

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292952** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.12.08

(22) Дата подачи заявки
2021.04.15

(51) Int. Cl. *A61K 47/00* (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО**

(31) **PCT/CN2020/084880**

(32) **2020.04.15**

(33) **CN**

(86) **PCT/CN2021/087513**

(87) **WO 2021/209007 2021.10.21**

(71) Заявитель:

**ШЭНЬЧЖЭНЬ ИНДЬЮРИНГ
БАЙОТЕК, ЛТД. (CN)**

(72) Изобретатель:

**У Дэчунь, Лю Шуминь, Инь Шуцян,
Вэнь Юй (CN)**

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение касается конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC), особенно пегилированных моно- или биспецифичных конъюгатов антитело-лекарственное средство (BsADC), полученных путем сайт-специфической конъюгации с получением однородных конъюгатов с высокой активностью и низкой токсичностью. Настоящее изобретение также касается способа получения ADC, композиций, содержащих эти ADC, и их применения при лечении заболеваний.

A1

202292952

202292952

A1

КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

Настоящая заявка претендует на приоритет от даты подачи заявки PCT/CN2020/084880, поданной 15 апреля 2020 г., содержание которой включено сюда путем ссылки во всей полноте на все случаи.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC), особенно мультиспецифичных конъюгатов антитело-лекарственное средство, полученных путем сайт-специфической конъюгации с получением гомогенных конъюгатов с высокой активностью и низкой токсичностью. В частности, изобретение касается пегилированных конъюгатов моно- или биспецифичных одноцепочечных антител с лекарственными средствами длительного действия, полученных путем сайт-специфической конъюгации пегилированного конъюгата лекарственного средства с моно- или биспецифичным антителом.

Уровень техники

Лечение рака медленно прогрессировало от хирургии (конец 1800-х) к лучевой терапии (начало 1900-х), от химиотерапии и гормональной терапии (середина 1900-х) к целевой медицине (1990-е) и от комбинации целевой медицины с химио- и гормональной терапией (начало 2000-х) к недавним конъюгатам антитело-лекарственное средство (ADC) и т.п. Концепция лечения рака с помощью ADC возникла более 50 лет назад (Decarvalho S. et al., Nature, 1964, 202, 255-258): использование антител в качестве переносчиков для доставки чрезвычайно сильнодействующих веществ непосредственно в раковые клетки. В первых ADC использовались негуманизированные антитела, которые сами по себе являются антигенными, β -излучающие препараты радионуклидов, которые трудно получить и с которыми трудно работать, и нестабильные линкеры, которые преждевременно высвобождают цитотоксический груз. В современной технологии ADC используются гуманизированные антитела, сильно цитотоксичные органические грузы и относительно стабильные линкеры, разработанные для сохранения целостности уничтожающего клетки агента до того, пока не будет достигнута мишень и вся молекула ADC интернализуется в клетки.

В США уже 10 ADC одобрены FDA, которые все предназначены для лечения рака, и более 100 ADC-кандидатов сейчас проходят клинические испытания (по данным исследования фирмы Beason Targeted Therapies). Все 10 одобренных ADC проявляют серьезные побочные эффекты при лечении. В самом деле, 8 из 10 утвержденных ADC должны иметь предупреждающие этикетки в черной рамке, что ограничивает их

применение при различных показаниях для рака. Сейчас самой большой проблемой для ADC на основе IgG является необходимость дозировки, очень близкой к максимально допустимой дозе (MTD), чтобы проявилась польза от лечения, что означает очень узкий терапевтический диапазон (Beck A. et al., *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2017, 16, 315-337; Vankemmelbeke M. et al., *Ther. Deliv.*, 2016, 7, 141-144; Tolcher A.W. et al., *Ann. Oncol.*, 2016, 27, 2168-2172). Кроме того, профили токсичности у этих ADC сравнимы с профилями стандартных химиотерапевтических средств, с ограничивающей дозировку токсичностью, связанной с цитотоксическим активным веществом (Coats S. et al., *Clin. Cancer Res.*, 2019, 25, 5441-5448). Из примерно 80 традиционных ADC, клинические испытания которых были прекращены, большинство прекращений было связано с плохим терапевтическим окном или индексом по сравнению с существующими терапиями. Установлено, что сайт конъюгации и гидрофобность линкера/лекарственного средства оказывают значительное влияние на стабильность, эффективность и терапевтический индекс ADC, а сайт-специфическая конъюгация цитотоксической молекулы с антителом с помощью гидрофильного линкера может улучшить терапевтический индекс (Junutula J.R. et al., *Nat. Biotechnol.*, 2008, 26, 925-932; Lyon R.P. et al., *Nat. Biotechnol.*, 2015, 33, 733-735). Однако многим ADC, проходящим клиническую разработку либо уже на рынке, требуется расщепление двух или нескольких межцепочечных дисульфидных связей у полноразмерных антител для достижения высокого DAR. К сожалению, такой подход может приводить к дестабилизации белка. Это особенно верно для несущих Fc биспецифичных ADC, так как биспецифичные антитела не являются естественными антителами, а получение биспецифичных ADC, несущих Fc, с высоким DAR еще более затруднено. Многие другие ADC, проходящие разработку или уже одобренные, получают при случайной конъюгации по остаткам цистеина либо по остаткам лизина антитела и гетерогенны по природе, что затрудняет их анализ и точное дозирование в клинических условиях. Более того, молекулы ADC, созданные из полноразмерных антител, считаются слишком большими для глубокого проникновения в плотные твердые опухоли при лечении рака на средней и поздней стадии. Кроме того, всем несущим Fc традиционным ADC присуща токсичность из-за связывания Fc с FcγRIIIa на мегакариоцитах (МК) и последующей интернализации с последующей гибелью МК, что в конечном счете приводит к остановке продукции тромбоцитов и тромбоцитопении (Uppal H. et al., *Clin. Cancer Res.*, 21(1), January 1, 2015), а многие внецелевые токсические эффекты, отмеченные у конъюгатов антитело-лекарственное средство, также обусловлены поглощением через рецепторы маннозы, что напрямую связано с Fc-компонентом ADC (Gorovits B. et al., 2013, *Cancer Immunol. Immunother.* 62, 217-223).

Таким образом, существует настоятельная потребность в новой технологии ADC с повышенной эффективностью и улучшенным профилем токсичности.

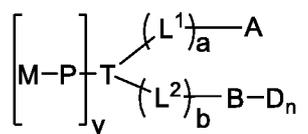
Сущность изобретения

Настоящее изобретение направлено на удовлетворение вышеуказанных потребностей путем получения модифицированных неиммуногенным полимером конъюгатов антитело-лекарственное средство, полученных путем сайт-специфичной конъюгации модифицированного полимером (например, пегилированного) лекарственного средства с моноспецифичным или мультиспецифичным фрагментом антитела; либо с моноспецифичным или мультиспецифичным одноцепочечным антителом со встроенным сайтом (например, цистеином) для сайт-специфичного конъюгирования. Фрагмент антитела или одноцепочечное антитело может быть моновалентным или мультивалентным для антигенов.

В одном аспекте изобретения предусмотрены молекулы полимерных конъюгатов

антитело-лекарственное средство по формуле Ia:
$$\text{P}-\text{T} \begin{array}{l} \text{A} \\ \text{D}_n \end{array}$$
, где P означает неиммуногенный полимер; T означает мультифункциональную (например, трифункциональную) низкомолекулярную группу линкера и содержит по меньшей мере одну функциональную группу, способную к сайт-специфичной конъюгации с моноспецифичным или мультиспецифичным антителом или белком; A – моноспецифичное или мультиспецифичное антитело или белок; D – небольшая цитотоксическая молекула или пептид ($n > 1$), причем каждый D может быть одинаковым или различным.

В частности, в одном аспекте изобретения предусмотрены конъюгаты по формуле Ib:



формула Ib

где: P означает неиммуногенный полимер;

M означает H или концевую кэспирующую группу типа C₁₋₅₀-алкила или арила, причем один или несколько атомов углерода у данного алкила необязательно заменены гетероатомами;

y – целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

T – мультифункциональный линкер, содержащий две или несколько функциональных групп, включая, без ограничения, трифункциональные или

тетрафункциональные или же любые другие циклические или нециклические мультифункциональные группы (например, лизин), причем связи между T и $(L^1)_a$ и между T и $(L^2)_b$ могут быть одинаковыми или разными;

каждый L^1 и L^2 независимо означает бифункциональный линкер;

каждый a и b означает целое число, выбранное из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

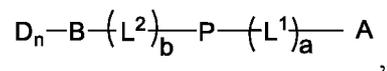
B – разветвленный линкер, причем каждая ветвь может содержать удлинительный спейсер, триггерное звено, самоликвидирующийся спейсер или любые их комбинации, причем триггерное звено представляет собой аминокислотную последовательность или триггерную группу, расщепляемую ферментом, рН-зависимый линкер, который высвобождает лекарственное средство D или его производные при кислых значениях рН, или же линкер с дисульфидной связью, который высвобождает лекарственное средство D или его производные при химическом или энзиматическом расщеплении, либо расщепляемую связь, которая высвобождает лекарственное средство D по определенному механизму расщепления;

A – моноспецифичное или мультиспецифичное антитело или антигенсвязывающий белок, включая фрагменты антител, одноцепочечные антитела, нанотела или какие-либо антигенсвязывающие фрагменты, который может быть моновалентным или мультивалентным для антигенов;

D – небольшая цитотоксическая молекула или пептид либо их производное, которые могут высвободиться из B при энзиматическом расщеплении и/или по механизму самоликвидации или рН-индуцированного гидролиза с механизмом самоликвидации или без него; причем каждый D может быть одинаковым или различным;

n – целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 и 25.

В другом аспекте изобретения предусмотрены конъюгаты по формуле Ic:

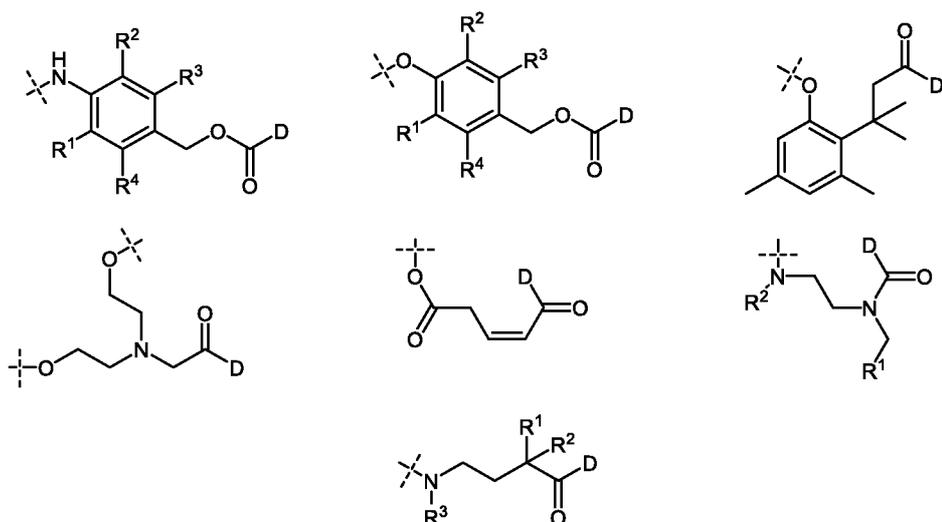


формула Ic

где каждая из переменных уже определена для формулы Ib.

В некоторых воплощениях каждая ветвь B содержит триггерную группу, например, аминокислотную последовательность или дисульфидную группу или β-глюкуронид либо β-галактозид, которая соединяется с лекарственным средством D через самоликвидирующийся спейсер или же непосредственно с лекарственным средством D и расщепляется, например, катепсином B, плазмином, матриксными металлопротеиназами (ММР), глутатионом, тиоредоксином, тиоредуктазой (Arunachalam B. et al., 2000, PNAS,

97(2), 745-750). Примеры самоликвидирующихся спейсеров включают, без ограничения, следующие:



где R^1 , R^2 , R^3 , R^4 означают H либо C_{1-10} -алкил. В таких воплощениях D означает небольшую молекулу или пептид либо их производное, содержащее активную функциональную группу с O, N или S.

В некоторых воплощениях каждая ветвь В может представлять собой рН-зависимый линкер, который может высвободить лекарственное средство D или его производные при кислых значениях рН по месту опухоли и/или внутри опухолевых клеток. Примеры кислотозависимых линкеров включают, без ограничения, следующие форматы:



В некоторых воплощениях каждая ветвь В может представлять собой линкер с дисульфидной связью, который может высвободить лекарственное средство D или его производные по месту опухоли и/или внутри опухолевых клеток при химическом или ферментативном расщеплении типа глутатиона, представителей семейства тиоредоксинов (WCGH/РСК) или тиоредуктаз.

В некоторых воплощениях А представляет собой моноспецифичное антитело, которое является моновалентным или бивалентным для антигенов, например, моноспецифичное одноцепочечное антитело, которое является моновалентным или бивалентным для антигенов.

В некоторых воплощениях А представляет собой мультиспецифичное антитело, например, биспецифичное одноцепочечное антитело.

В некоторых воплощениях два связывающих домена биспецифичного антитела связываются с двумя молекулами одного и того же опухолеассоциированного антигена (ТАА), но по двум разным эпитопам, или же связываются с двумя разными молекулами

ТАА.

В следующем воплощении А представляет собой одноцепочечное антитело против Her2×Her2 (SCAHer2×SCAHer2), которое связывается с Her2, экспрессирующимся на раковых клетках. Два связывающих домена антитела SCAHer2×SCAHer2 могут связываться с одним и тем же эпитопом на двух молекулах Her2 или же с двумя разными эпитопами на двух молекулах Her2. В некоторых воплощениях антитело имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

В некоторых воплощениях два связывающих домена одноцепочечного антитела соединяются через линкер, причем линкер может содержать группу типа цистеина либо остаток неприродной аминокислоты для сайт-специфической конъюгации антитела с L¹.

В некоторых воплощениях D может быть выбран из числа ДНК-сшивающих реагентов, ингибиторов микротрубочек, алкиляторов ДНК, ингибиторов топоизомеразы либо их комбинаций.

В некоторых воплощениях D может быть выбран из MMAE, MMAF, SN38, DM1, DM4, калихеамицинов, пирролобензодиазепинов, дуокармицинов либо их производных или комбинаций.

В некоторых воплощениях D представляет собой монометилауристин E (MMAE), антимитотический лекарственный препарат или его производное или же SN38, мощный ингибитор топоизомеразы I, либо их производные или комбинации.

В следующем воплощении D представляет собой MMAE и соединяется с самоликвидирующимся спейсером типа 4-аминобензилового спирта (PAB) и триггерной группой типа валин-цитруллин.

В приведенных выше аспектах и воплощениях неиммуногенный полимер может быть выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (PEG), декстранов, углеводных полимеров, полиалкиленоксидов, поливиниловых спиртов, гидроксипропилметакриламида (HPMA) и их сополимеров. Предпочтительно неиммуногенным полимером является PEG типа разветвленного PEG или линейного PEG. Общая молекулярная масса PEG может составлять от 5000 до 100 000 дальтон, например, от 5000 до 80 000, от 10000 до 60 000 или от 20 000 до 40 000 дальтон. PEG может соединяться с мультифункциональной группой T либо постоянной связью, либо расщепляемой связью.

Функциональная группа для сайт-специфической конъюгации, которая образует связь между (L¹)_a и белком А, может быть выбрана из группы, состоящей из тиола, малеимида, варианта 2-пиридилдитио, ароматического сульфена или винилсульфена, акрилата, бром- или йодацетамида, азида, алкина, дибензоциклооктильной (DBCO),

карбонильной, 2-аминобензальдегидной или 2-аминоацетофеноновой группы, гидразида, оксима, ацилтрифторбората калия, O-карбамоилгидроксиламина, *транс*-циклооктена, тетразина, триарилфосфина, бороновой кислоты, йода и т.п.

В некоторых воплощениях один из $(L^1)_a$ может содержать связь, образованную из азида и алкина либо из малеимида и тиола. В некоторых воплощениях алкин означает дибензоциклооктил (DBCO).

В некоторых воплощениях T означает лизин, P означает PEG, а у равно 1, тогда как алкин означает дибензоциклооктил (DBCO).

В некоторых воплощениях A может быть получен из помеченного азидом моно- или мультиспецифичного антитела или антигенсвязывающего белка, включая фрагменты антител, одноцепочечные антитела, нанотела либо их антигенсвязывающие фрагменты или комбинации, причем азид может быть конъюгирован с алкином в соответствующем $(L^1)_a$. В других воплощениях белок A может быть получен из помеченного тиолом моно- или мультиспецифичного антитела или антигенсвязывающего белка, включая фрагменты антител, одноцепочечные антитела, нанотела либо их антигенсвязывающие фрагменты или комбинации, причем тиол может быть конъюгирован с малеимидом в соответствующем $(L^1)_a$.

Вышеописанные конъюгаты антитело-лекарственное средство могут быть получены способом, включающим: (i) получение конъюгата неиммуногенного полимера и лекарственного средства с высокой нагрузкой и с концевой функциональной группой, способной к сайт-специфической конъюгации с антителом или белком или его модифицированной формой; и (ii) сайт-специфичное конъюгирование конъюгата неиммуногенного полимера и лекарственного средства с антителом или белком или его модифицированной структурой с образованием соединения по формуле Ia, Ib или Ic. В некоторых примерах антитело или белок можно модифицировать низкомолекулярным линкером перед стадией конъюгирования.

Изобретением также предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие вышеописанные конъюгаты антитело-лекарственное средство, например, конъюгаты лекарственного средства с пегилированными моно- или биспецифичными одноцепочечными антителами, которые являются моновалентными или мультивалентными для антигенов, и фармацевтически приемлемые носители.

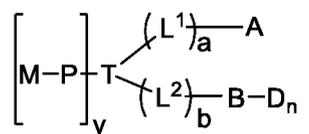
Изобретением также предусмотрен способ лечения заболеваний у нуждающихся в этом субъектов, включающий введение эффективного количества описанного выше конъюгата антитело-лекарственное средство, например, конъюгата лекарственного средства с пегилированным моно- или биспецифичным одноцепочечным антителом,

которое является моновалентным или мультивалентным для антигенов.

Далее в описании изложены подробности одного или нескольких воплощений изобретения. Другие признаки, цели и преимущества изобретения станут очевидными из чертежей, описания и формулы изобретения.

В настоящем изобретении предусмотрены следующие воплощения.

Воплощение 1. Соединение по формуле (Ib):



формула Ib

где: P означает неиммуногенный полимер;

M означает H или концевую кэспирующую группу типа C₁₋₅₀-алкила или арила, причем один или несколько атомов углерода у данного алкила необязательно заменены гетероатомами;

y – целое число от 1 до 10, например, от 1 до 5, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

A – антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

T – мультифункциональный низкомолекулярный линкер;

каждый L¹ и L² независимо означает гетеро- или гомобифункциональный линкер;

каждый из a и b – целое число от 0 до 10, например, от 0 до 5, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10;

B – разветвленный линкер, причем каждая ветвь содержит аминокислотную последовательность или углеводную группу, соединенную с самоликвидирующимся спейсером, причем расщепление аминокислотной последовательности или углеводной группы ферментом запускает механизм самоликвидации с высвобождением D, либо каждая ветвь содержит дисульфидную связь или расщепляемую связь, причем при расщеплении дисульфидной связи или расщепляемой связи высвобождается D или его производное;

каждый D независимо означает небольшую цитотоксическую молекулу или пептид; и

n – целое число от 1 до 25, например, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-25, 10-20, 10-15, 15-25, 15-20 или 20-25, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25.

Воплощение 2. Соединение по воплощению 1, при этом T означает трифункциональный линкер, полученный из молекулы с тремя функциональными

группами, выбранными независимо из гидроксила, амина, гидразинила, азиды, алкена, алкина, карбоксила (альдегида, кетона, сложного эфира, карбоновой кислоты, ангидрида, галоангидрида), тиола, дисульфида, нитрила, эпоксида, имида, нитро и галогенида, причем связи между T и $(L^1)_a$ и между T и $(L^2)_b$ одинаковы или различны.

Воплощение 3. Соединение по воплощению 2, при этом T означает лизин или происходит из лизина.

Воплощение 4. Соединение по любому из воплощений 1-3, при этом функциональная группа на конце линкера L^1 способна к сайт-специфичной конъюгации с A и выбрана из группы, состоящей из тиола, малеимида, варианта 2-пиридилдитио, ароматического сульфона или винилсульфона, акрилата, бром- или йодацетамида, азиды, алкина, дибензоциклооктила (DBCO), карбонила, 2-аминобензальдегида или 2-аминоацетофенона, гидразида, оксима, ацилтрифторбората калия, O-карбамоилгидроксиламина, *транс*-циклооктена, тетрамина, триарилфосфина, бороновой кислоты и йода.

Воплощение 5. Соединение по любому из воплощений 1-4, при этом антитело представляет собой моноспецифичное или мультиспецифичное полноразмерное антитело, одноцепочечное антитело, нанотело или его антигенсвязывающий домен.

Воплощение 6. Соединение по любому из воплощений 1-5, при этом антитело представляет собой моноспецифичное одноцепочечное антитело.

Воплощение 7. Соединение по воплощению 6, при этом моноспецифичное одноцепочечное антитело связывается с опухлеассоциированным антигеном (ТАА) типа Her2.

Воплощение 8. Соединение по воплощению 7, при этом моноспецифичное одноцепочечное антитело содержит два связывающих домена, связывающихся с Her2.

Воплощение 9. Соединение по воплощению 8, при этом моноспецифичное одноцепочечное антитело имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2.

Воплощение 10. Соединение по любому из воплощений 1-5, при этом антитело представляет собой биспецифичное антитело, например, биспецифичное одноцепочечное антитело.

Воплощение 11. Соединение по воплощению 10, при этом два связывающих домена биспецифичного антитела связываются с одним и тем же опухлеассоциированным антигеном (ТАА), с двумя разными ТАА или же с ТАА и антигеном, экспрессирующимся на T-клетках (например, компонентом T-клеточного рецептора) или NK-клетках.

Воплощение 12. Соединение по воплощению 11, при этом антитело представляет собой одноцепочечное биспецифичное антитело против Her2×Her2.

Воплощение 13. Соединение по воплощению 12, при этом антитело имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1.

Воплощение 14. Соединение по любому из воплощений 6-9, при этом два связывающих домена моноспецифичного одноцепочечного антитела соединяются через линкер, причем линкер содержит группу типа остатка цистеина или неприродной аминокислоты для сайт-специфической конъюгации антитела с L¹.

Воплощение 15. Соединение по любому из воплощений 10-13, при этом два связывающих домена биспецифичного одноцепочечного антитела соединяются через линкер, причем линкер содержит группу типа остатка цистеина или неприродной аминокислоты для сайт-специфической конъюгации антитела с L¹.

Воплощение 16. Соединение по воплощению 14 или 15, при этом неприродная аминокислота выбрана из генетически кодируемых алкен-лизинов (типа N⁶-(гекс-5-еноил)-L-лизина), 2-амино-8-оксононановой кислоты, *m*- или *n*-ацетилфенилаланина, аминокислот с β-дикетонной боковой цепью (типа 2-амино-3-(4-(3-оксобутаноил)фенил)пропановой кислоты), (S)-2-амино-6-(((1R,2R)-2-азидоциклопентилокси)карбониламино)гексановой кислоты, азидогомоаланина, аналога пирролизина N⁶-((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)-L-лизина, (S)-2-амино-6-пент-4-инамидогексановой кислоты, (S)-2-амино-6-((проп-2-инилокси)карбониламино)гексановой кислоты, (S)-2-амино-6-((2-азидоэтокси)карбониламино)гексановой кислоты, *n*-азидофенилаланина, *para*-азидофенилаланина, N-ε-акрилоил-1-лизина, N-ε-5-норборнен-2-илоксикарбонил-1-лизина, N-ε-(циклоокт-2-ин-1-илокси)карбонил)-L-лизина, N-ε-(2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)этил)карбонил-L-лизина, генетически кодируемой тетразиновой аминокислоты (типа 4-(6-метил-*s*-тетразин-3-ил)аминофенилаланина).

Воплощение 17. Соединение по любому из воплощений 1-16, при этом D выбран из ДНК-сшивающих реагентов, ингибиторов микротрубочек, алкиляторов ДНК, ингибиторов топоизомеразы либо их комбинаций.

Воплощение 18. Соединение по воплощению 17, при этом D выбран из ММАЕ, ММАF, SN38, DM1, DM4, калихеамицинов, пирролобензодиазепинов, дуокармицинов или их производных либо их комбинаций.

Воплощение 19. Соединение по воплощению 17, при этом D выбран из алкалоидов барвинка, лаулималида, таксана, колхицина, тубулизинов, криптофицинов, гемиастерлина, цемадотина, ризоксина, дискодермолида, таккалонолидов А, В, АF или АJ,

эпоксида таккалонолида AI, CA-4, эпотилона А и В, лаулималида, паклитакселя, доцетакселя, доксорубицина, камптотецина, iSGD-1882, центанамицина, PNU-159682, унциаламицина, димеров индолинобензодиазепина, β-аманитина, аматоксинов, тайланстатинов либо их производных или аналогов либо их комбинаций.

Воплощение 20. Соединение по любому из воплощений 1-19, при этом неиммуногенным полимером является полиэтиленгликоль (ПЭГ).

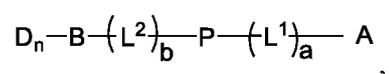
Воплощение 21. Соединение по воплощению 20, при этом ПЭГ представляет собой линейный ПЭГ или разветвленный ПЭГ.

Воплощение 22. Соединение по воплощению 20 или 21, при этом по меньшей мере один конец полиэтиленгликоля кэпирован метилом или низкомолекулярным алкилом.

Воплощение 23. Соединение по любому из воплощений 20-22, при этом общая молекулярная масса ПЭГ составляет от 100 до 80 000.

Воплощение 24. Соединение по любому из воплощений 20-23, при этом ПЭГ соединяется с трифункциональной или тетрафункциональной или какой-либо другой циклической или нециклической мультифункциональной группой Т (например, лизином) через постоянную связь или расщепляемую связь.

Воплощение 25. Соединение по формуле (Ic):



где: P означает линейный PEG;

A – антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

каждый L^1 и L^2 независимо означает бифункциональный линкер;

каждый из a и b означает целое число от 0 до 10, например, от 0 до 5, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10;

B – разветвленный линкер, причем каждая ветвь содержит аминокислотную последовательность или углеводную группу, соединенную с самоликвидирующимся спейсером, причем расщепление аминокислотной последовательности или углеводной группы ферментом запускает механизм самоликвидации с высвобождением D, или же каждая ветвь содержит дисульфидную связь или расщепляемую связь, причем при расщеплении дисульфидной связи или расщепляемой связи высвобождается D или его производное;

каждый D независимо означает небольшую цитотоксическую молекулу или пептид;

n – целое число от 1 до 25, например, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-25, 10-20, 10-15, 15-25, 15-20 или 20-25, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14,

15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25.

Воплощение 26. Соединение по воплощению 25, при этом функциональная группа на конце линкера L^1 способна к сайт-специфичной конъюгации с А и выбрана из группы, состоящей из тиола, малеимида, варианта 2-пиридилдитио, ароматического сульфона или винилсульфона, акрилата, бром- или йодацетамида, азида, алкина, дибензоциклооктила (DBCO), карбонила, 2-аминобензальдегида или 2-аминоацетофенона, гидразида, оксима, ацилтрифторбората калия, О-карбамоилгидроксиламина, *транс*-циклооктена, тетразина, триарилфосфина, бороновой кислоты и йода.

Воплощение 27. Соединение по воплощению 25 или 26, при этом антитело представляет собой моноспецифичное или мультиспецифичное полноразмерное антитело, одноцепочечное антитело, нанотело или его антигенсвязывающий домен.

Воплощение 28. Соединение по воплощению 27, при этом антитело представляет собой моноспецифичное одноцепочечное антитело, причем необязательно это моноспецифичное одноцепочечное антитело связывается с опухолевым антигеном (ТАА) типа Her2.

Воплощение 29. Соединение по воплощению 28, при этом моноспецифичное одноцепочечное антитело содержит два связывающих домена, связывающихся с Her2.

Воплощение 30. Соединение по воплощению 29, при этом моноспецифичное одноцепочечное антитело имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2.

Воплощение 31. Соединение по воплощению 27, при этом антитело представляет собой биспецифичное антитело, например, биспецифичное одноцепочечное антитело.

Воплощение 32. Соединение по воплощению 31, при этом два связывающих домена биспецифичного антитела связываются с одним и тем же опухолеассоциированным антигеном (ТАА), с двумя разными ТАА или же с ТАА и антигеном, экспрессирующимся на Т-клетках (например, компонентом Т-клеточного рецептора) или НК-клетках.

Воплощение 33. Соединение по воплощению 32, при этом антитело представляет собой одноцепочечное биспецифичное антитело против Her2×Her2.

Воплощение 34. Соединение по воплощению 33, при этом антитело имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1.

Воплощение 35. Соединение по любому из воплощений 28-30, при этом два связывающих домена моноспецифичного одноцепочечного антитела соединяются через линкер, причем линкер содержит группу типа остатка цистеина или неприродной аминокислоты для сайт-специфичской конъюгации антитела с L^1 .

Воплощение 36. Соединение по любому из воплощений 31-34, при этом два связывающих домена биспецифичного одноцепочечного антитела соединяются через линкер, причем линкер содержит группу типа остатка цистеина или неприродной аминокислоты для сайт-специфической конъюгации антитела с L¹.

Воплощение 37. Соединение по любому из воплощений 35-36, при этом остаток неприродной аминокислоты для сайт-специфической конъюгации антитела с L¹ выбран из генетически кодируемых алкен-лизинов (типа N⁶-(гекс-5-еноил)-L-лизина), 2-амино-8-оксононановой кислоты, *m*- или *n*-ацетилфенилаланина, аминокислот с β-дикетонной боковой цепью (типа 2-амино-3-(4-(3-оксобутаноил)фенил)пропановой кислоты), (S)-2-амино-6-(((1R,2R)-2-азидоциклопентилокси)карбониламино)гексановой кислоты, азидогомоаланина, аналога пирролизина N⁶-((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)-L-лизина, (S)-2-амино-6-пент-4-инамидогексановой кислоты, (S)-2-амино-6-((проп-2-инилокси)карбониламино)гексановой кислоты, (S)-2-амино-6-((2-азидоэтокси)карбониламино)гексановой кислоты, *n*-азидофенилаланина, *para*-азидофенилаланина, N-ε-акрилоил-1-лизина, N-ε-5-норборнен-2-илоксикарбонил-1-лизина, N-ε-(циклоокт-2-ин-1-илокси)карбонил)-L-лизина, N-ε-(2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)этил)карбонил-L-лизина, генетически кодируемой тетразиновой аминокислоты (типа 4-(6-метил-*s*-тетразин-3-ил)аминофенилаланина).

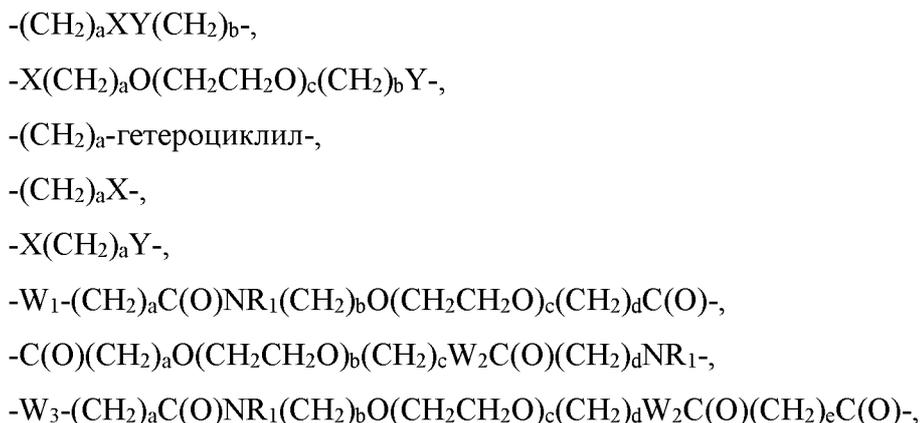
Воплощение 38. Соединение по любому из воплощений 25-37, при этом D выбран из ДНК-сшивающих реагентов, ингибиторов микротрубочек, алкиляторов ДНК, ингибиторов топоизомеразы либо их комбинаций.

Воплощение 39. Соединение по воплощению 38, при этом D выбран из ММАЕ, ММАF, SN38, DM1, DM4, калихеамицинов, пирролобензодиазепинов, дуокармицинов или их производных либо их комбинаций.

Воплощение 40. Соединение по воплощению 38, при этом D выбран из алкалоидов барвинка, лаулималида, таксана, колхицина, тубулизинов, криптофицинов, гемиастерлина, цемадотина, ризоксина, дискодермолида, таккалонолидов А, В, AF или AJ, эпоксида таккалонолида AI, CA-4, эпотилона А и В, лаулималида, паклитакселя, доцетакселя, доксорубицина, камптотецина, iSGD-1882, центанамицина, PNU-159682, унциаламицина, димеров индолинобензодиазепина, β-аманитина, аматоксинов, тайланстатинов либо их производных или аналогов либо их комбинаций.

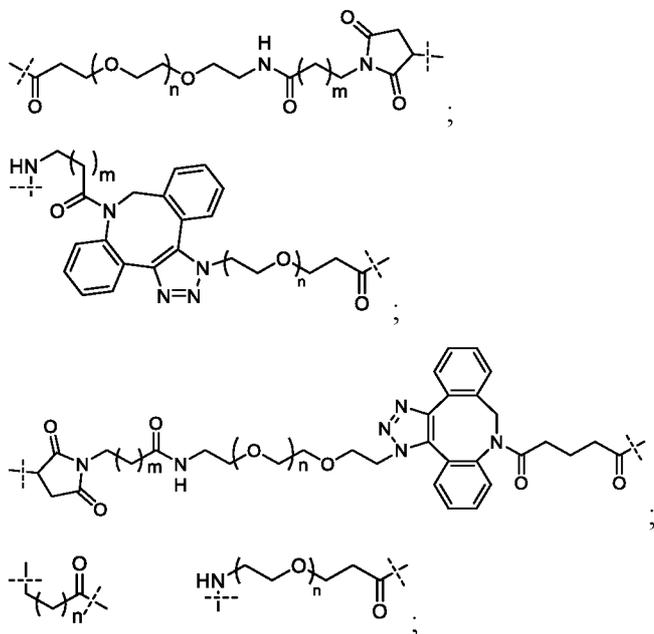
Воплощение 41. Соединение по любому из воплощений 25-40, при этом общая молекулярная масса ПЭГ составляет от 100 до 80 000.

Воплощение 42. Соединение по любому из воплощений 1-41, при этом каждый из L¹ и L² выбран независимо из:



где каждый a , b , c , d и e независимо означает целое число от 0 до 25, например, 0-20, 0-15, 0-10, 0-5, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-25, 10-20, 10-15, 15-25, 15-20 или 20-25, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25; каждый X и Y независимо означает $\text{C}(=\text{O})$, NR_1 , S , O , CR_2R_3 или ничего; R_1 и R_2 независимо означают водород, C_{1-10} -алкил или $(\text{CH}_2)_{1-10}\text{C}(=\text{O})$; W_1 и/или W_3 происходят из основанной на малеимиде группы, а W_2 – группа, содержащая триазилил или тетразолил; гетероцикл выбран из группы на основе малеимида либо группы на основе тетразолила или триазолила.

