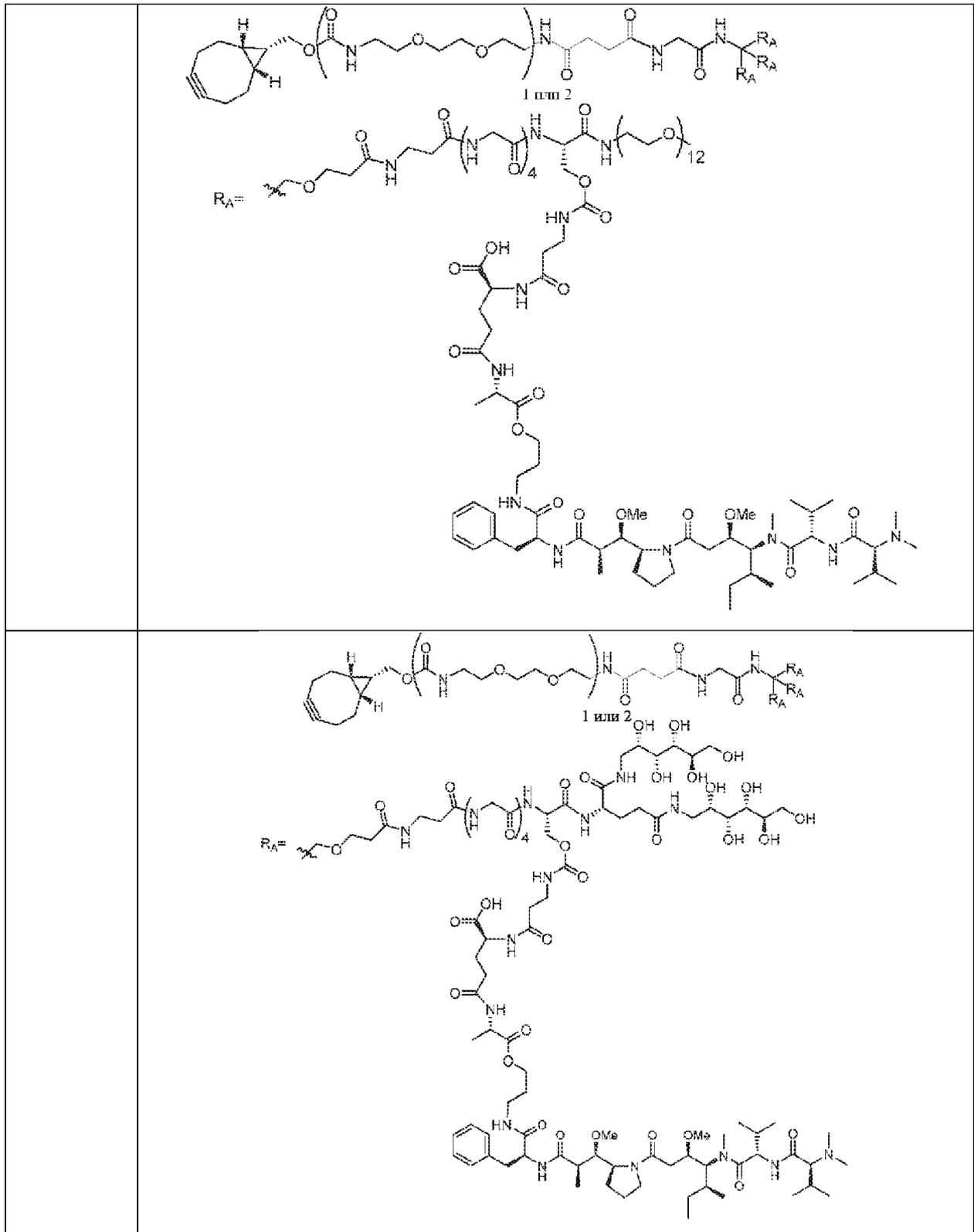
В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство и каркас по настоящему изобретению могут быть очищены (например, для удаления любых исходных материалов) путем интенсивной диафильтрации. При необходимости, можно провести дополнительную очистку эксклюзионной хроматографией для удаления любых агрегированных конъюгатов. В некоторых вариантах осуществления, очищенный конъюгат или каркас содержит менее 5% масс./масс. (например, <2% масс./масс.) агрегированных конъюгатов, по данным ГПХ; менее 0,5% масс./масс. (например, <0,1% масс./масс.) свободного (неконъюгированного) лекарственного средства, по данным ОФ-ВЭЖХ; менее 1% масс./масс. каркасов, содержащих пептиды, содержащие лекарственное

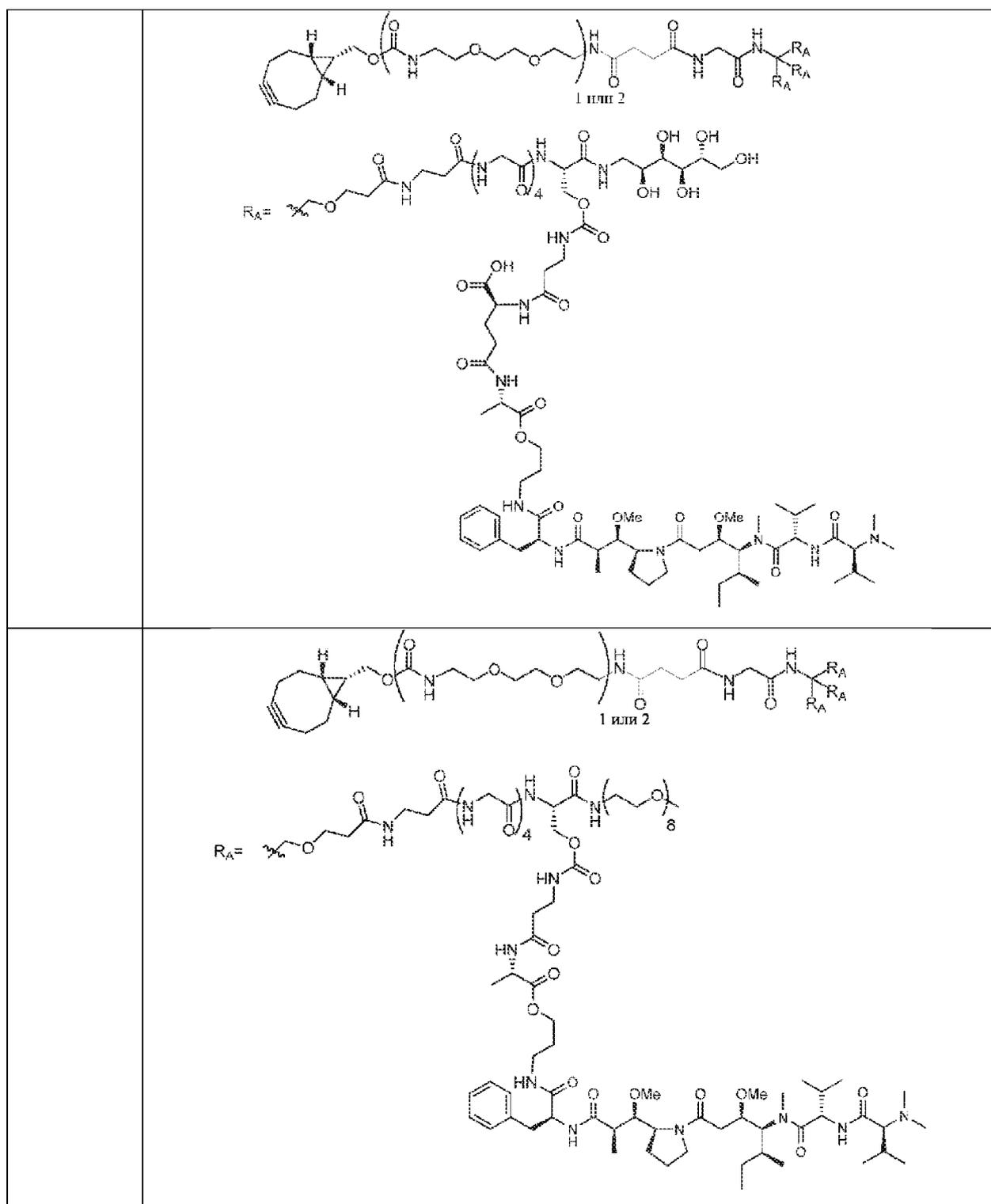
средство, как определено с помощью ГПХ; и/или менее 2% масс./масс. (например, <1% масс./масс.) неконъюгированных антител, как определено с помощью ХГВ-НPLC.

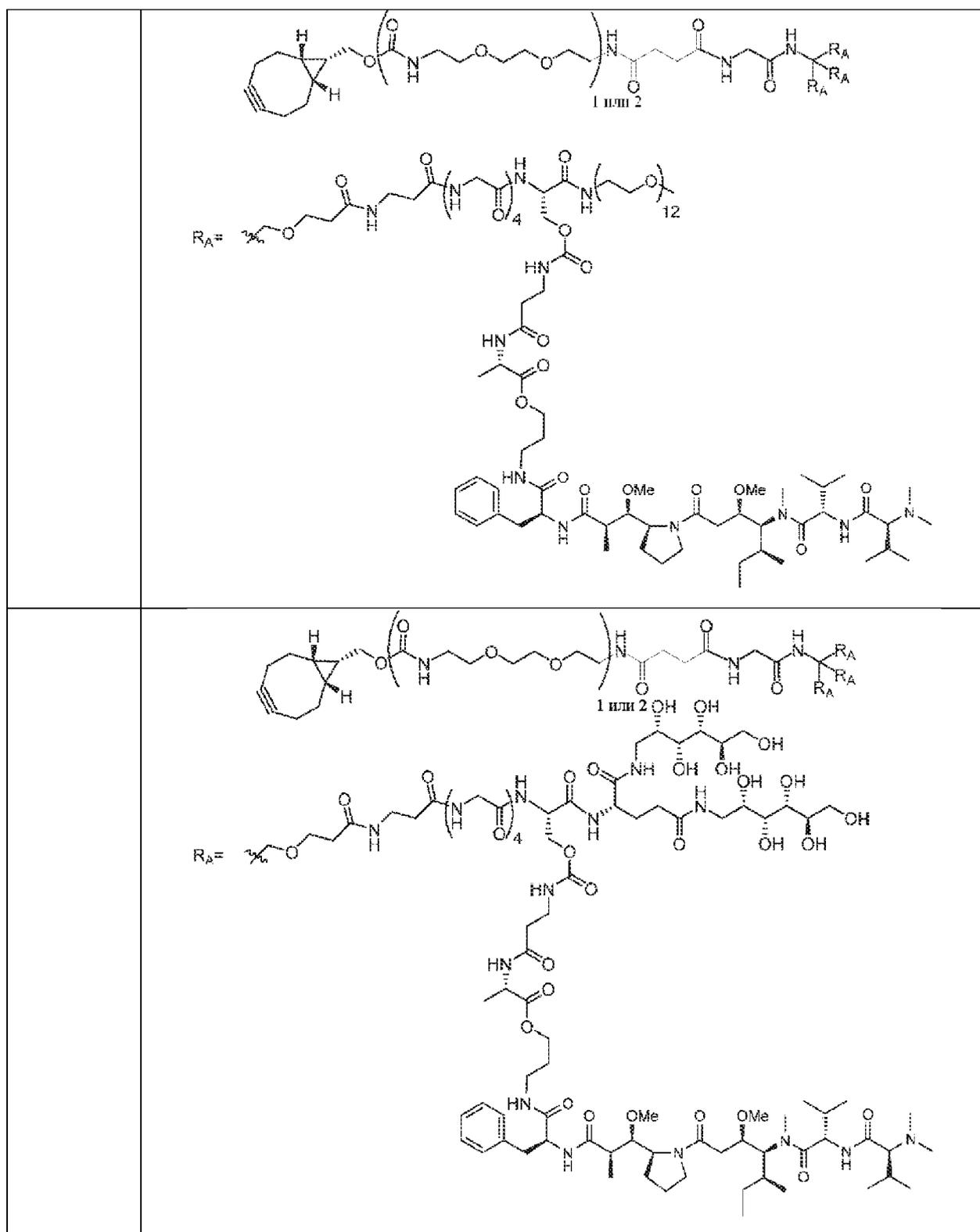
В некоторых вариантах осуществления, группа линкер-лекарственное средство выбрана из каркасов, описанных в таблицах В ниже.

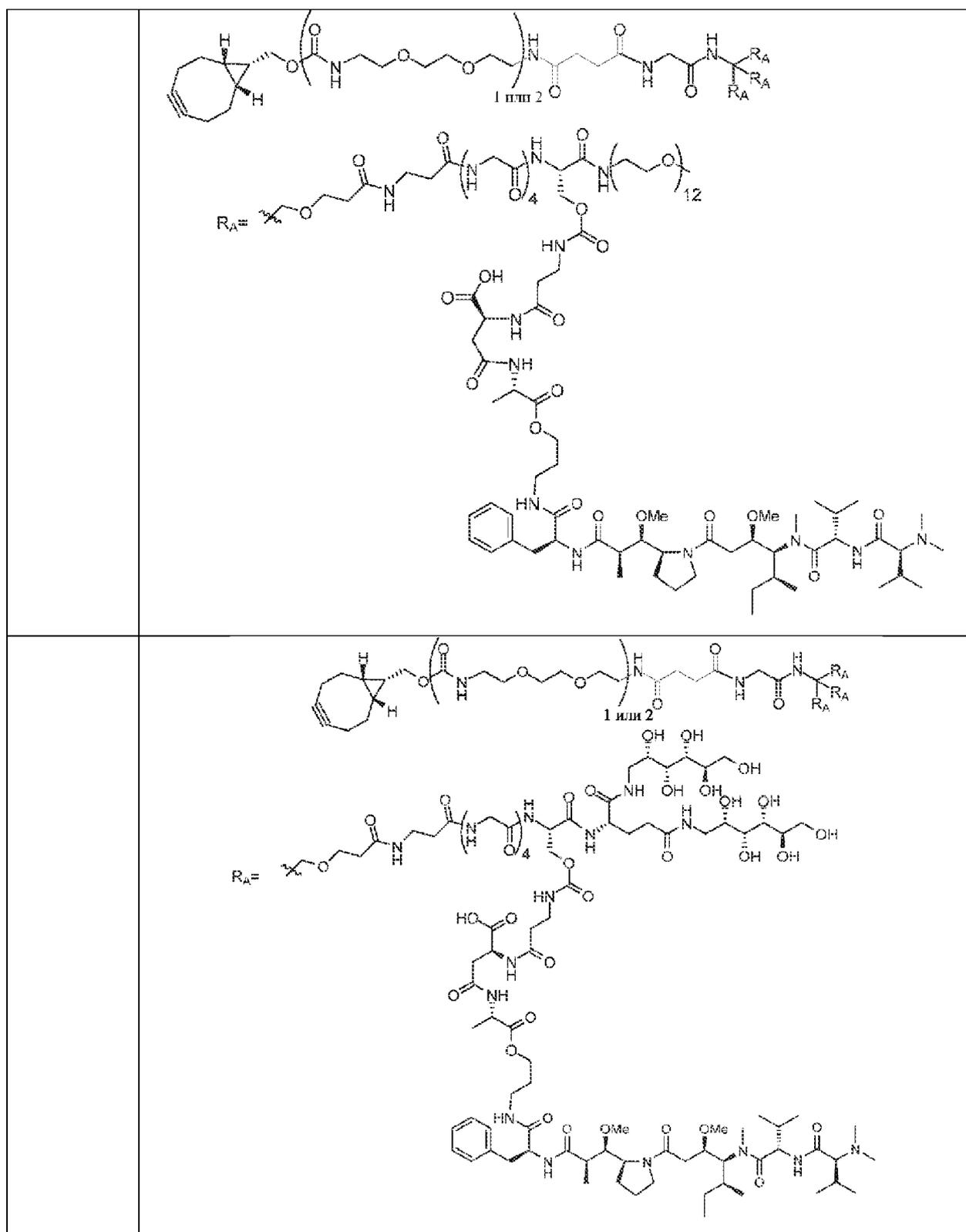
Таблица В

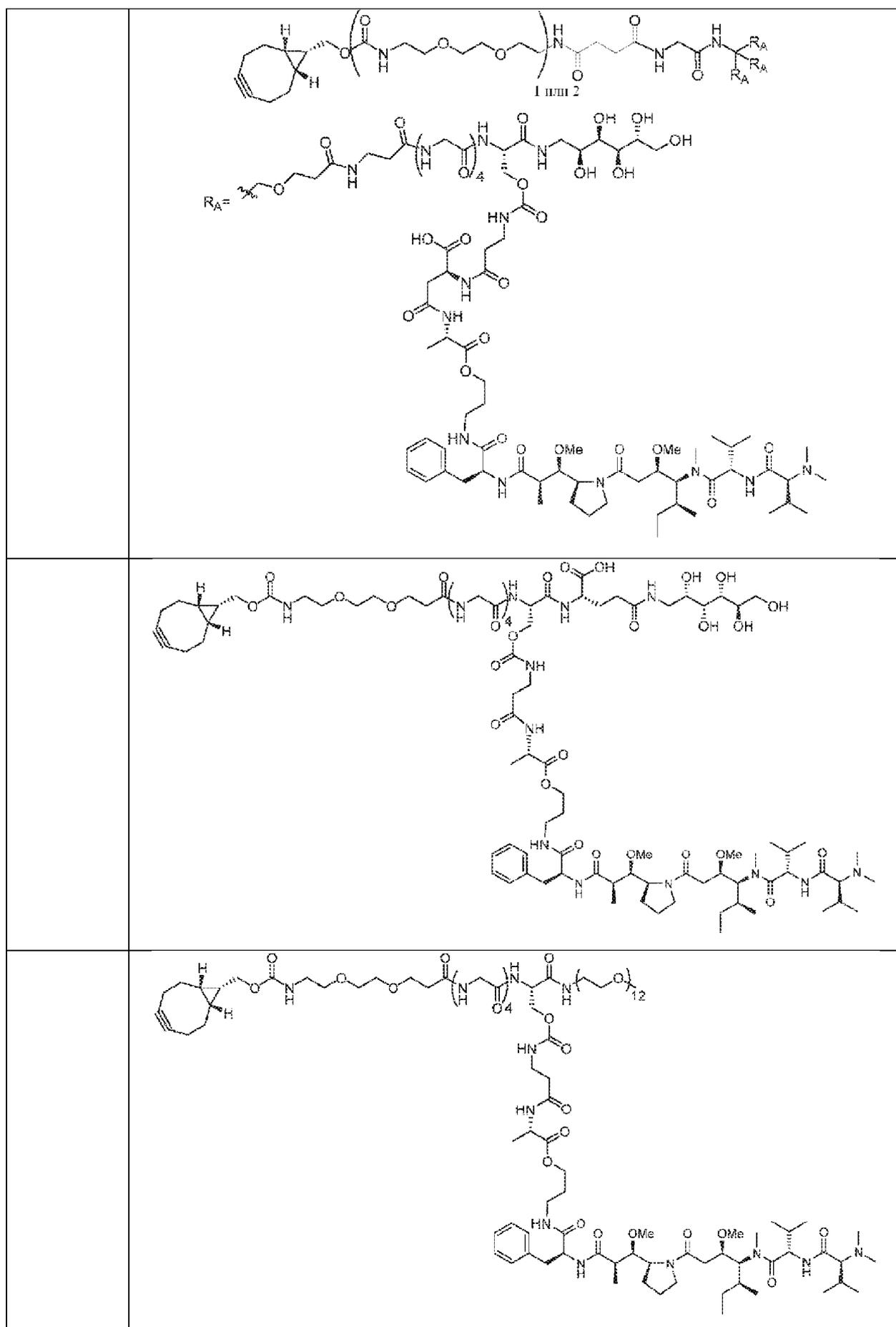
Линкер лекарств енного средства №	Структура

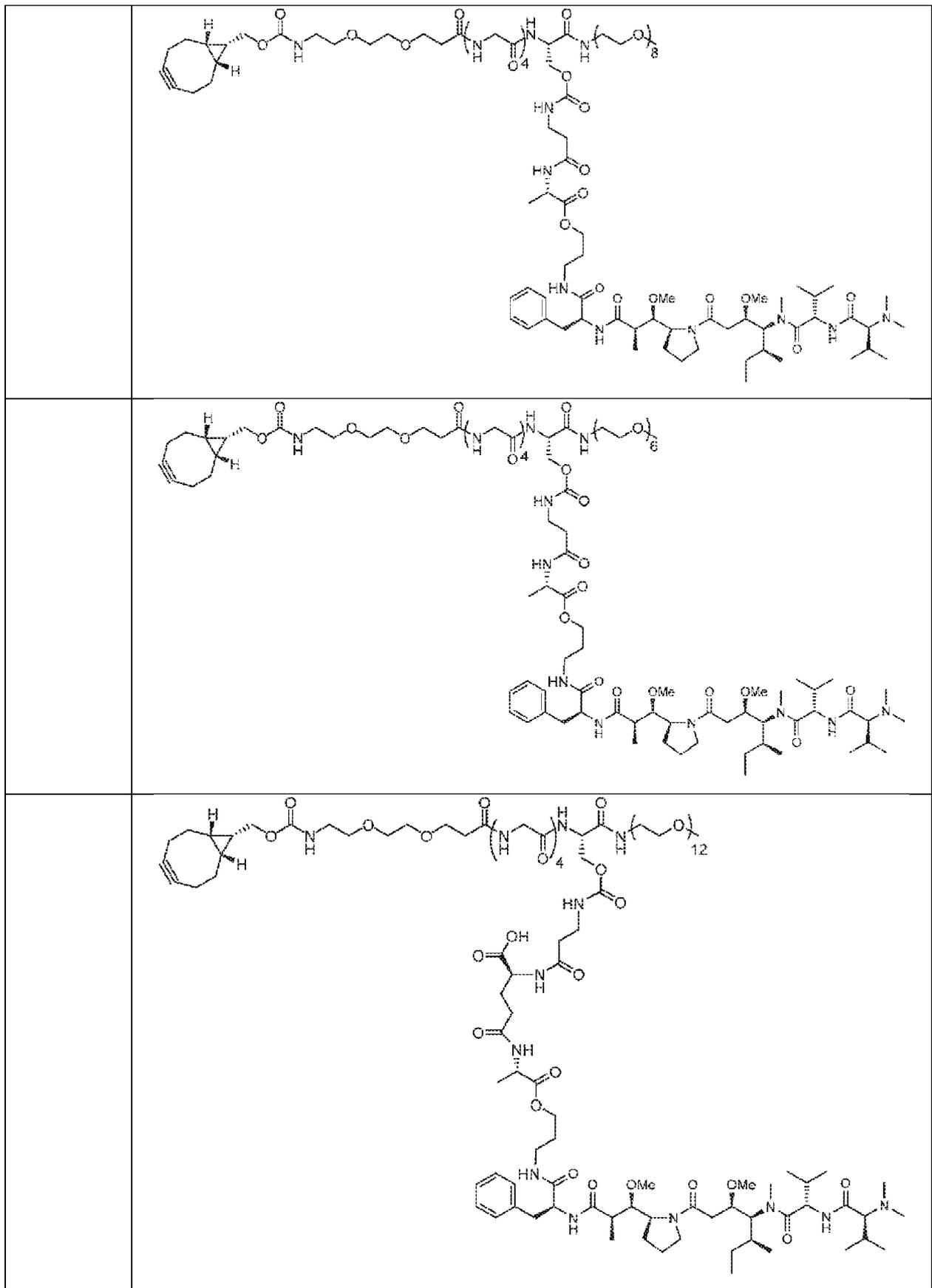


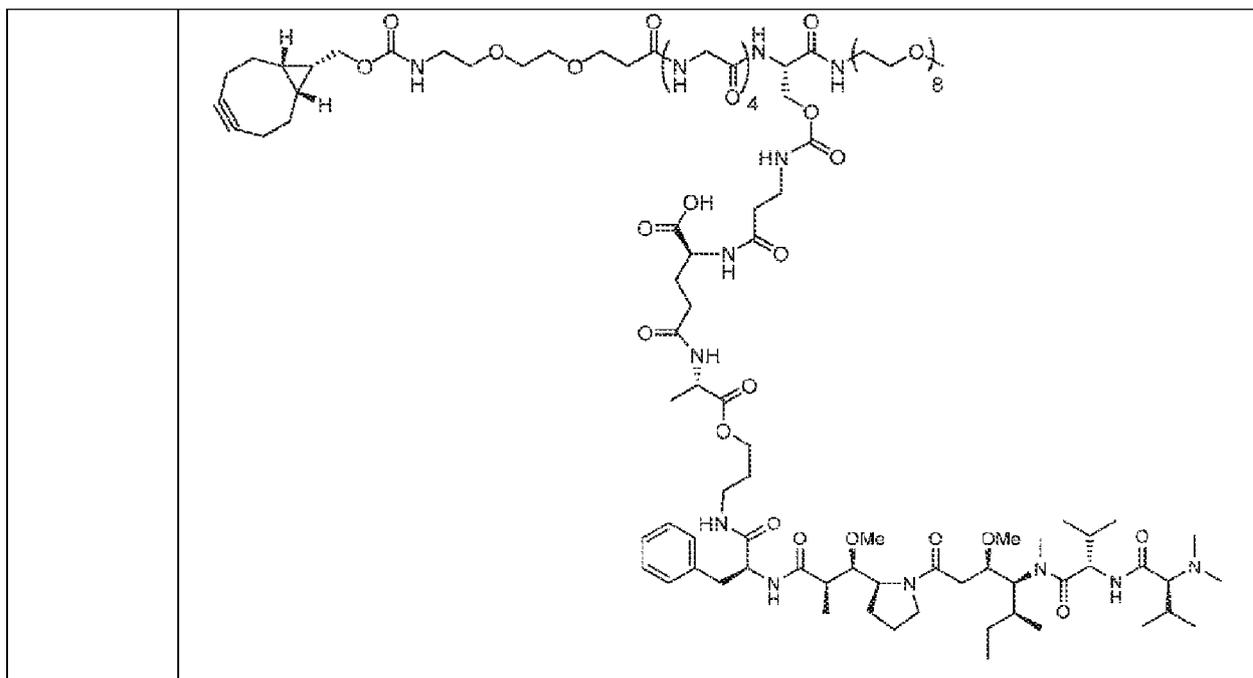








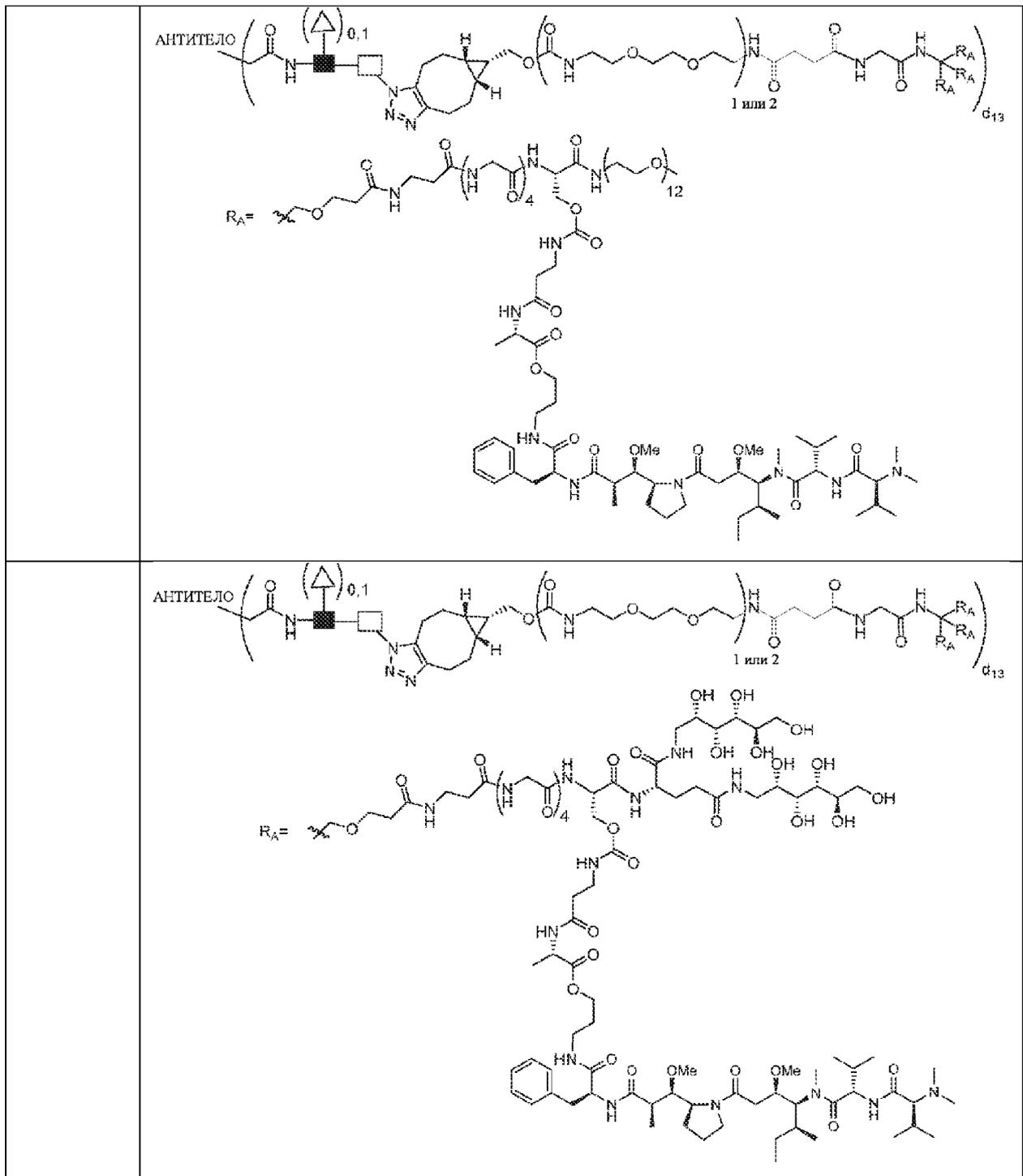


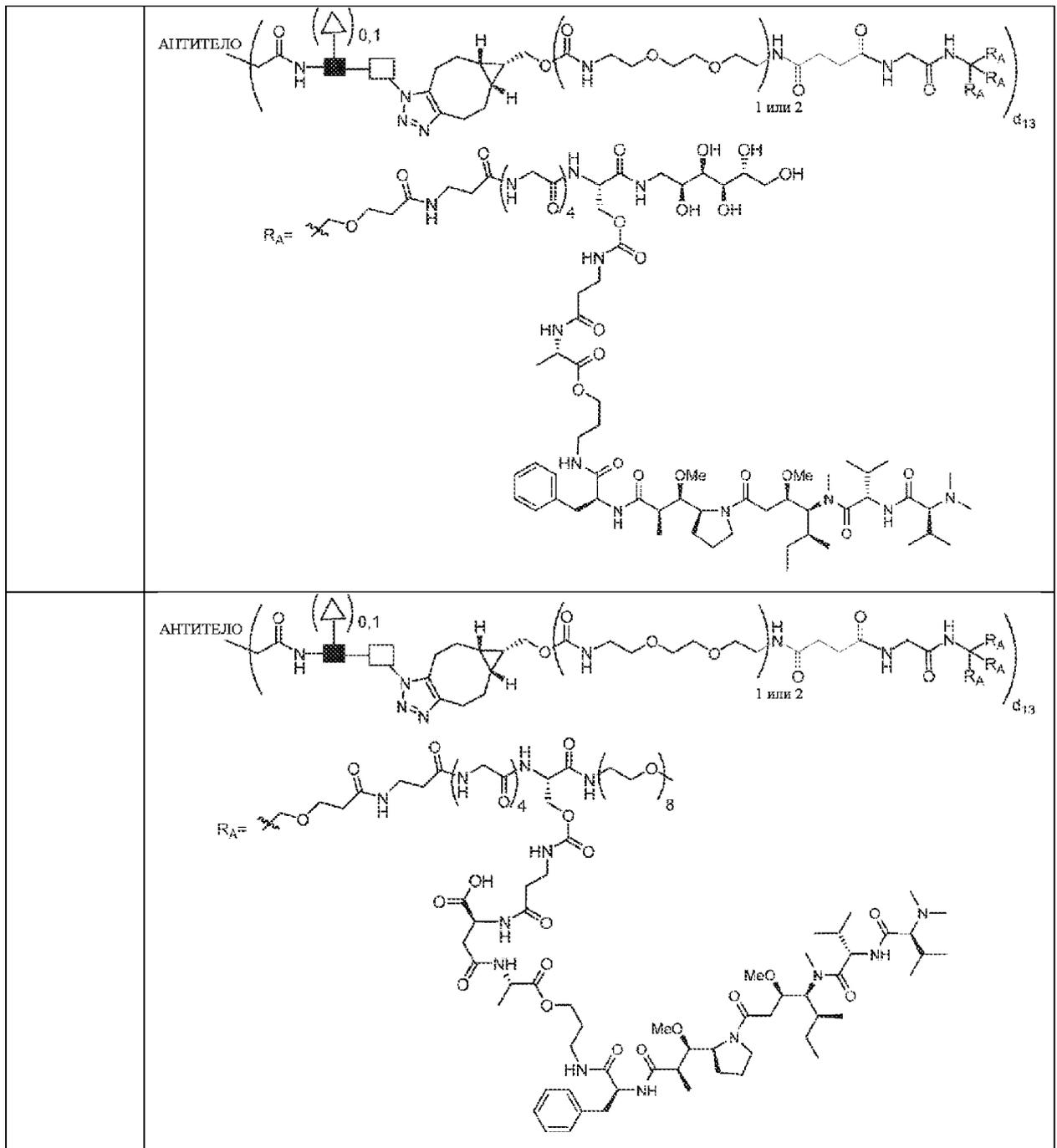


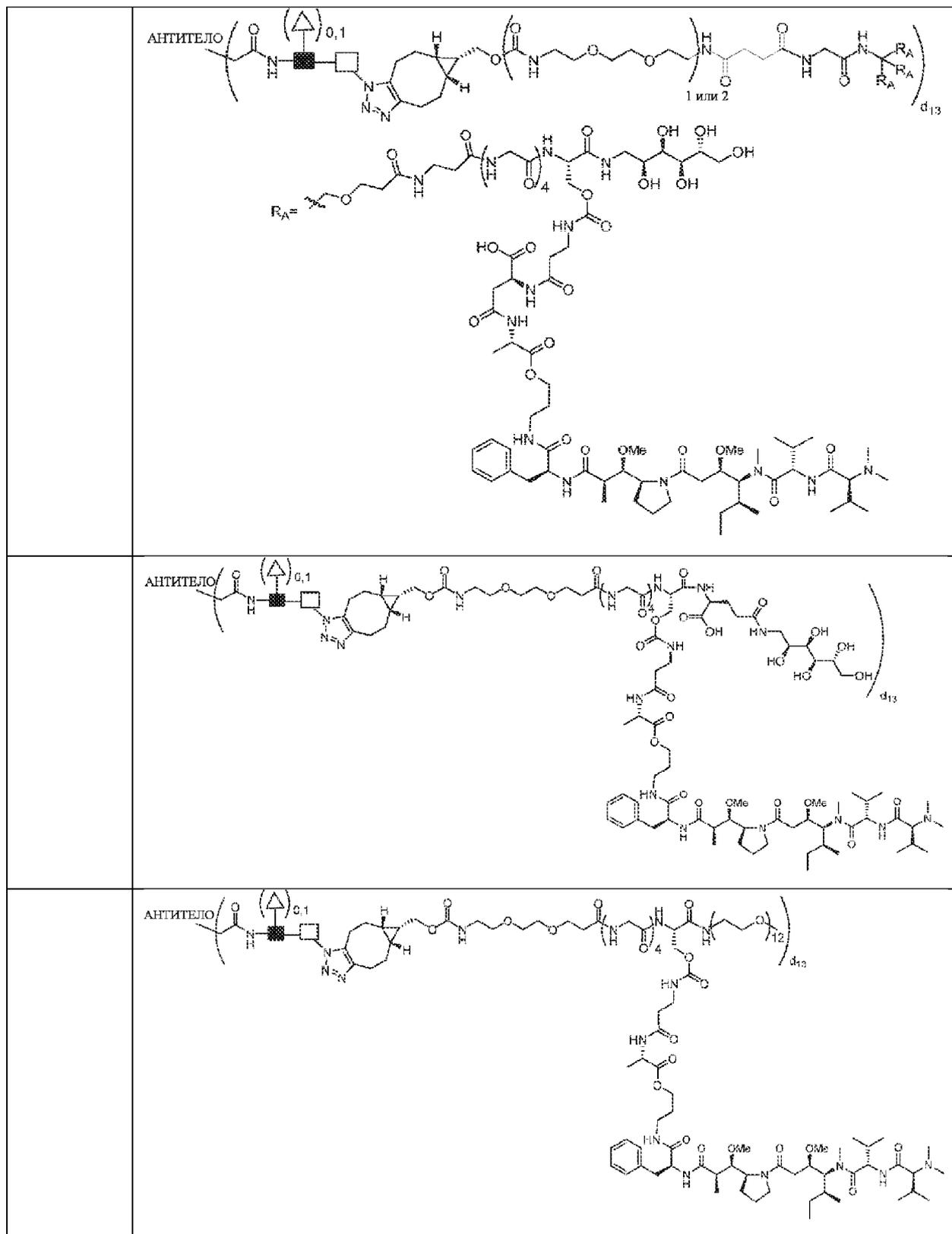
В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство выбран из конъюгатов, описанных в Таблице С ниже.

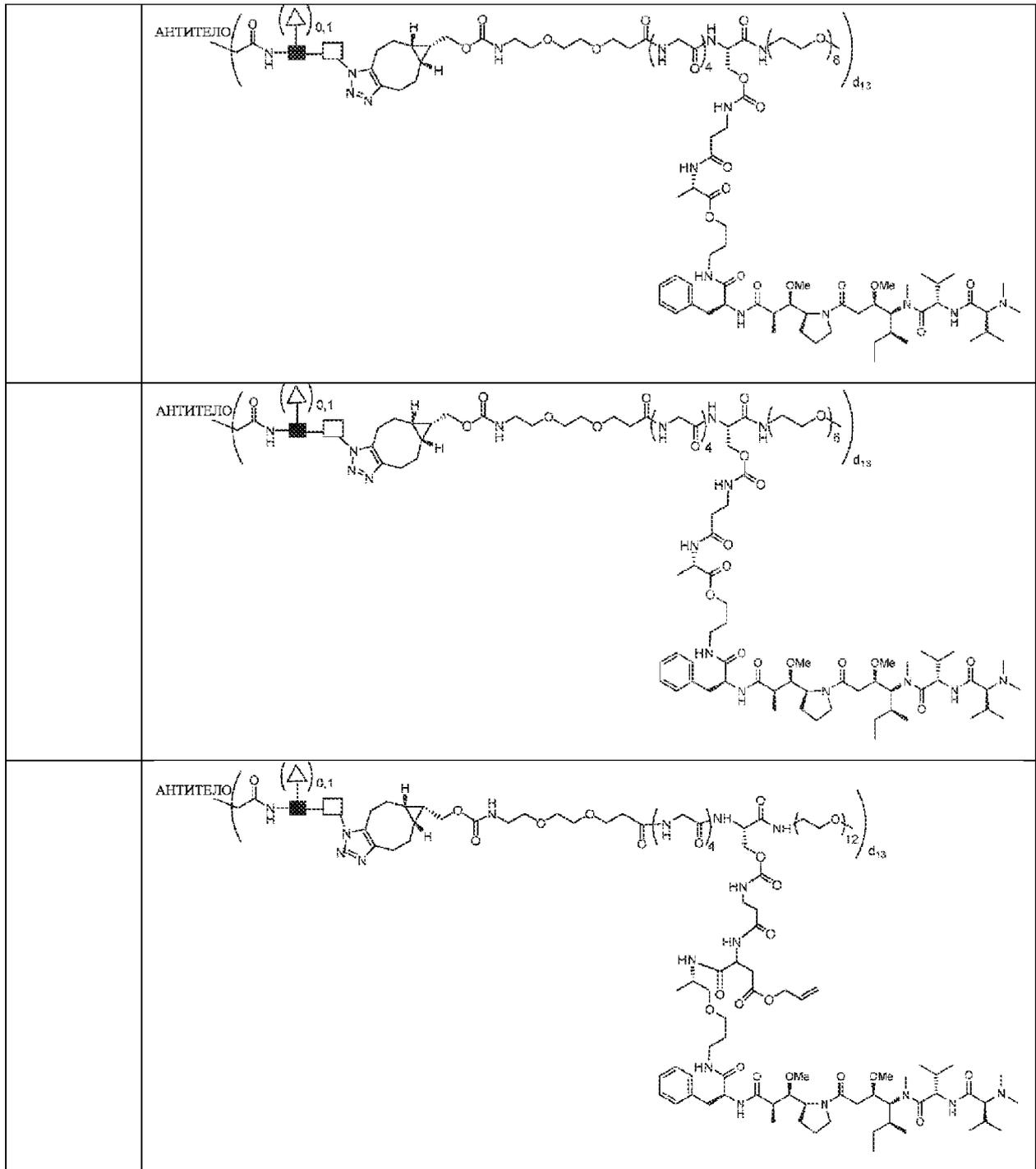
Таблица С

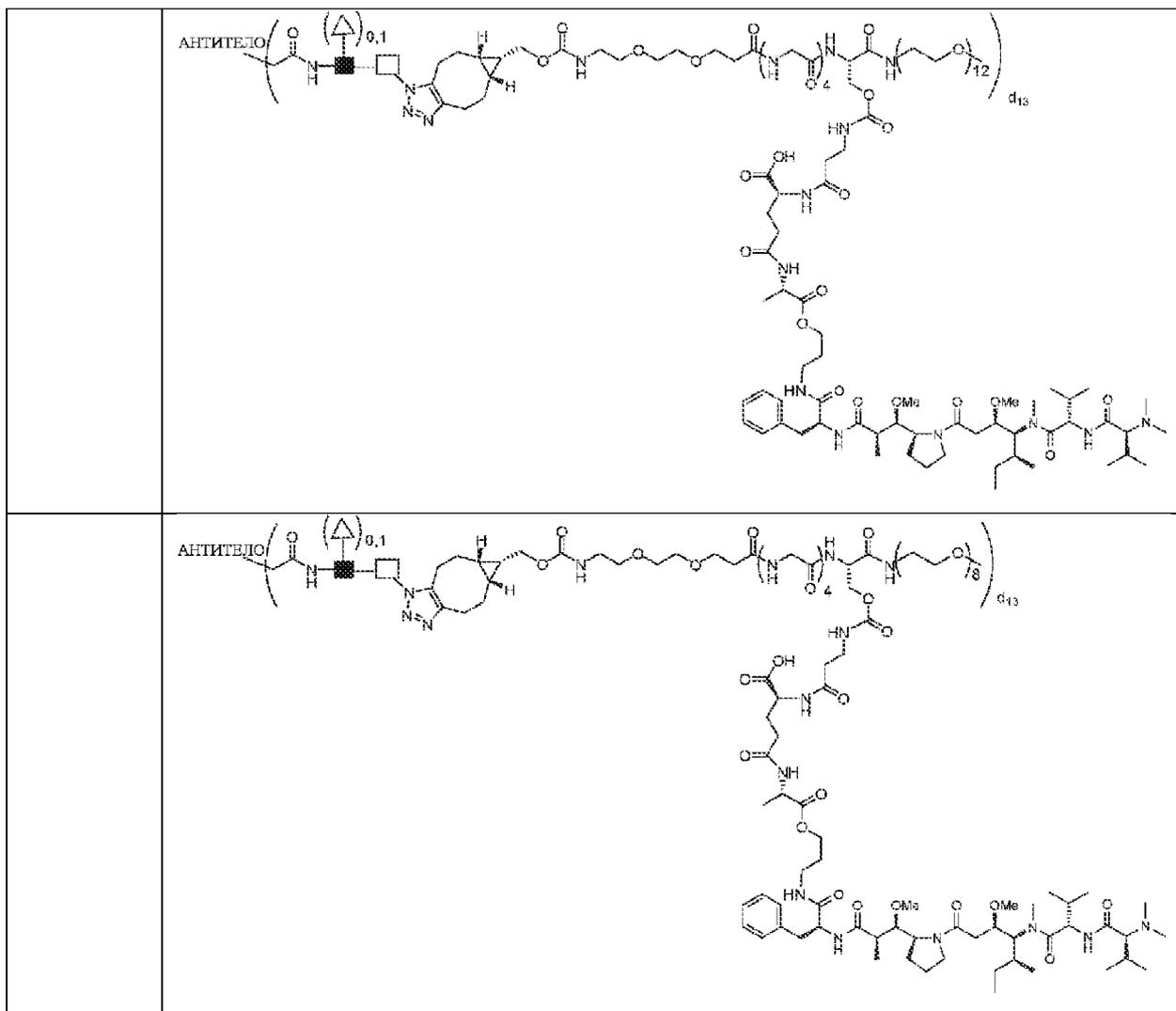
№ конъюгата	Структура
	<p>The general structure shows an antibody (АНТИТЕЛО) with a linker (represented by a square) and a peptide chain. The linker is connected to the antibody via a bond with a subscript '0,1'. The peptide chain is connected to the linker via a bond with a subscript '1 или 2'. The peptide chain includes a hydroxyl group, a carboxyl group, a methyl group, and a side chain containing a benzyl group, a methoxy group, a methyl group, and a dimethylamino group. The peptide chain is represented as a repeating unit with a subscript 'd,3'.</p> <p>$R_A =$ </p>









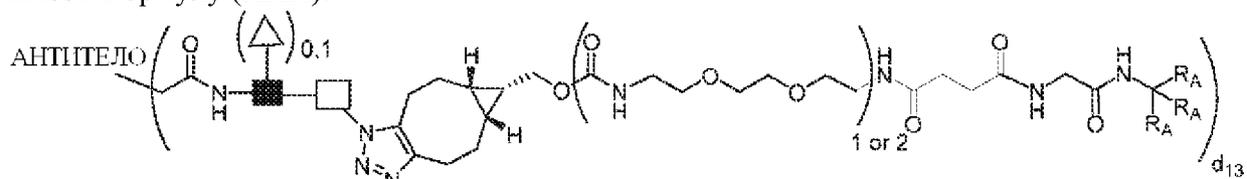


где:

■ представляет собой GlcNAc; Δ представляет собой Fuc; □ представляет собой GalNAc; и d_{13} является таким, как определено в настоящем документе.

