

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390160 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.26(22) Дата подачи заявки
2021.08.13(51) Int. Cl. A61K 47/68 (2017.01)
A61K 47/54 (2017.01)
C07K 16/32 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

(31) 202010814877.X

(32) 2020.08.13

(33) CN

(86) PCT/CN2021/112462

(87) WO 2022/033578 2022.02.17

(71) Заявитель:

ЧИА ТАЙ ТЯНЬЦИН
ФАРМАСЬЮТИКАЛ ГРУП КО.,
ЛТД.; НАНЬЦИН ШУНЬСИНЬ
ФАРМАСЬЮТИКАЛС КО.,
ЛТД, ОФ ЧИАТАЙ ТЯНЬЦИН
ФАРМАСЬЮТИКАЛ ГРУП (CN)

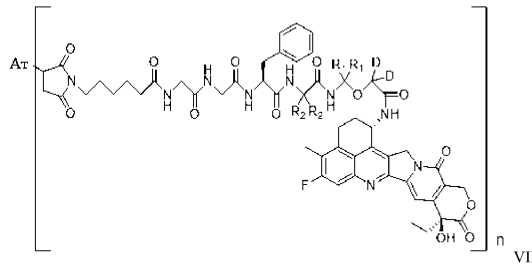
(72) Изобретатель:

Чжан Сицюань, Чэнь Тяньси, Фэн
Вэйвэй, Чжан Вин, Тан Сяоци, Сюй
Тунцзе, Ван Сяоцинъ, Шэн Хуацэ,
Чжан Чжэппин, Ван Хуа, Гао Юн (CN)

(74) Представитель:

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

(57) Предложен конъюгат антитело-лекарственное средство, в частности содержащий компонент в виде терапевтического антитела, промежуточный линкерный компонент и цитотоксический лекарственный компонент, которые являются связанными. Компонент в виде терапевтического антитела представляет собой антитело к мишени HER2. Цитотоксический лекарственный компонент представляет собой ингибитор топоизомеразы I камптотецин. Цитотоксический лекарственный компонент или линкер-цитотоксический лекарственный компонент модифицируют посредством замены на дейтерий. Конъюгат антитело-лекарственное средство может быть применен для профилактики или лечения онкологических заболеваний.



A1

202390160

202390160

A1

КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО - ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

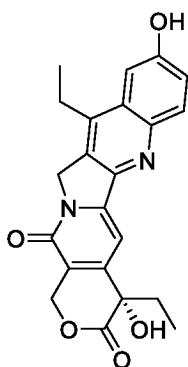
Настоящая заявка относится к конъюгату антитело - лекарственное средство, содержащему компонент в виде терапевтического антитела, промежуточный линкерный компонент и цитотоксический лекарственный компонент, которые связаны. Настоящая заявка также относится к применению конъюгата антитело - лекарственное средство для получения лекарственного препарата для профилактики и лечения злокачественного новообразования.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

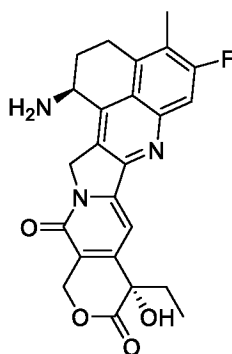
Конъюгаты антитело - лекарственное средство (ADC) представляют собой класс лекарственных средств, которые сочетают в себе высокую специфичность терапевтических антител и высокую активность уничтожения цитотоксических лекарственных средств, где компонент в виде терапевтического антитела связан с цитотоксическим лекарственным компонентом через промежуточный линкерный компонент. В настоящее время в мире продаются по меньшей мере восемь препаратов ADC, среди которых компоненты в виде антител брентуксимаб ведотин, полатузумаб ведотин и энфортумаб ведотин направлены против мишеней CD30, CD79b и нектин-4 соответственно; компоненты в виде антител трастузумаб эмтанзин и трастузумаб дерукстекабан направлены против мишени HER2; компоненты в виде антител гемтузумаб озогамидин и инотузумаб озогамидин направлены против мишеней CD33 и CD22, соответственно; компонент в виде антитела сацитузумаб говитекан направлен против мишени TROP2. Что касается цитотоксических лекарственных компонентов, то в брентуксимабе ведотине, полатузумабе ведотине и энфортумабе ведотине используются молекулы токсина ауристатина, действующие на микротрубочки, в трастузумабе эмтанзине используются молекулы токсина майтанзиноида, действующие на микротрубочки, в гемтузумабе озогамидине и инотузумабе озогамидине используются молекулы токсина калихимицина, действующие на ДНК, а в последних представленных на рынке трастузумабе дерукстекане и сацитузумабе говитекане используются молекулы токсина аналога камптотецина. Для промежуточного линкерного компонента в трастузумабе эмтанзине используется нерасщепляемый линкер, в то время как в остальных семи из вышеперечисленных препаратов ADC используются расщепляемые линкеры.

Аналоги и производные камптотецина (CPT) проявляют противоопухолевую активность за счет связывания с топоизомеразой I, которая проявляет значительную

активность в отношении широкого спектра типов опухолей. Чтобы преодолеть плохую растворимость СРТ в воде, исследователи синтезировали множество производных СРТ, из которых гидрохлорид иринотекана (СРТ-11) является водорастворимым пролекарством, одобренным для лечения метастатического колоректального рака. Однако СРТ-11 должен катализироваться карбоксиэстеразой *in vivo*, прежде чем он сможет превратиться в свою активную форму SN-38 (формула I), это превращение крайне неэффективно, а сам SN38 трудно получить в качестве лекарственного средства из-за его плохой растворимости. Эксатекан (формула II), другое водорастворимое производное СРТ, пытались разработать в качестве противоопухолевого лекарственного средства, однако разработка была прекращена к 2004 году, и эксатекан не нужно активировать ферментами. Кроме того, по сравнению с SN-38, представляющим собой фармакодинамическую онтологию иринотекана, эксатекан оказывает более сильное ингибирующее действие на активность топоизомеразы I.



I



II

Препараты ADC сочетают в себе двойное преимущество высокую активность малых цитотоксических молекул и высокую селективность антител к специфическим опухолевым клеткам, однако по-прежнему существует потребность в разработке высокоэффективных и малотоксичных препаратов ADC, которые могут быть применены для лечения большего числа заболеваний.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном аспекте настоящая заявка относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, имеющему дейтерированную модификацию, или его фармацевтически приемлемой соли, или сольвату, и конкретно относится к дейтерированной модификации линкера или цитотоксического лекарственного компонента.

В одном аспекте в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы At-(L-U)*n* или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где At представляет собой компонент в виде антитела, L представляет собой линкерный компонент, U представляет собой цитотоксический лекарственный компонент,

и n представляет собой целое или десятичное число, выбранное из группы, состоящей из 1-10.

В одном аспекте в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы Ат-(L-U)_n или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где Ат (компонент в виде антитела) может специфически связываться с опухолевым антигеном (включая опухолеспецифический антиген и опухоль-ассоциированный антиген), которые могут быть выбраны из любой мишени для профилактики или лечения опухолей, известной в данной области, например, могут быть выбраны из группы, состоящей из HER2, EGFR, CD20, CD30, CD33, CD47, CD79b, VEGF, VEGFR, MET, RET, PD-1, PD-L1, i т.п.

В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы Ат-(L-U)_n или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где Ат (компонент в виде антитела) может быть модифицируемым, например, может иметь изменения, добавления или удаления одной или более аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы Ат-(L-U)_n или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где компонент в виде антитела Ат представляет собой антитело, способное специфически связываться с HER2.

В некоторых вариантах осуществления компонент в виде антитела Ат из конъюгата антитело-лекарственное средство общей формулы Ат-(L-U)_n или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата, предложенных в данном документе, представляет собой трастузумаб, имеющий последовательность, приведенную в таблице S1 ниже.

Таблица S1 Последовательность трастузумаба

Вариабельная область тяжелой цепи	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR IYPTNGYTRY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG GDGFYAMDYW GQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 40)
CDR1 тяжелой цепи	GFNIKDTYIH (SEQ ID NO: 44)
CDR2 тяжелой цепи	RIYPTNGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 28)

CDR3 тяжелой цепи	WGGDGFYAMDYW (SEQ ID NO: 29)
Вариабель ная область легкой цепи	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFSGSRSGTD FTLTISLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO: 39)
CDR1 легкой цепи	CRASQDVNTAVAW (SEQ ID NO: 30)
CDR2 легкой цепи	SASFLYS (SEQ ID NO: 33)
CDR3 легкой цепи	QQHYTTPPT (SEQ ID NO: 32)

В некоторых вариантах осуществления компонент в виде антитела Ат из конъюгата антитело-лекарственное средство общей формулы Ат-(L-U)_n, представленного в данном документе, или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата, представляет собой пертузумаб, имеющий последовательность, приведенную в таблице S2 ниже.

Таблица S2 Последовательность пертузумаба

Вариабель ная область тяжелой цепи	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFT DYTMDWVRQA PGKGLEWVAD VNPNSGGSIY NQRFKGRFTL SVDRSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARNL GPSFYFDYWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 37)
CDR1 тяжелой цепи	GFTFTDYTMD (SEQ ID NO: 45)
CDR2 тяжелой цепи	DVNPNSGGSIYNQRFKG (SEQ ID NO: 46)
CDR3	NLGPSFYFDY (SEQ ID NO: 47)

тяжелой цепи	
Вариабель ная область легкой цепи	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVS IGVAWYQQKP GKAPKLLIYS ASYRYTGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYIYPYTFGQ GTKVEIK (SEQ ID NO: 38)
CDR1 легкой цепи	KASQDVSIGVA (SEQ ID NO: 48)
CDR2 легкой цепи	SASYRYT (SEQ ID NO: 49)
CDR3 легкой цепи	QYYIYPYT (SEQ ID NO: 50)

В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы Ат-(L-U)_n или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где компонент в виде антитела Ат содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, который является моновалентным и специфически связывается с эпитопом ВКД4 HER2 на HER2-экспрессирующей клетке, где первый антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv, содержащий VH и VL, VH с мутацией K30 и/или VL с мутацией F53. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении 30 в последовательности VH заменяется с К на кислую аминокислоту, например, Е. В некоторых вариантах осуществления аминокислота в положении 53 в последовательности VL заменяется с F на нейтральную или основную аминокислоту, например, Y, А или R. Например, scFv может содержать или представлять собой последовательность, имеющую мутацию K30 и/или мутацию F53 в аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1.

