

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202390553 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2023.07.26

(22) Дата подачи заявки  
2021.10.14

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)  
A61K 47/65 (2017.01)  
A61K 47/68 (2017.01)  
A61K 39/395 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛО К HER3, КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛА К HER3 И ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА И ИХ МЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 202011097383.0; 202111171200.X

(32) 2020.10.14; 2021.10.08

(33) CN

(86) PCT/CN2021/123733

(87) WO 2022/078425 2022.04.21

(71) Заявитель:

ЦЗЯНСУ ХЭНЖУЙ  
ФАРМАСЬЮТИКАЛС КО.,  
ЛТД.; ШАНХАЙ ХЭНЖУЙ  
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД. (CN)

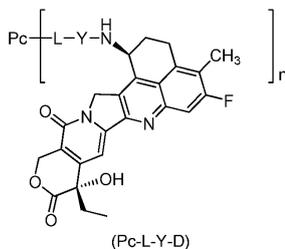
(72) Изобретатель:

Ян Ян, Юй Цзя, Тао Вэйкан (CN)

(74) Представитель:

Харин А.В., Стойко Г.В., Галухина  
Д.В., Буре Н.Н., Алексеев В.В. (RU)

(57) Предложены антитело к HER3 (рецептор эпидермального фактора роста 3), конъюгат антитела к HER3 и лекарственного средства и их медицинское применение, в частности антитело к HER3 и конъюгат антитела к HER3 и лекарственного средства, представленный общей формулой (Pc-L-Y-D), где Pc представляет собой антитело к HER3, и L, Y и n являются такими, как определено в описании.



202390553

A1

A1

202390553

## АНТИТЕЛО К HER3, И КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛА К HER3 И ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА, И ИХ МЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к антителу к HER3 и конъюгату антитела к HER3 и аналога экзатекана, способу их получения, фармацевтической композиции, содержащей их, и применению их в получении лекарственного препарата для лечения HER3-опосредованного заболевания или расстройства, в частности в получении противоракового лекарственного препарата.

### Уровень техники

Изложенное в данном документе представляет собой лишь общую информацию, относящуюся к настоящему изобретению, и необязательно может представлять собой известный уровень техники.

HER3 (рецептор эпидермального фактора роста 3, ErbB-3 или HER3) является членом семейства рецепторов эпидермального фактора роста (EGFR). Это семейство включает HER1 (erbB1, EGFR), HER2 (erbB2, NEU), HER3 (erbB3) и HER4 (erbB4). Каждый из этих рецепторов состоит из 3 частей: внеклеточной области, трансмембранной области и внутриклеточной области. Внеклеточная область содержит 4 домена. Внутриклеточная область содержит один внутриклеточный домен тирозинкиназы для передачи сигналов и один хвост в цитоплазме, содержащий остатки фосфорилирования тирозина. Когда лиганд связывается с внеклеточными доменами I и III, инициируется сигнальная система клетки. Как правило, эти рецепторы опосредуют деление клеток, миграцию, выживание и развитие органов. Когда члены семейства EGFR мутируют, аберрантная сигнальная система, вызванная ими, стимулирует выживание клеток, связанное с прогрессированием рака. Основной принцип активации и физиологического действия рецептора HER3 аналогичен таковому у других членов семьи, за исключением того, что его лиганды включают нейрегулин 1 (NRG-1) и нейрегулин 2 (NRG-2) и что активированный HER3 не может образовывать гомомер, а только гетеродимер с EGFR или HER2. В процессе образования HER3 гетеродимера его внутриклеточный домен проявляет более высокую активность тирозинфосфорилазы. Структурный анализ показывает, что внутриклеточный домен HER3 имеет шесть сайтов связывания P85 (субъединица PI-3K). Эта конкретная структура определяет, что HER3 при взаимодействии с регуляторными субъединицами P85 может набирать до шести PI-3K в сайты регуляторных субъединиц, тем самым сильно активируя сигнальный путь PI-3K. Фактически, димер HER3/HER2

является самым активным из димеров HER. EGFR широко распространены на поверхности клеток, таких как эпителиальные клетки млекопитающих, фибробласты, глиальные клетки и кератиноциты. Сигнальный путь EGFR играет важную роль в физиологических процессах, таких как рост, пролиферация и дифференцировка клеток.

HER3 высоко экспрессируется при различных распространенных злокачественных новообразованиях, таких как рак молочной железы, рак желудка, рак яичников, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, колоректальный рак, плоскоклеточный рак головы и шеи и меланома. Ген HER3 редко мутирует. В отличие от экспрессии высокого уровня или сверхактивации, вызванной мутациями в гене EGFR, экспрессия высокого уровня HER3 в основном вызвана увеличением транскрипции мРНК (матричная РНК), что приводит к увеличению трансляции белка, и обычно сопровождается экспрессией высокого уровня HER2. Высокоуровневая экспрессия HER3 тесно связана с развитием и прогрессированием многих опухолей, а также выживаемостью субъектов. Поэтому исследования противоопухолевых препаратов, нацеленных на HER3, имеют большое значение.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к антителу к HER3, конъюгату антитела к HER3 и аналога экзатекана и его применению.

Настоящее изобретение предлагает выделенное антитело к HER3, где антитело к HER3 имеет одну или более из следующих характеристик:

- a. антитело к HER3 связывается с белком HER3 с кажущейся аффинностью  $EC_{50}$  менее 0,5 нМ, как определено с помощью ELISA (иммуноферментный анализ);
- b. антитело к HER3 связывается с белком HER3, экспрессируемым клетками MCF7, с кажущейся аффинностью  $EC_{50}$  менее 0,2 нМ, как определено с помощью FACS (Сортировка клеток с активированной флуоресценцией);
- c. антитело к HER3 может подвергаться эндоцитозу клетками, экспрессирующими человеческий HER3.

Настоящее изобретение предлагает выделенное антитело к HER3, где антитело к HER3 имеет одну или более из следующих характеристик:

- a. антитело к HER3 связывается с белком HER3 с кажущейся аффинностью  $EC_{50}$  менее 0,5 нМ, как определено с помощью ELISA;
- b. антитело к HER3 связывается с белком HER3, экспрессируемым клетками MCF7, с кажущейся аффинностью  $EC_{50}$  менее 0,2 нМ, как определено с помощью FACS;
- c. антитело к HER3 может подвергаться эндоцитозу клетками, экспрессирующими

человеческий HER3; антитело к HER3 имеет  $IC_{50}$  менее 2 нМ, как определено с использованием метода Тестового примера 3;

d. антитело к HER3 может подвергаться эндоцитозу клетками, экспрессирующими человеческий HER3; предпочтительно, антитело к HER3 имеет сигнал FITC (изотиоцианат флуоресцеина) более 300, как определено с использованием метода Тестового примера 4.

В некоторых вариантах осуществления антитело к HER3 в соответствии с любым из вышеуказанного, содержит: (1) HCDR1 (определяющая комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи), HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в вариательной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 7; и (2) LCDR1 (CDR1 легкой цепи), LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в вариательной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления, антитело к HER3 в соответствии с любым из вышеуказанного, содержит вариательную область тяжелой цепи и вариательную область легкой цепи, где:

a. вариательная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, соответственно, и вариательная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14, соответственно;

причем области CDR определены в соответствии со схемой нумерации Чотиа.

В некоторых вариантах осуществления, антитело к HER3 в соответствии с любым из вышеуказанного, содержит вариательную область тяжелой цепи и вариательную область легкой цепи, где:

b. вариательная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17, соответственно, и вариательная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, соответственно;

причем области CDR определены в соответствии со схемой нумерации IMGT.

В некоторых вариантах осуществления, антитело к HER3 в соответствии с любым из вышеуказанного, содержит вариательную область тяжелой цепи и вариательную область легкой цепи, где:

c. вариательная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23, соответственно, и вариательная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно;

причем области CDR определены в соответствии со схемой нумерации Кабата.

Настоящее изобретение предлагает выделенное антитело к HER3, где антитело к HER3 содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

а. переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, соответственно, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14, соответственно;

причем области CDR определены в соответствии со схемой нумерации Чотиа.

Настоящее изобретение предлагает выделенное антитело к HER3, где антитело к HER3 содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

б. переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17, соответственно, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, соответственно;

причем области CDR определены в соответствии со схемой нумерации IMGT.

Настоящее изобретение предлагает выделенное антитело к HER3, где антитело к HER3 содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

с. переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23, соответственно, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно;

причем области CDR определены в соответствии со схемой нумерации Кабата.

В некоторых вариантах осуществления антитело к HER3 в соответствии с любым из вышеуказанного, представляет собой человеческое антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления, антитело к HER3 в соответствии с любым из вышеуказанного, содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 7, и/или переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления, антитело к HER3 в соответствии с любым из вышеуказанного, содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, и переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8; или

в некоторых вариантах осуществления антитело к HER3 в соответствии с любым из вышеуказанного, содержит константную область тяжелой цепи антитела и константную область легкой цепи антитела; где предпочтительно константную область тяжелой цепи выбирали из группы, состоящей из константных областей человеческих IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 и их обычных вариантов, а константную область легкой цепи выбирали из группы, состоящей из константных областей  $\kappa$ - и  $\lambda$ -цепей человеческого антитела и их обычных вариантов; более предпочтительно антитело содержит константную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 5, и константную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 6.

В некоторых вариантах осуществления антитело к HER3 в соответствии с любым из вышеуказанного, содержит:

тяжелую цепь, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 27, и/или легкую цепь, по меньшей мере на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 28.

В некоторых вариантах осуществления антитело к HER3 в соответствии с любым из вышеуказанного, содержит:

тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 27, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 28.

В некоторых вариантах осуществления антитело к HER3 в соответствии с любым из вышеуказанного, имеет одну или более из следующих характеристик:

a. антитело к HER3 связывается с белком HER3 с кажущейся аффинностью  $EC_{50}$  менее 0,5 нМ, как определено с помощью ELISA;

b. антитело к HER3 связывается с белком HER3, экспрессируемым клетками MCF7, с кажущейся аффинностью  $EC_{50}$  менее 0,2 нМ, как определено с помощью FACS;

c. антитело к HER3 может подвергаться эндоцитозу клетками, экспрессирующими человеческий HER3.

В некоторых вариантах осуществления антитело к HER3 в соответствии с любым из вышеуказанного, имеет одну или более из следующих характеристик:

a. антитело к HER3 связывается с белком HER3 с кажущейся аффинностью  $EC_{50}$  менее 0,5 нМ, как определено с помощью ELISA;

b. антитело к HER3 связывается с белком HER3, экспрессируемым клетками MCF7, с кажущейся аффинностью  $EC_{50}$  менее 0,2 нМ, как определено с помощью FACS;

c. антитело к HER3 может подвергаться эндоцитозу клетками, экспрессирующими человеческий HER3; антитело к HER3 имеет  $IC_{50}$  менее 2 нМ, как определено с использованием метода Тестового примера 3;

d. антитело к HER3 может подвергаться эндоцитозу клетками, экспрессирующими человеческий HER3; предпочтительно, антитело к HER3 имеет сигнал FITC более 300, как определено с использованием метода Тестового примера 4.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также предлагает выделенное антитело к HER3, где антитело конкурирует за связывание с человеческим HER3 с антителом к HER3 в соответствии с любым из вышеуказанного.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также предлагает молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую антитело к HER3 в соответствии с любым из вышеуказанного.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также предлагает клетку-хозяина, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из вышеуказанного.

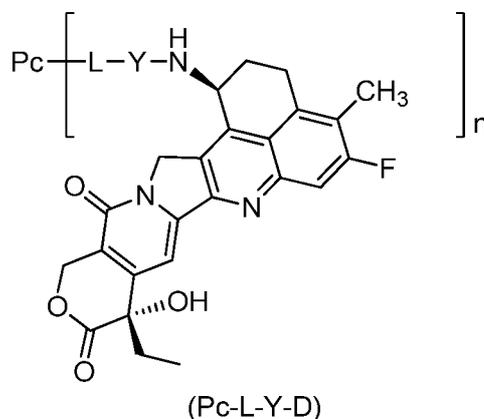
В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также предлагает фармацевтическую композицию, содержащую терапевтически эффективное количество антитела к HER3 в соответствии с любым из вышеуказанного, или молекулы нуклеиновой кислоты, описанной выше, и один или более фармацевтически приемлемых носителей, разбавителей или эксципиентов.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также предлагает иммуноконъюгат, содержащий антитело к HER3 в соответствии с любым из вышеуказанного, и эффекторную молекулу, где эффекторная молекула спарена с антителом к HER3; предпочтительно, эффекторная молекула выбрана из группы, состоящей из радиоизотопа, противоопухолевого агента, иммуномодулятора, модификатора биологического ответа, лектина, цитотоксического лекарственного средства, хромофора, флуорофора, хемилюминесцентного соединения, фермента, иона металла и любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также предлагает способ иммунодетекции или определения HER3, включающий стадию приведения антитела к HER3 в соответствии с любым из вышеуказанного, в контакт с субъектом или

образцом, полученным от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также предлагает конъюгат антитела и лекарственного средства общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемой соли:



где:

Y выбран из группы, состоящей из  $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ ,  $-O-CR^1R^2-(CR^aR^b)_m-$ ,  $-O-CR^1R^2-$ ,  $-NH-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$  и  $-S-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ ;

$R^a$  и  $R^b$  являются идентичными или разными и каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, дейтерия, галогена, алкила, галогеналкила, дейтерированного алкила, алкокси, гидрокси, amino, циано, нитро, гидроксиалкила, циклоалкила и гетероциклила; или  $R^a$  и  $R^b$ , вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклоалкил или гетероциклил;

$R^1$  выбран из группы, состоящей из галогена, галогеналкила, дейтерированного алкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксиалкила, гетероциклила, арила и гетероарила;  $R^2$  выбран из группы, состоящей из водорода, галогена, галогеналкила, дейтерированного алкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксиалкила, гетероциклила, арила и гетероарила; или  $R^1$  и  $R^2$  вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклоалкил или гетероциклил;

или  $R^a$  и  $R^2$  вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклоалкил или гетероциклил;

m представляет собой целое число от 0 до 4;

n представляет собой десятичное или целое число от 1 до 10;

L представляет собой линкерное звено;

Pc представляет собой антитело к HER3 в соответствии с любым из вышеуказанного.

В некоторых вариантах осуществления в конъюгате антитела и лекарственного средства общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемой соли в

соответствии с любым из вышеуказанного,  $n$  представляет собой десятичное или целое число от 1 до 8. В некоторых вариантах осуществления изобретения  $n$  представляет собой десятичное или целое число от 3 до 8.

В некоторых вариантах осуществления в конъюгате антитела и лекарственного средства общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с любым из вышеуказанного,

Y представляет собой  $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ ;

$R^a$  и  $R^b$  являются одинаковыми или различными, и каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, дейтерия, галогена и  $C_{1-6}$  алкила;

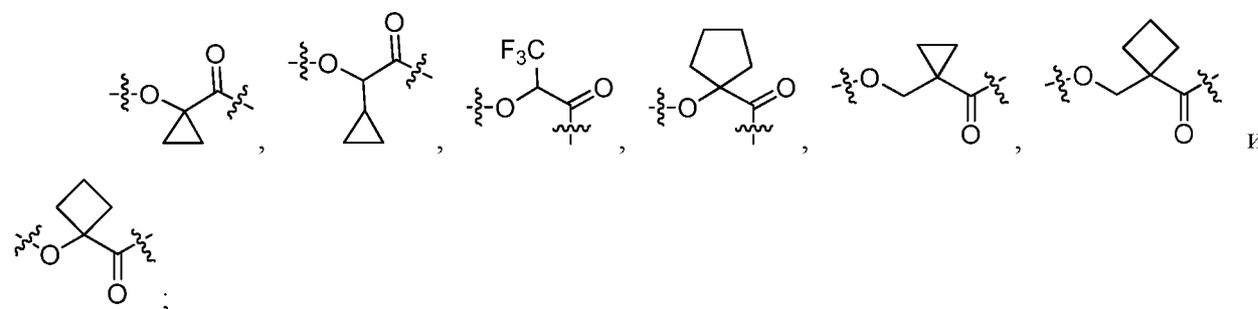
$R^1$  представляет собой  $C_{1-6}$  галогеналкил или  $C_{3-6}$  циклоалкил;

$R^2$  выбран из группы, состоящей из водорода,  $C_{1-6}$  галогеналкила и  $C_{3-6}$  циклоалкила;

или  $R^1$  и  $R^2$  вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют  $C_{3-6}$  циклоалкил;

$m$  представляет собой 0 или 1.

В некоторых вариантах осуществления в конъюгате антитела и лекарственного средства общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с любым из вышеуказанного, Y выбран из группы, состоящей из:



где O-конец Y присоединен к линкерному звену L.

В некоторых вариантах осуществления в конъюгате антитела и лекарственного средства общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с любым из вышеуказанного, линкерное звено -L- представляет собой  $-L^1-L^2-L^3-L^4-$ , где

$L^1$  выбран из группы, состоящей из  $-(\text{сукцинимидил-3-ил-N})-W-C(O)-$ ,  $-\text{CH}_2-C(O)-NR^3-W-C(O)-$  и  $-C(O)-W-C(O)-$ , где W выбран из группы, состоящей из  $C_{1-8}$  алкила,  $C_{1-8}$  алкил- $C_{3-6}$  циклоалкила и линейного гетероалкила, содержащего от 1 до 8 атомов цепи, и указанный линейный гетероалкил имеет от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из N, O и S, где каждый из указанных  $C_{1-8}$  алкила,  $C_{1-8}$  алкил- $C_{3-6}$  циклоалкила или линейного гетероалкила, содержащего от 1 до 8 атомов цепи, независимо

необязательно дополнительно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксид, циано, амина, C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> галогеналкила, дейтерированного C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> алкокси и C<sub>3-6</sub> циклоалкила;

L<sup>2</sup> выбран из группы, состоящей из -NR<sup>4</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sup>p</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -NR<sup>4</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sup>p</sup>CH<sub>2</sub>C(O)-, -S(CH<sub>2</sub>)<sup>p</sup>C(O)- и химической связи, где p<sup>1</sup> представляет собой целое число от 1 до 20;

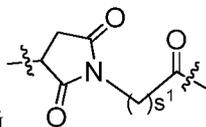
L<sup>3</sup> представляет собой пептидный остаток, состоящий из 2-7 аминокислотных остатков, где аминокислотные остатки выбраны из группы, состоящей из аминокислотных остатков, образованных из аминокислот фенилаланина (F), глицина (G), валина (V), лизина (K), цитруллин, серина (S), глутаминовой кислоты (Q) и аспарагиновой кислоты (D), и необязательно дополнительно замещены одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксид, циано, амина, алкила, хлоралкила, дейтерированного алкила, алкокси и циклоалкила;

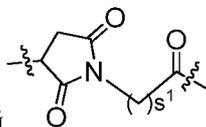
L<sup>4</sup> выбран из группы, состоящей из -NR<sup>5</sup>(CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>)<sub>t</sub>-, -C(O)NR<sup>5</sup>-, -C(O)NR<sup>5</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>- и химической связи, где t представляет собой целое число от 1 до 6;

R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> и R<sup>5</sup> являются одинаковыми или различными, и каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> галогеналкила, дейтерированного C<sub>1-6</sub> алкила и C<sub>1-6</sub> гидроксиалкила;

R<sup>6</sup> и R<sup>7</sup> являются одинаковыми или различными, и каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, галогена, C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> галогеналкила, дейтерированного C<sub>1-6</sub> алкила и C<sub>1-6</sub> гидроксиалкила.

В некоторых вариантах осуществления в конъюгате антитела и лекарственного средства общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с любым из вышеуказанного, линкерное звено -L- представляет собой -L<sup>1</sup>-L<sup>2</sup>-L<sup>3</sup>-L<sup>4</sup>-, где



L<sup>1</sup> представляет собой , и s<sup>1</sup> представляет собой целое число от 2 до 8;

L<sup>2</sup> представляет собой химическую связь;

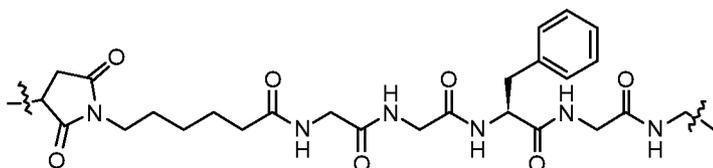
L<sup>3</sup> представляет собой тетрапептидный остаток;

L<sup>4</sup> представляет собой -NR<sup>5</sup>(CR<sup>6</sup>R<sup>7</sup>)<sub>t</sub>-, где R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> и R<sup>7</sup> являются одинаковыми или различными, и каждый независимо представляет собой водород или C<sub>1-6</sub> алкил, и t представляет собой 1 или 2;

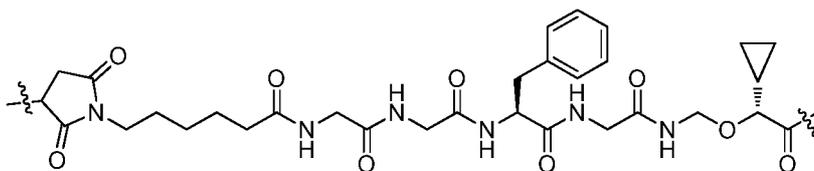
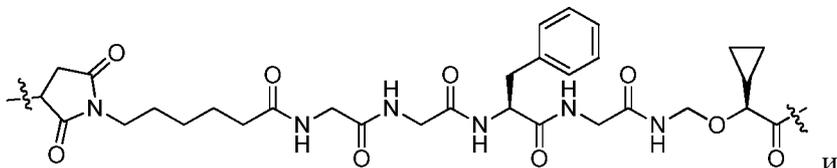
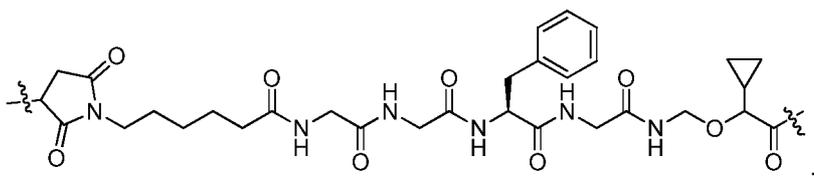
где L<sup>1</sup>-конец присоединен к Pc, и L<sup>4</sup>-конец присоединен к Y.

В некоторых вариантах осуществления в конъюгате антитела и лекарственного средства общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с любым из вышеуказанного, L<sup>3</sup> представляет собой тетрапептидный остаток GGFG.