Воплощение 43. Соединение по любому из воплощений 1-41, при этом каждый из $(\text{L}^1)_a$ и $(\text{L}^2)_b$ выбран независимо из:

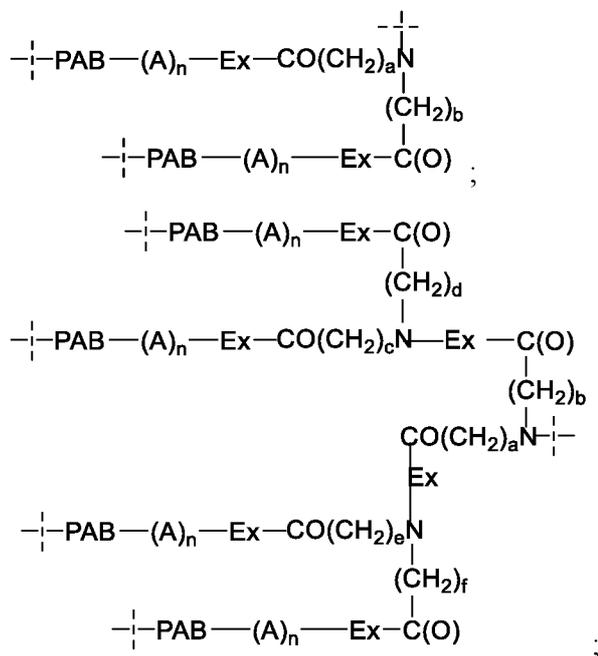


где n и m независимо означают целые числа от 0 до 20, например, 0-15, 0-10, 0-5, 5-20, 5-15, 5-10, 10-20, 10-15 или 15-20, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20.

Воплощение 44. Соединение по любому из воплощений 1-43, при этом разветвленный линкер B содержит удлинительный спейсер, триггерное звено,

самоликвидирующийся спейсер или любые их комбинации, причем необязательно триггерное звено представляет собой аминокислотную последовательность или триггерную группу β -глюкуронида или β -галактозида, расщепляемую ферментом типа катепсина В, плазмина, матричных металлопротеиназ (ММР), β -глюкуронидаз, β -галактозидаз; рН-зависимый линкер, который высвобождает лекарственное средство D или его производные при кислых значениях рН, или же линкер с дисульфидной связью, который высвобождает лекарственное средство D или его производные под действием глутатиона, представителей семейства тиоредоксинов (WCGH/РСК) или тиоредуктаз.

Воплощение 45. Соединение по воплощению 44, при этом разветвленный линкер В выбран из:

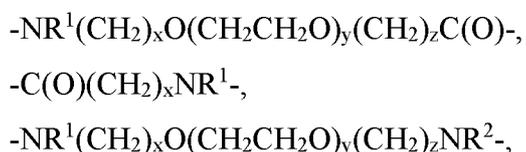


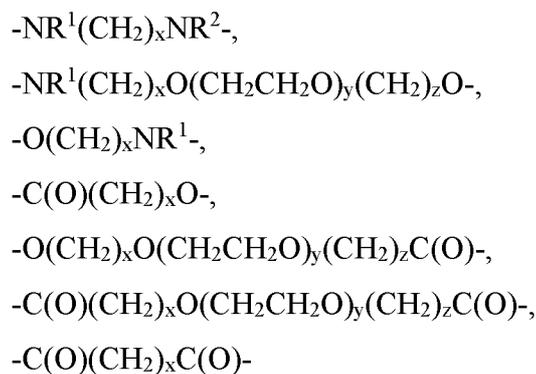
где: каждый из a, b, c, d, e и f независимо означает целое число от 1 до 25, например, 1-20, 1-15, 1-10, 1-5, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-25, 10-20, 10-15, 15-25, 15-20 или 20-25, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25;

(A)_n – триггерное звено с аминокислотной последовательностью типа Val-Cit, Val-Ala, Val-Lys, Phe-Lys, Phe-Cit, Phe-Arg, Phe-Ala, Ala-Lys, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, D-Phe-L-Phe-Lys, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Gly-Phe-Leu-Gly или Ala-Leu-Ala-Leu;

PAB – *para*-аминобензиловый спирт;

каждый Ex – удлинительный спейсер, содержащий линкерную цепь, выбранную независимо из:

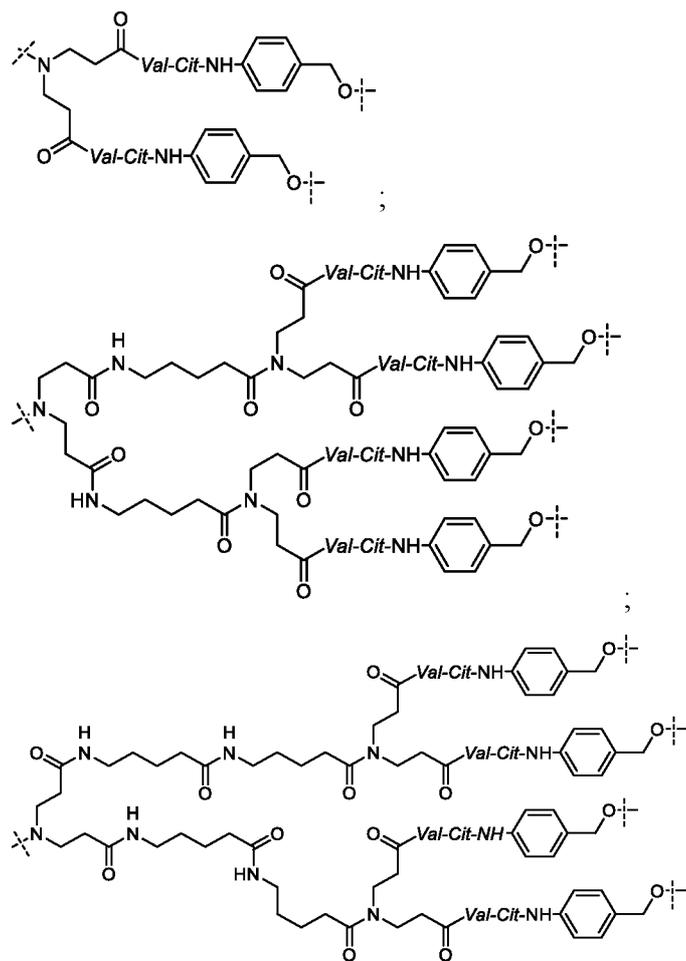




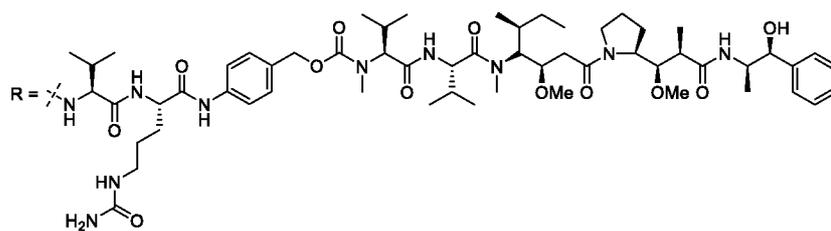
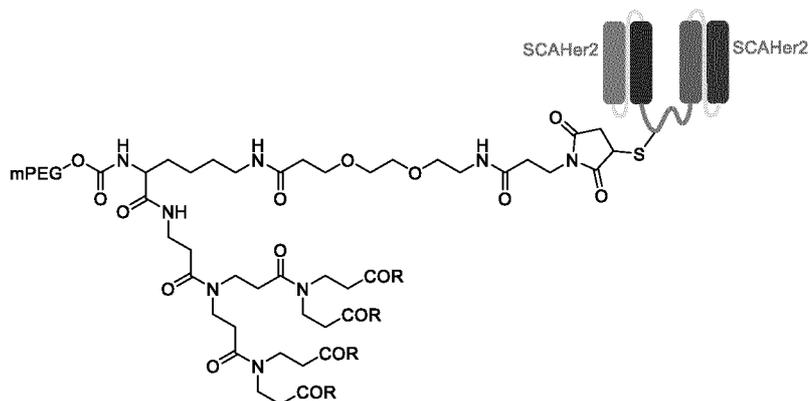
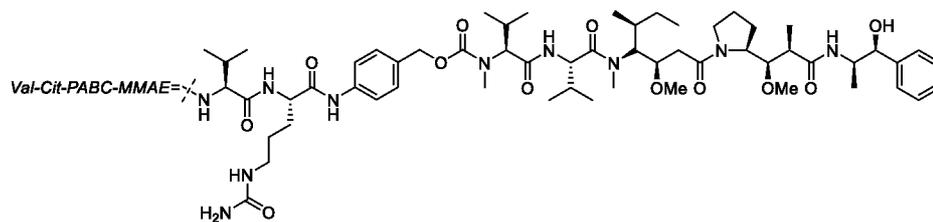
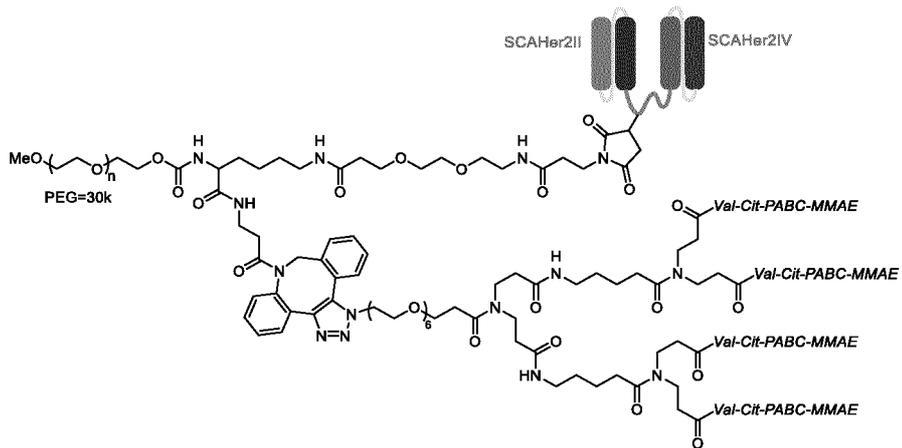
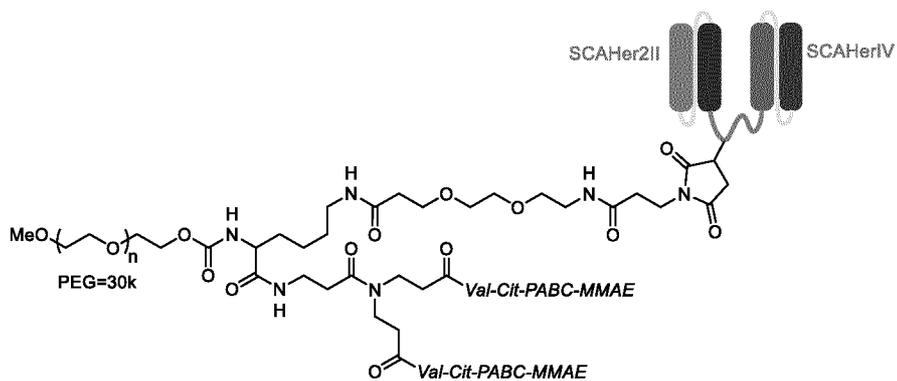
или ничего,

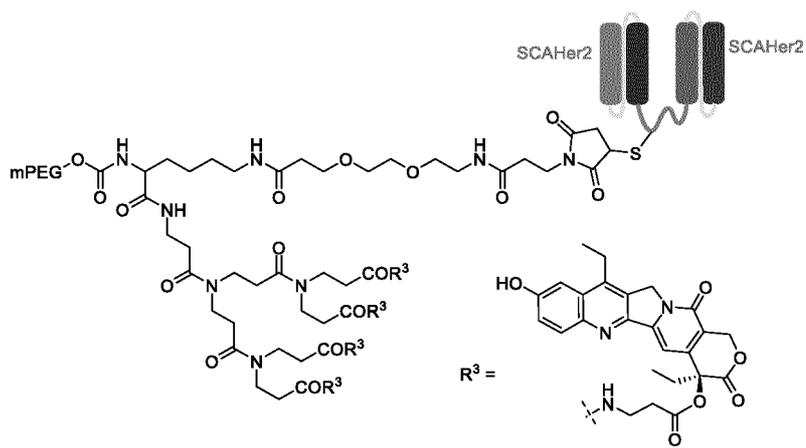
где каждый x , y и z независимо означает целое число от 0 до 25, например, 0-20, 0-15, 0-10, 0-5, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-25, 10-20, 10-15, 15-25, 15-20 или 20-25, например, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25; а R^1 и R^2 независимо означают водород или C_{1-10} -алкил.

Воплощение 46. Соединение по любому из воплощений 1-43, при этом разветвленный линкер В выбран из:



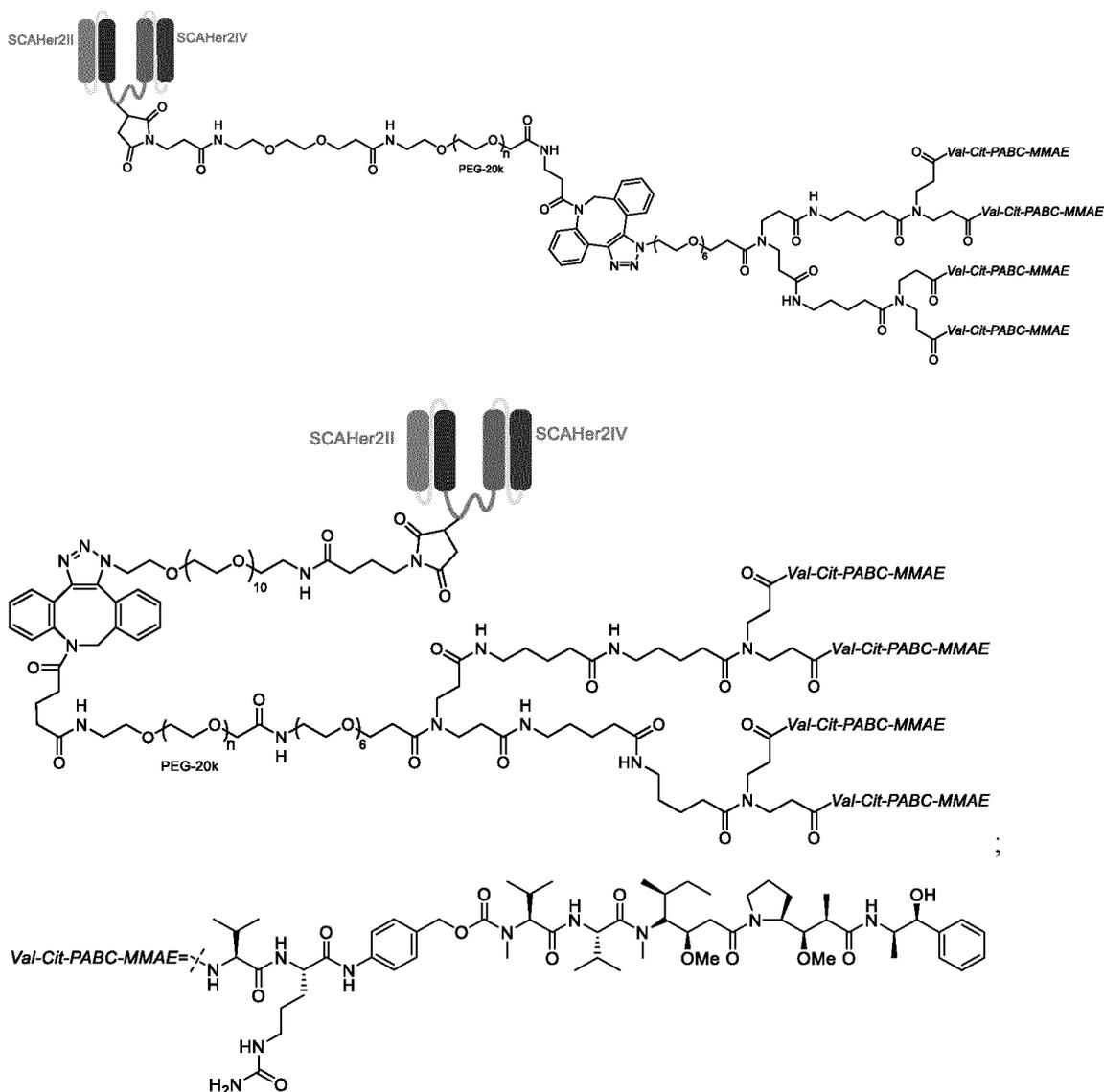
Воплощение 47. Соединение по воплощению 1, выбранное из формул:





или его фармацевтически приемлемая соль.

Воплощение 48. Соединение по воплощению 25, выбранное из формул:



Воплощение 49. Способ получения соединения по любому из воплощений 1-48, который включает:

а) стадию получения неиммуногенного модифицированного (например,

пегелированного) конъюгата лекарственного средства со свободной функциональной группой для сайт-специфической конъюгации;

b) стадию сайт-специфического конъюгирования неиммуногенного модифицированного (например, пегелированного) конъюгата лекарственного средства с антителом, получая соединение по формуле (Ib) или (Ic).

Воплощение 50. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество соединения по любому из воплощений 1-48 и фармацевтически приемлемую соль, носитель или эксципиент.

Воплощение 51. Соединение по любому из воплощений 1-48 для применения при лечении рака, выбранного из группы, состоящей из рака молочной железы, рака яичников, рака предстательной железы, рака легких, рака поджелудочной железы, рака почек, рака мочевого пузыря, рака желудка, рака толстой кишки, колоректального рака, рака слюнных желез, рака щитовидной железы и рака эндометрия.

Воплощение 52. Соединение по любому из воплощений 1-48 для применения в комбинации с эффективным количеством другого противоракового средства или иммунодепрессанта при лечении рака, выбранного из группы, состоящей из рака молочной железы, рака яичников, рака предстательной железы, рака легких, рака поджелудочной железы, рака почек, рака мочевого пузыря, рака желудка, рака толстой кишки, колоректального рака, рака слюнных желез, рака щитовидной железы и рака эндометрия.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 схематически представлена схема реакции получения промежуточного соединения 7 с разветвленным линкером, описанного в примере 1.

На фиг. 2 схематически представлена схема реакции получения соединения 14 Val-Cit-PAB-MMAE, описанного в примере 1.

На фиг. 3 схематически представлена схема реакции получения соединения 19 30kmPEG-Lys(Mal)-(Val-Cit-PAB-MMAE)₄, описанного в примере 1.

На фиг. 4 схематически представлена схема реакции получения соединения 20 30kmPEG-Lys(SCAHer2/SCAHer2)-(Val-Cit-PAB-MMAE)₄, описанного в примере 3.

На фиг. 5 схематически представлена схема реакции получения соединения 7 Val-Cit-PABC-MMAE в примере 4.

На фиг. 6 схематически представлена схема реакции получения соединения 13 (разветвленного линкера В с 2×MMAE) в примере 5.

На фиг. 7 схематически представлена схема реакции получения соединения 18 (разветвленного линкера В с 2×MMAE) в примере 6.

На фиг. 8 схематически представлена схема реакции получения соединения 22 (разветвленного линкера В с 4×ММАЕ) в примере 7.

На фиг. 9 схематически представлена схема реакции получения соединения 27 (разветвленного линкера В с 4×ММАЕ) в примере 8.

На фиг. 10 схематически представлена схема реакции получения соединения 32 (30kmPEG(малеимид)-2ММАЕ) в примере 9.

На фиг. 11 схематически представлена схема реакции получения соединения 35 (20kmPEG(малеимид)-4ММАЕ) в примере 10.

На фиг. 12 схематически представлена схема реакции получения соединения 39 (Малеимид-20mPEG-4ММАЕ) в примере 11.

На фиг. 13 схематически представлена схема реакции получения соединения 41 (DBCO-20mPEG-4ММАЕ) в примере 12.

На фиг. 14 представлен анализ методами SDS-PAGE и SEC-HPLC очищенного соединения 42 (SCAHer2II×SCAHer2IV) в примере 13.

На фиг. 15 схематически представлена схема реакции получения соединения 43 [30kmPEG-(SCAHer2II/SCAHer2IV)-2ММАЕ] и анализ методом SDS-PAGE в примере 14.

На фиг. 16 схематически представлена схема реакции получения соединения 44 [SCAHer2II/SCAHer2IV-20kPEG-4ММАЕ] и анализ методом SDS-PAGE в примере 15.

На фиг. 17 показано, что соединение 43 (JY201) обладает сильной цитотоксичностью *in vitro* в примере 16.

На фиг. 18 показано, что соединение 44 (JY201b) с одинаковым грузом более эффективно, чем T-DM1, индуцирует цитотоксичность *in vitro* для опухолевых клеток в примере 16.

На фиг. 19 показано, что пегилированный BsADC 43 (JY201) проявляет повышенную интернализацию в целевые клетки в примере 14.

На фиг. 20 показано, что пегилированный BsADC 43 (JY201) остается в целевых клетках после интернализации в примере 15.

На фиг. 21 показано, что пегилированный BsADC 43 (JY201) не проявляет токсичности в отношении мегакариоцитов в примере 16.

Раскрытие сущности изобретения

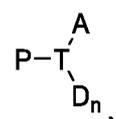
В настоящем изобретении предусмотрены пегилированные моно- или мультиспецифичные конъюгаты антитело-лекарственное средство. В данном изобретении нет необходимости в разрыве двух или нескольких дисульфидных связей антитела для достижения высокого DAR и можно получать однородные ADC, что дает значительное преимущество перед гетерогенными ADC в отношении токсичности, эффективности,

регулирования и производства, особенно при получении мультиспецифичных ADC.

Кроме того, в данном изобретении предусмотрен новый формат структуры пегилированных конъюгатов моно- или биспецифичных одноцепочечных антител с лекарственными средствами, который не только не проявляет токсичности в отношении мегакариоцитов или других нормальных клеток и расширяет терапевтическое окно, но также усиливает противоопухолевое действие конъюгатов за счет усиления интернализации и сравнительно небольшого размера молекул одноцепочечных антител для глубокого проникновения в солидные опухоли. Соответственно, данное изобретение решает проблемы современных технологий ADC и улучшает терапию рака с помощью новых пегилированных конъюгатов моно- или мультиспецифичных одноцепочечных антител с лекарственными средствами.

Конъюгаты

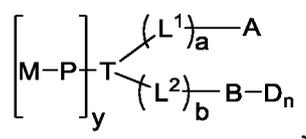
В одном аспекте изобретения предусмотрены соединения по формуле (Ia):



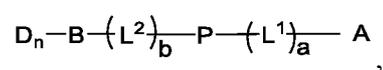
формула (Ia)

где: P означает неиммуногенный полимер; T означает мультифункциональную (например, трифункциональную) низкомолекулярную группу линкера и содержит по меньшей мере одну функциональную группу, способную к сайт-специфичной конъюгации с антителом или белком; A – моноспецифичное или мультиспецифичное антитело или белок, как-то полноразмерное антитело, одноцепочечное антитело, нанотело или его антигенсвязывающий фрагмент, либо их комбинация; D – небольшая цитотоксическая молекула или пептид ($n = 1-25$), причем каждый D может быть одинаковым или различным.

В частности, в одном аспекте изобретения предусмотрены конъюгаты по формуле Ib или Ic:



формула Ib



формула Ic

где: P означает неиммуногенный полимер типа PEG;

M означает H или концевую кэппирующую группу типа C₁₋₅₀-алкила или арила,

причем один или несколько атомов углерода у данного алкила необязательно заменены гетероатомами;

u – целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

T – группа, содержащая две или несколько функциональных групп, причем связи между T и $(L^1)_a$ и между T и $(L^2)_b$ могут быть одинаковыми или разными;

каждый L^1 и L^2 независимо означает бифункциональный линкер;

каждый a и b означает целое число, выбранное из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10;

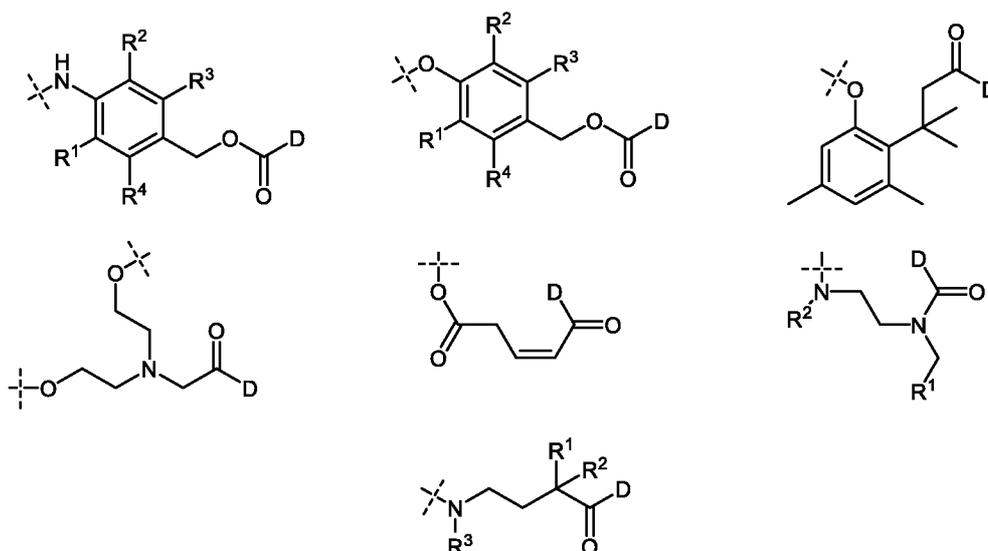
B – разветвленный линкер, причем каждая ветвь может содержать удлинительный спейсер, триггерное звено, самоликвидирующийся спейсер или любые их комбинации, причем триггерное звено представляет собой аминокислотную последовательность или триггерную группу β -глюкуронида или β -галактозида, расщепляемую ферментом типа катепсина В, плазмина, матриксных металлопротеиназ (ММР), β -глюкуронидаз, β -галактозидаз; рН-зависимый линкер, который высвобождает лекарственное средство D или его производные при кислых значениях рН, или же линкер с дисульфидной связью, который высвобождает лекарственное средство D или его производные под действием глутатиона, представителей семейства тиоредоксинов (WCGH/РСК) или тиоредуктаз;

A – моноспецифичное или мультиспецифичное антитело или антигенсвязывающий белок, включая фрагменты антител, одноцепочечные антитела, нанотела или какие-либо антигенсвязывающие фрагменты, который может быть моновалентным или мультивалентным для антигенов;

D – небольшая цитотоксическая молекула или пептид либо их производное, которые могут высвободиться из B при энзиматическом расщеплении и/или по механизму самоликвидации или рН-индуцированного гидролиза; причем каждый D может быть одинаковым или различным;

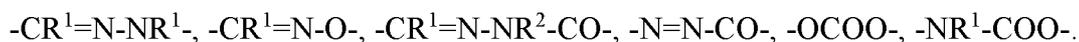
n – целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 и 25.

В некоторых воплощениях каждое ответвление B содержит триггерную группу, например, аминокислотную последовательность или дисульфидную группу либо β -глюкуронид или β -галактозид, которая соединяется с лекарственным средством D через самоликвидирующийся спейсер или же непосредственно с лекарственным средством D . Примеры самоликвидирующихся спейсеров включают, без ограничения, следующие:



где R^1 , R^2 , R^3 , R^4 означают H или C_{1-10} -алкил. В таких воплощениях D означает низкомолекулярное или пептидное лекарственное средство либо его производное, содержащее активную функциональную группу с O, N или S.

В некоторых воплощениях каждая ветвь В может содержать рН-зависимый линкер, который может высвобождать лекарственное средство D или его производные при кислых значениях рН по месту опухоли и/или внутри опухолевых клеток. Примеры кислотозависимых линкеров включают, без ограничения, следующие форматы:



В некоторых воплощениях каждая ветвь В может содержать линкер с дисульфидной связью, который может высвобождать лекарственное средство D или его производные по месту опухоли и/или внутри опухолевых клеток при химическом или ферментативном расщеплении, например, под действием глутатиона, представителей семейства тиоредоксинов (WCGH/PCK) или тиоредуктаз.

В некоторых воплощениях А представляет собой одноцепочечное биспецифичное антитело, которое способно связываться с двумя разными эпитопами на двух антигенах Her2 (SCAHer2II×SCAHer2IV).

В некоторых воплощениях SCAHer2II×SCAHer2IV может иметь следующую аминокислотную последовательность:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY
 TGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTGGSGGSG
 GSGGSGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVAD
 VNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSTFYFDY
 WGQGTLLTVSSGCGSGGSGGSGGSGGSGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDT
 YIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED
 TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSGSGGSGGSGGSGGSGGDIQMTQSPSSLSA

SVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGKVEIKRTHHHHHH (SEQ ID NO: 1).

В некоторых воплощениях А представляет собой одноцепочечное моноспецифичное антитело против Her2×Her2, которое способно связываться с двумя одинаковыми эпитопами на двух антигенах Her2.

В некоторых воплощениях SCAHer2IV/SCAHer2IV может иметь следующую аминокислотную последовательность:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGKVEIKRTGGSGGSGGGSGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSGCGSGGSGGSGGSGGDIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGKVEIKRTGGSGGSGGSGGSGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSHHHHHH (SEQ ID NO: 2).

В некоторых воплощениях А представляет собой одноцепочечное биспецифичное антитело, которое способно связываться с двумя разными антигенами Her2 и Her3 (SCAHer2×SCAHer3).

В некоторых воплощениях SCAHer2IV×SCAHer3 может иметь следующую аминокислотную последовательность:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGKVEIKRTGGSGGSGGGSGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSGCGSGGSGGSGGSGGQVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCVYGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHSGSTNTNPSLKSRTISVETSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLTVSSGSGGSGGSGGSGGDIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNYLAWYQQNPGQPPLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQGKVEIKHHHHHH (SEQ ID NO: 3).

В некоторых воплощениях А представляет собой одноцепочечное биспецифичное антитело, которое связывается с Met1 и Met2 (SCAc-Met1×SCAc-Met2).

В некоторых воплощениях SCAc-Met1×SCAc-Met2 может иметь следующую аминокислотную последовательность:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICSVSSSVSSIYHWHYQQKPGKAPKLLIYSTSNLA

SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCIQYSGYPLTFGGGKVEIKGGSGGSGGS
 GGSQQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYYMHWVRQAPGQGLEWMGR
 VNPNRGGTTYNQKFEGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARTNWLWDYWGQ
 GTTVTVSGCGSGGSGGSGGSGGQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYIFTAYTMH
 WVRQAPGQGLEWMGWIKPNNGLANYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELRSLRSDDTA
 VYYCARSEITTEFDYWGQGLVTVSSGGSGGSGGSGGSGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERA
 TINCKSSESVDSYANSFLHWYQQKPGQPPKLLIYRASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTI
 SLQAEDVAVYYCQQSKEDPLTFGGGKVEIKRHHHHHH (SEQ ID NO: 4).

В некоторых воплощениях D может высвободиться по месту опухоли или внутри опухолевых клеток при энзиматическом расщеплении и/или по механизму самоликвидации или pH-индуцированного гидролиза.

В некоторых воплощениях D может быть выбран из числа ДНК-сшивающих реагентов, ингибиторов микротрубочек, алкиляторов ДНК, ингибиторов топоизомеразы либо их комбинаций.

В некоторых воплощениях D может быть выбран из ауристатина (ММАЕ, ММАФ), алкалоидов барвинка, лаулималида, таксана, колхицина, майтансинов (DM1, DM4), тубулизинов, криптофицинов, гемиастерлина, цемадотина, ризоксина, дискодермолида, таккалонолидов А, В, АF или АJ, эпоксида таккалонолида АI, СА-4, эпотилона А и В, лаулималида, паклитакселя, доцетакселя, пирролобензодиазепинов, дуокармицинов, доксорубицина, калихеамицинов, камптотецина, SN38, iSGD-1882, центанамицина, PNU-159682, унциаламицина, димеров индолинобензодиазепина, аматоксинов, тайланстатинов либо их производных или аналогов либо их комбинаций.

В некоторых воплощениях D представляет собой монометилауристатин Е (ММАЕ), антимитотический препарат или его производное или же SN38, мощный ингибитор топоизомеразы I, либо их производные или комбинации.

В других воплощениях D соединяется с самоликвидирующимся спейсером типа 4-аминобензилового спирта (PAB) и триггерной группой типа валин-цитруллин с образованием Val-Cit-PAB-D.

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрены способы получения пегилированных конъюгатов с лекарственными средствами, способных к сайт-специфической конъюгации с белком или антителом, включая фрагменты антител или одноцепочечные моно- или мультиспецифичные антитела. В другом аспекте изобретения предусмотрены способы получения пегилированных одноцепочечных BsADC.

Для получения пегилированного одноцепочечного BsADC можно синтезировать кодирующую последовательность или вектор, несущий кодирующую последовательность

моноспецифичного одноцепочечного антитела с валентностью от 1 до 5 или одноцепочечного биспецифичного антитела, и ввести, например, в экспрессирующую систему СНО. Белки можно экспрессировать и очистить, как описано ранее (WO 2018/075308).

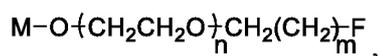
Для получения пегилированного конъюгата лекарственного средства с боковой цепью, содержащей функциональную группу для сайт-специфической конъюгации, можно активировать концевую функциональную группу ПЭГ типа гидроксильной или карбоксильной группы и конъюгировать с трифункциональной низкомолекулярной группой типа защищенного Boc или Fmoc лизина, получая разветвленный на конце гетеробифункциональный ПЭГ. Новообразованную карбоксильную группу можно соединить с разветвленным спейсером, получая PEG-Lys(Boc)-B. После сопряжения можно удалить защитную группу и соединить разблокированный пегилированный разветвленный линкер с низкомолекулярным линкером, содержащим функциональную группу для сайт-специфичной конъюгации типа малеимида или DBCO, получая PEG-Lys(Mal)-B или PEG-Lys(DBCO)-B. Пегилированный конъюгат лекарственного средства типа PEG-Lys(Mal)-B-(Val-Cit-PAB-MMAE)_n или PEG-Lys(DBCO)-B-(Val-Cit-PAB-MMAE)_n можно получить по реакции сочетания PEG-Lys(Mal)-B или PEG-Lys(DBCO)-B с Val-Cit-PAB-MMAE, где n – целое число типа 2. Конечная стадия синтеза – сайт-специфичная конъюгация пегилированного конъюгата лекарственного средства с помеченным тиолом или азидом одноцепочечным биспецифичным антителом.