Понятно, что, если не указано иное, символ ■ относится к GlcNAc в настоящем описании. Понятно, что, если не указано иное, символ Δ в настоящем описании относится к фукозе. Понятно, что, если не указано иное, символ □ в настоящем описании относится к GalNAc.

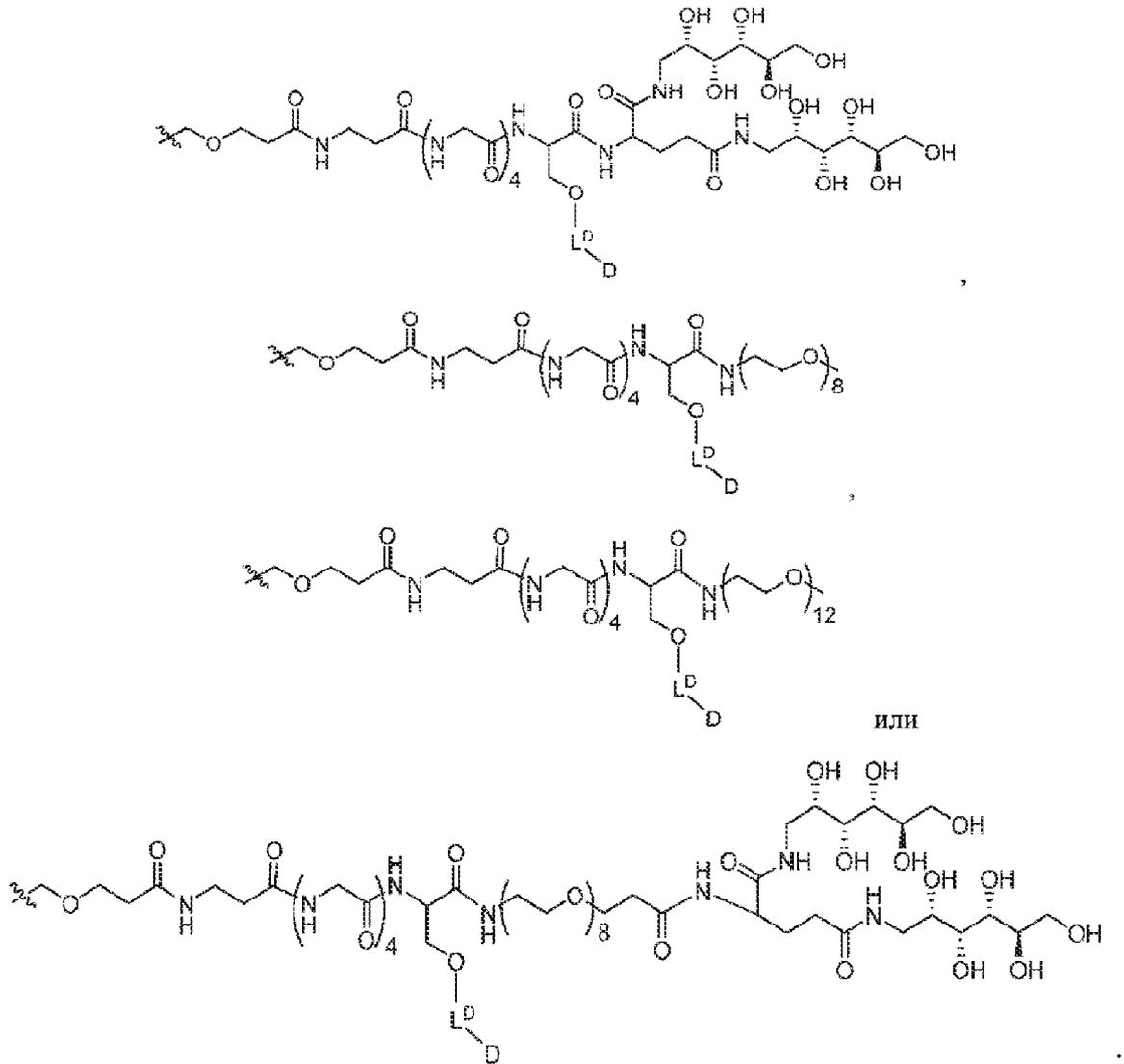
В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство имеет Формулу (XXX):



(XXX),

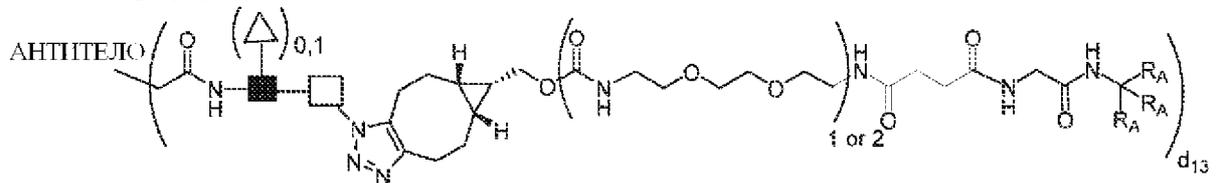
в которой:

каждый R_A представляет собой



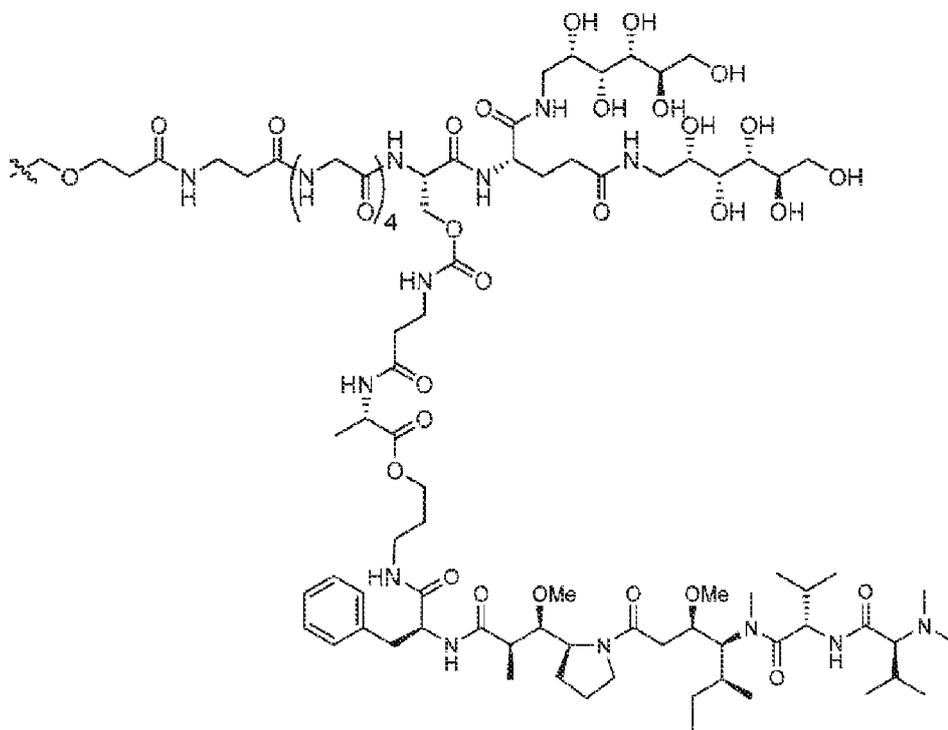
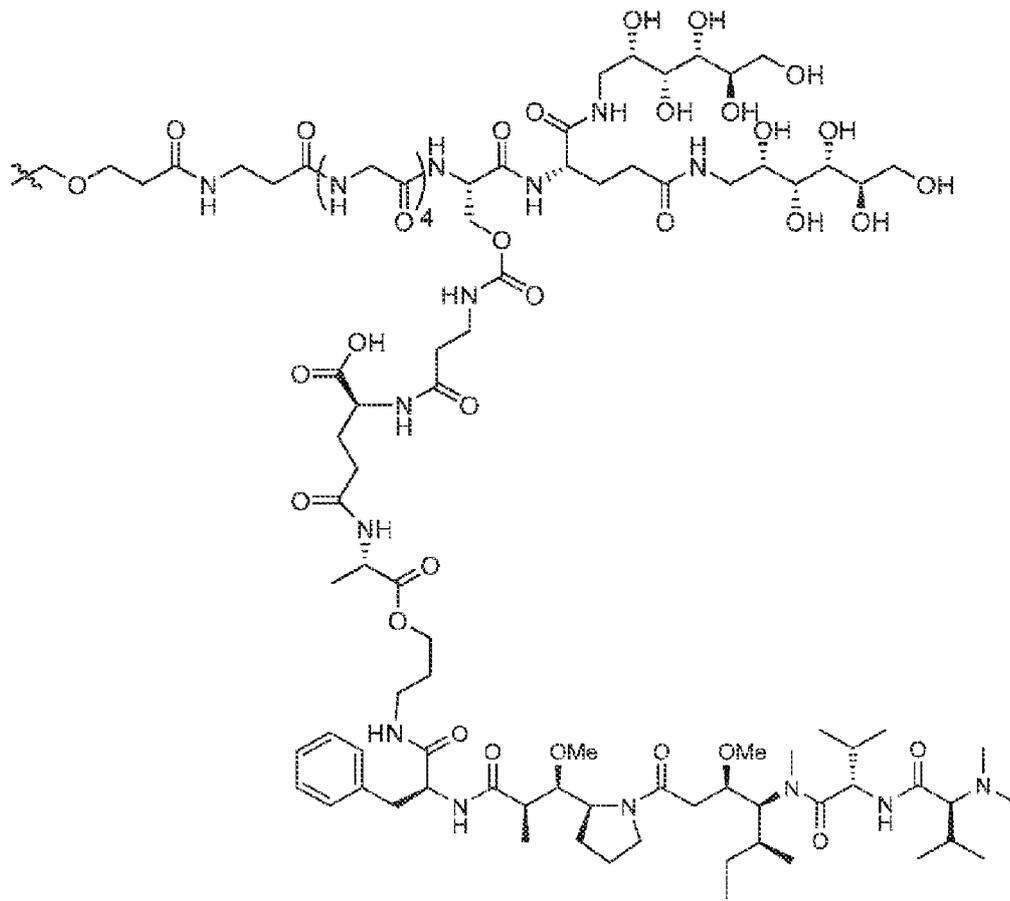
d_{13} равно 2; и одна или несколько групп линкер-лекарственное средство присоединены к группе аспарагина на N297 антитела.

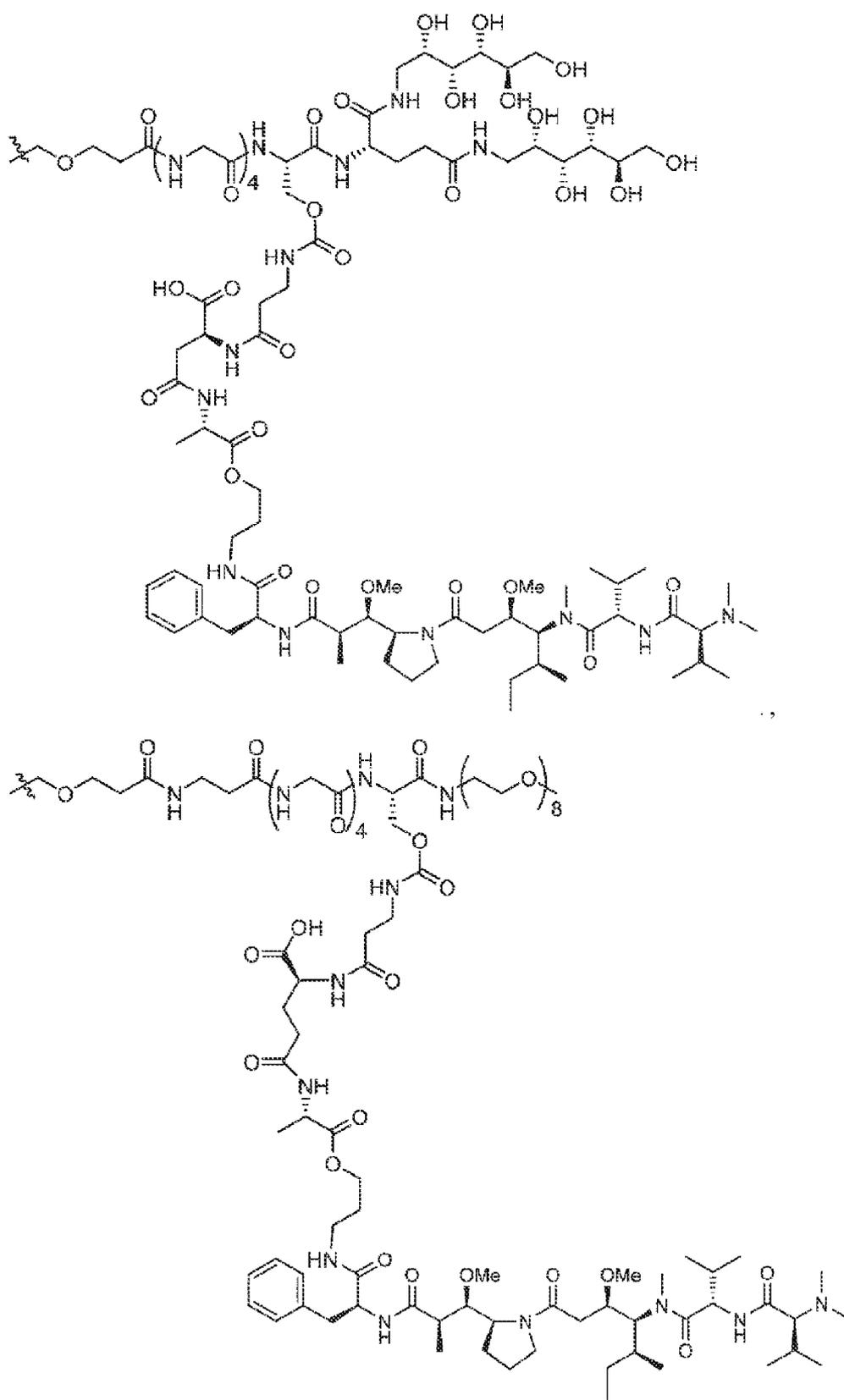
В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство имеет Формулу (XXX):

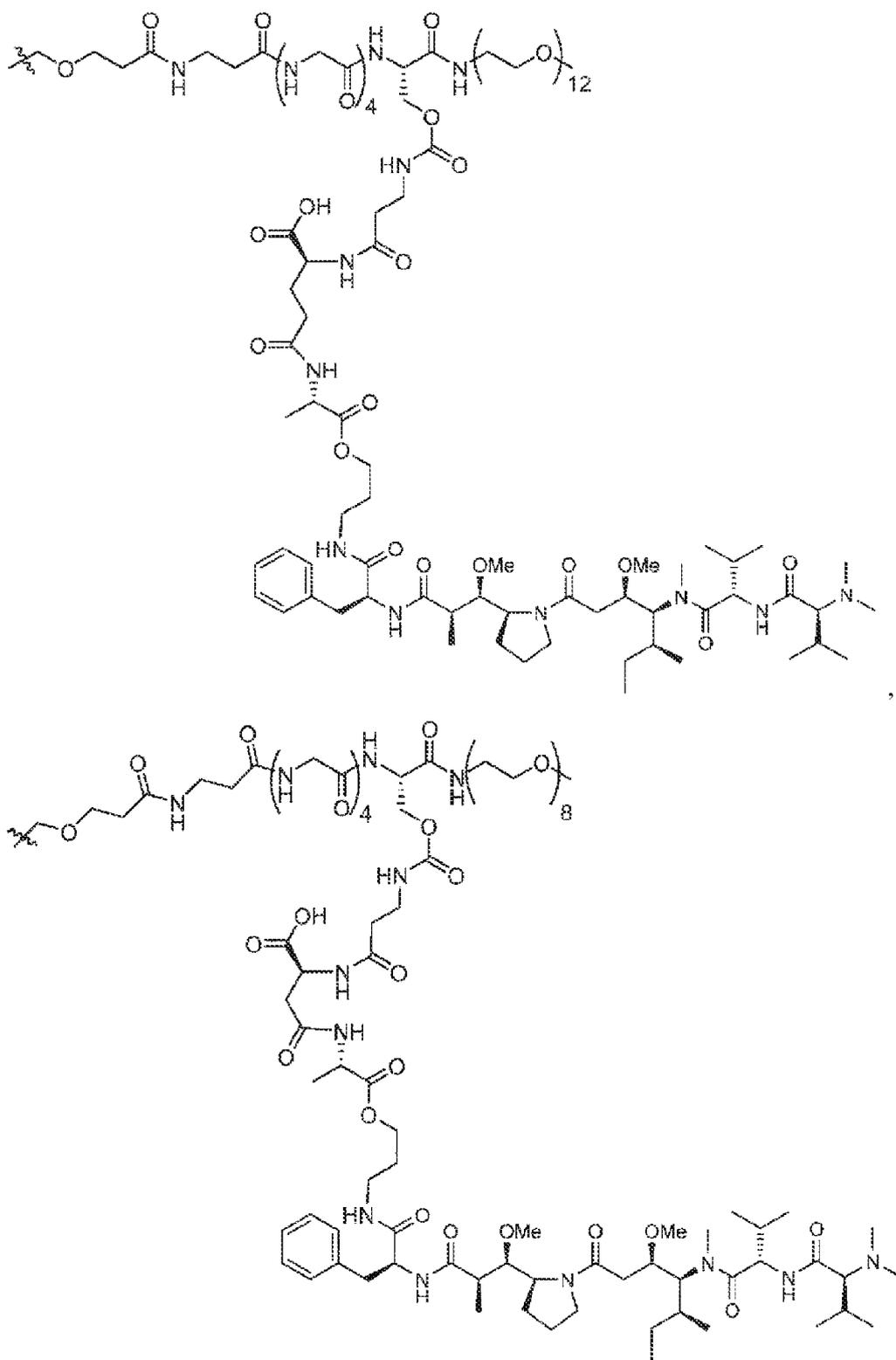


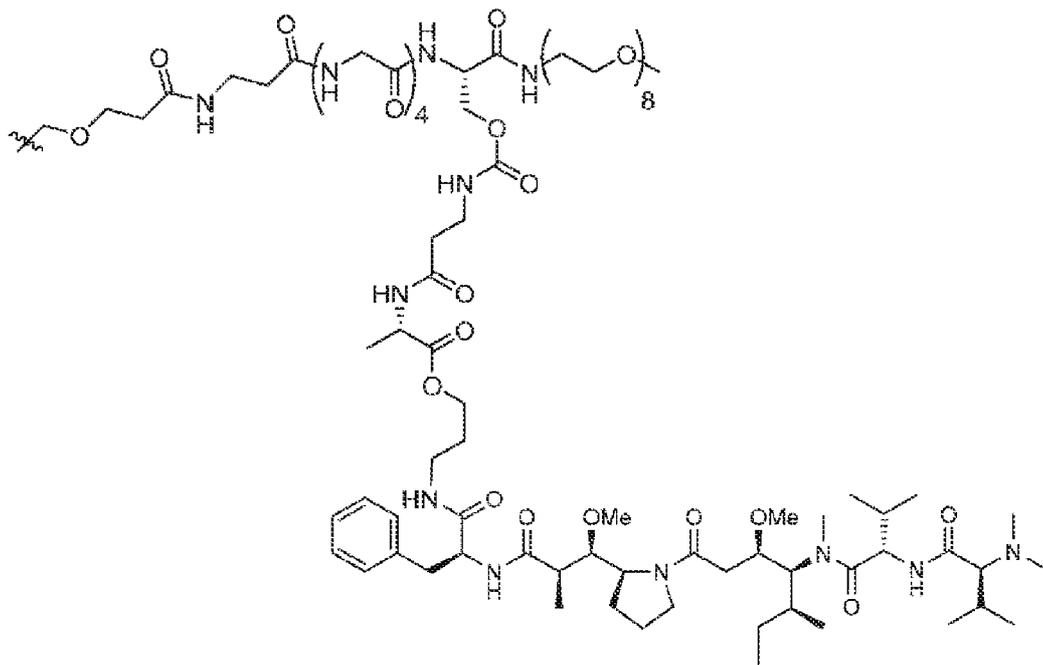
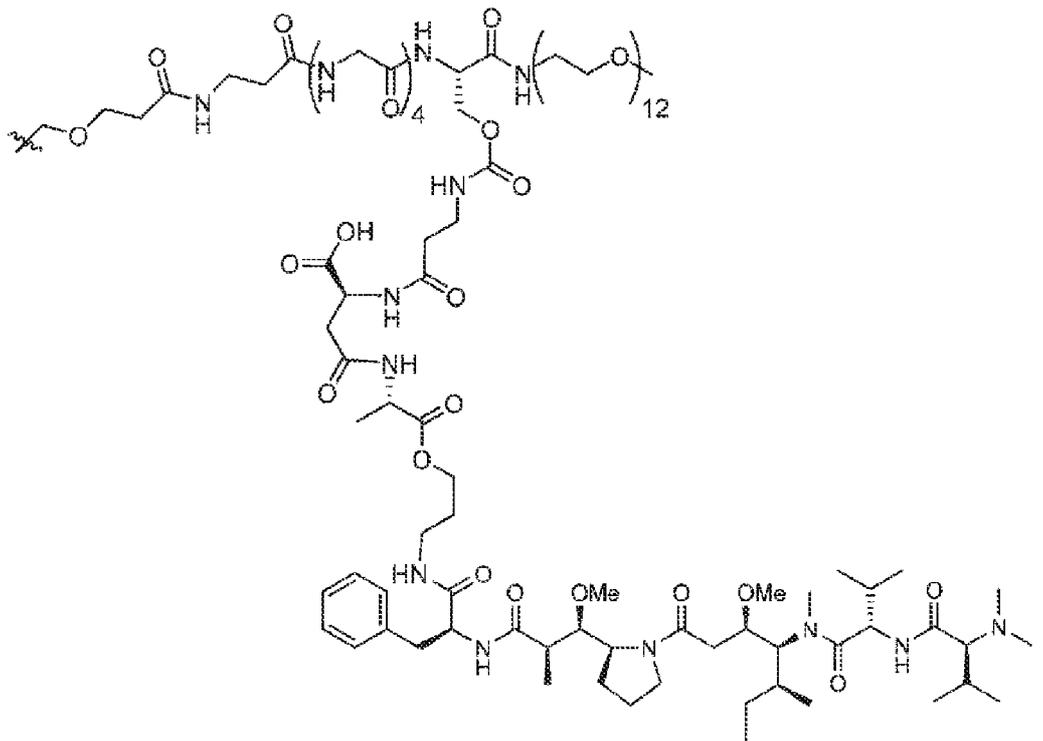
(XXX),

где каждый R_A представляет собой:

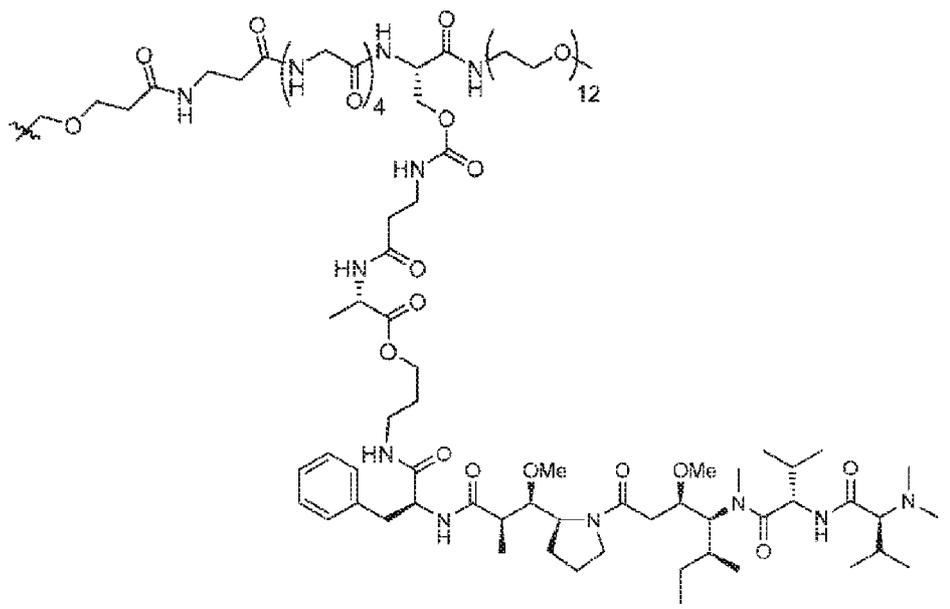






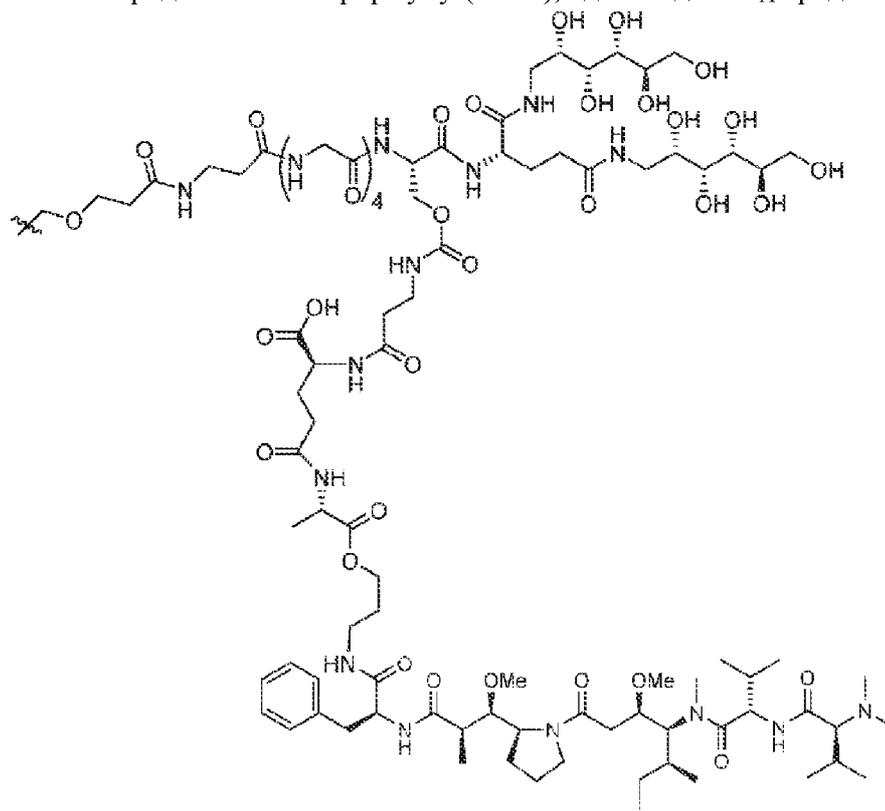


ИЛИ

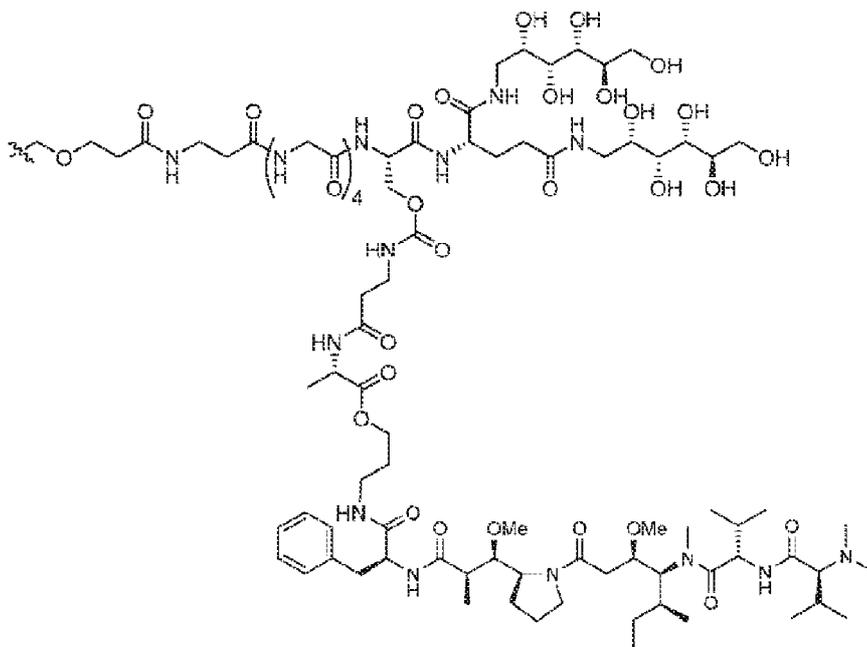


d_{13} равно 2; и антитело содержит одну или несколько групп аспарагина на N297, соединенных с остальной частью конъюгата.

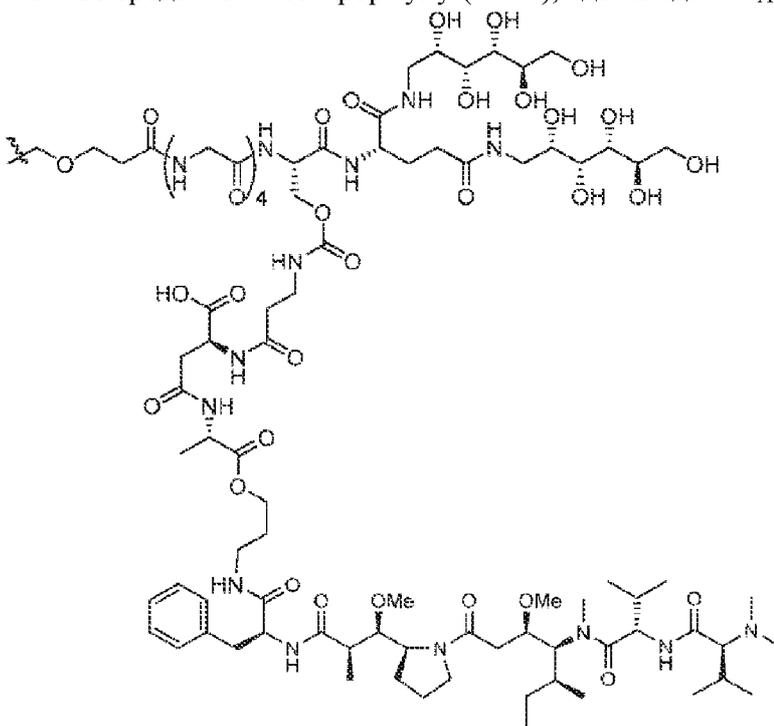
В некоторых вариантах осуществления, изобретения конъюгат антитело-лекарственное средство имеет формулу (XXX), где каждый R_A представляет собой



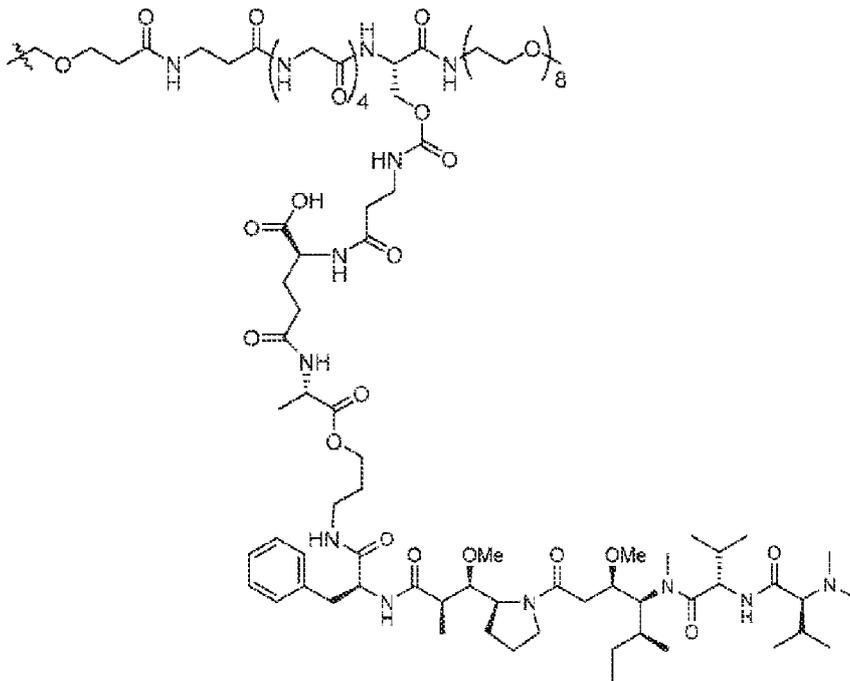
В некоторых вариантах осуществления, изобретения конъюгат антитело-лекарственное средство имеет формулу (XXX), где каждый R_A представляет собой



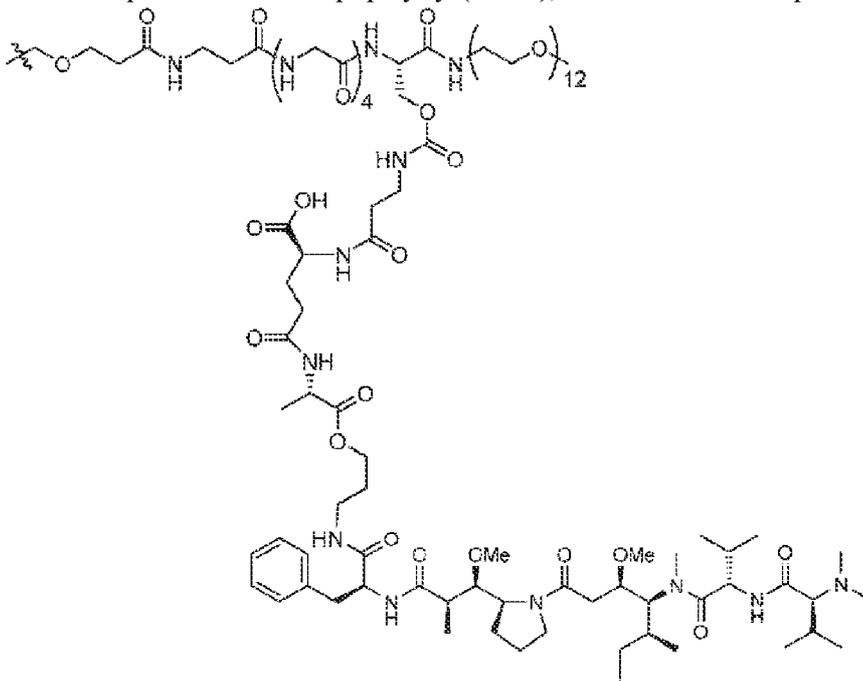
В некоторых вариантах осуществления, изобретения конъюгат антитело-лекарственное средство имеет формулу (XXX), где каждый R_A представляет собой



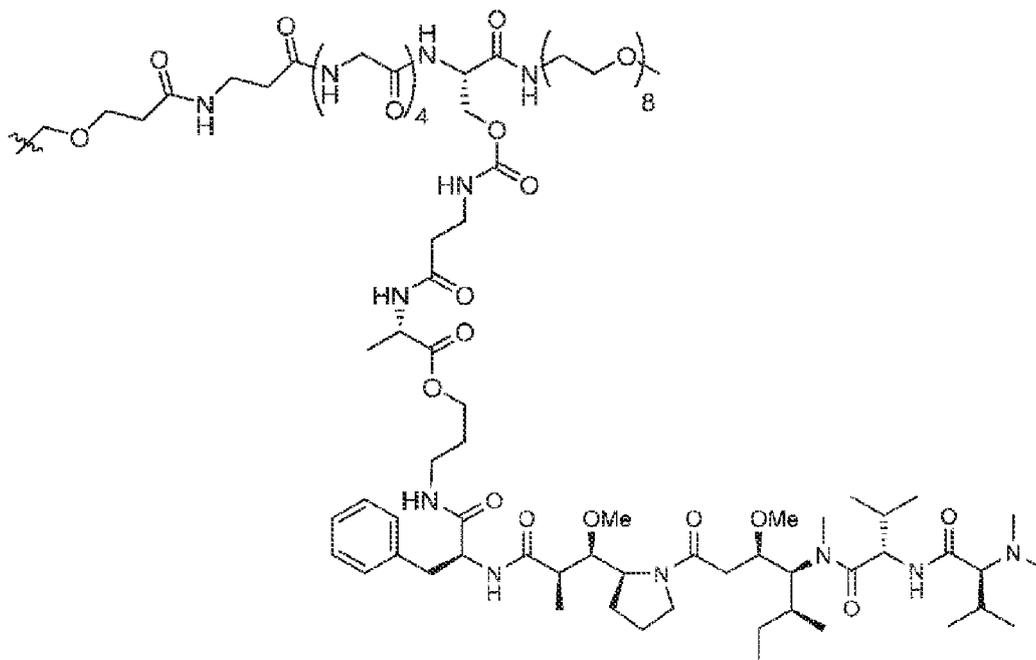
В некоторых вариантах осуществления, изобретения конъюгат антитело-лекарственное средство имеет формулу (XXX), где каждый R_A представляет собой



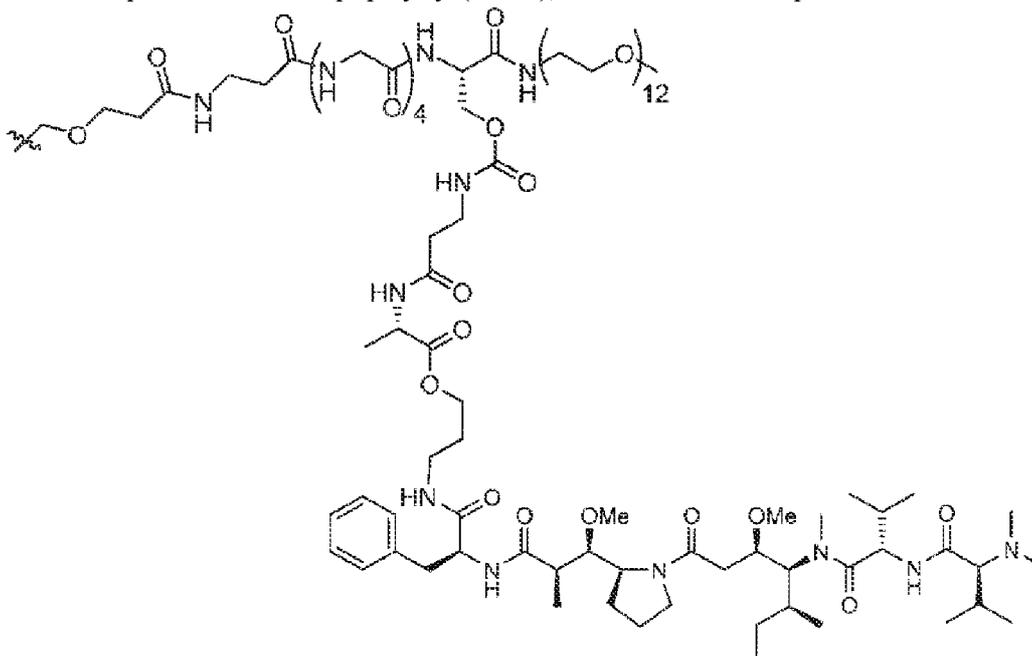
В некоторых вариантах осуществления, изобретения конъюгат антитело-лекарственное средство имеет формулу (XXX), где каждый R_A представляет собой