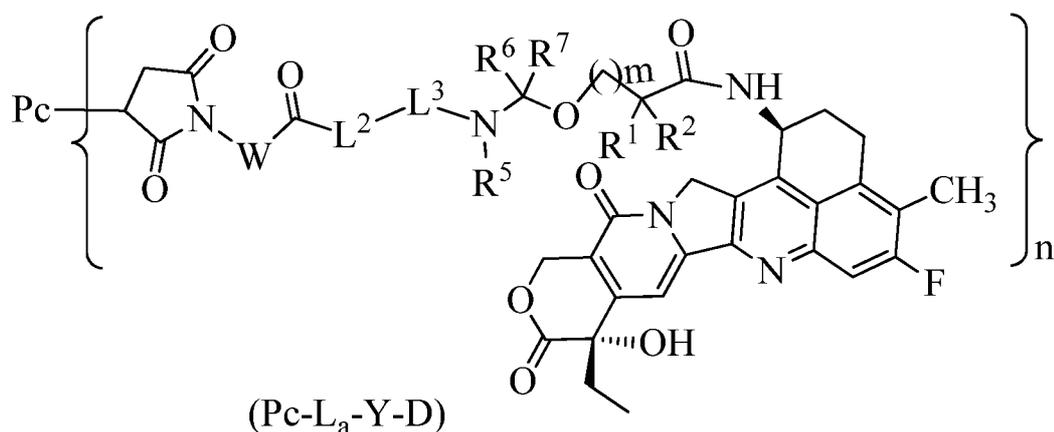
В некоторых вариантах осуществления в конъюгате антитела и лекарственного средства общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с любым из вышеуказанного, -L- представляет собой:



В некоторых вариантах осуществления в конъюгате антитела и лекарственного средства общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с любым из вышеуказанного, -L-Y- обязательно выбран из группы, состоящей из:



В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитела и лекарственного средства общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемая соль в соответствии с любым из вышеуказанного, представляет собой конъюгат антитела и лекарственного средства общей формулы (Pc-L<sub>a</sub>-Y-D) или его фармацевтически приемлемую соль:



где

Pc представляет собой антитело к HER3, описанное выше;

m представляет собой целое число от 0 до 4; например, m выбран из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3 и 4;

n представляет собой десятичное или целое число от 1 до 10; в частности, n представляет собой десятичное или целое число от 2 до 8 включительно; более конкретно, n представляет собой десятичное или целое число от 2 до 7 включительно; альтернативно, n представляет собой десятичное или целое число между 2 и 3, 3 и 4, 4 и 5, 5 и 6, 6 и 7 или 7 и 8 включительно;

R<sup>1</sup> выбран из группы, состоящей из галогена, галогеналкила, дейтерированного алкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксиалкила, гетероциклила, арила и гетероарила; R<sup>2</sup> выбран из группы, состоящей из водорода, галогена, галогеналкила, дейтерированного алкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксиалкила, гетероциклила, арила и гетероарила; или R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклоалкил или гетероциклил;

W выбран из группы, состоящей из C<sub>1-8</sub> алкила, C<sub>1-8</sub> алкил-C<sub>3-6</sub> циклоалкила и линейного гетероалкила с 1-8 атомами цепи, а гетероалкил с 1-8 атомами цепи содержит от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из N, O и S, где каждый из C<sub>1-8</sub> алкила, C<sub>1-8</sub> алкил-C<sub>3-6</sub> циклоалкила и линейного гетероалкила с 1-8 атомами цепи независимо необязательно дополнительно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксидной, циано-, амино-, C<sub>1-8</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> хлоралкила, дейтерированного C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> алкокси- и C<sub>3-6</sub> циклоалкила;

L<sup>2</sup> выбран из группы, состоящей из -NR<sup>4</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sup>p</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -NR<sup>4</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sup>p</sup>CH<sub>2</sub>C(O)-, -S(CH<sub>2</sub>)<sup>p</sup>C(O)- и химической связи, где p<sup>1</sup> представляет собой целое число от 1 до 20;

L<sup>3</sup> представляет собой пептидный остаток, состоящий из 2-7 аминокислотных остатков, где аминокислотные остатки выбраны из группы, состоящей из аминокислотных

остатков, образованных из аминокислот фенилаланина (F), глицина (G), валина (V), лизина (K), цитруллина, серина (S), глутаминовой кислоты (Q) и аспарагиновой кислоты (D), и необязательно дополнительно замещены одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксид, циано, амина, алкила, хлоралкила, дейтерированного алкила, алкокси и циклоалкила;

$R^5$  выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, галогеналкила, дейтерированного алкила и гидроксилалкила;

$R^6$  и  $R^7$  являются одинаковыми или различными, и каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, галогена, алкила, галогеналкила, дейтерированного алкила и гидроксилалкила.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитела и лекарственного средства общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемая соль в соответствии с любым из вышеуказанного, представляет собой конъюгат антитела и лекарственного средства общей формулы (Pc-La-Y-D) или его фармацевтически приемлемую соль, где

Pc представляет собой антитело к HER3 в соответствии с любым из вышеуказанного;

m представляет собой целое число от 0 до 4; например, m выбран из группы, состоящей из 0, 1, 2, 3 и 4;

n представляет собой десятичное или целое число от 1 до 10; в частности, n представляет собой десятичное или целое число от 2 до 8 включительно; более конкретно, n представляет собой десятичное или целое число от 2 до 7 включительно; альтернативно, n представляет собой десятичное или целое число между 2 и 3, 3 и 4, 4 и 5, 5 и 6, 6 и 7 или 7 и 8 включительно;

$R^1$  выбран из группы, состоящей из галогена,  $C_{1-6}$  галогеналкила, дейтерированного  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{3-6}$  циклоалкила,  $C_{3-6}$  циклоалкила  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{1-6}$  алкокси  $C_{1-6}$  алкила, гетероциклила, арила и гетероарила;  $R^2$  выбран из группы, состоящей из водорода, галогена,  $C_{1-6}$  галогеналкила, дейтерированного  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{3-6}$  циклоалкила,  $C_{3-6}$  циклоалкила  $C_{1-6}$  алкила,  $C_{1-6}$  алкокси  $C_{1-6}$  алкила, гетероциклила, арила и гетероарила; или  $R^1$  и  $R^2$  вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют  $C_{3-6}$  циклоалкил или гетероциклил;

W выбран из группы, состоящей из  $C_{1-8}$  алкила,  $C_{1-8}$  алкил- $C_{3-6}$  циклоалкила и линейного гетероалкила с 1-8 атомами цепи, а гетероалкил с 1-8 атомами цепи содержит от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из N, O и S, где каждый из  $C_{1-8}$  алкила,  $C_{1-8}$  алкил- $C_{3-6}$  циклоалкила и линейного гетероалкила с 1-8 атомами цепи

независимо необязательно дополнительно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксид, циано, амина, C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> хлоралкила, дейтерированного C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> алкокси и C<sub>3-6</sub> циклоалкила;

L<sup>2</sup> выбран из группы, состоящей из -NR<sup>4</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sup>p</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -NR<sup>4</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sup>p</sup>CH<sub>2</sub>C(O)-, -S(CH<sub>2</sub>)<sup>p</sup>C(O)- и химической связи, где p<sup>1</sup> представляет собой целое число от 1 до 20;

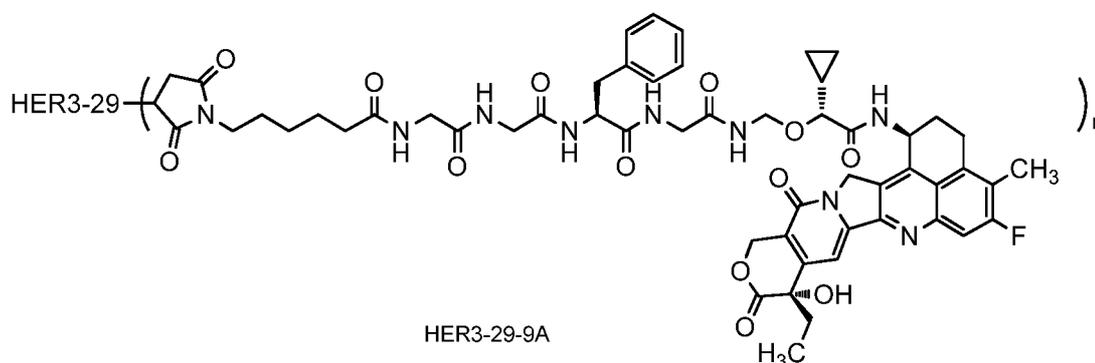
L<sup>3</sup> представляет собой пептидный остаток, состоящий из 2-7 аминокислотных остатков, где аминокислотные остатки выбраны из группы, состоящей из аминокислотных остатков, образованных из аминокислот из фенилаланина (F), глицина (G), валина (V), лизина (K), цитруллина, серина (S), глутаминовой кислоты (Q) и аспарагиновой кислоты (D), и необязательно дополнительно замещены одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксид, циано, амина, C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> хлоралкила, дейтерированного C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> алкокси и C<sub>3-6</sub> циклоалкила;

R<sup>5</sup> выбран из группы, состоящей из водорода, C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> галогеналкила, дейтерированного C<sub>1-6</sub> алкила и C<sub>1-6</sub> гидроксиалкила;

R<sup>6</sup> и R<sup>7</sup> являются одинаковыми или различными, и каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, галогена, C<sub>1-6</sub> алкила, C<sub>1-6</sub> галогеналкила, дейтерированного C<sub>1-6</sub> алкила и C<sub>1-6</sub> гидроксиалкила;

гетероцикл содержит от 3 до 6 кольцевых атомов, из которых от 1 до 3 являются гетероатомами, выбранными из группы, состоящей из азота, кислорода и серы.

В некоторых вариантах осуществления в конъюгате антитела и лекарственного средства общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с любым из вышеуказанного, конъюгат антитела и лекарственного средства представляет собой:



где:

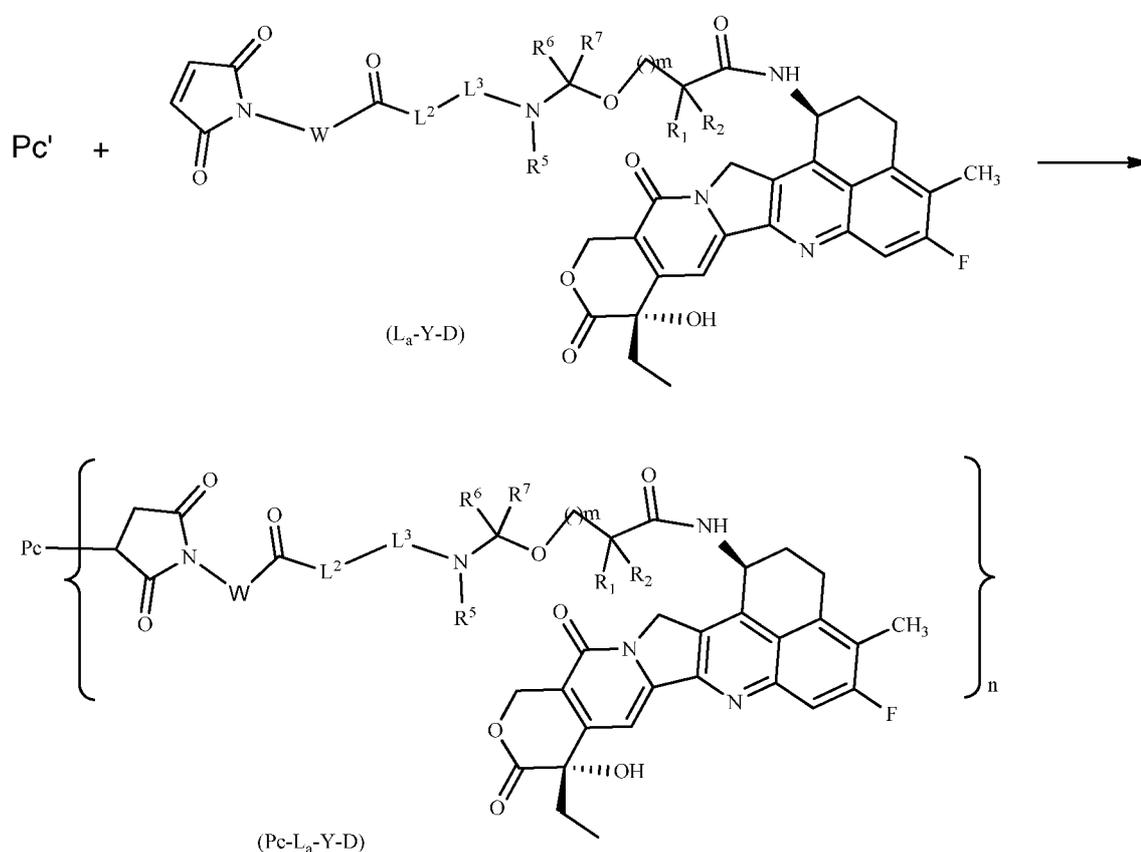
n представляет собой десятичное или целое число от 1 до 8; в частности, n представляет собой десятичное или целое число от 2 до 8 включительно; более конкретно, n представляет собой десятичное или целое число от 2 до 7 включительно; альтернативно,

n представляет собой десятичное или целое число между 2 и 3, 3 и 4, 4 и 5, 5 и 6, 6 и 7 или 7 и 8 включительно;

HER3-29 представляет собой антитело к HER3, содержащее тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 27, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 28.

В некоторых вариантах осуществления в конъюгате антитела и лекарственного средства общей формулы (Pc-L-Y-D) или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с любым из вышеуказанного, n предпочтительно представляет собой десятичное или целое число от 3 до 8.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также предлагает способ получения конъюгата антитела и лекарственного средства общей формулы (Pc-La-Y-D) или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с любым из вышеуказанного, включающему следующие стадии:



проведение реакции сочетания Pc' с соединением общей формулы (L<sub>a</sub>-Y-D) с получением соединения общей формулы (Pc-L<sub>a</sub>-Y-D);

где:

Pc' получали восстановлением Pc;

n, m, W, L<sup>2</sup>, L<sup>3</sup>, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> и R<sup>7</sup> являются такими, как определено в любом из вышеуказанного.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также предлагает

фармацевтическую композицию, содержащую антитело к HER3 в соответствии с любым из вышеуказанного, или молекулу нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из вышеуказанного, или конъюгат антитела и лекарственного средства или его фармацевтически приемлемую соль в соответствии с любым из вышеуказанного, и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов, разбавителей или носителей.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также предлагает применение антитела к HER3 в соответствии с любым из вышеуказанного, или молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из вышеуказанного, или конъюгата антитела и лекарственного средства или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с любым из вышеуказанного, или фармацевтической композиции в соответствии с любым из вышеуказанного, при получении лекарственного средства для лечения HER3-опосредованного заболевания или расстройства.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также предлагает применение антитела к HER3 в соответствии с любым из вышеуказанного, или молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из вышеуказанного, или конъюгата антитела и лекарственного средства или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с любым из вышеуказанного, или фармацевтической композиции в соответствии с любым из вышеуказанного, при получении лекарственного средства для лечения и/или предотвращения опухолей и рака, где опухоли и рак выбраны из группы, состоящей из рака молочной железы, немелкоклеточного рака легкого, рака желудка, рака яичников, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, колоректального рака, плоскоклеточной карциномы головы и шеи и меланомы.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также предлагает набор, содержащий антитела к HER3 в соответствии с любым из вышеуказанного, или молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из вышеуказанного, или конъюгата антитела и лекарственного средства или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с любым из вышеуказанного, или фармацевтической композиции в соответствии с любым из вышеуказанного.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также предлагает способ предотвращения или лечения заболевания или расстройства, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к HER3 в соответствии с любым из вышеуказанного, или молекулы нуклеиновой кислоты в соответствии с любым из вышеуказанного, или конъюгата антитела или лекарственного средства или его фармацевтически приемлемой соли в соответствии с любым из вышеуказанного, или фармацевтической композиции в соответствии с любым из

вышеуказанного. В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство предпочтительно представляет собой опухоль, аутоиммунное заболевание или инфекционное заболевание; в некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой заболевание или расстройство, связанное с HER3.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат антитела к HER3 и лекарственного средства или его фармацевтически приемлемую соль в соответствии с любым из вышеуказанного и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов, разбавителей или носителей. В некоторых вариантах осуществления разовая доза фармацевтической композиции содержит 0,1-3000 мг или 1-1000 мг антитела к HER3, описанного выше, или конъюгата антитела и лекарственного средства, описанного выше.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает применение конъюгата антитела и лекарственного средства или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, содержащей его в соответствии с любым из вышеуказанного, в качестве лекарственного средства.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает применение конъюгата антитела и лекарственного средства или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, содержащей их в соответствии с любым из вышеуказанного, в получении лекарственного средства для лечения HER3-опосредованного заболевания или расстройства; в некоторых вариантах осуществления HER3-опосредованное заболевание или расстройство представляет собой рак с высокой, умеренной или низкой экспрессией HER3.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает применение конъюгата антитела и лекарственного средства или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, содержащей их в соответствии с любым из вышеуказанного, в получении лекарственного средства для лечения или предотвращения рака; в некоторых вариантах осуществления опухоль и рак выбраны из группы, состоящей из рака молочной железы, немелкоклеточного рака легкого, рака желудка, рака яичников, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, колоректального рака, плоскоклеточной карциномы головы и шеи и меланомы.

В другом аспекте настоящее изобретение дополнительно относится к способу лечения и/или предотвращения опухоли, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективной дозы конъюгата антитела и лекарственного средства или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, содержащей их, в соответствии с любым из вышеуказанного; в некоторых вариантах

осуществления опухоль представляет собой рак, связанный с высокой, средней или низкой экспрессией HER3.

В другом аспекте настоящее изобретение дополнительно относится к способу лечения или предотвращения опухолей или злокачественных новообразований, включающему введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективной дозы конъюгата антитела и лекарственного средства или его фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, содержащей их, в соответствии с любым из вышеуказанного; в некоторых вариантах осуществления опухоли и злокачественные новообразования выбраны из группы, состоящей из рака молочной железы, немелкоклеточного рака легкого, рака желудка, рака яичников, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, колоректального рака, плоскоклеточной карциномы головы и шеи и меланомы.

В другом аспекте настоящее изобретение дополнительно предлагает антитело к HER3 или его конъюгат антитела и лекарственного средства в соответствии с любым из вышеуказанного, в качестве лекарственного средства, в некоторых вариантах осуществления, в качестве лекарственного средства для лечения рака или опухолей, более предпочтительно, в качестве лекарственного средства для лечения HER3-опосредованного рака.

Активное соединение (например, соединение или его фармацевтически приемлемая соль согласно настоящему изобретению или конъюгат лиганда и лекарственного средства или его фармацевтически приемлемая соль согласно настоящему изобретению) может быть составлено в форме, подходящей для введения любым подходящим способом. Активное соединение может быть в форме однократной дозы или в форме однократной дозы, которую субъект может вводить самостоятельно. Стандартная доза активного соединения или композиции по настоящему изобретению может быть составлена в форме таблетки, капсулы, крахмальной капсулы, флакона, порошка, гранулы, пастилки, суппозитория, порошка для разведения или жидком препарате.

Доза введения активного соединения или композиции, применяемая в способе лечения по настоящему изобретению, обычно варьируется в зависимости от тяжести заболевания, массы субъекта и относительной эффективности активного соединения. Однако, как правило, подходящая стандартная доза может составлять от 0,1 до 1000 мг.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать, в дополнение к активному соединению, один или более эксципиентов, выбранных из группы, состоящей из наполнителя, разбавителя, связующего вещества, смачивающего агента, разрыхлителя, эксципиента и т.п. В зависимости от способа введения композиция

может содержать от 0,1 до 99 мас.% активного соединения.

Антитело против HER3 и конъюгат антитела и лекарственного средства, предложенные в настоящем изобретении, обладают хорошей аффинностью к антигенам клеточной поверхности, хорошей эффективностью эндоцитоза и высокой эффективностью ингибирования опухоли, а также более широкими окнами применения лекарственного средства и пригодны для клинического применения лекарственного средства.

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1: связывающая активность антитела по настоящему изобретению и положительного антитела к белку HER3.

Фиг. 2: связывающая активность антитела по настоящему изобретению и положительного антитела к клеткам MCF7.

Фиг. 3: тестирование клеточной эндоцитарной активности антитела по настоящему изобретению и положительного антитела с помощью DT3C (белок, содержащий каталитический домен дифтерийного токсина (DT) и три антитело-связывающие области белка G).

Фиг. 4: испытание клеточной эндоцитарной активности антитела по настоящему изобретению и положительного антитела с помощью pHrodo.

Фиг. 5: эффективность образцов ADC (конъюгат антитела и лекарственного средства) по настоящему изобретению на ксенотрансплантатных опухолях SW620 у опухоленесущих голых мышей.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

### Термины

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, которое обычно подразумевается специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем документе, также могут быть использованы для осуществления или тестирования настоящего изобретения, предпочтительные способы и материалы описаны в настоящем документе. В описании и формуле изобретения по настоящему изобретению используются следующие термины в соответствии с приведенными ниже определениями.

При использовании торгового наименования в настоящем описании предполагается, что оно включает состав коммерческого продукта под указанным торговым наименованием и лекарственное средство и активный компонент

лекарственного средства коммерческого продукта под указанным торговым наименованием.

Термин «конъюгат антитела и лекарственного средства» (ADC) относится к связыванию антитела с биологически активным лекарственным средством. Антитело может быть связано с лекарственным средством непосредственно или через линкерное звено.

Термин «нагрузка лекарственного средства» относится к среднему количеству лекарственных средств, которые несет каждая молекула конъюгата антитела и лекарственного средства, а также может быть выражен как отношение количества лекарственных средств к количеству антител. Нагрузка лекарственным средством может составлять от 0 до 12 лекарственных средств, иллюстративно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лекарственных средств, связанных на антитело; числовое значение может быть десятичным или целым числом. В некоторых вариантах осуществления каждое антитело несет от 1 до около 10 лекарственных средств; в некоторых вариантах осуществления каждое антитело несет от около 1 до около 9, от 1 до около 8, от около 3 до около 7, от около 3 до около 6, от около 3 до около 5, около 2, около 3, около 4, около 5, около 6, около 7 или около 8 лекарственных средств; числовое значение может быть десятичным или целым числом. Нагрузка лекарственного средства может быть идентифицирована обычными методами, такими как спектроскопия в УФ/видимом спектре, масс-спектрометрия, анализы ELISA и характеристика HPLC (высокоэффективная жидкостная хроматография).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения цитотоксическое лекарственное средство связано с сульфгидрильной группой антитела посредством линкерного фрагмента.

Нагрузка конъюгата лиганда и цитотоксического лекарственного средства может контролироваться следующими неограничивающими способами, включая:

- (1) контроль молярного соотношения линкерного реагента к моноклональному антителу,
- (2) контроль времени и температуры реакции, и
- (3) выбор различных реагентов реакции.

Трехбуквенные и однобуквенные коды для аминокислот, используемые в настоящем описании, раскрыты в *J. Biol. Chem.*, 243, p3558 (1968).