В одном аспекте в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы Ат-(L-U)_n, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где компонент в виде антитела Ат содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, который является моновалентным и специфически связывается с эпитопом ВКД4 HER2 на HER2-экспрессирующей клетке, где первый антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv и содержит CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи,

CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи и CDR3 тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 27, 28 и 29, соответственно, и CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 30, 34 и 32, соответственно; где последовательность, указанная в SEQ ID NO: 27, представляет собой GFNIX₂DTYIH, где X₂ представляет собой K или E; последовательность, указанная в SEQ ID NO: 34, представляет собой SASX₁LYS, где X₁ представляет собой F или Y.

В одном аспекте в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы At-(L-U)_n, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где компонент в виде антитела At содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, который является моновалентным и специфически связывается с эпитопом ВКД4 HER2 на HER2-экспрессирующей клетке, где первый антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv и содержит CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи, CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи и CDR3 тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 43, 28 и 29, соответственно, и CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 30, 31 и 32, соответственно.

В одном аспекте в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы At-(L-U)_n, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где компонент в виде антитела At содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, который является моновалентным и специфически связывается с эпитопом ВКД4 HER2 на HER2-экспрессирующей клетке, где первый антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv и выбран из группы, состоящей из:

i. первого антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, которые включают аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 41 и 42, соответственно; и

ii. первого антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, которые включают аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотными последовательностями, указанными в SEQ ID NO: 41 и 42, соответственно;

где последовательность, указанная в SEQ ID NO: 41, представляет собой:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIX₂DTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPT
NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWG

QGTLVTVSS, где X_2 представляет собой К или Е;

последовательность, указанная в SEQ ID NO: 42, представляет собой:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASX₁LY
SGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK, где X_1
представляет собой F или Y.

В одном аспекте в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы Ат-(L-U)_n или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где компонент в виде антитела Ат содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, который является моновалентным и специфически связывается с эпитопом ВКД4 HER2 на HER2-экспрессирующей клетке, где первый антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv и содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 35 и 36, соответственно.

В одном аспекте в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы Ат-(L-U)_n или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где компонент в виде антитела Ат содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, который является моновалентным и специфически связывается с эпитопом ВКД4 HER2 на HER2-экспрессирующей клетке, где первый антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv, а VH и VL первого антигенсвязывающего фрагмента расположены от N-конца к C-концу в следующем порядке: VH-линкер-VL.

В одном аспекте в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы Ат-(L-U)_n или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где компонент в виде антитела Ат дополнительно содержит второй антигенсвязывающий фрагмент, который является моновалентным и специфически связывается с эпитопом ВКД2 HER2 на HER2-экспрессирующей клетке, второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab.

В одном аспекте в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы Ат-(L-U)_n или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где компонент в виде антитела Ат дополнительно содержит второй антигенсвязывающий фрагмент, который является моновалентным и специфически связывается с эпитопом ВКД2 HER2 на экспрессирующей HER2 клетке, где второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab и содержит CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи, CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи и CDR3 тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 45, 46 и 47,

соответственно, и CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 48, 49, и 50, соответственно.

В одном аспекте в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы Ат-(L-U)_n или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где компонент в виде антитела Ат дополнительно содержит второй антигенсвязывающий фрагмент, который является моновалентным и специфически связывается с эпитопом ВКД2 HER2 на HER2-экспрессирующей клетке, где второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv и содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37 и 38, соответственно.

В некоторых конкретных вариантах осуществления компонент в виде антитела Ат из конъюгата антитело-лекарственное средство общей формулы Ат-(L-U)_n или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата, представленных в данном документе, показаны в таблице S3.

Таблица S3 Компонент в виде антитела из иллюстративного конъюгата антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата

Название	Описание	Первый антигенсвязывающий фрагмент (Согласно системы нумерации Kabat)	Второй антигенсвязывающий фрагмент
/	Эпитоп-содержащий домен	ВКД4	ВКД2
	Форма	scFV	Fab
	Исходная последовательность	Трастузумаб	Пертузумаб
1	Замена последовательности	VL: F53Y	/
2	Замена последовательности	VH: K30E	/
3	Замена последовательности	VL: F53Y VH: K30E	/

В одном аспекте в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы Ат-(L-U)_n или его фармацевтически приемлемая соль или

сольват, где компонент в виде антитела Ат содержит функциональный домен иммуноглобулина, функционально связанный с первым антигенсвязывающим фрагментом и/или вторым антигенсвязывающим фрагментом, причем функциональный домен иммуноглобулина содержит: i. один или более из CL, CH1, CH2 или CH3, или ii. Fc.

В одном аспекте в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы Ат-(L-U)_n или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где компонент в виде антитела Ат содержит функциональный домен иммуноглобулина, функционально связанный с первым антигенсвязывающим фрагментом и/или вторым антигенсвязывающим фрагментом, причем функциональный домен иммуноглобулина содержит: i. один или более из CL, CH1, CH2 или CH3, или ii. Fc, где CL, CH1, CH2, CH3 и Fc получены из CL, CH1, CH2, CH3 и Fc IgG человека, соответственно.

В одном аспекте в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы Ат-(L-U)_n или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где компонент в виде антитела Ат содержит функциональный домен иммуноглобулина, функционально связанный с первым антигенсвязывающим фрагментом и/или вторым антигенсвязывающим фрагментом, причем функциональный домен иммуноглобулина содержит: i. один или более из CL, CH1, CH2 или CH3, или ii. Fc, где CL, CH1, CH2, CH3 или Fc имеет модификацию или не имеет модификацию; предпочтительно CH3 или Fc имеют модификацию, которая представляет собой, например, аминокислотную замену в положении 435 и/или положении 436 в соответствии с системой нумерации Kabat.

В одном аспекте в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы Ат-(L-U)_n или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где компонент в виде антитела Ат содержит функциональный домен иммуноглобулина, функционально связанный с первым антигенсвязывающим фрагментом и/или вторым антигенсвязывающим фрагментом, причем функциональный домен иммуноглобулина содержит: i. один или более из CL, CH1, CH2 или CH3, или ii. Fc, где Fc представляет собой димерную Fc, содержащую первый полипептид Fc и второй полипептид Fc, первый антигенсвязывающий фрагмент функционально связан с первым полипептидом Fc, а второй антигенсвязывающий фрагмент функционально связан со вторым полипептидом Fc.

В одном аспекте в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы Ат-(L-U)_n или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где компонент в виде антитела Ат содержит константную область, функционально

связанную с первым антигенсвязывающим фрагментом и/или вторым антигенсвязывающим фрагментом, где константная область может представлять собой константную область нативной последовательности или мутантную константную область иммуноглобулина, например, одну или более из нативных или мутированных функциональных доменов CL, CH1, CH2 и/или CH3; в некоторых примерах эти функциональные домены функционально связаны общепринятым в данной области техники способом, константная область может быть получена из константной области иммуноглобулина человека, такой как IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, и в некоторых примерах константная область может иметь модификации для улучшения ее способности опосредовать эффекторные функции.

В одном аспекте в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы Ат-(L-U)_n или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где компонент в виде антитела Ат содержит функциональный домен или каркас иммуноглобулина, например, Fc, функционально связанный с первым антигенсвязывающим фрагментом и/или вторым антигенсвязывающим фрагментом; термин «Fc» включает области Fc с нативной последовательностью и варианты области Fc, Fc может быть Fc человека, например, он получен из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, и Fc может быть модифицирована таким образом, чтобы улучшить ее способность опосредовать эффекторные функции. Например, в некоторых вариантах остов имеет модификации, такие как «выступ-во-впадину», H435R, Y436F, дефукозилирование и тому подобное; в некоторых вариантах осуществления сайты мутации «выступ-во-впадину» в приведенном выше каркасе включают, например, Y349C, T366S, L368A, Y407V, S354C, T366W и т.п.

В одном аспекте в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы Ат-(L-U)_n, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где компонент в виде антитела Ат содержит каркас, функционально связанный с первым антигенсвязывающим фрагментом и/или вторым антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления каркас, описанный в данном документе, представляет собой димерную Fc, содержащую первый полипептид Fc и второй полипептид Fc. В некоторых вариантах осуществления описанная в данном документе димерную Fc имеет модификацию. В некоторых вариантах осуществления димерная Fc имеет модификацию H435R и/или модификацию Y436F, которая может встречаться в одной или обеих полипептидных цепях первого полипептида Fc и второго полипептида Fc. В некоторых конкретных вариантах осуществления димерная Fc имеет модификацию H435R и/или модификацию Y436F, которые встречаются только в одном

полипептиде Fc, а не в другом полипептиде Fc. В некоторых вариантах осуществления димерная Fc имеет сайты мутаций «выступ-в-впадину», такие как Y349C, T366S, L368A, Y407V, S354C, T366W и т.п. В некоторых вариантах осуществления одна цепь димерной Fc имеет T366W и/или S354C, а другая цепь имеет Y407V, Y349C, T366S или/и L368A.

В одном аспекте в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы At-(L-U)_n, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где компонент в виде антитела At представляет собой бивалентное биспецифическое антитело, содержащее: тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO: 11, тяжелую цепь, включающую SEQ ID NO: 13, и легкую цепь, включающую SEQ ID NO: 15.