С другой стороны, для получения пегилированного конъюгата лекарственного средства с боковой цепочкой, содержащей функциональную группу для сайт-специфической конъюгации, можно активировать концевую функциональную группу ПЭГ типа гидроксильной или карбоксильной группы и конъюгировать с трифункциональной низкомолекулярной группой типа защищенного Boc или Fmoc лизина, получая разветвленный на конце гетеробифункциональный ПЭГ, а затем удалить защитную группу. Соединение с ПЭГ после разблокирования можно соединить с низкомолекулярным линкером, содержащим функциональную группу для сайт-специфичной конъюгации типа малеимида или DBCO, получая PEG-Lys(Mal)-OH или PEG-Lys(DBCO)-OH. Затем можно соединить PEG-Lys(Mal)-OH или PEG-Lys(DBCO)-OH с разветвленной группой, каждая ветвь которой соединяется с лекарственным средством D через удлинительный спейсер, триггерное звено и/или самоликвидирующийся спейсер, получая пегилированный конъюгат лекарственного средства типа PEG-Lys(Mal)-B-(Val-Cit-PAB-MMAE)_n или PEG-Lys(DBCO)-B-(Val-Cit-PAB-MMAE)_n, где n – целое число типа 2. Конечная стадия синтеза – сайт-специфичная конъюгация пегилированного конъюгата

лекарственного средства с помеченным тиолом или азидом одноцепочечным биспецифичным антителом с образованием соединения по формуле Ia или Ib. С другой стороны, пегилированный конъюгат лекарственного средства можно синтезировать из коммерчески доступного гетеробифункционального ПЭГ по аналогичной процедуре, получая соединение по формуле Ic.

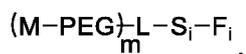
PEG-линкеры

В одном воплощении настоящего изобретения ПЭГ может иметь формулу:



где n – целое число от 1 до 2300, предпочтительно образуя полимер с общей молекулярной массой от 5000 до 40000 или больше, если нужно; M означает H, метил или другой низкомолекулярный алкил, а неограничительные примеры M включают H, метил, этил, изопропил, пропил, бутил или $F_1(CH_2)_qCH_2$; F и F_1 независимо означают концевые функциональные группы типа гидроксила, карбоксила, тиола, галогенида, аминогруппы и т.п., которые могут подвергаться функционализации, активации и/или конъюгации с низкомолекулярным спейсером или линкером; q и m – целые числа от 0 до 10.

В другом воплощении настоящего изобретения способ также может выполняться и с альтернативным разветвленным ПЭГ. Разветвленный ПЭГ может иметь формулу:



где PEG – полиэтиленгликоль; m – целое число от 2 до 10, предпочтительно образуя разветвленный ПЭГ с общей молекулярной массой от 5000 до 80000 или больше, если нужно; M означает метил или другой низкомолекулярный алкил; L – функциональная удлинительная группа, к которой присоединены два или несколько ПЭГ, а неограничительные примеры такой удлинительной группы включают аминокислоты типа глицина, аланина, лизина или 1,3-диамино-2-пропанол, триэтаноламин, 5- или 6-членные ароматические кольца или алифатические кольца с более чем двумя функциональными группами; S – нерасщепляемый спейсер; F – концевая функциональная группа типа гидроксила, карбоксила, тиола, аминогруппы; i равно 0 или 1. Когда i равно 0, формула имеет следующий вид: $(M-PEG)_mL$, где каждая переменная PEG, m, M или L имеет те же значения, что и выше.

Способ по настоящему изобретению также может выполняться с альтернативными полимерными веществами, такими как декстраны, углеводные полимеры, полиалкиленоксиды, поливиниловые спирты или другие подобные неиммуногенные полимеры, концевые группы которых могут подвергаться функционализации или активации. Приведенный список является просто иллюстративным и не предназначен для

ограничения типа неантигенных полимеров, пригодных для применения в настоящем изобретении.

Трифункциональный линкер Т

Т представляет собой трифункциональный линкер, соединяющийся с Р, $(L^1)_a$ и $(L^2)_b$. Т может происходить из молекул с любыми комбинациями трех функциональных групп, неограничительные примеры которых включают гидроксил, амино, гидразинил, азид, алкен, алкин, карбоксил (альдегид, кетон, сложный эфир, карбоновая кислота, ангидрид, галоангидрид), тиол, дисульфид, нитрил, эпоксид, имин, нитро и галогенид. Функциональные группы в трифункциональном линкере могут быть одинаковыми или разными. В некоторых воплощениях одна или две функциональные группы могут быть защищенными для селективного конъюгирования с другими партнерами по реакции. В данной области известны различные защитные группы, в том числе, к примеру, приведенные в *Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York)*. Функциональные группы также могут быть преобразованы в другие группы до или после реакции между Т и другим партнером реакции. Например, гидроксильная группа может быть преобразована в мезилатную или тозилатную группу. Галогенид может быть заменен на азидную группу. Кислотная функциональная группа в Т может быть преобразована в алкиновую функциональную группу путем связывания с аминогруппой, несущей концевой алкин.

В типичных воплощениях Т происходит из лизина, 1,3-диамино-2-пропанола или триэтанолamina. Одна или несколько функциональных групп в этих молекулах могут быть защищенными для селективных реакций. В некоторых воплощениях Т происходит из защищенного Вос лизина.

Бифункциональные линкеры L^1 и L^2

Оба линкера L^1 и L^2 содержат линкерные цепи, которые могут быть выбраны независимо из $-(CH_2)_aXY(CH_2)_b-$, $-X(CH_2)_aO(CH_2CH_2O)_c(CH_2)_bY-$, $-(CH_2)_a$ -гетероцикл- $-(CH_2)_aX-$ и $-X(CH_2)_aY-$, где а, b и с – целые числа от 0 до 25, включая все промежуточные; X и Y выбраны независимо из C(=O), NR_1 , S, O, CR_2R_3 или ничего; а R_1 , R_2 и R_3 означают водород, C_{1-10} -алкил или $(CH_2)_{1-10}C(=O)$.

Связующая группа с гетероциклилом в линкерах L^1 и L^2 (будь то во внутреннем положении или в концевом положении) может происходить из основанной на малеимиде группы. Неограничительные примеры подходящих предшественников включают N-сукцинимидил-4-(малеимидометил)циклогексанкарбоксилат (SMCC), N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбокси-(6-амидокапроат) (LC-SMCC), N-сукцинимидиловый эфир к-малеимидоундекановой кислоты (KMUA), N-

сукцинимидиловый эфир γ -малеимидомасляной кислоты (GMBS), N-гидроксисукцинимидный эфир ϵ -малеимидокапроновой кислоты (EMCS), *m*-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный эфир (MBS), N-(α -малеимидоацетокси)сукцинимидный эфир (AMAS), сукцинимидил-6-(β -малеимидопропионамидо)гексаноат (SMPH), N-сукцинимидил-4-(*n*-малеимидофенил)бутират (SMPB) и N-(*n*-малеимидофенил)изоцианат (PMPI).

В некоторых других неограничительных типичных воплощениях каждое линкерное звено также может происходить из галоацетильной группы, выбранной из N-сукцинимидил-4-(йодацетил)-аминобензоата (SIAB), N-сукцинимидил-йодацетата (SIA), N-сукцинимидил-бромацетата (SBA) и N-сукцинимидил-3-(бромацетамидо)пропионата (SBAP).

С другой стороны, связующей группой с гетероциклилом в линкерах может быть тетразолил или триазолил, который образуется при конъюгировании различных линкерных группировок типа DBCO и азида. Таким образом, группа с гетероциклилом служит в качестве связующей точки.

В некоторых воплощениях каждый из $(L^1)_a$ и $(L^2)_b$ может содержать:

$-X^1-(CH_2)_aC(O)NR(CH_2)_bO(CH_2CH_2O)_c(CH_2)_dC(O)-$ или

$-C(O)(CH_2)_aO(CH_2CH_2O)_b(CH_2)_cX^2C(O)(CH_2)_dNR-$ или

$-X^3-(CH_2)_aC(O)NR(CH_2)_bO(CH_2CH_2O)_c(CH_2)_dX^2C(O)(CH_2)_eC(O)-$,

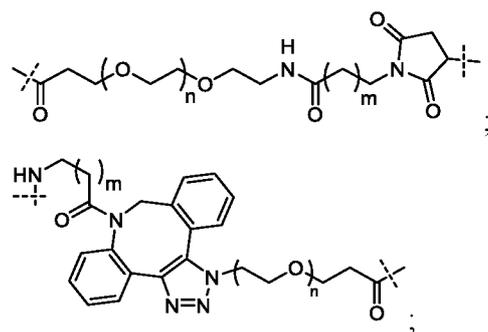
где: X^1 , X^2 и X^3 могут быть одинаковыми или разными и независимо означают гетероциклил;

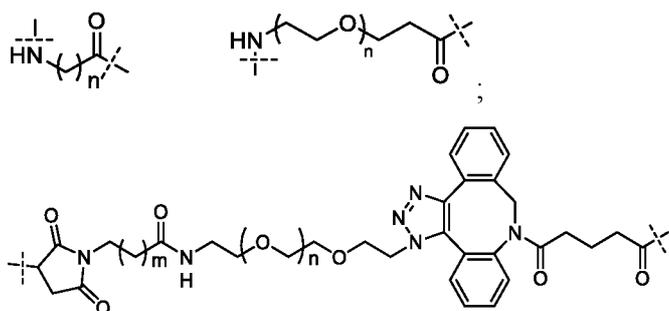
a , b , c , d и e – целые числа, выбранные из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 и 25; и

R означает водород или C_{1-10} -алкил.

В некоторых воплощениях X^1 и/или X^3 происходят из основанной на малеимиде группы. В некоторых воплощениях X^2 означает группу, содержащую триазолил или тетразолил. В некоторых воплощениях R означает водород. В некоторых воплощениях каждый из a , b , c , d и e выбран независимо из 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10.

В некоторых типичных воплощениях $(L^1)_a$ и $(L^2)_b$ могут быть выбраны из:



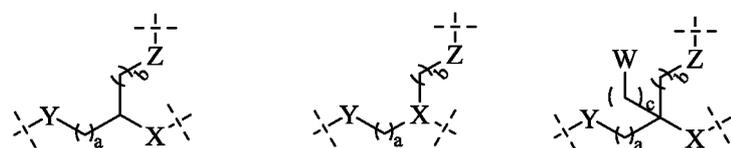


где n и m независимо означают целые числа от 0 до 20.

Разветвленный линкер В

Разветвленный линкер В может содержать разветвляющееся звено, удлинительный спейсер, триггерное звено, самоликвидирующийся спейсер или любые их комбинации.

В некоторых воплощениях разветвляющееся звено включает структуры, которые могут быть выбраны независимо из:

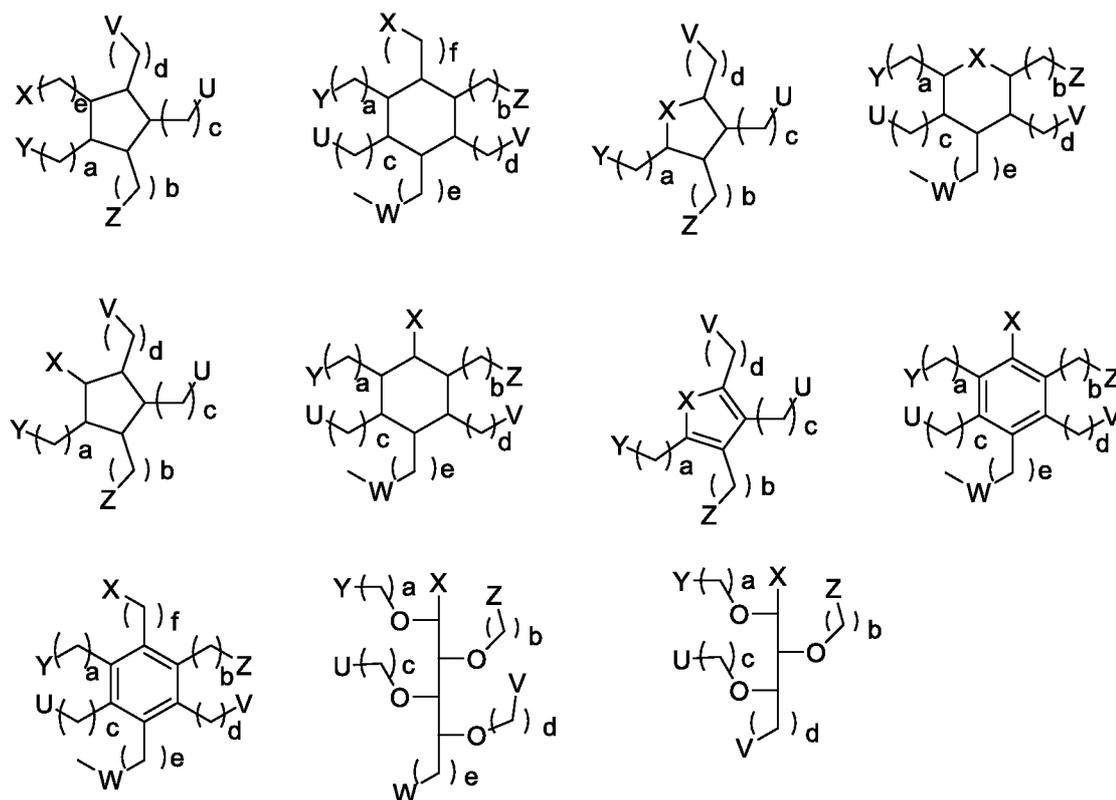


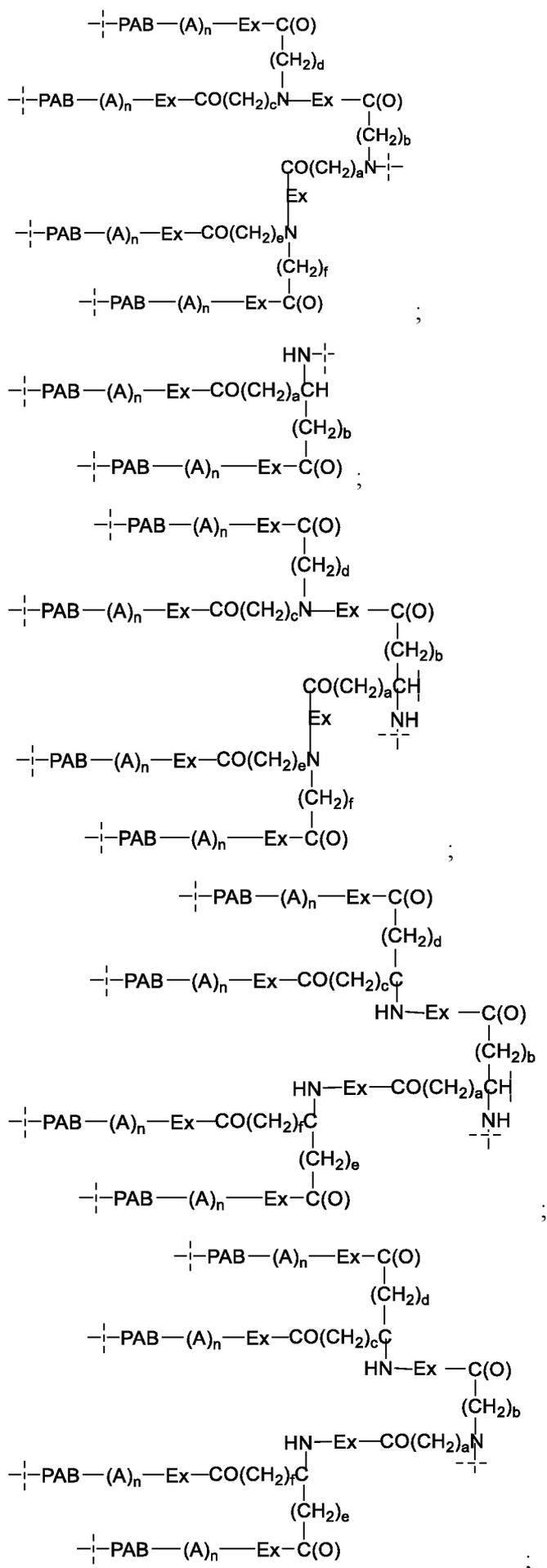
где: X, Y, Z, W = C(O), NR¹, NR², O, N или ничего;

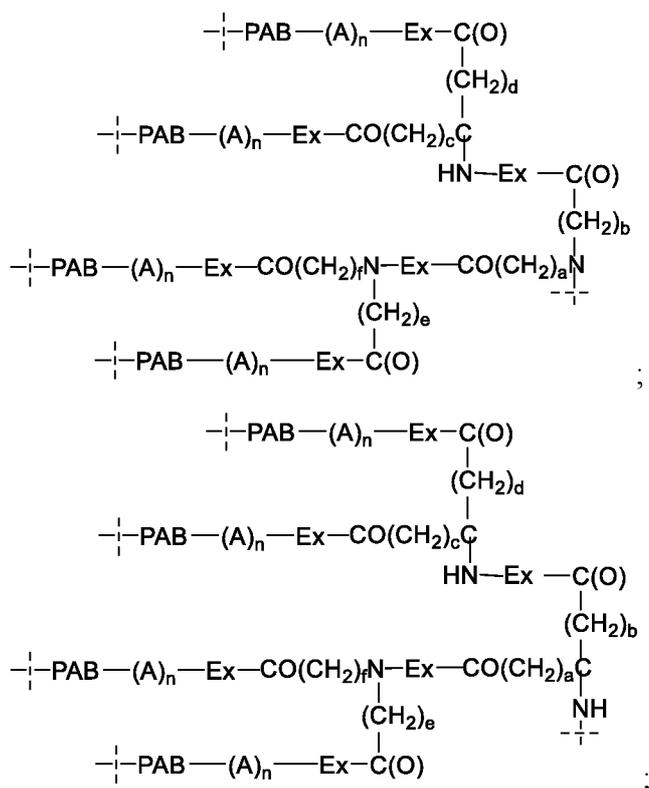
a, b, c = 0-10;

R¹ и R² независимо означают водород или C₁₋₁₀-алкил.

В других воплощениях разветвляющееся звено включает структуры, которые могут быть выбраны независимо из:





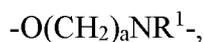


где: a, b, c, d, e и f – целые числа от 1 до 25;

(A)_n – триггерное звено с аминокислотной последовательностью, где каждый А независимо означает аминокислоту, а n – целое число от 1 до 25;

PAB – *para*-аминобензиловый спирт;

Ex – удлинительный спейсер, содержащий линкерные цепи, которые могут быть выбраны независимо из:



или ничего;

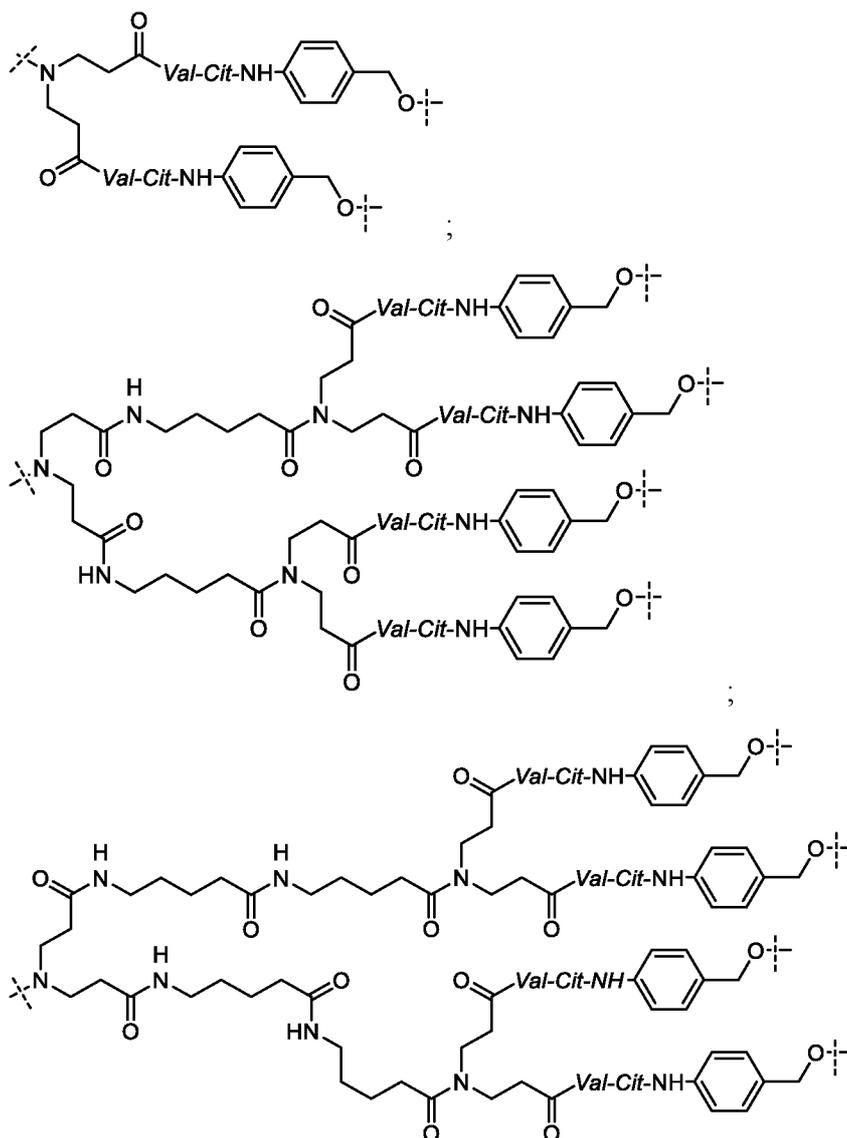
где a, b и c – целые числа от 1 до 25, включая все промежуточные; а R¹ и R² независимо означают водород или C₁₋₁₀-алкил.

В некоторых других воплощениях триггерное звено с аминокислотной

последовательностью может представлять собой Val-Cit, Val-Ala, Val-Lys, Phe-Lys, Phe-Cit, Phe-Arg, Phe-Ala, Ala-Lys, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, D-Phe-L-Phe-Lys, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Gly-Phe-Leu-Gly или Ala-Leu-Ala-Leu; либо их защищенные формы.

Для предпочтительных воплощений аминокислотная последовательность может представлять собой Val-Cit, Phe-Lys или Val-Lys.

В некоторых типичных воплощениях разветвленный линкер В может быть выбран из:



VI. Связующие группы

Различные части конъюгатов по настоящему изобретению могут соединяться через различные химические связи. Их примеры включают, без ограничения, амиды, сложные эфиры, дисульфиды, простые эфиры, амины, карбаматы, гидразины, тиоэфиры и карбонаты. Например, конечная гидроксильная группа молекулы ПЭГ (Р) может быть активирована, а затем соединена с лизином (Т), обеспечивая требуемую связующую точку

между Р и Т по формуле Ia или Ib. Связующая группа между Т и L¹ или между Т и L² или между L² и В может представлять собой амид, образующийся при реакции между аминогруппой линкера L² и карбоксильной группой лизина (Т) или между карбоксильной группой L¹ и аминогруппой Т или между карбоксильной группой L² и аминогруппой В. В зависимости от требуемых характеристик конъюгата подходящие связующие группы также могут быть вставлены между молекулой антитела (А) и соседним линкером L¹ или между любыми двумя аминокислотами или между аминокислотой и *пара*-аминобензиловым спиртом.

В некоторых воплощениях связующие группы между различными частями конъюгатов могут возникать при соединении пары функциональных групп, обладающих присущим им химическим сродством или селективностью друг к другу. Такие типы связывания или образования кольца способствуют сайт-специфической конъюгации для введения молекулы белка или антитела. Неограничительные примеры таких функциональных групп, которые приводят к сайт-специфической конъюгации, включают тиол, малеимид, варианты 2'-пиридилдитио, ароматические или винилсульфоны, акрилаты, бром- или йодацетамид, азиды, алкины, дибензоциклооктил (DBCO), карбонил, 2-аминобензальдегидные или 2-аминоацетофеноновые группы, гидразиды, оксимы, ацилтрифторбораты калия, О-карбамоилгидроксиламин, *транс*-циклооктен, тетразин и триарилфосфин, бороновые кислоты, алкины.

Цитотоксические соединения D

В некоторых воплощениях D может включать, без ограничения, майтансиноиды (DM1, DM4) (US 5208020; US 5416064; EP 0425235), производные ауристатина типа монометилауристатина E (MMAE) и F (MMAF) (US 5635483; US 5780588; US 7498298), пирролобензодиазепины, цемадотин, SN38, дискодермолид, таккалонолиды А, В, AF или AJ, эпоксид таккалонолида AI, CA-4, алкалоиды барвинка, iSGD-1882, димеры индолинобензодиазепина, унциаламицин, центанамицин, лаулималид, доластатин, тайланстатины, аматоксины, β-аманитин, гемиастерлин, дуокармицины, PNU-159682, колхицин, тубулизины, калихеамицин или его производные (US 5712374; US 5714586; US 5739116; US 5767285; US 5770701; US 5770710; US 5773001; US 5877296; Hinman L.M. et al., Cancer Res., 1993, 53, 3336-3342; Lode H.N. et al., Cancer Res., 1998, 58, 2925-2928), антрациклины типа дауномицина или доксорубицина (Kratz F. et al., Curr. Med. Chem., 2006, 13, 477-523; Jeffrey S.C. et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2006, 16, 358-362; Torgov M.Y. et al., Bioconj. Chem., 2005, 16, 717-721; Nagy A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, 97, 829-834; Dubowchik G.M. et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2002, 12, 1529-1532; King H.D. et al., J. Med. Chem., 2002, 45, 4336-4343; US 6630579), метотрексат, виндезин,

таксаны типа доцетакселя, паклитакселя, ларотакселя, тезетакселя и ортатакселя, трихотецен и СС-1065.

В других воплощениях D может представлять собой ферментативно активный токсин или его фрагмент, в том числе, без ограничения, дифтерийный токсин А, несвязывающиеся активные фрагменты дифтерийного токсина, экзотоксин А (из *Pseudomonas aeruginosa*), рицин А, абрин А, модекцин А, α -сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантины, белки *Phytolaca americana* (РАPI, РАPII и РАP-S), ингибитор из *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор из *Saponaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин и эномицин.

А в некоторых других воплощениях D может представлять собой радиоактивный атом. Имеются различные радиоактивные изотопы для получения радиоконъюгатов. Их примеры включают At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² и радиоактивные изотопы Lu. При использовании радиоконъюгатов для диагностики они могут содержать радиоактивный атом для сцинтиграфических исследований, например, Tc⁹⁹ или I¹²³, или спиновую метку для магнитно-резонансной томографии (MRI) типа I¹²³, I¹³¹, In¹¹¹, F¹⁹, C¹³, N¹⁵, O¹⁷, гадолиния, марганца или железа.

В некоторых других воплощениях D может включать алкилирующие реагенты типа тиотепа и циклофосамида; алкилсульфонаты типа бусульфана, импросульфана и пипосульфана; азиридины типа бензодопа, карбоквона, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилломеламин; ацетогенины (в особенности буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая его синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; СС-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); криптофицины (в особенности криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая его синтетические аналоги KW-2189 и СВI-TMI); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые аналоги иприта, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтаминоксид гидрохлорид, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитромочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики типа эндиновых антибиотиков, например, калихеамицин (Nicolaou K.C. et al., *Agnew Chem. Intl. Ed.*, 1994, 33, 183-186), динемидин, эсперамицин, а также хромофор неокарцинонатина и хромомофоры родственных хромопротеиновых эндиновых антибиотиков, аклациномицины, актиномицин, антрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, каминомицин, карцинофилин, хромомицины, дактиномицин,

даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (в том числе морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пурамицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты типа метотрексата и 5-фторурацила (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, птероптерин, триметрексат; аналоги пуринов, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидинов, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин, 5-FU; такие андрогены, как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестолактон; антиадреналовые средства типа аминоглютетимида, митотана, трилостана; восполнители фолиевой кислоты типа фролиновой кислоты; ацеглатон; альдофосфамид-гликозид; аминоклевулиновая кислота; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демекольцин; диазиквон; эфлорнитин; эллиптиний ацетат; эпотилон; этоглюцид; галлия нитрат; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; майтансиноиды типа майтансина и ансамитоцина; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK[®]; разоксан; ризоксин; сизофуран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2''-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангвидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид; циклофосфамид; тиотепа; таксоиды типа паклитакселя (Taxol[®]) и доцетакселя (Taxotere[®]); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; аналоги платины типа цисплатина и карбоплатина; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы рубитекан (9-нитрокамптотецин или RFS-2000); дифформетилорнитин; ретиноевая кислота; капецитабин; и их фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные. Также в это определение входят антигормональные средства, которые регулируют или ингибируют действие гормонов на опухоли, как-то антиэстрогены, включая, к примеру, тамоксифен, ралоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кетоксифен, LY 117018, онапристон и торемифен; и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гoserelin; а также их фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные.

Антитела и их мишени

Известен целый ряд терапевтических антител, направленных против молекул клеточной поверхности и/или их лигандов. Эти антитела можно использовать для отбора и конструирования специализированных связывающих частей для специфического распознавания в моно- или мультиспецифичных ADC. Их примеры включают блинатумомаб/BlinCyto (CD3/CD19), Rituxan/MabThera/ритуксимаб (CD20), H7/окрелизумаб (CD20), Zevalin/ибризумаб (CD20), Arzerra/офатумумаб(CD20), HLL2/эпратузумаб, инотузумаб (CD22), Zenarax/даклизумаб, Simulect/базиликсимаб (CD25), Herceptin/трастузумаб, пертузумаб (Her2/ERBB2), Mylotarg/гемтузумаб (CD33), Raptiva/эфализумаб (Cd11a), Erbitux/цетуксимаб (EGFR, рецептор эпидермального фактора роста), IMC-1121B (рецептор-2 VEGF), Tysabri/натализумаб (субъединица $\alpha 4$ интегринов $\alpha 4\beta 1$ и $\alpha 4\beta 7$), ReoPro/абциксимаб (gpIIb-gpIIa и интегрин $\alpha v\beta 3$), Orthoclone OKT3/муромонаб-CD3 (CD3), Benlysta/белимумаб (BAFF), Tolerx/отеликсимаб (CD3), Soliris/экулизумаб (белок компонента C5), Actemra/тоцилизумаб (IL-6R), Panorex/эдреколомаб (EpcAM, молекула адгезии эпителиальных клеток), CEA-CAM5/лабетузумаб (CD66/CEA, карциноэмбриональный антиген), CT-11 (PD-1, белок запрограммированной смерти-1, ингибирующий Т-клеточные рецепторы, CD-d279), H224G11 (рецептор c-Met), SAR3419 (CD19), IMC-A12/циксутумумаб (IGF-1R, рецептор инсулиноподобного фактора роста 1), MEDI-575 (PDGF-R, рецептор тромбоцитарного фактора роста), CP-675, 206/тремелимумаб (антиген 4 цитотоксических Т-лимфоцитов), RO5323441 (плацентарный фактор роста, PGF), HGS1012/мапатумумаб (TRAIL-R1), SGN-70 (CD70), Vedotin (SGN-35)/брентуксимаб (CD30) и ARH460-16-2 (CD44).

Приведенные здесь моно- или мультиспецифичные ADC могут применяться при получении лекарственных средств для лечения онкологических заболеваний, сердечно-сосудистых заболеваний, инфекционных заболеваний, воспалительных заболеваний, аутоиммунных заболеваний, метаболических (например, эндокринных) заболеваний или неврологических (например, нейродегенеративных) заболеваний. Типичные неограничительные примеры таких заболеваний – болезнь Альцгеймера, неходжкинская лимфома, В-клеточный острый и хронический лимфолейкоз, лимфома Беркитта, лимфома Ходжкина, волосатоклеточная лейкемия, острый и хронический миелоидный лейкоз, Т-клеточная лимфома и лейкемия, множественная миелома, глиома, макроглобулинемия Вальденстрёма, карцинома (как-то карцинома полости рта, желудочно-кишечного тракта, толстой кишки, желудка, легочных путей, легких, молочной железы, яичников, предстательной железы, матки, эндометрия, шейки матки, мочевого пузыря, поджелудочной железы, костей, печени, желчного пузыря, почек, кожи и яичек),

меланома, саркома, глиома и рак кожи, острая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, хроническая идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, дерматомиозит, хорея Сиденгама, миастения гравис, системная красная волчанка, волчаночный нефрит, ревматизм, полигландулярные синдромы, буллезный пемфигоид, сахарный диабет, пурпура Шенлейна-Геноха, постстрептококковый нефрит, узловатая эритема, артериит Такаясу, болезнь Аддисона, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, саркоидоз, язвенный колит, мультиформная эритема, IgA-нефропатия, узелковый полиартериит, анкилозирующий спондилоартрит, синдром Гудпасчера, облитерирующий тромбангиит, синдром Шёгрена, первичный билиарный цирроз, тиреоидит Хашимото, тиреотоксикоз, склеродермия, хронический активный гепатит, полимиозит/дерматомиозит, полихондрит, обыкновенная пузырьчатка, гранулематоз Вегенера, мембранозная нефропатия, боковой амиотрофический склероз, сухотка спинного мозга, гигантоклеточный артериит/полимиалгия, пернициозная анемия, быстро прогрессирующий гломерулонефрит, псориаз или фиброзирующий альвеолит.

Известен целый ряд маркеров клеточной поверхности и их лигандов. Например, отмечено, что раковые клетки экспрессируют по крайней мере один из следующих маркеров клеточной поверхности и/или лигандов, включая, без ограничения, карбоангидразу IX, α -фетопротеин, α -актинин-4, A3 (антиген, специфичный для антитела A33), ART-4, B7, Ba-733, BAGE, антиген BrE3, CA125, CAMEL, CAP-1, CASP-8/m, CCCL19, CCCL21, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CDS, CD8, CD1-1A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD45, CD46, CD54, CD55, CD59, CD64, CD66a-e, CD67, CD70, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD133, CD138, CD147, CD154, CDC27, CDK-4/m, CDKN2A, CXCR4, CXCR7, CXCL12, HIF-1- α , специфичный для толстой кишки антиген p (CSAp), CEA (CEACAM5), CEACAM6, c-met, DAM, EGFR, EGFRvIII, EGP-1, EGP-2, ELF2-M, Ep-CAM, Flt-1, Flt-3, фолатный рецептор, антиген G250, GAGE, GROB, HLA-DR, HM1.24, хорионический гонадотропин человека (HCG) и его субъединицы, HER2/neu, HMGB-1, индуцируемый гипоксией фактор (HIF-1), HSP70-2M, HST-2 или 1a, IGF-1R, IFN- γ , IFN- α , IFN- β , IL-2, IL-4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-25, инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-1), антиген KC4, антиген KS-1, KS 1-4, Le-Y, LDR/FUT, фактор торможения миграции макрофагов (MIF), MAGE, MAGE-3, MART-1, MART-2, NY-ESO-1, TRAG-3, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, MIF, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, MUM-1/2, MUM-3, NCA66, NCA95, NCA90, раковый муцин поджелудочной железы, плацентарный фактор роста, p53, PLAGL2, кислая фосфатаза предстательной железы, PSA, PRAME, PSMA, P1GF, ILGF,

ILGF-1R, IL-6, IL-25, RS5, RANTES, T101, SAGE, 5100, сурвивин, сурвивин-2В, TAC, TAG-72, тенасцин, рецепторы TRAIL, TNF- α , антиген Tn, антигены Томсена-Фриденрайха, антигены некроза опухолей, VEGFR, фибронектин ED-B, WT-1, антиген 17-1A, факторы комплемента C3, C3a, C3b, C5a, C5, маркеры ангиогенеза, bcl-2, bcl-6, Kras, c-Met, маркеры онкогенов и продукты онкогенов (Sensi M. et al., *Clin. Cancer Res.*, 2006, 12, 5023-5032; Parmiani G. et al., *J. Immunol.*, 2007, 178, 1975-1979; Castelli C. et al., *Cancer Immunol. Immunother.*, 2005, 54, 187-207). Таким образом, антитела, распознающие такие специфичные рецепторы клеточной поверхности либо их лиганды, могут применяться для специфического и избирательного распознавания связывающих группировок в моно- или мультиспецифичных ADC по настоящему изобретению, для наведения и связывания с целым рядом маркеров клеточной поверхности или лигандов, связанных с болезнями.