Термин «антитело» в настоящем документе используется в самом широком смысле и охватывает различные структуры антител, включая, но не ограничиваясь, моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифические антитела

(например, биспецифические антитела), полноразмерные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (также известные как антигенсвязывающие части), при условии, что они проявляют желаемую антигенсвязывающую активность. Полноразмерное антитело представляет собой иммуноглобулин (Ig), который содержит по меньшей мере две тяжелые цепи и две легкие цепи, связанные между собой дисульфидными связями. Константные области тяжелой цепи иммуноглобулинов отличаются по своему аминокислотному составу и расположению, и, таким образом, по своей антигенности. Соответственно, иммуноглобулины можно разделить на пять классов, иначе называемых изотипами иммуноглобулинов, а именно IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, при этом их соответствующие тяжелые цепи представляют собой  $\mu$ -цепь,  $\delta$ -цепь,  $\gamma$ -цепь,  $\alpha$ -цепь и  $\epsilon$ -цепь, соответственно. Ig одного класса может быть разделен на различные подклассы в зависимости от различий в аминокислотном составе шарнирных областей и количества и положения дисульфидных связей тяжелых цепей; например, IgG может быть разделен на IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи классифицируются на  $\kappa$ - или  $\lambda$ -цепи по различиям в константных областях. Каждый из пяти классов Ig может иметь  $\kappa$ -цепь или  $\lambda$ -цепь.

В тяжелых и легких цепях полноразмерного антитела последовательности около 110 аминокислот вблизи N-конца значительно варьируются и, таким образом, называются переменными областями (сокращенно Fv-области); остальные аминокислотные последовательности вблизи C-конца являются относительно стабильными и, таким образом, называются константными областями. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно VH) и константной области тяжелой цепи (сокращенно CH). Константная область тяжелой цепи содержит три области (домена), т. е. CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно VL) и константной области легкой цепи (сокращенно CL). Переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи содержат гиперпеременные области (также называемые определяющими комплементарность областями, сокращенно CDR или HVR) и каркасные области (сокращенно FR), последовательности которых относительно консервативны. Каждая VL и VH состоит из 3 CDR и 4 FR, расположенных от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Три области CDR легкой цепи обозначаются как LCDR1, LCDR2 и LCDR3, три области CDR тяжелой цепи обозначаются как HCDR1, HCDR2 и HCDR3.

«Обычный вариант» константной области тяжелой цепи человеческого антитела и константной области легкой цепи человеческого антитела, описанный в данном документе,

относится к варианту константной области тяжелой цепи или константной области легкой человеческой цепи, который был раскрыт в предшествующем уровне техники и не изменяет структуру и функцию вариабельной области антитела. Иллюстративные варианты включают варианты константной области тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 с сайт-специфическими модификациями и аминокислотными заменами в константной области тяжелой цепи. Конкретные замены представляют собой, например, мутацию YTE, мутацию L234A и/или L235A или мутацию S228P, 265A (например, D265A) и/или 297A (например, N297A), и/или мутации с получением структуры «выступ-во-впадину» (так что тяжелая цепь антитела имеет комбинацию «выступ-Fc» и «впадина-Fc»), известную в данной области техники. Было подтверждено, что эти мутации придают антителу новые свойства, но не изменяют функцию вариабельной области антитела.

«Человеческое антитело» (HuMAb), «антитело человеческого происхождения», «полностью человеческое антитело» и «целиком человеческое антитело» в настоящем документе используются взаимозаменяемо и имеют аминокислотные последовательности, соответствующие аминокислотным последовательностям антител, продуцируемых людьми или человеческими клетками, или полученных из нечеловеческих источников с использованием репертуаров человеческих антител или других кодирующих человеческих антител последовательностей. Определение такого человеческого антитела исключает гуманизированные антитела, содержащие антигенсвязывающие остатки, не являющиеся человеческими.

Термин «антигенсвязывающий фрагмент», или «функциональный фрагмент», или «антигенсвязывающая часть» относится к одному или более фрагментам интактного антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Фрагмент полноразмерного антитела может быть использован для выполнения антигенсвязывающей функции антитела. Иллюстративно, примеры связывающего фрагмента, включенного в термин «антигенсвязывающий фрагмент», включают (i) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')<sub>2</sub>-фрагмент, двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VH и VL одного плеча антитела; (v) dsFv, стабильный антигенсвязывающий фрагмент, образованный VH и VL через межцепочечные дисульфидные связи между ними; (vi) диатело, биспецифическое антитело и мультиспецифическое антитело, содержащее такие фрагменты, как scFv, dvs и Fab. Кроме того, хотя два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются отдельными генами, эти два домена могут быть связаны рекомбинантным способом с использованием

искусственного пептидного линкера, который позволяет им формироваться в виде единой белковой цепи, где пара VL и VH образует одновалентную молекулу, называемую одноцепочечным Fv (scFv) (см., например, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также включены в термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела. Такие фрагменты антител получают путем общепринятых методик, известных специалистам в данной области техники, и подвергают скринингу на пригодность таким же образом, как и интактные антитела. Антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с использованием технологии рекомбинантной ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов. Антитела могут быть различных изотипов, например, IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 подтипа), IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM антитела.

Термин «аминокислотное различие» или «аминокислотная мутация» относится к наличию аминокислотных изменений или мутаций в варианте белка или полипептида по сравнению с исходным белком или полипептидом, включая наличие 1, 2, 3 или более аминокислотных вставок, делеций или замен в последовательности исходного белка или полипептида.

Термин «каркасная область антитела» или «FR» относится к части варибельного домена VL или VH, которая служит каркасом для антигенсвязывающих петель (CDR) варибельного домена. Это, по существу, представляет собой варибельную область без CDR.

Термин «определяющие комплементарность области», «CDR» или «гиперварибельная область» относится к одной из 6 гиперварибельных областей в пределах варибельного домена антитела, которые в основном способствуют связыванию антигена. В целом, существует три CDR (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) в каждой варибельной области тяжелой цепи и три CDR (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) в каждой варибельной области легкой цепи. Границы аминокислотных последовательностей CDR могут быть определены с использованием любой из множества хорошо известных схем, включая схему нумерации «Кабат» (см. Kabat et al. (1991), «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD), схема нумерации «Чотиа», схема нумерации «ABM», схема нумерации «контакт» (see Martin, ACR. Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains[J]. 2001), схема нумерации ImMunoGenTics (IMGT) (Lefranc M.P., Dev. Счетчики Immunol., 27, 55–77(2003)) и т.п. Например, для классического формата, согласно схеме Кабата, аминокислотные остатки CDR в варибельной области тяжелой цепи (VH) пронумерованы

как 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); аминокислотные остатки CDR в варибельной области легкой цепи (VL) пронумерованы как 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3). Согласно схеме Чотиа аминокислоты CDR в VH пронумерованы как 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); а аминокислотные остатки в VL пронумерованы как 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3). Согласно схеме IMGT, аминокислотные остатки CDR в VH примерно пронумерованы 27-38 (HCDR1), 56-65 (HCDR2) и 105-117 (HCDR3), а аминокислотные остатки CDR в VL примерно пронумерованы 27-38 (LCDR1), 56-65 (LCDR2) и 105-117 (LCDR3). Согласно схеме AbM аминокислоты CDR в VH пронумерованы как 26-35 (HCDR1), 50-58 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и аминокислотные остатки в VL пронумерованы как 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3).

Термин «эпитоп» или «антигенная детерминанта» относится к сайту на антигене (например, конкретному сайту на молекуле HER3), с которым связывается антитело. Эпитопы обычно содержат по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 смежных или несмежных аминокислот в уникальной пространственной конформации. См., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, volume 66, G.E.Morris, Ed. (1996).

Термины «специфическое связывание», «селективное связывание», «селективное связывание с» и «специфическое связывание с» относятся к связыванию антитела или антигенсвязывающего фрагмента с эпитопом на заданном антигене. Как правило, антитело или антигенсвязывающий фрагмент связывается с аффинностью ( $KD$  (константа диссоциации)) менее чем около  $10^{-8}$  М, например, менее чем около  $10^{-9}$  М,  $10^{-10}$  М,  $10^{-11}$  М,  $10^{-12}$  М или менее.

Термин «конкурировать» при использовании в случае, когда антигенсвязывающие белки (например, нейтрализующие антигенсвязывающие белки или нейтрализующие антитела) конкурируют за один и тот же эпитоп, относится к конкуренции между антигенсвязывающими белками, которая определена с помощью следующего анализа, в котором тестовый антигенсвязывающий белок (например, антитело или его иммунологически функциональный фрагмент) предотвращает или ингибирует (например, снижает) специфическое связывание эталонного антигенсвязывающего белка (например, лиганда или эталонного антитела) с общим антигеном (например, антигеном HER3 или его фрагментом). Многочисленные типы конкурентных анализов связывания доступны для определения того, конкурирует ли антигенсвязывающий белок с другим, например, твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (RIA), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (EIA) и сэндвич-конкурентный анализ (см.,

например, Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253), твердофазный прямой биотин-авидин EIA (см., например, Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619), твердофазный прямой меченый анализ и твердофазный прямой меченый сэндвич-анализ (см., например, Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press), твердофазный прямой меченый RIA с меткой I-125 (см., например, Morel et al., 1988, *Molec. Immunol.* 25:7-15), твердофазный прямой биотин-авидин EIA (см., например, Cheung, et al., 1990, *Virology* 176:546-552) и прямой меченый RIA (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J. Immunol.* 32: 77-82). Как правило, анализ относится к применению очищенного антигена, связывающегося с твердой поверхностью или клеткой, несущей любой из немеченого анализируемого антигенсвязывающего белка и меченого эталонного антигенсвязывающего белка. Конкуrentное ингибирование определяли путем измерения количества метки, связанной с твердой поверхностью или клеткой в присутствии анализируемого антигенсвязывающего белка. Как правило, анализируемый антигенсвязывающий белок существует в избыточном количестве. Антигенсвязывающие белки, идентифицированные с помощью конкурентных анализов (конкурирующие антигенсвязывающие белки), включают антигенсвязывающий белок, связывающийся с тем же эпитопом, что и эталонный антигенсвязывающий белок, и антигенсвязывающий белок, связывающийся с проксимальным эпитопом, достаточно близким к связывающему эпитопу эталонного антигенсвязывающего белка, где два эпитопа стерически препятствуют связыванию. Другая подробная информация о способе анализа конкурентного связывания представлена в примерах в настоящем документе. Как правило, когда конкурентный антигенсвязывающий белок существует в избыточном количестве, специфическое связывание эталонного антигенсвязывающего белка с общим антигеном ингибируется (например, снижается) по меньшей мере на 40-45%, 45-50%, 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% или 75% или более. В некоторых случаях связывание ингибируется по меньшей мере на 80-85%, 85-90%, 90-95%, 95-97% или 97% или более.

Термин «молекула нуклеиновой кислоты», используемый в данном документе относится к молекуле ДНК или молекуле РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной и предпочтительно представляет собой двухцепочечную ДНК, одноцепочечную мРНК или модифицированную мРНК (матричная РНК). Нуклеиновая кислота является «функционально связанной», когда она помещена в функциональную связь с другой последовательностью нуклеиновой кислоты. Например, промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию кодирующей последовательности.

«Идентичность» аминокислотной последовательности относится к проценту

аминокислотных остатков, разделяемых первой последовательностью и второй последовательностью, причем при выравнивании аминокислотных последовательностей при необходимости вводятся гэпы для достижения максимального процента идентичности последовательности, и любая консервативная замена не рассматривается как часть идентичности последовательности. С целью определения процента идентичности аминокислотных последовательностей, выравнивания могут быть достигнуты различными способами, которые входят в область техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить параметры, подходящие для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания всей длины выровненных последовательностей.

«Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность» или «ADCC» относится к клеточно-опосредованному ответу, в котором неспецифические цитотоксические клетки, экспрессирующие FcR (например, естественные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на клетке-мишени, что приводит к лизису клетки-мишени. Первичные клетки и NK-клетки, которые регулируют ADCC, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Анализы ADCC *in vivo* и *in vitro* могут быть выполнены для оценки активности ADCC молекулы, представляющей интерес, например, описанные в Clynes et al. (PNAS USA 95: 652-656 (1998)), и в патентах США № US5500362 и US5821337 и т.п.

«Антителозависимый клеточный фагоцитоз» или «ADCP» относится к механизму, посредством которого клетки-мишени или вирионы, покрытые антителами, элиминируются путем интернализации фагоцитарных клеток (например, макрофагов, нейтрофилов и дендритных клеток). Интернализированные клетки-мишени или вирионы, покрытые антителами, содержатся в везикулах, называемых фагосомами, которые впоследствии сливаются с одной или более лизосомами с образованием фаголизосом. ADCP можно оценить с помощью анализа цитотоксичности *in vitro* с использованием макрофагов в качестве эффекторных клеток и видеомикроскопии (например, van Bij et al., Journal of Hepatology Vol. 53, No. 4, October 2010, p677-685). «Комплемент-зависимая цитотоксичность» или «CDC» относится к цитотоксичности, в которой участвует комплемент, то есть литическое воздействие на клетку-мишень комплексом мембранной атаки, который образуется путем активации классического пути комплемента после связывания антитела с соответствующим антигеном на клетке или вирионе с образованием комплекса. CDC можно оценить с помощью анализа *in vitro* (например, анализа на CDC с

использованием нормальной человеческой сыворотки в качестве источника комплемента) или в серии концентраций C1q. Снижение активности CDC (например, снижение активности CDC из-за введения второй мутации в полипептид или антитело) может быть определено путем сравнения активности CDC полипептида или антитела с активностью CDC исходного полипептида или антитела, которое не имеет второй мутации в том же анализе. Анализ, такой как описанный Romeuf et al (Romeuf et al., Br J Haematol. 2008 Mar; 140(6): 635-43) могут быть выполнены для оценки способности антитела индуцировать CDC.

Антитело или фрагмент антитела, описанные в настоящем документе, могут быть связаны с эффекторной молекулой любым способом. Например, антитело или фрагмент антитела могут быть химически или рекомбинантно присоединены к цитотоксическому лекарственному средству. Химические средства для получения слияний или конъюгатов известны в данной области техники и могут быть использованы для получения иммуноконъюгатов. Способ конъюгирования антитела или фрагмента антитела и лекарственного средства должен быть способен связывать антитело с цитотоксическим средством, не мешая способности антитела или фрагмента антитела связываться с молекулой-мишенью.

В одном варианте осуществления и антитело, и цитотоксическое лекарственное средство являются белками и могут быть соединены с использованием методик, хорошо известных в данной области техники. В данной области техники описаны сотни сшивающих агентов, которые могут конъюгировать два белка. Сшивающий агент обычно выбирали на основе реакционноспособных функциональных групп, доступных или вставленных в антитело или цитотоксическое лекарственное средство. Альтернативно, при отсутствии реакционноспособных групп может быть использован фотоактивируемый сшивающий агент. В некоторых случаях может быть желательно включить спейсер между антителом и цитотоксическим лекарственным средством. Сшивающие агенты, известные в данной области техники, включают гомобифункциональные агенты: глутаральдегид, диметил адипимидат и бис(диазобензидин), и гетеробифункциональные агенты: м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид и сульфо-м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид.

Сшивающие агенты, которые могут быть использованы для конъюгации эффекторной молекулы с фрагментом антитела, включают, например, ТРСН (S-(2-тиопиридил)-L-цистеингидразид) и ТРМРН (S-(2-тиопиридил)сульфгидрил-пропионгидразид). ТРСН и ТРМРН реагируют на углеводный фрагмент гликопротеина, который ранее был окислен обработкой мягким периодатом, тем самым образуя

гидразоновую связь между гидразидным фрагментом сшивающего агента и альдегидом, полученным периодатом. Гетеробифункциональные сшивающие агенты GMBS (N-( $\gamma$ -малеимидобутирилокси)-сукцинимид) и SMCC (сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан) взаимодействуют с первичным амином, тем самым вводя в компонент малеимидную группу. Эта малеимидная группа может затем реагировать с сульфгидрильной группой на другом компоненте, который может быть введен сшивающим агентом, тем самым образуя стабильную простую тиоэфирную связь между компонентами. Если стерическое препятствие между компонентами препятствует активности любого компонента, для введения длинной сшивающей прокладки между компонентами можно использовать сшивающий агент, такой как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP). Таким образом, существует множество подходящих сшивающих агентов, которые могут быть использованы и выбраны индивидуально в зависимости от их влияния на выход оптимального иммуноконъюгата.

Термин «вектор экспрессии» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она была связана. В одном варианте осуществления вектор представляет собой «плазмиду», которая относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. В другом варианте осуществления вектор представляет собой вирусный вектор, где дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Векторы, раскрытые в настоящем документе, способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они были введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальное происхождение репликации, и эписомальные векторы млекопитающих) или интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина (например, неэписомальные векторы млекопитающих).

Способы получения и очистки антител и антигенсвязывающих фрагментов хорошо известны в данной области техники, например, описаны в главах 5-8 и 15 публикации “Antibodies: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Press. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном изобретении, генетически сконструированы таким образом, чтобы содержать одну или более дополнительных человеческих FR в CDR нечеловеческого происхождения. Последовательности FR зародышевой линии человека можно получить на веб-сайте <http://imgt.cines.fr> ImMunoGeneTics (IMGT) или в журнале иммуноглобулинов, 2001 ISBN 012441351, путем сравнения с базой данных генов вариабельной области человеческих антител зародышевой линии с помощью программного обеспечения MOE.

Термин «клетка-хозяин» относится к клетке, в которую был введен вектор экспрессии. Клетки-хозяева могут включать бактериальные, микробные, растительные или животные клетки. Бактерии, чувствительные к трансформации, включают членов семейства Enterobacteriaceae, таких как штаммы *Escherichia coli* или *Salmonella*; членов семейства Bacillaceae, таких как *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*; и *Haemophilus influenzae*. Подходящие микроорганизмы включают *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*. Подходящие линии клеток-хозяев животных включают CHO, 293 и клетки NS0. В некоторых вариантах осуществления клетки-хозяева в настоящем изобретении не включают клетки эмбрионов человека.

Сконструированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно получить и очистить обычными методами. Например, последовательности кДНК (комплементарная ДНК), кодирующие тяжелую и легкую цепи, можно клонировать и рекомбинировать в вектор экспрессии GS. Векторы экспрессии рекомбинантного иммуноглобулина могут быть стабильно трансфицированы в клетки CHO (клетки ячника китайского хомячка). В качестве более рекомендуемых в предшествующем уровне техники системы экспрессии млекопитающих могут привести к гликозилированию антител, в частности, в высококонсервативном N-концевом сайте области Fc. Стабильные клоны получали путем экспрессии антитела, которое специфически связывается с человеческим HER3. Положительные клоны размножали в бессывороточной среде биореактора для получения антител. Культура с секретируемым антителом может быть очищена с использованием обычных методик. Например, очистку проводили с использованием колонки A или G Sepharose FF, содержащей скорректированный буфер. Неспецифически связанные фракции вымывали. Связанное антитело элюировали методом градиента pH, и фрагменты антител детектировали с помощью SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) и собирали. Антитело можно фильтровать и концентрировать обычными методами. Растворимые смеси и полимеры также можно удалить обычными методами, такими как молекулярные сита и ионный обмен. Полученный продукт должен быть немедленно заморожен, например, при  $-70^{\circ}\text{C}$ , или лиофилизирован.

«Консервативная модификация» или «консервативная замена или замещение» относятся к замене аминокислот в белке другими аминокислотами, имеющими схожие характеристики (например, заряд, размер боковой цепи, гидрофобность/гидрофильность или конформация и жесткость каркаса), так что изменения часто могут быть сделаны без изменения биологической активности белка. Специалистам в данной области техники известно, что, как правило, замена одной аминокислоты в несущественной области

полипептида существенно не изменяет биологическую активность (см., например, Watson et al. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p224, (4th edition)). Кроме того, замена аминокислот с аналогичной структурой или функцией маловероятно нарушит биологическую активность. Иллюстративные консервативные замены являются следующими:

Исходный остаток	Консервативная замена
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His; Asp
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala; Val
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Термин «экзогенные» относится к веществам, производимым вне организмов, клеток или человеческих тел в зависимости от обстоятельств. Термин «эндогенные» относится к веществам, производимым в клетках, организмах или организмах людей в зависимости от обстоятельств.

«Гомология» относится к сходству последовательностей между двумя

полинуклеотидными последовательностями или между двумя полипептидами. Когда положения в двух сравниваемых последовательностях заняты идентичными основаниями или субъединицами аминокислотного мономера, например, если положение каждой из двух молекул ДНК занято аденином, то молекулы гомологичны в этом положении. Процент гомологии между двумя последовательностями является функцией количества совпадающих или гомологичных положений, общих для двух последовательностей, деленного на количество сравниваемых положений  $\times 100\%$ . Например, при оптимальном выравнивании последовательностей, если 6 из 10 положений двух последовательностей совпадают или гомологичны, две последовательности являются на 60% гомологичными, и если 95 из 100 положений двух последовательностей совпадают или гомологичны, две последовательности являются на 95% гомологичными. Как правило, две последовательности при выравнивании сравнивали, чтобы получить максимальный процент гомологии. Например, сравнение может быть выполнено с помощью алгоритма BLAST, где параметры алгоритма выбраны таким образом, чтобы обеспечить максимальное соответствие между эталонными последовательностями по всей длине каждой последовательности. Следующие ссылки относятся к алгоритму BLAST, часто используемому для анализа последовательностей: алгоритмы BLAST: Altschul, S.F. et al., (1990) *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410; Gish, W., et al., (1993) *Nature Genet.*, 3: 266-272; Madden, T.L. et al., (1996) *Meth. Enzymol.*, 266: 131-141; Altschul, S.F. et al., (1997) *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402; Zhang, J. et al., (1997) *Genome Res.*, 7: 649-656. Другие традиционные алгоритмы BLAST, такие как один, предложенный NCBI BLAST, также хорошо известны специалистам в данной области техники.

В данном контексте выражения «клетка», «клеточная линия» и «клеточная культура» используются взаимозаменяемо, и все такие обозначения включают их потомство. Таким образом, слова «трансформант» и «трансформированная клетка» включают первичные тестовые клетки и культуры, полученные из них, независимо от количества переносов. Также следует понимать, что все потомки могут не быть точно идентичными по содержанию ДНК из-за преднамеренных или непреднамеренных мутаций. Это определение включает мутантное потомство с той же функцией или биологической активностью, что и в исходных трансформированных клетках. Когда речь идет о различных обозначениях, они становятся ясными через контекст.