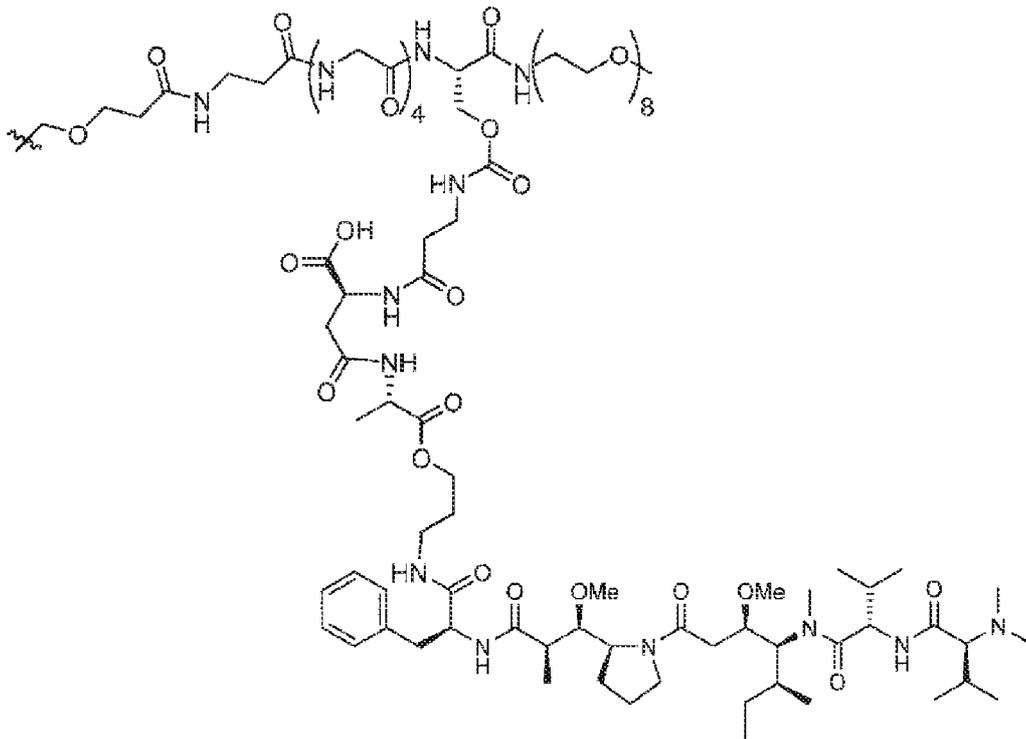
В некоторых вариантах осуществления, изобретения конъюгат антитело-лекарственное средство имеет формулу (XXX), где каждый R_A представляет собой



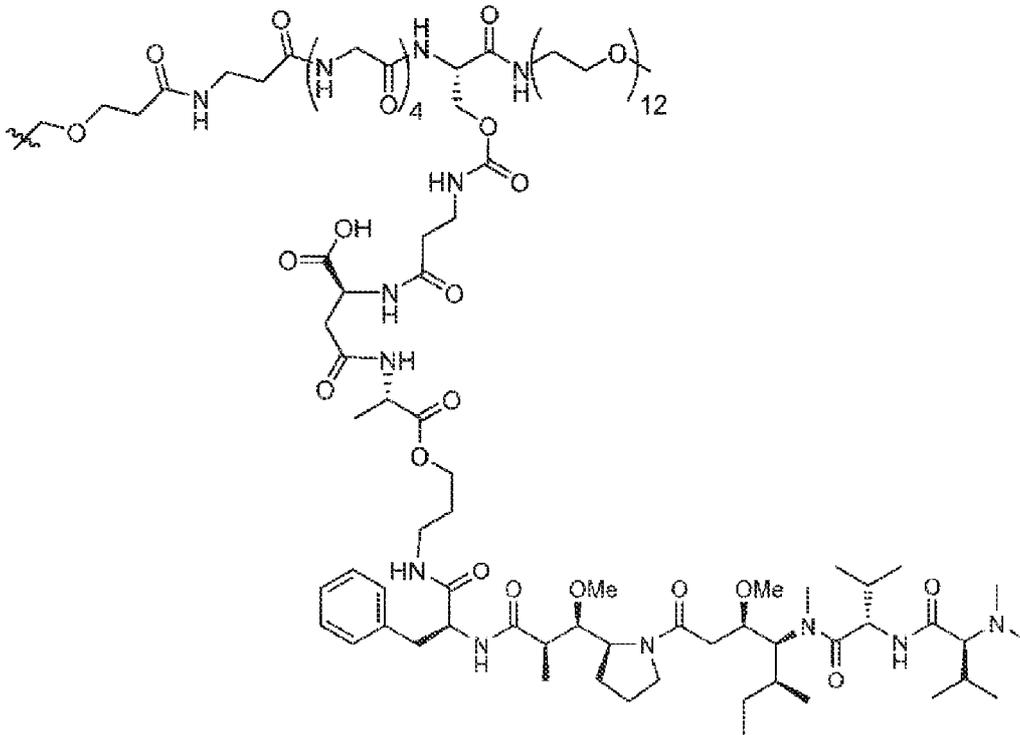
В некоторых вариантах осуществления, изобретения конъюгат антитело-лекарственное средство имеет формулу (XXX), где каждый R_A представляет собой



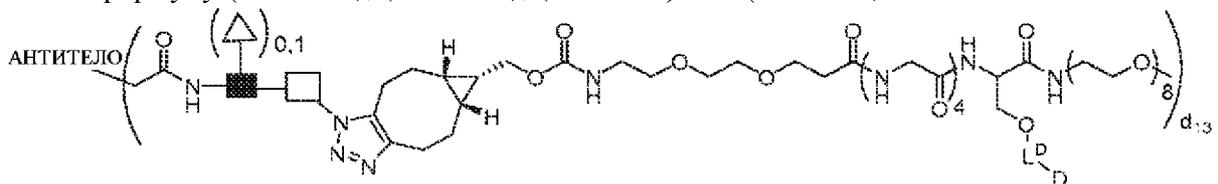
В некоторых вариантах осуществления, изобретения конъюгат антитело-лекарственное средство имеет Формулу (XXX), где каждый R_A представляет собой:

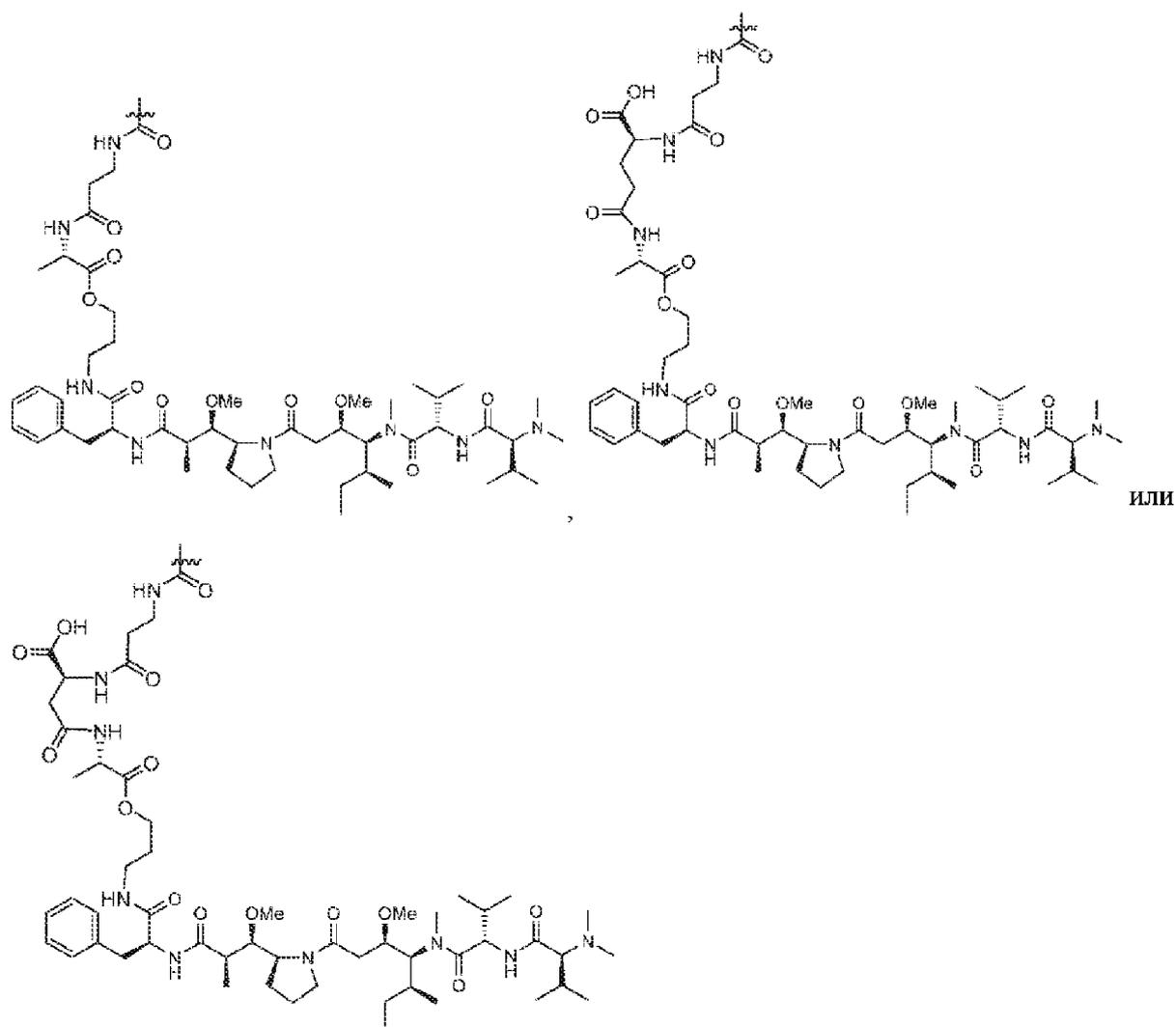


В некоторых вариантах осуществления, изобретения конъюгат антитело-лекарственное средство имеет формулу (XXX), где каждый R_A представляет собой

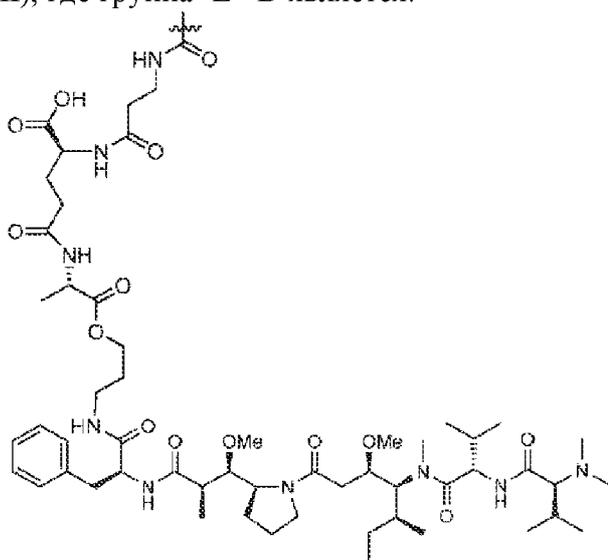


В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство имеет формулу (XXXII-1), (XXXII-2), (XXXII-3) или (XXXII-4):

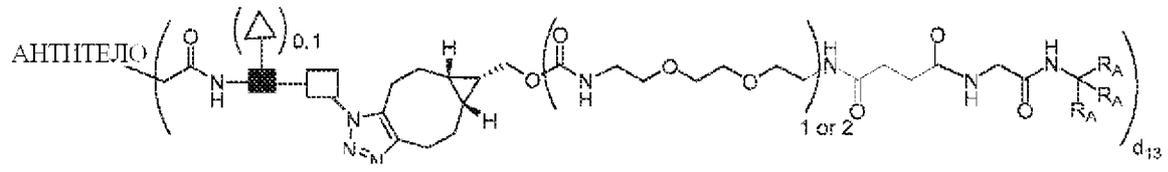




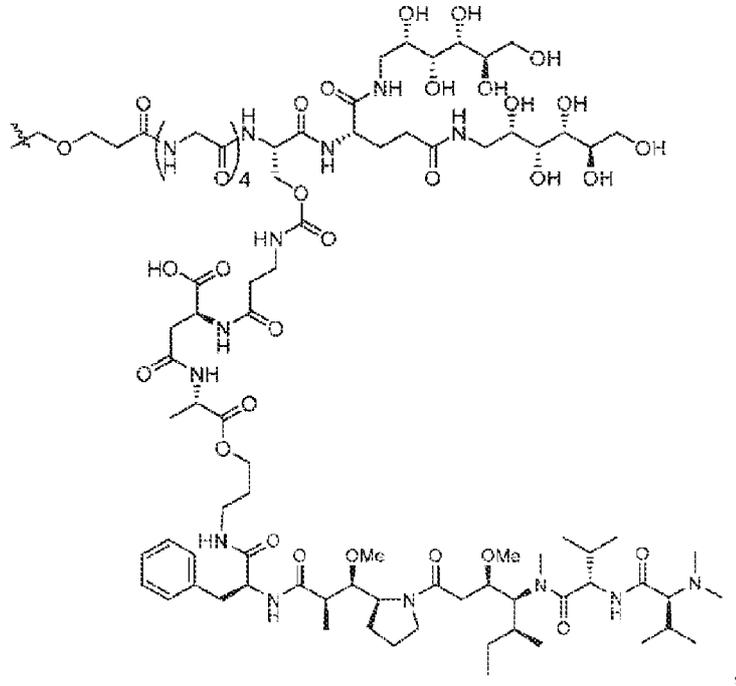
В некоторых вариантах осуществления, изобретения конъюгат антитело-лекарственное средство имеет формулу (XXXII-1), (XXXII-2), (XXXII-3), (XXXII-4) или (XXXIII), где группа $-L^D-D$ является:

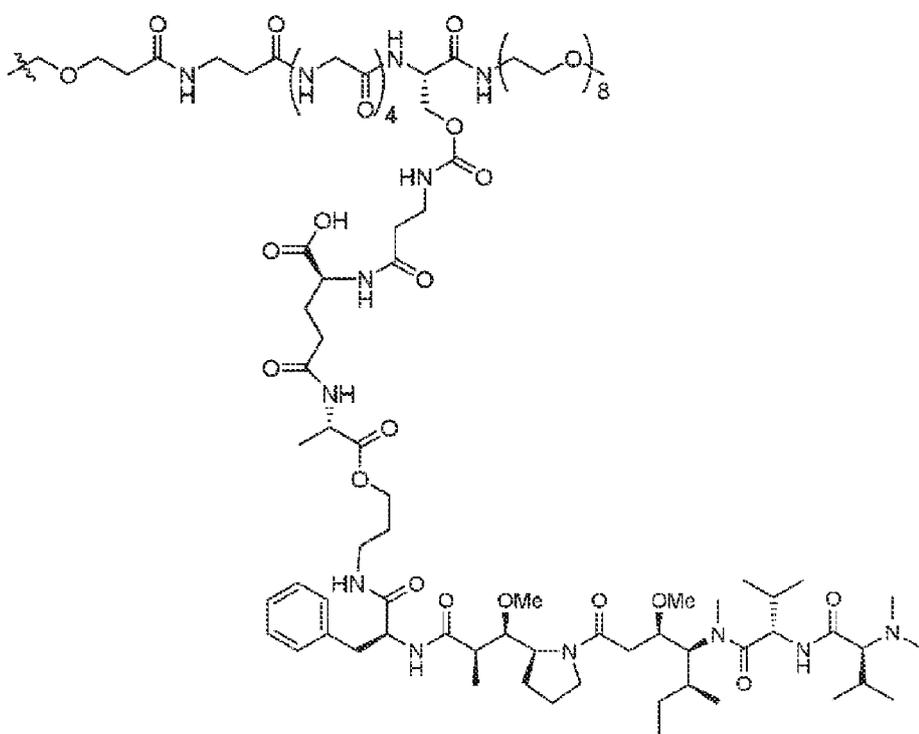
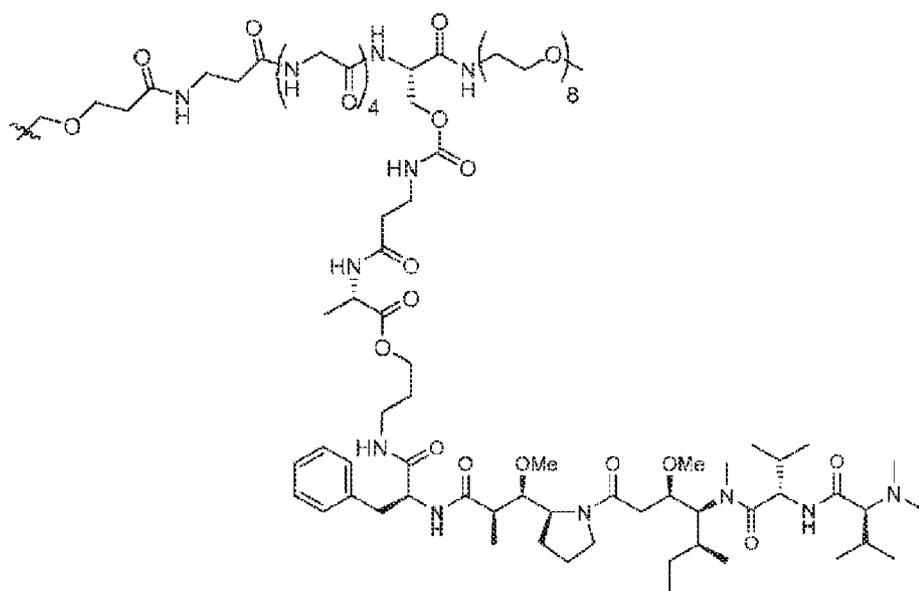


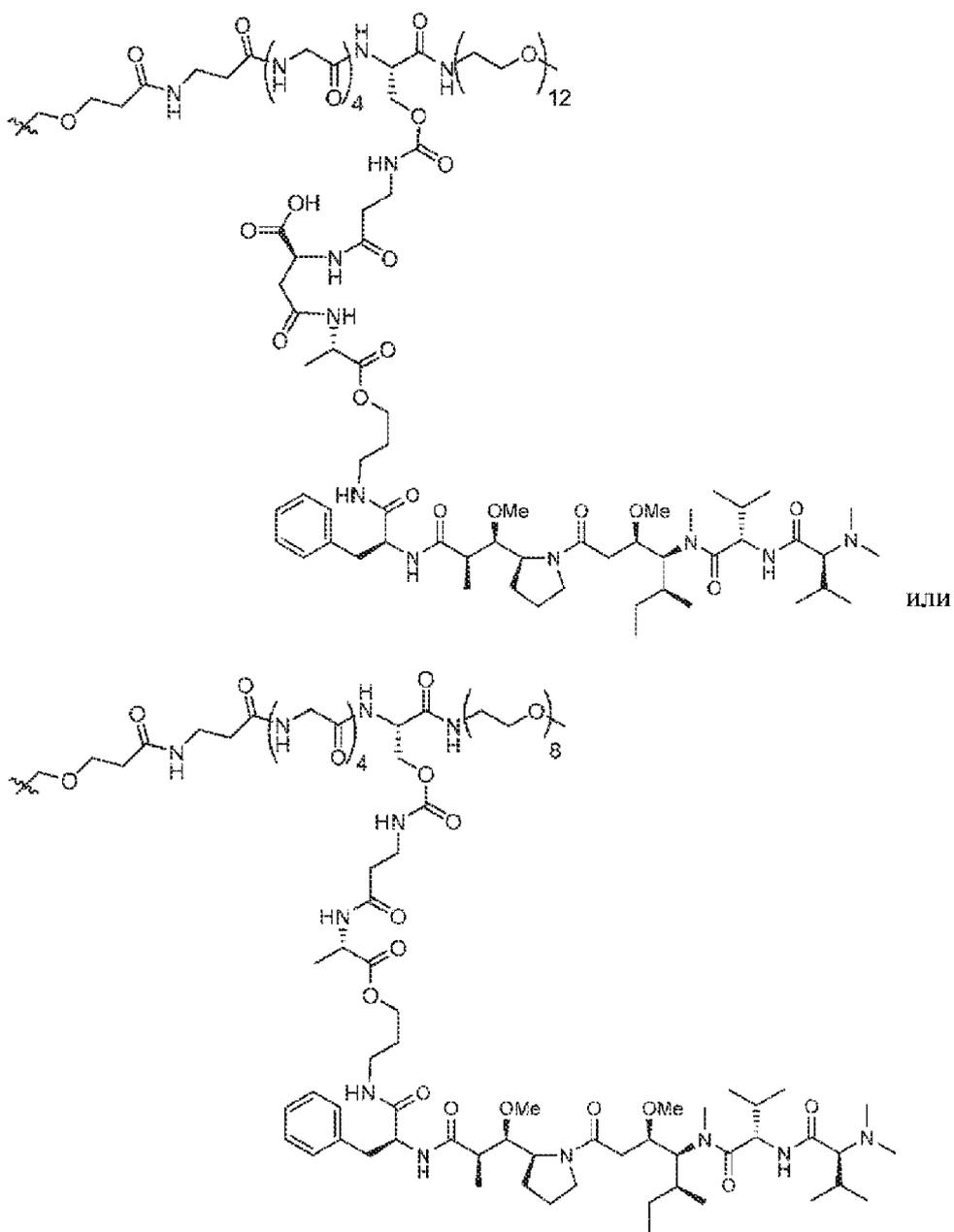
В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство имеет Формулу (XXXIV):



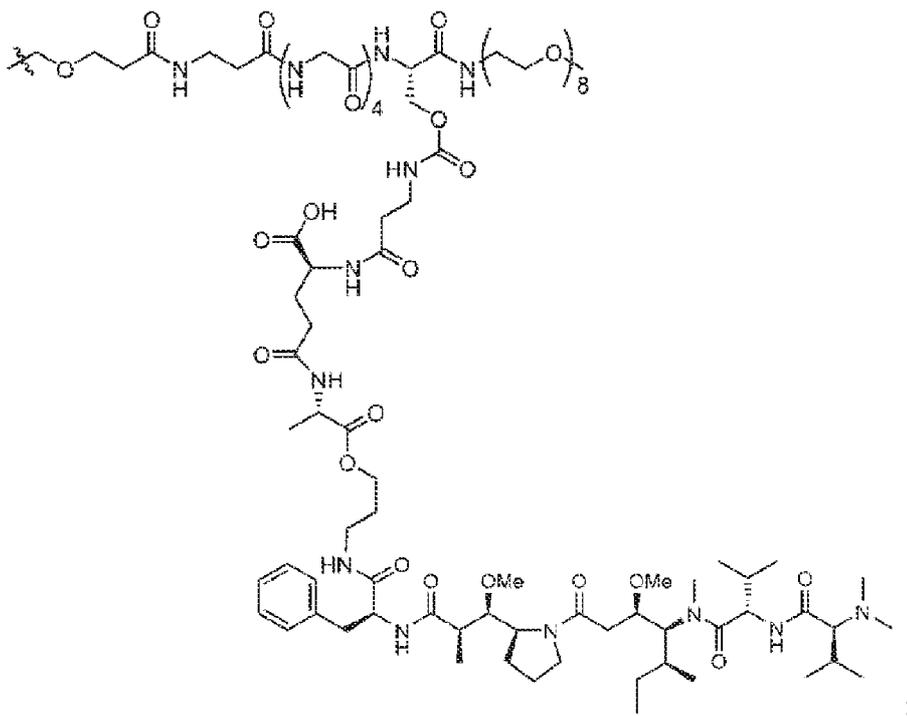
где каждый R_A представляет собой





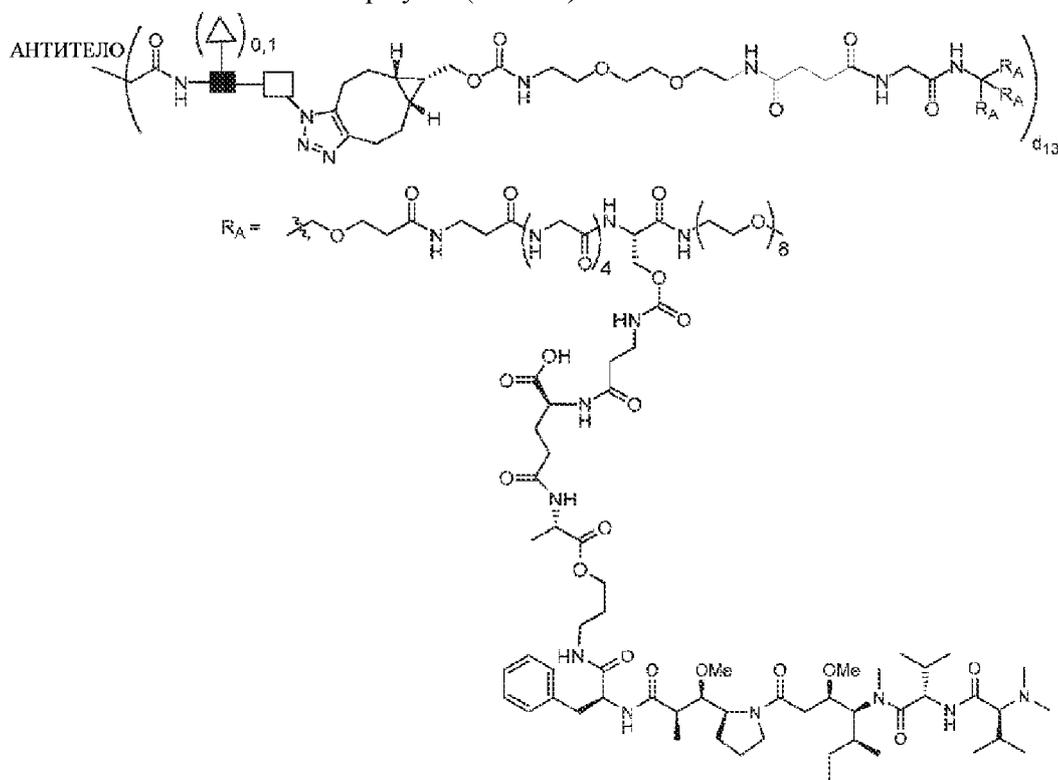


В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой конъюгат формулы (XXXIV), где каждый R_A представляет собой



необязательно, антитело содержит одну или несколько аспарагиновых групп на N297, соединенных с остальной частью конъюгата; и, необязательно, антитело до модификации представляет собой антитело NaPi2b, ХМТ-1535, которое описано в заявке США № 15/457,574.

В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой конъюгат Формулы (XXXV):



где

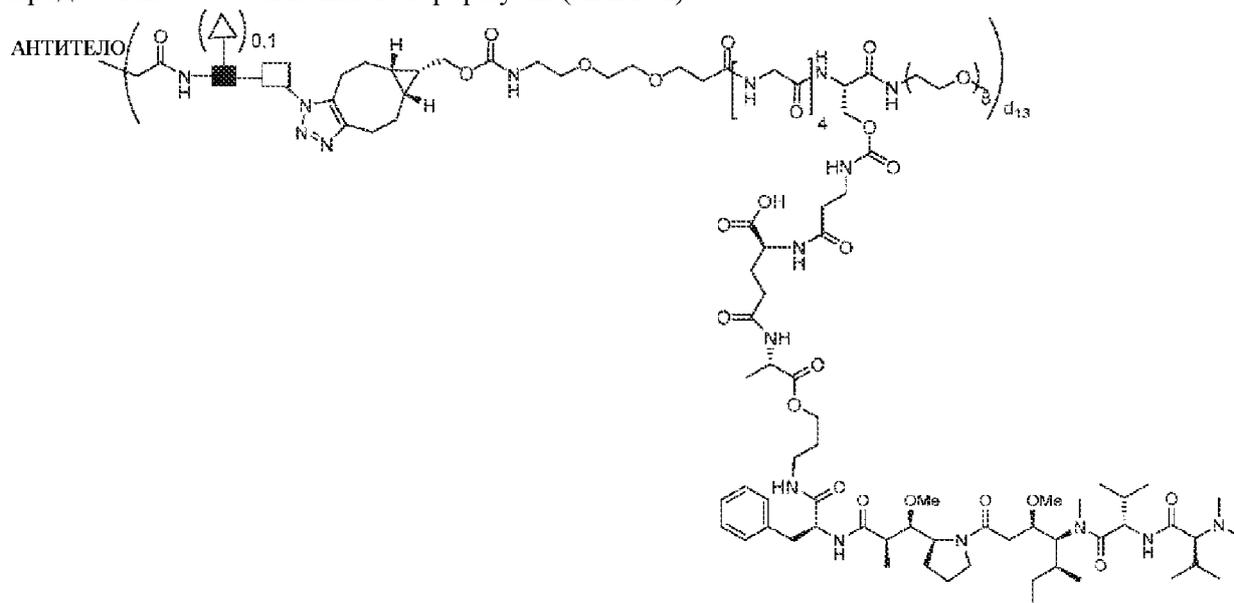
d_{13} равно 2;

АНТИТЕЛО представляет собой антитело NaPi2b, содержащее: CDRH1, содержащую аминокислотную последовательность GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 5); CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 6); CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность GETARATFAY (SEQ ID NO: 7); CDRL1, содержащую аминокислотную последовательность SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 8); CDRL2, содержащую аминокислотную последовательность YTSSLYS (SEQ ID NO: 9); CDRL3, содержащую аминокислотную последовательность QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 10); тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;

группа линкер-лекарственное средство присоединена к группе аспарагина на N297 антитела;

■ представляет собой GlcNAc; Δ представляет собой Fuc; и \square представляет собой GalNAc.

В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой конъюгат формулы (XXXVI):



(XXXVI)

где

d_{13} представляет собой целое число 2;

АНТИТЕЛО представляет собой антитело NaPi2b, содержащее: CDRH1, содержащую аминокислотную последовательность GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 5); CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 6); CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность GETARATFAY (SEQ ID NO: 7); CDRL1, содержащую аминокислотную последовательность SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 8); CDRL2, содержащую аминокислотную последовательность YTSSLYS (SEQ ID NO: 9); CDRL3, содержащую

аминокислотную последовательность QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 10); тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;

группа линкер-лекарственное средство присоединена к группе аспарагина на N297 антитела;

■ представляет собой GlcNAc; Δ представляет собой Fuc; и □ представляет собой GalNAc.

Фармацевтические композиции

В некоторые варианты осуществления настоящего описания включены фармацевтические композиции, содержащие один или несколько конъюгатов, как описано в настоящем документе, в приемлемом носителе, таком как стабилизатор, буфер и подобные. В некоторых вариантах осуществления, конъюгаты можно вводить и вводить субъекту стандартными средствами, со стабилизаторами, буферами и подобными или без них, с образованием фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления, введение может представлять собой парентеральное введение, включая внутривенную, внутриартериальную, подкожную, внутривентриальную или внутримышечную инъекцию или инфузию, или внутричерепное, например, подбололочное или внутрижелудочковое введение. В некоторых вариантах осуществления, конъюгаты могут быть составлены и использованы в виде стерильных растворов и/или суспензий для инъекционного введения; лиофилизированных порошков для разведения перед инъекцией/инфузией; местных композиции; в виде таблеток, капсул или эликсиров для перорального введения; или суппозитория для ректального введения и других композиций, известных в данной области техники.

Фармакологическая композиция или состав относится к композиции или составу в форме, подходящей для введения, например системного введения, в клетку или субъекту, включая, например, человека. Подходящие формы частично зависят от применения или пути введения, например перорального, ингаляционного, трансдермального или путем инъекции/инфузии. Такие формы не должны препятствовать достижению композицией или составом клетки-мишени (т.е. клетки, в которую желательна доставка лекарственного средство).

Под «системным введением» подразумевается системная абсорбция или аккумуляция конъюгата *in vivo* в кровотоке с последующим распределением по всему телу. Пути введения, которые приводят к системной абсорбции, включают, без ограничения: внутривенный, подкожный, внутривентриальный, ингаляционный, пероральный, внутрилегочный и внутримышечный. Использование конъюгата по настоящему описанию может локализовать доставку лекарственного средства в определенные клетки, такие как раковые клетки, через специфичность антител.

«Фармацевтически приемлемый состав» означает композицию или состав, который обеспечивает эффективное распределение конъюгатов в физической локации, наиболее подходящей для их желаемой активности. В некоторых вариантах осуществления,

эффективная доставка происходит до клиренса ретикулоэндотелиальной системой или образования связывания вне мишени, что может привести к снижению эффективности или токсичности. Неограничивающие примеры агентов, подходящих для составления с конъюгатами, включают: ингибиторы Р-гликопротеина (такие как Pluronic P85), которые могут усиливать проникновение активных агентов в ЦНС; биоразлагаемые полимеры, такие как поли(DL-лактид-когликолидные) микросферы для доставки с замедленным высвобождением после интрацеребральной имплантации; и загруженные наночастицы, например, изготовленные из полибутилцианоакрилата, которые могут доставлять активные агенты через гематоэнцефалический барьер и могут изменять механизмы поглощения нейронами.

В некоторых вариантах осуществления, настоящего описания, представлены фармацевтические композиции, приготовленные для хранения или введения, которые включают фармацевтически эффективное количество желаемых конъюгатов в фармацевтически приемлемом носителе или разбавителе. В некоторых вариантах осуществления, приемлемые носители, разбавители и/или эксципиенты для терапевтического применения хорошо известны в области фармацевтики. В некоторых вариантах осуществления, могут быть предусмотрены буферы, консерванты, наполнители, диспергаторы, стабилизаторы или красители. В некоторых вариантах осуществления, можно использовать антиоксиданты и суспендирующие агенты.

Термин «фармацевтически эффективное количество», используемый в настоящем документе, относится к количеству фармацевтического агента для лечения, облегчения или профилактики идентифицированного заболевания или состояния, или для проявления обнаруживаемого терапевтического или ингибирующего действия. Эффект может быть обнаружен любым методом анализа, известным в данной области техники. Точное эффективное количество для субъекта будет зависеть от массы тела, размера и здоровья субъекта; природы и степени состояния; и терапевтического агента или комбинации терапевтических агентов, выбранных для введения.

В некоторых вариантах осуществления, фармацевтически эффективное количество любого конъюгата может быть первоначально оценено либо в анализах клеточных культур, *например*, клеток новообразований, либо в моделях на животных, обычно на крысах, мышах, кроликах, собаках или свиньях. В некоторых вариантах осуществления, животную модель также можно использовать для определения соответствующего диапазона концентраций и пути введения. В некоторых вариантах осуществления, такую информацию затем можно использовать для определения полезных доз и способов введения людям. В некоторых вариантах осуществления, терапевтическая и/или профилактическая эффективность и токсичность могут быть определены стандартными фармацевтическими процедурами на культурах клеток или экспериментальных животных, *например*, ED₅₀ (доза, терапевтически эффективная у 50% популяции) и LD₅₀ (доза, летальная для 50% популяции). В некоторых вариантах осуществления, соотношение доз между токсическим и терапевтическим и/или профилактическим действием представляет

собой терапевтический индекс, и его можно выразить как отношение LD_{50}/ED_{50} . В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции демонстрируют высокие терапевтические индексы. В некоторых вариантах осуществления, дозировка может варьироваться в этом диапазоне в зависимости от используемой дозированной формы, чувствительности пациента и пути введения.

В некоторых вариантах осуществления, лекарственное средство или его производные, конъюгаты лекарственного средства или конъюгаты PBRM-лекарственное средство можно оценить на их способность ингибировать рост опухоли в нескольких клеточных линиях с использованием Cell titer Glo. Кривые доза-ответ можно построить с помощью программного обеспечения SoftMax Pro, и значения IC_{50} можно определить из четырехпараметрической аппроксимации кривой. Используемые клеточные линии могут включать такие, которые являются мишенями для PBRM, и контрольную клеточную линию, которая не является мишенью для PBRM, содержащихся в тестируемых конъюгатах.

В некоторых вариантах осуществления, конъюгаты составлены для парентерального введения путем инъекции, включая использование обычных методов катетеризации или инфузии. В некоторых вариантах осуществления, составы для инъекций могут быть представлены в виде стандартной дозированной формы, например, в ампулах или в многодозовых контейнерах, с добавлением консерванта. В некоторых вариантах осуществления, конъюгаты можно вводить парентерально в стерильной среде. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат, в зависимости от используемого носителя и концентрации, может быть либо суспендирован, либо растворен в носителе. В некоторых вариантах осуществления, в носителе могут быть растворены адъюванты, такие как местные анестетики, консерванты и буферные агенты. Термин «парентеральный», используемый в настоящем документе, включает чрескожные, подкожные, внутрисосудистые (например, внутривенные), внутримышечные или интратекальные инъекции или инфузии и подобные. Кроме того, предлагается фармацевтический состав, содержащий конъюгаты и фармацевтически приемлемый носитель. Один или несколько конъюгатов могут присутствовать в сочетании с одним или несколькими нетоксичными фармацевтически приемлемыми носителями, и/или разбавителями, и/или адъювантами, и, при желании, другими активными ингредиентами.

В некоторых вариантах осуществления, стерильный препарат для инъекций также может представлять собой стерильный раствор или суспензию для инъекций в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе. В некоторых вариантах осуществления, в число приемлемых носителей и растворителей, которые можно использовать, входят вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. В некоторых вариантах осуществления, в качестве растворителя или суспендирующей среды обычно используют стерильные нелетучие масла. В некоторых вариантах осуществления, можно использовать мягкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. В некоторых вариантах осуществления, жирные

кислоты, такие как олеиновая кислота, находят применение в приготовлении инъекционных препаратов.

В некоторых вариантах осуществления, описанные в настоящем документе конъюгаты и композиции можно вводить в подходящей форме (например, парентерально или внутривенно).

В некоторых вариантах осуществления, конъюгаты можно вводить один раз в неделю в течение шести недель или дольше. В некоторых вариантах осуществления, конъюгаты можно вводить один раз каждые две, три или четыре недели. В некоторых вариантах осуществления, болюсные дозы вводят в количестве от примерно 50 до примерно 400 мл физиологического раствора, к которому можно добавить от примерно 5 до примерно 10 мл сывороточного альбумина человека. В некоторых вариантах осуществления, непрерывные инфузии проводят в количестве от примерно 250 до примерно 500 мл физиологического раствора, к которому можно добавить от примерно 25 до примерно 50 мл сывороточного альбумина человека, в течение 24 часов.

В некоторых вариантах осуществления, пациент может пройти второй курс лечения примерно через одну-четыре недели после лечения (например, примерно через три недели после лечения или примерно через четыре недели после лечения).

В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество можно вводить по другой регулярной схеме, *т.е.* ежедневно, еженедельно, ежемесячно или ежегодно, или по нерегулярной схеме с различными днями, неделями, месяцами введения и т. д. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество вводимое количество может варьироваться. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество для первой дозы выше, чем терапевтически эффективное количество для одной или нескольких последующих доз. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество для первой дозы ниже, чем терапевтически эффективное количество для одной или нескольких последующих доз. В некоторых вариантах осуществления, эквивалентные дозы можно вводить в течение различных периодов времени, включая, но не ограничиваясь ими, примерно каждые 2 часа, примерно каждые 6 часов, примерно каждые 8 часов, примерно каждые 12 часов, примерно каждые 24 часа, примерно каждые 36 часов, примерно каждые 48 часов, примерно каждые 72 часа, примерно каждую неделю, примерно каждые две недели, примерно каждые три недели, примерно каждый месяц и примерно каждые два месяца. В некоторых вариантах осуществления, количество и частота дозировок, соответствующих завершеному курсу терапии, будут определяться в соответствии с рекомендациями соответствующих регулирующих органов и мнением практикующего врача. В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективные количества, описанные в настоящем документе, относятся к общим количествам, вводимым в течение заданного периода времени; то есть, если вводят более одного другого описанного в настоящем документе конъюгата, терапевтически эффективные количества соответствуют общему вводимому количеству. Понятно, что конкретный уровень дозы для конкретного

субъекта зависит от множества факторов, включая активность конкретного конъюгата, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, диету, время введения, способ введения и скорость выведения, комбинацию с другими активными агентами и тяжесть конкретного заболевания, подвергающегося терапии.

В некоторых вариантах осуществления, терапевтически эффективное количество конъюгата, описанное в настоящем документе, в целом относится к количеству, необходимому для достижения терапевтической цели. В некоторых вариантах осуществления, это может быть связывающее взаимодействие между антителом и его антигеном-мишенью, которое в некоторых случаях препятствует функционированию мишени. В некоторых вариантах осуществления, количество, необходимое для введения, будет, кроме того, зависеть от аффинности связывания антитела с его конкретным антигеном, а также будет зависеть от скорости, с которой введенное антитело истощается из свободного объема другого субъекта, которому оно вводится. В некоторых вариантах осуществления, диапазоны терапевтически эффективных доз конъюгатов, описанных в настоящем документе, могут составлять, в качестве неограничивающего примера, от примерно 0,1 мг/кг массы тела до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 0,1 мг/кг массы тела до примерно 100 мг/кг массы тела или от примерно 0,1 мг/кг массы тела до примерно 150 мг/кг массы тела. В некоторых вариантах осуществления, частота дозирования может варьироваться, например, от двух раз в день до одного раза в месяц (например, один раз в день, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в 3 недели или ежемесячно). В некоторых вариантах осуществления, описанные в настоящем документе конъюгаты можно вводить внутривенно путем инфузии (например, в виде разовой дозы еженедельно, каждые 2 недели, каждые 3 недели или 4 недели) в дозе от примерно 0,1 мг/кг до примерно 20 мг/кг (например, 0,2 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,67 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг, 10 мг/кг, 11 мг/кг, 12 мг/кг, 13 мг/кг, 14 мг/кг, 15 мг/кг, 16 мг/кг, 17 мг/кг, 18 мг/кг, 19 мг/кг или 20 мг/кг). В некоторых вариантах осуществления, описанные в настоящем документе конъюгаты можно вводить (например, в виде разовой дозы еженедельно, каждые 2 недели, каждые 3 недели или ежемесячно) в дозе от примерно 0,1 мг/кг до примерно 20 мг/кг (например, 0,2 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,67 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг, 6 мг/кг, 7 мг/кг, 8 мг/кг, 9 мг/кг, 10 мг/кг, 11 мг/кг, 12 мг/кг, 13 мг/кг, 14 мг/кг, 15 мг/кг, 16 мг/кг, 17 мг/кг, 18 мг/кг, 19 мг/кг, 19 мг/кг или 20 мг/кг) для лечения рака.