В некоторых конкретных вариантах осуществления компонент в виде антитела At из конъюгата антитело-лекарственное средство общей формулы At-(L-U)_n или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата, представленных в данном документе, показаны в таблице S4.

Таблица S4 Компонент в виде антитела из иллюстративного конъюгата антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата

Название		Описание	Аминокислотная последовательность
Expi Her2-2/ 23C-HER2 -2	Первый антигенсвязывающий фрагмент (scFv)	CDR1 тяжелой цепи	GFNIEDTYIH (SEQ ID NO: 43)
		CDR2 тяжелой цепи	RIYPTNGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 28)
		CDR3 тяжелой цепи	WGGDGFYAMDYW (SEQ ID NO: 29)
		Вариабельная область тяжелой цепи	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIEDTYIHWV RQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 35)
		CDR1 легкой цепи	CRASQDVNTAVAW (SEQ ID NO: 30)
		CDR2 легкой цепи	SASYLYS (SEQ ID NO: 31)
		CDR3 легкой цепи	QQHYTTPPT (SEQ ID NO: 32)
		Вариабельная область	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASYLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTI

		легкой цепи	SSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGKVEIK (SEQ ID NO: 36)
	анти-Her2-scFv-VH-K30E-VL-F53Y-Fc		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIEDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYA MDYWGGQTLVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGGS DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWY QQKPGKAPKLLIYSASYLYSGVPSRFSGRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGKVEIKGEP KSSDKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11)
Второй антигенсвязывающий фрагмент (Fab)	Варибельная область тяжелой цепи		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDW VRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSV DRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDY WGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 37)
	Варибельная область легкой цепи		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDV SIGVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASYRYTGVP SRFSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGKVEIK (SEQ ID NO: 38)
	анти-Her2-домен2-НС-Fc		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMD WVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTL SVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYF DYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK

			CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSREE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM HEALHNRFTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 13)
	анти-Her2-домен2-LC		DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSIGVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFSGSGSDFTLTI SSLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAA PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 15)
Expri Her2-3/ 23C-HER2 -3	Первый антигенсвяза ывающий фрагмент (scFv)	CDR1 тяжелой цепи	GFNIEDTYIH (SEQ ID NO: 43)
		CDR2 тяжелой цепи	RIYPTNGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 28)
		CDR3 тяжелой цепи	WGGDGFYAMDYW (SEQ ID NO: 29)
		Варибельная область тяжелой цепи	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIEDTYIHWV RQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 35)
		CDR1 легкой цепи	CRASQDVNTAVAW (SEQ ID NO: 30)
		CDR2 легкой цепи	SASFLYS (SEQ ID NO: 33)
		CDR3 легкой цепи	QQHYTTPPT (SEQ ID NO: 32)
		Варибельная область легкой цепи	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDVNTAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 39)

	Второй антигенсвязывающий фрагмент (Fab)	Варибельная область тяжелой цепи	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDW VRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSV DRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDY WGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 37)
		Варибельная область легкой цепи	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSIGVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 38)
Exp1 Her2-4/ 23C-HER2 -4	Первый антигенсвязывающий фрагмент (scFv)	CDR1 тяжелой цепи	GFNIKDTYIH (SEQ ID NO: 44)
		CDR2 тяжелой цепи	RIYPTNGYTRYADSVKG (SEQ ID NO: 28)
		CDR3 тяжелой цепи	WGGDGFYAMDYW (SEQ ID NO: 29)
		Варибельная область тяжелой цепи	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHW VRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWWGGDGFYAM DYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 40)
		CDR1 легкой цепи	CRASQDVNTAVAW (SEQ ID NO: 30)
		CDR2 легкой цепи	SASYLYS (SEQ ID NO: 31)
		CDR3 легкой цепи	QQHYTPPT (SEQ ID NO: 32)
		Варибельная область легкой цепи	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDVNTAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASYLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQHYTPPTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 36)
Второй антигенсвязывающий фрагмент (Fab)	Варибельная область тяжелой цепи	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDW VRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLSV DRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDY WGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 37)	
	Варибельная область	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSIGVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI	

		легкой цепи	SSLQPEDFATYYCQQYYIYPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 38)
--	--	-------------	---

В одном аспекте в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы $At-(L-U)_n$ или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где цитотоксический лекарственный компонент U конъюгирован с компонентом в виде антитела At через линкерный компонент L . Линкерный компонент L , описанный в данном документе, может быть связан с фрагментом антитела любым способом, известным в данной области техники, предпочтительно линкерный компонент связан с фрагментом антитела через сульфгидрильную группу и/или аминогруппу. В некоторых более предпочтительных вариантах осуществления описанный в данном документе линкерный компонент связан с компонентом в виде антитела через сульфгидрильную группу.

В одном аспекте в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы $At-(L-U)_n$ или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где цитотоксический лекарственный компонент U конъюгирован с компонентом в виде антитела At через линкерный фрагмент L , который может представлять собой расщепляемый линкер или нерасщепляемый линкер; в некоторых вариантах осуществления линкерный компонент, описанный в данном документе, представляет собой расщепляемый линкер, который может быть, например, типа с зависимой от низкой рН деградации (включая гидразоновую связь, карбонатную связь и т.п.), протеолитического типа (включая пептидную связь), типа зависимый от высокой концентрации глутатиона деградации (включая дисульфидную связь), и т.п.; в других вариантах осуществления линкерный компонент, описанный в данном документе, представляет собой нерасщепляемый линкер, например, может представлять собой малеимидокапроил и т.п.

В одном аспекте в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы $At-(L-U)_n$ или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где компонент в виде антитела At конъюгирован с одним или более цитотоксическими лекарственными компонентами U , которые могут быть выбраны из группы, состоящей, например, из алкалоидов, антиметаболитов, противоопухолевых антибиотиков, алкилирующих агентов, препаратов на основе платины и т.п., предпочтительно цитотоксическое лекарственное средство представляет собой ингибитор микротрубочек (включая майтанзиноид, ауристатин) или действующее на ДНК цитотоксическое лекарственное средство (включая калихеамицин, дуокармицин, PBD (пирролобензодиазепин), ингибитор топоизомеразы I и т.п.).

В некоторых конкретных вариантах осуществления цитотоксический лекарственный компонент U из конъюгата антитело-лекарственное средство общей формулы $At-(L-U)_n$ или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата, предложенных в данном документе, представляет собой ингибитор топоизомеразы I.

В некоторых конкретных вариантах осуществления цитотоксический лекарственный компонент U из конъюгата антитело-лекарственное средство общей формулы $At-(L-U)_n$ или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата, предложенных в данном документе, представляет собой ингибитор топоизомеразы I аналог камптотецина.

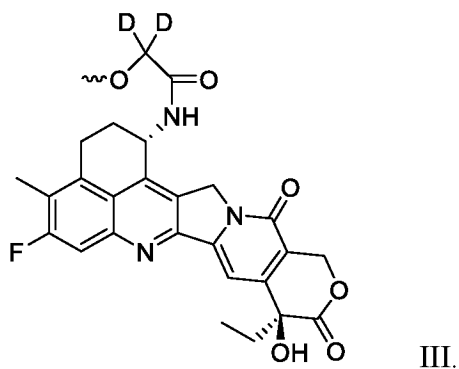
В некоторых предпочтительных конкретных вариантах осуществления цитотоксический лекарственный компонент U из конъюгата антитело-лекарственное средство общей формулы $At-(L-U)_n$ или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата, предложенных в данном документе, выбран из группы, состоящей из SN-38, производного SN-38, экзатекана и производного экзатекана.

В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы $At-(L-U)_n$ или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где At представляет собой компонент в виде антитела, L представляет собой линкерный компонент, U представляет собой ингибитор топоизомеразы I камптотецин, и n представляет собой целое или десятичное число, выбранное из числа от 1 до 10, где компонент L и/или компонент U имеет дейтерированную модификацию. В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число или десятичное число, выбранное из группы, состоящей из 2-10, например, 2-9, 2-8, 3-9, 3-8, 4-9, 4-8, 5-9, и 5-8.

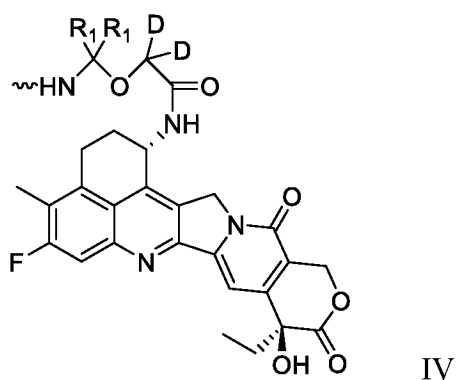
В некоторых вариантах осуществления в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы $At-(L-U)_n$ или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где At представляет собой компонент в виде антитела, L представляет собой линкерный компонент, U представляет собой ингибитор топоизомеразы I камптотецин, и n представляет собой целое или десятичное число, выбранное из группы, состоящей из 1-10, где компонент L и/или компонент U имеет дейтерированную модификацию, а цитотоксический лекарственный компонент U выбран из группы, состоящей из SN-38, производного SN-38, экзатекана и производного экзатекана.