«Полимеразная цепная реакция» или «PCR», используемые в настоящем документе, относятся к способу или методике, в которой следовое количество конкретного фрагмента нуклеиновой кислоты, РНК и/или ДНК амплифицируется, как описано, например, в патенте США № 4683195. Вообще говоря, необходимо получить информацию

о последовательности с конца или за пределами целевой области, чтобы можно было сконструировать олигонуклеотидные праймеры; эти праймеры идентичны или аналогичны с точки зрения последовательности соответствующей цепи амплифицируемой матрицы. 5'-концевой нуклеотид из 2 праймеров может совпадать с концом амплифицируемого материала. PCR может быть использована для амплификации специфических последовательностей РНК, специфических последовательностей ДНК из тотальной геномной ДНК и кДНК, последовательностей, транскрибируемых из тотальной клеточной РНК, фаговых или плазмидных последовательностей и т. п. См., в целом, Mullis, et al., (1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263; Erlich ed. (1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.). PCR, используемая в настоящем документе, считается примером, но не единственным, способа полимеразной реакции нуклеиновой кислоты для амплификации испытуемого образца нуклеиновой кислоты, и способ включает использование известных нуклеиновых кислот в качестве праймеров и полимераз нуклеиновой кислоты для амплификации или получения специфического фрагмента нуклеиновой кислоты.

«Выделенный» относится к состоянию очистки, и в этом случае означает, что указанная молекула по существу не содержит других биомолекул, таких как нуклеиновые кислоты, белки, липиды, углеводы или другие материалы (такие как клеточный дебрис и питательная среда). Как правило, термин «выделенный» не предназначен для обозначения полного отсутствия таких веществ или отсутствия воды, буферов или солей, если они не присутствуют в количествах, которые значительно мешают экспериментальному или терапевтическому применению соединений, описанных в настоящем документе.

Термин «лекарственное средство» относится к химическому веществу, которое может изменять или устанавливать физиологию и патологическое состояние организма и может использоваться для предотвращения, диагностики и лечения заболеваний. Лекарственное средство включает цитотоксическое лекарственное средство. Нет четкой границы между лекарственным средством и токсичным веществом. Токсичное вещество относится к химическому веществу, которое оказывает токсический эффект на организмы и может причинить вред здоровью человека даже в небольших дозах. Любое лекарственное средство в больших дозах может вызывать токсические реакции.

Цитотоксическое лекарственное средство относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает функции клеток и/или вызывает гибель клеток или разрушение клеток. Цитотоксическое лекарственное средство может уничтожать опухолевые клетки в целом при достаточно высокой концентрации; однако из-за отсутствия специфичности, цитотоксическое лекарственное средство может вызывать

апоптоз нормальных клеток при уничтожении опухолевых клеток, что приводит к серьезным побочным эффектам. Цитотоксическое лекарственное средство включает токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, радиоизотопы (например, At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32 и радиоактивные изотопы Lu), токсические лекарственные средства, химиотерапевтические лекарственные средства, антибиотики и нуклеолитические ферменты.

В некоторых вариантах осуществления токсины могут представлять собой низкомолекулярные токсины из бактерий, грибов, растений или животных и их производных, включая производные камптотецина (такие как экзатекан и майтанзиноиды и их производные (CN101573384) (такие как DM1, DM3, DM4 и ауристин F (AF) и их производные (такие как MMAF, MMAE, 3024 (WO 2016/127790 A1, соединение 7))), дифтерийный токсин, экзотоксин, цепь рицина А, цепь абрина А, модекцин,  $\alpha$ -сарцин, токсичный белок *Aleutites fordii*, токсичный белок диантина, токсичный белок *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецены.

Термин «химиотерапевтический агент» относится к химическому соединению, которое может быть использовано для лечения опухолей. Определение также включает антигормональные агенты, которые действуют, чтобы модулировать, уменьшать, блокировать или ингибировать эффекты гормонов, которые могут способствовать росту рака, и часто в форме систематического или системного лечения. Они сами могут быть гормонами. Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофамид (CYTO $\square$ AN<sup>TM</sup>); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридин, такой как бенадопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; азиридин и меламинамин, включая альтретамин, триэтиленмеламинамин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилломеламинамин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин и гидрохлорид нитромина; мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид и урацил иприт; нитромочевины, такие как кармустин, хлорзотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицин, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицин, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, хромомицин, карзинофилин, хромомицин, актиномицин D, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицин, микофеноловая кислота,

ногаламицин, оливомицин, пепломицин, потфиромицин, пурамицин, квеламицин, родорубицин и стрептонигрин; стрептозоцин, туберкулоцидин, убенимекс, зиностатин и зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин и триметрексат; аналоги птерина, такие как флундарабин, 6-меркаптоптерин, тиоптерин и тиогуантерин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксилуридин, эноцитабин, флоксуридин и 5-FU; андрогены, такие как калустерон, дромостанолонг пропионат, эпителиостанол, мепителиостан и тестолактон; антиадренергические средства, такие как аминоклотеимид, митотан и трилостан; добавки фолиевой кислоты, такие как фролиновая кислота; ацетоглюконолактон; альдофосфамидгликозид; аминоклевулиновая кислота; амсакрин; бесстрабуцил; бисинтрен; эдатрексат; дефофамин; колхицин; диазиквон; эльфомитин; ацетат эллиптиния; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пинтостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазононовая кислота; триазиквон; 2,2',2»-трихлортриэтиламин, урета, виндезин, дакарбазин, манномустин, митобронитол, митолактол, пипоброман, гацитозин, арабинозид («Ара-С»), циклофосфамид, тиотепа, таксан, такой как паклитаксел (ТА□OL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, Нью-Джерси) и доцетаксел (ТА□OTERE®, Rhone-Poulenc Roger, Антони, Франция); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навельбин; новантрон; тенипозид; даунорубицин; аминокптерин; кселода и ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS2000; дифформетилорнитин (DMFO); ретиноевая кислота; эсперамицины; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеуказанных веществ. Определение также включает антигормональные агенты, которые могут модулировать или ингибировать действие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогенные агенты, включая тамоксифен, ралоксифен, ингибитор ароматазы 4(5)-имидазол, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен (Фарестон); и антиандрогенные агенты, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеуказанных веществ.

Термин «алкил» относится к насыщенной алифатической углеводородной группе, которая представляет собой линейную или разветвленную группу, содержащую от 1 до 20

атомов углерода, предпочтительно к алкилу, содержащему от 1 до 12 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12) атомов углерода и более предпочтительно к алкилу, содержащему от 1 до 6 атомов углерода. Неограничивающие примеры включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, трет-бутил, втор-бутил, н-пентил, 1,1-диметилпропил, 1,2-диметилпропил, 2,2-диметилпропил, 1-этилпропил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, н-гексил, 1-этил-2-метилпропил, 1,1,2-триметилпропил, 1,1-диметилбутил, 1,2-диметилбутил, 2,2-диметилбутил, 1,3-диметилбутил, 2-этилбутил, 2-метилпентил, 3-метилпентил, 4-метилпентил, 2,3-диметилбутил, н-гептил, 2-метилгексил, 3-метилгексил, 4-метилгексил, 5-метилгексил, 2,3-диметилпентил, 2,4-диметилпентил, 2,2-диметилпентил, 3,3-диметилпентил, 2-этилпентил, 3-этилпентил, н-октил, 2,3-диметилгексил, 2,4-диметилгексил, 2,5-диметилгексил, 2,2-диметилгексил, 3,3-диметилгексил, 4,4-диметилгексил, 2-этилгексил, 3-этилгексил, 4-этилгексил, 2-метил-2-этилпентил, 2-метил-3-этилпентил, н-нонил, 2-метил-2-этилгексил, 2-метил-3-этилгексил, 2,2-диэтилпентил, н-децил, 3,3-диэтилгексил, 2,2-диэтилгексил и их различные изомеры с боковой цепью и т.п. Более предпочтительно представляет собой низший алкил, который содержит от 1 до 6 атомов углерода, и неограничивающие примеры включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, трет-бутил, втор-бутил, н-пентил, 1,1-диметилпропил, 1,2-диметилпропил, 2,2-диметилпропил, 1-этилпропил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, н-гексил, 1-этил-2-метилпропил, 1,1,2-триметилпропил, 1,1-диметилбутил, 1,2-диметилбутил, 2,2-диметилбутил, 1,3-диметилбутил, 2-этилбутил, 2-метилпентил, 3-метилпентил, 4-метилпентил, 2,3-диметилбутил и т.п. Алкил может быть замещенным или незамещенным. При замещении заместитель может быть замещен в любом доступном сайте соединения, и заместитель предпочтительно представляет собой один или более заместителей, независимо необязательно выбранных из группы, состоящей из водорода, дейтерия, галогена, алкила, алкокси, галогеналкила, галогеналкокси, циклоалкилокси, гетероциклокси, гидроксид, гидроксидалкила, циано, amino, нитро, циклоалкила, гетероциклолила, арила и гетероарила.

Термин «гетероалкил» относится к алкилу, содержащему один или более гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из N, O и S, где алкил является таким, как определено выше.

Термин «алкилен» относится к насыщенной линейной или разветвленной алифатической углеводородной группе, имеющей 2 остатка, полученных из исходного алкана путем удаления двух атомов водорода из одного и того же атома углерода или двух различных атомов углерода, которая представляет собой линейную или разветвленную группу, содержащую от 1 до 20 атомов углерода, предпочтительно алкиленовую группу,

содержащую от 1 до 12 (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12) атомов углерода, более предпочтительно алкиленовую группу, содержащую от 1 до 8 атомов углерода и наиболее предпочтительно алкиленовую группу, содержащую от 1 до 6 атомов углерода. Неограничивающие примеры алкилена включают, но не ограничиваются, метилен (-CH<sub>2</sub>-), 1,1-этилен (-CH(CH<sub>3</sub>)-), 1,2-этилен(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,1-пропилен(-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)-), 1,2-пропилен(-CH<sub>2</sub>CH(CH<sub>3</sub>)-), 1,3-пропилен(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), 1,4-бутилен(-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) и т.п. Алкилен может быть замещенным или незамещенным. При замещении заместитель может быть замещен в любом доступном месте соединения, и замещен предпочтительно одним или более заместителями, независимо необязательно выбранными из группы, состоящей из алкила, алкенила, алкинила, алкокси, галогеналкокси, циклоалкилокси, гетероциклокси, алкилтио, алкиламино, галогена, сульфгидрил, гидроксид, нитро, циано, циклоалкила, гетероциклолила, арила, гетероарила, циклоалкокси, гетероциклоалкокси, циклоалкилтио, гетероциклоалкилтио и оксо.

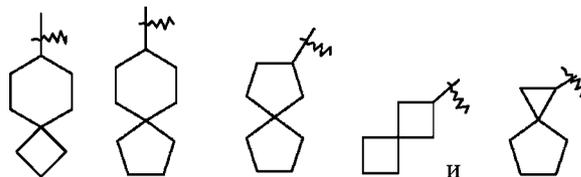
Термин «алкенил» относится к алкильному соединению, содержащему углерод-углеродные двойные связи в молекуле, где алкил является таким, как определено выше. Алкенил может быть замещенным или незамещенным, и когда он замещен, заместитель предпочтительно представляет собой одну или более групп, независимо выбранных из одного или более заместителей водорода, алкила, алкокси, галогена, галогеналкила, галогеналкокси, циклоалкилокси, гетероциклокси, гидроксид, гидроксидалкила, циано, амино, нитро, циклоалкила, гетероциклолила, арила и гетероарила.

Термин «алкинил» относится к алкильному соединению, содержащему тройную связь углерод-углерод в молекуле, где алкил является таким, как определено выше. Алкинил может быть замещенным или незамещенным, и когда он замещен, заместитель предпочтительно представляет собой одну или более групп, независимо выбранных из одного или более заместителей водорода, алкила, алкокси, галогена, галогеналкила, галогеналкокси, циклоалкилокси, гетероциклокси, гидроксид, гидроксидалкила, циано, амино, нитро, циклоалкила, гетероциклолила, арила и гетероарила.

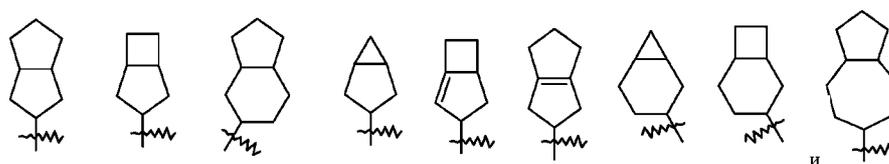
Термин «циклоалкил» относится к насыщенному или частично ненасыщенному моноциклическому или полициклическому углеводородному заместителю. Циклоалкильное кольцо содержит от 3 до 20 атомов углерода, предпочтительно от 3 до 12 атомов углерода, более предпочтительно от 3 до 8 (например, 3, 4, 5, 6, 7 и 8) атомов углерода и наиболее предпочтительно от 3 до 6 атомов углерода. Неограничивающие примеры моноциклического циклоалкила включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентенил, циклогексил, циклогексенил, циклогексадиенил, циклогептил, циклогептатриенил, циклооктил и т. д. Полициклический циклоалкил

включает спироциклоалкил, конденсированный циклоалкил и мостиковый циклоалкил.

Термин «спироциклоалкил» относится к 5-20-членной полициклической группе, в которой моноциклические кольца имеют один общий атом углерода (называемый спироатомом). Он может содержать одну или более двойных связей, но ни одно из колец не имеет полностью сопряженной  $\pi$ -электронной системы. Предпочтительно является 6-14-членным, и более предпочтительно 7-10-членным (например, 7-членным, 8-членным, 9-членным или 10-членным). В соответствии с количеством спироатомов, которые являются общими между кольцами, спироциклоалкил может являться моноспироциклоалкилом, биспироциклоалкилом или полиспироциклоалкилом, предпочтительно моноспироциклоалкилом и биспироциклоалкилом, и более предпочтительно 4-членным/4-членным, 4-членным/5-членным, 4-членным/6-членным, 5-членным/5-членным или 5-членным/6-членным моноспироциклоалкилом. Неограничивающие примеры спироциклоалкила включают:



Термин «конденсированный циклоалкил» относится к 5-20-членной полностью углеродной полициклической группе, в которой каждое кольцо в системе имеет общую пару соседних атомов углерода с другими кольцами в системе, где одно или более колец могут содержать одну или более двойных связей, но ни одно из них не имеет полностью сопряженной  $\pi$ -электронной системы. Предпочтительно является 6-14-членным, и более предпочтительно 7-10-членным (например, 7-членным, 8-членным, 9-членным или 10-членным). В соответствии с количеством образованных колец, конденсированный циклоалкил может быть бициклическим, трициклическим, тетрациклическим или полициклическим конденсированным циклоалкилом, предпочтительно бициклическим или трициклическим конденсированным циклоалкилом и более предпочтительно 5-членным/5-членным или 5-членным/6-членным бициклическим конденсированным гетероциклилом. Неограничивающие примеры конденсированного циклоалкила включают:

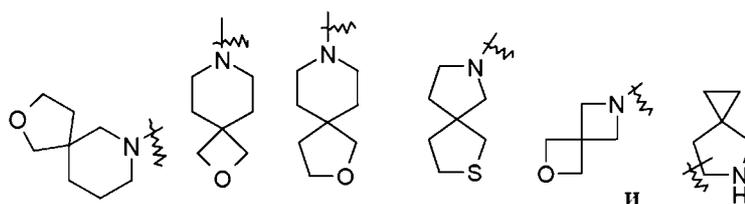


Термин «мостиковый циклоалкил» относится к 5-20-членной полностью углеродной полициклической группе, в которой любые два кольца имеют два общих атома



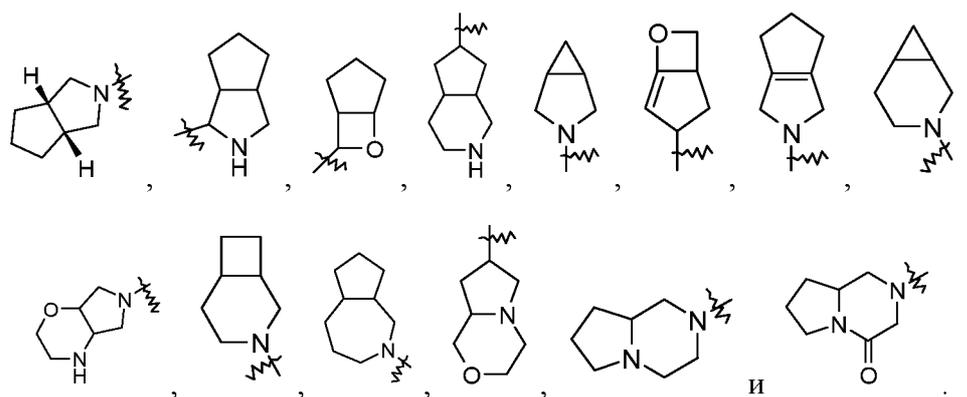
Термин «гетероцикл» относится к насыщенному или частично ненасыщенному моноциклическому или полициклическому углеводородному заместителю, содержащему от 3 до 20 кольцевых атомов, где один или более кольцевых атомов представляют собой гетероатомы, выбранные из группы, состоящей из азота, кислорода, серы, S(O) и S(O)<sub>2</sub>, за исключением циклической части -O-O-, -O-S- или -S-S-, и остальные атомы кольца представляют собой атомы углерода. Предпочтительно он содержит от 3 до 12 атомов кольца (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12), из которых от 1 до 4 (например, 1, 2, 3 и 4) представляют собой гетероатомы; более предпочтительно от 3 до 8 (например, 3, 4, 5, 6, 7 и 8) кольцевых атомов, из которых от 1 до 3 (например, 1, 2 и 3) представляют собой гетероатомы; более предпочтительно от 3 до 6 кольцевых атомов, из которых от 1 до 3 представляют собой гетероатомы; наиболее предпочтительно 5 или 6 кольцевых атомов, из которых от 1 до 3 представляют собой гетероатомы. Неограничивающие примеры моноциклического гетероцикла включают пирролидинил, тетрагидропиранил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, пиперидинил, пиперазинил, морфолинил, тиоморфолинил, гомопиперазинил и тому подобное. Полициклический гетероцикл включает спирогетероцикл, конденсированный гетероцикл и мостиковый гетероцикл.

Термин «спирогетероцикл» относится к 5-20-членной полициклической гетероциклической группе, в которой моноциклические кольца имеют общий один атом (называемый спироатомом), где один или более кольцевых атомов представляют собой гетероатомы, выбранные из группы, состоящей из азота, кислорода, серы, S(O) и S(O)<sub>2</sub>, и другие атомы кольца представляют собой атомы углерода. Он может содержать одну или более двойных связей, но ни одно из колец не имеет полностью сопряженной π-электронной системы. Предпочтительно является 6-14-членным, и более предпочтительно 7-10-членным (например, 7-членным, 8-членным, 9-членным или 10-членным). В соответствии с количеством спироатомов, являющихся общими между кольцами, спирогетероцикл может являться моноспирогетероциклом, биспирогетероциклом или полиспирогетероциклом, предпочтительно моноспирогетероциклом и биспирогетероциклом и более предпочтительно 4-членным/4-членным, 4-членным/5-членным, 4-членным/6-членным, 5-членным/5-членным или 5-членным/6-членным моноспирогетероциклом. Неограничивающие примеры спирогетероцикла включают:

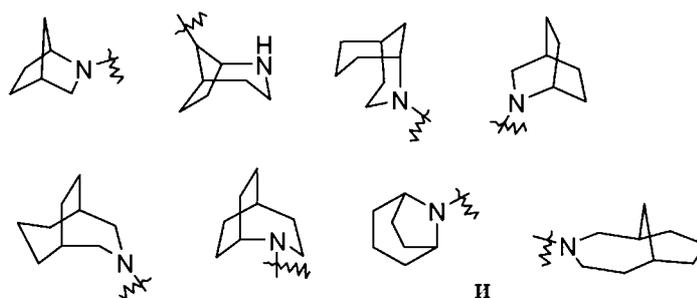


Термин «конденсированный гетероцикл» относится к 5-20-членной

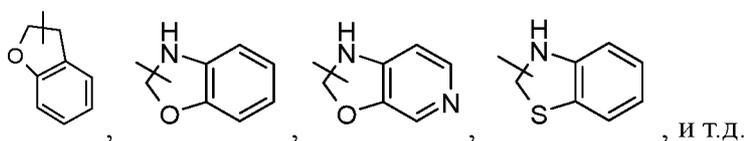
полициклической гетероциклической группе, в которой каждое кольцо имеет общую пару соседних атомов с другими кольцами в системе, где одно или более колец могут содержать одну или более двойных связей, но ни одно из них не имеет полностью сопряженной  $\pi$ -электронной системы, где один или более кольцевых атомов представляют собой гетероатомы, выбранные из группы, состоящей из азота, кислорода, серы, S(O) и S(O) 2, и другие атомы кольца представляют собой атомы углерода. Предпочтительно является 6-14-членным, и более предпочтительно 7-10-членным (например, 7-членным, 8-членным, 9-членным или 10-членным). В соответствии с количеством образованных колец, конденсированный гетероциклический может быть бициклическим, трициклическим, тетрациклическим или полициклическим конденсированным гетероциклическим, предпочтительно бициклическим или трициклическим конденсированным гетероциклическим и более предпочтительно 5-членным/5-членным или 5-членным/6-членным бициклическим конденсированным гетероциклическим. Неограничивающие примеры конденсированного гетероциклического включают:



Термин «мостиковый гетероциклический» относится к 5-14-членной полициклической гетероциклической группе, в которой любые два кольца имеют общих два атома, которые непосредственно не связаны друг с другом. Он может содержать одну или более двойных связей, но ни одно из колец не имеет полностью сопряженной  $\pi$ -электронной системы, где один или более атомов кольца представляют собой гетероатомы, выбранные из группы, состоящей из азота, кислорода, серы, S(O) и S(O) 2, а другие атомы кольца представляют собой атомы углерода. Предпочтительно является 6-14-членным, и более предпочтительно 7-10-членным (например, 7-членным, 8-членным, 9-членным или 10-членным). В соответствии с количеством образованных колец, мостиковый гетероциклический может быть бициклическим, трициклическим, тетрациклическим или полициклическим, предпочтительно бициклическим, трициклическим или тетрациклическим и более предпочтительно бициклическим или трициклическим. Неограничивающие примеры мостикового гетероциклического включают:

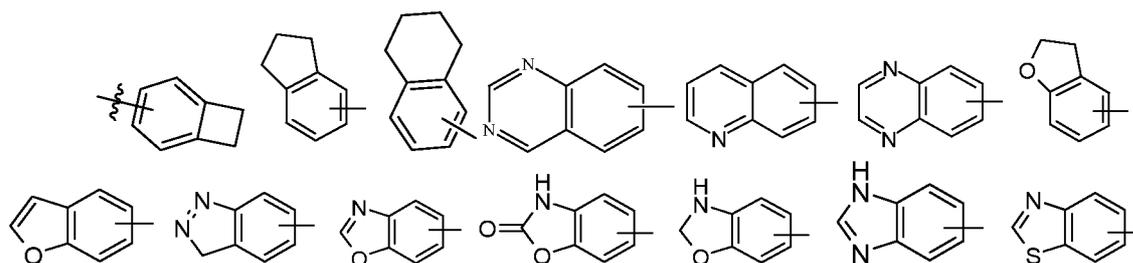


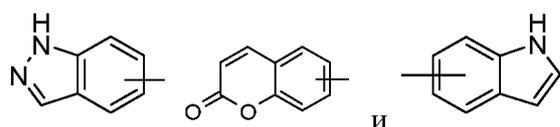
Гетероциклическое кольцо включает те, в которых описанный выше гетероциклил (включая моноциклические, спирогетероциклические, конденсированные гетероциклические и мостиковые гетероциклические кольца) конденсирован с арильным, гетероарильным или циклоалкильным кольцом, где кольцо, связанное с исходной структурой, представляет собой гетероциклил; его неограничивающие примеры включают:



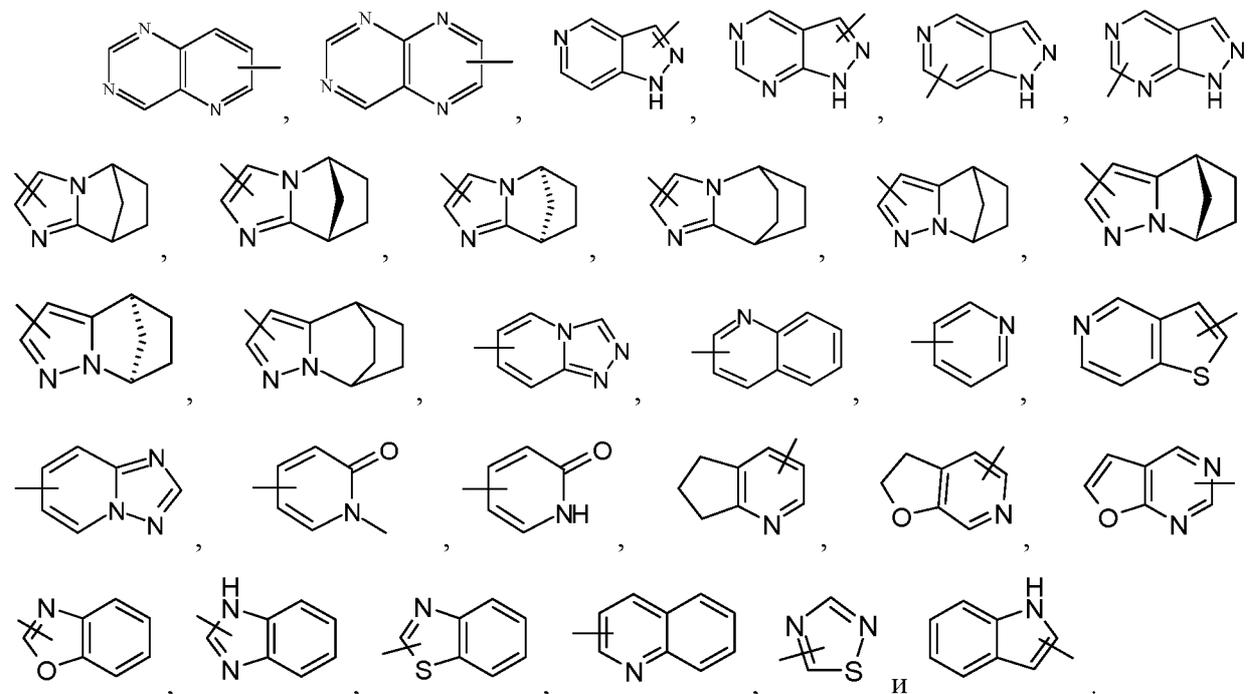
Гетероциклил может быть замещенным или незамещенным. При замещении заместитель может быть замещен в любом доступном сайте соединения, и заместитель предпочтительно представляет собой один или более заместителей, независимо выбранных из группы, состоящей из водорода, дейтерия, галогена, алкила, алкокси, галогеналкила, галогеналкокси, циклоалкилокси, гетероциклилокси, гидроксид, гидроксидалкила, циано, амина, нитро, циклоалкила, гетероциклила, арила и гетероарила.

Термин «арил» относится к 6-14-членной, предпочтительно 6-10-членной полностью углеродной моноциклической или конденсированной полициклической (в которой кольца, имеющие общую пару соседних атомов углерода) группе, имеющей сопряженную  $\pi$ -электронную систему, такой как фенил и нафтил. Арильное кольцо включает те, в которых арильное кольцо, описанное выше, конденсировано с гетероарильным, гетероциклическим или циклоалкильным кольцом, где кольцо, соединенное с исходной структурой, представляет собой арильное кольцо; его неограничивающие примеры включают:





Арил может быть замещенным или незамещенным. При замещении заместитель может быть замещен в любом доступном сайте соединения, и заместитель предпочтительно представляет собой один или более заместителей, независимо необязательно выбранных из группы, состоящей из водорода, дейтерия, галогена, алкила, алкокси, галогеналкила, галогеналкокси, циклоалкилокси, гетероциклокси, гидроксид, гидроксидалкила, циано, амина, нитро, циклоалкила, гетероциклолила, арила и гетероарила. Термин «гетероарил» относится к гетероароматической системе, содержащей от 1 до 4 гетероатомов и от 5 до 14 кольцевых атомов, где гетероатомы выбраны из группы, состоящей из кислорода, серы и азота. Гетероарил представляет собой предпочтительно 5-10-членный (например, 5-членный, 6-членный, 7-членный, 8-членный, 9-членный или 10-членный) и более предпочтительно 5-членный или 6-членный, например, фурил, тиенил, пиридинил, пирролил, N-алкилпирролил, пиримидинил, пиазинил, пиридазинил, имидазолил, пиазолил, триазолил и тетразолил. Гетероарильное кольцо включает кольца, в которых описанное выше гетероарильное кольцо конденсировано с арильным, гетероциклолильным или циклоалкильным кольцом, где кольцо, связанное с исходной структурой, представляет собой гетероарильное кольцо; его неограничивающие примеры включают:



Гетероарил может быть замещенным или незамещенным. При замещении заместитель может быть замещен в любом доступном сайте соединения, и заместитель

предпочтительно представляет собой один или более заместителей, независимо необязательно выбранных из группы, состоящей из водорода, дейтерия, галогена, алкила, алкокси, галогеналкила, галогеналкокси, циклоалкилокси, гетероциклокси, гидроксид, гидроксидалкила, циано, амина, нитро, циклоалкила, гетероциклола, арила и гетероарила.

Термин «аминозащитная группа» относится к группе, которая может быть легко удалена и предназначена для защиты аминогруппы от изменения, когда реакция проводится в другом месте молекулы. Неограничивающие примеры включают (триметилсилил)этоксиметил, тетрагидропиранил, трет-бутоксикарбонил, ацетил, бензил, аллил, п-метоксибензил и тому подобное. Эти группы могут быть необязательно замещены 1-3 заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, алкокси и нитро.

Термин «гидроксизащитная группа» представляет собой подходящую группу, известную в данной области техники для защиты гидроксидной группы. Гидроксизащитные группы можно найти в литературе (“Protective Groups in Organic Synthesis”, 5th Ed. T.W.Greene & P.G.M.Wuts). В качестве примера, предпочтительно, гидроксизащитная группа может представлять собой ( $C_{1-10}$  алкил или арил) триэтилсилил, например, триэтилсилил, триизопропилсилил, трет-бутилдиметилсилил или трет-бутилдифенилсилил;  $C_{1-10}$  алкил или замещенный алкил, предпочтительно алкокси или арилзамещенный алкил, более предпочтительно  $C_{1-6}$  алкоксизамещенный  $C_{1-6}$  алкил или фенилзамещенный  $C_{1-6}$  алкил и наиболее предпочтительно  $C_{1-4}$  алкоксизамещенный  $C_{1-4}$  алкил, например, метил, трет-бутил, аллил, бензил, метоксиметил (МOM), этоксиэтил или 2-тетрагидропиранил (ТНР); ( $C_{1-10}$  алкил или арил)ацил, например, формил, ацетил, бензоил или п-нитробензоил; ( $C_{1-6}$  алкил или  $C_{6-10}$  арил)сульфонил; или ( $C_{1-6}$  алкокси или  $C_{6-10}$  арилокси)карбонил.

Термин «циклоалкилокси» относится к циклоалкилу-О-, где циклоалкил является таким, как определено выше.

Термин «гетероциклокси» относится к гетероциклолилу-О-, где гетероциклолил является таким, как определено выше.

Термин «алкилтио» относится к алкил-S-, где алкил является таким, как определено выше.

Термин «галогеналкил» относится к алкилу, замещенному одним или более галогенами, где алкил является таким, как определено выше.

Термин «галогеналкокси» относится к алкокси, замещенному одним или более галогенами, где алкокси является таким, как определено выше.

Термин «дейтерированный алкил» относится к алкилу, замещенному одним или более атомами дейтерия, где алкил является таким, как определено выше.

Термин «гидроксиалкил» относится к алкильной группе, замещенной гидроксильной группой, где алкил представляет собой такой, как определено выше.

Термин «галоген» относится к фтору, хлору, бромю или йоду.

Термин «гидроксильный» относится к  $-OH$ .

Термин «сульфгидрил» относится к  $-SH$ .

Термин «амино» относится к  $-NH_2$ .

Термин «циано» относится к  $-CN$ .

Термин «нитро» относится к  $-NO_2$ .

Термин «оксо» относится к  $=O$ .

Термин «карбонил» относится к  $C=O$ .

Термин «карбоксильный» относится к  $-C(O)OH$ .

Термин «карбоксилатная группа» относится к  $-C(O)O$ (алкилу),  $-C(O)O$ (циклоалкилу), (алкил) $C(O)O-$  или (циклоалкил) $C(O)O-$ , где алкил и циклоалкил являются такими, как определено выше.

Соединения, описанные в настоящем документе, включают их изотопные производные. Термин «изотопное производное» относится к соединениям, которые отличаются по структуре только наличием одного или более обогащенных изотопных атомов. Например, соединения со структурой по настоящему изобретению, имеющие «дейтерий» или «третий» вместо водорода, или мечение  $^{18}F$ -фтором (изотоп  $^{18}F$ ) вместо фтора, или  $^{11}C$ -,  $^{13}C$ - или  $^{14}C$ -обогащенный углерод (мечение  $^{11}C$ -,  $^{13}C$ - или  $^{14}C$ -углеродом;  $^{11}C$ -,  $^{13}C$ - или  $^{14}C$ -изотоп) вместо атома углерода, находятся в пределах объема настоящего изобретения. Такое соединение может быть использовано в качестве аналитического инструмента или зонда, например, в биологическом анализе, или может быть использовано в качестве индикатора для диагностической визуализации заболевания *in vivo*, или в качестве индикатора в фармакодинамическом, фармакокинетическом или рецепторном исследовании. Различные дейтерированные формы соединений по настоящему изобретению означают, что каждый доступный атом водорода, соединенный с атомом углерода, может быть независимо заменен атомом дейтерия. Специалисты в данной области техники могут синтезировать соединения в дейтерированной форме со ссылкой на соответствующую литературу. Коммерчески доступные дейтерированные исходные материалы могут быть использованы для получения дейтерированных соединений или они могут быть синтезированы с использованием обычных методов с дейтерированными реагентами, включая, но не ограничиваясь, дейтерированный боран, тридейтерированный боран в тетрагидрофуране, дейтерированный алюмогидрид лития, дейтерированный йодэтан, дейтерированный йодметан и тому подобное. Дейтериды, как

правило, могут сохранять сопоставимую активность с недейтерированными соединениями и могут достигать лучшей метаболической стабильности при дейтерировании в определенных конкретных местах, тем самым достигая определенных терапевтических преимуществ.

«Необязательный» или «необязательно» означает, что событие или обстоятельство, описанное далее, может, но не безусловно, иметь место, и что такое описание включает случаи, когда событие или обстоятельство происходит или не происходит. Например, «гетероциклическая группа, необязательно замещенная алкилом» означает, что алкил может присутствовать, но не обязательно, и включает случаи, когда гетероциклическая группа является или не является замещенной алкилом.

«Замещен» означает, что один или более, предпочтительно от 1 до 5, более предпочтительно от 1 до 3 атомов водорода в группе независимо замещены соответствующим количеством заместителей. Специалисты в данной области техники могут определить (экспериментально или теоретически) возможную или невозможную замену, не прилагая чрезмерных усилий. Например, она может быть нестабильной, когда амино или гидроксильные, имеющие свободный водород, связаны с атомом углерода, имеющим ненасыщенную (например, олефиновую) связь.

«Фармацевтическая композиция» относится к смеси, содержащей одно или более соединений, или их физиологически/фармацевтически приемлемые соли, или пролекарств, описанных в настоящем изобретении, и другие химические компоненты, например, физиологически/фармацевтически приемлемые носители и эксципиенты. Фармацевтическая композиция предназначена для облегчения введения в организм, что облегчает абсорбцию активного ингредиента, тем самым осуществляя биологическую активность.

В настоящем описании термин «фармацевтически приемлемый» относится к тем соединениям, материалам, композициям и/или лекарственным формам, которые по результатам надежной клинической оценки подходят для применения в контакте с тканями субъекта без возникновения чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений и являются соразмерными с точки зрения разумного соотношения пользы и риска и эффективными для их предполагаемого применения.

В данном контексте формы единственного числа включают ссылки на множественное число и наоборот, если иное четко не определено в контексте.

Когда термин «около» применяется к таким параметрам, как pH, концентрация и температура, это означает, что параметр может варьироваться на  $\pm 10\%$ , и иногда более

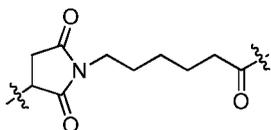
предпочтительно в пределах  $\pm 5\%$ . Как будет понятно специалистам в данной области техники, когда параметры не являются критическими, числа, как правило, приведены только в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения.

Термин «линкерное звено», «линкерная единица» или «линкерный фрагмент» относится к химическому структурному фрагменту или связи, который связан с лигандом (антителом в настоящем описании) на одном конце и связан с лекарственным средством на другом конце или который связан с другими линкерами до того, как он связан с лекарственным средством.

Линкер может содержать один или более линкерных компонентов. Примеры линкерных компонентов включают 6-малеимидакапроил («МС»), малеимидопропионил («МР»), валин-цитруллин («val-cit» или «vc»), аланин-фенилаланин («ala-phe»), п-аминобензилоксикарбонил («РАВ») и такие, которые получены от сочетания с линкерным реагентом: N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноат («SPP»), N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1 карбоксилат («SMCC», также именуемый в настоящем документе «MCC») и N-сукцинимидил(4-йод-ацетил)аминобензоат («SIAB»). Линкер может включать удлиняющие звенья, спейсерные звенья и аминокислотные звенья и может быть синтезирован с использованием способов, известных в данной области техники, таких как описанные в US2005-0238649A1. Линкер может представлять собой «расщепляемый линкер», благоприятствующий высвобождению лекарственных средств в клетках. Например, могут быть использованы кислотолабильные линкеры (например, гидразоны), линкеры, чувствительные к протеазе (например, чувствительные к пептидазе), фотоллабильные линкеры, диметильные линкеры или дисульфидсодержащие линкеры (Chari et al., Cancer Research 52: 127–131(1992); патент США № 5208020).

Линкерные компоненты включают, но не ограничиваются:

МС означает 6-малеимидакапроил, со следующей структурой:



Val-Cit или «vc» означает валин-цитруллин (пример дипептида в расщепляемом протеазой линкере)

цитруллин означает 2-амино-5-уреидопентановая кислота

РАВ означает п-аминобензилоксикарбонил (пример «саморасщепляющихся» линкерных компонентов)

Me-Val-Cit означает N-метил-валин-цитруллин (где линкерная пептидная связь была модифицирована для предотвращения ее расщепления катепсином В)

MC(PEG)6-OH означает малеимидокапроил-полиэтиленгликоль (присоединяемый к цистеину антитела)

SPP означает N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)валерат

SPDP означает N-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат

SMCC означает сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат

IT означает имиотиолан

Для получения обычных фармацевтических композиций см. Китайскую фармакопею.

Термин «носитель» для лекарственного средства по настоящему изобретению относится к системе, которая может изменять то, как лекарственного средства попадает в организм человека и распределение лекарственного средства в организме человека, контролировать скорость высвобождения лекарственного средства и доставлять лекарственное средство в орган-мишень. Система высвобождения и нацеливания на основе носителя лекарственного средства может уменьшить разложение и потерю лекарственного средства, уменьшить побочные эффекты и улучшить биодоступность. Например, полимерные поверхностно-активные вещества, которые могут быть использованы в качестве носителей, могут самостоятельно собираться благодаря своим уникальным амфифильным структурам с образованием различных форм агрегатов, таких как мицеллы, микроэмульсии, гели, жидкие кристаллы и везикулы, в качестве предпочтительных примеров. Агрегаты имеют способность инкапсулировать молекулы лекарственного средства и имеют хорошую проницаемость для мембран, и поэтому могут быть использованы как превосходные носители лекарственного средства.

Термин «эксципиент» представляет собой дополнение, помимо основного лекарственного средства, к фармацевтической композиции. Его также можно назвать вспомогательным веществом. Например, связующие вещества, наполнители, разрыхлители и смазывающие вещества в таблетках; основная часть в полутвердой мази и кремовых препаратах; консерванты, антиоксиданты, корригены, ароматизаторы, соразтворители, эмульгаторы, солюбилизаторы, регуляторы осмотического давления, красители и тому подобное в жидких составах могут быть названы эксципиентами.

Термин «разбавитель», также называемый наполнителем, используется в первую очередь для увеличения массы и объема таблетки. Добавление разбавителя не только обеспечивает определенный объем, но и уменьшает отклонение дозы основных ингредиентов, а также улучшает способность лекарственного средства к прессованию и т.п. Когда лекарственное средство в форме таблетки содержит маслянистые компоненты, в обязательном порядке добавляли абсорбент для абсорбции маслянистых компонентов

таким образом, чтобы поддерживать «сухое» состояние и, таким образом, облегчать получение таблетки. Примеры включают крахмал, лактозу, неорганические соли кальция, микрокристаллическую целлюлозу и т.п.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к смеси, содержащей одно или более соединений, или их физиологически/фармацевтически приемлемые соли, или пролекарств, описанных в настоящем изобретении, и другие химические компоненты, например, физиологически/фармацевтически приемлемые носители и эксципиенты. Фармацевтическая композиция предназначена для облегчения введения в организм, что облегчает абсорбцию активного ингредиента, тем самым осуществляя биологическую активность.

Фармацевтическая композиция может быть в форме стерильного водного раствора для инъекций. Доступные и приемлемые носители или растворители включают воду, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Стерильный препарат для инъекций может представлять собой стерильную микроэмульсию масло-в-воде для инъекций, в которой активный ингредиент растворен в масляной фазе. Например, активный ингредиент растворяли в смеси соевого масла и лецитина. Затем масляный раствор добавляли к смеси воды и глицерина и обрабатывают с образованием микроэмульсии. Инъекция или микроэмульсия может быть введена местно в кровоток субъекта в больших количествах. В качестве альтернативы, может быть желательным введение раствора и микроэмульсии таким образом, чтобы поддерживать постоянную циркулирующую концентрацию соединения по настоящему изобретению. Для поддержания такой постоянной концентрации может использоваться устройство для непрерывной внутривенной доставки. Примером такого устройства является насос для внутривенных инъекций Deltac CADD-PLUS. ТМ. Насос для внутривенных инъекций 5400.

Фармацевтическая композиция может быть в форме стерильной водной или масляной суспензии для инъекции для внутримышечного и подкожного введения. Суспензия может быть получена в соответствии с предшествующим уровнем техники с использованием тех подходящих диспергирующих веществ или увлажняющих агентов и суспендирующих веществ, как раскрыто выше. Стерильный состав для инъекции также может представлять собой стерильную инъекцию или суспензию, полученную в парентерально приемлемом нетоксичном разбавителе или растворителе, например, растворе, полученном в 1,3-бутандиоле. Кроме того, стерильное нелетучее масло может обычно использоваться в качестве растворителя или суспендирующей среды. Для этой цели может быть использована любая смесь нелетучего масла, включая синтетические

моноглицериды или диглицериды. Кроме того, в получении инъекций также могут быть использованы жирные кислоты, такие как олеиновая кислота.

«Введение», «обработка» и «лечение», когда они применяются к животным, людям, экспериментальным субъектам, клеткам, тканям, органам или биологическим жидкостям, относятся к приведению экзогенного лекарственного средства, терапевтического агента, диагностического агента или композиции в контакт с животными, людьми, субъектами, клетками, тканями, органами или биологическими жидкостями. Термины «введение», «обработка» и «лечение» могут относиться, например, к терапевтическим, фармакокинетическим, диагностическим, исследовательским и экспериментальным способам. Обработка клеток включает приведение реагента в контакт с клетками и приведение реагента в контакт с жидкостью, где жидкость находится в контакте с клетками. Термины «введение», «обработка» и «лечение» также относятся к лечению, например, клеток реагентами, диагностическими агентами, связывающим композициям или другой клеткой *in vitro* и *ex vivo*. «Лечение» применительно к людям, ветеринарным или исследовательским субъектам, относится к терапевтическому лечению, превентивным или профилактическим мерам и исследовательским и диагностическим применениям.

Термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к соли конъюгата антитела и лекарственного средства по настоящему изобретению или к соли соединения по настоящему изобретению. Такие соли являются безопасными и эффективными при использовании у животных млекопитающих и обладают требуемой биологической активностью. Конъюгат антитела и лекарственного средства по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну аминокислотную группу и, таким образом, может образовывать соль с кислотой. Неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых солей включают: гидрохлорид, гидробромид, гидроиодат, сульфат, бисульфат, цитрат, ацетат, сукцинат, аскорбат, оксалат, нитрат, сорбат, гидрофосфат, дигидрофосфат, салицилат, гидроцитрат, тартрат, малеат, фумарат, формиат, бензоат, мезилат, этансульфонат, бензолсульфонат и пара-толуолсульфонат.

«Лечение» относится к введению терапевтического агента, такого как композиция, содержащая любое из соединений конъюгации по настоящему изобретению, либо вовнутрь, либо снаружи субъекту с одним или более симптомами заболевания, в отношении которого известно, что терапевтический агент оказывает терапевтический эффект. Как правило, терапевтический агент вводили в количестве, эффективном для облегчения одного или более симптомов заболевания у субъекта или популяции, получавших лечение, для индуцирования регрессии таких симптомов или для ингибирования развития таких симптомов в любой клинически измеримой степени.