В некоторых вариантах осуществления, описанные в настоящем документе конъюгаты можно вводить внутривенно путем инфузии (например, в виде разовой дозы еженедельно, каждые 2 недели, каждые 3 недели или каждые четыре недели) в концентрации от примерно 7 мг/м² до примерно 162 мг/м² (например, 7 мг/м², 14 мг/м², 28 мг/м², 56 мг/м², 84 мг/м², 112 мг/м², 135 мг/м² или 162 мг/м²). В данной области техники известен ряд упаковок или наборов для дозирования фармацевтических агентов для периодического перорального применения. В некоторых вариантах осуществления, упаковка имеет индикаторы для каждого периода. В некоторых вариантах осуществления,

упаковка представляет собой маркированную блистерную упаковку, градуированную упаковку с дозатором, или бутылку. В некоторых вариантах осуществления, упаковочные средства набора могут сами по себе быть приспособлены для введения, такие как шприц, пипетка, глазная пипетка или другое подобное устройство, из которого состав можно наносить на пораженный участок тела, вводить субъекту, или даже наносить и смешивать с другими компонентами набора.

Способы применения

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает способ лечения или профилактики заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает способ лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание предлагает способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание относится к способу лечения рака, экспрессирующего NaPi2b, у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание предлагает описанный в настоящем документе конъюгат для применения при лечении или профилактике заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание предлагает описанный в настоящем документе конъюгат для применения при лечении заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает применение описанного в настоящем документе конъюгата для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает применение конъюгата, описанного в настоящем документе, для лечения рака, экспрессирующего NaPi2b, у субъекта, нуждающегося в этом.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает применение описанного в настоящем документе конъюгата при производстве лекарственного средства для лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает применение описанного в настоящем документе конъюгата в производстве лекарственного средства для лечения или профилактики заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает применение описанного в настоящем документе конъюгата при производстве лекарственного средства для лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение обеспечивает применение конъюгата, описанного в настоящем документе, при производстве лекарственного средства для лечения рака, экспрессирующего NaPi2b, у субъекта, нуждающегося в этом.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание предлагает конъюгат для лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание предлагает конъюгату для лечения или профилактики заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание предлагает конъюгат для применения при лечении рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающего введение субъекту эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание предлагает конъюгат для применения при лечении рака, экспрессирующего NaPi2b, у субъекта, нуждающегося в этом, включающего введение субъекту эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание предлагает способ лечения или профилактики заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества, по меньшей мере, одного конъюгата по описанию; где указанный конъюгат высвобождает один или несколько терапевтических агентов при биоразложении.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание предлагает способ лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества, по меньшей мере, одного конъюгата по описанию; где указанный конъюгат высвобождает один или несколько терапевтических агентов при биоразложении.

В некоторых вариантах осуществления, заболевание представляет собой рак.

В некоторых вариантах осуществления, предлагаемую в настоящем документе противораковую терапию, содержащую конъюгат антитело-лекарственное средство, таргетирующий NaPi2b, вводят в количестве, достаточном для оказания терапевтически полезного эффекта. Как правило, активные агенты вводят в количестве, которое не приводит к нежелательным побочным эффектам у пациента, которого лечат, или которое сводит к минимуму или уменьшает наблюдаемые побочные эффекты. Рак, экспрессирующий NaPi2b, включает, например, рак яичников, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак эндометрия, папиллярный почечно-клеточный рак, рак слюнных протоков, папиллярный рак щитовидной железы, светлоклеточный рак почки, рак молочной железы, рак почки, рак шейки матки и холангиокарциному.

Специалист в данной области техники может определить точное количество

активных агентов, в том числе конъюгатов антитело-лекарственное средство, таргетирующих NaPi2b, для введения субъекту. Например, такие агенты и их применение для лечения рака и солидных опухолей хорошо известны в данной области техники. Таким образом, дозы таких агентов могут быть выбраны на основе стандартных схем дозирования для этого агента при заданном способе введения.

Понятно, что точная дозировка и продолжительность лечения зависят от ткани или опухоли, подвергаемой лечению, и могут быть определены эмпирически с использованием известных протоколов тестирования или путем экстраполяции данных испытаний *in vivo* или *in vitro*, и/или могут быть определены на основе известных схем дозирования конкретного агента. Следует отметить, что концентрации и значения доз могут также варьироваться в зависимости от возраста пациента, веса пациента, пути введения и/или степени или тяжести заболевания и других факторов, рассмотрение которых находится в компетенции практикующего врача. Как правило, схемы дозирования выбраны для ограничения токсичности. Следует отметить, что лечащий врач должен знать, как и когда прекратить, прервать или скорректировать терапию для снижения дозы из-за токсичности или дисфункции костного мозга, печени или почек или других тканей. И наоборот, лечащий врач также должен знать, как и когда корректировать лечение до более высоких уровней, если клинический ответ не является адекватным (исключая токсические побочные эффекты). Кроме того, следует понимать, что для любого конкретного субъекта конкретные схемы дозирования должны корректироваться с течением времени в соответствии с индивидуальными потребностями и профессиональным мнением лица, вводящего или контролирующего введение составов, и что диапазоны концентраций, указанные в настоящем документе, являются только примерными и не предназначены для ограничения их объема.

Например, таргетирующий NaPi2b полимер конъюгата антитело-лекарственное средство вводят в терапевтически эффективном количестве для уменьшения объема опухоли.

Количество таргетирующего NaPi2b полимера конъюгата антитело-лекарственное средство вводят для лечения заболевания или состояния, например, рака или солидной опухоли, можно определить стандартными клиническими методами. Кроме того, для определения оптимальных диапазонов дозировок можно использовать анализы *in vitro* и модели на животных. Точная дозировка, которую можно определить эмпирически, может зависеть от пути введения, типа заболевания, подлежащего лечению и серьезности заболевания.

В некоторых вариантах осуществления, представленные в настоящем документе конъюгаты вводят внутривенно. В некоторых вариантах осуществления, для внутривенного введения конъюгатов можно вводить струйно или болюсно, путем вливания или посредством их комбинации. В некоторых вариантах осуществления, время инфузии может составлять от примерно 1 минуты до трех часов, например, от примерно 1 минуты до примерно двух часов, или от примерно 1 минуты до примерно 60 минут, или, по

меньшей мере, 10 минут, 40 минут или 60 минут.

В некоторых вариантах осуществления, дозируемое количество составляет примерно от 7 мг/м^2 до 162 мг/м^2 (например, 7 мг/м^2 , 14 мг/м^2 , 28 мг/м^2 , 56 мг/м^2 , 84 мг/м^2 , 112 мг/м^2 , 135 мг/м^2 или 162 мг/м^2). В некоторых вариантах осуществления, дозируемое количество составляет от примерно $6,5 \text{ мг/м}^2$ до примерно $7,5 \text{ мг/м}^2$, от примерно $13,5 \text{ мг/м}^2$ до примерно $14,5 \text{ мг/м}^2$, от примерно $27,5 \text{ мг/м}^2$ до примерно $28,5 \text{ мг/м}^2$, от примерно $55,5 \text{ мг/м}^2$ до примерно $56,5 \text{ мг/м}^2$, от примерно $83,5 \text{ мг/м}^2$ до примерно $84,5 \text{ мг/м}^2$, от примерно $111,5 \text{ мг/м}^2$ до примерно $112,5 \text{ мг/м}^2$, от примерно $134,5 \text{ мг/м}^2$ до примерно $135,5 \text{ мг/м}^2$ или от примерно $161,5 \text{ мг/м}^2$ до примерно 162 мг/м^2). В некоторых вариантах осуществления, дозируемые количества вводят внутривенно один раз каждые три недели (т.е. 21-дневный цикл) или один раз каждые четыре недели (т.е. 28-дневный цикл).

Частоту и время введения, и дозируемое количество можно вводить периодически в течение цикла введения, чтобы поддерживать непрерывный и/или долгосрочный эффект активных агентов в течение желаемого периода времени. Предлагаемые композиции конъюгата антитело-лекарственное средство, таргетирующего NaPi2b, можно вводить ежечасно, ежедневно, еженедельно, ежемесячно, ежегодно или один раз. Продолжительность цикла введения может быть определена эмпирически и зависит от лечимого заболевания, тяжести заболевания, конкретного пациента и других соображений в пределах уровня квалификации лечащего врача. Продолжительность лечения комбинированной терапией, предложенной в настоящем документе, может составлять одну неделю, две недели, один месяц, несколько месяцев, один год, несколько лет или более.

В некоторых вариантах осуществления, частота введения конъюгата антитело-лекарственное средство, таргетирующего NaPi2b, составляет один раз в день, через день, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз каждые 2 недели, один раз каждые 3 недели или один раз каждые 4 недели. Дозировка может быть разделена на множество циклов введения в течение курса лечения. Например, конъюгат антитело-лекарственное средство, таргетирующий NaPi2b, можно вводить с частотой в течение примерно месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, года или более. Частота введения может быть одинаковой на протяжении всего периода цикла или может различаться. В некоторых вариантах осуществления, конъюгат антитело-лекарственное средство, таргетирующий NaPi2b, вводят, по меньшей мере, два раза в неделю в течение первой недели цикла введения. После первой недели, частота может продолжаться два раза в неделю, может увеличиваться до более двух раз в неделю или может быть снижена до не более одного раза в неделю. Специалист в данной области техники может определить конкретную частоту дозирования и цикл введения на основе конкретной вводимой дозы, заболевания или состояния, которое лечат, тяжести заболевания или состояния, возраста субъекта и других подобных факторов.

В некоторых вариантах осуществления, если симптомы заболевания сохраняются при отсутствии прекращения лечения, лечение можно продолжать в течение

дополнительного периода времени. В курсе лечения можно отслеживать признаки заболевания и/или связанной с лечением токсичности или побочных эффектов.

Цикл введения конъюгата антитело-лекарственное средство, таргетирующего NaPi2b, может быть адаптирован для добавления периодов прекращения лечения, чтобы обеспечить период отдыха от воздействия агентов. Продолжительность прекращения лечения может составлять заранее определенное время или может быть определена эмпирически в зависимости от того, как отвечает пациент, или в зависимости от наблюдаемых побочных эффектов. Например, лечение можно прекратить на одну неделю, две недели, три недели, один месяц или несколько месяцев. В некоторых вариантах осуществления, период прекращения лечения встроен в цикл схемы дозирования для пациента.

Типовая схема дозирования представляет собой цикл лечения или цикл введения продолжительностью 21 день или 28 дней. В некоторых вариантах осуществления, схема дозирования представляет собой цикл лечения или цикл введения, равный 28 дням. В некоторых вариантах осуществления, описанный в настоящем документе конъюгат антитело-лекарственное средство, таргетирующий NaPi2b, вводят в 1 день, с последующими 20 днями без дозирования, или вводят в 1 день, с последующими 27 днями без дозирования. Специалист в данной области техники может определить точный цикл введения и схему дозирования.

В некоторых вариантах осуществления, цикл введения может иметь любую желаемую продолжительность (например, 21-дневный цикл или 28-дневный цикл введения можно повторять в течение любого периода времени). Например, 21-дневный цикл или 28-дневный цикл введения можно повторять в течение 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 12 месяцев, 1,5 года, 2 года, 2,5 года, 3 года и более.

В некоторых вариантах осуществления, рак, экспрессирующий NaPi2b, включает, например, рак яичников, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак эндометрия, папиллярный почечно-клеточный рак, рак слюнных протоков, папиллярный рак щитовидной железы, светлоклеточный рак почки, рак молочной железы, рак почки, рак шейки матки и холангиокарциному.

В некоторых вариантах осуществления, рак, экспрессирующий NaPi2b, включает, например, рак яичников, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак эндометрия, папиллярный почечно-клеточный рак, рак слюнных протоков и папиллярный рак щитовидной железы.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее описание предлагает способ лечения рака яичников или немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает применение конъюгата, описанного в настоящем документе, в производстве

лекарственного средства для лечения рака яичников или немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) у субъекта, нуждающегося в этом.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение предлагает применение конъюгата, описанного в настоящем документе, для лечения рака яичников или немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) у субъекта, нуждающегося в этом.

В некоторых вариантах осуществления, в настоящем описании предложен конъюгат для применения при лечении рака яичников или немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) у субъекта, нуждающегося в этом, включающего введение субъекту эффективного количества конъюгата, описанного в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого (NSCLC). В некоторых вариантах осуществления, NSCLC относится к подтипу аденокарциномы.

В некоторых вариантах осуществления, рак яичников представляет собой резистентный к платине рак яичников. В некоторых вариантах осуществления, рак яичника представляет собой серозную карциному яичника высокой степени злокачественности. В некоторых вариантах осуществления, рак яичников представляет собой резистентный к платине серозный рак яичников высокой степени злокачественности.

В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой рак эндометрия. В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой папиллярный почечно-клеточный рак. В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой рак слюнных протоков. В некоторых вариантах осуществления, рак представляет собой папиллярный рак щитовидной железы.

В некоторых вариантах осуществления, изобретения у субъекта имеется эпителиальный рак яичников, рак фаллопиевой трубы, первичный рак брюшины, резистентный к платине рак яичников, не плоскоклеточный NSCLC, прогрессирующее, резистентное к радиоактивному йоду, местно-регионарное рецидивирующее или метастатическое заболевание, папиллярный рак щитовидной железы или эпителиальный рак эндометрия.

В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет эпителиальный рак яичников, подразделяющийся на рак яичников высокой степени злокачественности, серозный рак яичников низкой степени злокачественности или светлоклеточный рак яичников.

В некоторых вариантах осуществления, субъект, страдающий раком яичников, ранее получал лечение химиотерапевтическим агентом, таким как, например, доцетаксел, доксорубицин, циклофосфамид, карбоплатин, паклитаксел, наб-паклитаксел, гемцитабин и цисплатин; ингибиторами ангиогенеза, такими как, например, бевацизумаб (Avastin); ингибитором PARP, такой как, например, нирапариб (Zejula), олапариб (Lynparza) и велипариб; олапарибом (Lynparza) в комбинации с бевацизумабом; или их комбинацией.

В некоторых вариантах осуществления, субъект, страдающий раком яичников,

ранее получал химиотерапию одним агентом, таким как, например, пегилированный липосомальный доксорубицин, еженедельное лечение паклитакселом, топотеканом, гемцитабином, ингибитором PARP и подобным.

В некоторых вариантах осуществления, субъект, страдающий раком яичников, получил не более 3 предшествующих линий терапии, таких как, например, комбинация химиотерапии, такая как, например, карбоплатин плюс паклитаксел, пегилированный липосомальный доксорубицин, еженедельное лечение паклитакселом, доцетакселом, топотеканом, гемцитабином, ингибитором PARP и подобными.

В некоторых вариантах осуществления, субъект, страдающий раком яичников, получил не более 3 предшествующих линий терапии, включая, по меньшей мере, одну линию схемы лечения, содержащей платину. В некоторых вариантах осуществления, субъект, страдающий раком яичников, получил не более 4 предшествующих линий терапии с, по меньшей мере, одной линией с или без платиносодержащей схемы.

В некоторых вариантах осуществления, субъект, имеющий рак NSCLC, относится к подтипу аденокарциномы. В некоторых вариантах осуществления, у субъекта с аденокарциномой NSCLC рак может быть метастатическим или рецидивирующим.

В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет NSCLC и получил предшествующее лечение, такое как, например, химиотерапия на основе платины (цисплатин или карбоплатин) и моноклональное антитело PD-1 или PD-L1. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет NSCLC и получил предшествующее лечение карбоплатином/паклитакселом, абраксаном наб-паклитакселом, доцетакселом, преметрекседом, гемцитабином или комбинацией доцетаксела и рамуцирумаба.

В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет NSCLC и ранее получил до 2 предшествующих линий химиотерапии.

В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет NSCLC и не получал предшествующее дополнительное лечение цитотоксическим агентом или не получал иммунотерапию. В другом варианте осуществления у субъекта, имеющего NSCLC, задокументирована непереносимость или прогрессирование заболевания с известными онкогенными мутациями, для которых существуют одобренные терапии (например, транслокация ALK, мутация EGFR или мутация KRAS).

В некоторых вариантах осуществления, субъект, страдающий раком NSCLC, подвергается лечению NaPi2b конъюгатом антитело-лекарственное средство и PD-1 или PD-L1 моноклональным антителом, таким как, например, ниволумаб, пембролизумаб, атезолизумаб или авелумаб.

В некоторых вариантах осуществления, субъект, страдающий раком NSCLC, подвергается лечению NaPi2b конъюгатом антитело-лекарственное средство и PD-1 или PD-L1 моноклональным антителом, пембролизумабом.

В некоторых вариантах осуществления, субъект подвергается лечению NaPi2b конъюгатом антитело-лекарственное средство в комбинации с ингибитором PARP, таким как, например, олапариб, нирапариб, рукапариб, талазопариб и подобные; ингибитором

PD1/PDL-1, таким как, например, ниволумаб, пембролизумаб, атезолизумаб, авелумаб и подобные; химиотерапией, такой как, например, карбоплатин, цисплатин, оксалиплатин, доксил, циклофосфамид, гемцитабин, топотекан, преметрекс и подобные; ингибитором VEGF, таким как, например, бевацизумаб, рамуцирумаб и подобные; ингибитором тирозинкиназы, таким как, например, гефитиниб, афатиниб, эрлотиниб, дакомитиниб, осимертиниб, пазопаниб и подобные; ингибитором ALK, таким как, например, алектиниб, кризотиниб, цертиниб, бригагиниб и подобные; или ингибитором BRAF, таким как, например, дабрафениб, траметиниб и подобные.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой пембролизумаб.

В некоторых вариантах осуществления, субъект получает лечение NaP2b конъюгатом антитело-лекарственное средство в комбинации с пембролизумабом, карбоплатином, доксилом, бевацизумабом или ингибитором PARP.

В некоторых вариантах осуществления, у субъекта имеется папиллярный рак щитовидной железы с резистентностью или непереносимостью предшествующей терапии ингибиторами киназ, или получал предшествующее лечение эндометридной аденокарциномы низкой степени злокачественности с положительной реакцией на гормональные рецепторы.

В некоторых вариантах осуществления, рак эндометрия не является стромальной опухолью или карциносаркомой. В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет рак эндометрия и получал предшествующее лечение карбоплатином/паклитакселом или аналогичной схемой.

В некоторых вариантах осуществления, у субъекта имеется папиллярный почечно-клеточный рак или светлоклеточный рак почки, который характеризуется преимущественно папиллярным характером роста. В одном варианте осуществления, субъект имеет гистологический диагноз рака слюнных протоков, который прогрессирует после стандартной системной терапии.

В некоторых вариантах осуществления, субъект невосприимчив к химиотерапии, включая стандартные химиотерапевтические агенты первой линии.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится данное изобретение. В спецификации, формы единственного числа также включают множественное число, если контекст явно не указывает иное. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут быть использованы при практическом применении или тестировании настоящего изобретения, подходящие способы и материалы описаны ниже. В случае конфликта, настоящая спецификация, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

На протяжении всего описания, где соединения, каркасы и композиции

описываются как имеющие, включающие или содержащие определенные компоненты, предполагается, что композиции также по существу состоят или состоят из перечисленных компонентов. Аналогичным образом, если способы или процессы описаны как имеющие, включающие или содержащие определенные стадии процесса, процессы также по существу состоят или состоят из указанных стадий обработки. Далее следует понимать, что порядок шагов или порядок выполнения определенных действий не имеет значения, пока изобретение остается работоспособным. Более того, две или несколько стадий или действий могут выполняться одновременно.

Все способы, описанные в настоящем документе, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если иное не указано в настоящем документе или иным образом явно не противоречит контексту. Использование любых и всех примеров или примерных формулировок (например, «такой как»), представленных в настоящем документе, предназначено только для лучшей иллюстрации изобретения и не должно рассматриваться как ограничение объема формулы изобретения, если явно не заявлено иное. Никакая формулировка в спецификации не должна толковаться как указывающая, что любой не заявленный элемент является существенным для того, что заявлено.

Способы синтеза

Любые доступные методы могут быть использованы для получения конъюгатов или их композиций, а также промежуточных продуктов и компонентов (*например*, каркасов), используемых для их получения. В некоторых вариантах осуществления, могут использоваться полусинтетические и полностью синтетические способы.

Общие способы получения конъюгатов или каркасов, описанные в настоящем документе, проиллюстрированы на схемах 2 и 3 ниже и в находящейся на совместном рассмотрении заявке США 15/819,650, описание которой включено в настоящий документ во всей своей полноте. Переменные (например, M^P , M^A , L^3 , W^D , W^M , L^D и L^P , и т.д.) в этих схемах имеют такие же определения, как описано в настоящем документе, если не указано иное.

Схема 2

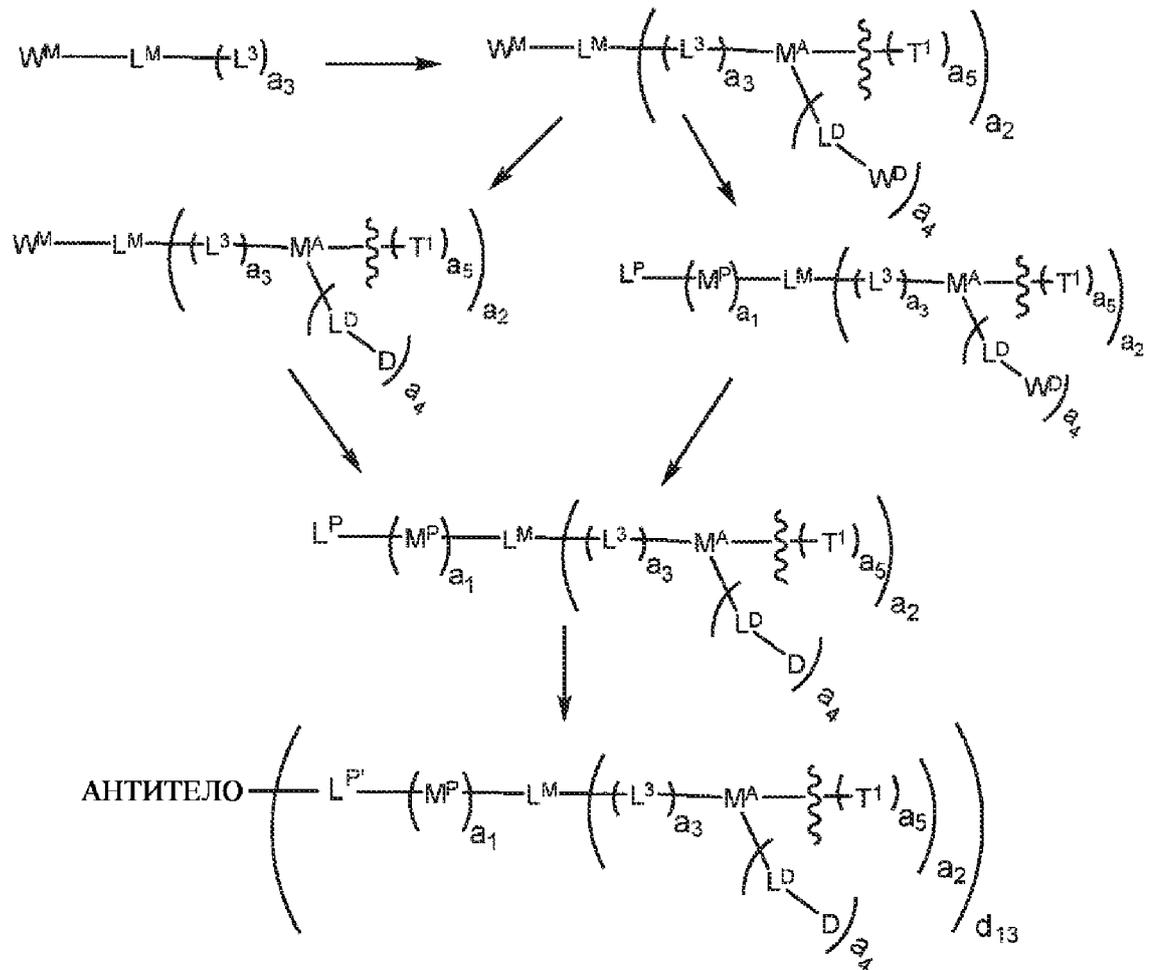
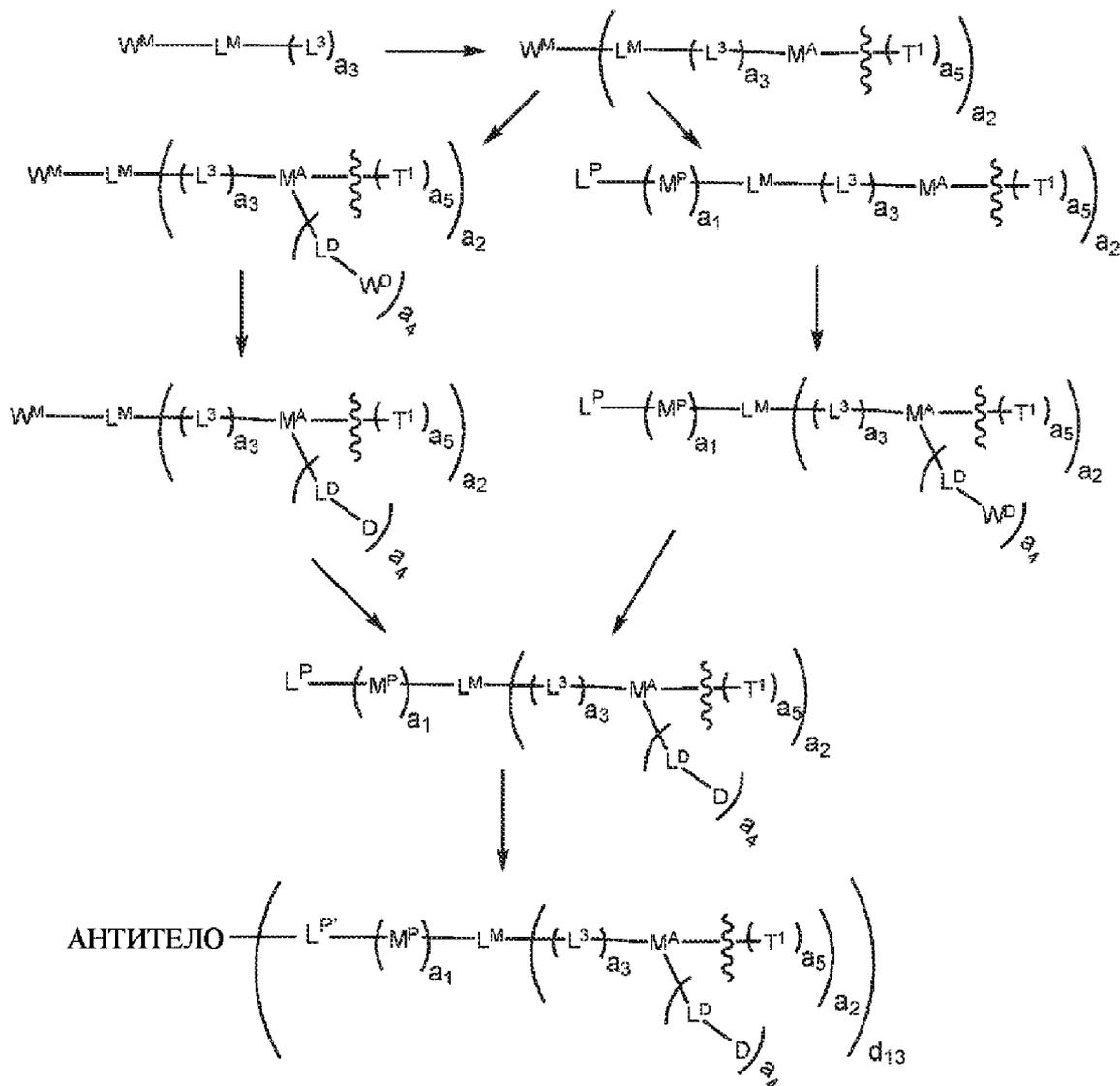


Схема 3



где антитело представляет собой модифицированное антитело по настоящему описанию.

Синтетические процессы по описанию могут допускать использование широкого спектра функциональных групп; поэтому можно использовать различные замещенные исходные материалы. Способы обычно дают желаемое конечное соединение в конце или ближе к концу всего процесса, хотя в некоторых случаях может быть желательным дальнейшее превращение соединения в его фармацевтически приемлемую соль, сложный эфир или пролекарство.

Лекарственные соединения, используемые для конъюгатов по настоящему описанию, могут быть получены различными способами с использованием коммерчески доступных исходных материалов, соединений, известных в литературе, или из легко получаемых промежуточных соединений с использованием стандартных способов и процедур синтеза, известных специалистам в данной области техники, или которые будут очевидны специалисту в данной области техники в свете представленных в настоящем документе идей. Стандартные способы синтеза и процедуры получения органических

молекул и трансформаций и манипуляций с функциональными группами можно найти в соответствующей научной литературе или в стандартных учебниках в данной области техники. Хотя не ограничиваясь одним или несколькими источниками, классические тексты, такие как Smith, M. B., March, J., *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 5th edition, John Wiley & Sons: New York, 2001; и Greene, T.W., Wuts, P.G. M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd edition, John Wiley & Sons: New York, 1999, включенные в настоящее описание посредством ссылки, являются полезными и признанными справочными учебниками по органическому синтезу, известными специалистам в данной области техники. Следующие описания способов синтеза предназначены для иллюстрации, но не для ограничения, общих процедур получения соединений по настоящему описанию.

Конъюгаты по настоящему описанию и включенные в них лекарственные соединения могут быть получены различными способами, известными специалистам в данной области техники. Конъюгаты или соединения по настоящему изобретению с каждой из описанных в настоящем документе формул могут быть получены в соответствии со следующими процедурами из коммерчески доступных исходных материалов или исходных материалов, которые могут быть получены с использованием описанных в литературе процедур. Эти процедуры показывают получение типовых конъюгатов по настоящему описанию.

Конъюгаты, сконструированные, селектированные и/или оптимизированные способами, описанными выше, после получения, могут быть охарактеризованы с использованием различных анализов, известных специалистам в данной области техники, для определения того, обладают ли конъюгаты биологической активностью. В некоторых вариантах осуществления, конъюгаты могут быть охарактеризованы с помощью обычных анализов, включая, помимо прочего, анализы, описанные ниже, для определения того, обладают ли они прогнозируемой активностью, активностью связывания и/или специфичностью связывания.

Кроме того, высокопроизводительный скрининг можно использовать для ускорения анализа с использованием таких анализов. Общие методики проведения высокопроизводительного скрининга описаны, например, в Devlin (1998) *High Throughput Screening*, Marcel Dekker; и патенте США № 5,763,263. Высокопроизводительные анализы могут использовать один или несколько различных методов анализа, включая описанные ниже, но не ограничиваясь ими.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится данное описание. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем документе, могут быть использованы при практическом применении или тестировании настоящего изобретения, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, патентные заявки, патенты и другие ссылки, упомянутые в настоящем документе, полностью включены

посредством ссылки. В случае конфликта настоящая спецификация, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения.

ПРИМЕРЫ

Следующие рабочие примеры иллюстрируют линкеры, молекулы лекарственных средств и антитела или группы антител, а также способы их получения. Они не предназначены для ограничения, и специалисту в данной области техники будет понятно, что можно использовать другие реагенты или способы.

Сокращения

Следующие сокращения используются в схемах реакций и синтетических примерах, которые следуют. Этот список не является исчерпывающим списком сокращений, используемых в заявке, поскольку дополнительные стандартные сокращения, понятные специалистам в области органического синтеза, также могут использоваться в схемах и примерах синтеза.

Сокращения:

АЦН: Ацетонитрил

AF: Ауристин F

AF-NPA: Гидроксипропиламид Ауристина F

ALP: Щелочная фосфатаза

ALT: Аланинаминотрансфераза

AST: Аспаргатаминотрансфераза

водн.: Водный

CE: Капиллярный электрофорез

CR: Полная регрессия

DAD: Диодно-матричный детектор

DAR: Соотношение лекарственного средства к антителу

ДХМ: Дихлорметан

ДИПЕА: N,N-диизопропилэтиламин

DMEM: Среда Игла, модифицированная по Дульбекко

ДМФ: Диметилформамид

EDC: 1-Этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодиимид

ЭДТК: Этилендиаминтетрауксусная кислота

ELISA: Ферментный иммуносорбентный анализ

Endo SH: Эндогликозидаза SH

FBS: Фетальная бычья сыворотка

Fuc: Фукоза

GalNAcT: гликозилтрансфераза

ХГВ: Хроматография гидрофобного взаимодействия

HOAt: 1-гидрокси-7-азабензотриазол

HRP: Пероксидаза хрена

в/в: внутривенно

ЖХ: Жидкостная хроматография

МС: Масс-спектрометрия

MTV: Средний объем опухоли

NMP: N-метил-2-пирролидон

ЯМР: Ядерный магнитный резонанс

PBS: Фосфатно-солевой буфер

PBST: Фосфатно-солевой буфер, содержащий Tween

PR: Частичная регрессия

RBC: Эритроциты

ОФ-ВЭЖХ: Высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой

SDS: Додецилсульфат натрия

ГПХ: Гель-проникающая хроматография

TBS: Tris-солевой буфер

TFS: Безопухолевая выживаемость

TGI: Ингибирование роста опухоли

ТСЕР: Трис[2-карбоксиэтил]фосфин

TEAA: Ацетат триэтиламония

ТФК: Трифторуксусная кислота

ТГФ: Тетрагидрофуран

ТМВ: Тетраметилбензидин

UDP: Уридиндифосфат

УФ/ДФ: Ультрафильтрация/диафильтрация

WBC: Лейкоциты

WCX: Слабая катионообменная хроматография

Общая информация

Все реагенты были приобретены у соответствующих поставщиков, если не указано иное.

XMT-1535 (анти-NaPi2b антитело) описано в находящейся на одновременном рассмотрении заявке US 15/457,574, поданной 13 марта 2017, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. XMT-1519 (анти-Her2 антитело) описано в патенте США 9,555,112 от 31 января 2017 и патенте США 9,738,720 от 22 августа 2017, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

Endo SH получают, как описано в заявке PCT WO 2017137459, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. UDP-азидосахар и GalNAcT получают, как описано в патенте США 9,988,662, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

Ингибирование роста опухоли (%TGI) определяют как разницу долей средних объемов опухоли (MTV) между обработанной и контрольной группами. Размер опухоли

измеряют на протяжении каждого исследования эффективности для определения ингибирования роста опухоли (TGI).

Очистку ВЭЖХ проводят на полупрепаративной колонке Phenomenex Gemini 5 мкм C18 110 Å, 250x10 мм. Когда применимо, содержание лекарственного средства в конъюгатах определяют спектрофотометрически, в противном случае для количественного определения содержания лекарственного средства проводят ОФ-ВЭЖХ, ЖХ/МС или ¹Н ЯМР.

Содержание белка в конъюгатах антитело-лекарственное средство определяют спектрофотометрически при 280 нм или с помощью ELISA.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство, каркасы, несущие лекарственное средство, или каркасы антител очищают (т. е. удаляют остаточное непрореагировавшее лекарственное средство, неконъюгированное антитело, ферменты или исходные материалы) с помощью экстенсивной диафильтрации, ХГВ или белка А по мере необходимости. При необходимости, проводят дополнительную очистку с помощью ГПХ или ХГВ для удаления агрегированных конъюгатов антитело-лекарственное средство. Как правило, очищенные конъюгаты антитело-лекарственное средство содержат <5% (масс./масс.) (например, <2% (масс./масс.)) агрегированных конъюгатов антитело-лекарственное средство, по данным ГПХ; <0,5% (масс./масс.) (например, <0,1% (масс./масс.)) свободного (неконъюгированного) лекарственного средства, как определено с помощью ОФ-ВЭЖХ и/или ЖХ-МС/МС; <1% (масс./масс.) свободного конъюгата лекарственного средства, по данным ГПХ и/или ОФ-ВЭЖХ; и <2% (масс./масс.) (например, <1% (масс./масс.)) неконъюгированного антитела или фрагментов антител, по данным ХГВ-ВЭЖХ и/или ОФ-ВЭЖХ. Восстановленные или частично восстановленные антитела получают с использованием процедур, описанных в литературе, см., например, Francisco et al., Blood 102 (4): 1458-1465 (2003). Общую концентрацию лекарственного средства (конъюгированного и неконъюгированного) определяют с помощью ОФ-ВЭЖХ или обратного расчета из DAR, измеренного с помощью CE-SDS.

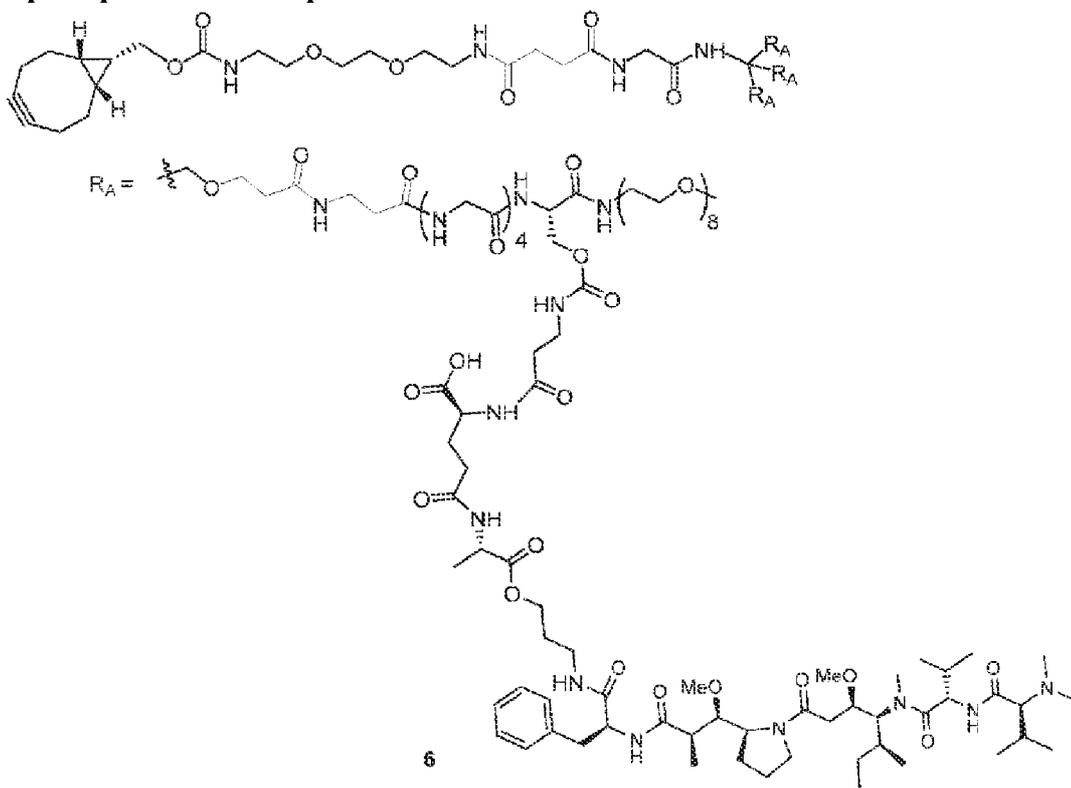
Для определения концентрации свободного лекарственного средства AF-НРА в биологическом образце, подкисленный образец обрабатывают АЦН. Свободное лекарственное средство экстрагируют, и анализируют супернатант АЦН. Для определения концентрации конъюгированного AF-НРА в неклиническом образце, образец подвергают иммунозахвату с использованием магнитных микроносителей, покрытых анти-IgG1 антителом, с последующим истощающим щелочным гидролизом. Супернатант АЦН, содержащий высвобожденное лекарственное средство AF-НРА, анализируют с помощью ЖХ-МС/МС. Концентрацию общего антитела в неклинических образцах измеряют с помощью ЖХ-МС/МС после иммунозахвата с использованием анти-IgG1 антитела путем обнаружения пептидной последовательности, уникальной для антитела после трипсинового перевара. Для клинических образцов можно использовать ту же процедуру, за исключением того, что для иммунозахвата будут использоваться анти-идиотипические антитела, чтобы избежать интерференции эндогенных антител.

Анализ свободного АФ и АФ-НРА проводят с помощью ОФ-ВЭЖХ с использованием колонки С4, градиента АЦН и УФ определения. Площади пиков интегрируют и сравнивают со стандартами АФ и АФ-НРА. Способ является количественным для АФ и АФ-НРА в гомогенатах плазмы и тканей и линейным в диапазоне концентраций от 0,1 нг/мл до 150 нг/мл. Общее количество лекарственного средства (АФ-НРА), высвобождаемое после гидролиза с NaOH (водн.), измеряют в тех же условиях в динамическом диапазоне от 1 нг/мл до 5000 нг/мл. Общие стандарты антител варьируются от 0,1 мкг/мл до 100 мкг/мл.