В определенных вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы $At-(L-U)_n$, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, представленные в данном документе, содержат структуру формулы III, которая

приведена ниже:

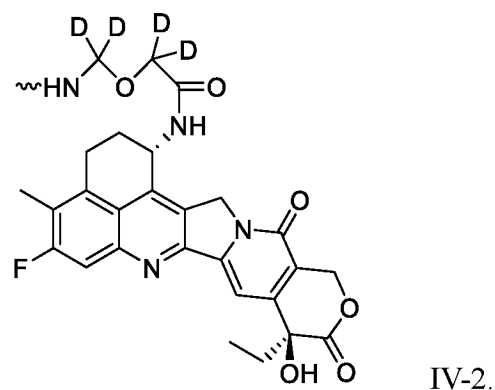
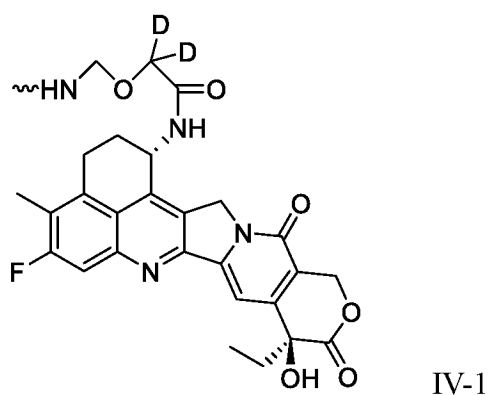


В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы Ат-(L-U)_n или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, представленные в данном документе, содержат структуру формулы IV, которая приведена ниже:



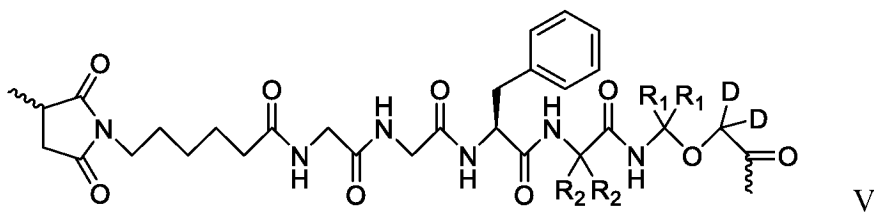
где R₁ выбран из группы, состоящей из водорода (H) и дейтерия (D).

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы Ат-(L-U)_n или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, представленные в данном документе, содержат структуру формул IV-1 или IV-2, которые приведены ниже:



В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы Ат-(L-U)_n или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, представленные в данном документе, содержат структуру формулы V, которая приведена

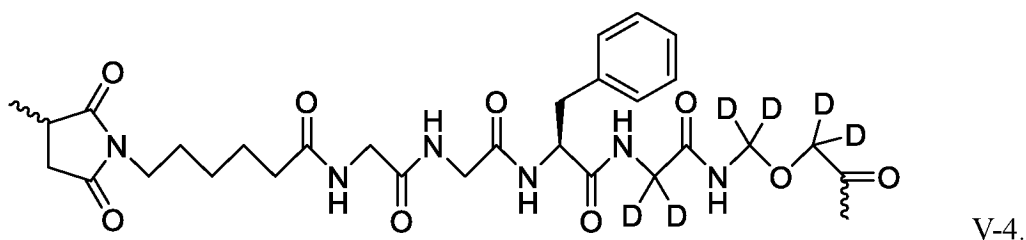
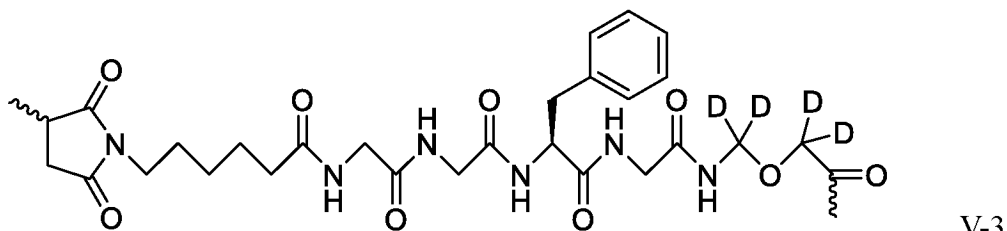
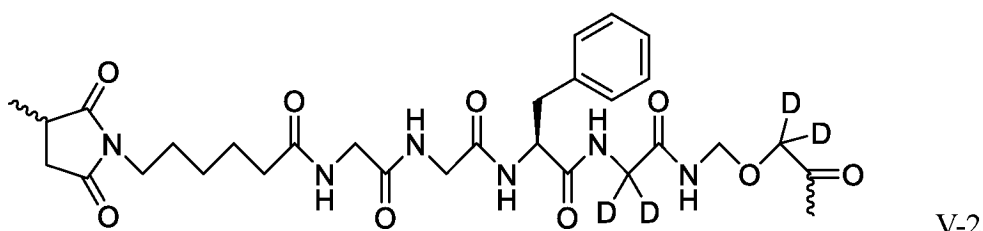
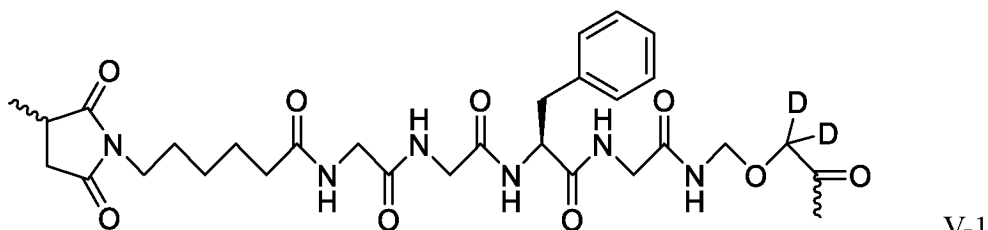
ниже:



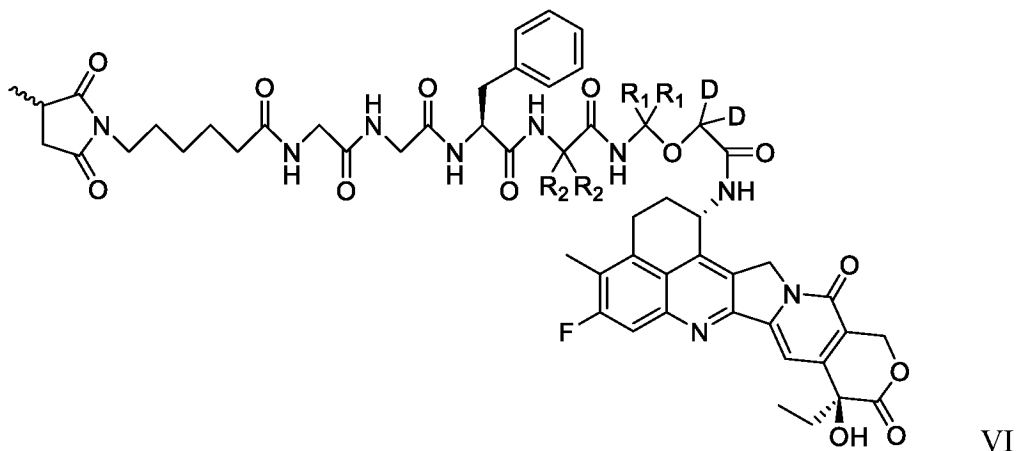
где каждый из R_1 и R_2 независимо выбран из группы, состоящей из водорода (H) и дейтерия (D),

и левый сукцинимидный конец структуры представляет собой сайт, связанный с фрагментом антитела, а правый карбонильный конец представляет собой сайт, связанный с цитотоксическим лекарственным компонентом.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы $At-(L-U)_n$ или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, представленные в данном документе, содержат структуру формул V-1, V-2, V-3 или V-4, которые приведены ниже, а структуры формул с V-1 по V-4 связаны с компонентом в виде антитела левым сукцинимидным концом и цитотоксическим лекарственным компонентом правым карбонильным концом, соответственно:



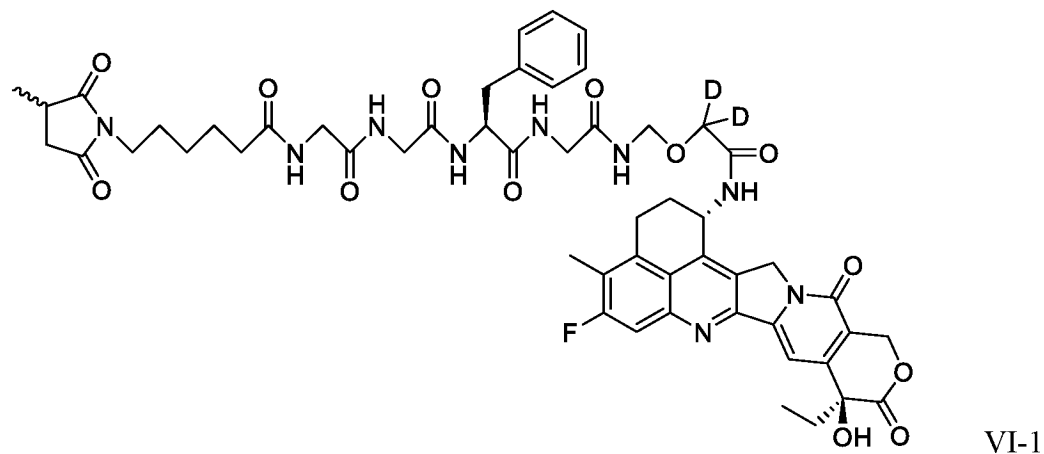
В определенных вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы At-(L-U)_n, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, представленные в данном документе, содержат структуру формулы VI, которая приведена ниже:

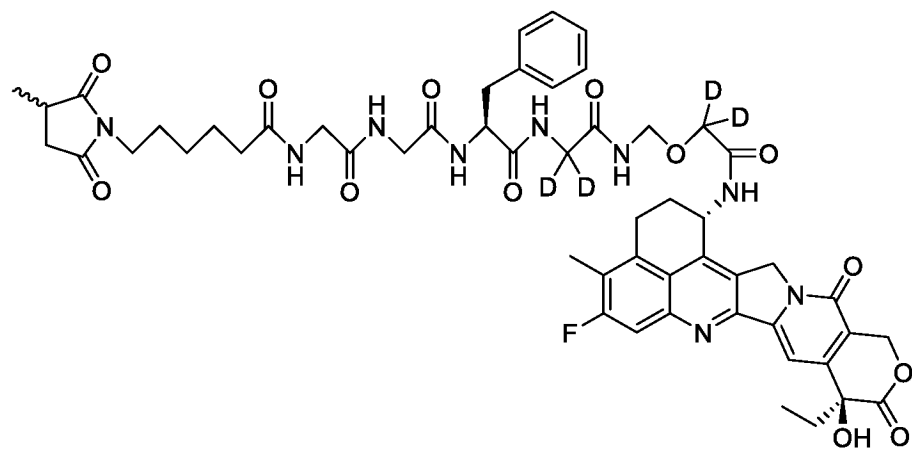


где,

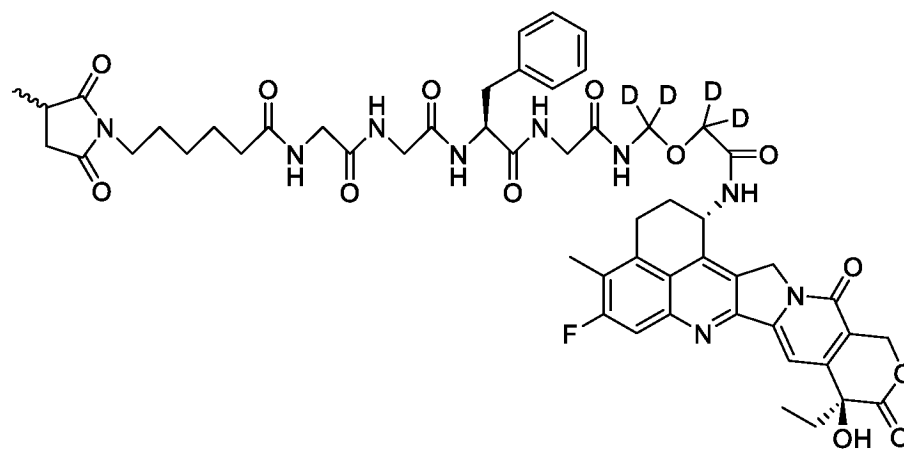
каждый из R₁ и R₂ независимо выбран из группы, состоящей из водорода (H) и дейтерия (D).

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы At-(L-U)_n или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, представленные в данном документе, содержат структуру формул VI-1, VI-2, VI-3, или VI-4, которые приведены ниже:

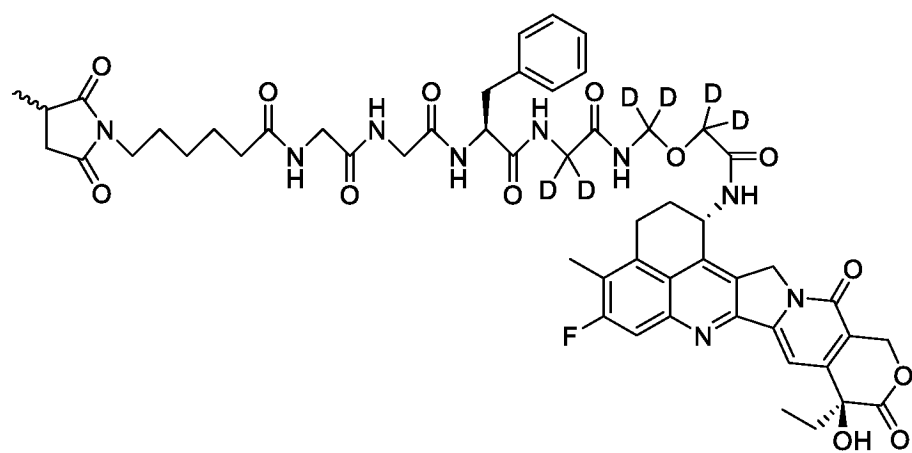




VI-2

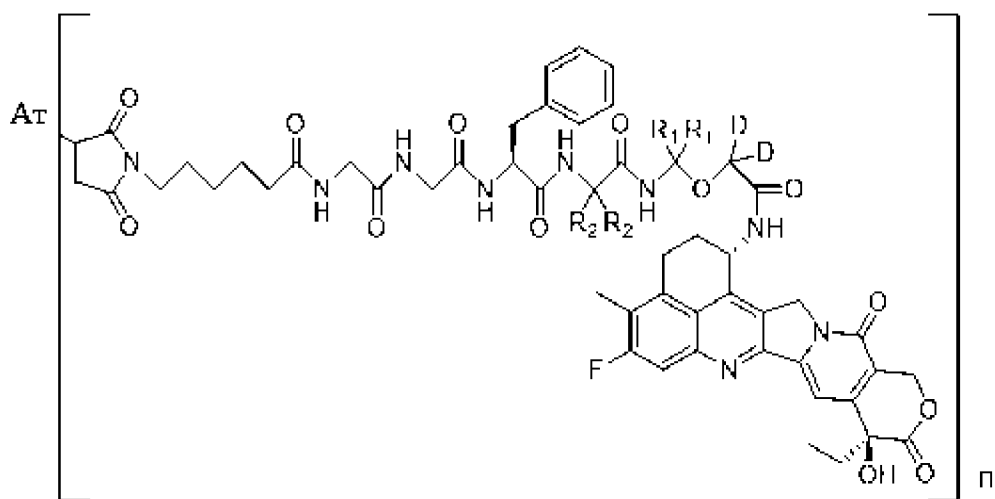


VI-3



VI-4.

В некоторых конкретных вариантах осуществления в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, имеющие структуру формулы VII:



где,

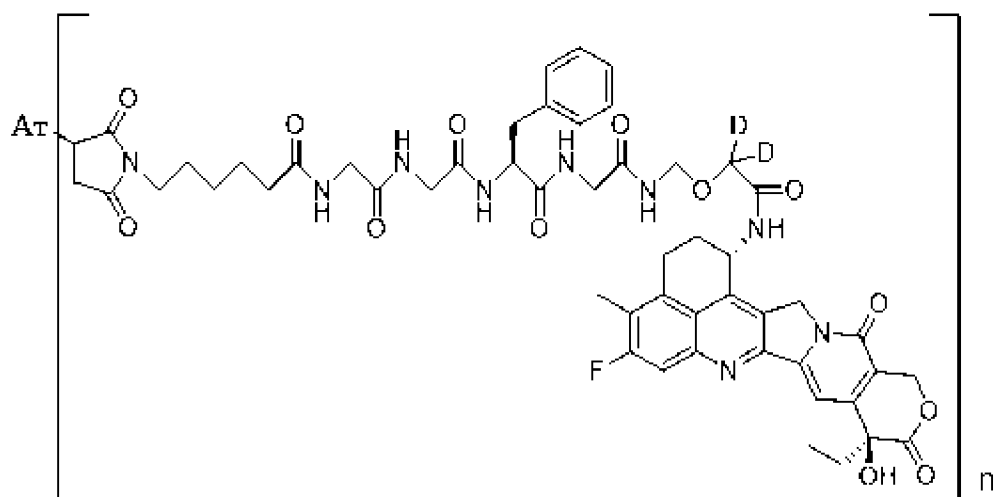
At представляет собой компонент в виде антитела, содержащий первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, где первый антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv и содержит CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи, CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи и CDR3 тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 43, 28 и 29, соответственно, и CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 30, 31 и 32, соответственно;

второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab и содержит CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи, CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи и CDR3 тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 45, 46 и 47, соответственно, и CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 48, 49 и 50, соответственно;

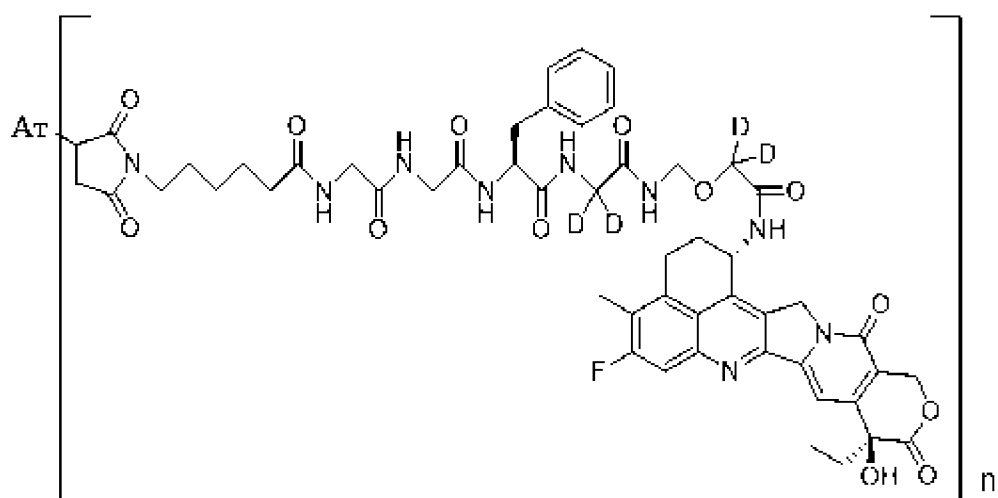
p представляет собой целое число или десятичное число, выбранное из группы, состоящей из 1–10, и

каждый из R_1 и R_2 независимо выбран из группы, состоящей из водорода (H) и дейтерия (D).