В некоторых воплощениях моно- или мультиспецифичные ADC используются при лечении рака/опухолей для наведения на опухолеассоциированные антигены (ТАА) типа антигенов, описанных в Herberman, "Immunodiagnosis of Cancer", во Fleisher, ed., "The Clinical Biochemistry of Cancer", page 347 (American Association of Clinical Chemists, 1979), а также в US 4150149; US 4361544; US 4444744.

Обзоры по опухолевым антигенам включают Mizukami et al., *Nature Med.* 2005, 11, 992-997; Hatfield et al., *Curr. Cancer Drug Targets* 2005, 5229-248; Vallbohmer et al., *J. Clin. Oncol.* 2005, 23, 3536-3544; и Ren et al., *Ann. Surg.* 2005, 242, 55-63; которые все включены сюда путем ссылки по идентифицированным ТАА. Если заболевания включают лимфому, лейкемию или аутоиммунные заболевания, то антигены-мишени могут быть выбраны из группы, состоящей из CD4, CD5, CD8, CD14, CD15, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD46, CD54, CD67, CD74, CD79a, CD80, CD126, CD138, CD154, CXCR4, B7, MUC1 или 1a, HM1.24, HLA-DR, тенасцина, VEGF, P1GF, фибронектина ED-B, онкогенов, продуктов онкогенов (например, c-Met или PLAGL2), CD66a-d, антигенов некроза, IL-2, T101, TAG, IL-6, MIF, TRAIL-R1 (DR4) и TRAIL-R2 (DR5).

Антитела против вышеприведенных антигенов можно использовать в качестве связывающих доменов или группировок для получения ADC или BsADC по настоящему изобретению. Можно создавать различные BsADC против двух разных мишеней.

Примеры пар антигенов включают CD19/CD3, BCMA/CD3, различные антигены из семейства HER в сочетаниях (EGFR, HER2, HER3), IL17RA/IL7R, IL-6/IL-23, IL-1- β /IL-8, IL-6 или IL-6R/IL-21 либо IL-21R, ANG2/VEGF, VEGF/PDGFR- β , VEGF 2/CD3, PSMA/CD3, EPCAM/CD3, комбинации антигенов из числа VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, FLT3, c-FMS/CSF1R, RET, c-Met, EGFR, Her2/neu, HER3, HER4, IGFR, PDGFR, c-KIT,

BCR, интегрин и MMPs с водорастворимыми лигандами из числа VEGF, EGF, PlGF, PDGF, HGF и ангиопоэтина, ERBB-3/c-Met, ERBB-2/c-Met, рецептор-1 EGF/CD3, EGFR/HER3, PSCA/CD3, c-Met/CD3, эндосиалин/CD3, EPCAM/CD3, IGF-1R/CD3, FAPальфа/CD3, EGFR/IGF-1R, IL 17A/F, рецептор-1 EGF/CD3 и CD19/CD16. Другие примеры биспецифичных ADC могут включать: (i) первую специфичность к гликоэпиту антигена из числа структур Lewis x, Lewis b и Lewis y, структур Globo H, KH1, антигена Tn, антигена TF и углеводных структур муцинов, CD44, гликолипидов и гликосфинголипидов типа Gg3, Gb3, GD3, GD2, Gb5, Gm1, Gm2 и сиалилтетраозилцерамида, и (ii) вторую специфичность к рецепторной тирозинкиназе ErbB из числа EGFR, HER2, HER3 и HER4. При этом GD2 в сочетании со вторым антигенсвязывающим сайтом связывается с иммунологическими клетками из числа Т-лимфоцитов, NK-клеток, В-лимфоцитов, дендритных клеток, моноцитов, макрофагов, нейтрофилов, мезенхимальных стволовых клеток, нервных стволовых клеток.

Моноспецифичное или биспецифичное антитело можно соединить с другим моноспецифичным или биспецифичным антителом описанным здесь способом, получая мультиспецифичные ADC. Используя уже доступные моноспецифичные или биспецифичные терапевтические связывающие молекулы типа описанных выше терапевтических антител, можно добиться быстрого и легкого получения требуемых мультиспецифичных связывающих молекул. При таком целенаправленном создании мультиспецифичных ADC путем комбинирования двух или нескольких отдельных терапевтических молекул для одновременного наведения и связывания с двумя или несколькими различными эпитопами можно ожидать аддитивных/синергических эффектов по сравнению с однонаправленными ADC.

В некоторых воплощениях мультиспецифичные ADC по данному изобретению получают, используя пары антител, которые специфически взаимодействуют и проявляют измеримое сродство к следующим парам мишеней.

Мишени одноцепочечных фрагментов антител	Механизмы действия	Заболевания (или здоровые добровольцы)
CD3, EPCAM	переориентация Т-клеток на опухоли, опосредованные эффекторные функции Fc	злокачественные асциты в EPCAM-положительных опухолях, солидные опухоли
CD3, Her2	переориентация Т-клеток на опухоли	метастатический рак молочной железы, запущенные солидные опухоли
CD3, CD19	переориентация Т-клеток на опухоли	предшественники В-клеток при ALL, ALL, DLBCL, NHL
CD3, CEA	переориентация Т-клеток на опухоли	желудочно-кишечная аденокарцинома

CD3, PSMA	переориентация Т-клеток на опухоли	на	рак предстательной железы
CD3, CD123	переориентация Т-клеток на опухоли	на	AML
CD3, gpA33	переориентация Т-клеток на опухоли	на	колоректальный рак
CD30, CD16A	переориентация NK-клеток на опухолевые клетки	на	лимфома Ходжкина
CD3, GD2	переориентация Т-клеток на опухоли	на	нейробластома и остеосаркома
CD3, EGFR	активированные аутологичные Т-клетки на EGFR-положительные опухоли		рак легких и другие солидные опухоли, рак толстой кишки и поджелудочной железы
CD28, MAPG	переориентация Т-клеток на опухоли	на	метастатическая меланома
CD3, пептид MHC	переориентация Т-клеток на опухоли	на	метастатическая меланома
CD19, CD22	наведение белковых токсинов на опухоли	на	В-клеточная лейкемия или лимфома
EGFR, HER3	блокирование 2 рецепторов, ADCC		рак головы и шеи, колоректальный рак
EGFR, c-Met	блокирование 2 рецепторов		запущенный или метастатический рак
HER2, HER2	блокирование 2 одинаковых или разных рецепторов		рак желудка и пищевода, рак молочной железы
HER2, HER3	блокирование 2 рецепторов		рак желудка и пищевода, рак молочной железы
IGF-1R, HER3	блокирование 2 рецепторов		запущенные солидные опухоли
Ang2, VEGF A	блокирование 2 проангиогенных веществ		солидные опухоли, влажная AMD (макулодистрофия)
CEA, HSG	предобработка опухолей для PET или радиовизуализации		колоректальный рак, рак молочной железы и рак легких
IL-1 α , IL-1 β	блокирование провоспалительных цитокинов	2	остеоартрит
TNF, IL-17A	блокирование провоспалительных цитокинов	2	ревматоидный артрит, бляшечный псориаз
IL-13, IL-4	блокирование провоспалительных цитокинов	2	идиопатический фиброз легких
IL-13, IL-4	блокирование провоспалительных цитокинов	2	(здоровые добровольцы)
TNF, HSA	блокирование провоспалительного цитокина, связывается с HSA с повышением полужизни		ревматоидный артрит
IL-17A/F, HSA	блокирование провоспалительных цитокинов, связывается с HSA с повышением полужизни	2	(здоровые добровольцы)
IL-6R, HSA	блокирование провоспалительного цитокина, связывается с HSA с повышением полужизни		ревматоидный артрит
RANKL, HSA	блокирование резорбции костей, связывается с HSA с повышением полужизни		потеря костной массы после менопаузы
Фактор IXa, фактор X	свертывание плазмы крови		гемофилия

В некоторых воплощениях BsADC содержит биспецифичное одноцепочечное

антитело, причем два связывающих домена биспецифичного одноцепочечного антитела соединяются через линкер. В некоторых воплощениях линкер содержит группу типа цистеина или остатка неприродной аминокислоты, которую можно использовать для сайт-специфической конъюгации антитела с конъюгатом неиммуногенного полимера и лекарственного средства, например, пегилированным конъюгатом лекарственного средства. В некоторых воплощениях один или оба из двух связывающих доменов биспецифичного одноцепочечного антитела содержат цистеин или остаток неприродной аминокислоты, который можно использовать для сайт-специфической конъюгации антитела с конъюгатом неиммуногенного полимера и лекарственного средства, например, с пегилированным конъюгатом лекарственного средства.

В предпочтительном воплощении BsADC представляет собой конъюгат двух антител либо их антигенсвязывающих фрагментов (типа Fab, scFv и т.п.), которые специфически взаимодействуют и проявляют измеримое сродство к двум разным эпитомам Her2.

Синтез

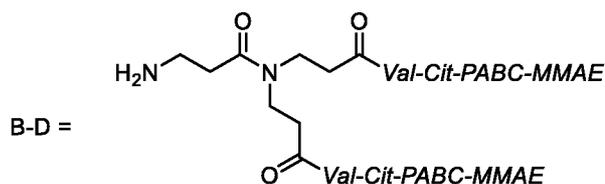
После выбора нужного размера и количества разветвлений ПЭГ можно преобразовать концевые функциональные группы ПЭГ типа гидроксильных, карбоксильных групп и т.п. в концевые разветвленные гетеробифункциональные группы любым известным в данной области способом (WO 2018/075308). В общих чертах разветвленный по концам гетеробифункциональный ПЭГ может быть получен путем активации концевых гидроксильных или карбоксильных групп ПЭГ N-гидроксисукцинимидом с помощью таких реагентов, как ди-(N-сукцинимидил)карбонат (DSC), трифосген и т.п. в случае концевых гидроксильных групп либо с помощью сшивающих реагентов типа N,N-диизопропилкарбодиимида (DIPC), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и т.п. в случае концевых карбоксильных групп в присутствии основания типа 4-диметиламинопиридина (DMAP), пиридина и т.п., получая активированный ПЭГ.

Затем активированный ПЭГ можно подвергнуть реакции с небольшой трифункциональной молекулой типа производного лизина H-Lys(Boc)-OH в присутствии основания типа диизопропиламина (DIPEA), получая разветвленный по концам гетеробифункциональный ПЭГ со свободной карбоксильной группой и защищенной Boc аминокислотной группой PEG-Lys(Boc)-COOH. Рядовым специалистам должно быть понятно, что в качестве альтернативы для той же цели можно использовать и другие концевые функциональные группы ПЭГ типа галогенидов, аминокислотных групп, тиоловых групп и т.п., и другие небольшие трифункциональные молекулы, содержащие любые комбинации трех

функциональных групп из числа $-\text{NH}_2$, $-\text{NHNH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{C}(\text{O})\text{X}$ (X = галогенид), $-\text{N}=\text{C}=\text{O}$, $-\text{SH}$, ангидридов, галогенидов, малеимидов, $\text{C}=\text{C}$, $\text{C}\equiv\text{C}$ и т.п. либо их защищенные варианты, если нужно.

После удаления Вос с помощью TFA и последующей реакции с помеченным малеимидом спейсером типа NHS-PEG₂-малеимида образуется PEG-Lys(Mal)-COOH.

Отдельно к разветвленному звену пришивается цитотоксическое лекарственное средство (например, MMAE), связанный с триггером (например, Val-Cit) и самоликвидирующимся спейсером (например, PABC), с помощью сшивающего реагента типа EDC/HOBT, получая B-D, например:



Целевой продукт получается при присоединении PEG-Lys(Mal)-COOH к B-D с помощью сшивающего реагента типа DCC, образуя пегилированный конъюгат с препаратом PEG-Lys(Mal)-(Val-Cit-PAB-MMAE)₂.

Моноспецифичные антитела, бивалентные для антигенов, или биспецифичные антитела типа SCAHer2II×SCAHer2IV могут быть получены при помощи генетических манипуляций в экспрессирующих системах. Например, можно синтезировать ДНК, кодирующую биспецифичный scFv, и ввести её в экспрессирующую систему (например, в клетки CHO). Затем данный белок экспрессируется и очищается хроматографическими методами.

Для получения пегилированных одноцепочечных ADC, бивалентных для антигенов, или же BsADC, пегилированный конъюгат лекарственного средства с функциональной группой малеимида или DBCO можно подвергнуть сайт-специфической реакции со свободной тиоловой или азидной функциональной группой бифункционального антитела типа SCAHer2IV×SCAHer2IV или SCAHer2II×SCAHer2IV, которая либо встроена генетически, либо образовалась путем дериватизации, получая PEG-Lys(SCAHer2IV×SCAHer2IV)-(Val-Cit-PAB-MMAE)₂ или PEG-Lys(SCAHer2II×SCAHer2IV)-(Val-Cit-PAB-MMAE)₂.

Пегилированные мультиспецифичные антитела могут быть получены таким же образом с использованием мультиспецифичных антител вместо моно- или биспецифичных антител.

Наряду с парами групп тиол/малеимид или DBCO/азид для сайт-специфической конъюгации, приведенными в настоящем изобретении, как должно быть известно

рядовым специалистам, можно также предусмотреть и другие известные пары групп для сайт-специфической конъюгации, такие как пара *транс*-циклооктен/тетразин; карбонил/гидразид; карбонил/оксим; пара сшивающих реагентов Судзуки–Мияура; пара сшивающих реагентов Соногаширы; пара лигирующих реагентов Штаудингера; пара реагентов для реакции конденсации Кнёвенагеля; пара активный амин/акрилат и др., и использовать их в качестве альтернативы для той же цели, если нужно. Вышеприведенный список пар групп для сайт-специфической конъюгации является чисто иллюстративным и не предназначен для ограничения типов пар групп для сайт-специфической конъюгации, подходящих для использования в настоящем изобретении.

Композиции

Настоящим изобретением также предусмотрены композиции, например, фармацевтические композиции, содержащие соединения по настоящему изобретению, включенные в состав вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Например, фармацевтическая композиция по изобретению может содержать соединение (например, конъюгат биспецифичное антитело-лекарственное средство), которое связывается с двумя разными эпитопами рецептора Her2.

Лекарственные формы по настоящему изобретению могут быть получены путем смешивания конъюгата моно- или мультиспецифичной молекулы и лекарственного средства, имеющего требуемую степень чистоты, с необязательными физиологически приемлемыми носителями, наполнителями или стабилизаторами в виде лиофилизированных составов или водных растворов. Приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы не токсичны для реципиентов при используемых дозах и концентрациях и включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмоний хлорид, гексаметоний хлорид, бензалконий хлорид, бензетоний хлорид, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены типа метил- или пропилпарабена, катехол, резорцинол, циклогексанол, 3-пентанол и *m*-крезол); низкомолекулярные (менее 10 аминокислотных остатков) белки типа сывороточного альбумина, желатина или иммуноглобулинов; гидрофильные полимеры типа поливинилпирролидона; такие аминокислоты, как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы; хелаторы типа ЭДТА; такие сахара, как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы типа натрия; комплексы с металлами (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества типа Tween, Pluronic или PEG.

Композиции также могут содержать более одного активного соединения, если это

необходимо для лечения конкретного показания, предпочтительно это соединения со взаимодополняющей активностью, которые не оказывают отрицательного воздействия друг на друга. Например, композиции могут дополнительно включать и другие антитела или мультиспецифичные антитела, цитотоксические средства, химиотерапевтические средства или ADC. Такие молекулы должны присутствовать в композиции в количествах, которые эффективны для намеченной цели.

Активные ингредиенты также могут быть заключены в микрокапсулы, полученные, к примеру, методами коацервации или межфазной полимеризации, например, в гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли-(метилметацрилатные) микрокапсулы, соответственно, в коллоидные системы доставки лекарств (например, липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методы изложены в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol A., Ed. (1980).

Можно получить препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие моно- или мультиспецифичные молекулы, причем матрицы имеют вид формованных изделий, например, пленок или микрокапсул. Примеры матриц для замедленного высвобождения включают полиэферы, гидрогели (к примеру, поли-(2-гидроксиэтилметакрилат) либо поливиниловый спирт), полилактиды (US 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и γ -этил-L-глутамата, неразлагаемый этилен-винилацетат, разлагаемые сополимеры молочной и гликолевой кислоты типа Lupron Depot (микросферы для инъекций, состоящие из сополимера молочной и гликолевой кислоты и лейпролидацетата) и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту. В то время как полимеры типа этиленвинилацетата и молочной-гликолевой кислоты обеспечивают высвобождение молекул на протяжении более 100 дней, некоторые гидрогели высвобождают белки в течение меньшего периода времени. Когда инкапсулированные антитела остаются в организме в течение длительного времени, они могут денатурировать или агрегировать в результате воздействия влаги при 37°C, что приводит к потере биологической активности и возможному изменению иммуногенности. Можно разработать рациональные стратегии стабилизации в зависимости от задействованного механизма. Например, если выяснится, что механизм агрегации представляет собой образование межмолекулярной связи S-S посредством тиодисульфидного обмена, то стабилизация достигается путем модификации сульфгидрильных остатков, лиофилизации из кислых растворов, контроля влагосодержания, использования соответствующих добавок и разработки специального

состава полимерных матриц.

Фармацевтические композиции по изобретению можно вводить в составе комбинированной терапии, т.е. в сочетании с другими средствами. Примеры терапевтических средств, которые можно использовать при комбинированной терапии, более подробно описаны ниже.

Композиции, предназначенные для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Это легко осуществляется путем фильтрования через стерильные фильтрационные мембраны. Стерильные растворы для инъекций можно получить путем включения активного соединения в требуемом количестве в соответствующий растворитель с одним из либо с комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, как потребуется, с последующей стерилизацией микрофильтрованием. Как правило, дисперсии получают путем включения активного соединения в стерильный носитель, содержащий основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и сушка с замораживанием (лиофилизация), которые дают порошок активного ингредиента вместе с любыми другими необходимыми ингредиентами из предварительно стерилизованного фильтрованием раствора.

Дозировка

Количество активного ингредиента, которое можно смешивать с материалом носителя для получения разовой дозовой формы, будет варьироваться в зависимости от проходящего лечение субъекта и конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое можно смешивать с материалом носителя для получения разовой дозовой формы, обычно составляет такое количество композиции, которое дает терапевтический эффект. Как правило, из ста процентов это количество должно составлять от 0,01% до 99% активного ингредиента, предпочтительно от 0,1% до 70%, наиболее предпочтительно от 1% до 30% активного ингредиента в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

Схемы дозировки подбираются так, чтобы обеспечить оптимальную желательную реакцию (например, терапевтическую реакцию). Например, можно вводить болюсом, можно вводить несколькими дробными дозами по времени или же пропорционально снижать или повышать дозу в соответствии с требованиями терапевтической ситуации. Особенно выгодно формировать парентеральные композиции в виде стандартной дозовой формы для простоты введения и однородности дозировки. Стандартная дозовая форма в настоящем изобретении означает физически дискретные единицы, подходящие в качестве

однократных доз для подлежащих лечению субъектов; причем каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное для получения требуемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификации на стандартные дозовые формы по изобретению обусловлены и напрямую зависят от (а) уникальных характеристик активного соединения и требуемого конкретного терапевтического эффекта и (b) ограничений, присущих технологии составления композиций такого активного соединения для лечения чувствительности у людей.

При введении конъюгатов моно- или мультиспецифичных молекул с лекарственным средством по настоящему изобретению доза составляет от 0,0001 до 100 мг/кг, обычно от 0,01 до 50 мг/кг массы тела. Например, дозы могут составлять 0,3 мг/кг массы тела, 1 мг/кг массы тела, 3 мг/кг массы тела, 5 мг/кг массы тела или 10 мг/кг массы тела или же в пределах 1-10 мг/кг. Типичный режим лечения предусматривает введение каждый день, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, один раз каждые четыре недели, один раз в месяц, один раз каждые 3 месяца или один раз каждые 3-6 месяцев. Предпочтительные схемы дозировки моно- или мультиспецифичных конъюгатов лекарственного средства по изобретению включают 1 мг/кг массы тела или 3 мг/кг массы тела при внутривенном введении, причем моно- или мультиспецифичные конъюгаты лекарственного средства вводятся по одной из следующих схем дозирования: (i) 6 доз через каждые четыре недели, а затем через каждые три месяца; (ii) каждые три недели; (iii) 3 мг/кг массы тела один раз, а затем по 1 мг/кг массы тела через каждые три недели.

С другой стороны, моно- или мультиспецифичные конъюгаты лекарственного средства можно вводить в виде формы с замедленным высвобождением, при этом требуется менее частое введение. Дозировка и частота зависят от периода полувыведения моно- или мультиспецифичного конъюгата лекарственного средства у пациента. Как правило, человеческие антитела проявляют самый длительный период полураспада, за ними следуют гуманизированные антитела, химерные антитела и нечеловеческие антитела. Дозировка и частота введения зависят от того, будет лечение профилактическим или терапевтическим. При профилактическом применении вводятся сравнительно низкие дозы с относительно небольшими интервалами на протяжении длительного времени. Некоторые пациенты продолжают получать лечение до конца своей жизни. При терапевтическом применении иногда требуются сравнительно высокие дозы с относительно короткими интервалами до тех пор, пока не уменьшится или не прекратится прогрессирование заболевания, а предпочтительно до тех пор, пока у пациента не проявится частичное или полное улучшение симптомов заболевания. После этого

пациенту может быть назначен профилактический режим.

Фактические уровни дозы активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению могут варьироваться с тем, чтобы получить такое количество активного ингредиента, которое эффективно вызывает желательную терапевтическую реакцию для конкретного пациента, композиции и способа введения и не токсично для пациента. Выбранный уровень дозы будет зависеть от различных фармакокинетических факторов, включая активность используемых композиций по настоящему изобретению, способ введения, время введения, скорость выведения используемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в сочетании с данными композициями, возраст, пол, вес, заболевание, общее состояние здоровья и предшествующая история болезни пациента, проходящего лечение, и другие факторы, хорошо известные в области медицины.

“Терапевтически эффективная доза” моно- или мультиспецифичных молекул по изобретению предпочтительно приводит к снижению тяжести симптомов заболевания, повышению частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания или к предотвращению нарушений или инвалидности вследствие заболевания. Например, при лечении опухолей “терапевтически эффективная доза” предпочтительно ингибирует рост клеток или рост опухолей или метастазирование по меньшей мере на 20%, более предпочтительно по меньшей мере на 40%, еще более предпочтительно по меньшей мере на 60% и даже еще более предпочтительно по меньшей мере на 80% по сравнению с субъектами без терапии. Способность средства или соединения ингибировать рост опухолей можно определить на модели у животных, прогнозирующей эффективность в отношении опухолей у человека. С другой стороны, данное свойство композиции можно определить, исследуя такую способность соединения к ингибированию *in vitro* методами, известными специалистам. Терапевтически эффективное количество терапевтического соединения может уменьшать размер опухолей, метастазирование или иным образом облегчать симптомы у субъекта. Рядовые специалисты в данной области смогут определить такие количества, исходя из таких факторов, как размер субъекта, тяжесть симптомов у субъекта и конкретная выбранная композиция или способ введения.

Способы введения

Композиции по изобретению можно вводить одним или несколькими способами введения, используя один или несколько из различных способов, известных в данной области. Как должно быть известно специалистам, способ и/или метод введения будет зависеть от требуемых результатов. Предпочтительные способы введения конъюгатов

антитело-лекарственное средство по изобретению включают внутривенное, внутримышечное, внутрикожное, внутрибрюшинное, подкожное, спинальное или другое парентеральное введение, к примеру, посредством инъекции или вливания. Выражение “парентеральное введение” в настоящем изобретении означает другие способы введения, чем энтеральное и местное введение, обычно посредством инъекции, и включает, без ограничения, внутривенные, внутримышечные, внутриартериальные, интратекальные, интракапсулярные, интраорбитальные, внутрисердечные, внутрикожные, внутрибрюшинные, транстрахеальные, подкожные, субкутикулярные, внутрисуставные, субкапсулярные, субарахноидальные, интраспинальные, эпидуральные и интрастернальные инъекции и инфузии. С другой стороны, конъюгаты моно- или мультиспецифичных молекул с лекарственными средствами по изобретению можно вводить и непарентеральным способом типа местного, эпидермального или мукозального способа введения, к примеру, интраназально, перорально, интравагинально, ректально, под язык или местно.

Активные соединения могут быть приготовлены с носителями, защищающими соединение от быстрого высвобождения, типа композиций с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микрокапсульные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Многие способы получения таких лекарственных форм запатентованы или общеизвестны специалистам в данной области. Например, см. *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Терапевтические композиции можно вводить с помощью медицинских устройств, известных в данной области. Например, терапевтические композиции по изобретению можно вводить с помощью безыгольного устройства для подкожных инъекций типа устройств, описанных в US 5399163, US 5383851, US 5312335, US 5064413, US 4941880, US 4790824 и US 4596556. Примеры хорошо известных имплантатов и модулей, применимых в настоящем изобретении, включают описанные в US 4487603, US 4486194, US 4447233, US 4447224, US 4439196 и US 4475196. Эти патенты включены сюда путем ссылки. Специалистам в данной области известны и многие другие подобные имплантаты, системы доставки и модули.

Способы лечения

В одном аспекте настоящего изобретения предусмотрено лечение субъектов *in vivo* с помощью вышеописанных конъюгатов моно- или мультиспецифичных молекул с

лекарственными средствами с тем, чтобы ингибировать рост и/или метастазирование раковых опухолей. В одном воплощении изобретения предусмотрен способ ингибирования роста и/или ограничения метастатического распространения опухолевых клеток у субъектов, включающий введение субъектам терапевтически эффективного количества конъюгата моно- или мультиспецифичной молекулы с лекарственным средством.

Неограничительные примеры предпочтительных раковых заболеваний для лечения включают хронический или острый лейкоз, включая острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический лимфолейкоз, лимфоцитарную лимфому, рак молочной железы, рак яичников, меланому (например, метастатическую злокачественную меланому), рак почек (например, светлоклеточную карциному), рак предстательной железы (например, гормон-резистентную аденокарциному предстательной железы), рак толстой кишки и рак легких (например, немелкоклеточный рак легких). Кроме того, изобретение включает рефрактерные или рецидивирующие злокачественные новообразования, рост которых можно ингибировать с помощью антител по изобретению. Примеры других раковых заболеваний, которые можно лечить способами по изобретению, включают рак кости, рак поджелудочной железы, рак кожи, рак головы или шеи, кожную или внутриглазную злокачественную меланому, рак матки, рак прямой кишки, рак анальной области, рак желудка, рак яичек, рак матки, рак фаллопиевых труб, рак эндометрия, рак шейки матки, рак влагалища, рак вульвы, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому, рак пищевода, рак тонкой кишки, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечников, саркому мягких тканей, рак уретры, рак полового члена, детские солидные опухоли, рак мочевого пузыря, рак почек или мочеточников, рак почечной лоханки, неоплазии центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, ангиогенез опухолей, опухоли позвоночника, глиому ствола головного мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, рак от воздействия окружающей среды, включая рак от воздействия асбеста, и комбинации данных раковых заболеваний.

В настоящем изобретении термин “субъект” охватывает человека и других животных. К другим животным относятся все позвоночные, т.е. млекопитающие и не млекопитающие, как-то другие приматы, овцы, собаки, кошки, коровы, лошади, куры, амфибии и рептилии, хотя предпочтительны млекопитающие – другие приматы, овцы, собаки, кошки, коровы и лошади. Предпочтительными субъектами являются больные люди, нуждающихся в усилении иммунитета. Способы особенно подходят для лечения

больных людей с такими заболеваниями, которые можно лечить путем усиления иммунитета.

Вышеуказанное лечение также можно комбинировать со стандартными методами лечения рака. Например, его можно эффективно комбинировать с химиотерапевтическим лечением. При этом становится возможным снижение дозы вводимого химиотерапевтического средства (Mokyr M. et al., *Cancer Res.*, 1998, 58, 5301-5304).

В конъюгатах мультиспецифичных молекул с лекарственными средствами по настоящему изобретению или вместе с ними можно использовать и другие антитела для активации иммунитета организма. К ним относятся молекулы, нацеленные на поверхность дендритных клеток и активирующие функции DC и презентацию антигенов. Например, антитела против CD40 способны эффективно заменять активность Т-клеток-хелперов (Ridge J. et al., *Nature*, 1998, 393, 474-478) и могут применяться в сочетании с конъюгатами мультиспецифичных молекул с лекарственными средствами по изобретению (Ito N. et al., *Immunobiology*, 2000, 201, 527-540). Точно так же антитела, нацеленные на костимулирующие Т-клетки молекулы типа CTLA-4 (US 5811097), CD28 (Haan J. et al., *Immunol. Lett.*, 2014, 162, 103-112), OX-40 (Weinberg A. et al., *J. Immunol.*, 2000, 164, 2160-2169), 4-1BB (Melero I. et al., *Nature Med.*, 1997, 3, 682-685) и ICOS (Hutloff A. et al., *Nature*, 1999, 397, 262-266) или антитела против PD-1 (US 8008449) и PD-L1 (US 7943743; US 8168179) также могут обеспечивать повышение уровня активации Т-клеток. В другом примере конъюгаты моно- или мультиспецифичных молекул с лекарственными средствами по изобретению можно использовать в сочетании с противоопухолевыми антителами, такими как Rituxan (ритуксимаб), Herceptin (трастузумаб), Vectra (тозитумомаб), Zevalin (ибритумомаб), Campath (алемтузумаб), Lymphocide (эпртузумаб), Avastin (бевацизумаб) или Tarceva (эрлотиниб) и др.

Определения терминов

Термин “алкил” в настоящем изобретении означает углеводородную цепь, длина которой обычно составляет от 1 до 25 атомов. Такие углеводородные цепи предпочтительно, но не обязательно, являются насыщенными и могут быть разветвленными или линейными, хотя обычно предпочтительны линейные цепи. Термин C₁₋₁₀-алкил охватывает алкильные группы с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10 атомами углерода. Точно так же C₁₋₂₅-алкил охватывает все алкилы с 1-25 атомами углерода. Примеры алкильных групп включают метил, этил, изопропил, *n*-бутил, *n*-пентил, 2-метил-1-бутил, 3-пентил, 3-метил-3-пентил и др. В настоящем изобретении “алкилы” включает и циклоалкилы, если указано три или несколько атомов углерода. Если не указано иначе, алкилы могут быть замещенными или не замещенными.

Термин “функциональная группа” в настоящем изобретении означает такую группу, которая может использоваться в нормальных условиях органического синтеза для образования ковалентной связи между объектом, к которому она присоединена, и другим объектом, который обычно несет дополнительную функциональную группу. “Бифункциональный линкер” означает линкер с двумя функциональными группами, образующими две связи с другими частями конъюгата.

Термин “производное” в настоящем изобретении означает химически модифицированное соединение с дополнительным структурным фрагментом с целью введения новой функциональной группы или модификации свойств исходного соединения.

Термин “защитная группа” в настоящем изобретении означает такую группу, которая предотвращает или блокирует реакцию определенной химически реакционной функциональной группы в молекуле при определенных условиях реакции. Различные защитные группы хорошо известны специалистам и описаны, к примеру, в T.W. Greene and G.M. Wuts, *Protecting Groups in Organic Synthesis*, Third Edition, Wiley, New York, 1999; и в P.J. Kocienski, *Protecting Groups*, Third Ed., Thieme Chemistry, 2003; и в приведенных там ссылках.

Термин “ПЭГ” в настоящем изобретении означает полиэтиленгликоль. ПЭГ для применения в настоящем изобретении обычно имеет структуру $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$. ПЭГ может иметь различную молекулярную массу, структуру или геометрию. Группа ПЭГ может содержать кэспирующую группу, которая не поддается химическим превращениям в типичных условиях реакций синтеза. Примеры кэспирующих групп включают $-\text{O}-\text{C}_{1-25}$ -алкил или $-\text{O}$ -арил.

Термин “ПЭГилированный” в настоящем изобретении обозначает химическую модификацию полиэтиленгликолем.

Термин “линкер” в настоящем изобретении означает атом или набор атомов, используемых для соединения взаимосвязанных частей типа частей антител и полимеров. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым. Получение различных линкеров для конъюгатов описано в литературе, включая, к примеру, Goldmacher et al., *Antibody-drug Conjugates and Immunotoxins: From Pre-clinical Development to Therapeutic Applications*, Chapter 7, in *Linker Technology and Impact of Linker Design on ADC properties*, Edited by Phillips GL, Ed. Springer Science and Business Media, New York (2013). Расщепляемые линкеры включают группы или группы, которые могут расщепляться при определенных биологических или химических условиях. Примеры включают расщепляемые ферментами дисульфидные линкеры, элиминирование по 1,4- или 1,6-

бензилу, триметилловые замки, саморасщепляющиеся системы на основе бицина, кислотолабильные силилоэфирные линкеры и другие фотолабильные линкеры.

Термин “соединительная группа” или “связующая группа” в настоящем изобретении означает функциональную группу или группу, соединяющую различные части соединения или конъюгата. Примеры соединительных групп включают, без ограничения, амиды, сложные эфиры, карбаматы, простые эфиры, тиоэфиры, дисульфиды, гидразоны, оксимы, семикарбазиды, карбодиимиды, кислотолабильные группы, фотолабильные группы, пептидазолабильные группы и эстеразолабильные группы. Например, молекула линкера и молекула полимера могут соединяться друг с другом через амидную или карбаматную связующую группу.

Термины “пептид”, “полипептид” и “белок” применяются здесь взаимозаменяемо для описания расположения аминокислотных остатков в полимерах. Пептид, полипептид или белок может состоять из 20 стандартных встречающихся в природе аминокислот наряду с редкими аминокислотами и синтетическими аналогами аминокислот. Они могут представлять собой любые цепочки аминокислот, независимо от длины или посттрансляционной модификации (к примеру, гликозилирования или фосфорилирования).

“Рекомбинантный” пептид, полипептид или белок означает пептид, полипептид или белок, полученный методами рекомбинантной ДНК; т.е. полученный из клеток, трансформированных конструкцией из экзогенной ДНК, кодирующей требуемый пептид. “Синтетический” пептид, полипептид или белок означает пептид, полипептид или белок, полученный путем химического синтеза. Термин “рекомбинантный” в применении, например, к клеткам или нуклеиновой кислоте, белку или вектору, означает, что клетки, нуклеиновая кислота, белок или вектор были модифицированы путем введения гетерологичной нуклеиновой кислоты или белка либо изменения нативной нуклеиновой кислоты или белка, или же что клетки происходят из модифицированных таким образом клеток. В рамки настоящего изобретения входят слитые белки, содержащие одну или несколько вышеупомянутых последовательностей и гетерологичную последовательность. Гетерологичный полипептид, нуклеиновая кислота или ген происходят из другого вида или, если они из того же вида, то существенно модифицированы по сравнению с исходной формой. Два слитых домена или последовательности гетерологичны друг другу, если они не соседствуют друг с другом в природном белке или нуклеиновой кислоте.