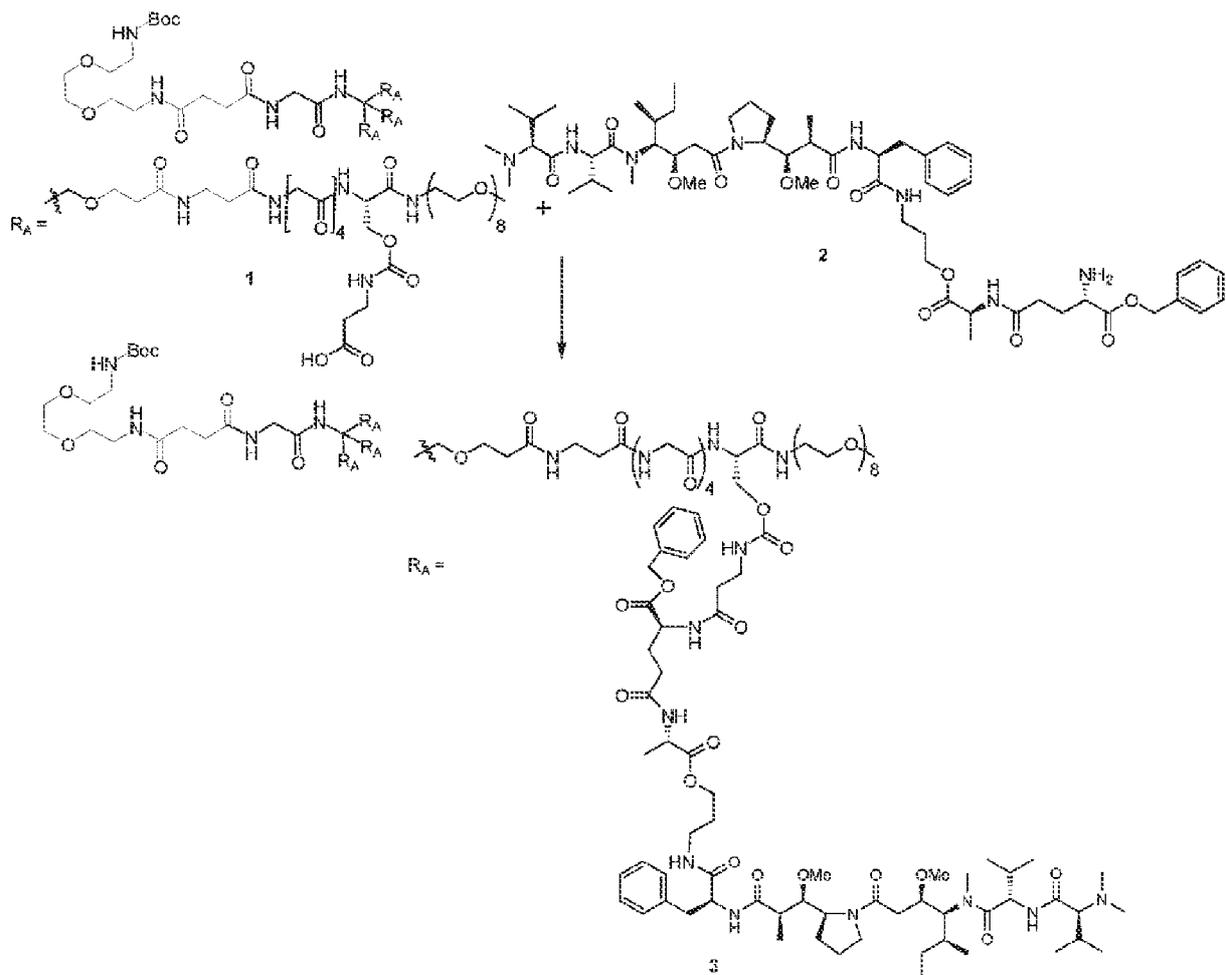
Гидрофобность конъюгата антитело-лекарственное средство определяют с помощью ХГВ-ВЭЖХ на системе ВЭЖХ Shimadzu Prominence, оснащенной диодно-матричным детектором (DAD). Колонку TSK гель-бутил-NPR (размер частиц 2,5 мкм) для этих анализов выдерживают при 35°C. Подвижная фаза А представляет собой 1,5 М сульфата аммония, 25 мМ фосфата натрия и pH 7,0, и подвижная фаза В представляет собой 25 мМ фосфата натрия, 10% изопропилового спирта и pH 7,0. Разделение проводят с линейным градиентом подвижной фазы В от 0 до 100% в течение 25 минут. Скорость потока составляет 1 мл/мин. Инъекции образцов варьируются от ~10 мкг до 100 мкг.

Отношение лекарственного средства к антителу (DAR) определяют, подвергая конъюгаты антитело-лекарственное средство истощающему щелочному гидролизу. Высвобожденный АФ-НРА затем количественно определяют по стандартной кривой с помощью ОФ-ВЭЖХ. Измеренные концентрации АФ-НРА коррелируют с содержанием антител для определения DAR.

Пример 1: Синтез каркаса 6

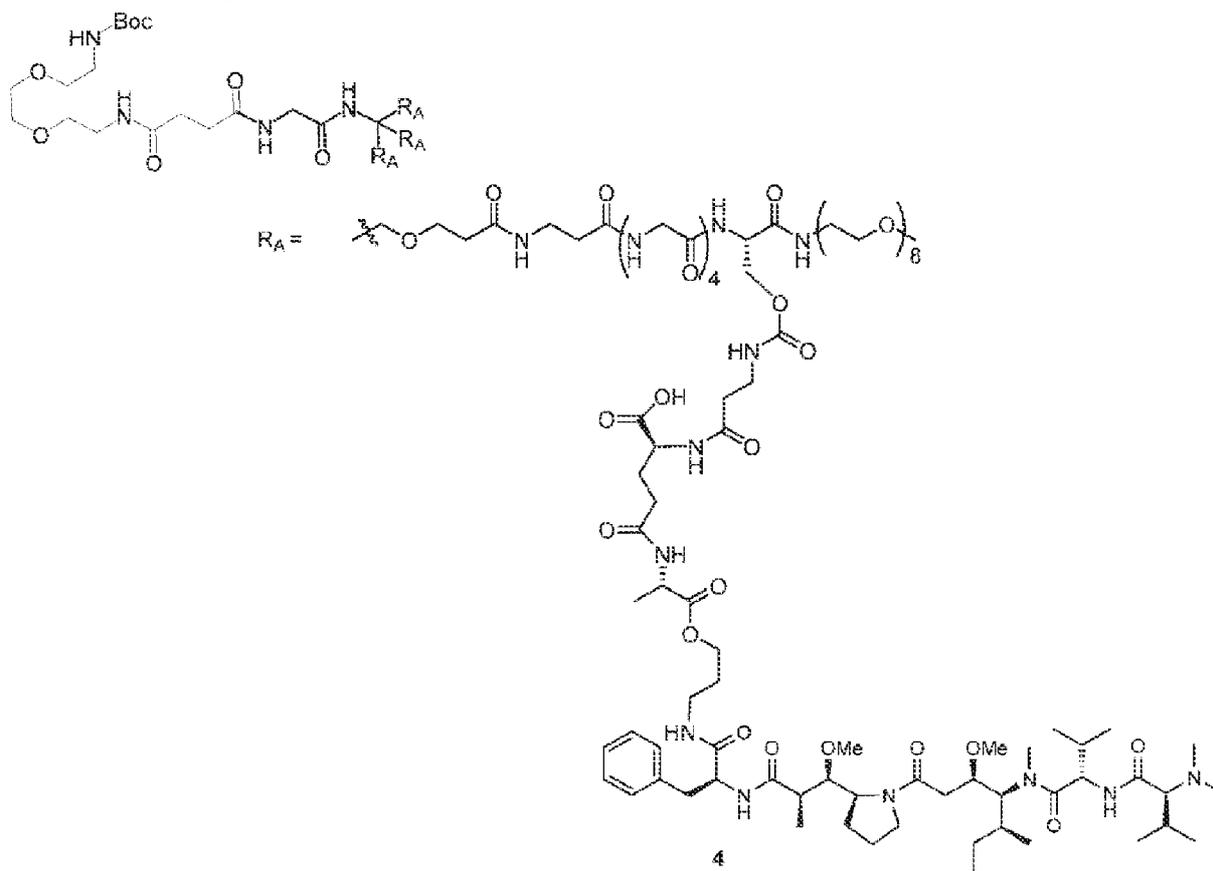


Стадия 1. Соединение 3



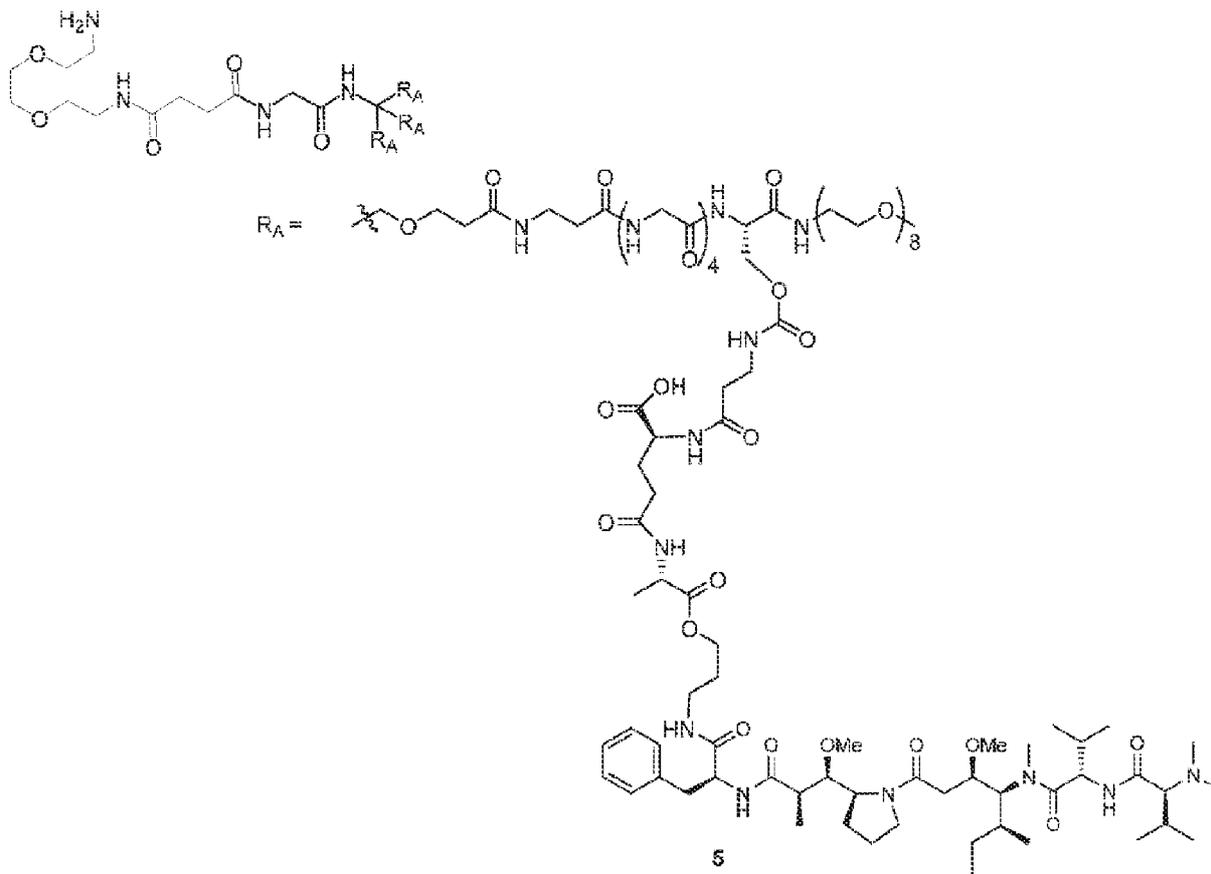
Соединение **1** (548 мг, 0,165 ммоль, получено, как описано в US 15/819,650, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки), воду (14 мл), NMP (1,4 мл), EDC (158 мг, 0,824 ммоль) и HOAt (112 мг, 0,824 ммоль) перемешивают на бане со льдом и доводят pH до ~6,5 с 1N NaHCO₃ (водн.). Добавляют соединение **2** (696 мг, 0,577 ммоль) с последующим доведением pH до ~6,5. Полученную смесь перемешивают в холодном состоянии в течение 3 часов. Добавляют дополнительное количество EDC, HOAt и соединения **2** (198 мг, 0,164 ммоль) и продолжают перемешивание в течение ночи. Реакционную смесь очищают на картридже C18 (275 г) со ступенчатым градиентом АЦН/Н₂О (0,1% ТФК) от 10% до 50% и до 90% об./об. АЦН/Н₂О (0,1% ТФК). Желаемые фракции лиофилизируют с получением соединения **3** в виде белого аморфного твердого вещества (825 мг, выход 76%). МС: 2120,04 (3⁺), 1590,27 (4⁺), 1272,41 (5⁺).

Стадия 2. Соединение 4



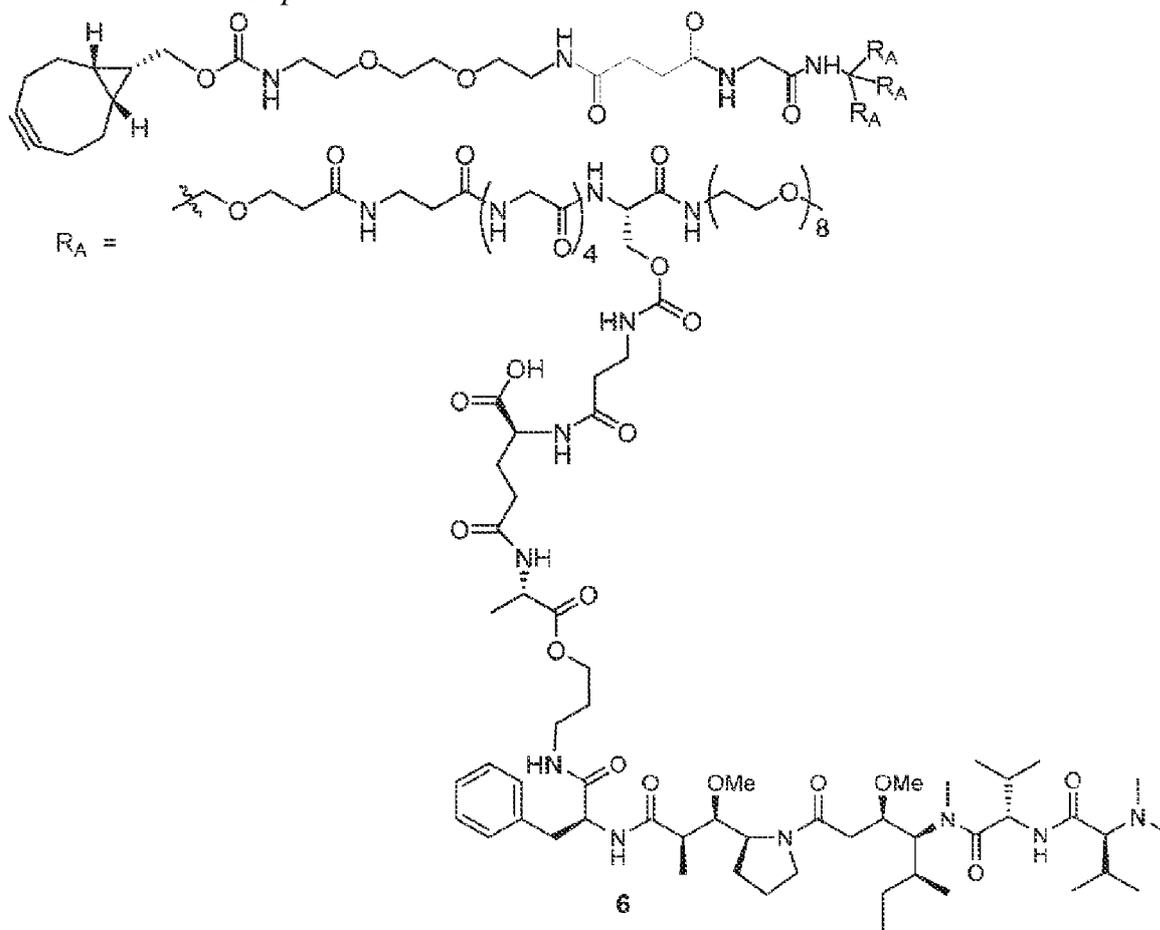
К смеси соединения **3** (825 мг, 0,126 ммоль), EtOH (90 мл) и воды (9,00 мл) в стеклянной колбе Парра добавляют уксусную кислоту (0,288 мл, 5,04 ммоль). Через смесь барботируют аргон с последующим добавлением Pd/C (134 мг, 0,126 ммоль). Колбу присоединяют к оборудованию для гидрирования, затем последовательно откачивают вакуум, заполняют аргоном, затем заполняют водородом (0,762 мг, 0,378 ммоль) до 30 ф./кв.д. и смесь энергично перемешивают в течение ночи. Реакционную смесь фильтруют через слой силикагеля и концентрировали до масла. Масло растворяют в смеси АЦН/Н₂О (0,1% ТФК) и лиофилизируют с получением соединения **4** в виде белого аморфного твердого вещества (790 мг, выход 100%). МС: 2094,65 (3⁺), 1570,98 (4⁺), 1257,18 (5⁺).

Стадия 3. Соединение 5



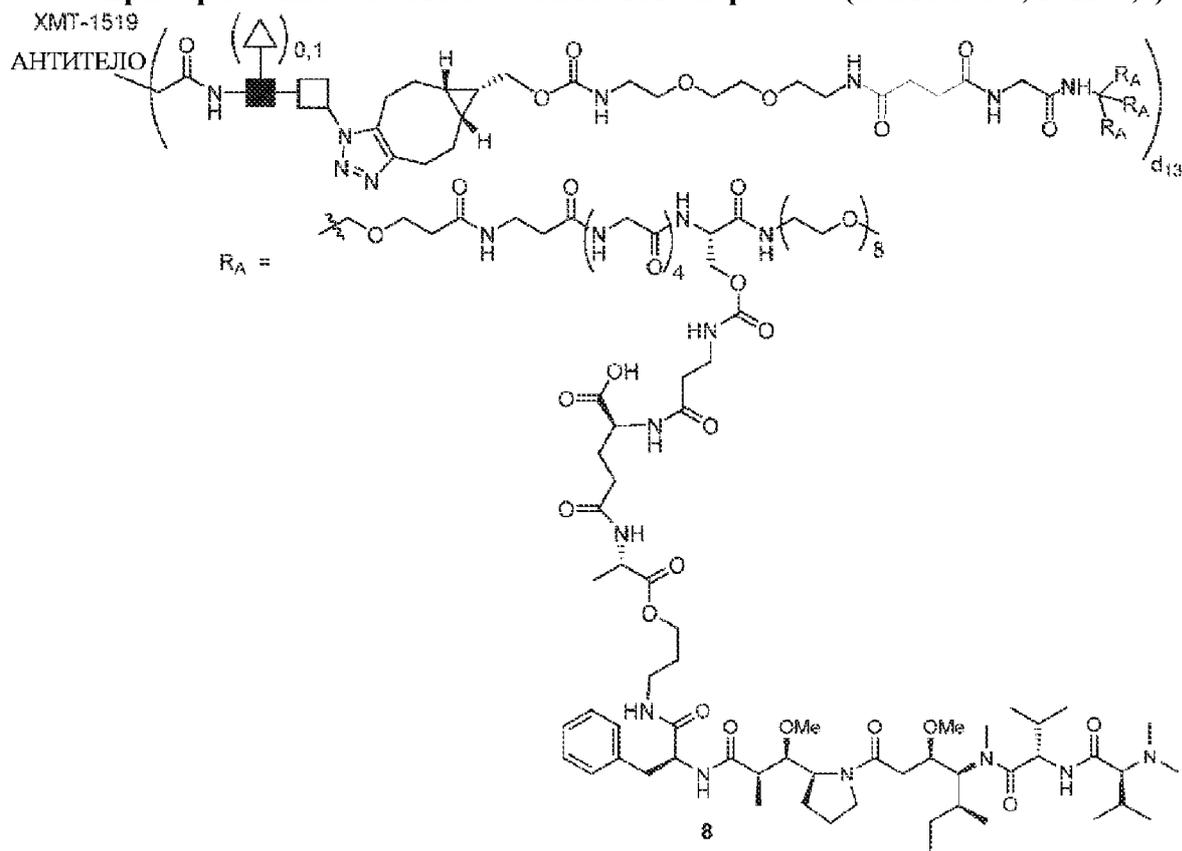
К охлажденному льдом раствору соединения **4** (100 мг, 0,016 ммоль), растворенного в ТГФ (1,5 мл) и воде (1,5 мл), добавляют муравьиную кислоту (4,5 мл, 117 ммоль). Раствор перемешивают в холодном состоянии в течение 15 минут, затем в течение ночи при комнатной температуре. ТГФ удаляют, и полученную смесь разбавляют водой и очищают на картридже С18 (150 г) с использованием АЦН/Н₂О (0,1% ТФК) в качестве подвижной фазы. Желаемые фракции лиофилизируют с получением соединения **5** в виде белого аморфного твердого вещества (71 мг, выход 72%). МС: 2060,97 (3⁺), 1545,98 (4⁺), 1236,99 (5⁺).

Стадия 4. Каркас 6



К охлажденному льдом раствору соединения **5** (71 мг, 0,011 ммоль) в ДХМ (5 мл) и ДМФ (0,500 мл) добавляют ((1R,8S,9s)-бицикло[6.1.0]нон-4-ин-9-ил)метил(2,5-диоксопирролидин-1-ил)карбонат (5,02 мг, 0,017 ммоль) и DIPEA (0,018 мл, 0,103 ммоль), конечный pH ~8-9. Через 18 ч к реакционной смеси добавляют ДМФ (1,5 мл) и смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 2 ч, затем концентрируют и очищают с помощью препаративной ВЭЖХ с использованием АЦН/Н₂О (0,1% АсОН) в качестве подвижной фазы. Желаемые фракции лиофилизируют с получением каркаса **6** в виде белого аморфного твердого вещества (34 мг, выход 47%). МС: 2120,04 (3⁺), 1590,27 (4⁺), 1272,41 (5⁺).

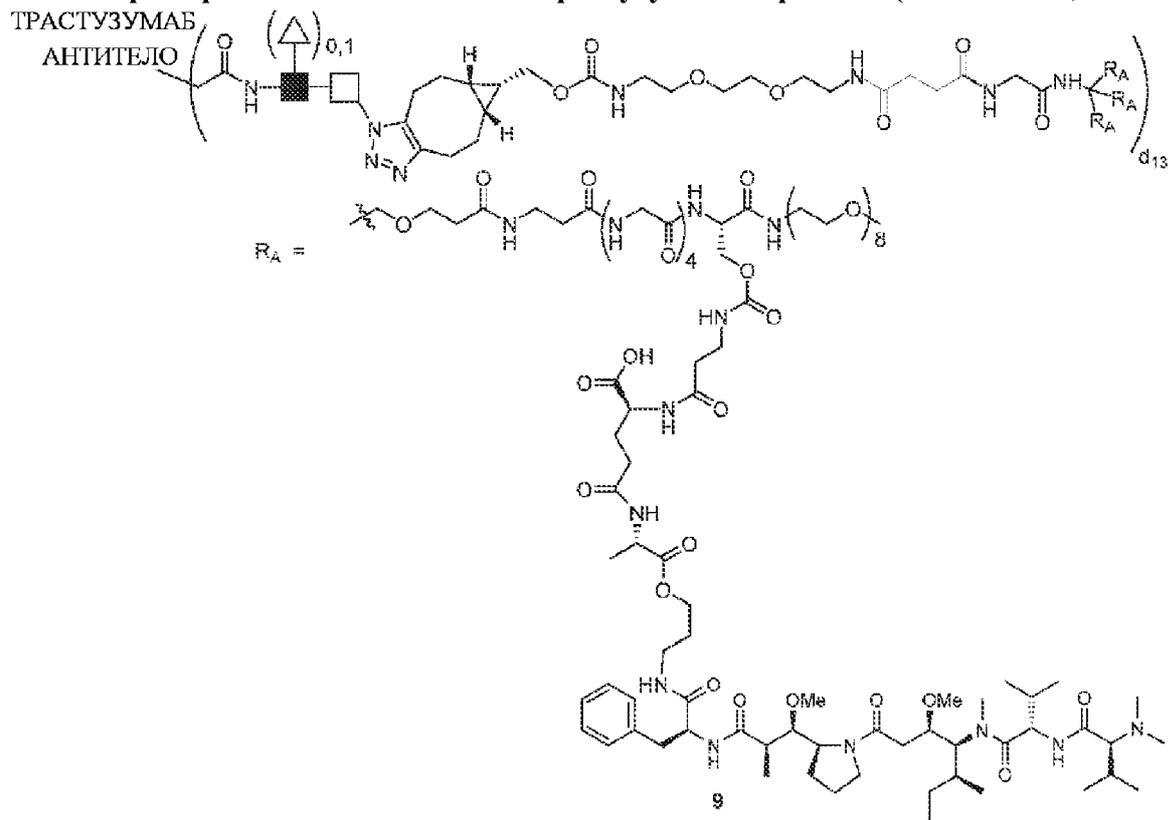
Пример 3: Синтез конъюгата ХМТ-1519 каркаса 6 (конъюгат 8, DAR 7,3)



где: ■ представляет собой GlcNAc; Δ представляет собой Fuc; и □ представляет собой GalNAc.

Конъюгат **8** синтезируют, как описано в примере 2, за исключением того, что на стадии 2 вместо азидо-модифицированного антитела ХМТ-1535 используют азидо-модифицированное ХМТ-1519 (400 мг, 2,78 мкмоль). Очищенный конъюгат 8 (163 мг, выход 41%) имеет DAR лекарственного средства 7,3, по данным гидролиза с последующей ОФ-ВЭЖХ.

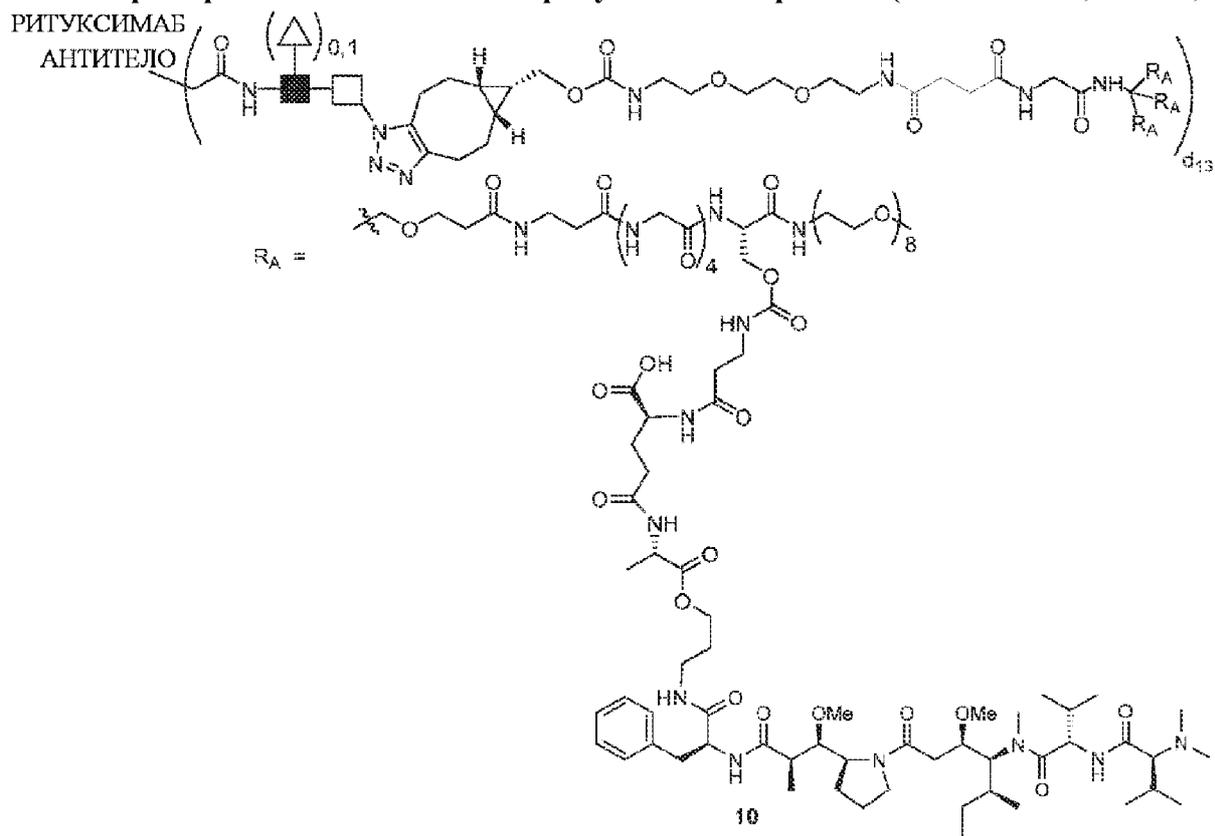
Пример 4: Синтез конъюгата трастузумаба каркаса 6 (конъюгат 9, DAR 7,3)



где: ■ представляет собой GlcNAc; Δ представляет собой Fuc; и □ представляет собой GalNAc.

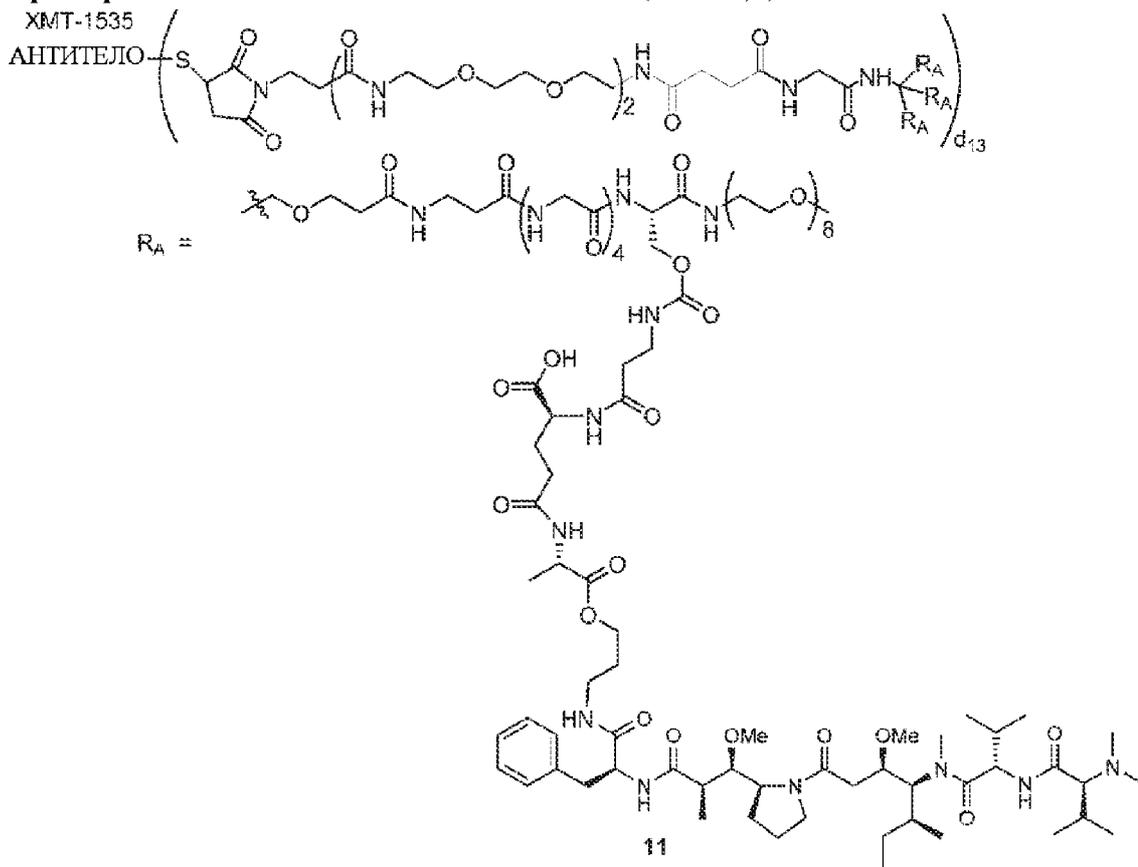
Конъюгат 9 такой, как описано в примере 2, за исключением того, что на стадии 2 вместо азидо-модифицированного антитела ХМТ-1535 используют азидо-модифицированный трастузумаб (35 мг, 0,239 мкмоль). Очищенный конъюгат 9 имеет DAR 7,3, как определено гидролизом с последующей ОФ-ВЭЖХ.

Пример 5: Синтез конъюгата ритуксимаба каркаса 6 (конъюгат 10, DAR 6,8)



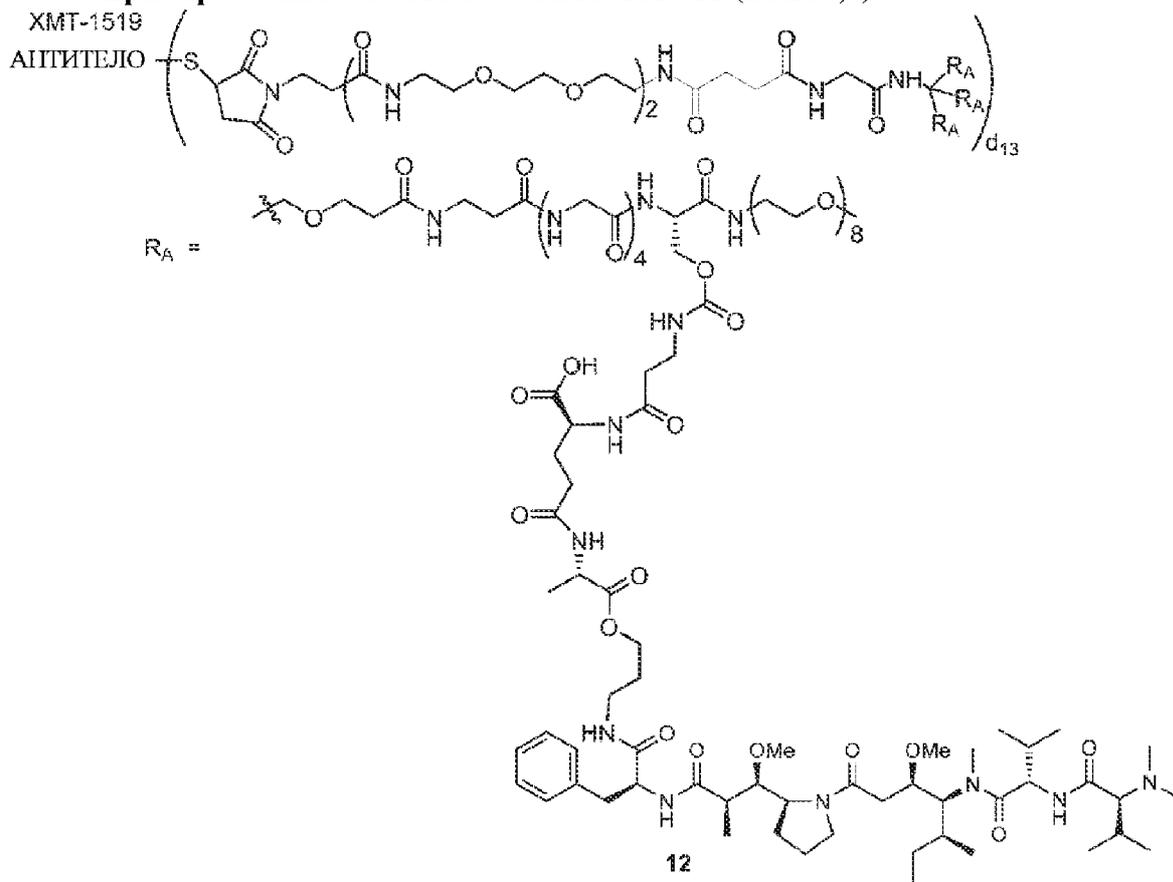
где: \blacksquare представляет собой GlcNAc; \triangle представляет собой Fuc; и \square представляет собой GalNAc.

Конъюгат **10** получают, как описано в примере 2, за исключением того, что на стадии 2 вместо азидо-модифицированного антитела ХМТ-1535 используют азидо-модифицированный ритуксимаб (40 мг, 0,28 мкмоль). Очищенный конъюгат **10** имеет отношение лекарственного средства к DAR 6,8, как определено гидролизом с последующей ОФ-ВЭЖХ.

Пример 6: Синтез конъюгата ХМТ-1535 11 (DAR 6,5)

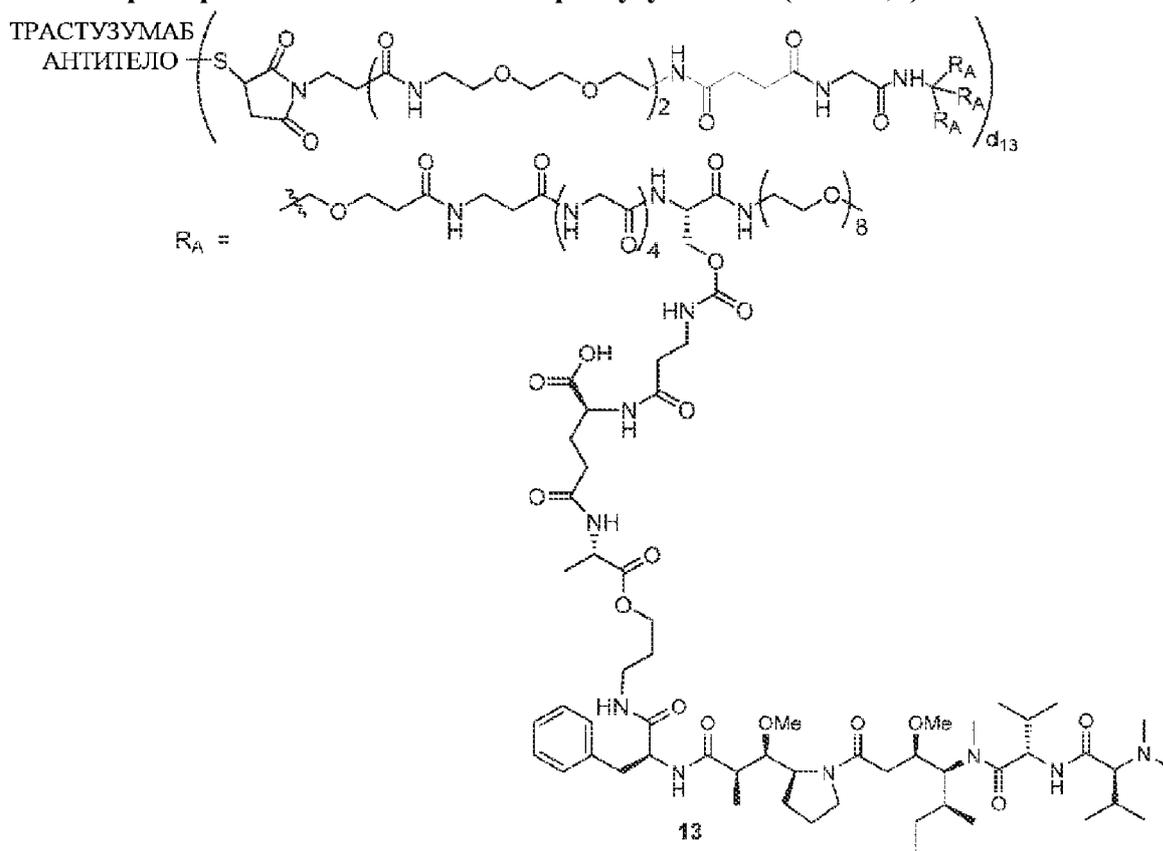
К раствору ХМТ-1535 (200 мг, 1,37 мкмоль) в натрий-ацетатном буфере (25 мМ, рН 5,5, 21,1 мл) при +4°C добавляют ТЕАА (водн., 50 мМ) и ЭДТК (1 мМ, рН 7,0, 18,95 мл). рН полученной смеси доводят до рН 7,0 с NaHCO_3 (водн., 1,0 М) с последующим добавлением ТСЕР (1,37 мг, 4,77 мкмоль) в ТЕАА (водн., 50 мМ) и ЭДТК (1 мМ, рН 7,0). Через 90 минут рН реакционной смеси доводят до рН 6,0 уксусной кислотой (водн., 1,0 М). Добавляют малеимидный каркас каркаса **6** (79,8 мг, 12,3 мкмоль, полученного, как описано в US 15/819,650, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки) в ТЕАА (водн., 50 мМ, 9,5 мл) и ЭДТК (1 мМ, рН 7,0), и полученную смесь перемешивают в течение 2 часов при +4°C. Через 2 часа реакцию гасят добавлением L-цистеина (8,28 мг, 68,3 мкмоль). Неочищенный продукт очищают УФ/ДФ и ХГВ (75,2 мг, выход 38%), получая стохастический конъюгат **11**. Очищенный конъюгат **11** имеет DAR 6,5, по данным гидролиза с последующей ОФ-ВЭЖХ.

Пример 7: Синтез конъюгата XMT-1519 12 (DAR 6,6)



Конъюгат **12** синтезируют, как описано в примере 6, за исключением того, что вместо антитела XMT-1535 используют антитело XMT-1519 (500 мг, 3,47 мкмоль). Очищенный стохастический конъюгат **12** имеет DAR 6,6, по данным гидролиза с последующей ОФ-ВЭЖХ.

Пример 8: Синтез конъюгата трастузумаба **13** (DAR 6,4)



Конъюгат **13** синтезируют, как описано в примере 6, за исключением того, что вместо антитела XMT-1535 используют трастузумаб (40 мг, 0,273 мкмоль) и восстановление проводят при комнатной температуре. Очищенный стохастический конъюгат **13** имеет DAR 6,4, как определено гидролизом с последующей ОФ-ВЭЖХ.

Пример 9: Связывание конъюгатов антитело-лекарственное средство NaPi2b с пептидом NaPi2b с помощью ELISA

Пептид, полученный из NaPi2b человека (QINVTVPSTANCTSPSLCWTDGIQNWTMKN), наносили на поверхность каждой лунки 96-луночного планшета путем инкубации с пептидом (1 мкг/мл в PBS) в течение ночи при +4°C. Затем лунки блокируют инкубацией с BSA (3% в PBS, содержащем 0,1% Tween 20 (PBST)) в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем в каждую лунку добавляют ряд разведений (от 0,017 нМ до 1 мкМ; 3-кратные серийные разведения в 3% BSA в PBS) тестируемых образцов (XMT-1535, конъюгат **7** или конъюгат **11**) и планшет инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре при легком покачивании. Несвязанный тестируемый образец удаляют промыванием PBST (3x). Вторичный анти-человеческий IgG, конъюгированный с HRP (0,16 мкг/мл в PBST), инкубируют в каждой лунке в течение 1 часа. Несвязанное вторичное антитело удаляют промыванием PBST (3x). Субстрат HRP, TMB, добавляют в каждую лунку и инкубируют до появления синей окраски. Реакцию гасят добавлением серной кислоты (0,2 N, 100 мкл). Поглощение при 450 нм измеряют в планшетном ридере (Molecular Devices, Spectramax M5). Значения наносят на график с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Значения

EC₅₀ определяют подбором четырехпараметрической кривой. В таблице I приведены значения связывания (EC₅₀).

Таблица I

Тестируемые образцы	Средние значения связывания NaPi2b EC ₅₀ (нМ)	Стандартное отклонение (нМ)
ХМТ-1535	1,77	Н/Д
Конъюгат 7	1,44	0,55
Конъюгат 11	1,05	0,08

Как показано в таблице I, ХМТ-1535, конъюгат 7 и конъюгат 11 демонстрируют сравнимые значения EC₅₀. Показанные результаты представляют собой средние значения EC₅₀ и стандартные отклонения трех повторных экспериментов для конъюгата 7 и конъюгата 11, а также среднее значение EC₅₀ двух повторных экспериментов для ХМТ-1535.