Количество терапевтического агента, эффективное для облегчения любого конкретного симптома заболевания (также называемое «терапевтически эффективным количеством»), может варьироваться в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания, возраст и вес субъекта, а также от способности лекарственного средства производить желаемый терапевтический эффект у субъекта. Облегчение симптома заболевания может быть оценено с помощью любых методов клинического тестирования, обычно используемых врачами или другими специалистами в области здравоохранения для оценки тяжести или прогрессирования симптома. Хотя варианты осуществления настоящего изобретения (например, способы лечения или получение изделия) могут быть неэффективными для облегчения симптомов каждого представляющего интерес заболевания, они должны облегчать симптомы представляющего интерес заболевания у статистически значимого количества субъектов, как определено любым статистическим методом испытания, известным в данной области техники, таким как t-критерий Стьюдента, критерий хи-квадрат, U-критерий Манна и Уитни, критерий Крускала-Уоллиса (H-критерий), критерий Джонкера-Терпстра и критерий Уилкоксона.

Один или более вариантов осуществления настоящего изобретения подробно раскрыты в описании выше. Хотя любые способы и вещества, аналогичные или идентичные описанным в настоящем документе, могут также использоваться в практике или исследовании настоящего изобретения, ниже описаны предпочтительные способы и вещества. Другие признаки, объекты и преимущества изобретения будут очевидны из описания и формулы изобретения. В описании и формуле изобретения формы единственного числа включают множественное число, если иное четко не указано в контексте. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют общие значения, понятные специалисту в данной области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Все патенты и публикации, цитируемые в описании, включены посредством ссылки. Следующие примеры приведены для того, чтобы более полно проиллюстрировать предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения. Эти примеры не следует никоим образом истолковывать как ограничивающие объем настоящего изобретения, который определен формулой изобретения.

Настоящее изобретение дополнительно описано ниже со ссылкой на примеры, но эти примеры не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

Экспериментальные процедуры без условий, указанные в примерах и тестах настоящего изобретения, как правило, проводили в соответствии с общепринятыми условиями или в соответствии с условиями, рекомендованными производителем исходных

материалов или коммерческих продуктов. См. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al. Greene Publishing Association, Wiley Interscience, NY. Реагенты без указания конкретного происхождения являются коммерчески доступными общепринятыми реагентами.

### Примеры

Пример 1: Конструирование клеточных штаммов, экспрессирующих HER3 на высоких уровнях

Плазмиды лентивирусного вектора экспрессии pCDH-Her3, упаковочные векторы лентивирусной системы pVSV-G и pCMV-dR8.91 трансфицировали в вирусные упаковочные клетки 293T с использованием реагента для трансфекции Lipofectamine 3000. Собирали супернатант среды, содержащий вирусы, фильтровали и центрифугировали на сверхвысокой скорости. Клетки яичника китайского хомячка CHO-K1 позволяли инфицировать концентрированным вирусом, подвергали скринингу с использованием пурамицина в течение двух-трех недель и подвергали сортировке отдельных клеток FACS.

В соответствии с уровнями экспрессии HER3 на поверхности клеток CHO-K1, инфицированных лентивирусом, определенными с помощью FACS, были отобраны штаммы моноклональных клеток, экспрессирующие HER3 на высоких уровнях.

Отобранные моноклональные клеточные штаммы были размножены и сохранены для последующих экспериментов.

Аминокислотная последовательность человеческого ErbB3 (UniProtKB - P21860-1, AA Ser 20 - Thr 643)

```
SEVGN SQAVCPGTLNGLSVTGDAENQYQTLTKLYERCEVVMGNLEIVLTGHNAD
LSFLQWIREVTGYVLVAMNEFSTLPLPNLRVVRGTQVYDYGKFAIFVMLNYNTNSSHALR
QLRLTQLTEILSGGVYIEKNDKLCMDTIDWRDIVRDRDAEIVVKDNGRSCPPCHEVCK
GRCWGPSEDCQTLTKTICAPQCNGHCFGNPNQCCHEDECAGGCSGPQDTCFACRHF
NDSGACVPRCPQPLVYNKLTFLQLEPNPHTKYQYGGVCVASCPHNFVVDQTSVVRACPPD
KMEVDKNGLKMCEPCGGLCPKACEGTGSGSRFQTV DSSNIDGFVNCTKILGNLDFLITG
LNGDPWHKIPALDPEKLNVFRTVREITGYLNIQSWPPHMHNFVFSNLTTIGGRSLYNRG
FSLIMKNLNVTSLGFRSLKEISAGRIYISANRQLCYHHSLNWTKVL RGPTEERLDIKHNR
PRRDCVAEGKVCDPLCSSGGCWGPGPGQCLSCRNYSRGGVCVTHCNFLNGEPREFAHE
AECFSCHPECQPMEGTATCNGSGSDTCAQCAHFRDGP HCVSSCPHGVLGAKGPIYKYPD
VQNECRPCHENCTQGCKGPELQDCLGQTLVLIGKTHLT
```

SEQ ID NO: 1

## Нуклеотидная последовательность человеческого ErbB3

AGCGAAGTCGGCAACAGCCAAGCCGTCTGTCCCGGCACACTCAATGGACTGT  
CCGTGACTGGCGACGCCGAGAACCAATACCAGACACTCTACAAGCTCTACGAGAGGT  
GCGAGGTGGTCATGGGAAATCTGGAGATCGTGCTGACTGGCCATAACGCCGATCTGT  
CCTTTCTGCAGTGGATTAGGGAAGTGACTGGCTACGTGCTGGTCGCCATGAATGAGTT  
TTCCACTCTGCCACTGCCAAATCTGAGAGTGGTGAGGGGGCACTCAAGTGTACGACGG  
CAAGTTCGCCATTTTCGTCATGCTCAACTACAACACAACTCCAGCCACGCCCTCAG  
ACAGCTGAGGCTCACTCAGCTGACAGAAATTCTGTCCGGCGGGCTCTATATCGAGAA  
AAACGATAAACTGTGCCACATGGACACAATCGATTGGAGGGACATCGTGAGGGATAG  
GGATGCCGAGATCGTGGTCAAGGATAACGGAAGGAGCTGTCCTCCTTGTCATGAGGT  
CTGCAAGGGAAGGTGTTGGGGACCCGGCTCCGAAGACTGCCAGACACTGACTAAGA  
CTATCTGCGCCCCTCAGTGCAATGGACACTGCTTCGGCCCAAATCCAAACCAGTGCT  
GCCACGACGAATGTGCCGGCGGATGCAGCGGACCACAAGATACAGACTGCTTCGCTT  
GTAGACACTTCAATGACTCCGGCGCTTGTGTGCCTAGGTGTCCACAGCCACTCGTGTA  
CAACAAGCTCACTTTTCAGCTCGAGCCTAACCTCACACTAAGTACCAATACGGCGG  
AGTCTGCGTCGCCAGCTGTCTCACAACCTTCGTGGTGGATCAGACAAGCTGCGTGAG  
AGCTTGCCCTCCAGATAAAATGGAGGTGGACAAGAACGGACTGAAGATGTGTGAGC  
CTTGCGGCGGACTGTGTCTAAAGCTTGCAGGGGCACTGGCTCCGGATCTAGGTTC  
AGACTGTGACTCCAGCAACATCGACGGCTTTGTGAACTGCACTAAGATTCTGGGCA  
ATCTGGACTTTCTGATCACTGGCCTCAACGGCGATCCTTGGCACAAGATCCAGCTCT  
GGACCCAGAAAAGCTGAATGTGTTTAGGACAGTGAGGGAGATTACTGGCTACCTCAA  
CATCCAGAGCTGGCCTCCACACATGCACAACCTCAGCGTGTTCTCCAATCTGACTACA  
ATCGGCGGCAGATCCCTCTATAATAGGGGCTTCTCTCTGCTCATCATGAAGAATCTGA  
ACGTCACTTCTCTGGGCTTCAGATCTCTGAAGGAGATCTCCGCCGGAAGGATTTACAT  
CTCCGCCAATAGGCAGCTCTGTTACCACCACAGCCTCAACTGGACTAAGGTGCTGAG  
GGGACCTACTGAGGAAAGGCTGGACATTAACACAATAGGCCAAGAAGGGATTGCG  
TCGCTGAGGGCAAAGTGTGTGATCCTCTGTGTAGCTCCGGAGGATGTTGGGGACCCG  
GCCCCGGCCAGTGTCTGAGCTGTAGGAATTATCTAGGGGGCGGCGTGTGTGTGACAC  
ACTGCAACTTTCTGAACGGCGAACCTAGGGAATTCGCCCATGAAGCCGAGTGCTTCA  
GCTGCCACCCAGAGTGTCAGCCTATGGAGGGCACAGCTACATGCAATGGCAGCGGAT  
CCGACACATGTGCTCAGTGTGCCACTTTAGGGATGGACCTCATTGCGTCAGCAGCT  
GTCCACACGGCGTGCTGGGAGCCAAGGGCCCTATCTACAAGTACCCAGATGTGCAGA  
ACGAGTGTAGGCCTTGCCACGAGAATTGCACACAAGGCTGCAAGGGCCAGAGCTG  
CAAGATTGCCTCGGCCAGACTCTGGTGCTCATCGGCAAGACTCATCTCACT

SEQ ID NO: 2

## Пример 2: Получение моноклонального антитела к человеческому HER3

### 2.1. Получение положительного контрольного антитела

Положительное контрольное антитело U3 получали в соответствии с WO 2007077028A2 (стр. 118, U1-59). Аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепи U3 следующие:

Тяжелая цепь U3:

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVYGGSGYYSWIRQPPGKGLEWIGEINHS  
GSTNYPNPSLKSRTISVETSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLV  
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVL  
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL  
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE  
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP  
PSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV  
DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 3

Легкая цепь U3:

DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNRYLAWYQQNPGQPPKLLIYW  
ASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGGQTKVEIKRTVA  
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD  
STYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 4

### 2.2. Получение антитела по настоящему изобретению

Положительный клон получали с помощью пэннинга с использованием библиотеки полностью человеческих природных фаговых антител и биотинилированного антигена человеческого ErbB3 (приобретенного у Beijing ACROBiosystems Biotech Ltd., кат. № ER3-H82E6) с последующим обнаружением фага с помощью ELISA. Положительный клон секвенировали. После получения последовательности положительный клон встраивали в вектор экспрессии белка Phr-IgG и экспрессировали клетками HEK293 и Expi-CHO-S. После очистки были проведены анализы валидации эндоцитарной активности и FACS, и была получена молекула полностью человеческого антитела HER3-29.

Константные области антител молекулы полностью человеческого антитела HER3-29:

Константная область тяжелой цепи человеческому IgG1:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAV  
LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE

LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL  
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV  
DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 5

Константная область легкой цепи к человека:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES  
VTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 6

Последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи молекулы полностью человеческого антитела HER3-29 следующие:

Вариабельная область тяжелой цепи HER3-29:

QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISW  
NSGSIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKEGLPGLDYWGQGTL  
VTVSS

SEQ ID NO: 7

Вариабельная область легкой цепи HER3-29:

DIQMTQSPSSLSASIGDRATITCRASQHVGTLYLNWYQQKPGKTPKLLISGAANLQ  
SGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYNTPPFSFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 8

Последовательности CDR, полученные с помощью различных схем нумерации, следующие:

Таблица 1. Последовательности CDR, полученные по схеме нумерации Чотиа

Антитело	HER3-29	Номер последовательности
CDR1 тяжелой цепи	GFTFDDY	SEQ ID NO: 9
CDR2 тяжелой цепи	SWNSGS	SEQ ID NO: 10
CDR3 тяжелой цепи	EGLPGLDY	SEQ ID NO: 11
CDR1 легкой цепи	RASQHVGTLYN	SEQ ID NO: 12
CDR2 легкой цепи	GAANLQS	SEQ ID NO: 13
CDR3 легкой цепи	QQSYNTPPFS	SEQ ID NO: 14

Таблица 2. Последовательности CDR, полученные по схеме нумерации IMGT

Антитело	HER3-29	Номер последовательности
----------	---------	--------------------------

CDR1 тяжелой цепи	GFTFDDYA	SEQ ID NO: 15
CDR2 тяжелой цепи	ISWNSGSI	SEQ ID NO: 16
CDR3 тяжелой цепи	AKEGLPGLDY	SEQ ID NO: 17
CDR1 легкой цепи	QHVGTY	SEQ ID NO: 18
CDR2 легкой цепи	GAA	SEQ ID NO: 19
CDR3 легкой цепи	QQSYNTPPFS	SEQ ID NO: 20

Таблица 3. Последовательности CDR, полученные по схеме нумерации Кабата

Антитело	HER3-29	Номер последовательности
CDR1 тяжелой цепи	DYAMH	SEQ ID NO: 21
CDR2 тяжелой цепи	GISWNSGSIGYADSVKG	SEQ ID NO: 22
CDR3 тяжелой цепи	EGLPGLDY	SEQ ID NO: 23
CDR1 легкой цепи	RASQHVGYTLN	SEQ ID NO: 24
CDR2 легкой цепи	GAANLQS	SEQ ID NO: 25
CDR3 легкой цепи	QQSYNTPPFS	SEQ ID NO: 26

Последовательности тяжелой и легкой цепей молекулы полностью человеческого антитела HER3-29 следующие:

QVQLVQSGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISW  
 NSGSIGYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKEGLPGLDYWGQGTL  
 VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
 VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP  
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT  
 LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT  
 VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 27

Легкая цепь HER3-29:

DIQMTQSPSSLSASIGDRATITCRASQHVGYTLNHWYQQKPGKTPKLLISGAANLQ  
 SGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYNTPPFSFGQGTKVEIK  
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ  
 DSKDSTYLSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 28

Пример 3: Получение ADC

## Определение значений DAR (соотношение лекарственного средства к антителу) ADC

Значения DAR ADC по настоящему изобретению рассчитывали с помощью RP-HPLC (высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой), в частности, следующим образом:

### 1. Метод определения:

Голое антитело и тестируемый образец ADC (в концентрации 1 мг/мл) восстанавливали 4 мкл DDT (дихлордифенилтрихлорметилметан) (sigma) на водяной бане при 37 °C в течение 1 часа, а затем переносили на ввод. Анализ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1200 с Agilent PLRP-S 1000A 8 мкм 4,6 × 250 мм, выбранной в качестве хроматографической колонки, температурой колонки 80 °C, детектором DAD (детектор с диодной матрицей) при длине волны 280 нм, скоростью потока 1 мл/мин и объемом введения 40 мкл. Сравнение проводили между спектрами образца и голого антитела для идентификации мест расположения легкой цепи и тяжелой цепи, а затем проводили интеграцию на спектре тестируемого образца для вычисления значения DAR.

### 2. Получение растворов

#### 1) 0,25 М раствор DTT (дителиотреитол):

Пример получения: 5,78 мг DTT взвешивали в 150 мкл очищенной воды и полностью растворяли с получением 0,25 М раствора DTT, который затем хранили при -20 °C.

#### 2) Подвижная фаза А (0,1% TFA (трифторуксусная кислота) в воде):

Пример получения: 1000 мл очищенной воды отмеряли с помощью градуированного цилиндра и добавляли 1 мл TFA (sigma). Раствор хорошо перемешивали перед использованием и хранили при 2–8 °C в течение 14 дней.

#### 3) Подвижная фаза В (0,1% TFA в ацетонитриле):

Пример получения: 1000 мл ацетонитрила измеряли с помощью градуированного цилиндра и добавляли 1 мл TFA. Раствор хорошо перемешивали перед использованием и хранили при 2–8 °C в течение 14 дней.

### 3. Анализ данных

Сравнение проводили между спектрами образца и голого антитела для идентификации мест расположения легкой цепи и тяжелой цепи, а затем проводили интеграцию на спектре тестируемого образца для вычисления значения DAR.

Формула расчета выглядит следующим образом:

Наименование	Количество связанных лекарственных средств
--------------	--

LC (легкая цепь)	0
LC+1	2
HC (тяжелая цепь)	0
HC+1	2
HC+2	4
HC+3	6

Общая площадь пика LC = площадь пика LC + площадь пика LC+1

Общая площадь пика HC = площадь пика HC + площадь пика HC+1 + площадь пика HC+2 + площадь пика HC+3

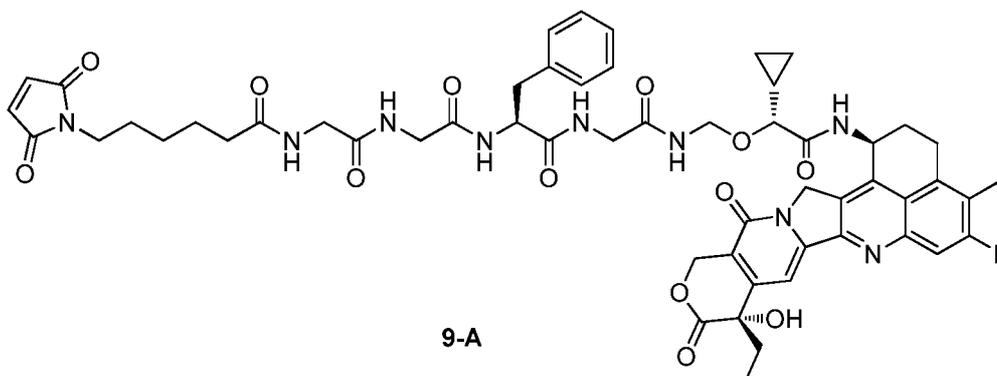
$LC\ DAR = \Sigma(\text{количество связанных лекарственных препаратов} \times \text{процентная площадь пика}) / \text{общая площадь пика LC}$

$HC\ DAR = \Sigma(\text{количество связанных лекарственных препаратов} \times \text{процентная площадь пика}) / \text{общая площадь пика HC}$

$DAR = LC\ DAR + HC\ DAR$

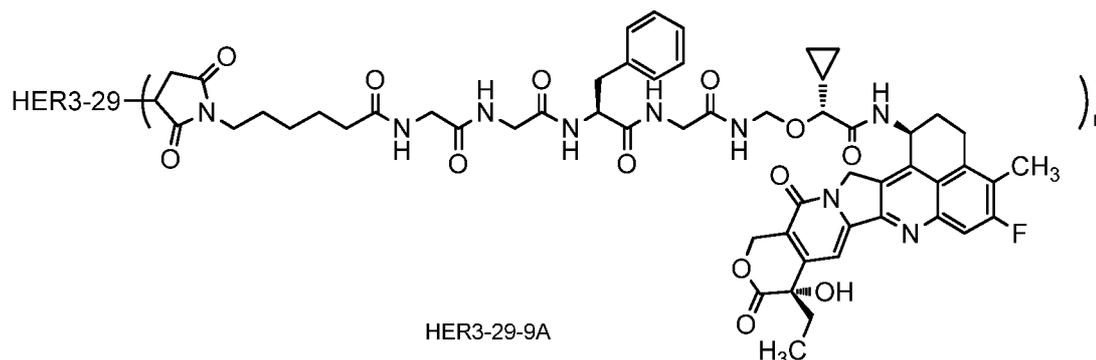
Лекарственное средство

Лекарственный фрагмент конъюгатов по настоящему изобретению может представлять собой любое подходящее лекарственное средство. Особенно подходящие лекарственные средства описаны, например, в публикации PCT № WO2020063676A1, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Соединение 9A согласно настоящему изобретению (т.е., соединение 9A согласно примеру 9 WO2020063676 A1) представляет собой N-((2R,10S)-10-бензил-2-циклопропил-1-(((1S,9S)-9-этил-5-фтор-9-гидрокси-4-метил-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-1-ил)амино)-1,6,9,12,15-пентаоксо-3-окса-5,8,11,14-тетраазагексадец-16-ил)-6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексанамид, которые имеет структуру, представленную ниже:



В настоящем изобретении используются следующие способы получения

конъюгатов антитела и лекарственного средства, представленных общей формулой ADC (HER3-29-9A), путем корректировки параметров реакции.



#### Пример 3-1: ADC-1

К водному буферу PBS антитела HER3-29 (0,05 М рН 6,5 водный буфер PBS; 10,0 мг/мл, 11,8 мл, 797 нмоль) добавляли при 37 °С полученный водный раствор трис(2-карбок시에тил)фосфина (ТСЕР) (10 мМ, 208,2 мкл, 2,082 мкмоль). Смесь подвергали реакции на водяной бане с шейкером при 37 °С в течение 3 ч, а затем реакцию прекращали. Реакционную смесь охлаждали до 25 °С на водяной бане.

Соединение 9А (полученное в соответствии со способом для соединения 9-А согласно примеру 9 WO2020063676, который включен в настоящее изобретение в полном объеме) (8,6 мг, 8,006 мкмоль) растворяли в 500 мкл DMSO (диметилсульфоксид) и полученный раствор добавляли к вышеуказанной реакционной смеси. Смесь подвергали реакции на водяной бане при 25 °С в течение 3 ч, а затем реакцию останавливали. Реакционную смесь обессоливали и очищали через колонку с гелем Sephadex G25 (фаза элюирования: 0,05 М водный буфер PBS при рН 6,5, содержащий 0,001 М EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота)) с получением иллюстративного продукта конъюгата HER3-29-9А, ADC-1, в буфере PBS (4,02 мг/мл, 27,9 мл), который затем хранили при 4 °С. Среднее значение, рассчитанное с помощью RP-HPLC: DAR = 4,19.

#### Пример 3-2: ADC-2

К водному буферу PBS антитела HER3-29 (0,05 М рН 6,5 водный буфер PBS; 10,0 мг/мл, 11,8 мл, 797 нмоль) добавляли при 37 °С полученный водный раствор трис(2-карбоксиетил)фосфина (ТСЕР) (10 мМ, 128 мкл, 1,281 мкмоль). Смесь подвергали реакции на водяной бане с шейкером при 37 °С в течение 3 ч, а затем реакцию прекращали. Реакционную смесь охлаждали до 25 °С на водяной бане.

Соединение 9А (6,88 мг, 6,405 мкмоль) растворяли в 400 мкл DMSO и полученный раствор добавляли к вышеуказанной реакционной смеси. Смесь подвергали реакции на водяной бане при 25 °С в течение 3 ч, а затем реакцию останавливали. Реакционную смесь обессоливали и очищали через колонку с гелем Sephadex G25 (фаза элюирования: 0,05 М

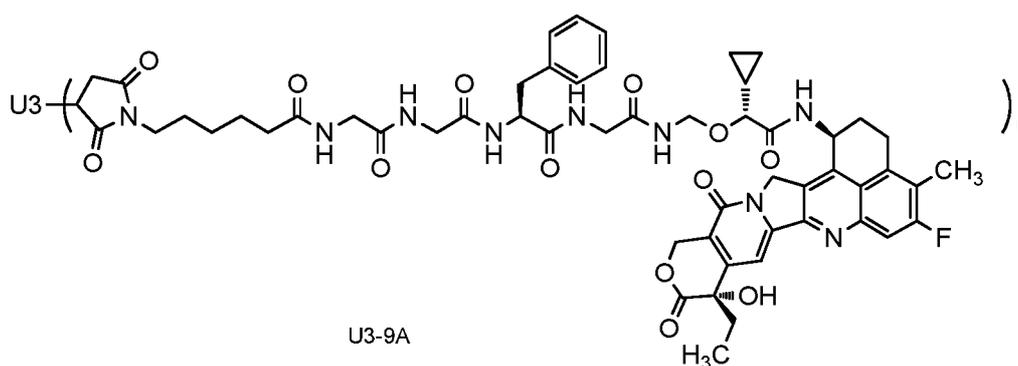
водный буфер PBS при pH 6,5, содержащий 0,001 М EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота)) с получением иллюстративного продукта конъюгата HER3-29-9A, ADC-2, в буфере PBS (4,24 мг/мл, 27,2 мл), который затем хранили при 4 °С. Среднее значение, рассчитанное с помощью RP-HPLC: DAR = 2,91.