“Выделенный” пептид, полипептид или белок означает пептид, полипептид или белок, который был отделен от других белков, липидов и нуклеиновых кислот, с которыми он связан в природе. Полипептид/белок может составлять не менее 10% (т.е.

любой процент от 10% до 100%, например, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99%) от сухой массы очищенного препарата. Чистоту можно измерить любым подходящим стандартным методом, например, методом колоночной хроматографии, электрофореза в полиакриламидном геле или HPLC. Выделенный полипептид/белок, описанный в изобретении, может быть очищен из природного источника, получен методами рекомбинантной ДНК или химическими методами.

“Антиген” означает такое вещество, которое вызывает иммунологическую реакцию или связывается с продуктами этой реакции. Термин “эпитоп” означает ту область антигена, с которой связывается антитело или Т-клетка.

Термин “антитело” в настоящем изобретении охватывает целые антитела и их антигенсвязывающие фрагменты или отдельные цепи. Целые антитела представляют собой гликопротеины, содержащие по меньшей мере две тяжелые (H) и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из вариабельной области тяжелой цепи (V_H) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов: C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (V_L) и константной области легкой цепи (C_L), причем константная область легкой цепи состоит из одного домена. Области V_H и V_L еще подразделяются на участки гипервариабельности, именуемые определяющими комплементарность участками (CDR), перемежающиеся с более консервативными участками, именуемыми каркасными участками (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Участки CDR и FR вариабельной области тяжелой цепи – HFR1, HCDR1, HFR2, HCDR2, HFR3, HCDR3, HFR4. Участки CDR и FR вариабельной области легкой цепи – LFR1, LCDR1, LFR2, LCDR2, LFR3, LCDR3, LFR4. Вариабельные области тяжелых и легких цепей содержат связывающий домен, взаимодействующий с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами организма, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

В настоящем изобретении “фрагменты антител” могут содержать такую часть интактного антитела, обычно включающую антигенсвязывающую и/или вариабельную область интактного антитела и/или Fc-область антитела, которая сохраняет способность к связыванию с FcR. Примеры фрагментов антител включают линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител; и мультиспецифичные антитела, образованные из фрагментов антител.

Термин “антигенсвязывающий фрагмент или часть” антитела (либо просто “фрагмент или часть антитела” в настоящем изобретении означает один или несколько фрагментов антитела, сохраняющих способность к специфическому связыванию с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающую функцию антитела могут выполнять фрагменты полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином “антигенсвязывающий фрагмент или часть” антитела, включают: (i) Fab-фрагмент – моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и C_H ; (ii) $F(ab')_2$ -фрагмент – бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fab'-фрагмент, фактически это Fab с частью шарнирной области; (iv) фрагмент Fd, состоящий из доменов V_H и C_H ; (v) фрагмент Fv, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела; (vi) dAb, состоящий из домена V_H ; (vii) выделенный участок, определяющий комплементарность (CDR); и (viii) нанотело – переменная область тяжелой цепи, содержащая один переменный домен и два константных домена. Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, V_L и V_H , кодируются отдельными генами, их можно соединить рекомбинантными методами с помощью синтетического линкера, что позволяет получать их в виде единой белковой цепи, в которой области V_L и V_H соединяются с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечные Fv (scFv); например, см. Bird et al., Science, 1988, 242, 423-426; и Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, 85, 5879-5883. Предусмотрено, что такие одноцепочечные антитела охватываются термином “антигенсвязывающий фрагмент или часть” антитела. Эти фрагменты антител получают стандартными методами, известными специалистам в данной области, и фрагменты проверяют на пригодность таким же образом, как и интактные антитела.

В настоящем изобретении термин “Fc-фрагмент” или “Fc-область” применяется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина.

Термин “моноклональное антитело” в настоящем изобретении означает антитело, полученное из популяции практически однородных антител, т.е. индивидуальные антитела в составе популяции идентичны, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела очень специфичны и направлены против одного антигенного сайта. Кроме того, в отличие от обычных (поликлональных) препаратов антител, которые обычно включают различные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты у антигена. Модификатор “моноклональное” указывает на то, что антитело получено из практически однородной популяции антител, но это не обязательно значит, что оно получено каким-то

конкретным способом. Например, моноклональные антитела для применения по настоящему изобретению могут быть получены гибридным методом, впервые описанным Кёлером и Мильштейном (Kohler G. et al., *Nature*, 1975, 256, 495-497), который включен сюда путем ссылки, или методами рекомбинантной ДНК (US 4816567), которые включены сюда путем ссылки. Моноклональные антитела также могут быть выделены из фаговых библиотек антител методами, описанными, к примеру, в Clackson et al., *Nature*, 1991, 352, 624-628; и Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 1991, 222, 581-597; которые все включены сюда путем ссылки.

При этом моноклональные антитела, в частности, включают “химерные” антитела, у которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям у антител, происходящих из определенного вида или принадлежащих к определенному классу или подклассу антител, тогда как остальная часть цепей идентична или гомологична соответствующим последовательностям у антител, происходящих из другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, если только они проявляют требуемую биологическую активность (см. U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81, 6851-6855; Neuberger et al., *Nature*, 312, 1984, 604-608; Takeda et al., *Nature*, 1985, 314, 452-454; International Patent Application No. PCT/GB85/00392; которые все включены сюда путем ссылки).

“Гуманизированные” формы нечеловеческих (например, мышинных) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность из нечеловеческого иммуноглобулина. По большей части гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (антителареципиенты), у которых остатки из гипервариабельной области реципиента заменены на остатки из гипервариабельной области не человека, а другого вида типа мыши, крысы, кролика или примата (донорного антитела), обладающего требуемой специфичностью, аффинностью и ёмкостью. В некоторых случаях остатки в каркасной области (FR) Fv иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками не человека. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые не встречаются у реципиентного антитела или у донорного антитела. Эти модификации проводятся для дальнейшего улучшения характеристик антител. В общем, гуманизированные антитела должны содержать практически всё из по меньшей мере одного, а обычно из двух вариабельных доменов, у которых все или почти все гипервариабельные петли соответствуют петлям иммуноглобулина не человека, а все или почти все остатки FR относятся к последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированные антитела

необязательно также должны содержать по крайней мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, иммуноглобулина человека. Насчет дальнейших подробностей см. Jones et al., Nature, 1986, 321, 522-525; Riechmann et al., Nature, 1988, 332, 323-329; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 1992, 2, 593-596; U.S. Patent No. 5,225,539; которые все включены сюда путем ссылки).

“Человеческие антитела” – это антитела с полностью человеческими последовательностями, которые могли быть получены из человеческой гибридомы, человеческой библиотеки фагового дисплея или трансгенной мыши, экспрессирующей последовательности антител человека.

Термин “фармацевтическая композиция” относится к комбинации активного вещества с носителем, инертным или активным, что делает композицию особенно пригодной для диагностического или терапевтического применения *in vivo* или *ex vivo*.

В настоящем изобретении “фармацевтически приемлемый носитель” включает всевозможные растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонизационные и замедляющие всасывание средства и т.п., которые являются физиологически совместимыми. “Фармацевтически приемлемый носитель” после введения субъекту или на него не вызывает нежелательных физиологических эффектов. Носитель в фармацевтической композиции должен быть “приемлемым” также и в том смысле, чтобы он был совместим с активным ингредиентом и способен его стабилизировать. В качестве фармацевтических носителей для доставки активного вещества можно использовать одно или несколько солюбилизующих веществ. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают, без ограничения, биосовместимые носители, адъюванты, добавки и разбавители для получения композиций, применимых в качестве дозовых форм. Примеры других носителей включают коллоидный оксид кремния, стеарат магния, целлюлозу и лаурилсульфат натрия. Другие подходящие фармацевтические носители и разбавители, а также фармацевтические требования для их применения описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences. Предпочтительно носитель подходит для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, интраспинального или эпидермального введения (например, посредством инъекции или инфузии). Терапевтические соединения могут включать одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. “Фармацевтически приемлемая соль” означает такую соль, которая сохраняет требуемую биологическую активность исходного соединения и не оказывает каких-либо нежелательных токсикологических эффектов (например, см. Berge S.M. et al., J. Pharm. Sci. 1997, 66, 1-19).

В настоящем изобретении “лечить” или “лечение” означает введение соединения

или средства субъекту, страдающему заболеванием или подверженному риску развития заболевания, с целью излечения, ослабления, облегчения, лечения, замедления возникновения заболевания, предотвращения или облегчения заболевания, симптома заболевания, болезни, вторичной по отношению к заболеванию, или предрасположенности к заболеванию.

“Эффективное количество” означает такое количество активного соединения/средства, которое требуется для оказания терапевтического эффекта на проходящего лечение субъекта. Эффективные дозы варьируются, как это известно специалистам, в зависимости от типа подлежащих лечению заболеваний, способа введения, используемых наполнителей и возможности применения вместе с другим терапевтическим средством. Терапевтически эффективное количество комбинации для лечения раковых заболеваний означает такое количество, которое вызывает, к примеру, уменьшение размера опухолей, снижение количества опухолевых очагов или замедление роста опухолей по сравнению с животными, не получавшими лечения.

В настоящем изобретении представлены различные диапазоны значений. Предполагается, что также фактически представлены и все промежуточные значения с точностью до одной десятой единицы нижнего предела, если из контекста четко не требуется иначе, между верхним и нижним пределами этого диапазона. Каждый меньший диапазон между любым указанным или промежуточным значением в указанном диапазоне и любым другим указанным или промежуточным значением в данном диапазоне охватывается изобретением. Верхние и нижние пределы этих меньших диапазонов могут независимо включаться в диапазон или исключаться из него, и каждый диапазон, в котором один, ни один или оба предела не включены в меньшие диапазоны, также охватывается изобретением, с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, то диапазоны, исключаящие один или оба из этих включенных пределов, также охватываются изобретением.

Термин “примерно” обычно означает плюс-минус 10% от указанного числа. Например, “около 10%” может означать диапазон от 9% до 11%, а “примерно 1” может означать от 0,9 до 1,1. Другие значения “примерно” могут быть очевидными из контекста, типа округления, как, к примеру, “примерно 1” также может означать от 0,5 до 1,4.

Примеры

Следующие примеры служат для лучшего понимания изобретения, но не должны никоим образом ограничивать эффективный объем изобретения.

Пример 1. Получение 30kmPEG-Lys(Mal)-(Val-Cit-PAВ-ММАЕ)₄

Получение промежуточного соединения 7 с разветвленным линкером (фиг. 1)

В раствор 1 (3,1 г, 10 ммоль) в безводном CH₂Cl₂ (50 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли соединение 2 (2,6 г, 12 ммоль, 1,2 экв.), EDCI (2,87 г, 15 ммоль, 1,5 экв.) и HOBt (0,27 г, 2 ммоль, 0,2 экв.). Смесь перемешивали до полной конверсии по данным TLC. По завершении реакции смесь экстрагировали CH₂Cl₂, а органический слой промывали насыщенным раствором NaCl, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и упаривали *in vacuo*. Неочищенную реакционную смесь очищали методом хроматографии на силикагеле, получая продукт 3.

В раствор 3 (2,6 г, 5 ммоль) в THF (50 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли 1M LiOH (20 мл, 20 ммоль, 4,0 экв.). Смесь перемешивали до полной конверсии по данным TLC. По завершении реакции смесь экстрагировали CH₂Cl₂, а органический слой промывали насыщенным раствором NaCl, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и упаривали *in vacuo*. Неочищенную реакционную смесь очищали методом хроматографии на силикагеле, получая продукт 4.

В раствор 4 (2,3 г, 5 ммоль) в безводном CH₂Cl₂ (50 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли соединение 5 (1,6 г, 6 ммоль, 1,2 экв.), EDCI (1,4 г, 7,5 ммоль, 1,5 экв.) и HOBt (0,14 г, 1 ммоль, 0,2 экв.). Смесь перемешивали до полной конверсии по данным TLC. По завершении реакции смесь экстрагировали CH₂Cl₂, а органический слой промывали насыщенным раствором NaCl, сушили над Na₂SO₄, фильтровали и упаривали *in vacuo*. Неочищенную реакционную смесь очищали методом хроматографии на силикагеле, получая продукт 6.

В раствор 6 (0,97 г, 1,0 ммоль) в DMF (10 мл) добавляли диэтиламин (1,0 мл) и проводили реакцию при комнатной температуре в течение 1,5 ч. Диэтиламин и растворитель удаляли *in vacuo* при температуре бани не выше 30°C. Остаток растирали с эфиром (25мл). Выпавший осадок собирали, фильтровали, дважды промывали эфиром (2×20 мл) и высушивали *in vacuo*, получая продукт 7.

Получение соединения 14 – Val-Cit-PAВ-ММАЕ (фиг. 2)

Растворяли соединение 8 Fmoc-Val-OH и N-гидроксисукцинимид (1,5 г, 13 ммоль, 1,3 экв.) в смеси CH₂Cl₂ (60 мл) и THF (20 мл) при 0°C и в этот раствор добавляли EDCI (2,5 г, 13 ммоль, 1,3 экв.). Затем раствор медленно нагревали до комнатной температуры. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до завершения реакции. Затем реакционную смесь упаривали при пониженном давлении. Концентрированный остаток растворяли в THF и фильтровали для удаления EDU. Фильтрат упаривали и растирали с *n*-гептаном при 5-10°C в течение 12 часов. Твердые вещества фильтровали,

промывали и высушивали *in vacuo*, получая Fmoc-Val-OSu.

Fmoc-Val-OSu (4,4 г, 10 ммоль, 1,0 экв.) растворяли в ацетонитриле (50 мл) при комнатной температуре, а затем добавляли раствор карбоната натрия (1,2 г, 11 ммоль, 1,1 экв.) и L-цитруллин (1,9 г, 11 ммоль, 1,1 экв.) в воде (50 мл). Реакционную смесь перемешивали при 35°C в течение нескольких часов до завершения реакции. Смесь охлаждали до 20°C, гасили 15%-й лимонной кислотой (150 мл) и экстрагировали смесью EtOAc/i-PrOH (9:1) (2×200 мл). Объединенную органическую фазу промывали водой (140 мл), сушили над безводным Na₂SO₄ и упаривали. Остаток промывали метил-*трет*-бутиловым эфиром, получая соединение 9 Fmoc-Val-Cit-OH.

Fmoc-Val-Cit-OH 9 (3,0 г, 6,0 ммоль, 1,0 экв.) и 4-аминобензиловый спирт (1,5 г, 12,1 ммоль, 2,0 экв.) растворяли в растворе CH₂Cl₂ (70 мл) и MeOH (30 мл). Добавляли EEDQ (3,0 г, 12,1 ммоль, 2,0 экв.) и перемешивали раствор при комнатной температуре в течение 1 дня. Добавляли еще EEDQ (1,5 г, 6,0 ммоль, 1,0 экв.) и непрерывно перемешивали раствор в течение 12 часов. Реакционную смесь упаривали, а остаток промывали метил-*трет*-бутиловым эфиром, получая соединение 10 Fmoc-Val-Cit-PAB-OH.

В раствор Fmoc-Val-Cit-PAB-OH 10 (2,0 г, 3,3 ммоль, 1,0 экв.) в DMF (20 мл) добавляли *n*-нитробензоилхлорид 11 (1,2 г, 6,6 ммоль, 2,0 экв.) и пиридин (0,4 мл, 5,0 ммоль, 1,5 экв.). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 часов, а затем упаривали. Остаток промывали смесью EtOAc с метил-*трет*-бутиловым эфиром, получая продукт 12.

В раствор 12 (1,3 г, 1,7 ммоль, 1,0 экв.) в DMF (3,4 мл) добавляли HOBt (376 мг, 2,78 ммоль, 1,6 экв.) и пиридин (0,85 мл) при комнатной температуре, а затем MMAE (1,0 г, 1,39 ммоль). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов. Реакционную смесь упаривали, а остаток очищали методом хроматографии на силикагеле, получая продукт 13 Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAE.

В раствор Fmoc-Val-Cit-PAB-MMAE 13 (1,4 г, 1,1 ммоль) в DMF (20 мл) добавляли Et₂NH (5 мл) и перемешивали раствор при комнатной температуре в течение 12 часов. Реакционную смесь упаривали, а остаток промывали смесью EtOAc с метил-*трет*-бутиловым эфиром, получая продукт 14.

Получение соединения 19 – 30kmPEG-Lys(Mal)-(MMAE)₄ (фиг. 3)

В 100 мл безводного DMF вносили H-Lys(Boc)-OH (369 мг, 1,5 ммоль, 3,0 экв.), а затем добавляли DIEA (5,0 ммоль, 10,0 экв.), соединение 15 (15 г, 0,5 ммоль, 1,0 экв.) и 150 мл безводного CH₂Cl₂. Смесь перемешивали в атмосфере аргона при комнатной температуре в течение ночи. Нерастворимые вещества отфильтровывали. Удаляли

растворитель, а остаток перекристаллизовывали из смеси CH_2Cl_2 с метил-трет-бутиловым эфиром. Выпавший осадок снова перекристаллизовывали из смеси АСN/2-пропанол. Продукт высушивали при 40°C в течение 4 ч под вакуумом, получая продукт 16.

В раствор 16 (15 г, 0,5 ммоль) в безводном CH_2Cl_2 (150 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли соединение 7 (1,1 г, 1,5 ммоль, 3,0 экв.), EDCI (0,58 г, 3,0 ммоль, 6,0 экв.) и НОВt (0,61 г, 4,5 ммоль, 9,0 экв.). Смесь перемешивали в атмосфере аргона при комнатной температуре в течение ночи. Удаляли растворитель, а остаток перекристаллизовывали из смеси CH_2Cl_2 с метил-трет-бутиловым эфиром. Выпавший осадок снова перекристаллизовывали из смеси АСN/2-пропанол. Продукт высушивали при 40°C в течение 4 ч под вакуумом, получая продукт 17.

Соединение 17 (9,0 г, 0,3 ммоль) растворяли в CH_2Cl_2 (90 мл), а затем добавляли TFA (45 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. Удаляли растворитель под вакуумом насколько возможно при температуре $<35^\circ\text{C}$. Остаток дважды перекристаллизовывали из смеси CH_2Cl_2 с метил-трет-бутиловым эфиром. Продукт сушили под вакуумом при 40°C , получая промежуточное соединение. Высушенное промежуточное соединение (6,0 г, 0,2 ммоль, 1,0 экв.) растворяли в безводном CH_2Cl_2 (60 мл) в атмосфере аргона. Раствор охлаждали до $0-5^\circ\text{C}$, а затем добавляли DIPEA (517 мг, 4 ммоль, 20 экв.) и NHS-PEG₂-Mal (0,22 г, 0,5 ммоль, 2,5 экв.) при $0-5^\circ\text{C}$. Смесь перемешивали при $0-5^\circ\text{C}$ в течение 2 ч, а затем медленно нагревали до комнатной температуры и выдерживали при ней в атмосфере аргона в течение ночи. После реакции удаляли растворитель, а остаток перекристаллизовывали из смеси CH_2Cl_2 с метил-трет-бутиловым эфиром. Выпавший осадок снова перекристаллизовывали из смеси АСN/2-пропанол. Полученный продукт высушивали при 40°C в течение 4 ч под вакуумом, получая продукт 18.

В раствор 18 (3,0 г, 0,1 ммоль) в безводном CH_2Cl_2 (30 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли соединение 14 (0,9 г, 0,8 ммоль, 8,0 экв.), EDCI (0,46 г, 2,4 ммоль, 24 экв.) и НОВt (0,49 г, 3,6 ммоль, 36 экв.). Смесь перемешивали в атмосфере аргона при комнатной температуре в течение ночи. Удаляли растворитель, а остаток перекристаллизовывали из смеси CH_2Cl_2 с метил-трет-бутиловым эфиром. Выпавший осадок снова перекристаллизовывали из смеси АСN/2-пропанол. Полученный продукт высушивали при 40°C в течение 4 ч под вакуумом, получая продукт 19.

Пример 2. Получение SCAHer2×SCAHer2

Фрагменты биспецифичных одноцепочечных антител (SCA) против Her2: антитела-1 [SCAHer2-1] и антитела-2 против Her2 [SCAHer2-2] могут быть получены по технологии рекомбинантной ДНК в клетках млекопитающих (например, CHO с помощью

Easy Select™) или дрожжей (например, с помощью набора Pichia pastoris Expression Kit, содержащего вектор pPICZ). Синтезируют последовательности ДНК SCAHer2-1×SCAHer2-2, соответствующие приведенной ниже аминокислотной последовательности (SEQ ID NO: 1), клонируют в экспрессирующие векторы и трансформируют ими клетки хозяина. Экспрессируемый белок очищают с помощью Ni-хелатирующего носителя или смолы, содержащей белок L. Для облегчения последующего конъюгирования в линкер между двумя SCA Her2 по технологии рекомбинантной ДНК вставляют функциональную группу тиола для сайт-специфической конъюгации.

Аминокислотная последовательность SCAHer2II×SCAHer2IV (SEQ ID NO: 1):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY
 TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTGGSGGSG
 GSGGSGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVAD
 VNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDY
 WGQGTLLTVSSGCGSGGSGGSGGSGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDT
 YIHWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED
 TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLTVSSGSGGSGGSGGSGGSDIQMTQSPSSLSA
 SVGDRVITITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDF
 LTISSLQPEDFATYYCQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTNNNNNN.

Пример 3. Получение 30kmPEG-(SCAHer2×SCAHer2)-(Val-Cit-PAB-MMAE)₄ (фиг. 4)

Белок SCAHer2/SCAHer2 обрабатывали восстановителем TCEP-HCl в буфере PBS (pH 7,4) при комнатной температуре в течение 30 мин, а затем доводили pH до pH 6,8 с помощью концентрированного раствора 500 мМ фосфата натрия с pH 4,12. Обработанный белок концентрировали до 5 мг/мл перед пегилированием. Пегилирование SCAHer2/SCAHer2 проводили при комнатной температуре в течение 3 часов, используя 5-10 молярных эквивалентов соединения 19 [30kmPEG-Lys(Mal)-(Val-Cit-PAB-MMAE)₄]. Реакцию гасили с помощью 10 мМ L-цистина при комнатной температуре в течение 10 мин. Конечный продукт PEG-Lys(SCAHer2/SCAHer2)-(Val-Cit-PAB-MMAE)₄ очищали на колонке для катионообменной хроматографии (CM Fast Flow) при pH 6,5 в 20 мМ фосфатном буфере. Целевое соединение 20 проверяли по SEC-HPLC и по активности на клетках.

Пример 4. Получение Val-Cit-PABC-MMAE (фиг. 5).

Fmoc-Val-OSu (соединение 2). Растворяли Fmoc-Val-OH (20,3 г, 60,0 ммоль) и N-гидроксисукцинимид (9,0 г, 78,0 ммоль) в смеси CH₂Cl₂ (120 мл) и THF (40 мл). Отдельно растворяли EDCI (13,8 г, 72,0 ммоль) в CH₂Cl₂ (200 мл) и охлаждали раствор до 0-5°C.

Затем раствор Fmoc-Val-OH/NHS вносили в раствор EDCI и реакционную смесь нагревали до комнатной температуры. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре до завершения реакции. Затем реакционную смесь упаривали при пониженном давлении насколько возможно и удаляли остаток CH_2Cl_2 с помощью THF (2×100 мл). Концентрированный остаток растворяли в THF (800 мл) и фильтровали для удаления EDU. Фильтрат упаривали при пониженном давлении, а остаток растирали с *n*-гептаном (800 мл) при $5-10^\circ\text{C}$ в течение 12 ч. Осадок фильтровали, промывали и высушивали под вакуумом, получая Fmoc-Val-OSu (2) (23,8 г, 91%) в виде белого порошка. HRMS (ESI) для $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: теор. 459,1532, факт. 459,1523.

Fmoc-Val-Cit (соединение 3). Растворяли Fmoc-Val-Osu (9,8 г, 22,5 ммоль) в DME (150 мл) при комнатной температуре. Отдельно растворяли бикарбонат натрия (2,1 г, 24,7 ммоль) в воде (150 мл) при комнатной температуре, а затем добавляли L-цитруллин (4,3 г, 24,7 ммоль) до получения однородного прозрачного раствора. Затем полученный раствор L-цитруллина вносили в раствор Fmoc-Val-Osu. Добавляли THF (75 мл) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 16 ч до завершения реакции. Реакционную смесь подкисляли 15%-й лимонной кислотой (200 мл) и упаривали на роторном испарителе. Остаток суспендировали в воде (500 мл) на 2 ч, а затем фильтровали и высушивали под вакуумом. Сухое вещество ресуспендировали в метил-*трет*-бутиловом эфире (500 мл) и перемешивали в течение 12 ч, а затем фильтровали, промывали и высушивали под вакуумом, получая Fmoc-Val-Cit (3) (6,8 г, 61%) в виде белого порошка. HRMS (ESI) для $\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: теор. 497,2400, факт. 497,2388.

Fmoc-Val-Cit-PAВОН (соединение 4). В раствор соединения 3 (4,96 г, 10,0 ммоль) и 4-аминобензилового спирта (2,46 г, 20,0 ммоль) в CH_2Cl_2 (350 мл) и MeOH (150 мл) вносили EEDQ (4,95 г, 20,0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. В реакционную смесь еще добавляли EEDQ (2,5 г, 10,0 ммоль) и перемешивали смесь еще 24 ч. По завершении реакции удаляли растворитель при пониженном давлении, а полученный остаток растирали в метил-*трет*-бутиловом эфире (800 мл) в течение 12 ч. Твердые вещества фильтровали, промывали и сушили под вакуумом, получая соединение 4 (4,1 г, 69%) в виде белого порошка. HRMS (ESI) для $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{N}_5\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: теор. 602,2979, факт. 602,2969.

Fmoc-Val-Cit-PAВC-PNP (соединение 5). В раствор соединения 4 (5,2 г, 8,6 ммоль) и бис(4-нитрофенил)карбоната (4,9 г, 16,1 ммоль) в DMF (52 мл) при комнатной температуре добавляли DIPEA (2,5 мл, 15,0 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 5 ч до завершения реакции. Продукт осаждали добавлением безводного этилацетата (250 мл) и метил-*трет*-бутилового эфира (250 мл).

Суспензию охлаждали до 0°C и перемешивали в течение 30 мин. Твердые вещества отделяли фильтрованием, промывали и высушивали под вакуумом, получая Fmoc-Val-Cit-PABC-PNP (5) (4,7 г, 72%) в виде бледно-желтого порошка. HRMS (ESI) для C₄₀H₄₃N₆O₁₀ [M+H]⁺: теор. 602,2979, факт. 602,2969.

Fmoc-Val-Cit-PABC-MMAE (соединение 6). Растворяли соединение MMAE (2,0 г, 1,8 ммоль) и Fmoc-Val-Cit-PABC-PNP (5) (2,8 г, 3,6 ммоль) в DMF (20 мл). Затем добавляли HOBt (0,75 г, 5,6 ммоль) и пиридин (1,7 мл) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 24 ч. По завершении реакции реакционную смесь охлаждали до 0°C, а затем добавляли метил-*трет*-бутиловый эфир (180 мл) для осаждения продукта. Суспензию перемешивали в течение 3-5 ч, а затем фильтровали, промывали и высушивали под вакуумом. Неочищенный продукт очищали методом колоночной хроматографии, получая Fmoc-Val-Cit-PABC-MMAE (6) (3,0 г, 80%) в виде желтого порошка. HRMS (ESI) для C₇₃H₁₀₅N₁₀O₁₄ [M+H]⁺: теор. 1345,7812, факт. 1345,7820.

Val-Cit-PABC-MMAE (соединение 7). Соединение 6 (3,0 г, 2,2 ммоль) суспендировали в безводном DMF (40 мл) и перемешивали при комнатной температуре до получения однородной суспензии. Затем добавляли диэтиламин (10 мл) и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 3 ч. По завершении реакции добавляли метил-*трет*-бутиловый эфир (100 мл) и этилацетат (50 мл) на протяжении 60 мин. Полученную смесь перемешивали в течение 4 ч при 0°C. Твердые вещества отфильтровывали и высушивали под вакуумом, получая Val-Cit-PABC-MMAE (7) (2,3 г, 92%) в виде бледно-желтого порошка. HRMS (ESI) для C₅₈H₉₅N₁₀O₁₂ [M+H]⁺: теор. 1123,7131, факт. 1123,7142.

Пример 5. Получение соединения 13 (разветвленный линкер В с 2×MMAE) (фиг. 6)

Соединение 10. В раствор соединения 8 (0,62 г, 2,0 ммоль) в безводном CH₂Cl₂ (15 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли ди-*трет*-бутил-3,3'-азандиилдипропаноат (9) (0,62 г, 2,2 ммоль), EDCI (0,58 г, 3,0 ммоль) и HOBt (54 мг, 0,4 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре и контролировали по TLC. По завершении реакции смесь экстрагировали CH₂Cl₂ (2×30 мл), а органические слои объединяли, промывали насыщенным раствором NaCl (20 мл) и сушили над Na₂SO₄. Раствор упаривали на ротаторном испарителе. Неочищенную реакционную смесь очищали методом хроматографии на силикагеле, получая соединение 10 (1,1 г, 96%) в виде бесцветного масла. HRMS (ESI) для C₃₂H₄₃N₂O₇ [M+H]⁺: теор. 567,3070, факт. 567,3062.

Соединение 11. Растворяли соединение 10 (5,2 г, 9,2 ммоль) в CH₂Cl₂ (100 мл), а затем добавляли TFA (25 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение

3 ч. Удаляли растворитель под вакуумом насколько возможно при температуре $<35^{\circ}\text{C}$. Остаток очищали методом хроматографии на силикагеле, получая соединение 11 (3,4 г, 83%) в виде бесцветного масла. HRMS (ESI) для $\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: теор. 455,1818, факт. 455,1824.

Соединение 12. В раствор соединения 11 (41 мг, 0,091 ммоль) в безводном CH_2Cl_2 (2 мл) и DMF (2 мл) с перемешиванием при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли Val-Cit-PAVC-MMAE (7) (224 мг, 0,2 ммоль), EDCI (52 мг, 0,27 ммоль) и HOBT (5 мг, 0,04 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре и контролировали по TLC. По завершении реакции смесь упаривали под вакуумом. Остаток очищали методом препаративной HPLC на колонке Welch Ultimate XB-C18 (элюенты: А = 0,1% TFA в воде, В = MeCN), получая соединение 12 (74 мг, 31%) в виде бледно-желтого вещества. HRMS (ESI) для $\text{C}_{140}\text{H}_{212}\text{N}_{22}\text{O}_{29}$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$: теор. 1333,2912, факт. 1333,2907.

Соединение 13. В раствор соединения 12 (73 мг) в DMF (3 мл) добавляли диэтиламин (0,6 мл). Проводили реакцию при комнатной температуре в течение 4 ч. Реакционную смесь упаривали на роторном испарителе, а остаток очищали методом препаративной HPLC на колонке Welch Ultimate XB-C18 (элюенты: А = 0,1% TFA в воде, В = MeCN), получая соединение 13 (71 мг, 99%) в виде бледно-желтого вещества. HRMS (ESI) для $\text{C}_{125}\text{H}_{202}\text{N}_{22}\text{O}_{27}$ $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$: теор. 1222,2572, факт. 1222,2560.

Пример 6. Получение соединения 18 (разветвленный линкер В с $2\times\text{MMAE}$) (фиг. 7)

Соединение 15. В раствор соединения 14 (0,68 г, 2,0 ммоль) в безводном CH_2Cl_2 (10 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли ди-*трет*-бутил-3,3'-азандиилдипропаноат (9) (0,64 мл, 2,2 ммоль), EDCI (0,58 г, 3,0 ммоль) и HOBT (54 мг, 0,4 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре и отслеживали по TLC. По завершении реакции смесь экстрагировали CH_2Cl_2 (2×30 мл), а объединенный органический слой промывали насыщенным раствором NaCl (20 мл), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и упаривали на роторном испарителе. Остаток очищали методом хроматографии на силикагеле, получая соединение 15 (1,2 г, 99%) в виде бесцветного масла. HRMS (ESI) для $\text{C}_{34}\text{H}_{47}\text{N}_2\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: теор. 595,3383, факт. 595,3380.

Соединение 16. Растворяли соединение 15 (0,5 г, 0,84 ммоль) в CH_2Cl_2 (6,0 мл), а затем добавляли TFA (3,0 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Удаляли растворитель под вакуумом насколько возможно при $<35^{\circ}\text{C}$. Остаток очищали методом хроматографии на силикагеле, получая соединение 16 (0,34 г, 85%) в виде бесцветного масла. HRMS (ESI) для $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_7$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: теор. 483,2131, факт. 483,2127.

Соединение 17. В раствор соединения 16 (185 мг, 0,383 ммоль) в смеси безводного

CH₂Cl₂ (8 мл) и DMF (8 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли Val-Cit-PAVC-MMAE (7) (947 мг, 0,843 ммоль), EDCI (238 мг, 1,23 ммоль) и HOBT (26 мг, 0,19 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре и отслеживали по HPLC. По завершении реакции смесь упаривали на роторном испарителе. Остаток очищали методом препаративной HPLC на колонке Welch Ultimate XB-C18 (элюенты: А = 0,1% TFA в воде, В = MeCN), получая соединение 17 (0,56 г, 54%) в виде бледно-желтого вещества. HRMS (ESI) для C₁₄₂H₂₁₆N₂₂O₂₉ [M+H]⁺: теор. 2694,6137, факт. 2694,6146.

Соединение 18. В раствор соединения 17 (0,62 г) в DMF (5 мл) добавляли диэтиламин (2,0 мл). Проводили реакцию при комнатной температуре в течение 2 ч. Реакционную смесь упаривали на роторном испарителе, а остаток очищали методом препаративной HPLC на колонке Welch Ultimate XB-C18 (элюенты: А = 0,1% TFA в воде, В = MeCN), получая соединение 18 (0,51 г, 89%) в виде бледно-желтого вещества. HRMS (ESI) для C₁₂₇H₂₀₅N₂₂O₂₇ [M+H]⁺: теор. 2471,5378, факт. 2471,5369; для C₁₂₇H₂₀₆N₂₂O₂₇ [M+2H]²⁺: теор. 1236,2728, факт. 1236,2744.