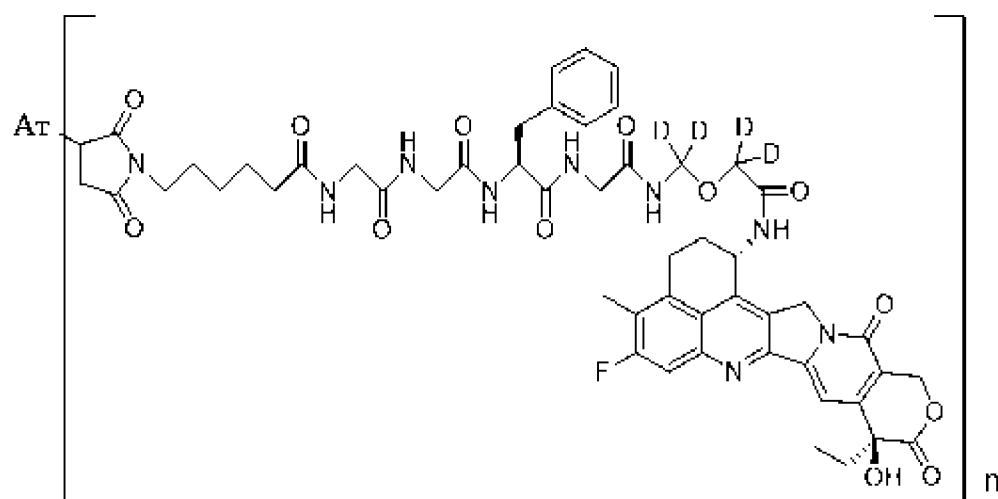
В некоторых конкретных вариантах осуществления в настоящей заявке предложены конъюгаты антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, имеющие структуру формулы VII-1, VII-2, VII-3 или VII-4, которые приведены ниже,



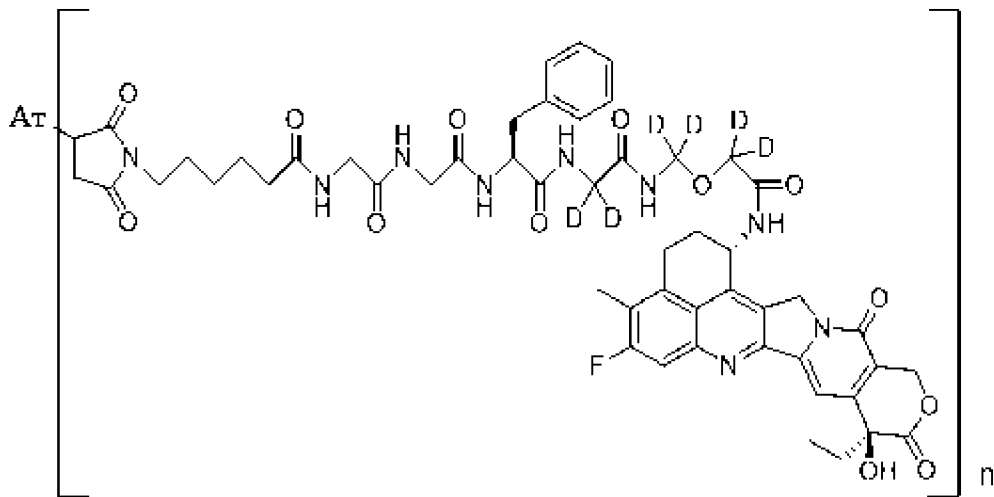
VII-1



VII-2



VII-3



VII-4

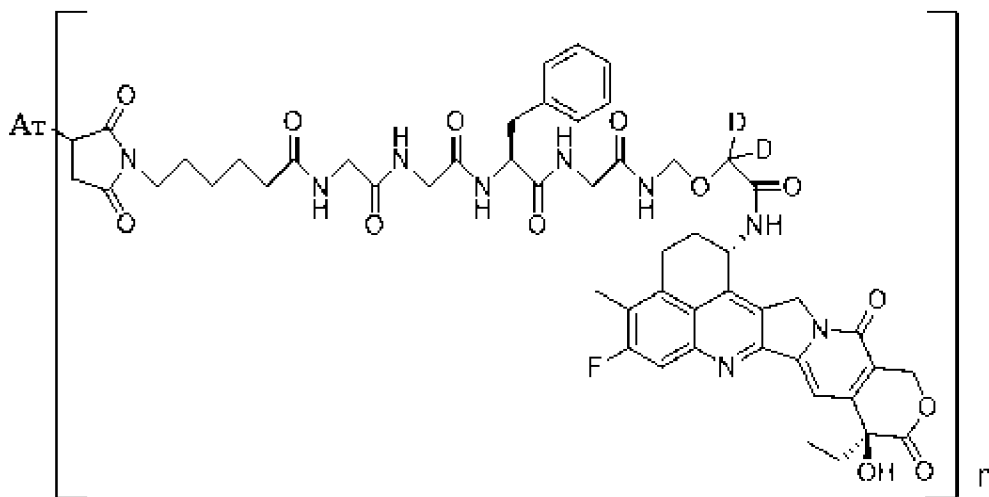
где,

At представляет собой компонент в виде антитела, содержащий первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, где первый антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv и содержит CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи, CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 43, 28 и 29, соответственно, и CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 30, 31 и 32, соответственно;

второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab и содержит CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи, CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 45, 46 и 47, соответственно, и CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 48, 49 и 50, соответственно;

n представляет собой целое число или десятичное число, выбранное из группы, состоящей из 1-10.

В одном конкретном варианте осуществления в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, имеющие структуру формулы VII-1, которая приведена ниже,



VII-1

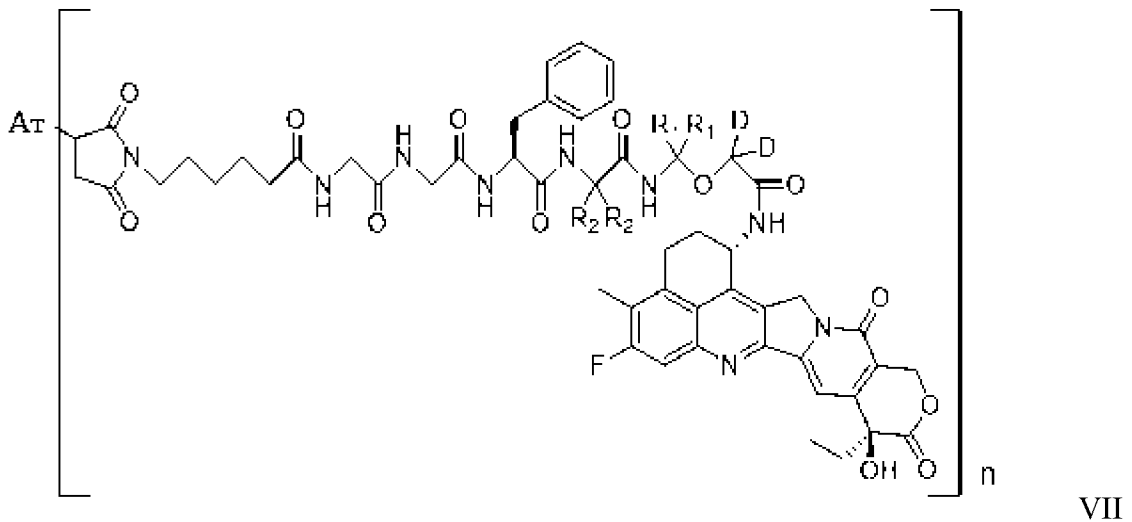
где,

At представляет собой компонент в виде антитела, содержащий первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, где первый антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv и содержит CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи, CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 43, 28 и 29, соответственно, и CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 30, 31 и 32, соответственно;

второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab и содержит CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи, CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 45, 46 и 47, соответственно, и CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 48, 49 и 50, соответственно;

n представляет собой целое число или десятичное число, выбранное из группы, состоящей из 1-10.

В одном конкретном варианте осуществления в настоящей заявке предложен конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, имеющие структуру формулы VII, которая приведена ниже,



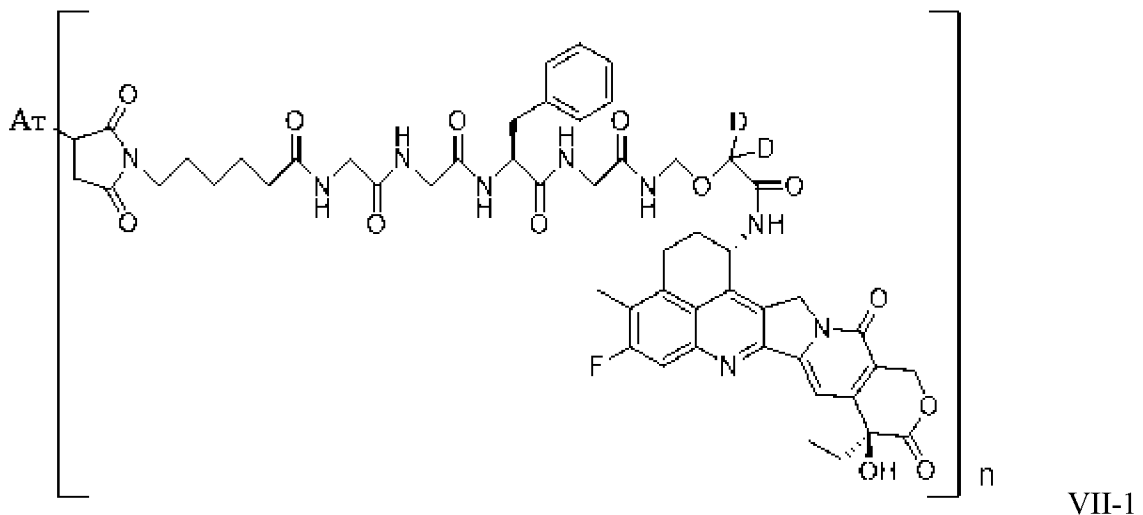
где,

At представляет собой трастузумаб,

n представляет собой целое число или десятичное число, выбранное из группы, состоящей из 1–10, и

каждый из R_1 и R_2 независимо выбран из группы, состоящей из водорода (H) и дейтерия (D).

В одном конкретном варианте осуществления в настоящей заявке предложены конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, имеющие структуру формулы VII-1, которая приведена ниже,



где,

At представляет собой трастузумаб,

n представляет собой целое число или десятичное число, выбранное из группы, состоящей из 1-10.

В одном аспекте в настоящей заявке предложена фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически

приемлемую соль или сольват в соответствии с настоящей заявкой и фармацевтически приемлемый носитель.