Пример 9А: Связывание конъюгатов NaPi2b антитело-лекарственное средство с пептидами NaPi2b с помощью ELISA

Связывание конъюгатов NaPi2b антитело-лекарственное средство с пептидами, производными NaPi2b, проводят, как описано в примере 9, за исключением того, что пептиды, производные NaPi2b, получены из человека ([Cys(12,18)]Ac-QINVTVPSTANCTSPSLCWTDGIQNWTMKN-амид), яванского макака ([Cys(12,18)]Ac-QMNVTVPSPMANCTSPSLCWTDGIQIWTMKN-амид), крысы ([Cys(12,18)]Ac-EENVTVPSPDNCTSPSYCWTDGIQTWTIQN-амид) или мыши ([Cys(12,18)]Ac-EMNVTVPSTDNCTSPSYCWTDGIQTWTIQN-амид). В таблице IA приведены значения связывания (EC₅₀).

Таблица IA

Тестируемые образцы	Средние значения связывания NaPi2b EC ₅₀ (нМ)			
	Человек	Яванский макак	Крыса	Мышь
ХМТ-1535	4,43	4,04	4,71	2,77
Соединение 7	3,70	3,83	2,48	1,79
Соединение 11	5,00	4,19	3,72	2,26

Как показано в таблице IA, ХМТ-1535, конъюгат 7 и конъюгат 11 демонстрируют сравнимые значения EC₅₀ для связывания с пептидами NaPi2b человека, яванского макака, крысы и мыши. Показанные результаты представляют собой средние значения EC₅₀ двух повторных экспериментов для каждого тестируемого образца.

Пример 10: Связывание Her2-таргетных конъюгатов антитело-лекарственное

средство с рекомбинантным белком HER2 с помощью ELISA

Рекомбинантный HER2 человека (Acro Biosystems) наносят на поверхность каждой лунки 96-луночного планшета путем инкубации при 1 мкг/мл в PBS в течение ночи при +4°C. Затем лунки блокируют инкубацией с PBST в течение одного часа при комнатной температуре. Диапазон разведений (от $9,54 \times 10^{-5}$ нМ до 100 нМ, 4-кратное серийное разведение в 1% BSA в PBS) тестируемых образцов (ХМТ-1519, конъюгат **8** или конъюгат **12**) затем добавляют в каждую лунку, и планшет инкубируют в течение 1 часа при комнатной температуре при осторожном покачивании. Несвязанные тестируемые образцы удаляют промыванием PBST (3x). Вторичный анти-человеческий IgG, конъюгированный с HRP (0,16 мкг/мл в PBST), инкубируют в каждой лунке в течение 1 часа. Несвязанное вторичное антитело удаляют промыванием PBST (3x). Субстрат HRP, ТМВ, добавляют в каждую лунку и инкубируют до появления синей окраски. Реакцию гасят добавлением серной кислоты (0,2 N, 100 мкл). Поглощение при 450 нм измеряют в планшетном ридере (Molecular Devices, Spectramax M5). Значения наносят на график с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Значения EC₅₀ определяют подбором четырехпараметрической кривой. В таблице II приведены средние значения связывания (EC₅₀).

Таблица II

Тестируемые образцы	Средние значения связывания HER2 EC ₅₀ (нМ)
ХМТ-1519	0,25
Конъюгат 8	0,51
Конъюгат 12	0,47

Как показано в таблице II, ХМТ-1519, конъюгат **8** и конъюгат **12** демонстрируют сравнимые значения EC₅₀. Результаты представляют собой средние значения EC₅₀ для 2 повторных экспериментов для каждого тестируемого образца.

Пример 11: Аффинность связывания конъюгатов антитело-лекарственное средство с пептидом, производным NaPi2b

Кинетику связывания ХМТ-1535, конъюгата **7** и конъюгата **11** с иммобилизованным пептидным антигеном, производным из NaPi2b, определяют с помощью биослойной интерферометрии (BLI; Octet; ForteBio). Константы связывания для ХМТ-1535, конъюгата **7** и конъюгата **11** определяют с использованием стандартных процедур Octet (ForteBio). Биотинилированный пептид, производный из NaPi2b (QINVTVPSTANCTSPSLCWTDGIQNWTKN-биотин; Genscript), иммобилизуют на стрептавидиновых датчиках Octet в кинетическом буфере (10x). Затем датчики блокируют в кинетическом буфере (10x) с бицитином (50 мкг/мл). Затем увеличивающиеся концентрации ХМТ-1535, конъюгата **7** или конъюгата **11** связывают с иммобилизованным пептидом в кинетическом буфере (10x).

В таблице III приведены K_d (равновесная константа диссоциации), k_{on} (скорость

ассоциации) и k_{off} (скорость диссоциации) при 25°C для ХМТ-1535, конъюгата **7** и конъюгата **11** с пептидом, производным из NaPi2b.

Таблица III

Тестируемые образцы	K_d (M)		K_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)		K_{off} (s^{-1})	
	Среднее связывание NaPi2b	Стандартное отклонение	Среднее связывание NaPi2b	Стандартное отклонение	Среднее связывание NaPi2b	Стандартное отклонение
Конъюгат 7	8,28E-11	2,36E-11	2,00E+05	5,84E+04	1,81E-05	9,97E-06
Конъюгат 11	8,13E-11	3,44E-11	1,65E+05	2,49E+04	1,37E-05	7,21E-06
ХМТ-1535	7,29E-11	4,36E-11	1,70E+05	1,50E+04	1,27E-05	8,61E-06

Как показано в таблице III, ХМТ-1535, конъюгат **7** и конъюгат **11** демонстрируют сравнимые значения K_d для их связывания с пептидом, производным из NaPi2b. Показанные результаты представляют собой средние значения и значения стандартного отклонения четырех повторных экспериментов для каждого тестируемого образца.

Пример 12: Аффинность связывания конъюгатов антитело-лекарственное средство с Fc рецепторами

Кинетику связывания ХМТ-1535, конъюгата **7** и конъюгата **11** с Fc рецепторами (FcRn, FcγRI, FcγRIIA (H167) и FcγRIIIA (V176) определяют с помощью биослойной интерферометрии (BLI; ForteBio Octet QKe) при 25°C. Для тестирования связывания с Fcγ рецепторами, ХМТ-1535, конъюгат **7** и конъюгат **11** разводят до 1 мкг/мл в кинетическом буфере (1x) и улавливают биосенсорами анти-человеческого Fab-CH1 (FAB2G) в течение 10 минут. Все разведения и исходные измерения проводят в кинетическом буфере (1x). Исходные измерения проводят через 61 минуту до и после каждой стадии захвата. Измерения ассоциации с различными Fc рецепторами выполняют при 7 концентрациях (от 1 мкМ до 100 нМ, 2-кратные серийные разведения) в течение 5 минут. Диссоциацию проводят в течение 15 минут. Константы связывания рассчитывают с помощью глобальных средних значений следов с использованием модели 1:1. Константы связывания ХМТ-1535, конъюгата **7** и конъюгата **11** с Fc рецепторами определяют с использованием стандартных процедуры Octet (ForteBio). Кинетические параметры рассчитывают с помощью программного обеспечения Octet (ForteBio).

Для тестирования связывания с FcRn рецептором, ассоциацию ХМТ-1535, конъюгата **7** и конъюгата **11** с биосенсорами Fab-CH1 (FAB2G) проводят, как описано выше. После ассоциации, датчики промывают в течение 5 минут буфером для связывания

FcRn (Boston Bioproducts; разведенный до 100 мМ NaH₂PO₄, 0,05% Tween 20, pH 6,0). Стадии ассоциации и диссоциации проводят в буфере для связывания FcRn. Измерения ассоциации с белком FcRn (Immunitrack) измеряют при 7 концентрациях (от 1 мкМ до 100 нМ, 2-кратные серийные разведения) в течение 5 минут. Диссоциацию проводят в течение 15 минут. Константы связывания рассчитывают с глобальными средними значениями следов с использованием модели 1:1.

В таблицах IV-VII приведены значения K_d (равновесная константа диссоциации), k_{on} (скорость ассоциации) и k_{off} (скорость диссоциации) для FcRn человека (таблица IV), FcγRI (таблица V), FcγRIIA H167 (таблица VI) и FcγRIIA V167 (таблица VII) для каждого тестируемого образца.

Таблица IV

Тестируемые образцы	K_d (М)		K_{on} (М ⁻¹ с ⁻¹)		K_{off} (с ⁻¹)	
	Среднее	Стандартное отклонение	Среднее	Стандартное отклонение	Среднее	Стандартное отклонение
Конъюгат 7	5,88E-09	2,64E-09	8,61E+04	2,49E+04	4,81E-04	1,81E-04
Конъюгат 11	4,96E-09	2,65E-09	1,26E+05	7,13E+04	5,50E-04	2,40E-04
ХМТ-1535	2,76E-09	Н/Д	1,60E+05	Н/Д	4,48E-04	Н/Д

Как показано в таблице IV, ХМТ-1535, конъюгат **7** и конъюгат **11** демонстрируют сравнимые значения K_d FcRn. Показанные результаты представляют собой средние значения и значения стандартного отклонения пяти повторных экспериментов для конъюгата **7** и конъюгата **11**, и средние значения двух повторных экспериментов для антитела ХМТ-1535.

Таблица V

Тестируемые образцы	K_d (М)		K_{on} (М ⁻¹ с ⁻¹)		K_{off} (с ⁻¹)	
	Среднее	Стандартное отклонение	Среднее	Стандартное отклонение	Среднее	Стандартное отклонение
Конъюгат 7	3,05E-09	3,00E-09	1,13E+06	1,44E+05	3,73E-03	4,06E-03
Конъюгат 11	1,66E-10	Н/Д	1,26E+06	Н/Д	2,09E-04	Н/Д

ХМТ-1535	1,50E-10	4,09E-11	1,28E+06	5,33E+05	1,92E-04	8,49E-05
----------	----------	----------	----------	----------	----------	----------

Как показано в таблице V, конъюгат **7** демонстрирует большее значение K_d FcγRI и более высокое значение k_{off} по сравнению с конъюгатом **11** и ХМТ-1535. Показанные результаты представляют собой средние значения и значения стандартного отклонения трех повторных экспериментов для конъюгата **7** и ХМТ-1535, и средние значения аффинности для двух повторных экспериментов для конъюгата **11**.

Таблица VI

Тестируемые образцы	K_d (M)		K_{on} (M ⁻¹ c ⁻¹)		K_{off} (c ⁻¹)	
	Среднее	Стандартное отклонение	Среднее	Стандартное отклонение	Среднее	Стандартное отклонение
Конъюгат 7	Нет связывания	Н/Д	Нет связывания	Н/Д	Нет связывания	Н/Д
Конъюгат 11	1,25E-06	Н/Д	2,73E+05	Н/Д	3,45E-01	Н/Д
ХМТ-1535	1,74E-06	2,74E-07	1,75E+05	2,72E+04	3,08E-01	9,91E-02

Как показано в Таблице VI, конъюгат **7** не связывается с FcγRIIA, тогда как конъюгат **11** и ХМТ-1535 имеют аналогичную K_d для связывания с FcγRIIA. Показанные результаты представляют собой средние значения и значения стандартного отклонения трех повторных экспериментов для конъюгата **7** и ХМТ-1535 и средние значения двух повторных экспериментов для конъюгата **11**.

Таблица VII

Тестируемые образцы	K_d (M)		K_{on} (M ⁻¹ c ⁻¹)		K_{off} (c ⁻¹)	
	Среднее	Стандартное отклонение	Среднее	Стандартное отклонение	Среднее	Стандартное отклонение
Конъюгат 7	Нет связывания	Н/Д	Нет связывания	Н/Д	Нет связывания	Н/Д
Конъюгат	2,70E-07	Н/Д	2,70E+05	Н/Д	6,71E-02	Н/Д

11						
ХМТ-1535	6,41E-07	Н/Д	2,16E+05	Н/Д	1,46E-01	Н/Д

Как показано в Таблице VII, конъюгат **7** не связывается с FcγRIIIA, тогда как конъюгат **11** и ХМТ-1535 имеют аналогичную K_d для связывания с FcγRIIIA. Показанные результаты представляют собой средние значения двух повторных экспериментов для каждого тестового изделия.

Пример 13: Анализ клеточного связывания конъюгатов NaPi2b антитело-лекарственное средство

Связывание ХМТ-1535, конъюгата **7** и конъюгата **11** на клеточной поверхности с культивируемыми клетками карциномы яичника человека OVCAR3 оценивают с использованием проточного цитометра MACSQuant (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Клетки OVCAR3, выращенные в среде RPMI-1640 (ATCC) с FBS (20%, ATCC) и 1% пенициллином/стрептомицином (1%), отделяют обработкой раствором для открепления клеток Accutase (Innovative Cell Technologies). Отделенные клетки растирают в среде и высевают в 96-луночные планшеты с U-образным дном при плотности 50000 клеток в среде (75 мкл). Клетки инкубируют на льду в течение 3 часов в диапазоне концентраций (от 1 мкМ до 0,5 нМ; 3-кратные серийные разведения) тестируемых образцов (ХМТ-1535, конъюгат **7** или конъюгат **11**) в общем объеме 100 мкл RPMI-1640 с 6% сывороткой козы. Клетки промывают ледяным PBS (3x), осаждают при 1000 x RCF между каждой стадией промывки и ресуспендируют в RPMI-1640 с 2% сывороткой козы (100 мкл) и вторичным флуоресцентно меченым Alexa Fluor® 647 анти-человеческим антителом IgG козы (5 мкг/мл, Life Technologies) в течение 1 часа на льду. Клетки промывают ледяным PBS (3x) и ресуспендируют в ледяном PBS с 1% параформальдегидом (100 мкл). Флуоресценцию на клетку определяют путем анализа 5000 клеток для каждой обработки на проточном цитометре. Среднее значение флуоресценции для каждой обработки наносят на график, и значения EC_{50} рассчитывают с помощью программного обеспечения Graphpad Prism путем подгонки четырехпараметрической кривой.

В таблице VIII суммированы значения EC_{50} для ХМТ-1535, конъюгата **7** и конъюгата **11** для связывания с NaPi2b на клеточной поверхности клеток OVCAR3.

Таблица VIII

Тестируемый образец	Средние значения связывания OVCAR3
	EC_{50} (нМ)
ХМТ-1535	11,20
Конъюгат 7	8,15
Конъюгат 11	6,56

Как показано в таблице VIII, ХМТ-1535, конъюгат **7** и конъюгат **11** демонстрируют

сравнимые значения EC_{50} . Результаты представляют собой средние значения для двух повторных экспериментов для каждого тестируемого образца.

Пример 14: Анализ клеточного связывания конъюгатов HER2 антитело-лекарственное средство

Связывание конъюгатов антитело-лекарственное средство с клетками JIMT-1 на клеточной поверхности оценивают с использованием проточного цитометра MACSQuant (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Клетки JIMT-1, выращенные в среде DMEM (ATCC) с FBS (10%, ATCC), отделяют обработкой раствором для открепления клеток Accutase (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA). Открепленные клетки растирают в среде и высевают в 96-луночные планшеты с U-образным дном при плотности 50000 клеток в 75 мкл среды. Клетки инкубируют на льду в течение 3 часов в диапазоне концентраций (от 1 мкМ до 0,5 нМ; 3-кратные серийные разведения) тестируемого образца (ХМТ-1519, конъюгат **8**, конъюгат **9**, конъюгат **12** или конъюгат **13**) в DMEM с 6% сывороткой козы (100 мкл). Клетки трижды промывают ледяным PBS, осаждают при 1000 x RCF между каждой стадией промывки и ресуспендируют в DMEM с 2% сывороткой козы (100 мкл) и вторичным флуоресцентно меченым Alexa Fluor® 647 античеловеческим антителом IgG козы (5 мкг/мл, Life Technologies) в течение 1 часа на льду. Клетки промывают ледяным PBS (3x) и ресуспендируют в ледяном PBS с 1% параформальдегидом (100 мкл). Количество флуоресценции на клетку определяют путем анализа 5000 клеток для каждой обработки на проточном цитометре. Среднее значение флуоресценции для каждой обработки наносят на график, и значения EC_{50} рассчитывают с помощью программного обеспечения Graphpad Prism путем подгонки четырехпараметрической кривой.

В таблице IX суммированы значения EC_{50} конъюгатов антитело-лекарственное средство и антитела ХМТ-1519 для связывания с HER2 на клеточной поверхности клеток JIMT-1.

Таблица IX

Тестируемый образец	Средние значения связывания JIMT-1 EC_{50} (нМ)
ХМТ-1519	0,71
Конъюгат 8	0,77
Конъюгат 9	0,11
Конъюгат 12	0,59
Конъюгат 13	0,14

Как показано в таблице IX, ХМТ-1519, конъюгат **8**, конъюгат **9**, конъюгат **12** и конъюгат **13** показывают значения EC_{50} в узком диапазоне. Показанные результаты представляют собой средние значения двух повторных экспериментов для ХМТ-1519, конъюгата **8** и конъюгата **12**, и значения EC_{50} из одного эксперимента для конъюгата **9** и конъюгата **13**.

Пример 15: Анализ цитотоксичности конъюгатов NaPi2b-антитело-лекарственное средство

Конъюгат **7** и конъюгат **11** оценивают на их антипролиферативные свойства в линии опухолевых клеток OVCAR3 *in vitro* с использованием CellTiter-Glo® (Promega Corp). Клетки высевают при плотности 5000 клеток на лунку в белостенные (объемные) 96-луночные планшеты и оставляют для прилипания в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере 5% CO₂. Клетки инкубируют с возрастающими концентрациями тестируемых образцов (Конъюгат **7** или Конъюгат **11** или контрольный Конъюгат **10**). Через три дня в лунки добавляют реагент CellTiter-Glo® при комнатной температуре. Люминесцентный сигнал измеряют через 10 минут с помощью планшетного ридера SpectraMax M5 (Molecular Devices). Кривые доза-реакция строят с использованием программного обеспечения Graphpad Prism. Значения EC₅₀ определяют из подбора четырехпараметрической кривой. В таблице X суммированы значения EC₅₀ для конъюгата **7**, конъюгата **11** и контрольного конъюгата **10** через шесть дней обработки.

Таблица X

Тестируемый образец	Среднее EC ₅₀ (нМ)
Конъюгат 7	0,39
Конъюгат 11	0,53
Конъюгат 10	120,24

Как показано в таблице X, конъюгат **7** и конъюгат **11** продемонстрировали сравнимую эффективность, тогда как контрольный конъюгат антитело-лекарственное средство, конъюгат **10** был в 200 раз менее активен, чем конъюгат **7** и конъюгат **11**. Показанные результаты представляют собой средние значения для двух повторных экспериментов для каждого тестируемого образца.

Пример 16: Анализ жизнеспособности клеток для конъюгатов HER2-антитело-лекарственное средство

Конъюгат **8**, конъюгат **10** и конъюгат **12** оценивают на предмет их антипролиферативных свойств в опухолевых клеточных линиях JMT-1, и конъюгат **9** и конъюгат **13** оценивают на их антипролиферативные свойства в опухолевых клеточных линиях JMT-1 и SKBR3 *in vitro* с использованием CellTiter-Glo® (Promega Corp). Клетки высевают при плотности 5000 клеток на лунку в белостенные (объемные) 96-луночные планшеты и оставляют для прилипания в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере 5% CO₂. Клетки инкубируют с увеличивающимися концентрациями тестируемых образцов (Конъюгат **8**, Конъюгат **9**, Конъюгат **10**, Конъюгат **12** или Конъюгат **13**). Через 3 дня для конъюгата **9** и конъюгата **13** или через 6 дней для конъюгата **8**, конъюгата **12** и контрольного конъюгата антитело-лекарственное средство, конъюгата **10**, в лунки добавляют реагент CellTiter-Glo® при комнатной температуре. Люминесцентный сигнал измеряют через 10 минут с помощью планшетного ридера SpectraMax M5 (Molecular

Devices). Кривые доза-ответ строят с использованием программного обеспечения Graphpad Prism. Значения EC_{50} определяют из подбора четырехпараметрической кривой.

В таблице XI приведены значения EC_{50} для конъюгата **8**, конъюгата **12** и контрольного конъюгата антитело-лекарственное средство, конъюгата **10**, через 6 дней обработки.

Таблица XI

Тестируемые образцы	ЖИМТ-1 EC_{50} (нМ)	Стандартное отклонение
Конъюгат 8	3,18	1,08
Конъюгат 12	4,12	1,27
Конъюгат 10	128,75	90,56

Как показано в таблице XI, конъюгат **8** и конъюгат **12** продемонстрировали сравнимую активность. Как конъюгат **8**, так и конъюгат **12** более чем в 25 раз более эффективные, чем контрольный конъюгат антитело-лекарственное средство, конъюгат **10**. Результаты представляют собой среднее значение трех повторных экспериментов для каждого тестируемого образца.

В таблице XII суммированы значения EC_{50} для конъюгата **9** и конъюгата **13** через 3 дня обработки.

Таблица XII

Тестируемые образцы	ЖИМТ-1 EC_{50} (нМ)	SKBR3 EC_{50} (нМ)
Конъюгат 9	0,72	0,088
Конъюгат 13	0,98	0,088

Как показано в Таблице XII, конъюгат **9** и конъюгат **13** продемонстрировали сравнимую активность как в клеточных линиях ЖИМТ-1, так и в SKBR3. Результаты представляют собой значения одного эксперимента для каждого тестируемого образца.

Пример 17: Воздействие на плазму мышей после введения конъюгатов NaPi2b антитело-лекарственное средство

Самкам бестимусных голых мышей подкожно инокулируют клетки OVCAR3 (n=4 для каждой группы). Конъюгат **7**, Конъюгат **11** или носитель вводят внутривенно в виде однократной дозы в 1 день (средний размер опухоли 174-176 мм³ на группу; диапазон 126-257 мм³) в дозе 0,05 мг/кг на полезную нагрузку. Плазму собирают через 10 минут, 24 часа, 96 часов, 168 часов, 336 часов и 504 часа после введения дозы. Концентрации конъюгированного АФ-НРА в плазме определяют анализом ЖХ-МС/МС, как указано в Таблице XIII.

Таблица XIII

Тестируемые образцы	C_{max} (нг/мл)	$T_{1/2}$ (день)	AUC_{inf} (день·нг/мл)	Cl_{obs} (мл/день/кг)	Vol_{ss} (мл/кг)
---------------------	-------------------	------------------	-----------------------------	----------------------------	-----------------------

Конъюгат 7	1020	5,00	4150	12,0	79,4
Конъюгат 11	1100	5,84	3680	13,6	106

Как показано в таблице XIII, конъюгат **7** показал более высокую AUC и более короткое $t_{1/2}$, а также более низкие Cl_{obs} и Vol_{ss} (объем распределения) конъюгированного АФ-НРА по сравнению с конъюгатом **11**. Значения C_{max} и $t_{1/2}$ почти эквивалентны для конъюгата **7** и конъюгата **11**.

Пример 18. Распределение в ткани у мышей после введения конъюгатов NaPi2b антитело-лекарственное средство.

Самкам бестимусных голых мышей подкожно инокулируют клетки OVCAR3. Тридцати семи мышам с опухолями (средний объем опухоли 418,5 мм³, диапазон 204-698 мм³) вводят однократную дозу конъюгата **7** в количестве 0,05 мг/кг полезной нагрузки. Плазму, опухолевую ткань, селезенку, легкие, печень и почки собирают через 1, 24, 48, 72, 96, 168, 336, 504 (четыре мыши в группе) и 672 часа (пять мышей). Кроме того, четырем мышам с опухолями (средний объем опухоли 653,7 мм³, диапазон 589-687 мм³) вводят контрольный носитель и собирают через 1 час. Ткани гомогенизируют, и затем определяют концентрации общего лекарственного средства, свободного АФ-НРА и концентрации свободного АФ с помощью анализа ЖХ-МС/МС; концентрацию конъюгированного лекарственного средства рассчитывают по формуле: [Общее лекарственное средство - (свободный АФ-НРА+свободный АФ)]. Результаты распределения в тканях суммированы в Таблице XIV.

Таблица XIV

Ткань	Конъюгированное лекарственное средство		Всего лекарственного средства		Свободный АФ-НРА		Свободный АФ	
	C_{max} (нг/г)	AUC _{last} (час*нг/г)	C_{max} (нг/г)	AUC _{last} (час*нг/г)	C_{max} (нг/г)	AUC _{last} (час*нг/г)	C_{max} (нг/г)	AUC _{last} (час*нг/г)
Почка	43,3	2120	43,3	2750	НР	НР	0,564	47,3
Печень	31,7	1740	24,4	1640	НР	НР	1,57	386
Легкое	30,5	3340	30,5	3880	НР	НР	1,02	264
Селезенка	47,5	3580	49,0	4940	0,512	0,256	3,45	893
Опухоль	187	39000	300	81600	21,2	5220	119	34300
Плазма	831	85700	831	85700	НПО	НР	0,501	126

НР=не поддается расчету. НПО=ниже предела количественного определения.

Пример 19. Воздействие плазмы на крысу после введения конъюгатов NaPi2b антитело-лекарственное средство.

Самкам крыс Sprague-Dawley инокулируют в/в болюс в хвостовую вену с конъюгатом **7** или конъюгатом **11** в дозе 0,34 мг/кг полезной нагрузки (n=4 для каждой группы). Плазму собирают через 10 минут, 24 часа, 96 часов, 168 часов, 336 часов и 504 часа после введения дозы. Концентрации конъюгированного AF-НРА в плазме определяют анализом ЖХ-МС/МС, как показано в Таблице XV.

Таблица XV

Тестируемые образцы	C_{max} (нг/мл)	$t_{1/2}$ (день)	AUC_{inf} (день·нг/мл)	Cl_{obs} (мл/день/кг)	Vol_{ss} (мл/кг)
Конъюгат 7	6830	3,34	17600	19,3	88,4
Конъюгат 11	7950	5,29	15600	21,8	125

Как показано в Таблице XV, конъюгат **7** показал более высокую AUC_{inf} , более низкую C_{max} , более короткий $t_{1/2}$, более низкую Cl_{obs} и более низкий Vol_{ss} конъюгированного AF-НРА по сравнению с конъюгатом **11**.

Пример 20: Воздействие плазмы на яванских макак после введения конъюгатов NaPi2b антитело-лекарственное средство

Самкам яванских макаков внутривенно вводят конъюгат **7** или конъюгат **11** в дозе 1 мг/кг антитела посредством внутривенной инфузии в течение 30 минут (n=2 для каждой группы). Плазму собирают через 1 час, 8 часов, 24 часа, 48 часов, 96 часов, 168 часов, 240 часов, 288 часов, 336 часов, 456 часов и 504 часа после введения дозы. Концентрации конъюгированного AF-НРА в плазме определяют анализом ЖХ-МС/МС, как показано в Таблице XVI.

Таблица XVI

Тестируемые образцы	C_{max} (нг/мл)	$t_{1/2}$ (день)	AUC_{inf} (день·нг/мл)	Cl_{obs} (мл/день/кг)	Vol_{ss} (мл/кг)
Конъюгат 7	804	6,73	4370	7,63	68,1
Конъюгат 11	758	4,83	2140	16,8	105

Как показано в таблице XVI, конъюгат **7** имеет более длительное $t_{1/2}$, большую AUC_{inf} и более низкие Cl_{obs} и Vol_{ss} конъюгированного AF-НРА по сравнению с конъюгатом **11**. Значения C_{max} почти эквивалентны для двух конъюгатов.

Пример 21: Воздействие плазмы на яванских макаков после введения конъюгатов NaPi2b антитело-лекарственное средство

Яванским макакам (n=3 самца; n=3 самки) внутривенно вводят конъюгат **7** в дозах 1,86, 3,72 или 5,60 мг/кг антитела посредством внутривенной инфузии в течение 45 минут. Плазму собирают до введения дозы и через 1 час, 6 часов, 24 часа, 96 часов, 168 часов, 240 часов, 336 часов и 504 часа после введения дозы. Концентрации конъюгированных AF-НРА в плазме определяют анализом ЖХ-МС/МС, как показано в Таблице XVII.

Таблица XVII

Конъюгат 7 мг/кг (mAb)	Клиренс мл/день/кг	$t_{1/2}$ (день)	AUC_{inf} (день·нг/мл)
1,86	8,2	6,5	7417
3,72	9,6	5,875	12708
5,60	10,8	3,48	16917

В таблице XVII приведены клиренс, период полувыведения и AUC_{inf} для конъюгата 7.

Пример 22. Ответ роста опухоли на введение конъюгатов NaPi2b антитело-лекарственное средство в OVCAR3.

Самкам бестимусных голых мышей подкожно инокулируют клетки OVCAR3 (n=8 для каждой группы). Конъюгат 7, конъюгат 11, контрольный конъюгат 10 или носитель вводят внутривенно однократно в день 1 (средний размер опухоли 167-168 мм³ на группу; диапазон 85-297 мм³). Размер опухоли измеряют в моменты времени, указанные на ФИГ. 7 с помощью цифровых штангенциркулей. Объем опухоли рассчитывают и используют для определения задержки роста опухоли. Мышей умерщвляют, когда опухоли достигают размера ≥ 1500 мм³. Объемы опухолей представлены как среднее значение \pm СОС для каждой группы.

На ФИГ. 7 представлены результаты ответа опухоли у мышей, которым подкожно инокулируют клетки OVCAR3 (n=8 для каждой группы) после в/в введения в виде однократной дозы в 1 день конъюгата 7, конъюгата 11 или контрольного конъюгата 10 в дозе 0,025 мг/кг, 0,05 мг/кг или 0,1 мг/кг полезной нагрузки, или носителя.

Все Тестируемые образцы, за исключением конъюгата 10, приводят к ингибированию роста опухоли (TGI) 60% или выше на 33 день. Обработка конъюгатом 10 приводила к TGI 43%. Обработка конъюгатом 7 в дозах 0,1 мг/кг и 0,05 мг/кг и конъюгатом 11 в дозе 0,1 мг/кг продемонстрировала наиболее выраженную эффективность, в результате чего средний объем опухоли в группе составил менее 100 мм³, а большинство опухолей регрессировали на 33 день. Лечение конъюгатом 7 в дозе 0,1 мг/кг показало наибольшую эффективность против опухолей OVCAR3, о чем свидетельствует пролонгированное ингибирование роста опухоли до 102 дня, последнего дня исследования, включая 3 опухоли, достигшие полной регрессии. Во всех других группах наблюдается повторный рост опухоли по ходу исследования.

Пример 23. Ответ роста опухоли на введение конъюгатов NaPi2b антитело-лекарственное средство в CTG-0852

Бестимусным мышам подкожно инокулируют клетки аденокарциномы легкого CTG-0852 (n=8 для каждой группы). Конъюгат 7 (в дозе 0,025 мг/кг, 0,05 мг/кг или 0,1 мг/кг полезной нагрузки), контрольный конъюгат 10 (в дозе 0,05 мг/кг или 0,1 мг/кг полезной нагрузки) или носитель вводят внутривенно однократно в 1 день (средний размер опухоли 150-300 мм³ на группу; диапазон 85-297 мм³). Объем опухоли

рассчитывают и используют для определения задержки роста опухоли. Мышей умерщвляют, когда опухоли достигают размера $\geq 1500 \text{ мм}^3$. На ФИГ. 8 показано, что объемы опухолей представлены как среднее значение \pm СОС для каждой группы.

На ФИГ. 8 представлены результаты ответа опухоли у мышей, которым подкожно инокулируют клетки аденокарциномы легкого СТG-0852 ($n=8$ для каждой группы) после внутривенного введения в виде однократной дозы в 1 день конъюгата **7** (в дозе 0,025 мг/кг, 0,05 мг/кг или 0,1 мг/кг полезной нагрузки), контрольного конъюгата **10** (в дозе 0,05 мг/кг или 0,1 мг/кг полезной нагрузки) или носителя.

Конъюгат **7** демонстрирует зависимое от дозы и мишени ингибирование роста опухоли (TGI) при всех уровнях доз (ФИГ. 8). В дозе 0,1 мг/кг полезной нагрузки, конъюгат **7** показывает TGI 118% и вызывает устойчивую регрессию опухоли до 49 дня, после чего средний объем опухоли медленно увеличивается. При полезной нагрузке 0,05 мг/кг, конъюгат **7** показывает TGI 102% и вызывает регрессию опухоли до 28 дня, после чего средний объем опухоли увеличивается. Конъюгат **7** вызывает ингибирование роста опухоли при полезной нагрузке 0,025 мг/кг (TGI=77%). Обработка конъюгатом **10** приводит к TGI 28% при дозе 0,1 мг/кг полезной нагрузки и 51% при дозе 0,05 мг/кг полезной нагрузки.

Пример 24. Ответ роста опухоли на введение конъюгатов HER2 антитело-лекарственное средство

Самкам мышей СВ.17 SCID подкожно инокулируют клетки JIMT-1. Конъюгат **8**, конъюгат **9**, конъюгат **12**, конъюгат **13**, конъюгат **10** или носитель вводят внутривенно однократно в день 1 (объем опухоли=150-200 мм^3). Размер опухоли измеряют в моменты времени, указанные на ФИГ. 9 и 10 с помощью цифровых штангенциркулей. Объем опухоли рассчитывают и используют для определения задержки роста опухоли. Мышей умерщвляют, когда опухоли достигают размера $\geq 1000 \text{ мм}^3$. Объемы опухолей представлены как среднее значение \pm СОС для каждой группы.

На ФИГ. 9 представлены результаты ответа опухоли у мышей с опухолями JIMT-1, которым вводят конъюгат **9** или конъюгат **13** ($n=10$ для каждой группы). Все мыши, получающие конъюгат **9** и конъюгат **13**, демонстрируют пролонгированное ингибирование роста опухоли и отсутствие повторного роста опухоли при использовании обоих конъюгатов антитело-лекарственное средство в обеих тестируемых дозах (0,067 мг/кг и 0,199 мг/кг полезной нагрузки).

На ФИГ. 10 представлены результаты ответа опухоли у мышей, которым подкожно инокулируют клетки JIMT-1 ($n=8$ для каждой группы) после внутривенного введения в виде разовой дозы в 1 день носителя или конъюгата **8**, конъюгата **12** или контрольного конъюгата **10** ($n=8$ для каждой группы) в дозе 0,017 мг/кг, 0,033 мг/кг или 0,067 мг/кг полезной нагрузки. Лечение конъюгатом **8** в дозе 0,033 мг/кг и 0,067 мг/кг и конъюгатом **12** в дозе 0,067 мг/кг демонстрирует наиболее выраженную эффективность, в результате чего средний объем опухоли в группе составляет менее 50 мм^3 , и большинство опухолей регрессируют к 19 дню. Обработка конъюгатом **8** в дозе 0,067 мг/кг показывает

наибольшую эффективность против JIMT-1, о чем свидетельствует пролонгированное ингибирование роста опухоли до 109 дня, последнего дня исследования, поскольку регрессия показана для всех опухолей. Во всех других группах наблюдается повторный рост опухоли по ходу исследования.

Пример 25: Оценка токсичности конъюгатов антитело-лекарственное средство у крыс

Токсичность конъюгатов антитело-лекарственное средство оценивают в исследовании на крысах. Конъюгат анти-NaPi2b антитело-лекарственное средство (Конъюгат **7** или Конъюгат **11**) или конъюгат анти-HER2 антитело-лекарственное средство (Конъюгат **8** или Конъюгат **12**) в дозе 0,17 мг/кг, 0,34 мг/кг или 0,51 мг/кг, в зависимости от полезной нагрузки, или носитель вводят в хвостовые вены самок крыс Sprague-Dawley (n=5 для каждой группы). Через восемь дней после введения у каждого животного собирают кровь для гематологического и токсикологического анализа.

На ФИГ. 11-18 показано повышение ключевых токсикологических параметров в ответ на воздействие конъюгата **7** или конъюгата **11**, основанное на результатах, рассчитанных на основе исследования, описанного в примере 18. Конъюгат **7** показал более низкое, зависящее от воздействия повышение ключевых токсикологических параметров AST, ALT, ALP, WBC, лейкоцитов, нейтрофилов, лимфоцитов, токсикологических параметров эритроцитов и гемоглобина относительно конъюгата **11**.

На ФИГ. 19-21 показано повышение ключевых токсикологических параметров в ответ на воздействие конъюгата **8** или конъюгата **12** на основе результатов, рассчитанных на основе исследования, описанного в примере 18. Конъюгат **8** показал более низкое, зависящее от воздействия повышение ключевых токсикологических параметров AST, ALT и ALP, относительно конъюгата **12**.

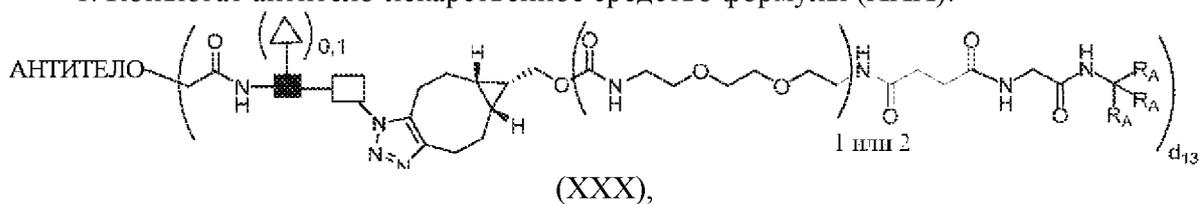
ЭКВИВАЛЕНТЫ

Детали одного или нескольких вариантов осуществления изобретения изложены в сопроводительном описании выше. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, что описаны в настоящем документе, могут быть использованы при практическом применении или тестировании настоящего изобретения, теперь описаны способы и материалы. Другие признаки, объекты и преимущества изобретения будут очевидны из описания и формулы изобретения. В описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не диктует иное. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится данное описание. Все патенты и публикации, цитируемые в этом описании, включены посредством ссылки.