Пример 7. Получение соединения 22 (разветвленный линкер В с 4×MMAE) (фиг. 8)

Соединение 20. В раствор соединения 19 (0,76 г, 2,0 ммоль) в безводном CH₂Cl₂ (10 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли ди-*трет*-бутил-3,3'-азандиилдипропаноат (9) (0,64 мл, 2,2 ммоль), EDCI (0,58 г, 3,0 ммоль) и HOBT (54 мг, 0,4 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре и отслеживали по TLC. По завершении реакции смесь экстрагировали CH₂Cl₂ (2×30 мл), а объединенный органический слой промывали насыщенным раствором NaCl (20 мл), сушили над Na₂SO₄, фильтровали и упаривали на роторном испарителе. Неочищенную реакционную смесь очищали методом хроматографии на силикагеле, получая соединение 20 (1,2 г, 99%) в виде бесцветного масла. HRMS (ESI) для C₂₉H₅₅N₄O₁₁ [M+H]⁺: теор. 635,3867, факт. 635,3860.

Соединение 21. Растворяли соединение 20 (0,3 г, 0,47 ммоль) в CH₂Cl₂ (4,0 мл), а затем добавляли TFA (2,0 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Удаляли растворитель под вакуумом насколько возможно при <35°C. Остаток очищали методом хроматографии на силикагеле, получая соединение 21 (0,34 г, 85%) в виде бесцветного масла. HRMS (ESI) для C₂₁H₃₉N₄O₁₁ [M+H]⁺: теор. 523,2615, факт. 523,2607.

Соединение 22. В раствор соединения 21 (39 мг, 0,076 ммоль) в смеси безводного CH₂Cl₂ (2 мл) и DMF (2 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли соединение 18 (0,41 г, 0,17 ммоль), EDCI (43 мг, 0,23 ммоль) и HOBT (4,0 мг, 0,03 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре и отслеживали по HPLC.

По завершении реакции смесь упаривали на роторном испарителе. Остаток очищали методом препаративной HPLC на колонке Welch Ultimate XB-C18 (элюенты: А = 0,1% TFA в воде, В = MeCN), получая соединение 22 (81 мг, 20%) в виде бледно-желтого вещества. HRMS (ESI) для $C_{275}H_{445}N_{48}O_{63}$ $[M+3H]^{3+}$: теор. 1810,1053, факт. 1810,1061; для $C_{275}H_{446}N_{48}O_{63}$ $[M+4H]^{4+}$: теор. 1357,8310, факт. 1357,8346.

Пример 8. Получение соединения 27 (разветвленный линкер В с 4×ММАЕ) (фиг. 9)

Соединение 24. В раствор соединения 21 (0,57 г, 1,1 ммоль) в безводном CH_2Cl_2 (10 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли соединение 23 (0,51 г, 2,4 ммоль), EDCI (0,67 г, 3,5 ммоль), HOBT (74 мг, 0,55 ммоль) и DIPEA (0,78 мл, 4,4 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре и отслеживали по TLC. По завершении реакции смесь экстрагировали CH_2Cl_2 (2×30 мл), а объединенный органический слой промывали насыщенным раствором NaCl (20 мл), сушили над Na_2SO_4 , фильтровали и упаривали на роторном испарителе. Неочищенную реакционную смесь очищали методом хроматографии на силикагеле, получая соединение 24 (0,7 г, 79%) в виде бесцветного масла. HRMS (ESI) для $C_{39}H_{73}N_6O_{13}$ $[M+H]^+$: теор. 833,5236, факт. 833,5231.

Соединение 25. Растворили соединение 24 (0,52 г, 0,62 ммоль) в CH_2Cl_2 (5,0 мл), а затем добавляли TFA (2,0 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. Удаляли растворитель под вакуумом насколько возможно при $<35^\circ C$. Остаток очищали методом хроматографии на силикагеле, получая соединение 25 (0,42 г, 93%) в виде бесцветного масла. HRMS (ESI) для $C_{31}H_{57}N_6O_{13}$ $[M+H]^+$: теор. 721,3984, факт. 721,3997.

Соединение 26. В раствор соединения 25 (77 мг, 0,11 ммоль) в DMF (5 мл) при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли соединение 18 (0,58 г, 0,24 ммоль), EDCI (82 мг, 0,43 ммоль) и HOBT (14 мг, 0,11 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре и отслеживали по HPLC. По завершении реакции смесь упаривали на роторном испарителе. Неочищенную реакционную смесь очищали методом препаративной HPLC на колонке Welch Ultimate XB-C18 (элюенты: А = 0,1% TFA в воде, В = MeCN), получая соединение 26 (0,23 г, 38%) в виде бледно-желтого вещества. HRMS (ESI) для $C_{285}H_{463}N_{50}O_{65}$ $[M+3H]^{3+}$: теор. 1876,4854, факт. 1876,4851; для $C_{285}H_{464}N_{50}O_{65}$ $[M+4H]^{4+}$: теор. 1407,6160, факт. 1407,6158.

Соединение 27. В раствор азиды 26 (180 мг, 0,03 ммоль) в метаноле (10 мл) добавляли катализатор Линдлара (130 мг, 5% масс.). Реакционную колбу откачивали и продували газообразным водородом. Реакционную смесь перемешивали в атмосфере водорода (баллон) при комнатной температуре в течение 5 ч. По завершении реакции катализатор фильтровали через слой целита, осадок промывали метанолом (10 мл), а

фильтрат упаривали при пониженном давлении. Остаток очищали методом препаративной HPLC на колонке Welch Ultimate XB-C18 (элюенты: А = 0,1% TFA в воде, В = MeCN), получая соединение 27 (130 мг, 74%) в виде бледно-желтого вещества. HRMS (ESI) для $C_{285}H_{465}N_{48}O_{65}$ $[M+3H]^{3+}$: теор. 1867,8219, факт. 1867,8217; для $C_{285}H_{466}N_{48}O_{65}$ $[M+4H]^{4+}$: теор. 1401,1184, факт. 1401,1181.

Пример 9. Получение соединения 32 (30kmPEG(малеимид)-2ММАЕ) (фиг. 10)

Соединение 29. В безводный DMF (100 мл) вносили H-Lys(Вос)-ОН (369 мг, 1,5 ммоль), а затем добавляли DIPEA (0,83 мл, 5,0 ммоль), соединение 28 (15 г, 0,5 ммоль) и безводный CH_2Cl_2 (150 мл). Смесь перемешивали в атмосфере аргона при комнатной температуре в течение ночи. Нерастворимые вещества отфильтровывали. Удаляли растворитель, а остаток перекристаллизовывали из смеси CH_2Cl_2 и метил-*трет*-бутилового эфира (45 мл/300 мл). Выделенный осадок перекристаллизовывали из смеси MeCN/2-пропанол (30 мл/450 мл). Продукт высушивали при 40°C в течение 4 ч под вакуумом, получая соединение 29 (13,6 г, 91%) в виде белого порошка. ^{13}C -ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$) δ 172.74, 155.65, 155.55, 78.41, 70.13 (PEG), 63.66, 58.55, 52.99, 39.90, 31.70, 29.17, 28.08, 21.97.

Соединение 30. В раствор соединения 29 (5,7 г, 0,19 ммоль) в безводном CH_2Cl_2 (57 мл) добавляли TFA (29,5 мл). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Удаляли растворитель под вакуумом насколько возможно при <35°C. Остаток дважды перекристаллизовывали из смеси CH_2Cl_2 с метил-*трет*-бутиловым эфиром (14,5 мл/115 мл). Выделенный продукт высушивали под вакуумом при 40°C, получая соединение 30 (4,7 г, 84%) в виде белого порошка.

Соединение 31. В раствор соединения 30 (5,5 г, 0,18 ммоль) в безводном CH_2Cl_2 (55 мл) с перемешиванием при 0°C вносили DIPEA (473 мг, 3,6 ммоль), а затем добавляли NHS-PEG₂-Mal (0,2 г, 0,47 ммоль). Смесь перемешивали при 0°C в течение 1,5 ч. Раствор медленно нагревали от 0°C до комнатной температуры, а затем перемешивали в атмосфере аргона в течение ночи. Удаляли растворитель, а остаток перекристаллизовывали из смеси CH_2Cl_2 с метил-*трет*-бутиловым эфиром (13,8 мл/110 мл). Выделенный осадок снова перекристаллизовывали из смеси MeCN/2-пропанол (11 мл/165 мл). Осадок высушивали под вакуумом, получая соединение 31 (5,0 г, 90%) в виде белого порошка. ^{13}C -ЯМР (126 МГц, $CDCl_3$) δ 172.76, 171.46, 170.01, 169.94, 155.55, 133.82, 71.37, 70.01 (PEG), 69.05, 68.92, 66.49, 63.53, 58.44, 52.92, 38.65, 36.01, 33.84, 33.71, 31.36, 28.21, 21.85.

Соединение 32. В раствор соединения 31 (0,76 г, 0,025 ммоль) в смеси растворителей DMF/ CH_2Cl_2 (5 мл/5 мл) с перемешиванием при комнатной температуре в

атмосфере аргона добавляли соединение 13 (0,12 г, 0,05 ммоль), DCC (31 мг, 0,15 ммоль) и DMAP (28 мг, 0,23 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре и отслеживали по HPLC. По завершении реакции смесь упаривали на роторном испарителе. Остаток очищали методом препаративной HPLC на колонке Phenomenex Jupiter[®] C18 (элюенты: А = 0,1% TFA в воде, В = MeCN), получая соединение 32 (0,36 г, 47%) в виде белого вещества. MS (MALDI-TOF) m/z 33863.

Пример 10. Получение соединения 35 (20k mPEG(малеимид)-4ММАЕ) (фиг. 11)

Соединение 33. Насчет синтеза соединения 33 см. получение соединения 31.

Соединение 34. В раствор соединения 33 (2,0 г, 0,1 ммоль) в безводном CH₂Cl₂ (20 мл) с перемешиванием при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли DBCO-NH₂ (83 мг, 0,3 ммоль), EDCI (115 мг, 0,6 ммоль) и HOBT (122 мг, 0,9 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре и отслеживали по HPLC. Удаляли растворитель, а остаток перекристаллизовывали из смеси CH₂Cl₂ с метил-*трет*-бутиловым эфиром (5 мл/ 40 мл). Выделенный осадок снова перекристаллизовывали из смеси MeCN/2-пропанол (4 мл/60 мл). Осадок высушивали при 40°C в течение 4 ч под вакуумом, получая соединение 34 (1,9 г, 89%) в виде белого порошка. ¹³C-ЯМР (214 МГц, CDCl₃) δ 171.12, 171.08, 170.05, 169.75, 155.64, 150.59 (d, J = 21.4 Hz), 147.54 (d, J = 6.6 Hz), 133.82, 131.69 (d, J = 13.8 Hz), 128.70, 128.27 (d, J = 11.3 Hz), 127.93 (d, J = 5.4 Hz), 127.79, 127.39 (d, J = 8.3 Hz), 126.66, 125.04 (d, J = 6.0 Hz), 122.46 (d, J = 4.9 Hz), 121.85 (d, J = 11.3 Hz), 114.21 (d, J = 9.8 Hz), 107.38 (d, J = 33.6 Hz), 70.06 (PEG), 66.59, 63.64 (d, J = 7.3 Hz), 58.50, 54.97 (d, J = 13.3 Hz), 54.23 (d, J = 59.1 Hz), 38.61, 38.40, 36.31, 34.86 (d, J = 18.0 Hz), 34.05 (d, J = 20.8 Hz), 33.89, 33.78, 31.76 (d, J = 40.2 Hz), 28.31 (d, J = 9.8 Hz), 21.99 (d, J = 17.1 Hz).

Соединение 35. Растворяли соединение 34 (147мг, 0,007 ммоль) в безводном MeOH (3 мл), а затем добавляли соединение 22 (40 мг, 0,007 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Смесь упаривали на роторном испарителе, а остаток очищали методом препаративной HPLC на колонке Phenomenex Jupiter[®] C18 (элюенты: А = 0,1% TFA в воде, В = MeCN), получая соединение 35 (41 мг, 22%) в виде белого вещества. MS (MALDI-TOF) m/z 25963.

Пример 11. Получение соединения 39 (малеимид-20k mPEG-4ММАЕ) (фиг. 12)

Соединение 37. В раствор амин-PEG20k-CO₂H (36) (1,0 г, 0,05 ммоль) в безводном CH₂Cl₂ (10 мл) с перемешиванием при 0°C вносили DIPEA (83 мкл, 0,5 ммоль), а затем добавляли N-гидроксисукцинимидный эфир 6-малеимидогексановой кислоты (46 мг, 0,15 ммоль). Смесь перемешивали при 0°C в течение 1,5 ч. Раствор медленно нагревали от 0°C до комнатной температуры и перемешивали в атмосфере аргона в течение ночи. Удаляли

растворитель, а остаток перекристаллизовывали из смеси CH_2Cl_2 с метил-*трет*-бутиловым эфиром (2,5 мл/20 мл). Выделенный осадок снова перекристаллизовывали из смеси MeCN/2-пропанол (2 мл/30 мл). Осадок высушивали под вакуумом, получая соединение 37 (0,95 г, 95%) в виде белого порошка.

Соединение 38. В раствор соединения 37 (0,9 г, 0,045 ммоль) в безводном CH_2Cl_2 (9 мл) с перемешиванием при комнатной температуре в атмосфере аргона добавляли DBCO- NH_2 (37 мг, 0,14 ммоль), EDCI (52 мг, 0,27 ммоль) и HOBT (55 мг, 0,41 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре и отслеживали по HPLC. Удаляли растворитель, а остаток перекристаллизовывали из смеси CH_2Cl_2 с метил-*трет*-бутиловым эфиром (2,5 мл/20 мл). Выделенный осадок снова перекристаллизовывали из смеси MeCN/2-пропанол (2 мл/30 мл). Продукт высушивали при 40°C в течение 4 ч под вакуумом, получая соединение 38 (0,86 г, 89%) в виде белого порошка.

Соединение 39. Растворяли соединение 38 (166 мг, 0,008 ммоль) в безводном MeOH (3 мл), а затем добавляли соединение 22 (30 мг, 0,006 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Удаляли растворитель на роторном испарителе, а остаток очищали методом препаративной HPLC на колонке Phenomenex Jupiter[®] C18 (элюенты: A = 0,1% TFA в воде, B = MeCN), получая соединение 39 (37 мг, 27%) в виде белого вещества. HRMS (ESI) или ЯМР.

Пример 12. Получение соединения 41 (DBCO-20kPEG-4ММАЕ) (фиг. 13)

Соединение 40. В раствор амин-PEG20k- CO_2H (36) (1,0 г, 0,05 ммоль) в безводном CH_2Cl_2 (10 мл) с перемешиванием при 0°C вносили DIPEA (83 мкл, 0,5 ммоль), а затем добавляли DBCO-NHS (60 мг, 0,15 ммоль). Смесь перемешивали при 0°C в течение 1,5 ч. Раствор медленно нагревали от 0°C до комнатной температуры и перемешивали в атмосфере аргона в течение ночи. Удаляли растворитель, а остаток перекристаллизовывали из смеси CH_2Cl_2 с метил-*трет*-бутиловым эфиром (2,5 мл/20 мл). Выделенный осадок снова перекристаллизовывали из смеси MeCN/2-пропанол (2 мл/30 мл). Осадок высушивали под вакуумом, получая соединение 40 (0,91 г, 91%) в виде белого порошка.

Соединение 41. В атмосфере аргона растворяли соединение 40 (120 мг, 0,006 ммоль) в смеси растворителей CH_2Cl_2 /DMF (2 мл/2 мл), а затем последовательно добавляли соединение 27 (50 мг, 0,009 ммоль), EDCI (6,9 мг, 0,036 ммоль) и HOBT (7,3 мг, 0,054 ммоль). Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. Реакционную смесь упаривали на роторном испарителе, а остаток очищали методом препаративной HPLC на колонке Phenomenex Jupiter[®] C18 (элюенты: A = 0,1% TFA в воде, B = MeCN), получая соединение 41 (53 мг, 36%) в виде белого вещества. MS

(MALDI-TOF) m/z 25450 Да.

Пример 13. Получение SCAHer2II×SCAHer2IV (соединение 42) (фиг. 14)

SCAHer2II×SCAHer2IV с аминокислотной последовательностью по SEQ ID NO: 1 получали и очищали, как описано в примере 2. В частности, собирали после центрифугирования около 1,6 л супернатанта культуральной среды клеток хозяина, экспрессирующих SCAHer2II×SCAHer2IV, и наносили на заряженную Ni колонку (2,6 см × 13 см) (кат. № AA207311, BestChrome, Shanghai, Китай), уравновешенную с 50 мМ фосфатом натрия, 100 мМ NaCl, pH 7,0. Белок элюировали буфером из 50 мМ фосфата натрия, 250 мМ имидазола, 100 мМ NaCl, pH 7,0, и собирали фракции в пробирках на 15 мл. Полученные 82 мг захваченного белка дополнительно очищали на колонке с CaptoL (кат. № 17-5478-02, GE Healthcare, NJ). Колонку с CaptoL (1,6 см × 8 см) уравновешивали с 50 мМ фосфатом натрия, 100 мМ NaCl, pH 7,0, и элюировали белок 75 мМ уксусной кислотой, pH 3,0, получая 58,3 мг белка. На фиг. 14 представлен анализ методами SDS-PAGE и SEC-HPLC очищенного соединения 42 (SCAHer2II×SCAHer2IV).

Пример 14. Получение 30kmPEG-(SCAHer2II×SCAHer2IV)-2ММАЕ (соединение 43, JY201) (фиг. 15)

Белок SCAHer2II×SCAHer2IV (42) обрабатывали восстановителем ТСЕР-НСI в буфере PBS (pH = 7,4) при комнатной температуре в течение 30 мин, а затем доводили до pH 6,8 концентрированным раствором 500 мМ фосфата натрия, pH 4,12. Перед конъюгированием обработанный белок концентрировали до 5 мг/мл. Конъюгирование SCAHer2II×SCAHer2IV проводили при комнатной температуре в течение 3 часов с 5-10 молярными эквивалентами соединения 32 (30kmPEG-(малеимид)-2ММАЕ). Реакцию гасили 10 мМ L-цистином при комнатной температуре в течение 10 мин. Конечный продукт 30kmPEG-(SCAHer2II×SCAHer2IV)-2ММАЕ (JY201) очищали на колонке для катионообменной хроматографии (CM Fast Flow, кат. № 17-0719-01, GE Healthcare, NJ) при pH 6,5 в 20 мМ фосфатном буфере. На фиг. 15А схематически представлена схема реакции получения соединения 43, а полученное соединение 43 проверяли методом SDS-PAGE (фиг. 15В).

Пример 15. Получение SCAHer2II×SCAHer2IV-20kPEG-4ММАЕ (соединение 44, JY201b) (фиг. 16)

Белок SCAHer2II×SCAHer2IV (42) обрабатывали восстановителем ТСЕР-НСI в буфере PBS (pH = 7,4) при комнатной температуре в течение 30 мин, а затем доводили до pH 6,8 концентрированным раствором 500 мМ фосфата натрия, pH 4,12. Перед конъюгированием обработанный белок концентрировали до 5 мг/мл. Конъюгирование SCAHer2II×SCAHer2IV проводили при комнатной температуре в течение 3 часов с 5-10

молярными эквивалентами соединения 41 (DBCO-20kPEG-4MMAE). Конечный продукт очищали на колонке для эксклюзионной хроматографии HiPrep™ 16/60, Sephacryl™ S-300HR (кат. № 17-1167-01, GE Healthcare, NJ) при pH 6,5 в 20 mM фосфатном буфере. На фиг. 16А схематически представлена схема реакции получения соединения 44 SCAHer2II×SCAHer2IV-20kPEG-4MMAE (JY201b), а конечное соединение 44 проверяли методом SDS-PAGE (фиг. 16В).

Пример 16. Цитотоксичность *in vitro* соединения 43 (JY201) и соединения 44 (JY201b) (фиг. 17, 18)

Для того, чтобы оценить влияние ПЭГилирования на цитотоксичность пегилированных BsADC JY201 и JY201b *in vitro*, проводили анализ жизнеспособности клеток после инкубации их с соединением 43 (JY201) или соединением 44 (JY201b) или с контролями. В частности, в плоскодонный 96-луночный планшет высевали по 4×10^4 клеток на лунку и давали клеткам прикрепиться. Через 6 часов клетки обрабатывали указанными дозами JY201 при 37°C в течение 72 часов, после чего добавляли по 20 мкл MTS в каждую лунку в соответствии с методикой производителя. Затем определяли поглощение при 490 нм (OD₄₉₀) и рассчитывали степень цитотоксичности.

Из фиг. 17 видно, что значения EC₅₀ у JY201 для клеток SKBR-3 и HCC-827 составляют 2,23 нМ и 75,55 нМ, соответственно. Поскольку клетки HCC827 экспрессируют Her2 на гораздо меньшем уровне, чем SKBR-3 (Kayatani H. et al., 2020, Biochem Biophys Res Commun. 532, 341-346), эти результаты свидетельствуют, что JY201 может индуцировать сильную цитотоксичность для опухолевых клеток с очень низкой экспрессией Her2. Кроме того, результат на левой панели фиг. 17 показывает, что одноцепочечное антитело Her2II×Her2IV не вызывает заметной токсичности для SKBR-3, поэтому цитотоксичность JY201 была вызвана нагрузкой MMAE.

Используя метод, описанный выше, тестировали цитотоксичность JY201 *in vitro* на клетках JMT-1 и сравнивали с трастузумаб эмтансином (T-DM1). Неожиданно результаты на фиг. 18А показали, что значение EC₅₀ у JY201 очень близко к таковому у T-DM1 (3,29 мкг/мл и 3,74 мкг/мл, соответственно), хотя DAR (соотношение лекарственного средства к антителу) составляло всего 2 для JY201, тогда как DAR для T-DM1 равно 4. Эти результаты свидетельствуют, что эффективность пегилированного BsADC JY201 только с 2 грузами по индуцированию цитотоксичности *in vitro* для опухолевых клеток была сравнима с T-DM1 с 4 грузами.

Далее проводились эксперименты для проверки цитотоксичности JY201b *in vitro* (DAR = 4) в сравнении с JY201 и T-DM1 (фиг. 18В, С, D и E). Результаты показали, что пегилированный BsADC JY201b с 4 грузами был более эффективен, чем JY201 с 2

грузами (фиг. 18А и D), и сравним или более эффективен, чем T-DM1 по всей панели линий раковых клеток при указанных концентрациях. Следует отметить, что при самых низких концентрациях исследуемых образцов JY201b проявил себя намного лучше, чем T-DM1, индуцируя сильную цитотоксичность для опухолевых клеток с низкой экспрессией целевых антигенов (уровень экспрессии Her2: SKBR-3 > JMT-1 > ZR75-1, см. следующую таблицу). Это достоинство, наряду с лучшим токсическим профилем, вселяет большие надежды на JY201b при лечении больных раком с низкой экспрессией Her2, для которых недоступны современные методы лечения.

Клетки	Экспрессия Her2
SKBR-3	> 3+
JMT-1	2+
ZR75-1	1+

Пример 17. Интернализация JY201 клетками мишени (фиг. 19)

Для исследования механизма цитотоксического эффекта, засвидетельствованного в примере 16, исследовали интернализацию пегилированного BsADC JY201 клетками SKBR-3 методом проточной цитометрии, описанным Мацудзаки (Matsuzaki S. et al., 2018, International Journal of Cancer 142, 1056-1066). После трипсинизации клетки SKBR-3 отмывали и ресуспендировали до концентрации в 1×10^7 клеток/мл в PBS, содержащем 2% FBS. Клеточные суспензии разделяли на аликвоты по 100 мкл на пробирку. Клетки SKBR-3 обрабатывали помеченным Fluor647 T-DM1 или JY201 по 10 мкг/мл при 4°C в течение ночи. После двукратной промывки охлажденным PBS клетки инкубировали при 37°C в течение указанного периода времени, чтобы обеспечить интернализацию T-DM1 и JY201. Инкубированные клетки промывали 3×200 мкл буфера FACS. После последней промывки добавляли 100 мкл буфера FACS, чтобы ресуспендировать клетки для проточной цитометрии. Степень интернализации рассчитывали по формуле:

$$(\text{общая MFI при } 4^\circ\text{C} - \text{общая MFI при } 37^\circ\text{C}) / \text{общая MFI при } 4^\circ\text{C} \times 100\%.$$

Из приведенных на фиг. 19 результатов видно, что степень интернализации JY201 клетками SKBR-3 во все исследованные моменты времени была примерно в 2 раза выше, чем у T-DM1, хотя сродство JY201 к мишени было намного слабее, чем у T-DM1 (данные не приводятся). Этот результат означает, что механизмы динамической интернализации и оттока, используемые традиционными Fc-содержащими ADC, может быть не применим к пегилированным ADC, описанным здесь. Отметим, что механизмы интернализации, связанные со связыванием Fc-компонентов традиционных ADC, к примеру, с FcγR или маннозным рецептором в нормальных тканях или клетках, зачастую способствуют внецелевой токсичности или даже ограничивающей дозу токсичности препаратов ADC (Krop IE et al., 2012, J Clin Oncol., 30, 3234-41; Uppal H. et al., 2015, Clin Cancer Res. 21,

123-133; Gorovits B. et al., 2013, *Cancer Immunol Immunother.* 62, 217-223).

Пример 18. JY201 не выходит из клеток мишени после интернализации (фиг. 20)

У Fc-содержащих ADC обычно наблюдается отток из клеток мишени после интернализации. Это может приводить к внецелевой токсичности, снижению эффективности и лекарственной устойчивости. Это явление объясняется опосредованной FcRn рециркуляцией (Junghans R.P. et al., 1996, *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 5512-5516; Ryman J.T. et al., 2017, *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 6, 576-588). Сообщалось, что 50% интернализованного трастузумаба выходит из клеток мишени в пределах 5 минут после интернализации, и это число возрастало до 85% в пределах 30 минут после интернализации (Barok M., Joensuu et al., 2014, *Breast Cancer Res.* 16, 209-209).

Чтобы проверить, выходит ли JY201 из клеток мишени после интернализации, конъюгировали HRP (пероксидазой хрена) с JY201 по методике, предоставленной производителем. В плоскодонный 96-луночный планшет высевали по 3×10^4 клеток SKBR-3 на всю ночь, чтобы клетки могли прикрепиться. На второй день клетки промывали и инкубировали с 0,25 мкг/мл JY201 в течение 18 часов при комнатной температуре. После трехкратной промывки полной средой клетки затем инкубировали при 37°C. В различные моменты времени собирали клеточные лизаты и супернатанты. В клеточных лизатах и супернатантах определяли содержание JY201-HRP, добавляя раствор ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидина) по 50 мкл на лунку. Реакцию останавливали добавлением 0,2 М серной кислоты по 50 мкл на лунку и измеряли OD₄₅₀ на анализаторе для микропланшетов. Такой же эксперимент проводили для T-DM1, при этом инкубировали с клетками 0,25 мкг/мл T-DM1-HRP в течение 4 часов, после чего промывали, меняли среду и еще инкубировали в течение 2 ч и 24 ч.

Из фиг. 20А видно, что JY201 в супернатанте не повышался значительно по сравнению с 0 ч при дальнейшей инкубации в течение 3 ч и 6 ч. В то же время в клеточных лизатах JY201 не снижался через 3 ч и 6 ч (фиг. 20В). Кроме того, в клеточных лизатах OD₄₅₀ в 0 ч была по меньшей мере в 2 раза выше, чем в супернатантах. Итак, видно, что JY201 интернализуется, а интернализированный JY201 не выходит обратно в супернатант.

Для сравнения также измеряли уровни T-DM1 в супернатантах, которые значительно повышались ($p < 0,001$) после 2-часовой инкубации (фиг. 20С). Кроме того, уровень T-DM1 после 24-часовой инкубации был значительно выше, чем при 2-часовой инкубации, указывая на продолжающийся отток T-DM1. Соответственно, T-DM1 в клеточных лизатах значительно снижался через 24 часа ($p < 0,001$) (фиг. 20D). Механизм оттока T-DM1 может привести к снижению клинической эффективности и повышению

токсичности лекарственного средства.

В целом данные на фиг. 20 демонстрируют неожиданные результаты об отсутствии механизма рециркуляции или оттока для JY201, что может быть связано с отсутствием Fc-компонента у JY201.

Пример 19. JY201 не проявляет цитотоксичности в отношении мегакариоцитов (фиг. 21)

Тромбоцитопения, характеризующаяся низким числом тромбоцитов, является серьезным побочным эффектом у больных раком, получающих ADC (Uppal H. et al., 2015, Clin Cancer Res. 21, 123-133; Donaghy H., 2016, MAbs 8, 659-671; de Goeij B.E. et al., 2016, Curr Opin Immunol. 40, 14-23), который обуславливает ограничивающую дозу токсичность T-DM1 (Krop IE et al., 2012, J Clin Oncol. 30, 3234-41). Для проверки цитотоксичности JY201 с точки зрения тромбоцитопении, исследовали связывание и цитотоксичность JY102 для DAMI (линия клеток мегакариоцитов, то есть исходных клеток для терминальной дифференцировки тромбоцитов: Lev P.R. et al., 2011, Platelets 22, 28-38).

Для эксперимента по связыванию собирали клетки DAMI и ресуспендировали до концентрации примерно 5×10^6 клеток/мл в ледяном PBS, содержащем 2% FBS. Затем клетки инкубировали с JY201 или контролями и подвергали проточной цитометрии тем же методом, что и в примере 17. Для оценки цитотоксичности *in vitro* для клеток DAMI использовали метод, описанный в примере 16.

Из приведенных на фиг.21C результатов видно, что пегилированный BsADC JY201 вне ожидания не вызывал цитотоксичности в отношении клеток DAMI даже при высокой концентрации в 50 мкг/мл, тогда как T-DM1 вызывал значительную специфичную для лекарственного средства цитотоксичность при исследуемых концентрациях. Неожиданный результат согласуется с результатами на фиг. 21A и 21B, на которых FITC-меченый T-DM1 связывается с клетками DAMI, а JY201 нет, вероятно, из-за отсутствия Fc-областей.

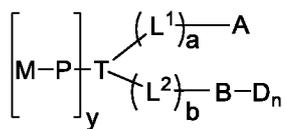
Итак, текущие данные указывают на то, что цитотоксичность JY201 является тканеспецифичной, оказывая цитотоксическое действие только на опухолевые клетки, но не на мегакариоциты. Неожиданные и превосходные свойства JY201 открывают большие возможности для устранения некоторых серьезных побочных эффектов, вызванных ADC-индуцированной тромбоцитопенией, и других клинических проявлений.

Приведенные выше примеры и описание предпочтительных воплощений следует рассматривать как иллюстрирующие, а не ограничивающие настоящее изобретение, которое определено в формуле изобретения. Должно быть понятно, что можно использовать различные варианты и комбинации признаков, изложенных выше, не выходя

из объема настоящего изобретения, которое изложено в формуле изобретения. Такие варианты не рассматриваются как выходящие за рамки изобретения, и предполагается, что все такие варианты входят в объем следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение по формуле (Ib):



формула Ib

где: P означает неиммуногенный полимер;

M означает H или концевую кэппирующую группу типа C₁₋₅₀-алкила или арила, причем один или несколько атомов углерода у данного алкила необязательно заменены гетероатомами;

y – целое число от 1 до 10;

A – антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

T – мультифункциональный низкомолекулярный линкер;

каждый L¹ и L² независимо означает гетеро- или гомобифункциональный линкер;

каждый из a и b – целое число от 0 до 10;

B – разветвленный линкер, причем каждая ветвь содержит аминокислотную последовательность или углеводную группу, соединенную с самоликвидирующимся спейсером, причем расщепление аминокислотной последовательности или углеводной группы ферментом запускает механизм самоликвидации с высвобождением D, либо каждая ветвь содержит дисульфидную связь или расщепляемую связь, причем при расщеплении дисульфидной связи или расщепляемой связи высвобождается D или его производное;

каждый D независимо означает небольшую цитотоксическую молекулу или пептид; и

n – целое число от 1 до 25.

2. Соединение по п. 1, при этом T означает трифункциональный линкер, полученный из молекулы с тремя функциональными группами, выбранными независимо из гидроксила, amino, гидразинила, азида, алкена, алкина, карбоксила (альдегида, кетона, сложного эфира, карбоновой кислоты, ангидрида, галоангидрида), тиола, дисульфида, нитрила, эпоксида, имида, нитро и галогенида, причем связи между T и (L¹)_a и между T и (L²)_b одинаковы или различны.

3. Соединение по п. 2, при этом T означает лизин или происходит из лизина.

4. Соединение по любому из пп. 1-3, при этом функциональная группа на конце линкера L¹ способна к сайт-специфической конъюгации с A и выбрана из группы, состоящей из тиола, малеимида, варианта 2-пиридилдитио, ароматического сульфона или

винилсульфона, акрилата, бром- или йодацетамида, азиды, алкина, дибензоциклооктила (DBCO), карбонила, 2-аминобензальдегида или 2-аминоацетофенона, гидразида, оксима, ацилтрифторбората калия, O-карбамоилгидроксиламина, *транс*-циклооктена, тетразина, триарилфосфина, бороновой кислоты и йода.

5. Соединение по любому из пп. 1-4, при этом антитело представляет собой моноспецифичное или мультиспецифичное полноразмерное антитело, одноцепочечное антитело, нанотело или его антигенсвязывающий домен.

6. Соединение по любому из пп. 1-5, при этом антитело представляет собой моноспецифичное одноцепочечное антитело.

7. Соединение по п. 6, при этом моноспецифичное одноцепочечное антитело связывается с опухолеассоциированным антигеном (ТАА) типа Her2.

8. Соединение по п. 7, при этом моноспецифичное одноцепочечное антитело содержит два связывающих домена, связывающихся с Her2.

9. Соединение по п. 8, при этом моноспецифичное одноцепочечное антитело имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2.

10. Соединение по любому из пп. 1-5, при этом антитело представляет собой биспецифичное антитело, например, биспецифичное одноцепочечное антитело.

11. Соединение по п. 10, при этом два связывающих домена биспецифичного антитела связываются с одним и тем же опухолеассоциированным антигеном (ТАА), с двумя разными ТАА или же с ТАА и антигеном, экспрессирующимся на Т-клетках (например, компонентом Т-клеточного рецептора) или NK-клетках.

12. Соединение по п. 11, при этом антитело представляет собой одноцепочечное биспецифичное антитело против Her2×Her2.

13. Соединение по п. 12, при этом антитело имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1.

14. Соединение по любому из пп. 6-9, при этом два связывающих домена моноспецифичного одноцепочечного антитела соединяются через линкер, причем линкер содержит остаток цистеина или не природной аминокислоты для сайт-специфической конъюгации антитела с L¹.

15. Соединение по любому из пп. 10-13, при этом два связывающих домена биспецифичного одноцепочечного антитела соединяются через линкер, причем линкер содержит остаток цистеина или не природной аминокислоты для сайт-специфической конъюгации антитела с L¹.