В одном аспекте в настоящей заявке предложено применение конъюгата антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата в соответствии с настоящей заявкой, в получении лекарственного препарата для профилактики и лечения злокачественного новообразования.

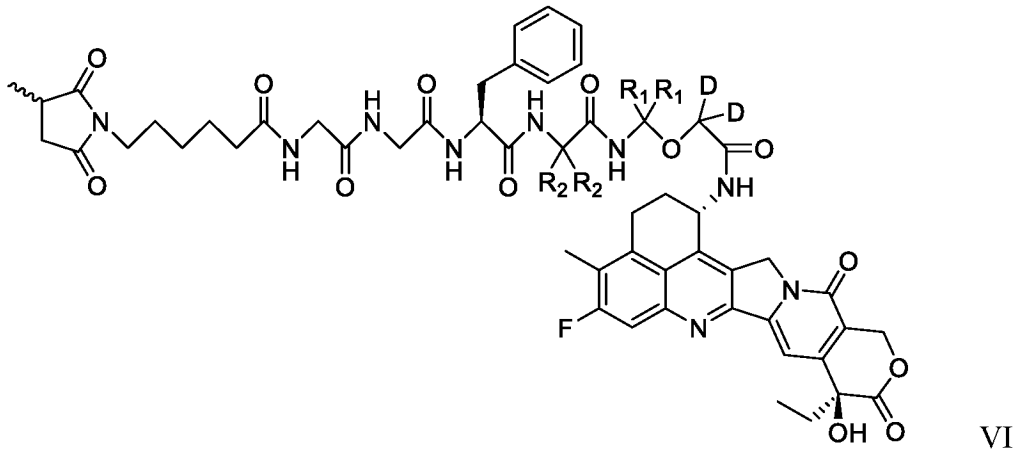
В одном аспекте в настоящей заявке предложено применение фармацевтической композиции, содержащей конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемую соль или сольват в соответствии с настоящей заявкой, и фармацевтически приемлемый носитель, в получении лекарственного препарата для профилактики и лечения злокачественного новообразования.

В одном аспекте в настоящей заявке предложен конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват для применения в профилактике и лечении злокачественного новообразования.

В одном аспекте в настоящей заявке предложен способ лечения или профилактики злокачественного новообразования, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества конъюгата антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата в соответствии с настоящей заявкой, или фармацевтической композиции, содержащей конъюгат антитело-лекарственное средство, или его фармацевтически приемлемую соль или сольват в соответствии с настоящей заявкой, и фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват в соответствии с настоящей заявкой может применяться для профилактики или лечения HER2-положительного злокачественного новообразования, HER2-отрицательного злокачественного новообразования (включая трижды негативный рак молочной железы) и злокачественного новообразования, при котором экспрессия HER2 определяется иммуногистохимическим анализом как IHC2+.

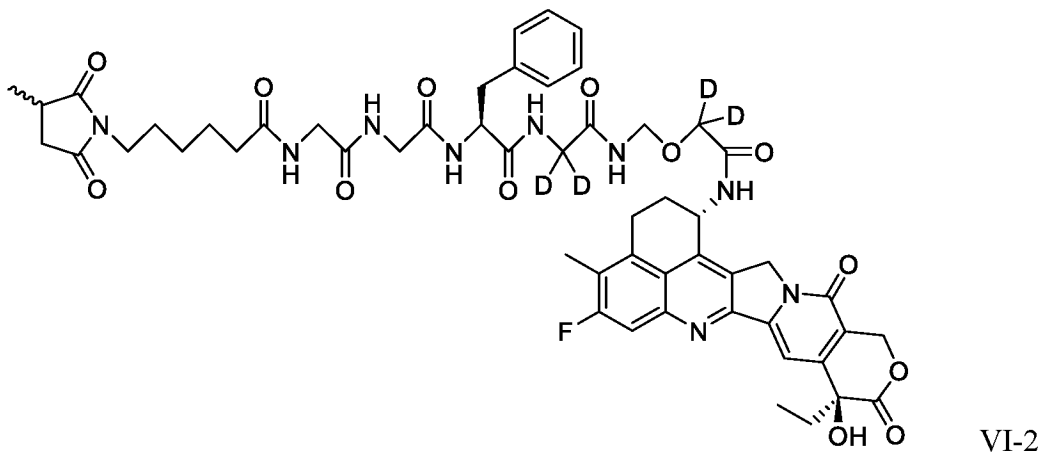
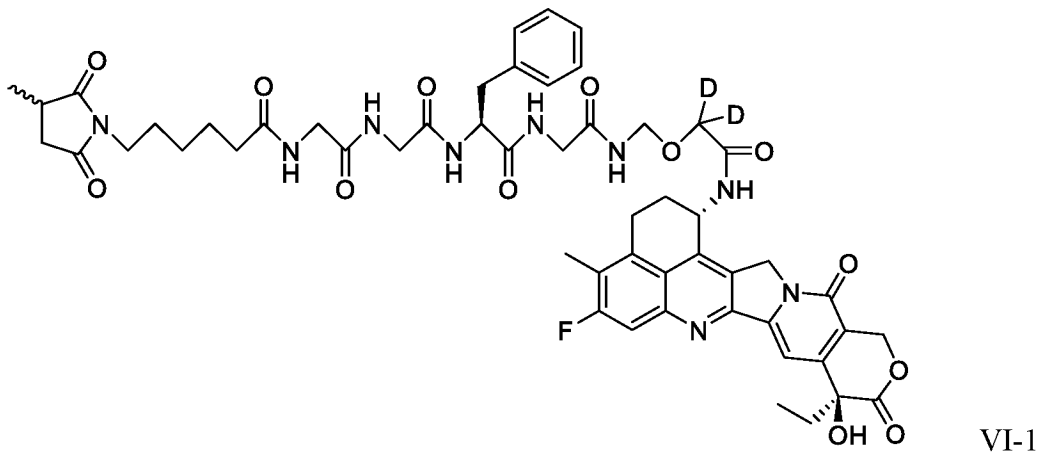
В некоторых аспектах в настоящей заявке предложено промежуточное соединение линкер-лекарственное средство, имеющее структуру приведенной ниже формулы VI, для применения при получении конъюгата антитело-лекарственное средство, который связывает антитело с промежуточным соединением:

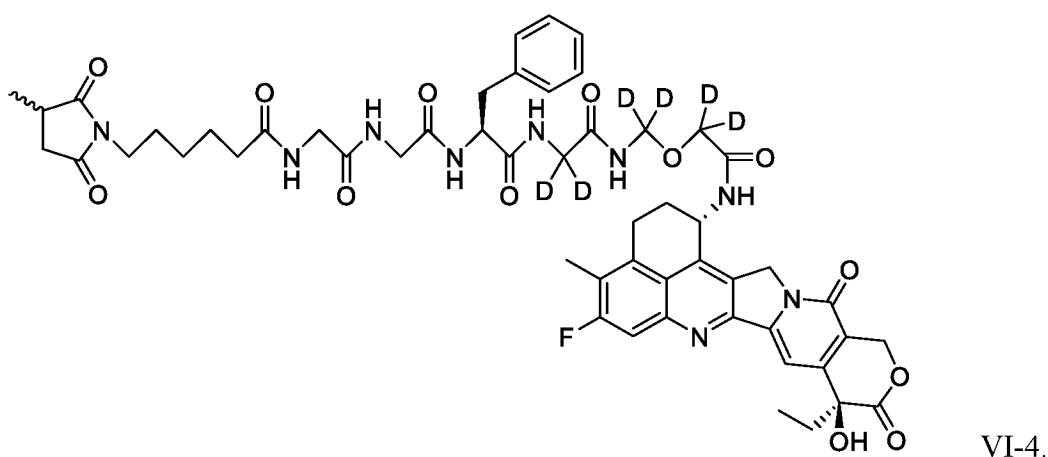
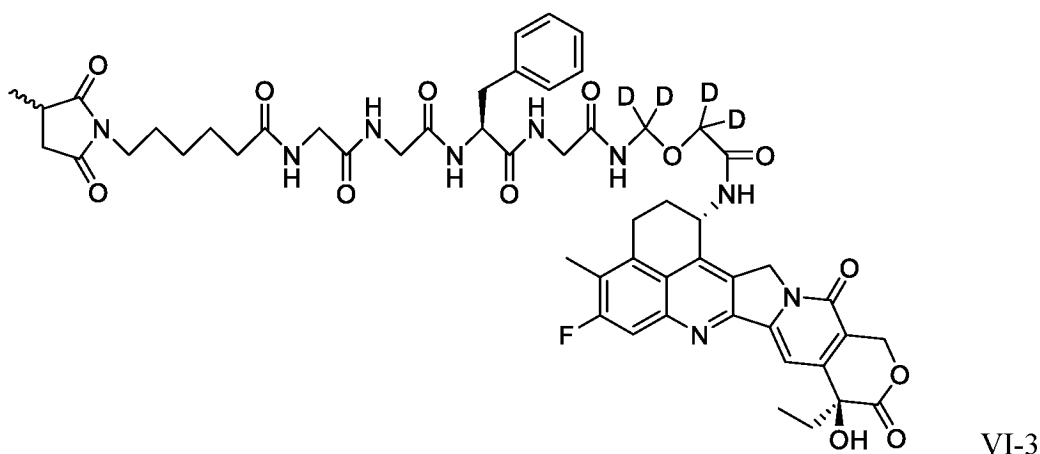


где,

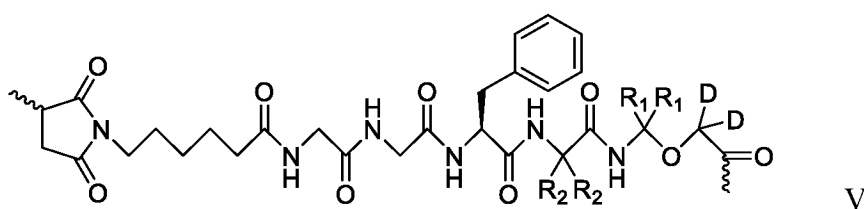
каждый из R_1 и R_2 независимо выбран из группы, состоящей из водорода (H) и дейтерия (D).