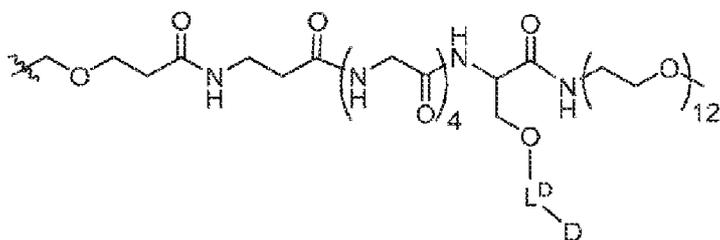
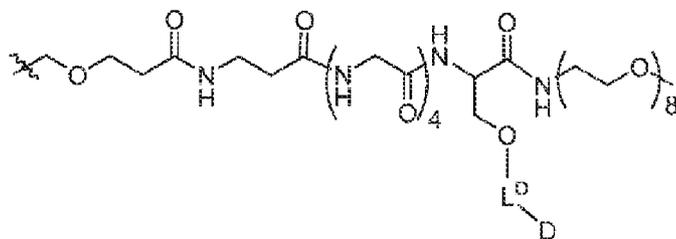
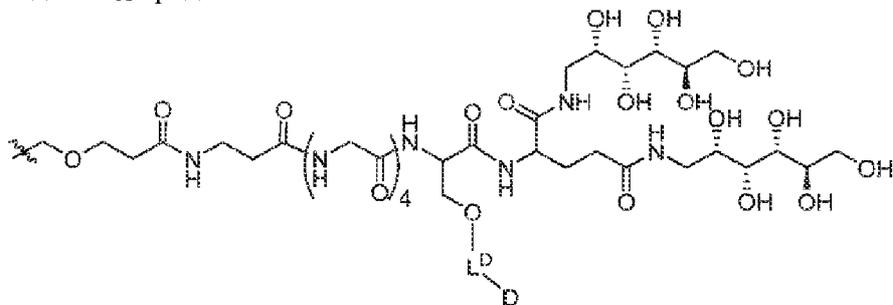
Предшествующее описание было представлено только в целях иллюстрации и не предназначено для ограничения изобретения точной раскрытой формой, но ограничивается прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

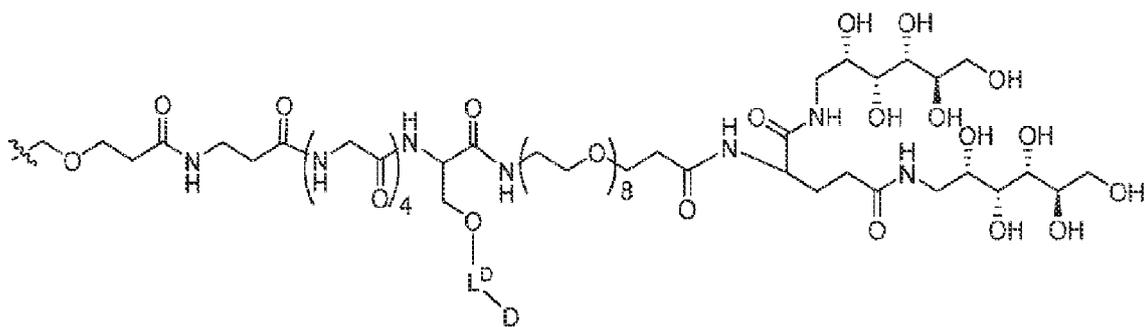
1. Конъюгат антитело-лекарственное средство формулы (XXX):



где каждый R_A представляет собой

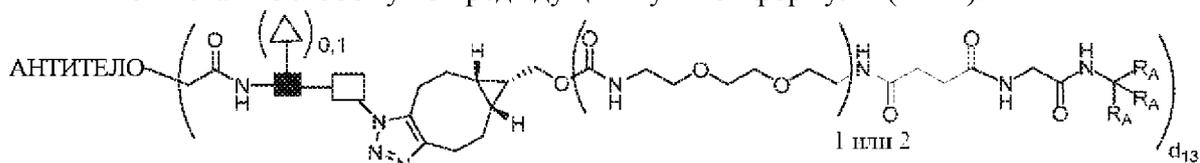


или

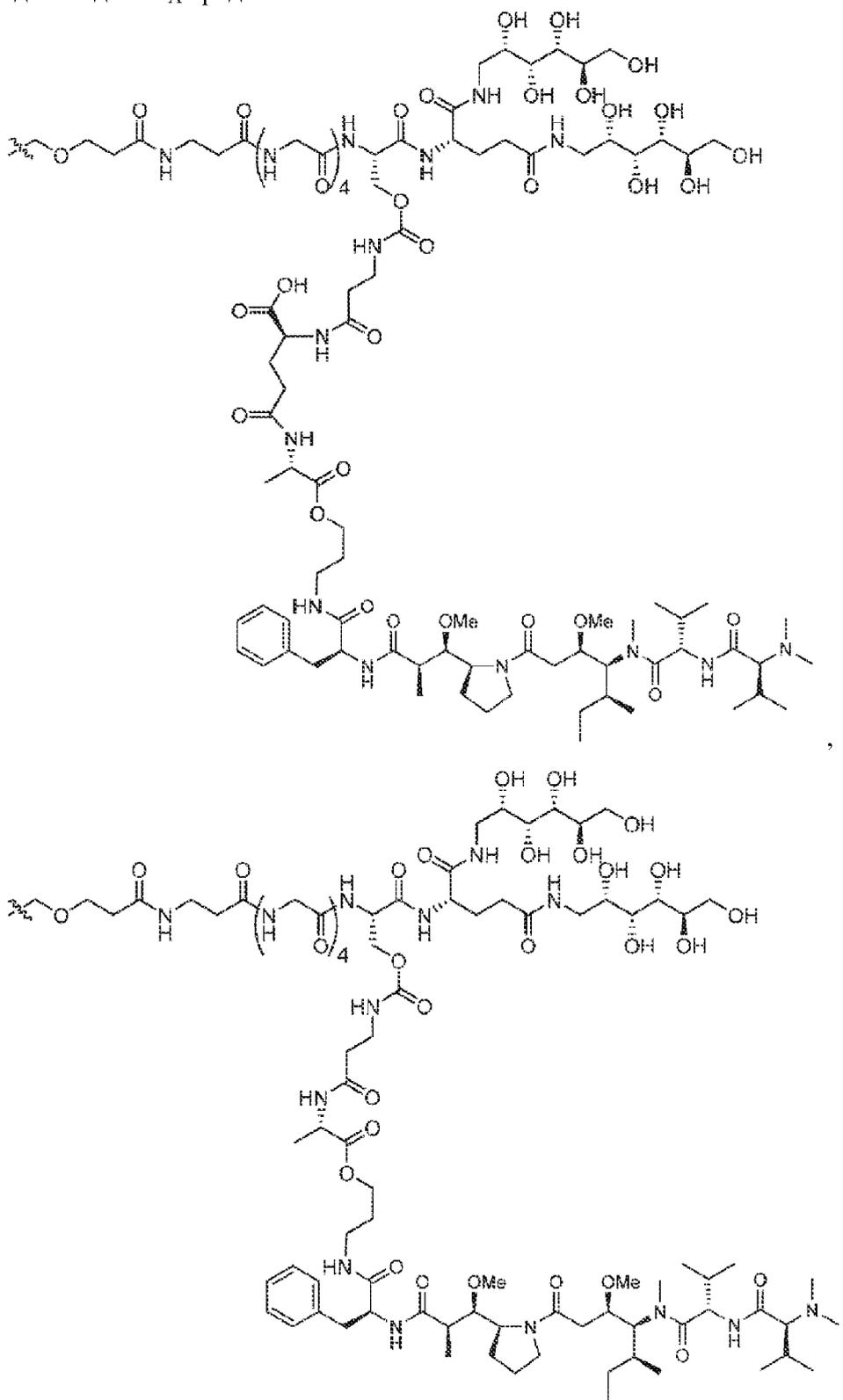


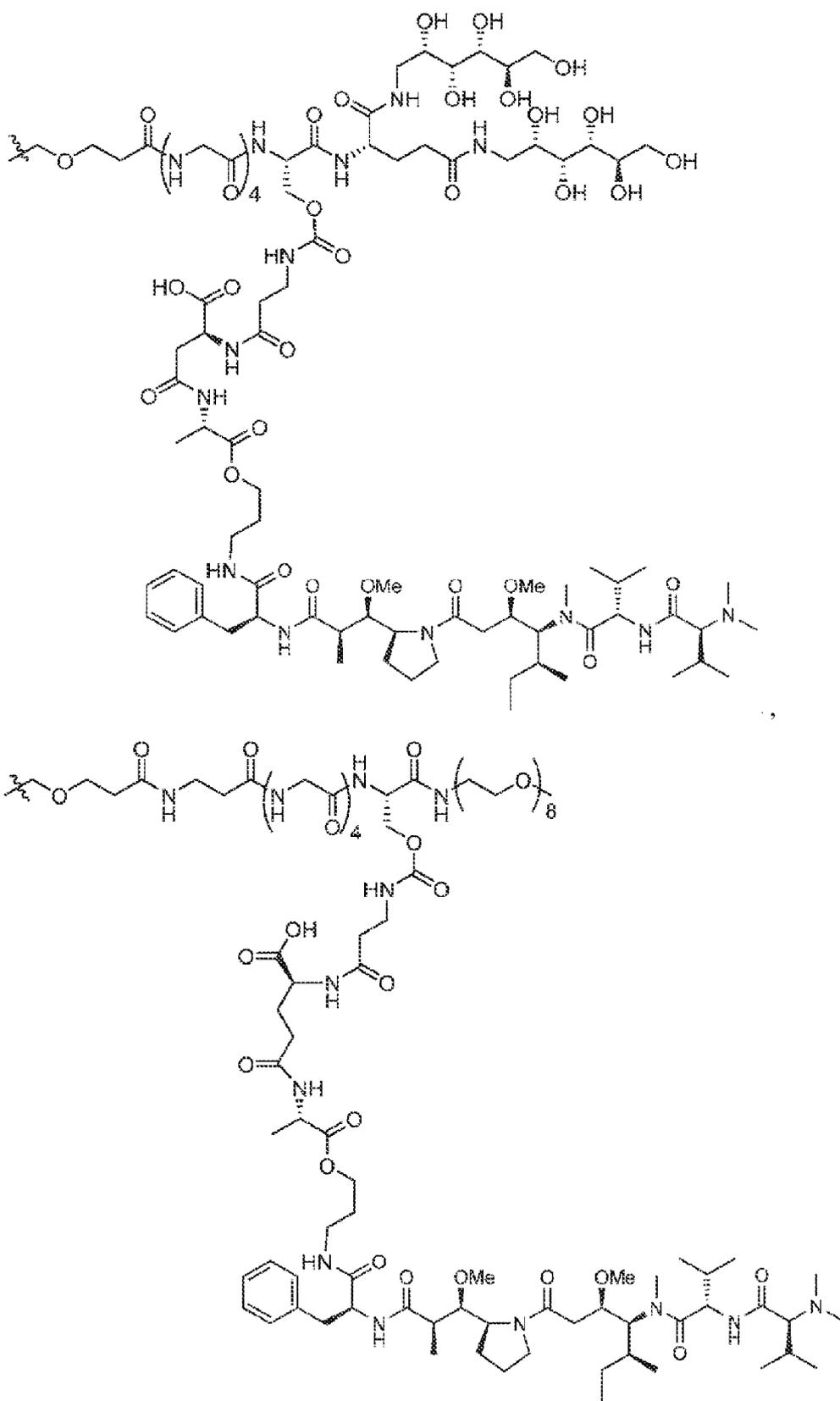
где d_{13} равно 2; и антитело содержит одну или несколько групп аспарагина на N297, соединенных с остальной частью конъюгата.

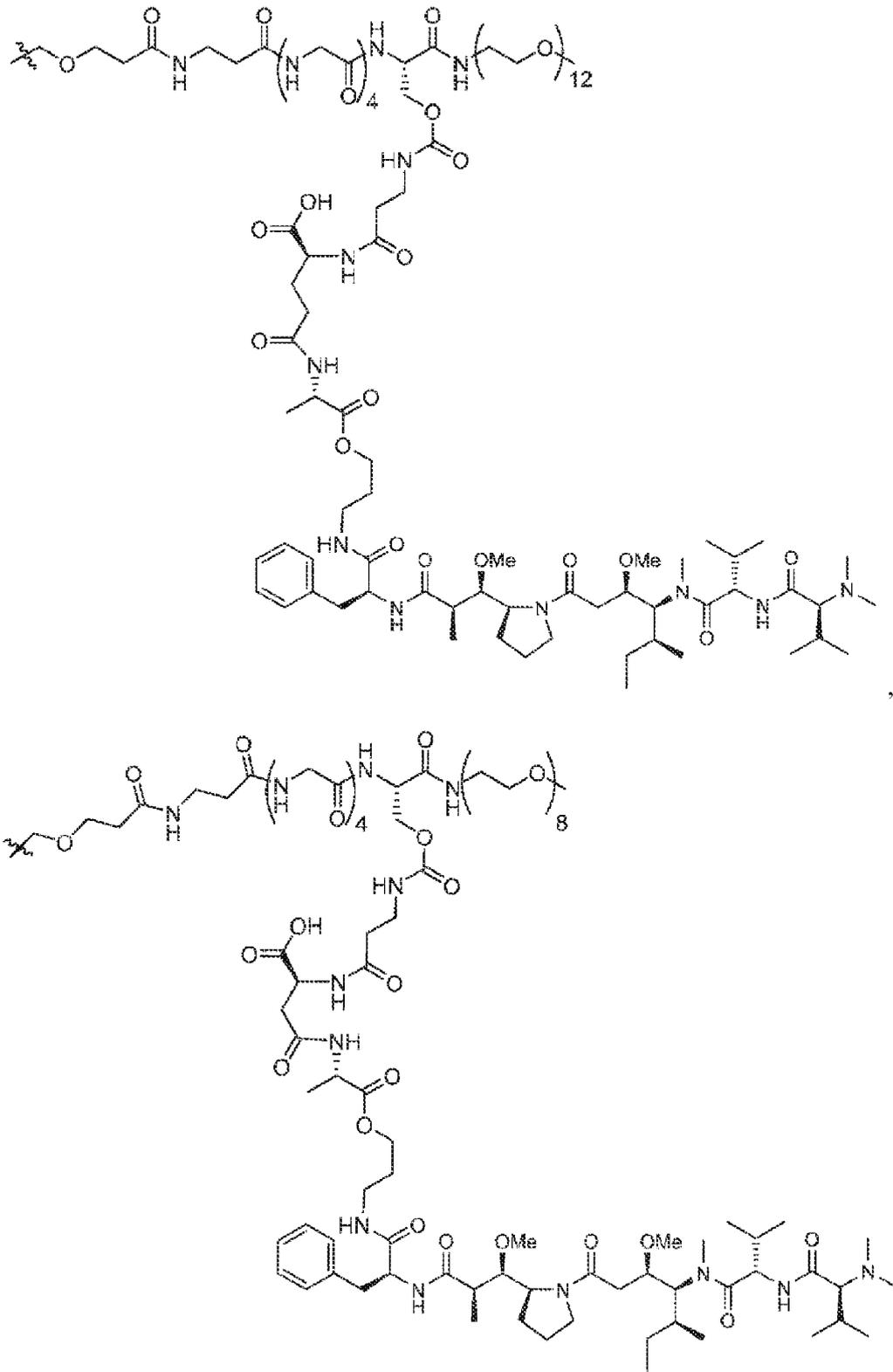
2. Конъюгат по любому из предыдущих пунктов формулы (XXX):

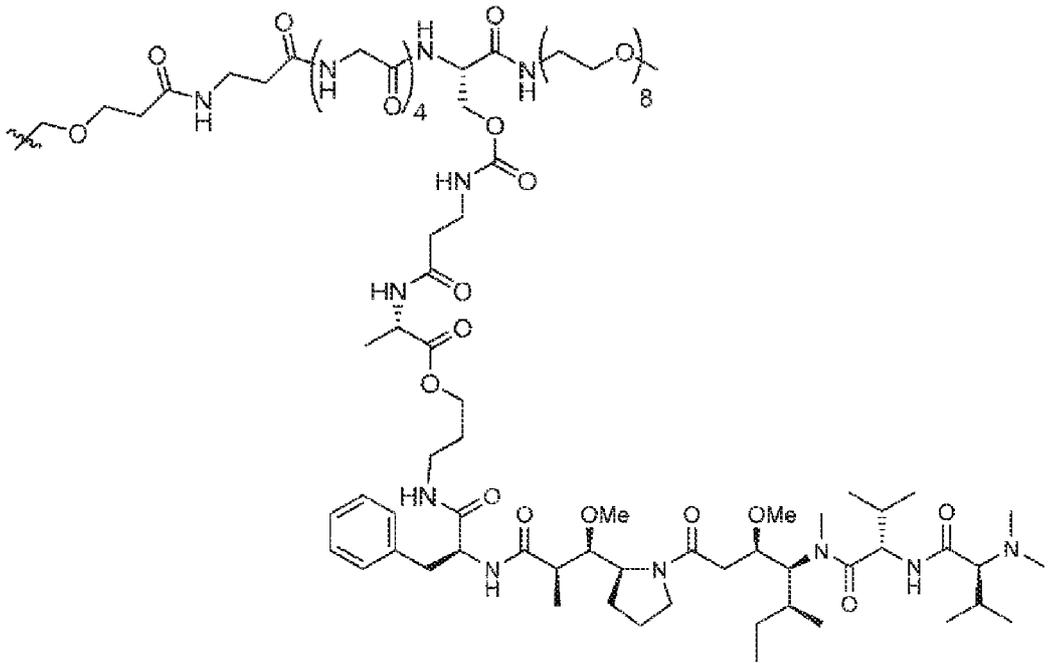
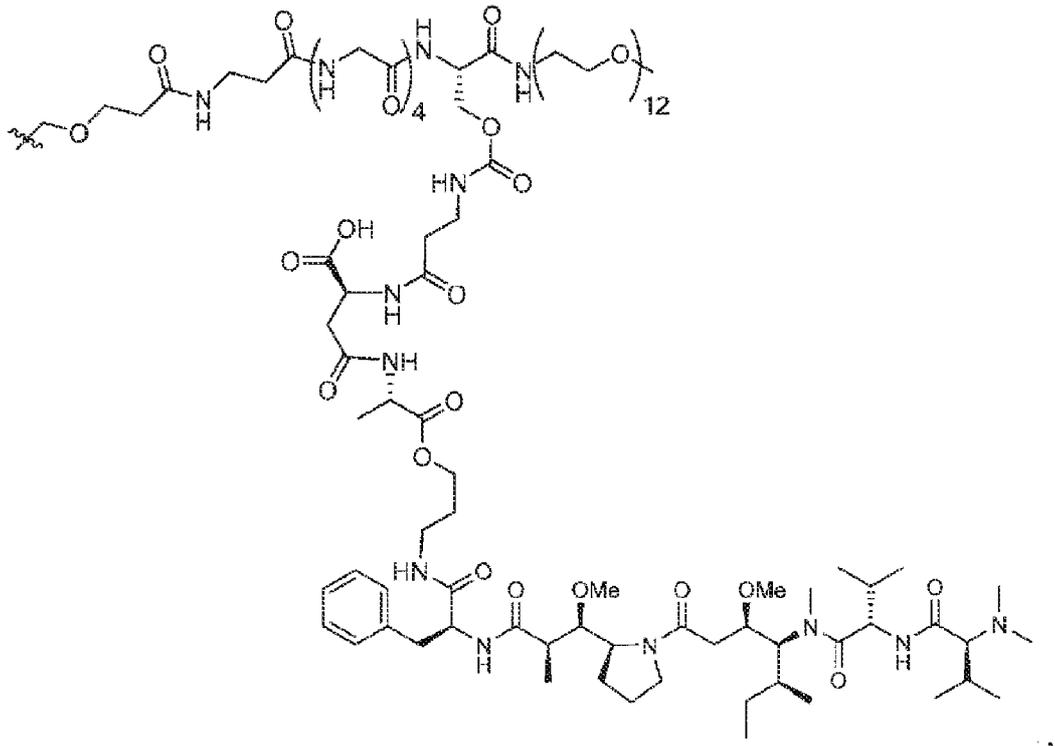


(XXX),

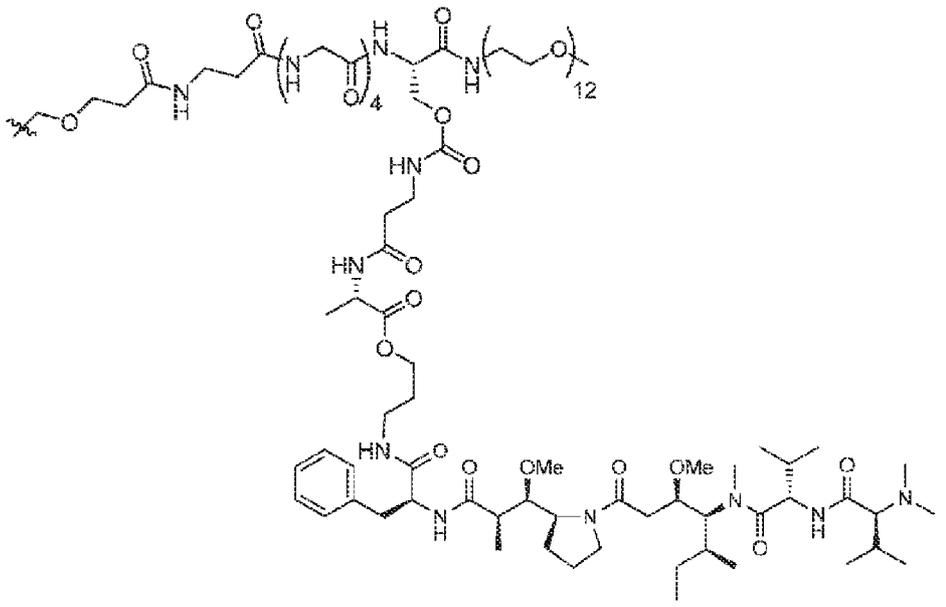
где каждый R_A представляет собой





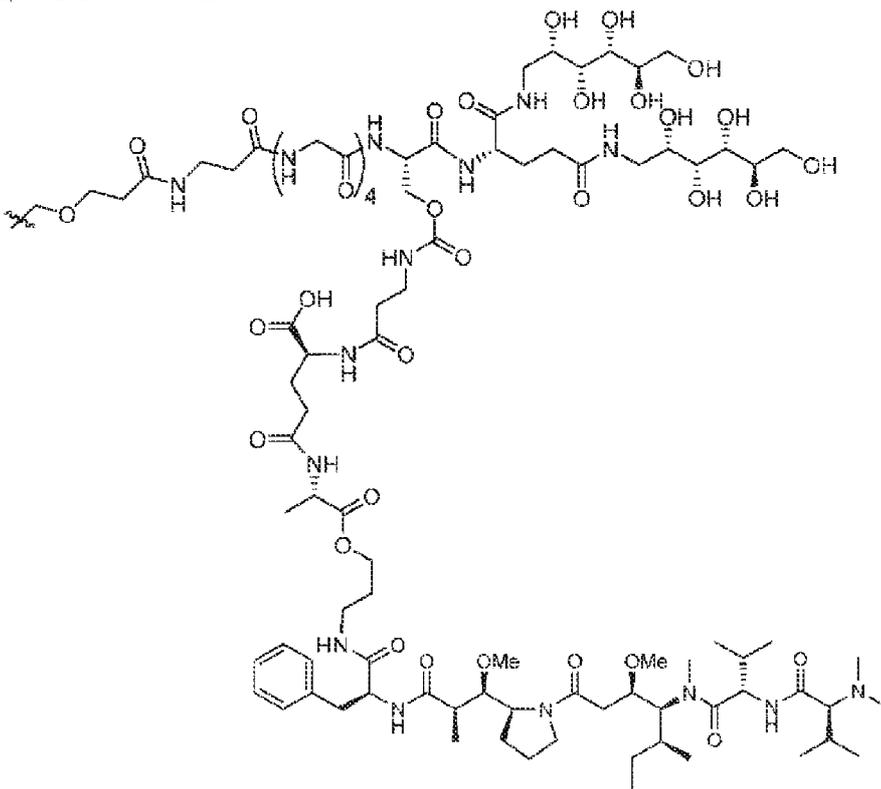


или

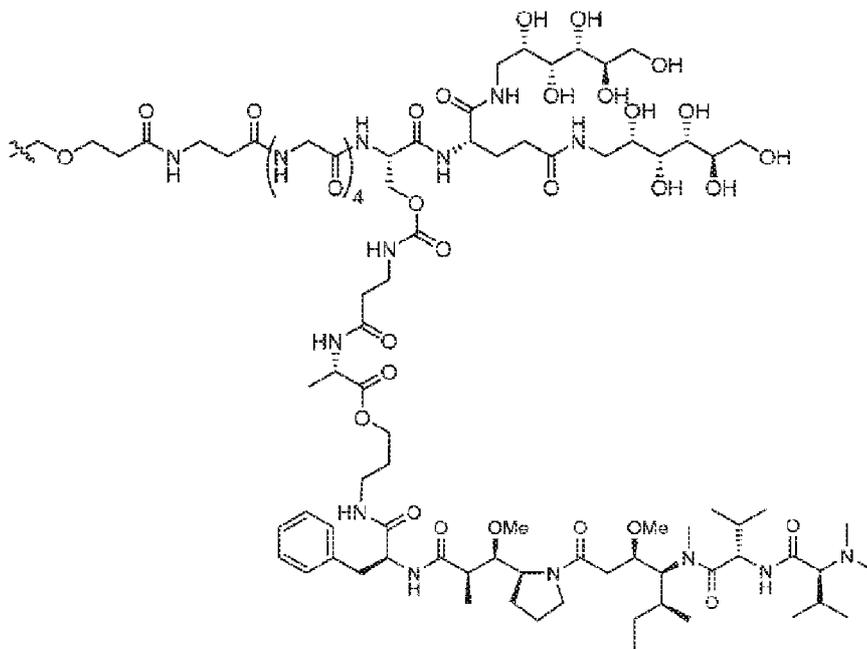


где d_{13} равно 2; и антитело содержит одну или несколько групп аспарагина на N297, соединенных с остальной частью конъюгата.

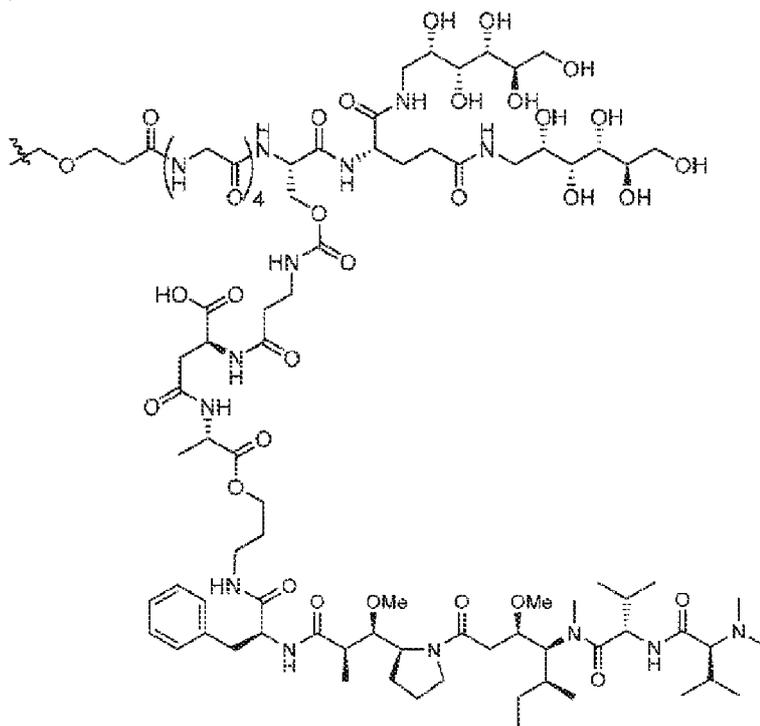
3. Конъюгат по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что каждый R_A представляет собой



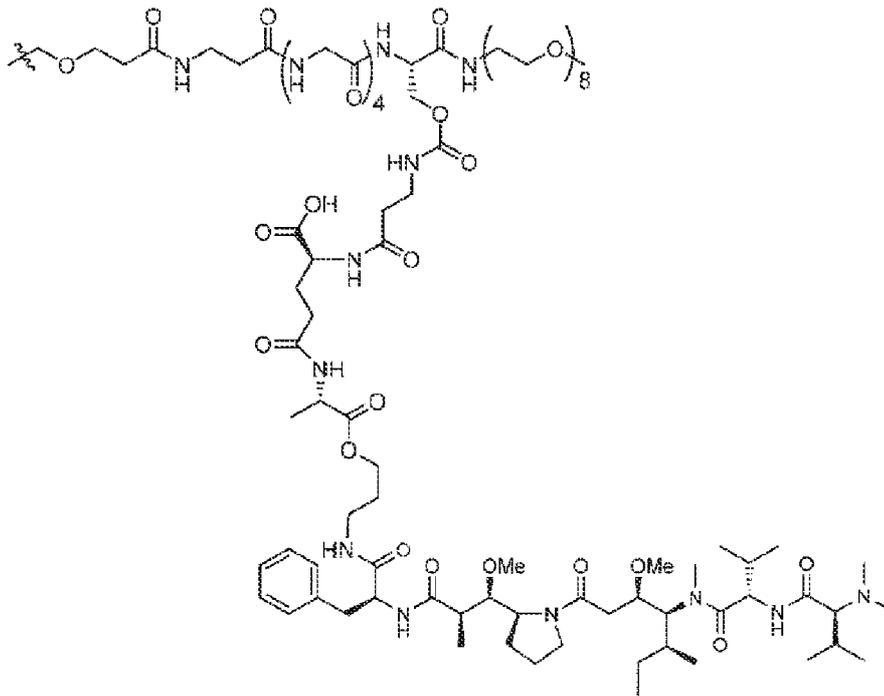
4. Конъюгат по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что каждый R_A представляет собой



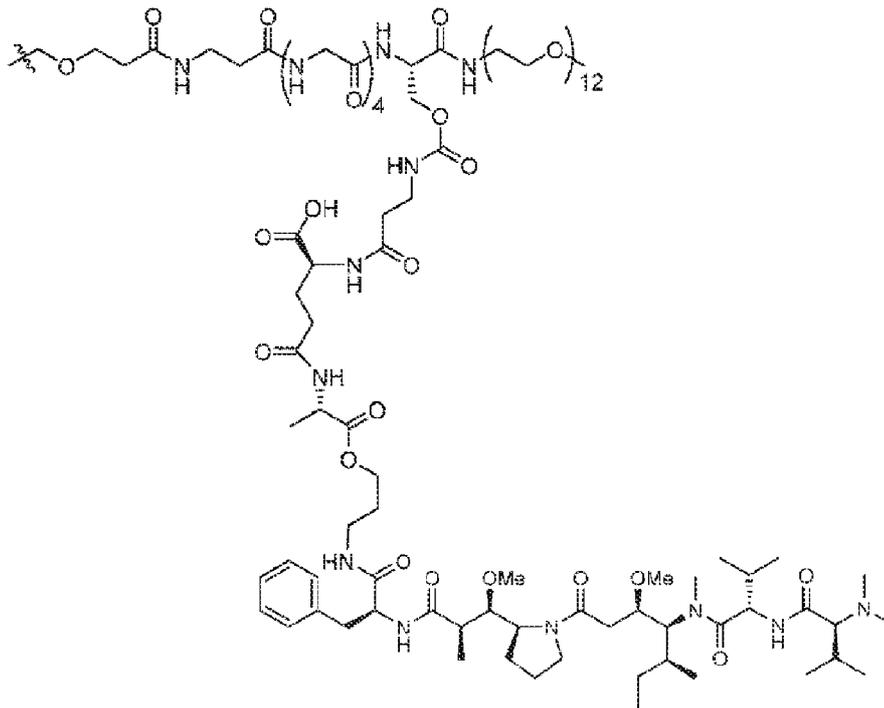
5. Конъюгат по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что каждый R_A представляет собой



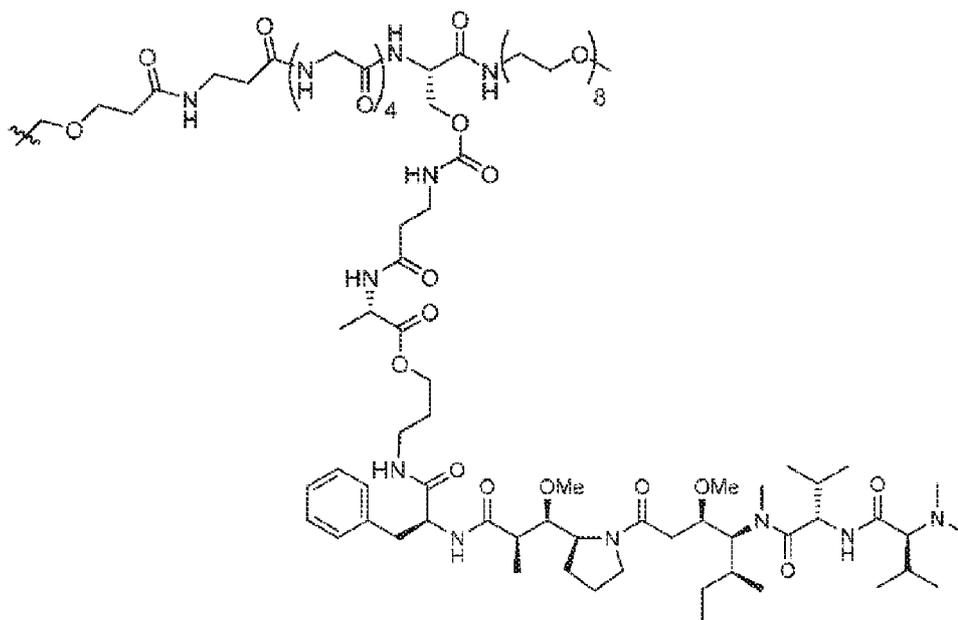
6. Конъюгат по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что каждый R_A представляет собой



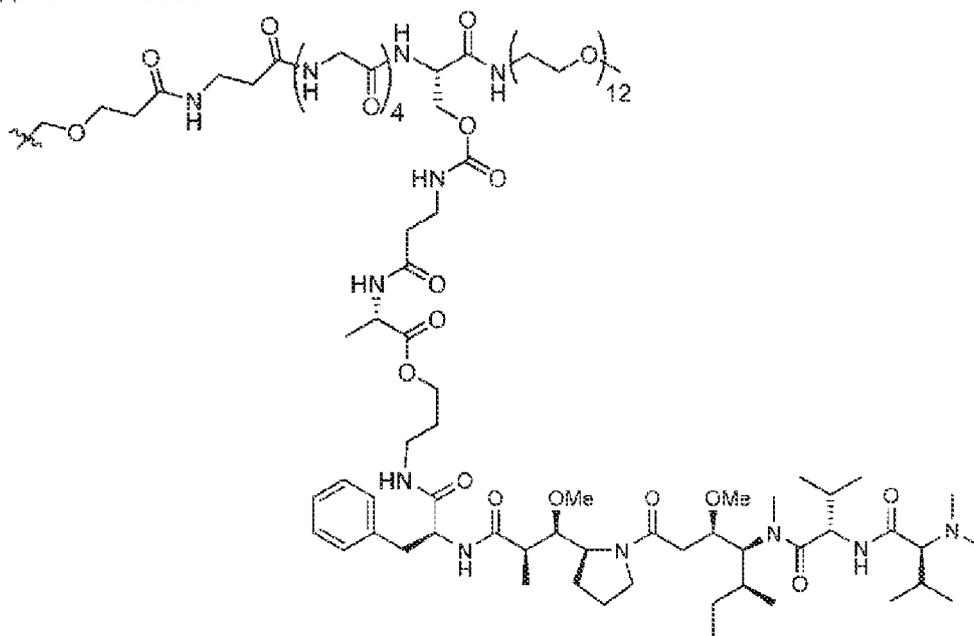
7. Конъюгат по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что каждый R_A представляет собой



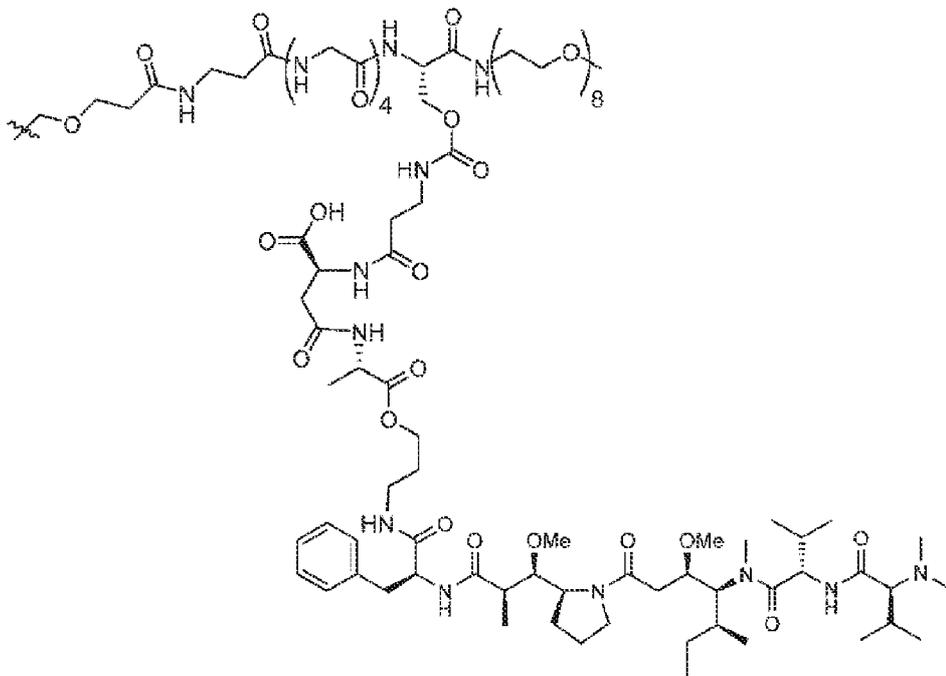
8. Конъюгат по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что каждый R_A представляет собой



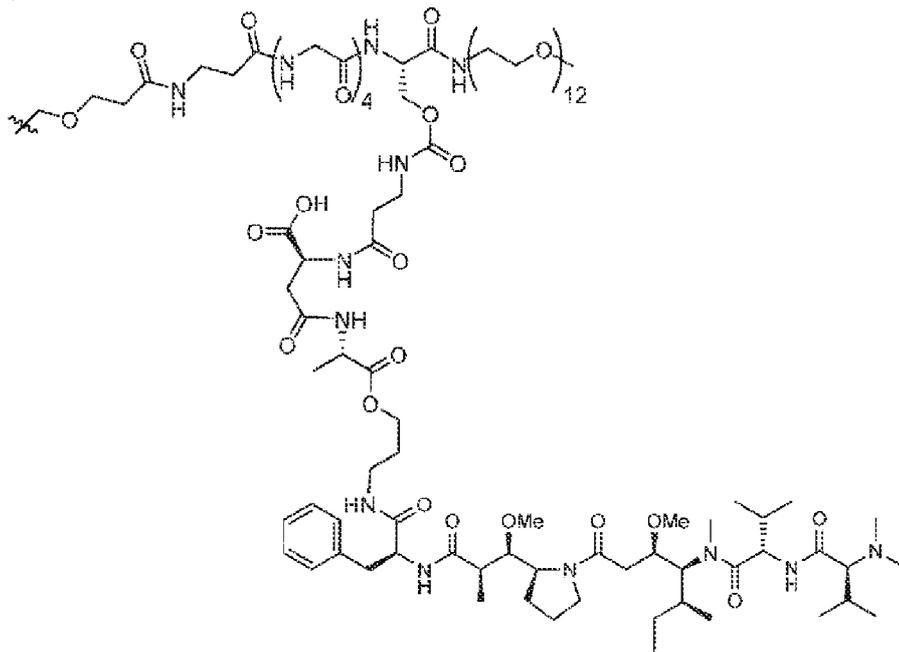
9. Конъюгат по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что каждый R_A представляет собой



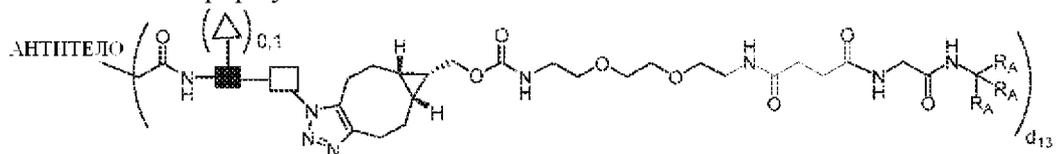
10. Конъюгат по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что каждый R_A представляет собой

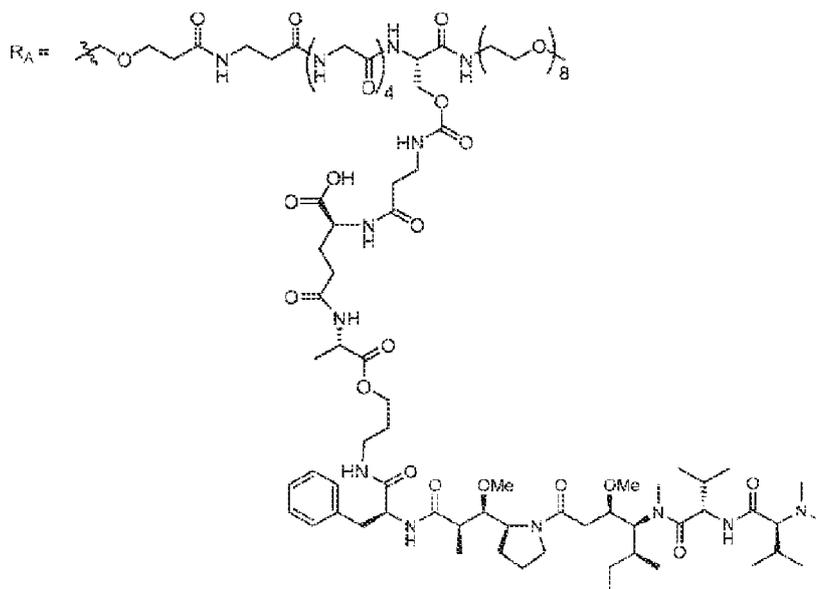


11. Конъюгат по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что каждый R_A представляет собой



12. Конъюгат формулы:





где

d_{13} равно 2;

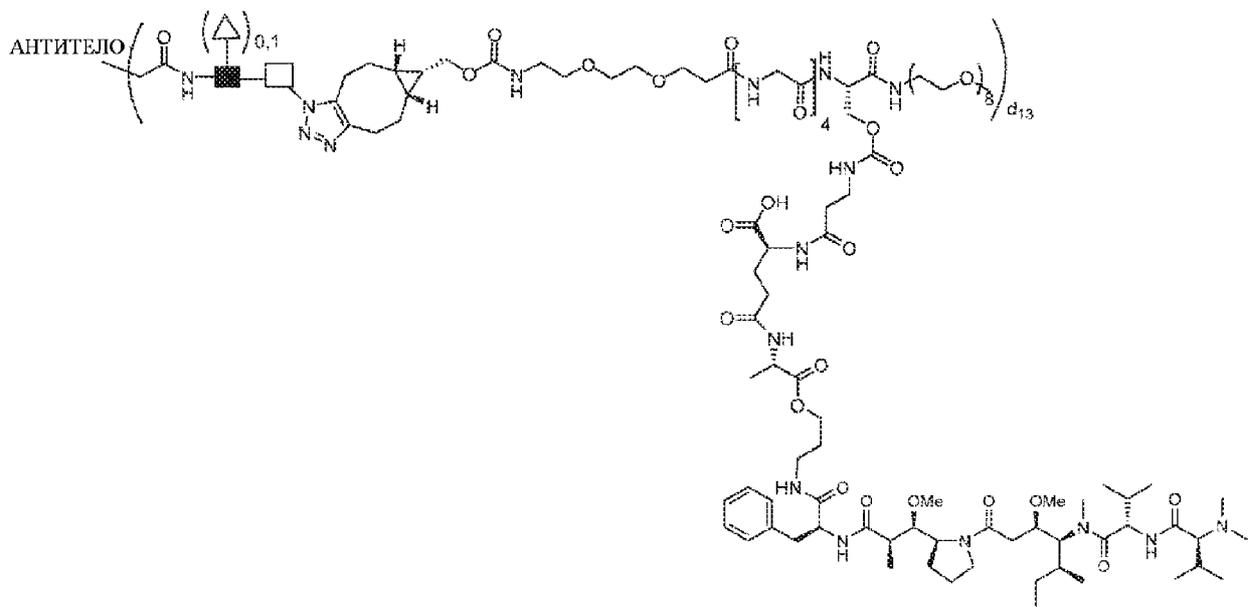
АНТИТЕЛО представляет собой NaPi2b антитело, содержащее: CDRH1, содержащую аминокислотную последовательность GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 5); CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 6); CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность GETARATFAY (SEQ ID NO: 7); CDRL1, содержащую аминокислотную последовательность SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 8); CDRL2, содержащую аминокислотную последовательность YTSSLYS (SEQ ID NO: 9); и CDRL3, содержащую аминокислотную последовательность QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 10);

антитело содержит одну или несколько групп аспарагина на N297, соединенных с остальной частью конъюгата;

■ представляет собой GlcNAc; Δ представляет собой Fuc; и □ представляет собой GalNAc.

13. Конъюгат по п. 12, отличающийся тем, что NaPi2b антитело содержит последовательность аминокислот тяжелой цепи SEQ ID NO: 1 и последовательность аминокислот легкой цепи SEQ ID NO: 2.

14. Конъюгат формулы



где

d_{13} равно 2;

АНТИТЕЛО представляет собой NaPi2b антитело, содержащее: CDRH1, содержащую аминокислотную последовательность GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 5); CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 6); CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность GETARATFAY (SEQ ID NO: 7); CDRL1, содержащую аминокислотную последовательность SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 8); CDRL2, содержащую аминокислотную последовательность YTSSLYS (SEQ ID NO: 9); и CDRL3, содержащую аминокислотную последовательность QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 10);

антитело содержит одну или несколько групп аспарагина на N297, соединенных с остальной частью конъюгата;

■ представляет собой GlcNAc; Δ представляет собой Fuc; и □ представляет собой GalNAc.

15. Конъюгат по п. 14, отличающийся тем, что NaPi2b антитело содержит последовательность аминокислот тяжелой цепи SEQ ID NO: 1 и последовательность аминокислот легкой цепи SEQ ID NO: 2.

16. Способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство, включающий взаимодействие модифицированного антитела с каркасом, выбранным из каркасов, описанных в таблице В, с образованием сайт-специфического конъюгата антитело-лекарственное средство, где модифицированное антитело получают путем контакта с гликопротеином, содержащим антитело и группу ядро-GlcNAc, соединенную с сайтом N297 антитела, с эндогликозидазой Endo SH, образуя таким образом промежуточное антитело, содержащее терминальную группу GlcNAc; и контакт промежуточного антитела с 4-AzGalNAc-UDP в присутствии фермента β -(1,4)-GalNAcT с образованием модифицированного антитела, содержащего группу модифицированной GlcNAc; где стадии (a) и (b) проводят одновременно.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат по любому из предыдущих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель.

18. Конъюгат по любому из предыдущих пунктов для лечения рака у нуждающегося в этом субъекта, отличающийся тем, что субъекту вводят эффективное количество конъюгата.

19. Способ лечения рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества конъюгата по любому из предыдущих пунктов.