16. Соединение по любому из пп. 14-15, при этом неприродная аминокислота выбрана из генетически кодируемых алкен-лизинов (типа N⁶-(гекс-5-еноил)-L-лизина), 2-амино-8-оксононановой кислоты, *m*- или *n*-ацетилфенилаланина, аминокислот с β-дикетонной боковой цепью (типа 2-амино-3-(4-(3-оксобутаноил)фенил)пропановой кислоты), (S)-2-амино-6-(((1R,2R)-2-азидоциклопентилокси)карбониламино)гексановой кислоты, азидогомоаланина, аналога пирролизина N⁶-((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)-L-лизина, (S)-2-амино-6-пент-4-инамидогексановой кислоты, (S)-2-амино-6-((проп-2-инилокси)карбониламино)гексановой кислоты, (S)-2-амино-6-((2-азидоэтокси)карбониламино)гексановой кислоты, *n*-азидофенилаланина, *para*-азидофенилаланина, N-ε-акрилоил-1-лизина, N-ε-5-норборнен-2-илоксикарбонил-1-лизина, N-ε-(циклоокт-2-ин-1-илокси)карбонил)-L-лизина, N-ε-(2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)этил)карбонил-L-лизина, генетически кодируемой тетразиновой аминокислоты (типа 4-(6-метил-*s*-тетразин-3-ил)аминофенилаланина).

17. Соединение по любому из пп. 1-16, при этом D выбран из ДНК-сшивающих реагентов, ингибиторов микротрубочек, алкиляторов ДНК, ингибиторов топоизомеразы либо их комбинаций.

18. Соединение по п. 17, при этом D выбран из MMAE, MMAF, SN38, DM1, DM4, калихеамицинов, пирролобензодиазепинов, дуокармицинов или их производных либо их комбинаций.

19. Соединение по п. 17, при этом D выбран из алкалоидов барвинка, лаулималида, таксана, колхицина, тубулизинов, криптофицинов, гемиастерлина, цемадотина, ризоксина, дискодермолида, таккалонолидов А, В, AF или AJ, эпоксида таккалонолида AI, CA-4, эпотилона А и В, лаулималида, паклитакселя, доцетакселя, доксорубицина, камптотецина, iSGD-1882, центанамицина, PNU-159682, унциаламицина, димеров индолинобензодиазепина, β-аманитина, аматоксинов, тайланстатинов либо их производных или аналогов либо их комбинаций.

20. Соединение по любому из пп. 1-19, при этом неиммуногенным полимером является полиэтиленгликоль (ПЭГ).

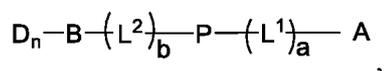
21. Соединение по п. 20, при этом ПЭГ представляет собой линейный ПЭГ или разветвленный ПЭГ.

22. Соединение по п. 20 или 21, при этом по меньшей мере один конец полиэтиленгликоля кэпирован метилом или низкомолекулярным алкилом.

23. Соединение по любому из пп. 20-22, при этом общая молекулярная масса ПЭГ составляет от 100 до 80 000.

24. Соединение по любому из пп. 20-23, при этом ПЭГ соединяется с трифункциональной или тетрафункциональной или какой-либо другой циклической или нециклической мультифункциональной группой Т (например, лизином) через постоянную связь или расщепляемую связь.

25. Соединение по формуле (Ic):



где: P означает линейный PEG;

A – антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

каждый L^1 и L^2 независимо означает бифункциональный линкер;

каждый из a и b означает целое число от 0 до 10;

B – разветвленный линкер, причем каждая ветвь содержит аминокислотную последовательность или углеводную группу, соединенную с самоликвидирующимся спейсером, причем расщепление аминокислотной последовательности или углеводной группы ферментом запускает механизм самоликвидации с высвобождением D, или же каждая ветвь содержит дисульфидную связь или расщепляемую связь, причем при расщеплении дисульфидной связи или расщепляемой связи высвобождается D или его производное;

каждый D независимо означает небольшую цитотоксическую молекулу или пептид;

n – целое число от 1 до 25.

26. Соединение по п. 25, при этом функциональная группа на конце линкера L^1 способна к сайт-специфической конъюгации с A и выбрана из группы, состоящей из тиола, малеимида, варианта 2-пиридилдитио, ароматического сульфона или винилсульфона, акрилата, бром- или йодацетамида, азида, алкина, дибензоциклооктила (DBCO), карбонила, 2-аминобензальдегида или 2-аминоацетофенона, гидразида, оксима, ацилтрифторбората калия, O-карбамоилгидроксиламина, *транс*-циклооктена, тетразина, триарилфосфина, бороновой кислоты и йода.

27. Соединение по п. 25 или 26, при этом антитело представляет собой моноспецифичное или мультиспецифичное полноразмерное антитело, одноцепочечное антитело, нанотело или его антигенсвязывающий домен.

28. Соединение по п. 27, при этом антитело представляет собой моноспецифичное одноцепочечное антитело, причем необязательно это моноспецифичное одноцепочечное антитело связывается с опухолевым антигеном (ТАА) типа Her2.

29. Соединение по п. 28, при этом моноспецифичное одноцепочечное антитело содержит два связывающих домена, связывающихся с Her2.

30. Соединение по п. 29, при этом моноспецифичное одноцепочечное антитело имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2.

31. Соединение по п. 27, при этом антитело представляет собой биспецифичное антитело, например, биспецифичное одноцепочечное антитело.

32. Соединение по п. 31, при этом два связывающих домена биспецифичного антитела связываются с одним и тем же опухолеассоциированным антигеном (ТАА), с двумя разными ТАА или же с ТАА и антигеном, экспрессирующимся на Т-клетках (например, компонентом Т-клеточного рецептора) или НК-клетках.

33. Соединение по п. 32, при этом антитело представляет собой одноцепочечное биспецифичное антитело против Her2×Her2.

34. Соединение по п. 33, при этом антитело имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1.

35. Соединение по любому из пп. 28-30, при этом два связывающих домена моноспецифичного одноцепочечного антитела соединяются через линкер, причем линкер содержит остаток цистеина или не природной аминокислоты для сайт-специфической конъюгации антитела с L¹.

36. Соединение по любому из пп. 31-34, при этом два связывающих домена биспецифичного одноцепочечного антитела соединяются через линкер, причем линкер содержит остаток цистеина или не природной аминокислоты для сайт-специфической конъюгации антитела с L¹.

37. Соединение по п. 35 или 36, при этом не природная аминокислота для сайт-специфической конъюгации антитела с L¹ выбрана из генетически кодируемых алкенилизинов (типа N⁶-(гекс-5-еноил)-L-лизина), 2-амино-8-оксононановой кислоты, *m*- или *n*-ацетилфенилаланина, аминокислот с β-дикетонной боковой цепью (типа 2-амино-3-(4-(3-оксобутаноил)фенил)пропановой кислоты), (S)-2-амино-6-(((1R,2R)-2-азидоциклопентилокси)карбониламино)гексановой кислоты, азидогомоаланина, аналога пирролизина N⁶-((проп-2-ин-1-илокси)карбонил)-L-лизина, (S)-2-амино-6-пент-4-инамидогексановой кислоты, (S)-2-амино-6-((проп-2-инилокси)карбониламино)гексановой кислоты, (S)-2-амино-6-((2-азидоэтокси)карбониламино)гексановой кислоты, *n*-азидофенилаланина, *para*-азидофенилаланина, N-ε-акрилоил-1-лизина, N-ε-5-норборнен-2-илоксикарбонил-1-лизина, N-ε-(циклоокт-2-ин-1-илокси)карбонил)-L-лизина, N-ε-(2-(циклоокт-2-ин-1-

илокси)этил)карбонил-L-лизина, генетически кодируемой тетразиновой аминокислоты (типа 4-(6-метил-s-тетразин-3-ил)аминофенилаланина).

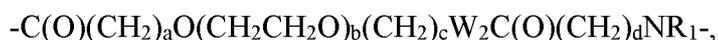
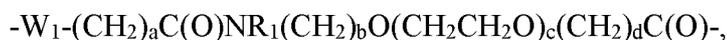
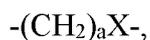
38. Соединение по любому из пп. 25-37, при этом D выбран из ДНК-сшивающих реагентов, ингибиторов микротрубочек, алкиляторов ДНК, ингибиторов топоизомеразы либо их комбинаций.

39. Соединение по п. 38, при этом D выбран из ММАЕ, ММАF, SN38, DM1, DM4, калихеамицинов, пирролобензодиазепинов, дуокармицинов или их производных либо их комбинаций.

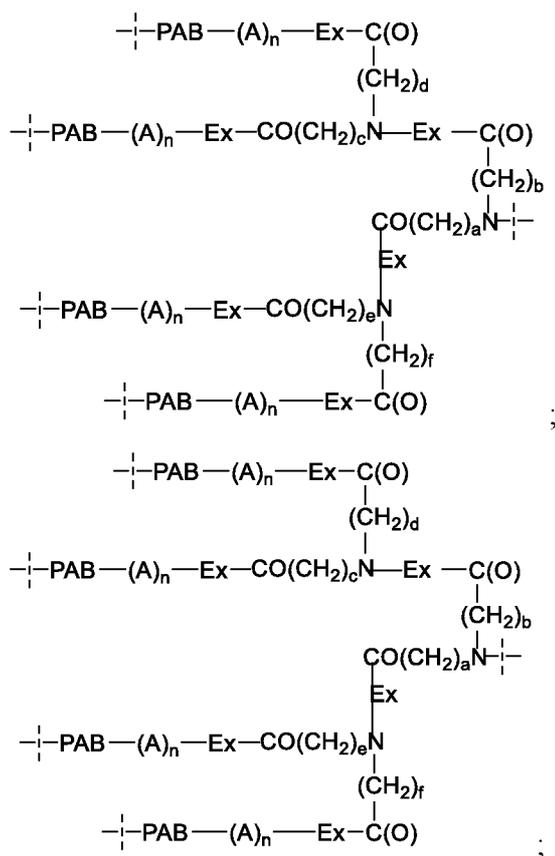
40. Соединение по п. 38, при этом D выбран из алкалоидов барвинка, лаулималида, таксана, колхицина, тубулизинов, криптофицинов, гемиастерлина, цемадотина, ризоксина, дискодермолида, таккалонолидов А, В, AF или AJ, эпоксида таккалонолида AI, СА-4, эпотилона А и В, лаулималида, паклитакселя, доцетакселя, доксорубицина, камптотецина, iSGD-1882, центанамицина, PNU-159682, унциаламицина, димеров индолинобензодиазепина, β-аманитина, аматоксинов, тайланстатинов либо их производных или аналогов либо их комбинаций.

41. Соединение по любому из пп. 25-40, при этом общая молекулярная масса ПЭГ составляет от 100 до 80 000.

42. Соединение по любому из пп. 1-41, при этом каждый из L¹ и L² выбран независимо из:



где каждый a, b, c, d и e независимо означает целое число от 0 до 25; каждый X и Y независимо означает C(=O), NR₁, S, O, CR₂R₃ или ничего; R₁ и R₂ независимо означают водород, C₁₋₁₀-алкил или (CH₂)₁₋₁₀C(=O); W₁ и/или W₃ происходят из основанной на малеимиде группы, а W₂ – группа, содержащая триазолил или тетразолил; гетероцикл выбран из группы на основе малеимида либо группы на основе тетразолила или триазолила.

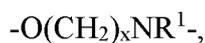


где: каждый из a, b, c, d, e и f независимо означает целое число от 1 до 25;

(A)_n – триггерное звено с аминокислотной последовательностью типа Val-Cit, Val-Ala, Val-Lys, Phe-Lys, Phe-Cit, Phe-Arg, Phe-Ala, Ala-Lys, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, D-Phe-L-Phe-Lys, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Gly-Phe-Leu-Gly или Ala-Leu-Ala-Leu;

PAB – *para*-аминобензиловый спирт;

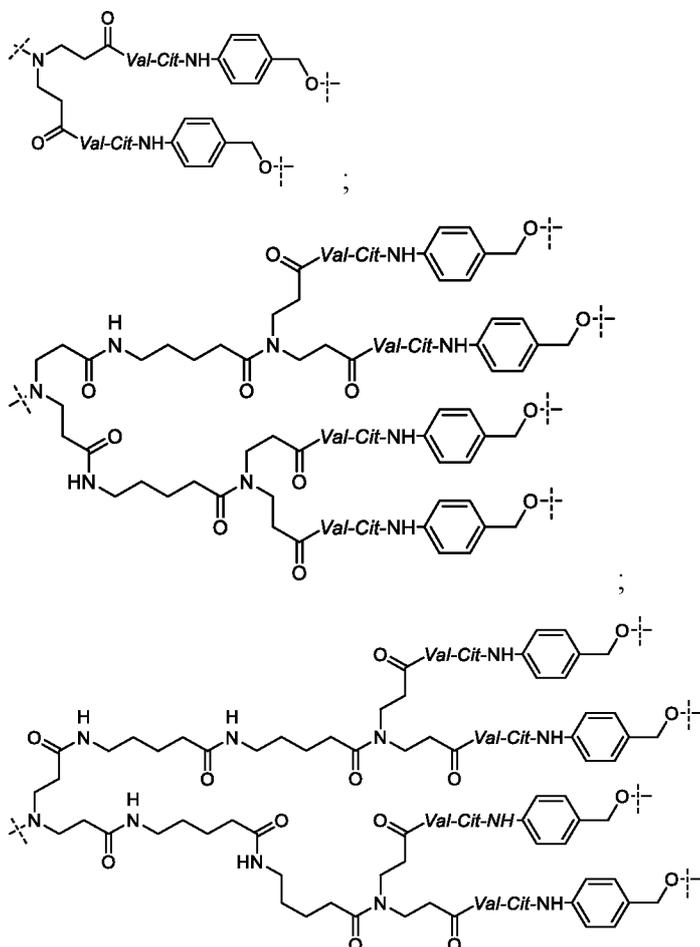
каждый Ex – удлинительный спейсер, содержащий линкерную цепь, выбранную независимо из:



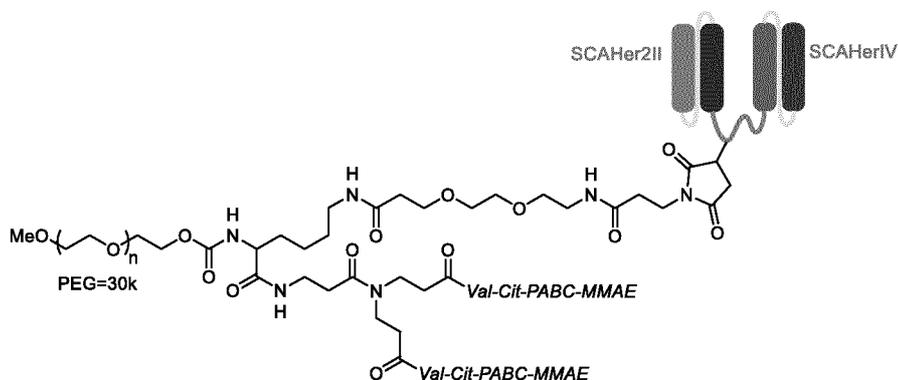
или ничего,

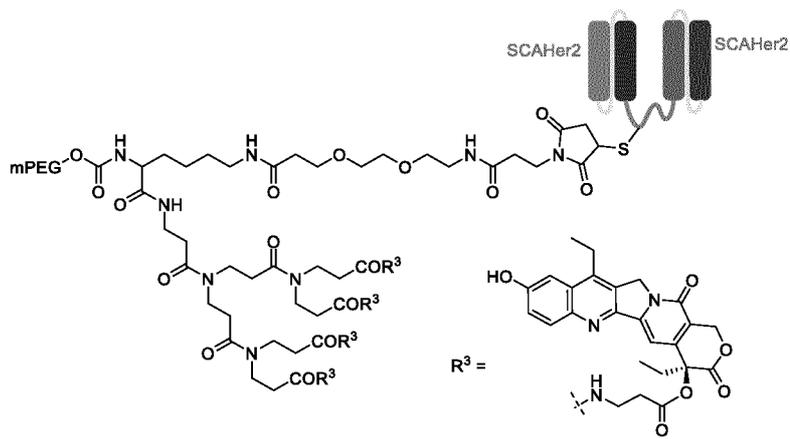
где каждый x , y и z независимо означает целое число от 0 до 25; а R^1 и R^2 независимо означают водород или C_{1-10} -алкил.

46. Соединение по любому из пп. 1-43, при этом разветвленный линкер В выбран из:



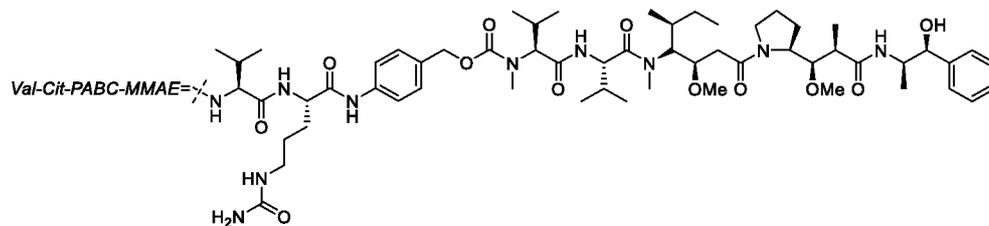
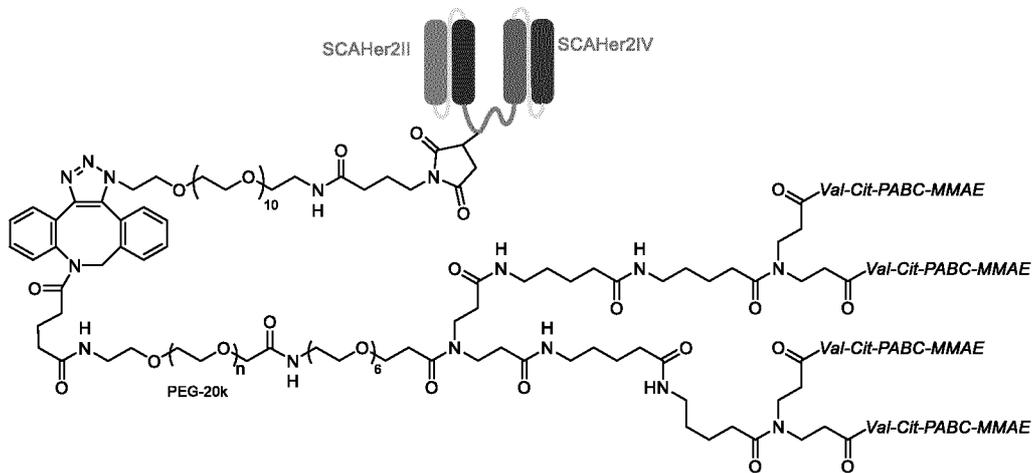
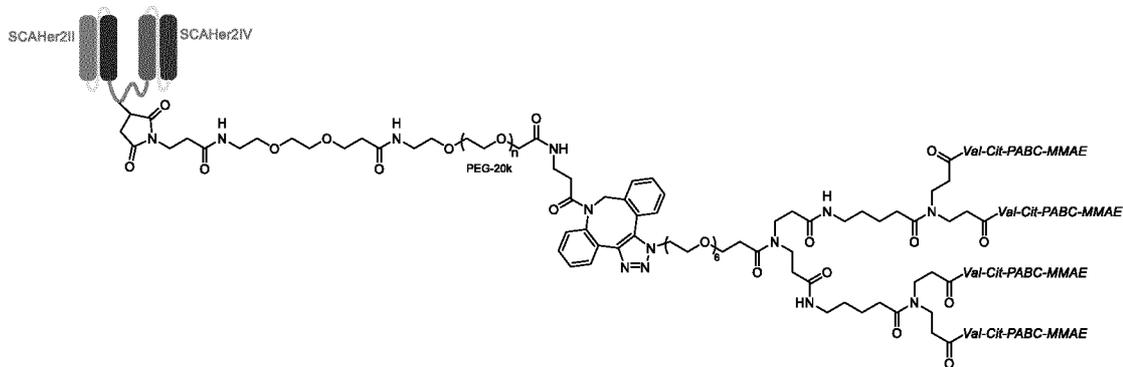
47. Соединение по п. 1, выбранное из формул:





или его фармацевтически приемлемая соль.

48. Соединение по п. 25, выбранное из формул:



49. Способ получения соединения по любому из пп. 1-48, включающий:

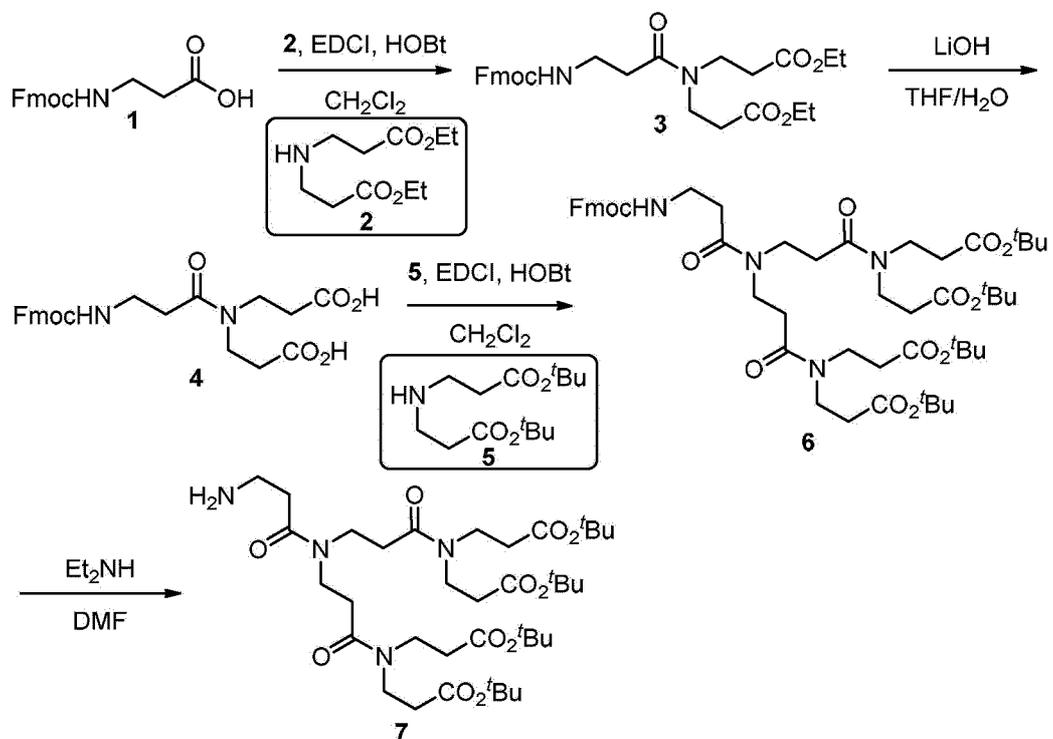
а) стадию получения неиммуногенного модифицированного (например, пегилированного) конъюгата лекарственного средства со свободной функциональной группой для сайт-специфической конъюгации;

б) стадию сайт-специфического конъюгирования неиммуногенного модифицированного (например, пегилированного) конъюгата лекарственного средства с антителом, получая соединение по формуле (Ib) или (Ic).

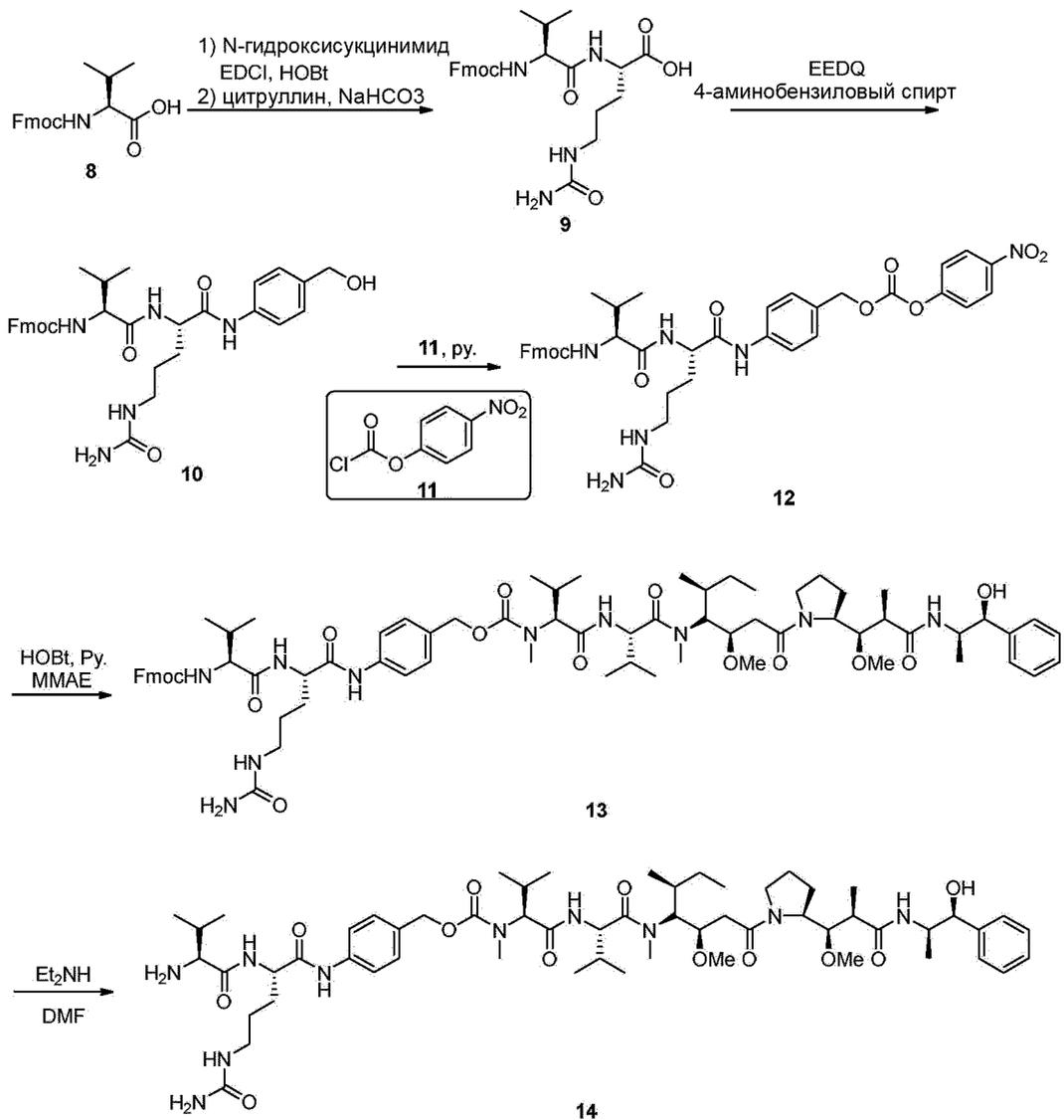
50. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество соединения по любому из пп. 1-48 и фармацевтически приемлемую соль, носитель или эксципиент.

51. Соединение по любому из пп. 1-48 для применения при лечении рака, выбранного из группы, состоящей из рака молочной железы, рака яичников, рака предстательной железы, рака легких, рака поджелудочной железы, рака почек, рака мочевого пузыря, рака желудка, рака толстой кишки, колоректального рака, рака слюнных желез, рака щитовидной железы и рака эндометрия.

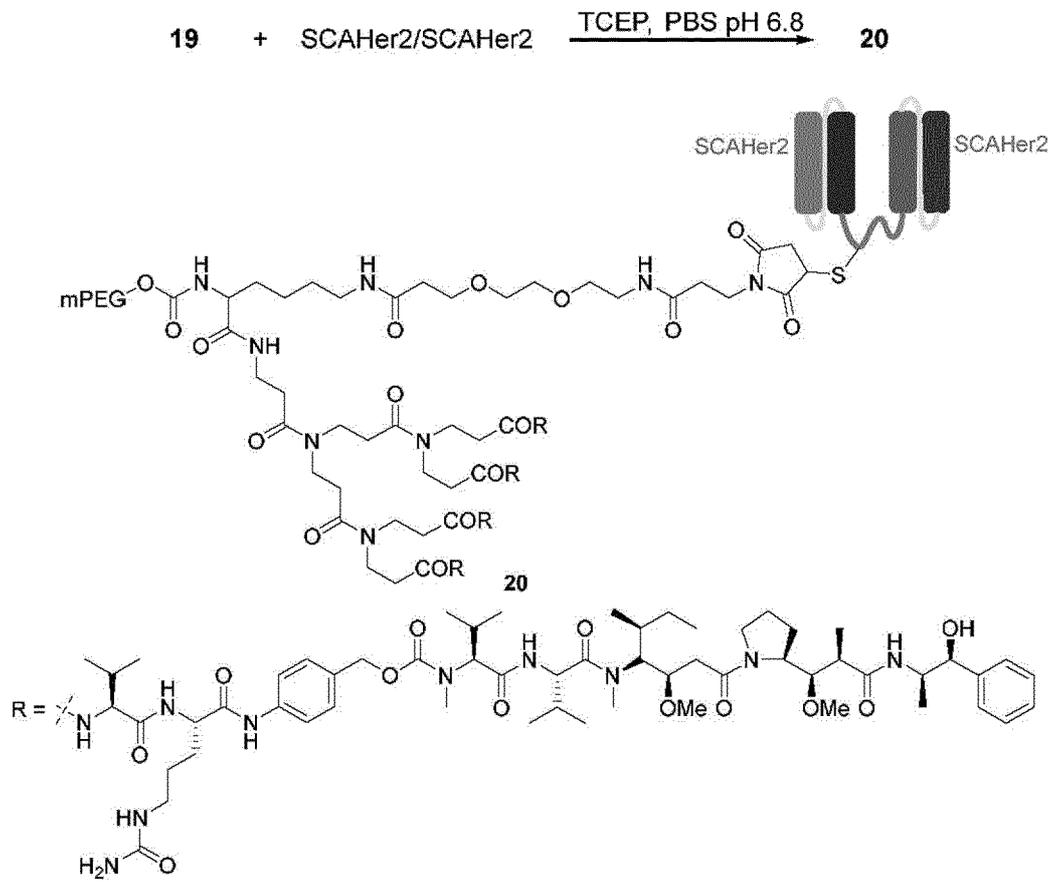
52. Соединение по любому из пп. 1-48 для применения в комбинации с эффективным количеством другого противоракового средства или иммуносупрессанта при лечении рака, выбранного из группы, состоящей из рака молочной железы, рака яичников, рака предстательной железы, рака легких, рака поджелудочной железы, рака почек, рака мочевого пузыря, рака желудка, рака толстой кишки, колоректального рака, рака слюнных желез, рака щитовидной железы и рака эндометрия.