#### Пример 3-3: ADC-3

К водному буферу PBS антитела HER3-29 (0,05 М pH 6,5 водный буфер PBS; 10,0 мг/мл, 3,1 мл, 209 нмоль) добавляли при 37 °С полученный водный раствор трис(2-карбок시에тил)фосфина (ТСЕР) (10 мМ, 111 мкл, 1,111 мкмоль). Смесь подвергали реакции на водяной бане с шейкером при 37 °С в течение 3 ч, а затем реакцию прекращали. Реакционную смесь охлаждали до 25 °С на водяной бане.

Соединение 9A (3,37 мг, 3,137 мкмоль) растворяли в 120 мкл DMSO и полученный раствор добавляли к вышеуказанной реакционной смеси. Смесь подвергали реакции на водяной бане при 25 °С в течение 3 ч, а затем реакцию останавливали. Реакционную смесь обессоливали и очищали через колонку с гелем Sephadex G25 (фаза элюирования: 0,05 М водный буфер PBS при pH 6,5, содержащий 0,001 М EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота)) с получением иллюстративного продукта конъюгата HER3-29-9A, ADC-3, в буфере PBS (1,48 мг/мл, 12,8 мл), который затем хранили при 4 °С. Среднее значение, рассчитанное с помощью RP-HPLC: DAR = 7,27.

#### Пример 3-4: ADC-4

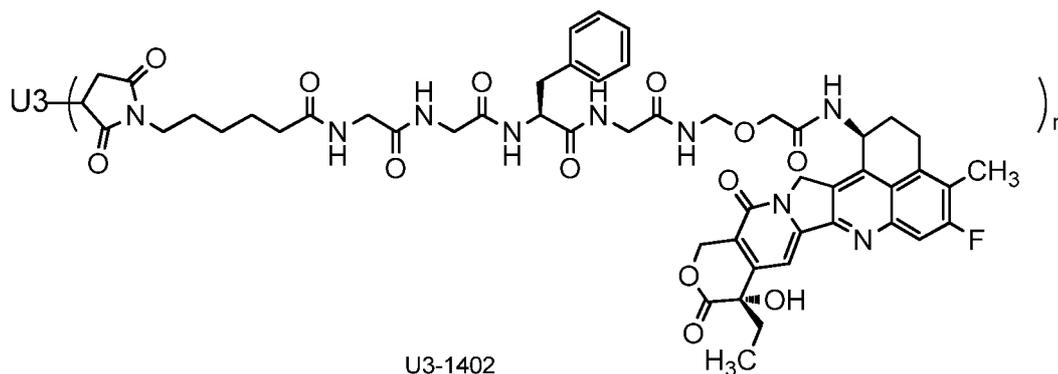


К водному буферу PBS антитела U3 (0,05 М pH 6,5 водный буфер PBS; 10,0 мг/мл, 3,1 мл, 209 нмоль) добавляли при 37 °С полученный водный раствор трис(2-карбоксиетил)фосфина (ТСЕР) (10 мМ, 111 мкл, 1,111 мкмоль). Смесь подвергали реакции на водяной бане с шейкером при 37 °С в течение 3 ч, а затем реакцию прекращали. Реакционную смесь охлаждали до 25 °С на водяной бане.

Соединение 9A (3,37 мг, 3,137 мкмоль) растворяли в 120 мкл DMSO и полученный раствор добавляли к вышеуказанной реакционной смеси. Смесь подвергали реакции на

водяной бане при 25 °C в течение 3 ч, а затем реакцию останавливали. Реакционную смесь обессоливали и очищали через колонку с гелем Sephadex G25 (фаза элюирования: 0,05 М водный буфер PBS с pH 6,5, содержащий 0,001 М EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота)) с получением иллюстративного продукта конъюгата U3-9A, ADC-4, в буфере PBS (1,48 мг/мл, 12,8 мл), который затем хранили при 4 °C. Среднее значение, рассчитанное с помощью RP-HPLC: DAR = 6,76.

#### Пример 3-5: ADC-5



Ссылаясь на Пример 12 на странице 156 описания WO2015155998A1, U3-1402 получали в качестве положительного контроля. К водному буферу PBS антитела U3 (0,05 М pH 6,5 водный буфер PBS; 10,0 мг/мл, 3,1 мл, 236 нмоль) добавляли при 37 °C полученный водный раствор трис(2-карбокsetил)фосфина (ТСЕР) (10 мМ, 130 мкл). Смесь подвергали реакции на водяной бане с шейкером при 37 °C в течение 3 ч, а затем реакцию прекращали. Реакционную смесь охлаждали до 25 °C на водяной бане.

Соединение 1402 (3,67 мг, 3,54 мкмоль) растворяли в 180 мкл DMSO и полученный раствор добавляли к вышеуказанной реакционной смеси. Смесь подвергали реакции на водяной бане при 25 °C в течение 3 ч, а затем реакцию останавливали. Реакционную смесь обессоливали и очищали через колонку с гелем Sephadex G25 (фаза элюирования: 0,05 М водный буфер PBS при pH 6,5, содержащий 0,001 М EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота)) с получением иллюстративного продукта конъюгата U3-1402, ADC-5, в буфере PBS (1,53 мг/мл, 15,4 мл), который затем хранили при 4 °C. Среднее значение, рассчитанное с помощью RP-HPLC: DAR = 6,97.

#### Тестовые примеры

##### Тестовый пример 1: Связывание антител со свободным белком HER3

Белок HER3 разбавляли до 1 мкг/мл с помощью буфера PBS с pH 7,4 (Shanghai BasalMedia Technologies Co., LTD., B320) и добавляли в 96-луночный микропланшет при 100 мкл/лунку. Планшет инкубировали при 4 °C в течение ночи. После того, как жидкость была отброшена, 300 мкл 5% обезжиренного молока (BD, 232100), разбавленного PBS,

добавляли в каждую лунку для блокирования и планшет инкубировали при 37 °С в течение 2 ч. После завершения блокирования блокирующий раствор отбрасывали; после того, как планшет промывали 3 раза буфером PBST (pH 7,4 PBS, содержащим 0,1% tween-20), в каждую лунку добавляли 100 мкл разбавленного градиентом раствора антитела и планшет инкубировали при 37 °С в течение 1 часа. После завершения инкубации планшет 3 раза промывали буфером PBST (PBS с Tween 20) и в каждую лунку добавляли 100 мкл 1:8000 разбавленного мышинового против человеческого IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch, 209-035-088). Планшет инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. После того, как планшет 3 раза промывали буфером PBST, в каждую лунку добавляли 100 мкл хромогенного субстрата ТМВ (KPL, 5120-0077), и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 10-15 мин. Реакцию прекращали путем добавления 50 мкл 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> каждую лунку. Показания оптической плотности при 450 нм снимали на микропланшетном ридере, а кривые связывания антител с антигеном были снабжены программным обеспечением, как показано на фиг. 1. Значения EC<sub>50</sub> были рассчитаны, и результаты показаны в таблице 4.

Таблица 4. Связывающая активность антител к белку HER3

Антитело	HER3-29	U3
EC <sub>50</sub> (нМ)	0,14	0,56

Вывод: антитело HER3-29 по настоящему изобретению обладает лучшей связывающей активностью с белком HER3, чем контрольное антитело U3.

#### Тестовый пример 2: Связывание антител с клетками, экспрессирующими HER3

Клетки MCF7 (ATCC, HTB-22) суспендировали в буфере FACS (2% фетальная бычья сыворотка (Gibco, 10099141), pH 7,4 PBS (Sigma, P4417-100TAB)) с получением суспензии 1 × 10<sup>6</sup> клеток/мл, которую затем добавляли в 96-луночный круглодонный планшет по 100 мкл/лунку. После центрифугирования и удаления супернатанта, тестируемое антитело, которое разбавляли буфером FACS до различных концентраций, добавляли при 50 мкл/лунку. Планшет инкубировали в темноте в холодильнике при 4 °С в течение 1 часа. Планшет трижды промывали буфером FACS центрифугированием при 300 g и затем добавляли антитела козы к человеческому IgG Alexa Fluor 488 (H+L) (Invitrogen, A-11013) в рабочей концентрации. Планшет инкубировали в темноте в холодильнике при 4 °С в течение 40 мин. Планшет трижды промывали буфером FACS путем центрифугирования при 300 g и тестировали на проточном цитометре BD FACS CantoII на геометрическую среднюю интенсивность флуоресценции. Результаты показаны на фиг. 2.

Значения EC<sub>50</sub> приведены в таблице 5.

Таблица 5. Связывающая активность антител на уровне клеток

Антитело	HER3-29	U3
EC <sub>50</sub> (нМ)	0,057	0,249

Вывод: антитело HER3-29 по настоящему изобретению обладает лучшей связывающей активностью с клетками, экспрессирующими белок HER3, чем контрольное антитело U3.

### Тестовый пример 3: Анализ эндоцитоза антител с помощью DT3C

Цель этого анализа заключается в том, что активированный дифтерийный токсин (DT) убивает клетки после того, как белок DT3C попадает в клетки, косвенно отражая эндоцитоз антитела к HER3. Эндоцитарную активность антитела *in vitro* оценивали в соответствии с IC<sub>50</sub> и I<sub>max</sub> (максимум ингибирования).

DT3C представляет собой рекомбинантно экспрессируемый слитый белок, образованный слиянием фрагмента А (только часть токсина) дифтерийного токсина с фрагментом 3С (связывающая часть IgG) стрептококка группы G. Белок обладает высоким сродством к структуре Fc антитела и попадает в клетки с антителом при эндоцитозе антитела. Под действием внутриклеточного фурина выделяется токсичный DT (дифтерийный токсин). DT может ингибировать активность рибозилирования EF2-ADP, блокировать процесс трансляции белка и, наконец, вызывать гибель клеток. DT3C, который не проникает в клетку, не обладает активностью уничтожения клеток. Эндоцитарную активность антитела оценивали в соответствии с уничтожением клеток.

2×10<sup>4</sup> клеток/мл суспензии клеток CHO-K1, рекомбинантно экспрессирующих HER3, получали со свежей клеточной средой, содержащей 20% FBS с низким содержанием IgG, и добавляли в планшет для культивирования клеток при 50 мкл/лунку. Планшет инкубировали при 37 °C с 5% диоксидом углерода в течение 16 ч.

DT3C в 4-кратной концентрации подготавливали в бессывороточной среде и фильтровали через фильтр 0,22 мкм для получения стерильного раствора. Антитело в 4-кратной концентрации получали в бессывороточной среде и 80 мкл DT3C (400 нМ) и 80 мкл антитела (66 нМ) смешивали в объеме 1:1 и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. К 50 мкл клеток добавляли 50 мкл разбавленного антитела. Клетки инкубировали в инкубаторе в течение трех дней. В каждую лунку добавляли 50 мкл CTG (реагент CellTiter-Glo™, G7573). Планшет инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 10 мин. Показания хемилюминесценции были взяты на Victor3.

Результаты представлены на фиг. 3 и в таблице 6.

Таблица 6. Эндоцитарная активность антител

Антитело	HER3-29	U3
I <sub>max</sub>	48%	19%
IC <sub>50</sub> (нМ)	0,51	2,81

Вывод: антитело HER3-29 по настоящему изобретению обладает лучшей клеточной эндоцитарной активностью, чем контрольное антитело U3.

#### Тестовый пример 4: Анализ эндоцитоза антител pHrodo

Целью данного анализа является отражение эндоцитоза антитела к HER3 в соответствии с изменениями сигнала флуоресценции после интернализации красителя. Эндоцитарную активность антитела *in vitro* оценивали в соответствии с интенсивностью флуоресцентного сигнала.

Фрагменты Fab в сочетании с pH-чувствительным красителем pHrodo iFL могут связываться непосредственно с Fc-областью антитела HER3, не влияя на распознавание антигена антитела. Краситель pHrodo iFL практически не флуоресцирует при нейтральном pH. Когда антитело к HER3 эндоцитируется, краситель одновременно интернализуется. Сигнал флуоресценции будет постепенно усиливаться по мере снижения pH. Эндоцитарную активность антитела оценивали в соответствии с тем, как усиливался сигнал флуоресценции.

Клетки HER3/CHOK1 культивировали с DMEM (минимальная среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко)/F12+10% FBS+10 мкг/мл пуромицина. В первый день эксперимента  $2 \times 10^5$  клеток/мл клеточной суспензии подготавливали со свежей клеточной средой и добавляли в 96-луночный планшет для культивирования клеток при 100 мкл/лунку. Планшет культивировали при 37 °C в 5 % диоксиде углерода в течение 24 ч.

50 мкл клеточного бульона высасывали из планшета и добавляли 50 мкл смеси антитела и красителя pHrodo в каждую лунку. Для каждого образца антитела были установлены две лунки с повторными пробами. Были установлены группа добавления только красителя и контрольная группа изотипа IgG1.

После 24 часов культивирования в инкубаторе среду отсасывали, и клетки в каждой лунке расщепляли 50 мкл панкреатина в течение 2 мин. Расщепление останавливали с помощью 50 мкл свежей среды. Клетки из лунок-репликаторов того же образца переносили в лунку планшета с круглым дном с помощью многоканальной пипетки.

Клетки центрифугировали при 1500 об/мин в течение 2 мин, и среду отбрасывали. Клетки промывали один раз буфером FACS (PBS + 2,5% FBS (фетальная бычья сыворотка)) и центрифугировали при 1500 об/мин в течение 2 мин. Клетки ресуспендировали путем добавления 200 мкл буфера FACS (PBS + 2,5% FBS), и сигнал FITC обнаруживали с помощью проточной цитометрии. Данные были проанализированы с использованием FlowJo 7.6. Результаты представлены на фиг. 4 и в таблице 7.

Таблица 7. Эндоцитарная активность антител

Антитело	HER3-29	U3
Сигнал FITC	373	267

Вывод: антитело HER3-29 по настоящему изобретению обладает лучшей клеточной эндоцитарной активностью, чем контрольное антитело U3.

#### Тестовый пример 5: Анализ клеточной активности молекул ADC

Целью этого анализа является определение эффектов уничтожения образцов ADC на клетки и оценка активности Her3-ADC *in vitro* в соответствии с  $IC_{50}$  и  $I_{max}$ .

Клетки MCF7 (клетки рака молочной железы человека), клетки SW620 (клетки рака толстой кишки человека, Nanjing Sbioer, CBP60036) и клетки WiDr (клетки рака толстой кишки человека) расщепляли панкреатином, нейтрализовали свежей средой, центрифугировали при 1000 об/мин, затем ресуспендировали в среде и подсчитывали. Затем клеточные суспензии доводили до плотности 500 клеток/лунку и добавляли к 96-луночному планшету для культивирования клеток. В лунки в 11-й вертикального ряда не добавляли клетку, а только 135 мкл среды. Клетки культивировали при 37 °C с 5 % углекислого газа в течение 16 ч.

Образец ADC разбавляли PBS до 15 мкМ (10-кратная концентрация). Эта концентрация была взята в качестве начальной концентрации, и образец был в 5 раз разбавлен PBS в общей сложности до 8 концентраций. В каждую лунку добавляли 15 мкл раствора с 10-кратной концентрацией. Клетки культивировали при 37 °C с 5 % углекислого газа в течение 6 дней.

В каждую лунку добавляли 70 мкл CTG. Планшет инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 10 мин. Белая мембрана была прикреплена к нижней части планшета для культивирования клеток, и показания хемилюминесценции были взяты на Victor3. Данные этого анализа были обработаны с помощью программного обеспечения для обработки данных GraphPad Prism5.0. Результаты приведены в таблице 8.

Таблица 8. Анализ уничтожения HER3-29-9A *in vitro* с различными значениями DAR

Образец ADC	Значение DAR	Тестирование ячейки					
		MCF7		SW620		WiDr	
		IC <sub>50</sub> (нМ)	I <sub>max</sub> %	IC <sub>50</sub> (нМ)	I <sub>max</sub> %	IC <sub>50</sub> (нМ)	I <sub>max</sub> %
ADC-5	6,97	95,52	85,53	110,5	99,04	420,6	97,98
ADC-4	6,76	68,2	83,66	90,2	100,06	327,5	100,89
ADC-3	7,27	22,35	86,72	47,27	100,06	143,5	100,54
ADC-1	4,19	71,51	91,41	90,47	100,35	673,4	94,1
ADC-2	2,91	119,6	88,91	130,4	99,85	2278	87,9

Заключение: образцы ADC ADC-1, ADC-2 и ADC-3 по настоящему изобретению обладают лучшей уничтожающей активностью на клетках, чем положительные контрольные образцы ADC-4 и ADC-5.

#### Биологическая оценка активности *in vivo*

Тестовый пример 6: Оценка эффективности модели HER3 с высокой экспрессией CD $\square$  *in vivo*

Клетки SW620 ( $5 \times 10^6$  клеток/мышь) инокулировали подкожно в правый бок бестимусных мышей Balb/c, и через 7 дней мышей разделяли в общей сложности на 9 групп по 8. Средний объем в группе составил 134,75 мм<sup>3</sup>. ADC вводили внутривентриально один раз каждые 5 дней и вводили в общей сложности 3 раза. Инъекции вводили в дозе 0,1 мл/10 г массы тела/мышь. Объемы опухоли и массу тела измеряли два раза в неделю, а результаты записывали. Данные записывали с помощью статистического программного обеспечения Excel: средние значения рассчитывали как avg; значения SD (среднеквадратическое отклонение) рассчитывались как STDEV (квадратный корень дисперсии выборки); значения SEM (стандартная ошибка среднего значения) рассчитывали как STDEV/SQRT (SQRT - вычисление квадратного корня.) (количество животных в группе); программное обеспечение GraphPad Prism использовалось для построения графика, а статистический анализ данных выполнялся с использованием двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) или однофакторного дисперсионного анализа.

Объем опухоли (V) рассчитывали как:  $V = 1/2 \times L_{\text{длина}} \times L_{\text{ширина}}^2$

Относительная скорость пролиферации опухоли T/C (%) =  $(T - T_0) / (C - C_0) \times 100\%$ , где T и C представляют собой объем опухоли животных в конце эксперимента в группе

лечения и контрольной группе, соответственно; T0 и C0 представляют собой объем опухоли животных в начале эксперимента в группе лечения и контрольной группе, соответственно.

Степень ингибирования опухоли TGI (%) = 1-T/C (%). Результаты приведены в таблице 9.

Таблица 9. Эффективность ADC на ксенотрансплантатных опухолях SW620 у опухолесодержащих голых мышей

Образец ADC	Значение DAR	Степень ингибирования опухоли TGI (%)		
		6 мг/кг массы тела	3 мг/кг массы тела	1,5 мг/кг массы тела
ADC-5	6,97	98,8	56,6	24,1
ADC-1	4,19	-	72,5	22,4
ADC-2	2,91	86,3	65,6	6,3

Заключение: ADC-1 и ADC-2 по настоящему изобретению имеют лучшую эффективность в отношении ксенотрансплантатных опухолей SW620 у опухоленесущих мышей, чем положительный контрольный ADC-5.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело к HER3 (рецептор эпидермального фактора роста 3), имеющее одну или более из следующих характеристик:

а. антитело к HER3 связывается с белком HER3 с кажущейся аффинностью  $EC_{50}$  менее 0,5 нМ, как определено с помощью ELISA (иммуноферментный анализ);

б. антитело к HER3 связывается с белком HER3, экспрессируемым клетками MCF7 (Онкологический фонд Мичигана 7, клетки инвазивной аденокарциномы протоков молочной железы человека), с кажущейся аффинностью  $EC_{50}$  менее 0,2 нМ, как определено с помощью FACS (сортировка клеток с активированной флуоресценцией);

с. антитело к HER3 может подвергаться эндоцитозу клетками, экспрессирующими человеческий HER3; предпочтительно, антитело к HER3 имеет  $IC_{50}$  менее 2 нМ, как определено с помощью анализа эндоцитоза антитела с помощью DT3C (белок, содержащий каталитический домен дифтерийного токсина (DT) и три антителосвязывающие области белка G);

д. антитело к HER3 может подвергаться эндоцитозу клетками, экспрессирующими человеческий HER3; предпочтительно, антитело к HER3 имеет сигнал FITC (изотиоцианат флуоресцеина) более 300, как определено с помощью анализа эндоцитоза антитела с помощью pHrodo.

2. Выделенное антитело к HER3 по п. 1, содержащее: 1) HCDR1 (определяющая комплементарность область 1 тяжелой цепи), HCDR2 и HCDR3, содержащиеся в вариательной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 7; и 2) LCDR1 (определяющая комплементарность область 1 легкой цепи), LCDR2 и LCDR3, содержащиеся в вариательной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8;

предпочтительно, антитело к HER3 содержит вариательную область тяжелой цепи и вариательную область легкой цепи, где:

а. вариательная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, соответственно, и вариательная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14, соответственно;

где области CDR определены в соответствии со схемой нумерации Чотиа; или

б. вариательная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17, соответственно, и вариательная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, соответственно;

где области CDR определены в соответствии со схемой нумерации IMGT; или

с. переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23, соответственно, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно;

где области CDR определены в соответствии со схемой нумерации Кабата.

3. Выделенное антитело к HER3, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

а. переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, соответственно, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14, соответственно;

причем области CDR, описанные выше, определены в соответствии со схемой нумерации Чотиа; или

б. переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17, соответственно, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, соответственно;

причем области CDR, описанные выше, определены в соответствии со схемой нумерации IMGT; или

с. переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23, соответственно, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 и SEQ ID NO: 26, соответственно;

причем области CDR, описанные выше, определены в соответствии со схемой нумерации Кабата.

4. Выделенное антитело к HER3 по любому из пп. 1-3, где антитело к HER3 представляет собой человеческое антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

5. Выделенное антитело к HER3 по любому из пп. 1-4, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 7, и/или переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 8;

предпочтительно, антитело к HER3 содержит переменную область тяжелой цепи

и вариабельную область легкой цепи, где:

вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, и вариабельная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8.