20. Способ по п. 19, отличающийся тем, что рак представляет собой рак, экспрессирующий NaPi2b, выбранный из рака яичника, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), рака эндометрия, папиллярного почечно-клеточного рака, рака слюнных протоков, папиллярного рака щитовидной железы, светлоклеточного рака почки, рака молочной железы, рака почки, рака шейки матки и холангиокарциномы.

21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что рак, экспрессирующий NaPi2b, представляет собой рак яичников, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), рак эндометрия, папиллярный почечно-клеточный рак, рак слюнных протоков или папиллярный рак щитовидной железы.

22. Способ по п. 20, отличающийся тем, что рак, экспрессирующий NaPi2b, представляет собой рак яичников или немелкоклеточный рак легкого (NSCLC).

23. Способ по п. 20, отличающийся тем, что эффективное количество конъюгата вводят субъекту в дозе примерно от 7 мг/м^2 до 162 мг/м^2 в первый день лечения и затем каждые три недели или четыре недели.

24. Способ по п. 20, отличающийся тем, что доза составляет от примерно 7 мг/м^2 до примерно 162 мг/м^2 (например, 7 мг/м^2 , 14 мг/м^2 , 28 мг/м^2 , 56 мг/м^2 , 84 мг/м^2 , 112 мг/м^2 , 135 мг/м^2 или 162 мг/м^2).

25. Способ по п. 20, отличающийся тем, что рак яичников представляет собой резистентный к платине рак яичников.

26. Способ по п. 20, отличающийся тем, что рак яичников представляет собой серозную карциному яичников высокой степени злокачественности.

27. Способ по п. 20, отличающийся тем, что рак яичников представляет собой резистентный к платине серозный рак яичников высокой степени злокачественности.

28. Способ по п. 20, отличающийся тем, что рак яичников ранее подвергался химиотерапии одним агентом.

29. Способ по п. 20, отличающийся тем, что субъект, страдающий раком яичников, получил не более 3 предшествующих линий терапии.

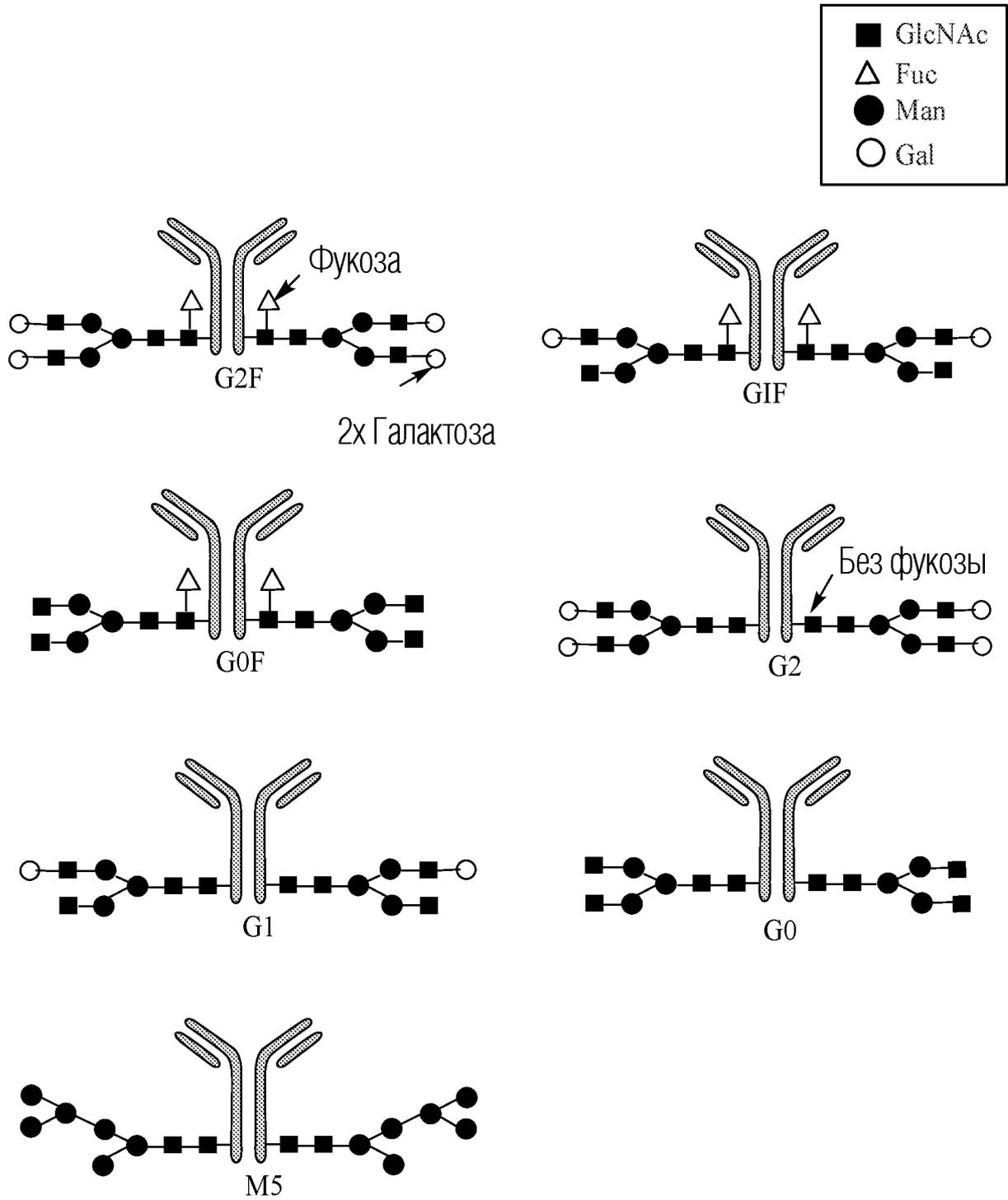
30. Способ по п. 20, отличающийся тем, что субъект, страдающий раком яичников, получил не более 3 предшествующих линий терапии, включая, по меньшей мере, одну линию со схемой лечения, содержащей платину.

31. Способ по п. 20, отличающийся тем, что субъект, страдающий раком яичников, получил не более 4 предшествующих линий терапии, включая, по меньшей мере, одну линию со схемой лечения, содержащей платину, или без нее.

32. Способ по п. 20, отличающийся тем, что NSCLC относится к подтипу аденокарциномы.

33. Способ по п. 20, отличающийся тем, что субъект имеет NSCLC и ранее проходил лечение химиотерапией на основе платины (цисплатином или карбоплатином) и PD-1 или PD-L1 моноклональным антителом.

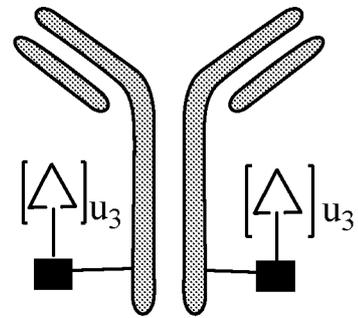
ФИГ. 1



ФИГ. 2

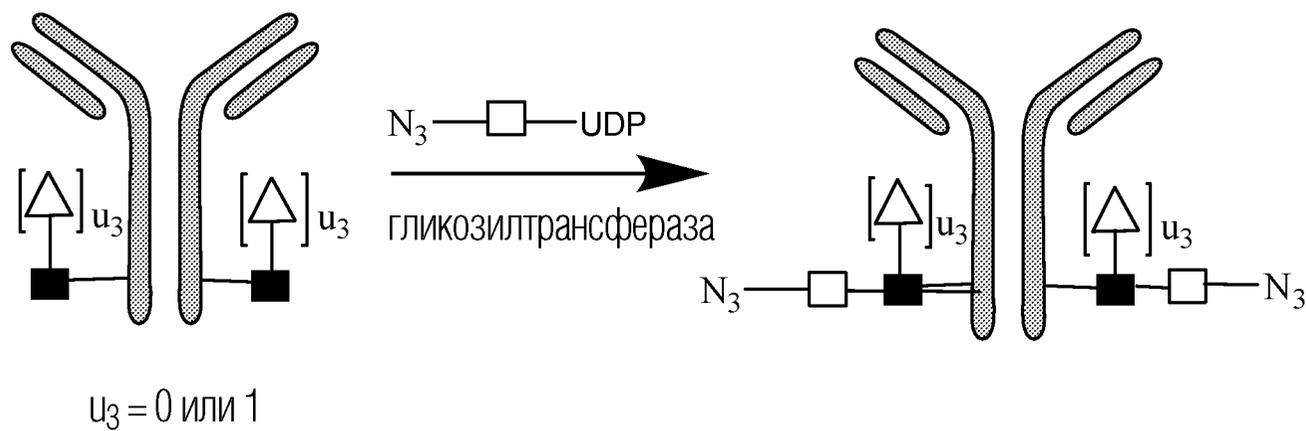
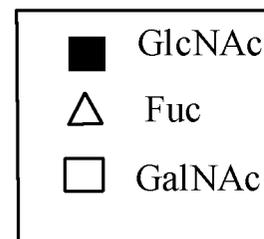
Смесь
гликоформ
G0, G1, G2,
G0F, G1F и
G2F

Эндогликозидаза

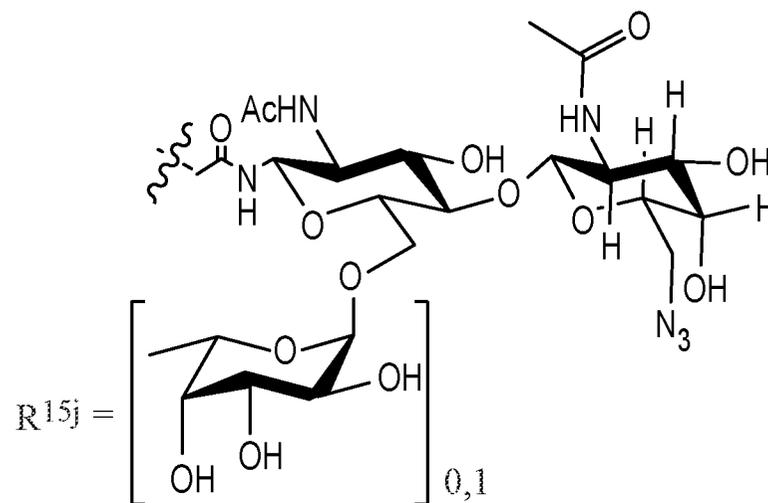
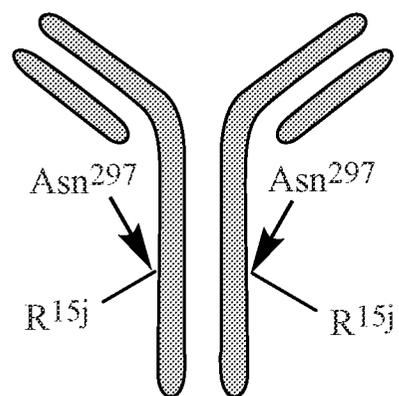
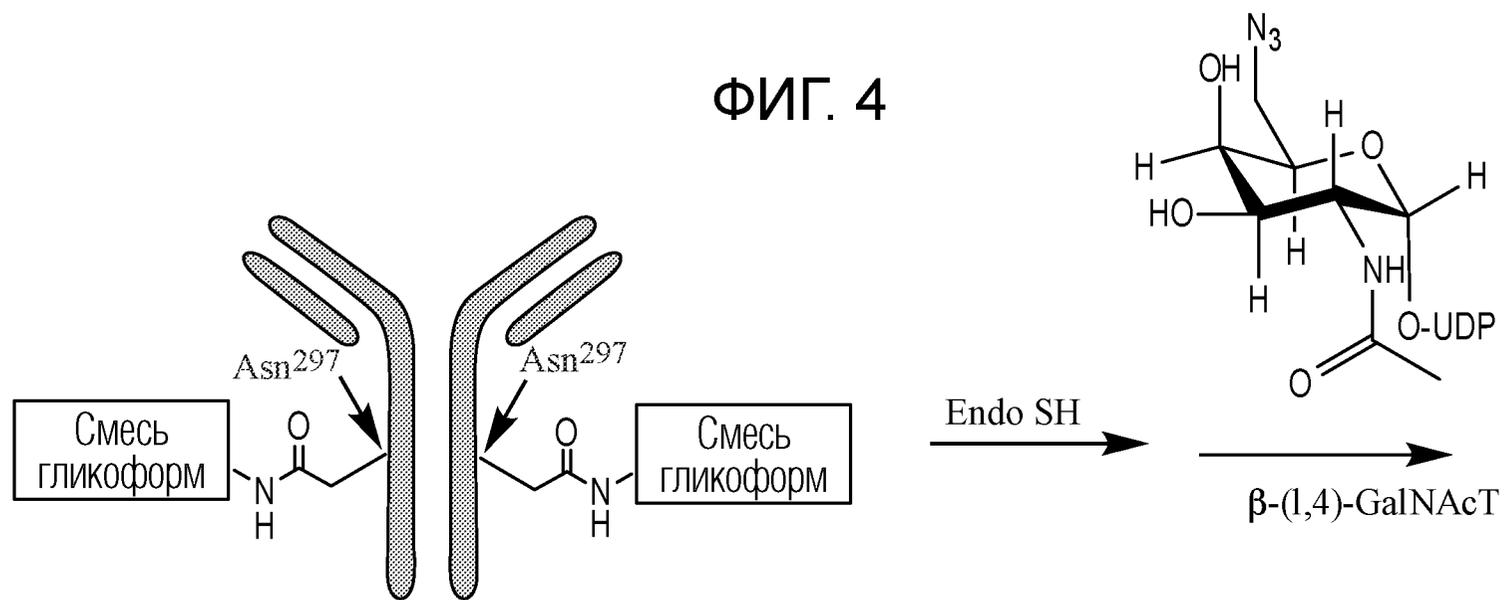


$u_3 = 0$ или 1

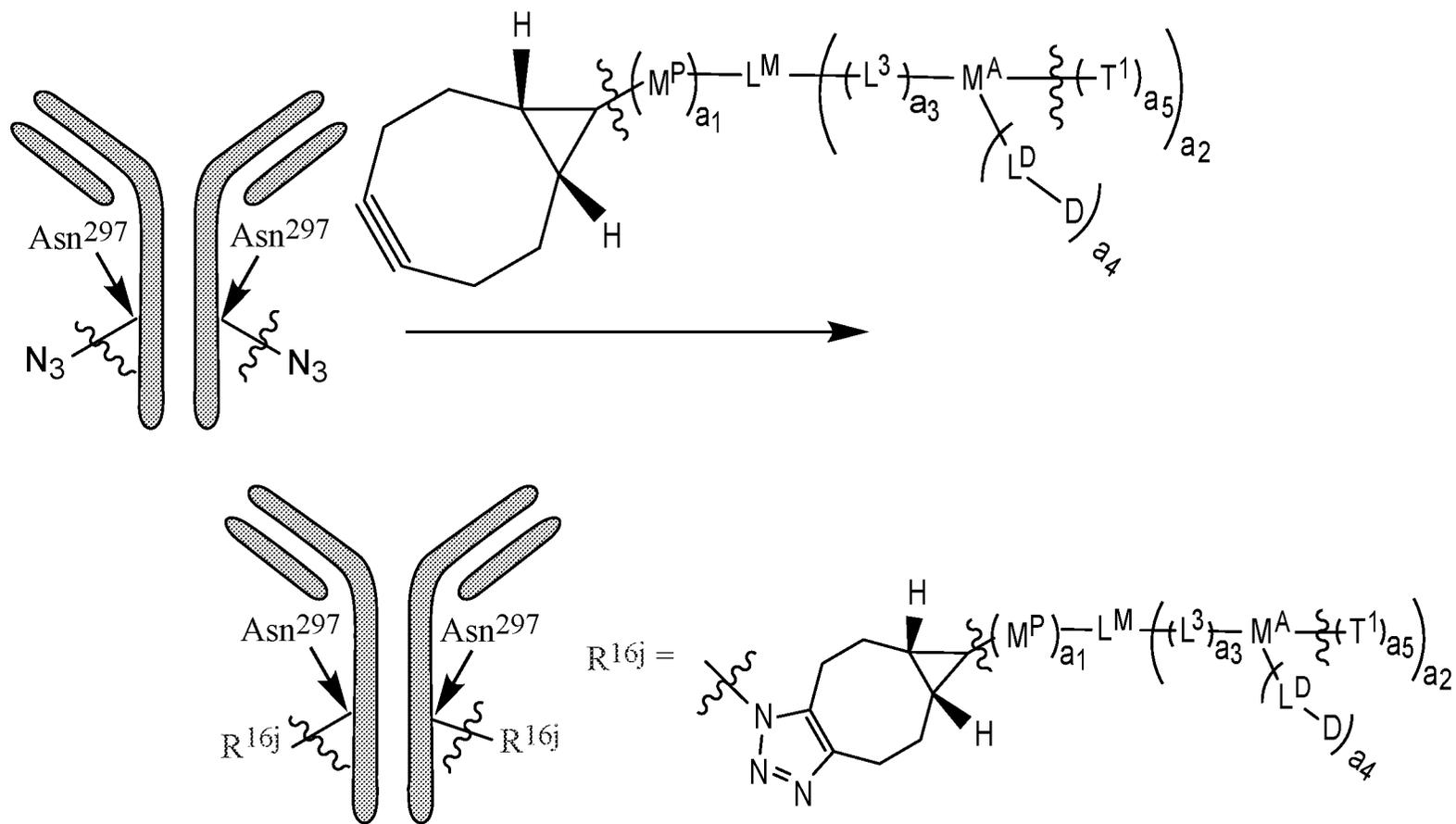
ФИГ. 3



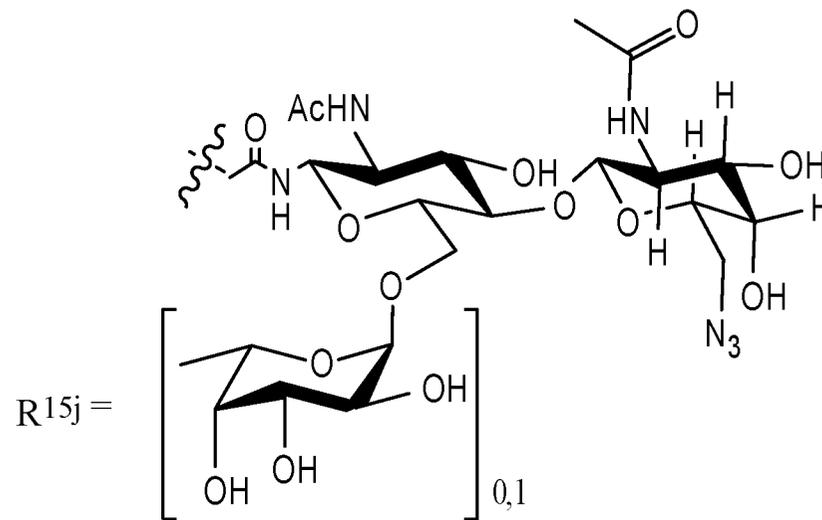
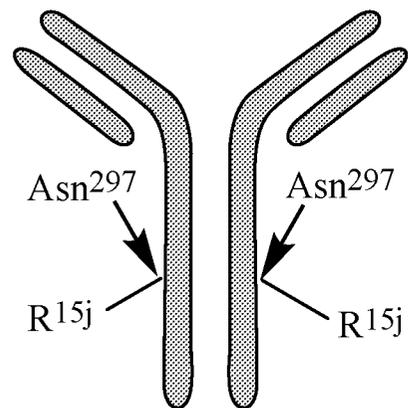
ФИГ. 4



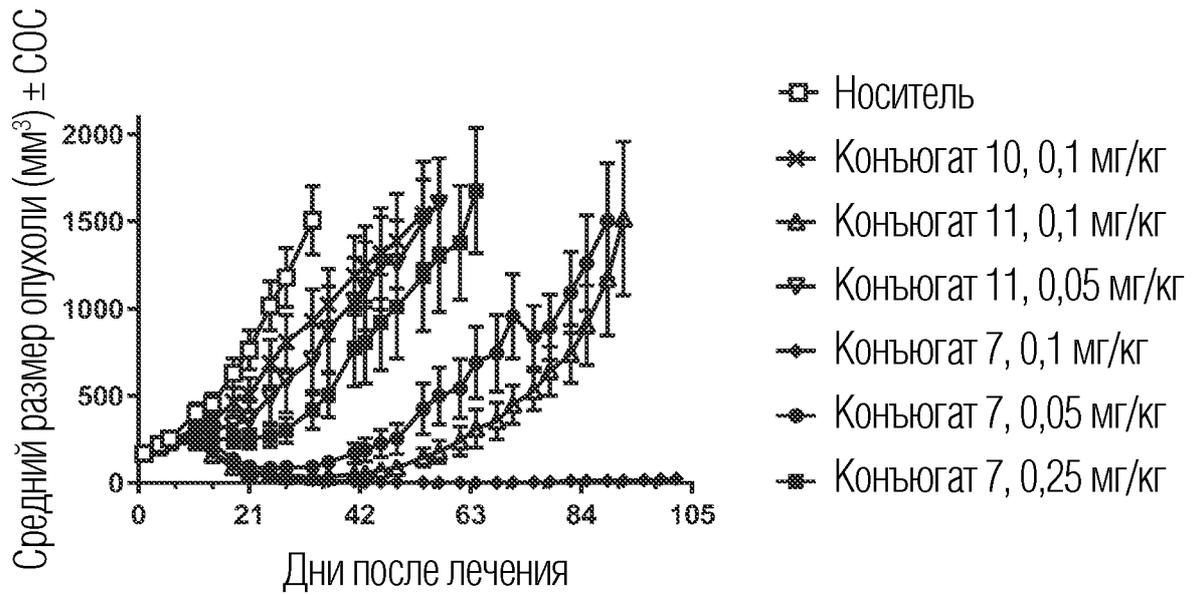
ФИГ. 5



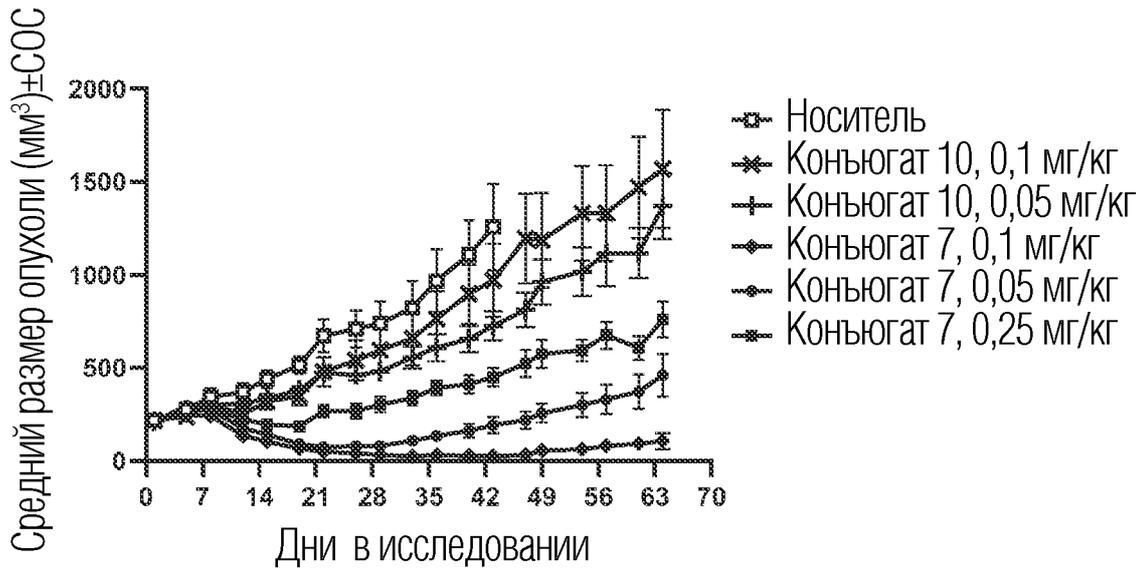
ФИГ. 6



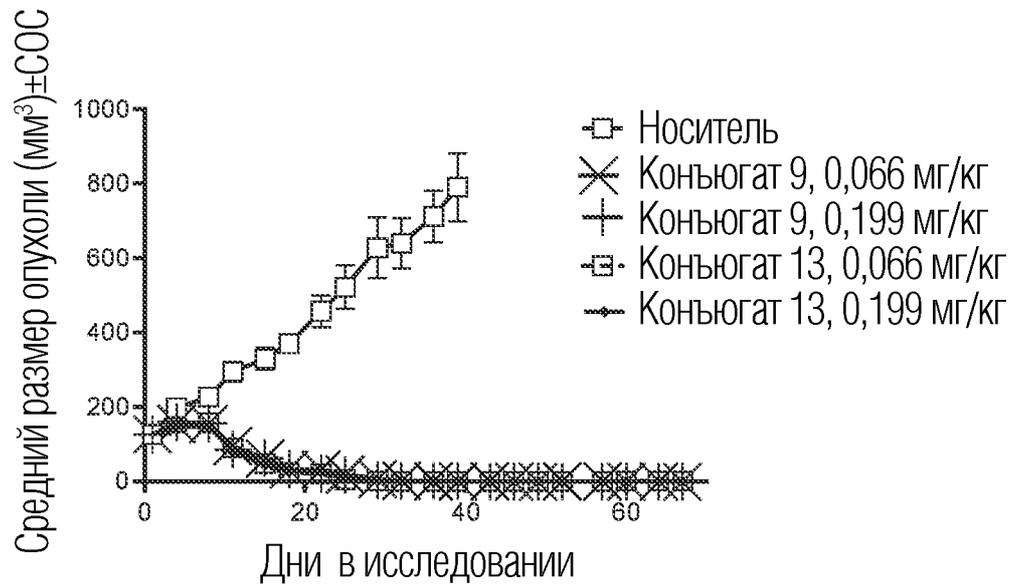
ФИГ. 7



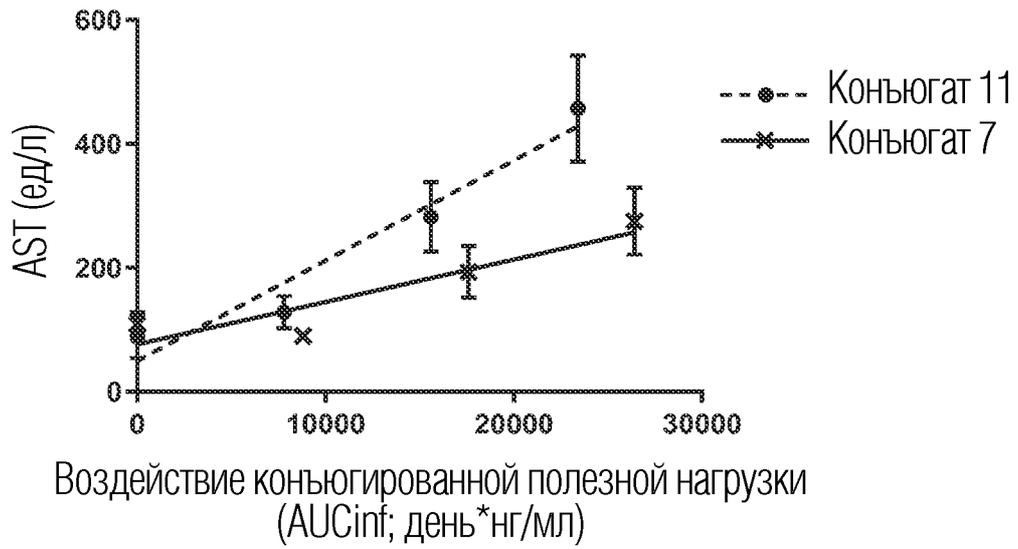
ФИГ. 8



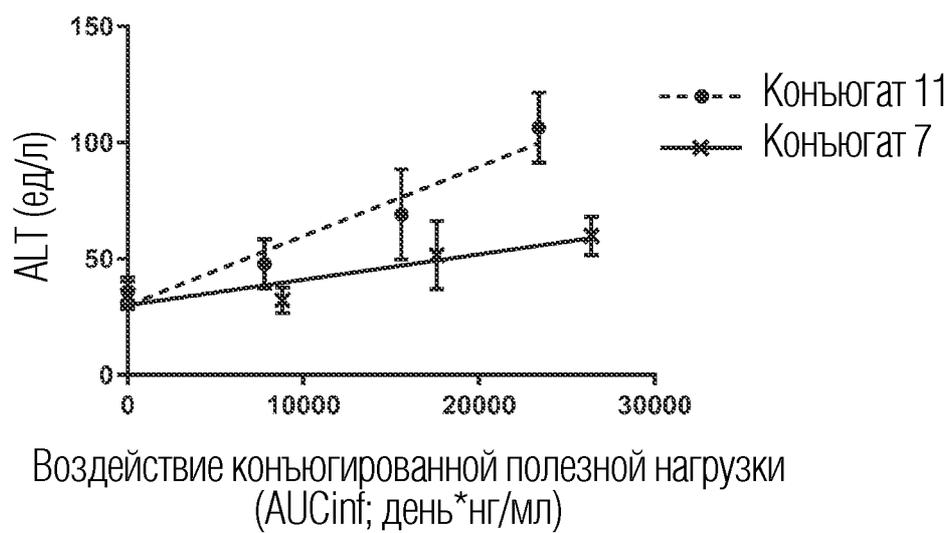
ФИГ. 9



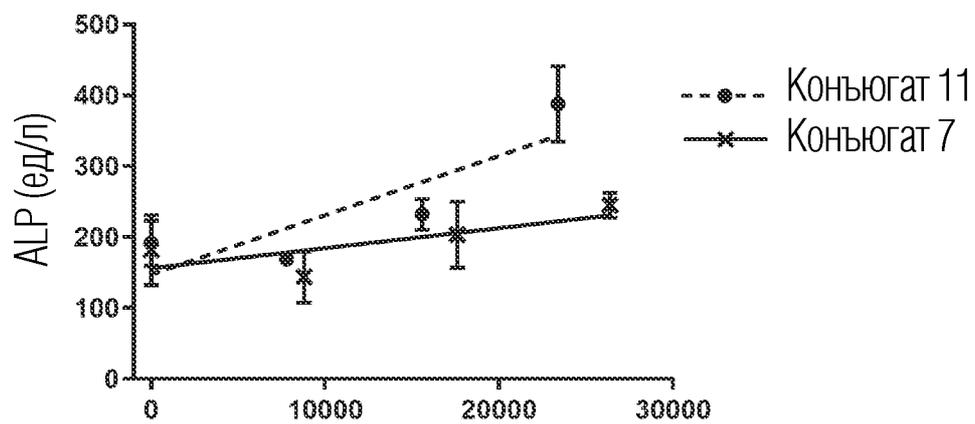
ФИГ. 11



ФИГ. 12

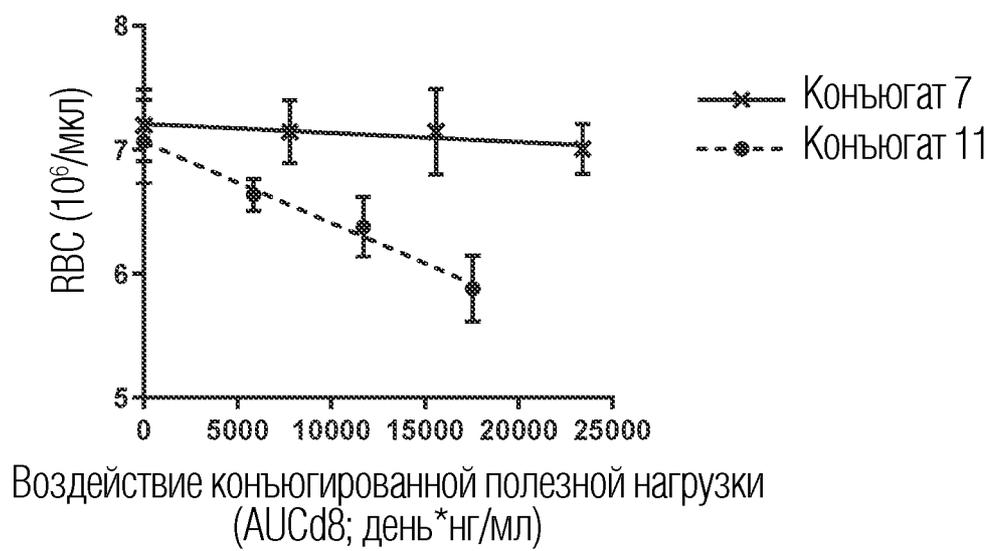


ФИГ. 13

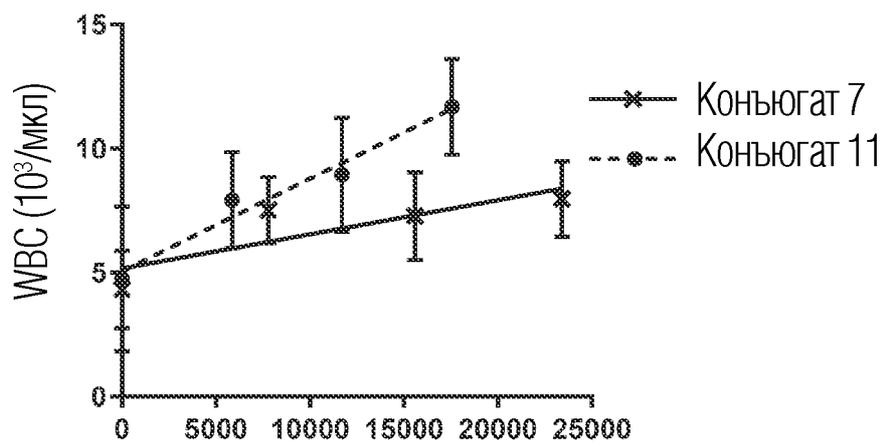


Воздействие конъюгированной полезной нагрузки
(AUCinf; день*нг/мл)

ФИГ. 14

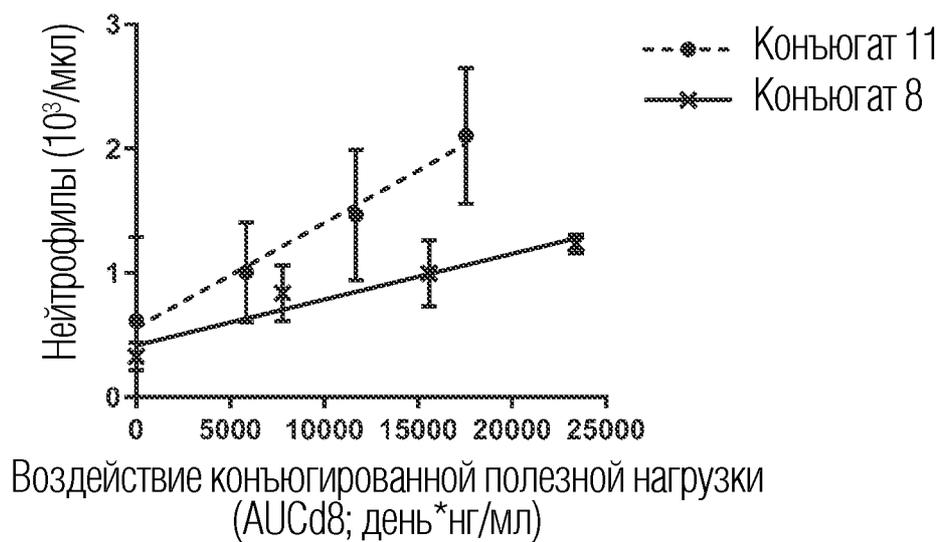


ФИГ. 15

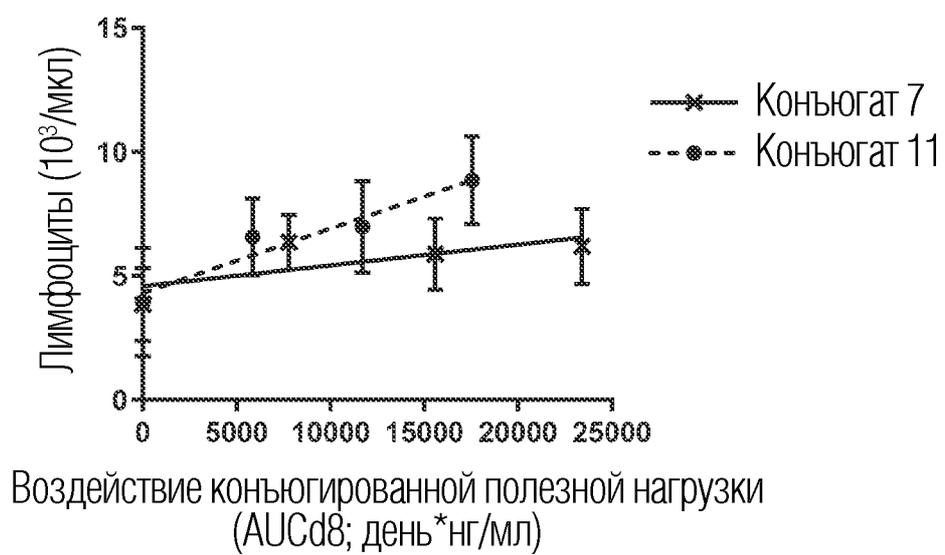


Воздействие конъюгированной полезной нагрузки
(AUCd8; день*нг/мл)

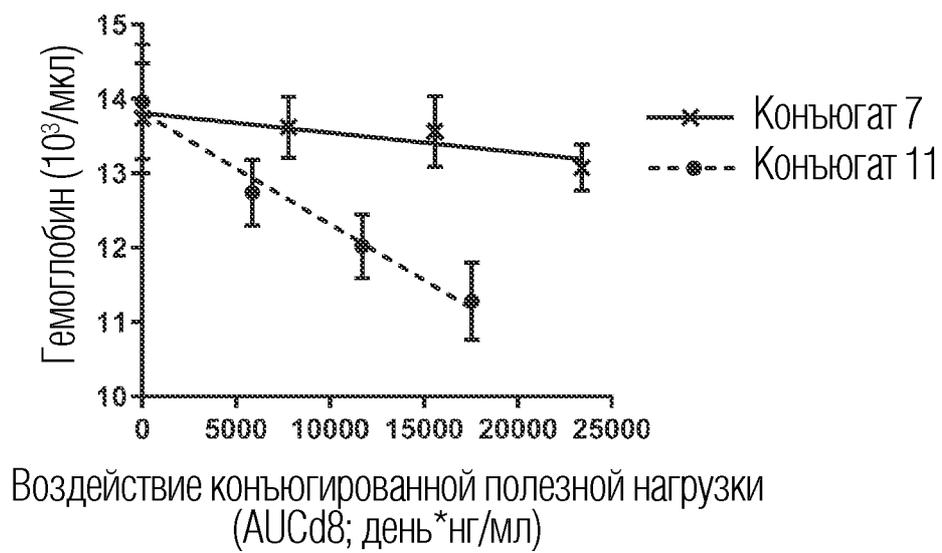
ФИГ. 16



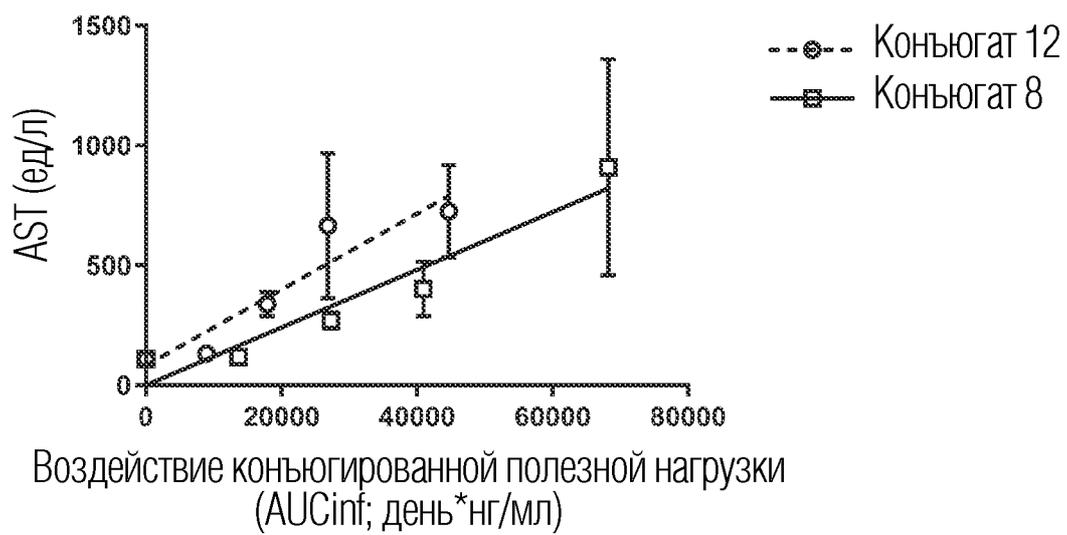
ФИГ. 17



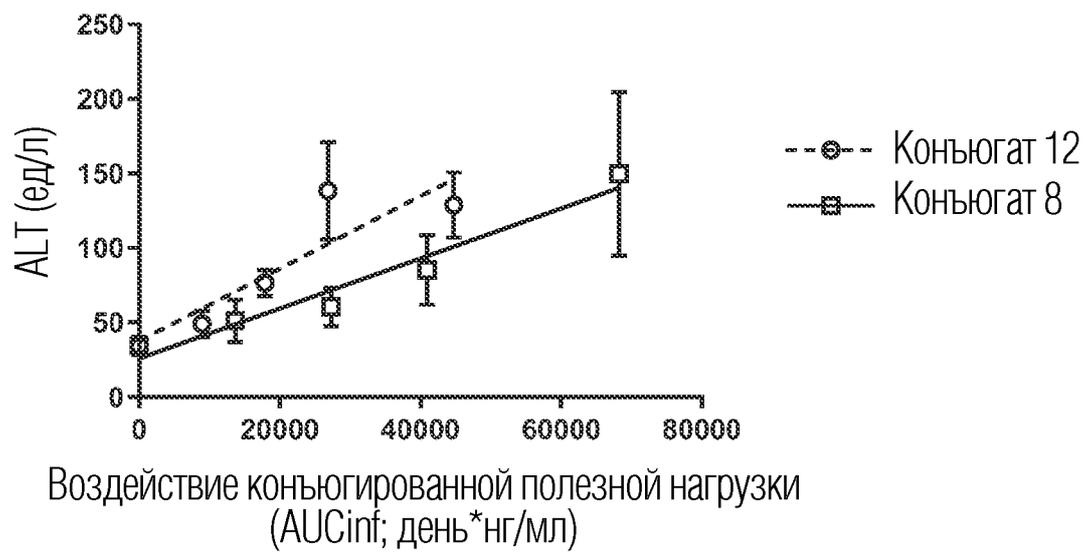
ФИГ. 18



ФИГ. 19



ФИГ. 20



ФИГ. 21