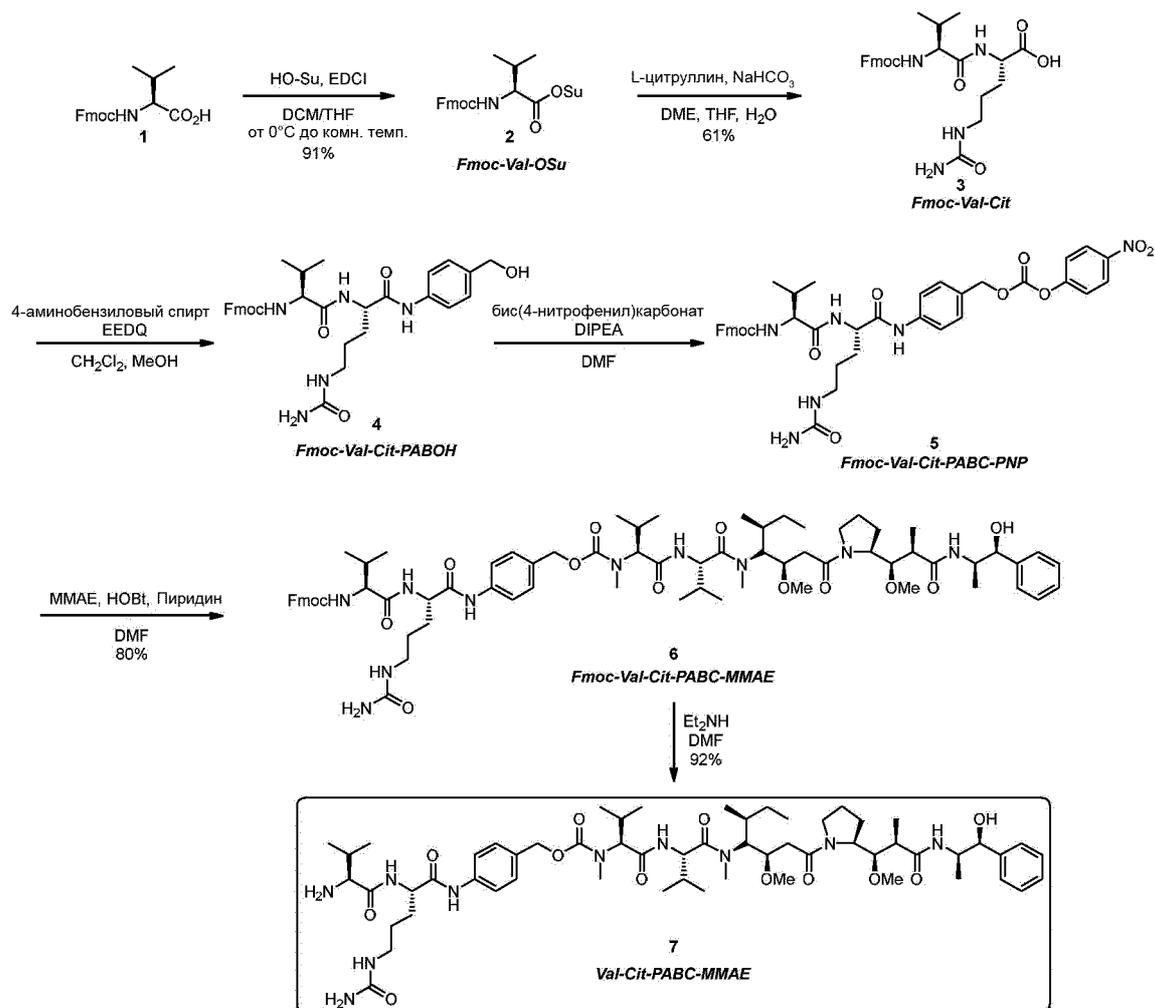
Фиг. 1



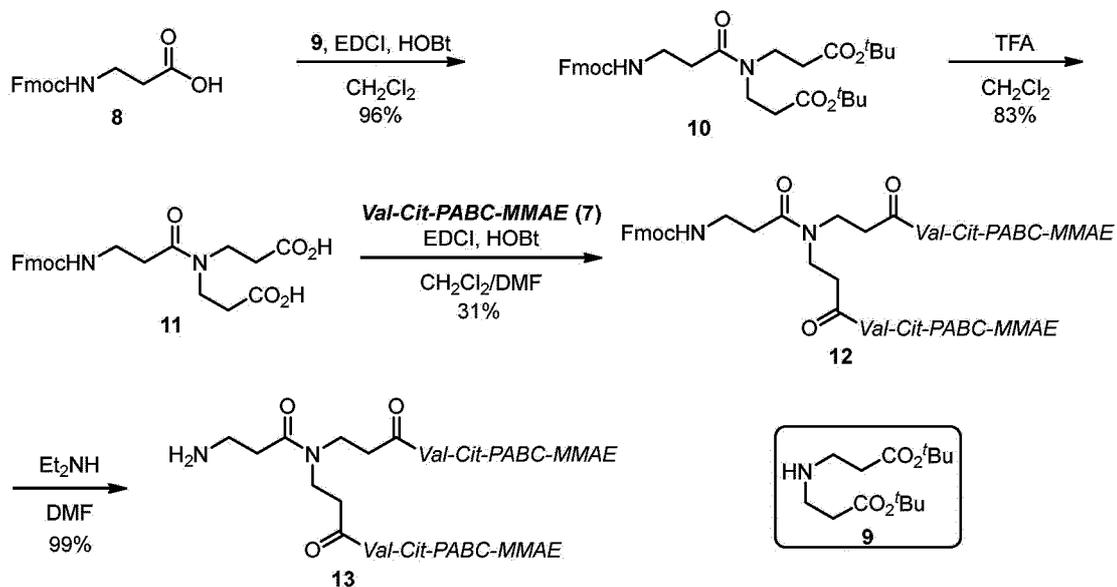
Фиг. 2



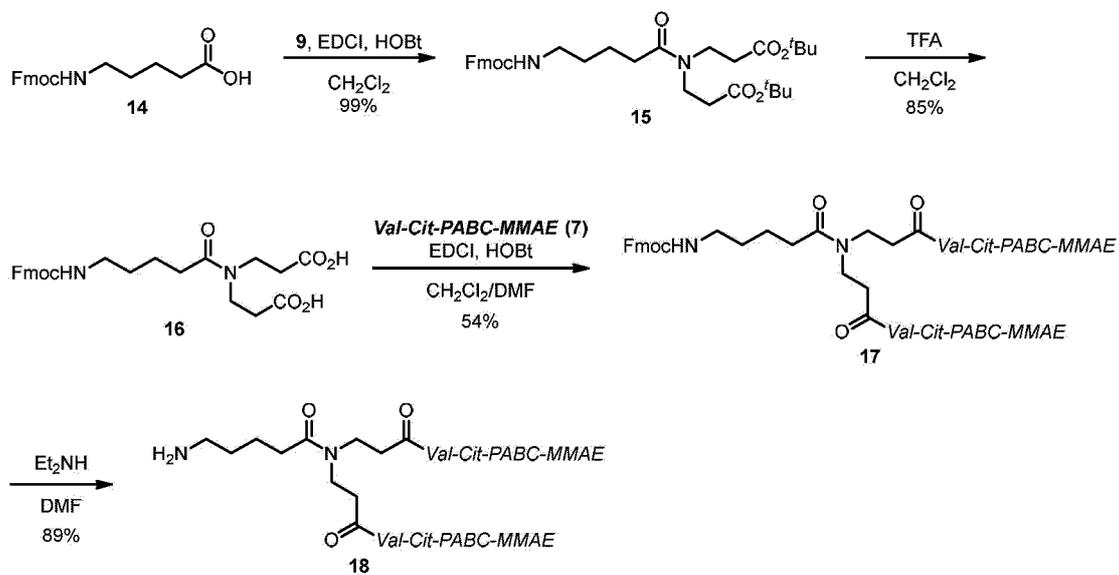
Фиг. 4



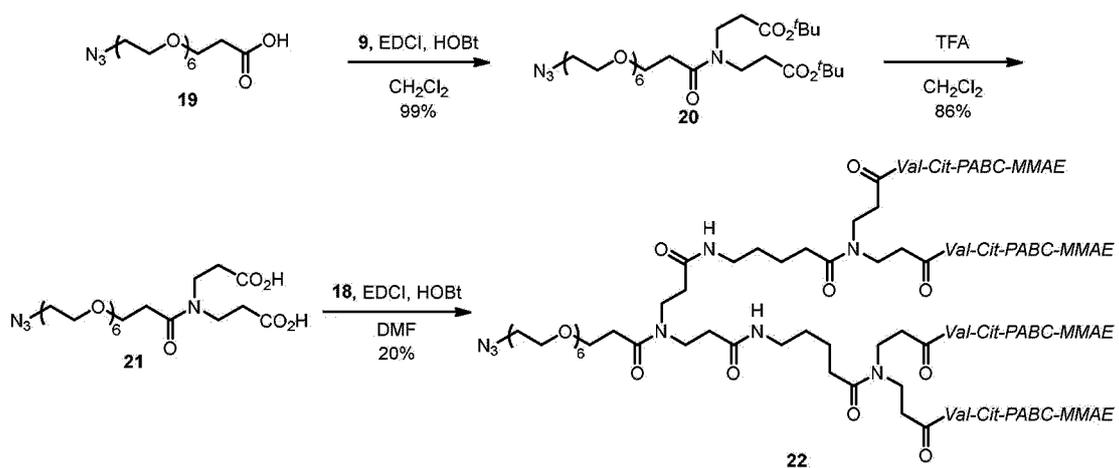
Фиг. 5



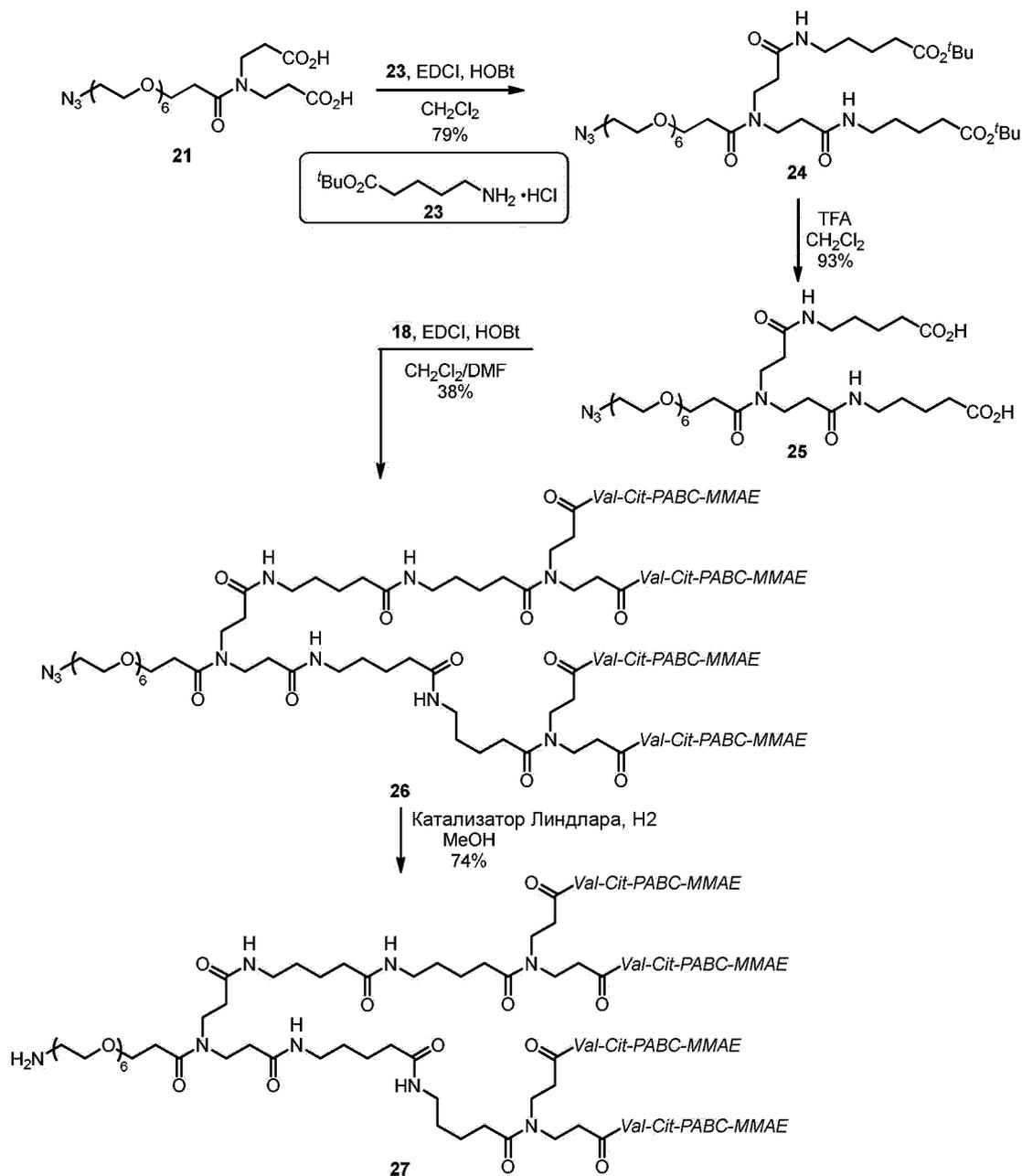
Фиг. 6



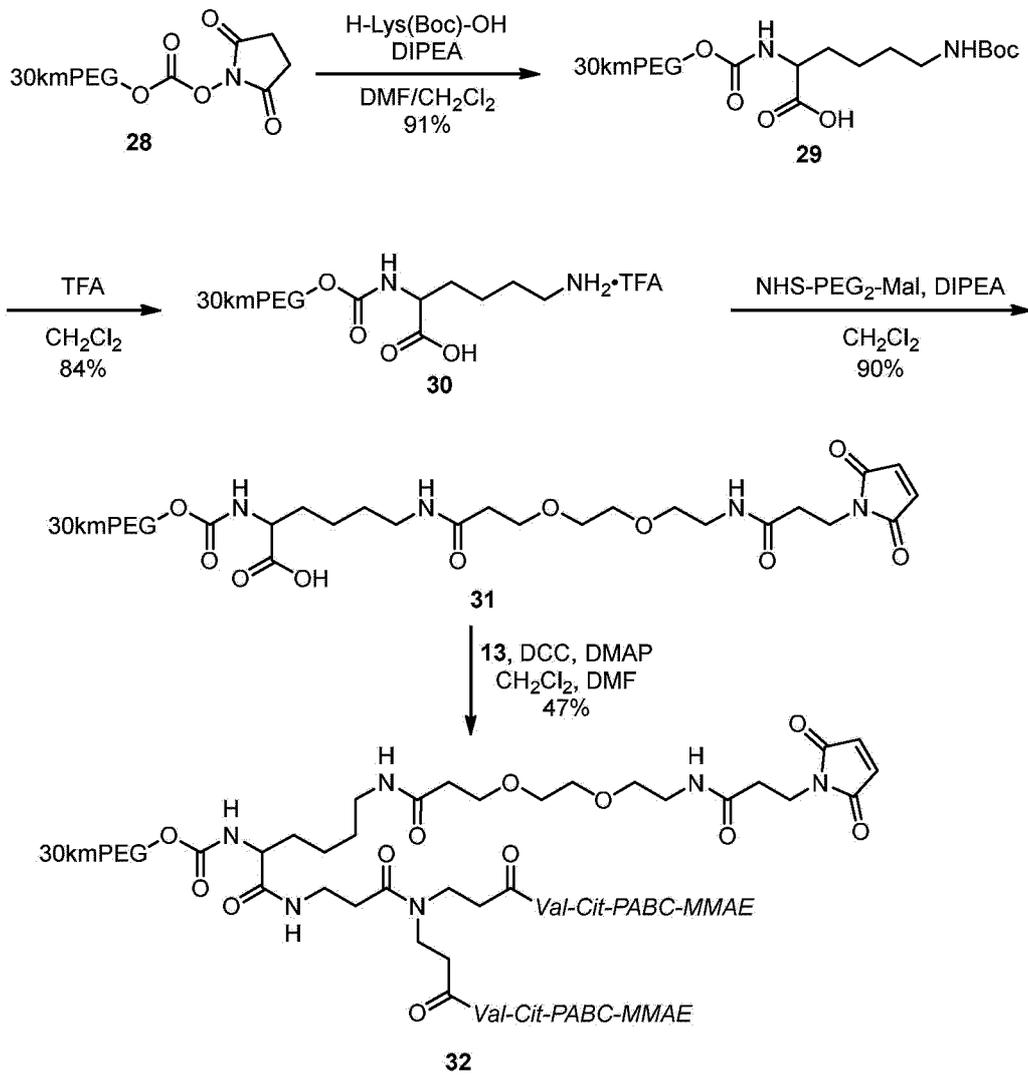
Фиг. 7



Фиг. 8

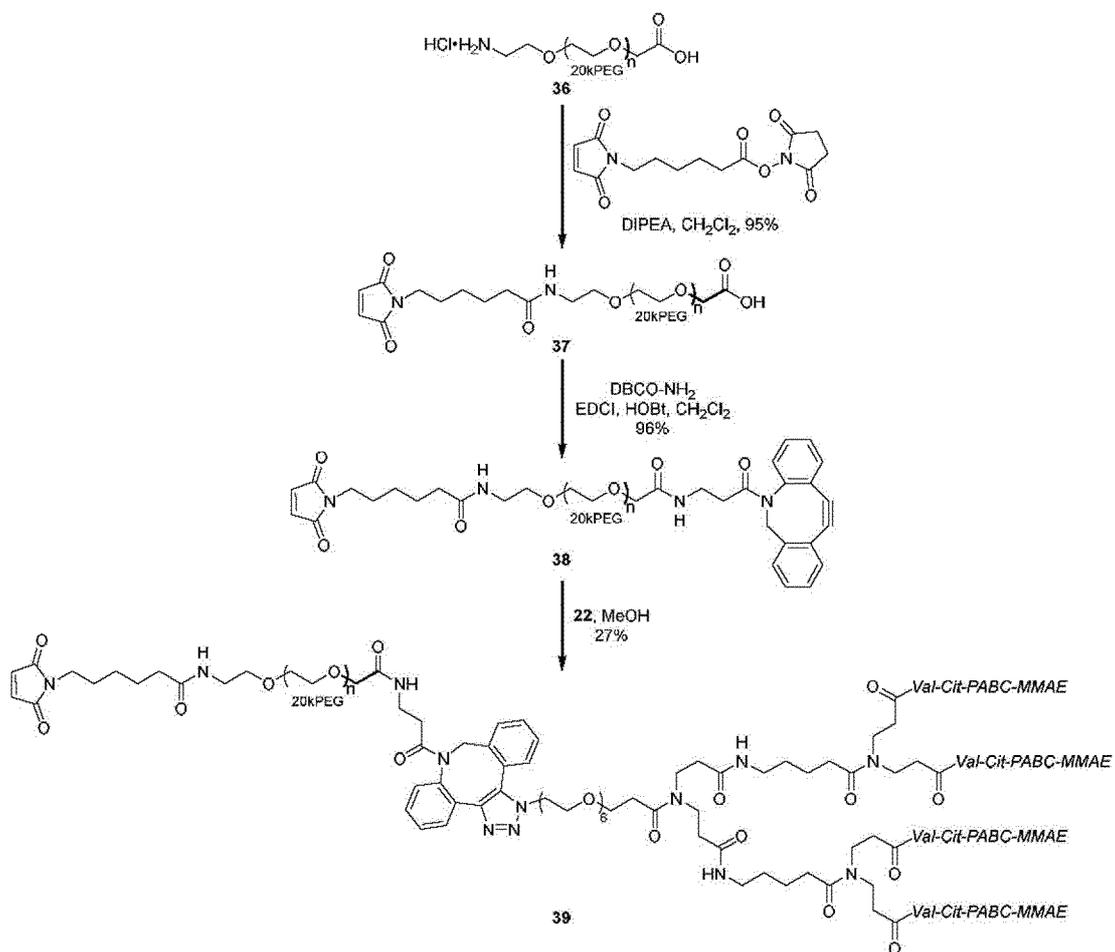


ФИГ. 9



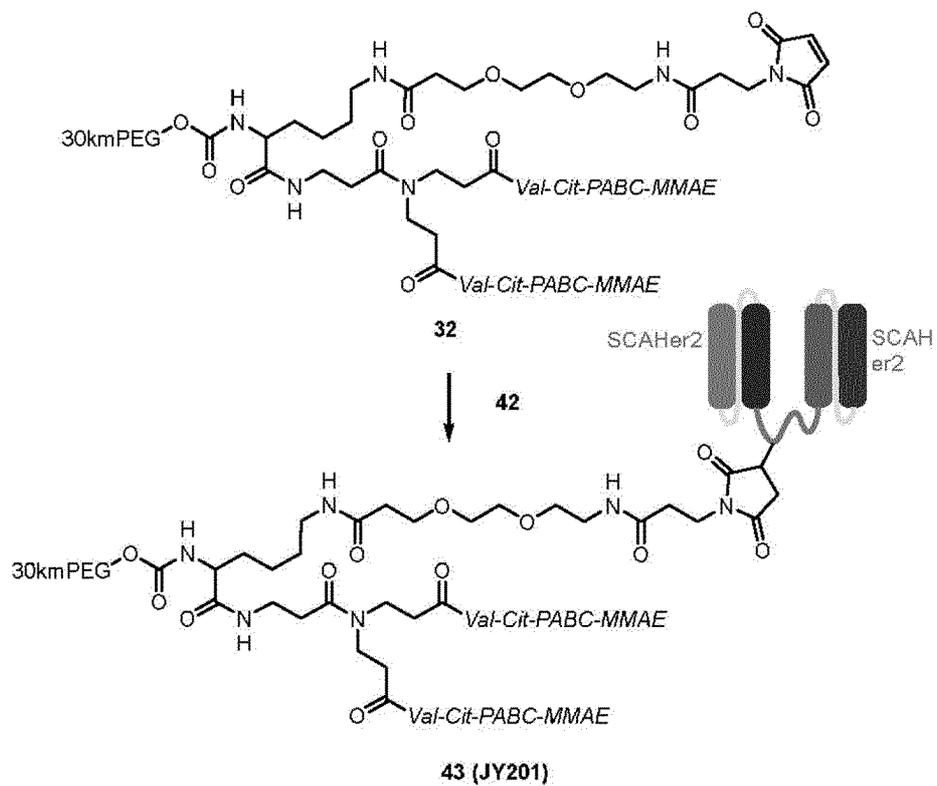
Фиг. 10

10/18

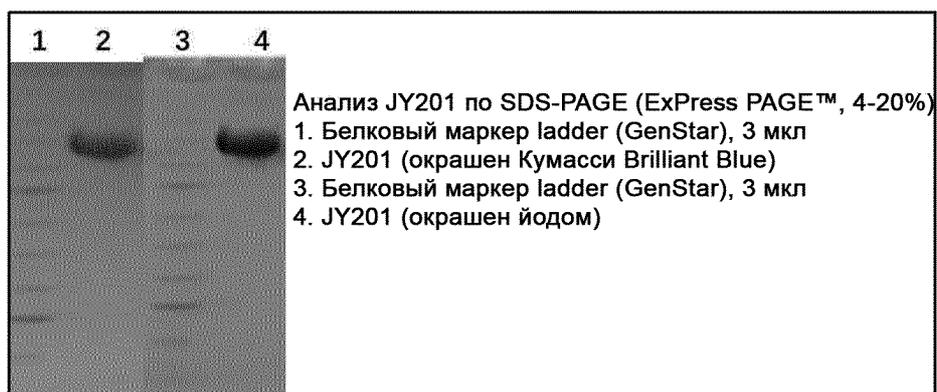


Фиг. 12

A

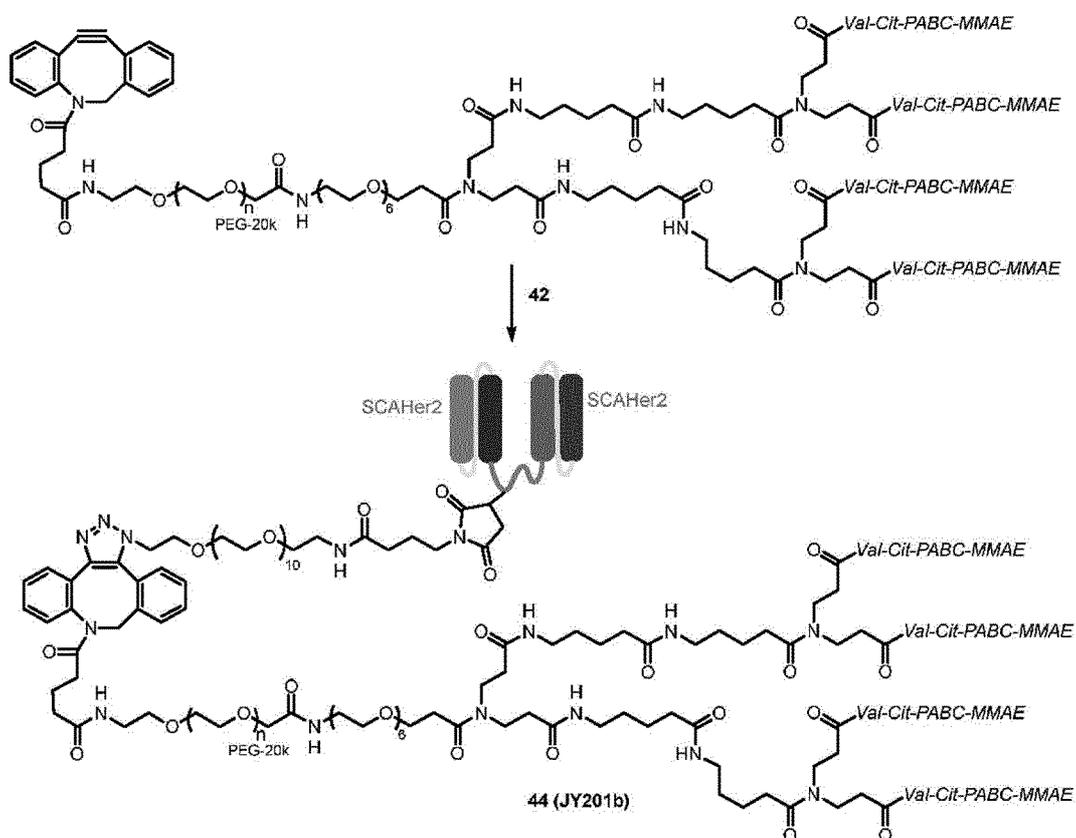


B

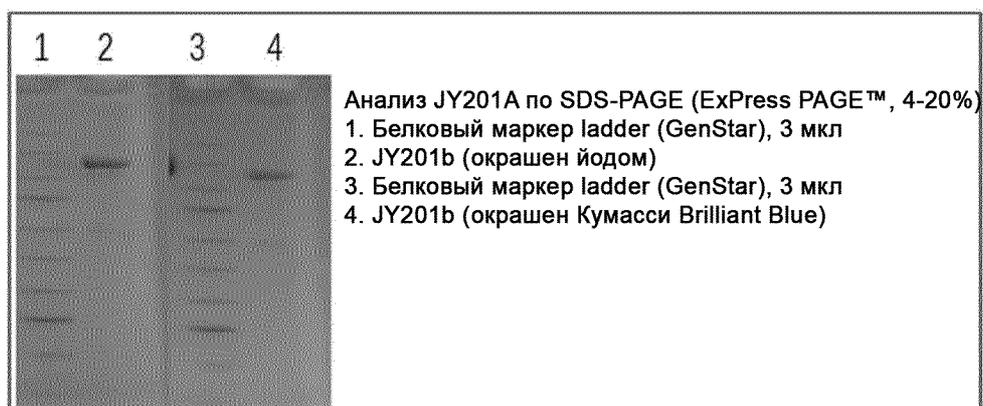


Фиг. 15

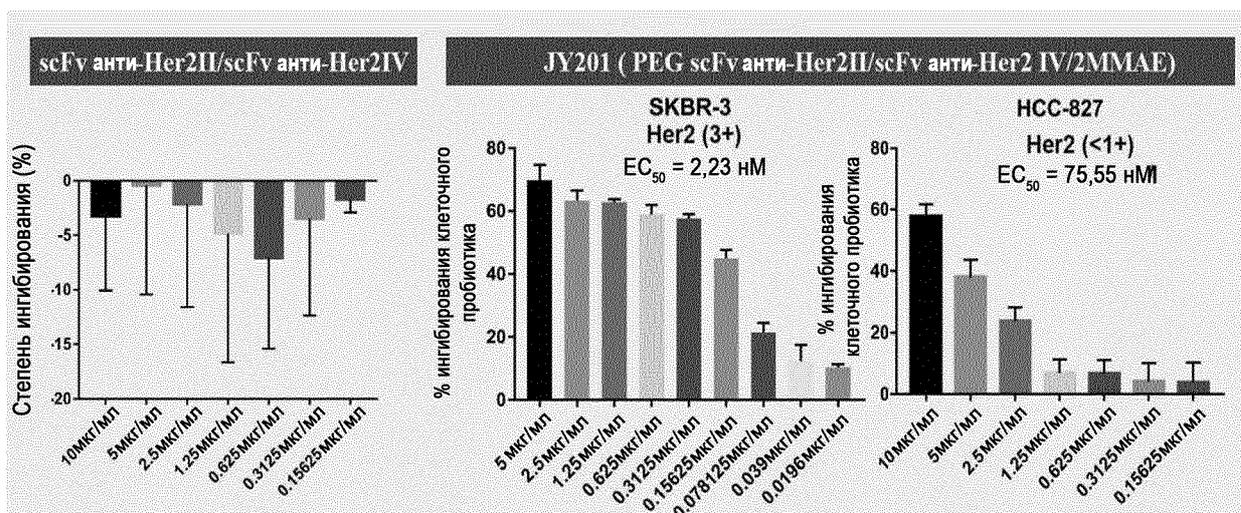
A



B

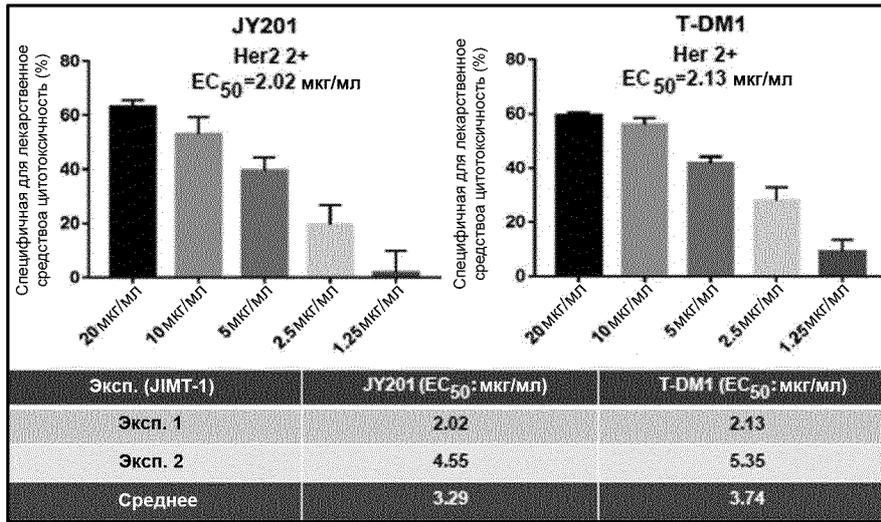


Фиг. 16



Фиг. 17

A

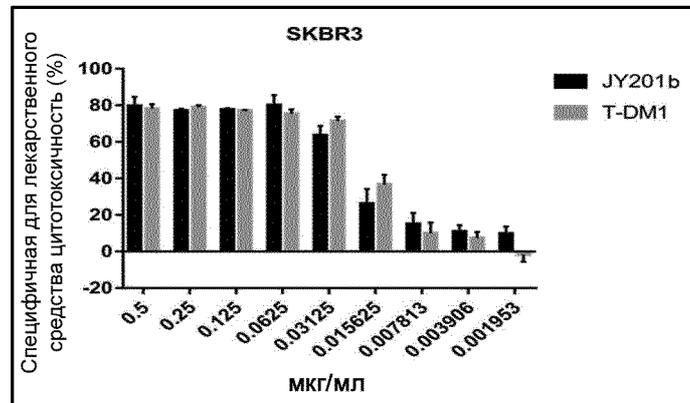


B



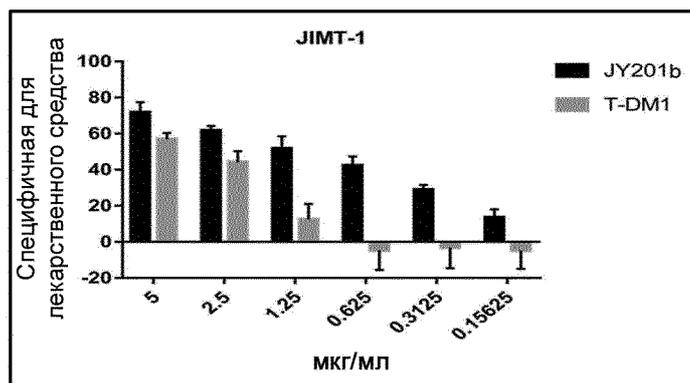
Фиг. 18

C



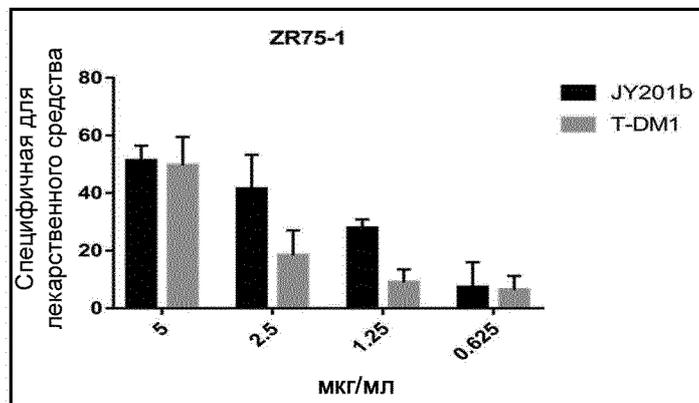
JY201b $EC_{50}=0.02$ мкг/мл; T-DM1 $EC_{50}=0.02$ мкг/мл

D

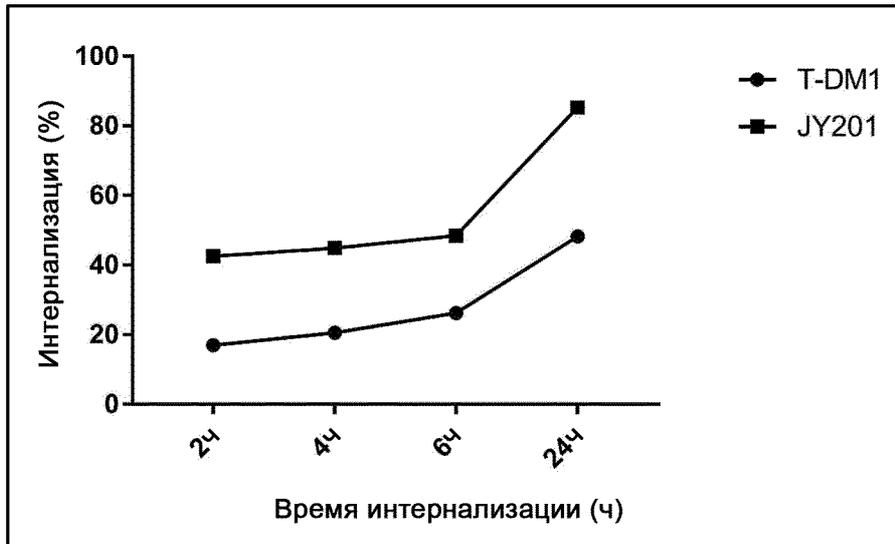


JY201b $EC_{50}=0.60$ мкг/мл; T-DM1 $EC_{50}=1.67$ мкг/мл

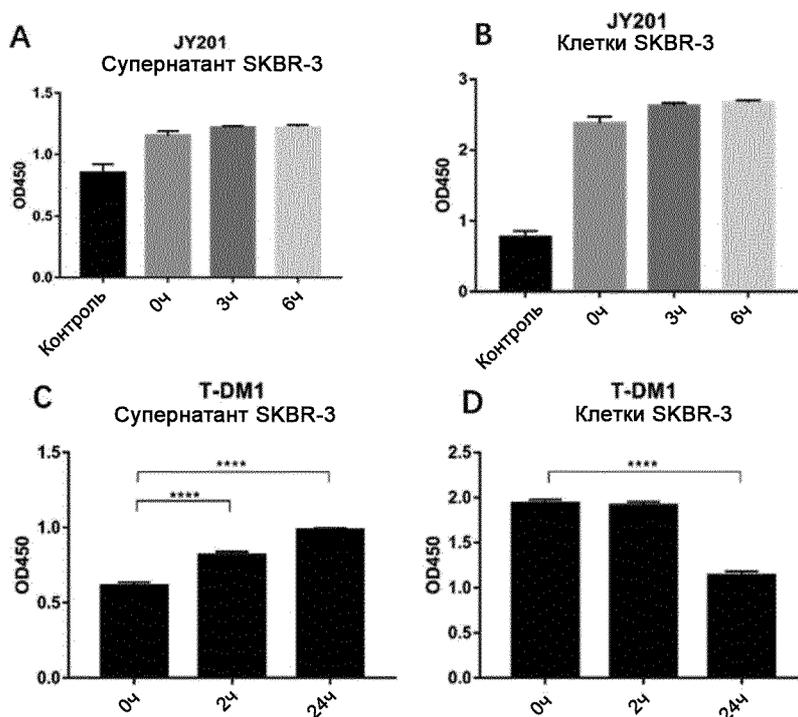
E



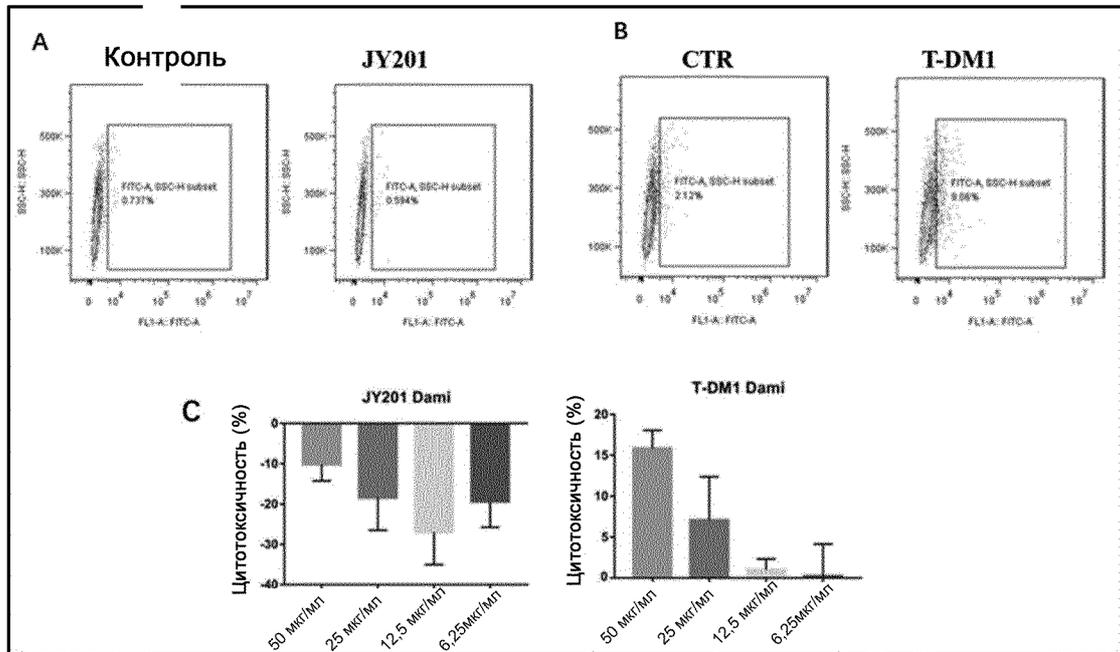
ФИГ. 18 (ПРОДОЛЖЕНИЕ)



Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21