6. Выделенное антитело к HER3 по любому из пп. 1-5, содержащее:

тяжелую цепь, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 27, и/или легкую цепь, по меньшей мере на 85% идентичную последовательности SEQ ID NO: 28;

предпочтительно антитело к HER3, содержащее:

тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 27, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 28.

7. Выделенное антитело к HER3 по любому из пп. 1-6, имеющее одну или более из следующих характеристик:

a. антитело к HER3 связывается с белком HER3 с кажущейся аффинностью  $EC_{50}$  менее 0,5 нМ, как определено с помощью ELISA;

b. антитело к HER3 связывается с белком HER3, экспрессируемым клетками MCF7, с кажущейся аффинностью  $EC_{50}$  менее 0,2 нМ, как определено с помощью FACS;

c. антитело к HER3 может подвергаться эндоцитозу клетками, экспрессирующими человеческий HER3; предпочтительно, антитело к HER3 имеет  $IC_{50}$  менее 2 нМ, как определено с помощью анализа эндоцитоза антитела с помощью DT3C;

d. антитело к HER3 может подвергаться эндоцитозу клетками, экспрессирующими человеческий HER3; предпочтительно, антитело к HER3 имеет сигнал FITC более 300, как определено с помощью анализа эндоцитоза антитела с помощью pHrodo.

8. Выделенное антитело к HER3, конкурирующее за связывание с человеческим HER3 с антителом к HER3 по любому из пп. 1-7.

9. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая выделенное антитело к HER3 по любому из пп. 1-8.

10. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п. 9.

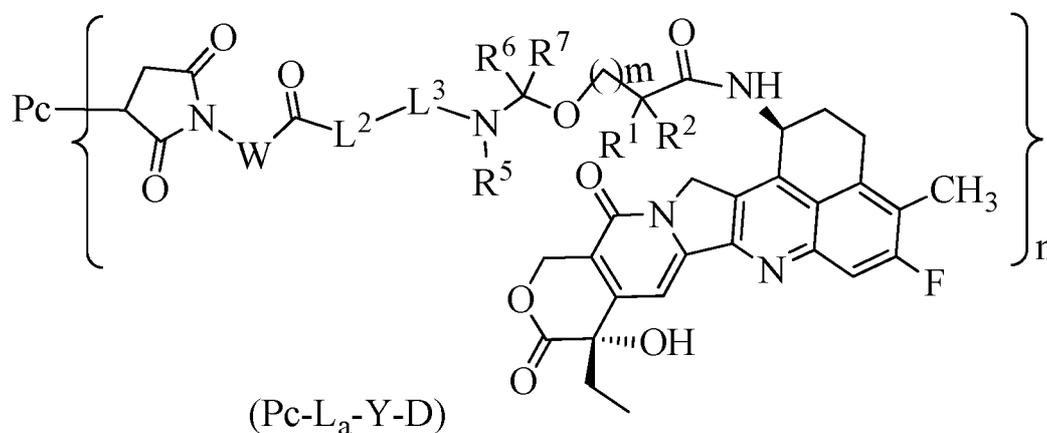
11. Иммуноконъюгат, содержащий выделенное антитело к HER3 по любому из пп. 1-8 и эффекторную молекулу, где эффекторная молекула связана с антителом к HER3;

предпочтительно эффекторная молекула выбрана из группы, состоящей из противоопухолевого агента, иммуномодулятора, модификатора биологического ответа, лектина, цитотоксического лекарственного средства, хромофора, флуорофора, хемилюминесцентного соединения, фермента, иона металла и любой их комбинации.

12. Способ иммунодетекции или определения HER3, включающий стадию

приведения выделенного антитела к HER3 по любому из пп. 1-8 в контакт с субъектом или образцом, полученным от субъекта.

13. Конъюгат антитела и лекарственного средства общей формулы (Pc-L<sub>a</sub>-Y-D) или его фармацевтически приемлемая соль:



где

Pc представляет собой выделенное антитело к HER3 по любому из пп. 1-8;

m представляет собой целое число от 0 до 4;

n представляет собой десятичное или целое число от 1 до 10;

R<sup>1</sup> выбран из группы, состоящей из галогена, галогеналкила, дейтерированного алкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксиалкила, гетероциклила, арила и гетероарила; R<sup>2</sup> выбран из группы, состоящей из водорода, галогена, галогеналкила, дейтерированного алкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксиалкила, гетероциклила, арила и гетероарила; или R<sup>1</sup> и R<sup>2</sup> вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклоалкил или гетероциклил;

W выбран из группы, состоящей из C<sub>1-8</sub> алкила, C<sub>1-8</sub> алкил-C<sub>3-6</sub> циклоалкила и линейного гетероалкила с 1-8 атомами цепи, причем указанный линейный гетероалкил с 1-8 атомами цепи содержит от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из N, O и S, где каждый из C<sub>1-8</sub> алкила, C<sub>1-8</sub> алкил-C<sub>3-6</sub> циклоалкила и линейного гетероалкила с 1-8 атомами цепи независимо необязательно дополнительно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидрокси, циано, амина, алкила, хлоралкила, дейтерированного алкила, алкокси и циклоалкила;

L<sup>2</sup> выбран из группы, состоящей из -NR<sup>4</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sup>p</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-, -NR<sup>4</sup>(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sup>p</sup>CH<sub>2</sub>C(O)-, -S(CH<sub>2</sub>)<sup>p</sup>C(O)- и химической связи, где p<sup>1</sup> представляет собой целое число от 1 до 20;

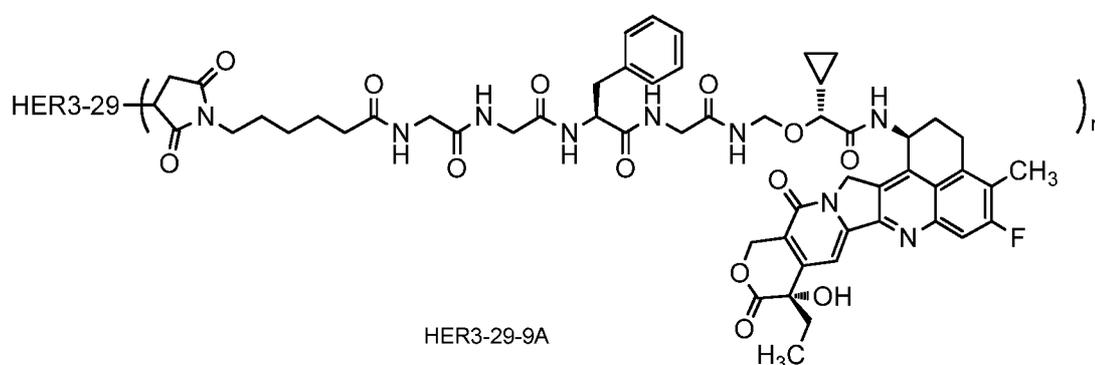
L<sup>3</sup> представляет собой пептидный остаток, состоящий из 2-7 аминокислотных остатков, где аминокислотные остатки выбраны из группы, состоящей из аминокислотных остатков, образованных из аминокислот из фенилаланина, глицина, валина, лизина,

цитруллина, серина, глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты, и необязательно дополнительно замещены одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксигруппы, циано, аминогруппы, алкила, хлоралкила, дейтерированного алкила, алкокси и циклоалкила;

$R^5$  выбран из группы, состоящей из водорода, алкила, галогеналкила, дейтерированного алкила и гидроксилалкила;

$R^6$  и  $R^7$  являются одинаковыми или различными, и каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, галогена, алкила, галогеналкила, дейтерированного алкила и гидроксилалкила.

14. Конъюгат антитела и лекарственного средства общей формулы (Pc-L<sub>a</sub>-Y-D) или его фармацевтически приемлемая соль по п. 13, где конъюгат антитела и лекарственного средства представляет собой:

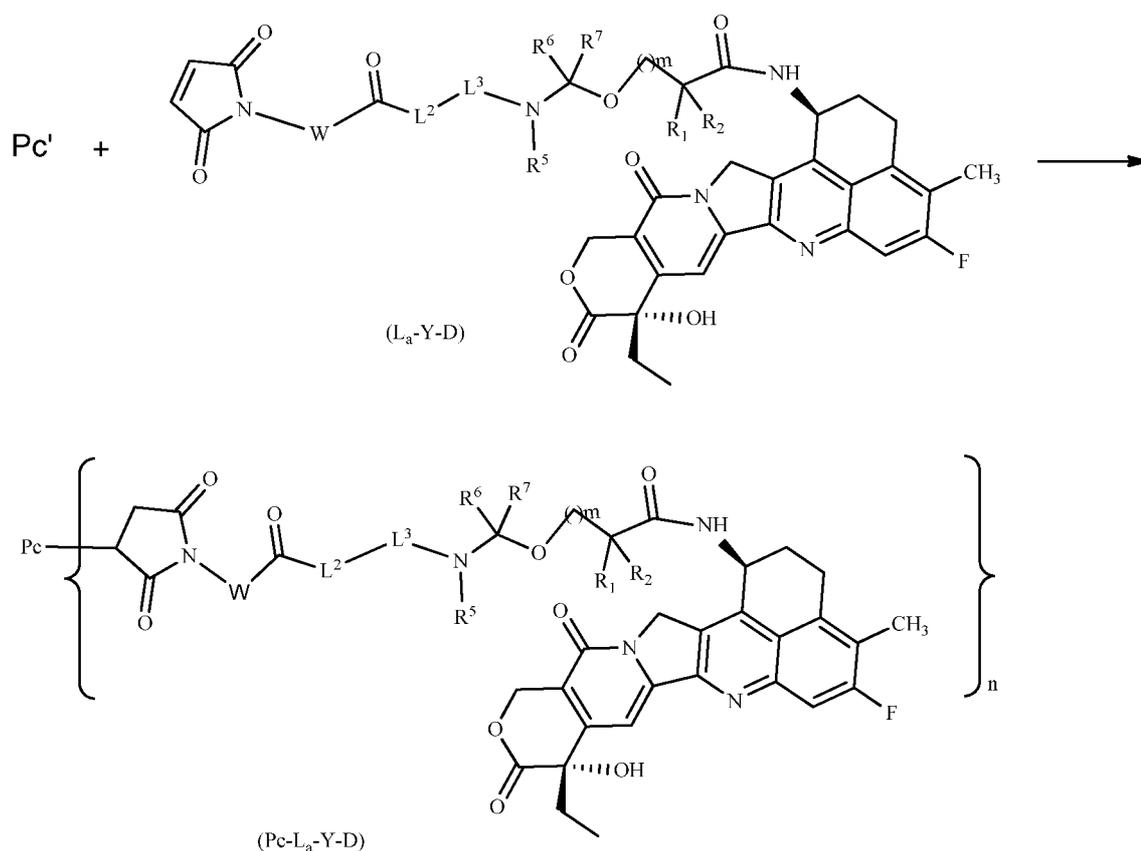


где:

n представляет собой десятичное или целое число от 1 до 8; предпочтительно, n представляет собой десятичное или целое число от 3 до 8;

HER3-29 представляет собой антитело к HER3, содержащее тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 27, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 28.

15. Способ получения конъюгата антитела и лекарственного средства общей формулы (Pc-L<sub>a</sub>-Y-D) или его фармацевтически приемлемой соли по п. 13, включающий следующую стадию:



проведения реакции сочетания Pc' с соединением общей формулы (L<sub>a</sub>-Y-D) с получением соединения общей формулы (Pc-L<sub>a</sub>-Y-D);

где:

Pc' получают путем восстановления Pc; Pc, n, m, W, L<sup>2</sup>, L<sup>3</sup>, R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup> и R<sup>7</sup> являются такими, как определено в п. 13.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное антитело к HER3 по любому из пп. 1-8, или молекулу нуклеиновой кислоты по п. 9, или конъюгат антитела и лекарственного средства или его фармацевтически приемлемую соль по п. 13 или 14 и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов, разбавителей или носителей.

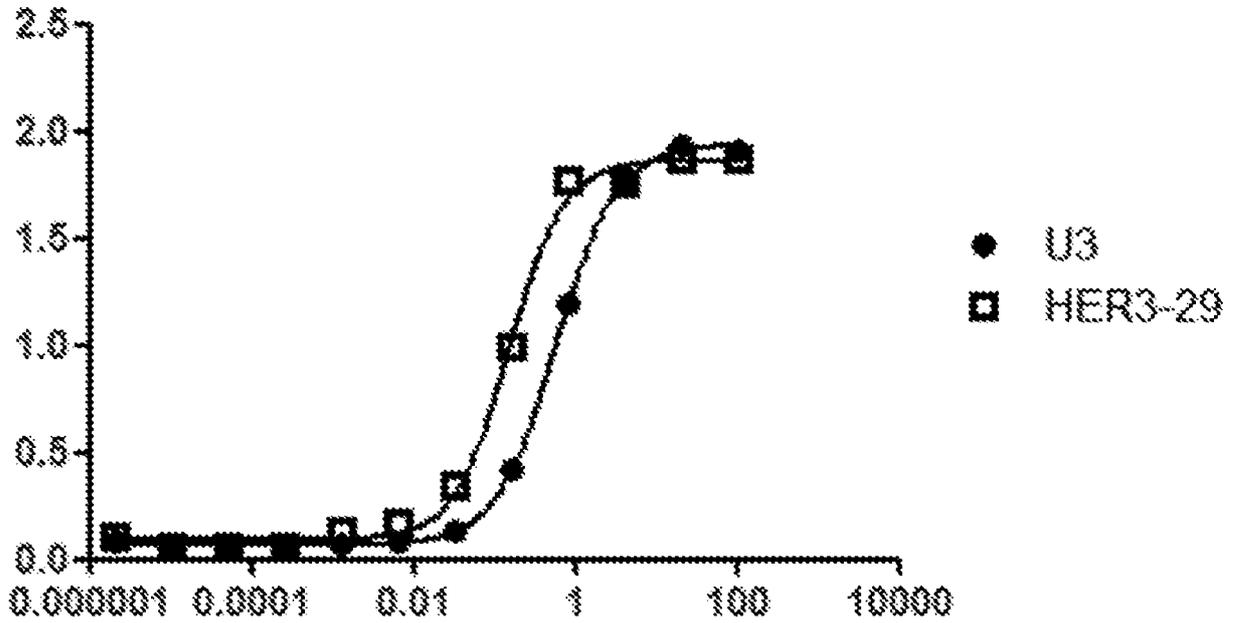
17. Применение выделенного антитела к HER3 по любому из пп. 1-8, или молекулы нуклеиновой кислоты по п. 9, или конъюгата антитела и лекарственного средства или его фармацевтически приемлемой соли по п. 13 или 14, или фармацевтической композиции по п. 16 для получения лекарственного препарата для лечения HER3-опосредованного заболевания или расстройства.

18. Применение выделенного антитела к HER3 по любому из пп. 1-8, или молекулы нуклеиновой кислоты по п. 9, или конъюгата антитела и лекарственного средства или его фармацевтически приемлемой соли по п. 13 или 14, или фармацевтической композиции по п. 16 для получения лекарственного препарата для лечения и/или предотвращения опухоли, где

предпочтительно опухоль выбрана из группы, состоящей из рака молочной железы, немелкоклеточного рака легкого, рака желудка, рака яичников, рака предстательной железы, рака мочевого пузыря, колоректального рака, плоскоклеточной карциномы головы и шеи и меланомы.

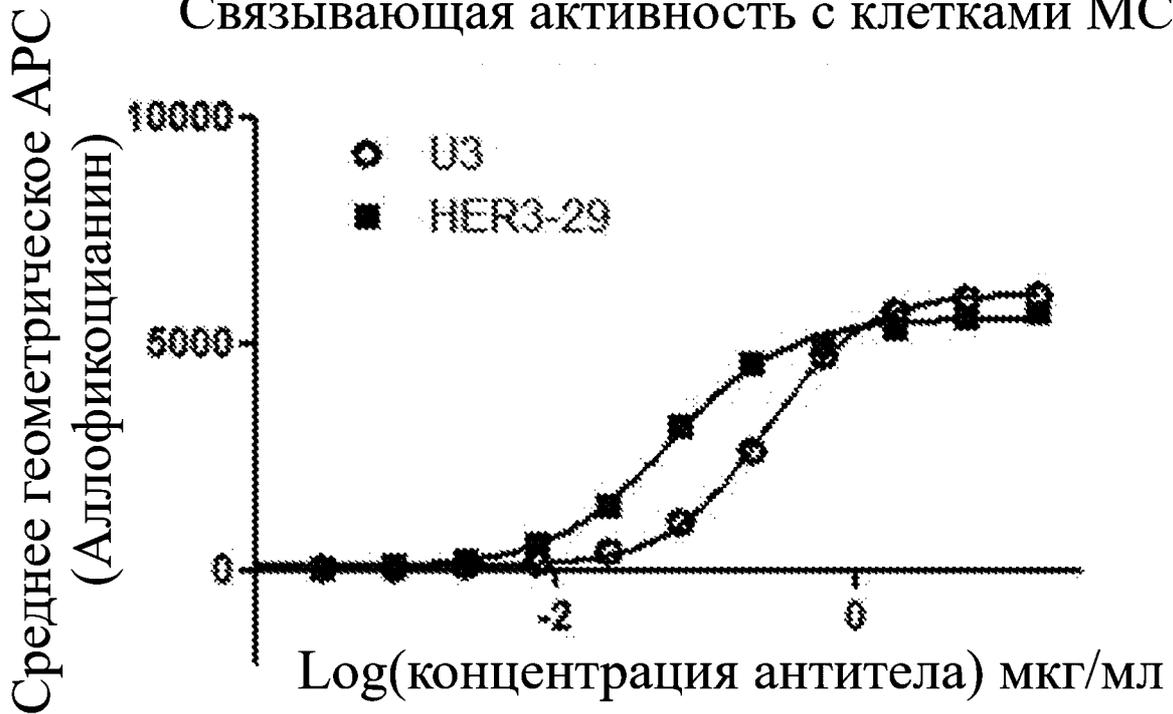
19. Набор, содержащий выделенное антитело к HER3 по любому из пп. 1-8, или молекулу нуклеиновой кислоты по п. 9, или конъюгат антитела и лекарственного средства или его фармацевтически приемлемую соль по п. 13 или 14, или фармацевтическую композицию по п. 16.

OD450  
(Оптическая плотность 450 нм)



Фиг. 1

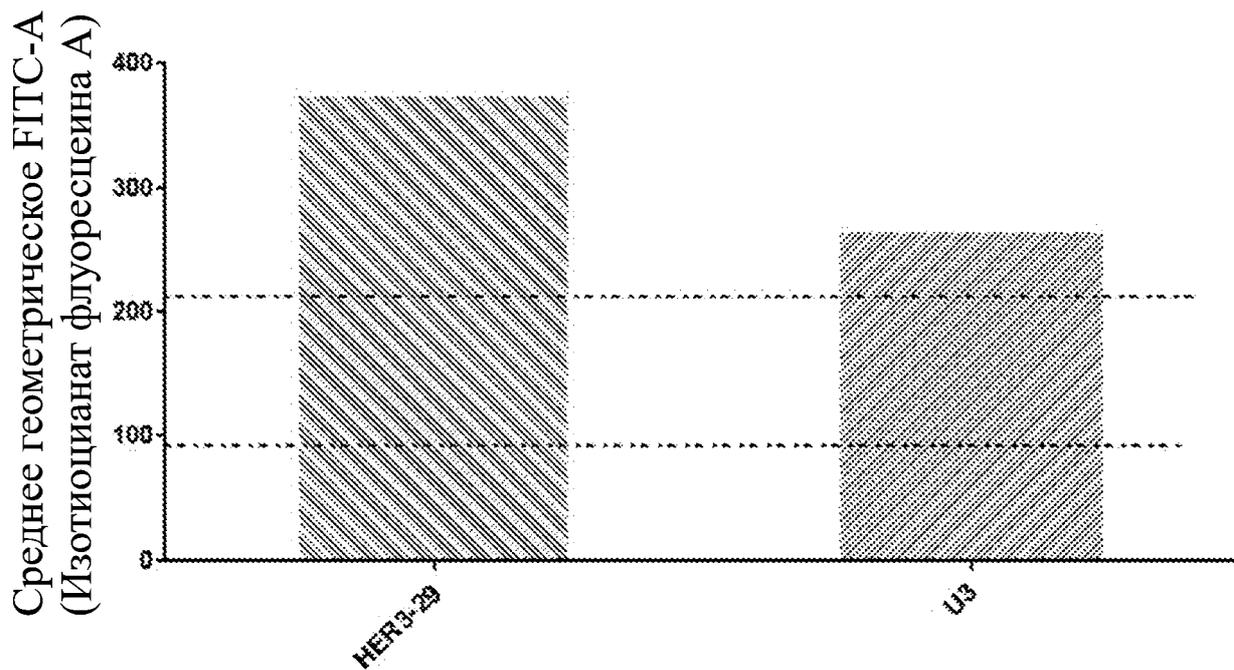
Связывающая активность с клетками MCF7



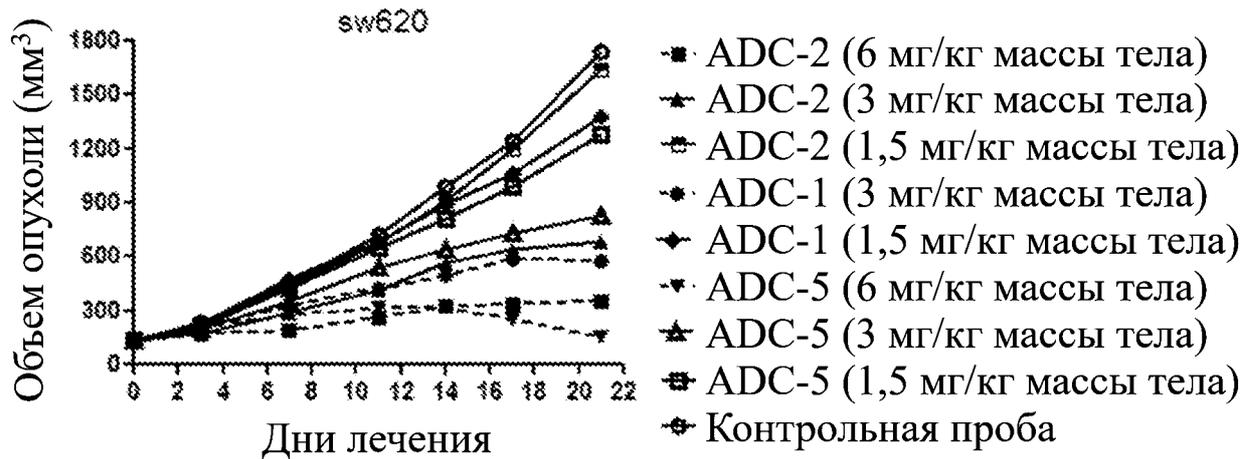
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5