В некоторых аспектах в настоящей заявке предложено промежуточное соединение линкер-лекарственное средство, имеющее структуру приведенных ниже формул VI-1, VI-2, VI-3 или VI-4, для применения при получении конъюгата антитело-лекарственное средство, который связывает антитело с промежуточным соединением:





В некоторых аспектах в настоящей заявке предложено линкерное соединение, имеющее структуру приведенной ниже формулы V, для применения при получении конъюгата антитело-лекарственное средство, который связывает лекарственное средство с антителом через линкер:

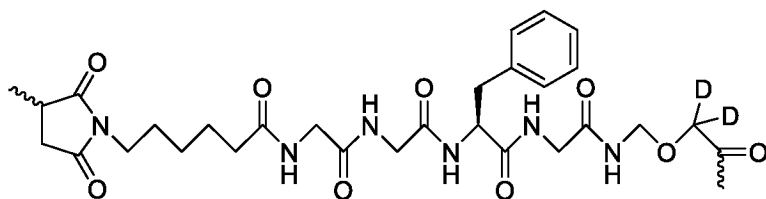


где каждый из R_1 и R_2 независимо выбран из группы, состоящей из водорода (H) и дейтерия (D),

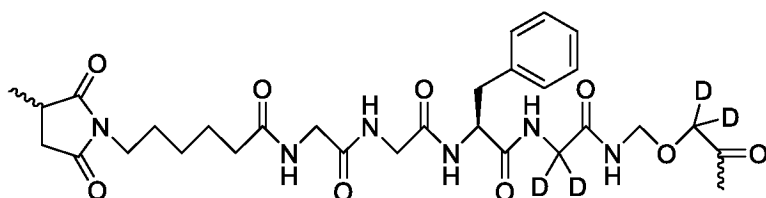
и левый сукцинимидный конец структуры представляет собой сайт, связанный с фрагментом антитела, а правый карбонильный конец представляет собой сайт, связанный с цитотоксическим лекарственным компонентом.

В некоторых аспектах в настоящей заявке предложено линкерное соединение, имеющее структуру формул V-1, V-2, V-3 или V-4, которые приведены ниже, для применения в получении конъюгата антитело-лекарственное средство, который связывает лекарственное средство с антителом через линкер, а структуры формул V-1 - V-4 связаны с компонентом в виде антитела левым сукцинимидным концом и цитотоксическим

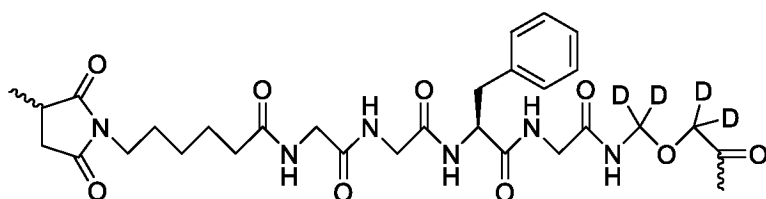
лекарственным компонентом правым карбонильным концом, соответственно:



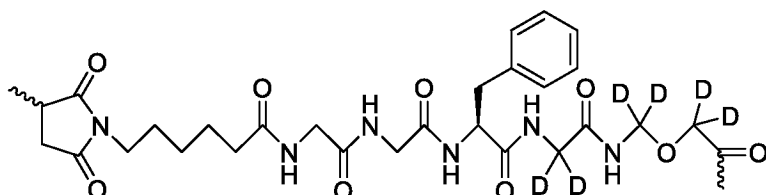
V-1



V-2

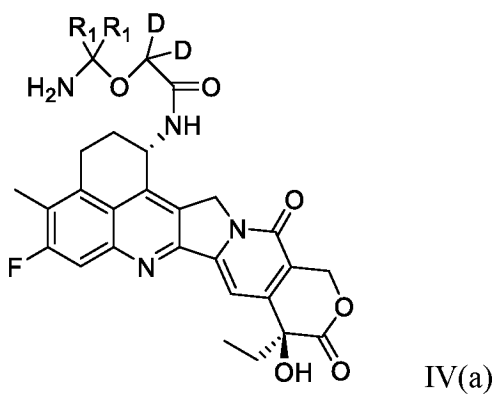


V-3



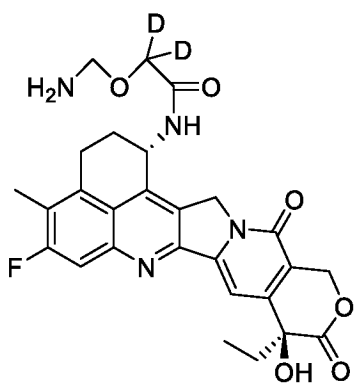
V-4.

В некоторых аспектах в настоящей заявке предложено соединение, имеющее структуру формулы IV(a), приведенной ниже:

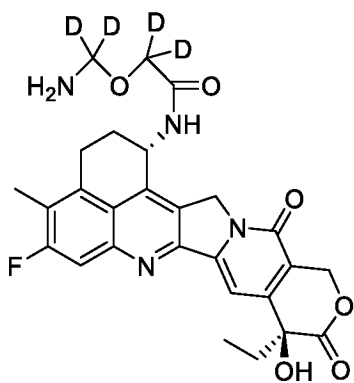


где R_1 выбран из группы, состоящей из водорода (H) и дейтерия (D).

В некоторых аспектах в настоящей заявке предложено соединение, имеющее структуру формулы IV(a)-1 или формулы IV(a)-2, которые приведены ниже:

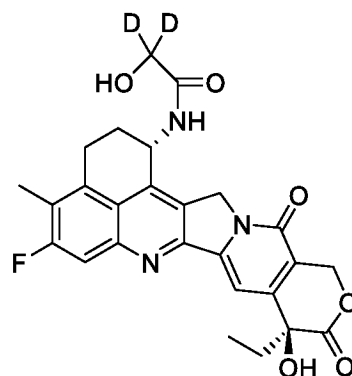


IV(a)-1



IV(a)-2.

В некоторых аспектах в настоящей заявке предложено соединение, имеющее структуру формулы III(a), приведенной ниже:



III(a).

В настоящей заявке предложен конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, обладающие улучшенными фармакокинетическими свойствами. Улучшение фармакокинетических свойств приведет к снижению токсичности целевого соединения, повышению безопасности и/или переносимости, повышению эффективности и улучшению конечного терапевтического окна.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 показан уровень уничтожения опухолевых клеток BT474 биспецифическими антителами к HER2 (Ехр1 HER2-1, Ехр1 HER2-2, 23С2 HER2-1 и 23С2 HER2-2) и комбинацией трастузумаб + пертузумаб;

На Фиг. 2 показан уровень уничтожения опухолевых клеток NCI-N87

биспецифическим антителом к HER2, трастузумабом, T-DM1 и комбинацией трастузумаб + пертузумаб;

На Фиг. 3 показан уровень уничтожения опухолевых клеток JMT-1 биспецифическим антителом к HER2, трастузумабом, T-DM1 и комбинацией трастузумаб + пертузумаб;

На Фиг. 4 показаны результаты ингибирования биспецифическим антителом к HER2, трастузумабом, и комбинацией трастузумаб + пертузумаб в отношении пролиферации опухолевых клеток BT474;

На Фиг. 5 показано влияние биспецифического антитела к HER2, контрольного носителя PBS и комбинации трастузумаб + пертузумаб (Per + Tra) на изменения объема опухоли мыши в мышинной модели опухолевых ксенотрансплантатов N87 рака желудка;

На Фиг. 6 показано влияние биспецифического антитела к HER2, контрольного носителя PBS и комбинации трастузумаб + пертузумаб на изменение массы тела мыши при исследовании на эффективность мышинной модели опухолевых ксенотрансплантатов N87 рака желудка;

На Фиг. 7 показана структура некоторых иллюстративных биспецифических антител к HER2, где изображена димерная Fc, где одна цепь показана черным цветом (первый полипептид Fc), а другая цепь показана серым (второй полипептид Fc), и один антигенсвязывающий домен (первый антигенсвязывающий фрагмент) показан штриховкой, а другой антигенсвязывающий домен (второй антигенсвязывающий фрагмент) показан белым; где первый антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv и слит с первым полипептидом Fc, а второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab и слит со вторым полипептидом Fc;

На Фиг. 8 показана эндоцитарная активность конъюгатов лекарственных средств с различными антителами (моноклональное антитело-DDDXD и биспецифическое антитело-DDDXD) в опухолевых клетках NCI-N87; и

На Фиг. 9 показана эндоцитарная активность конъюгатов лекарственных средств с различными антителами (моноклональное антитело-DDDXD и биспецифическое антитело-DDDXD) в опухолевых клетках SK-BR-3.

Определения и пояснения

Если не указано иное, следующие термины, используемые в данном документе, имеют следующие значения. Определенный термин, если иное специально не определено, не следует считать неопределенным или неясным, а следует толковать в соответствии с его общепринятым значением в данной области техники. Ссылаются, например, на Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York,

NY 1994); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989); Davis et al., *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier Science Publishing Inc., New York, USA (2012); Abbas et al., *Cellular and Molecular Immunology*, Elsevier Science Health Science div (2009); He Wei et al., *Medical Immunology*, (2nd ed), People's Medical Publishing House, 2010. При ссылке на торговое наименование в данном документе подразумевается, что оно относится к соответствующему коммерческому продукту или его активному ингредиенту.

Термин «замещенный» означает, что любой один или более атомов водорода у конкретного атома замещены заместителями при условии, что валентность конкретного атома является нормальной и полученное соединение является стабильным. Когда заместителем является оксо (а именно =O), это означает, что два атома водорода замещены, а оксо не может быть в ароматической группе.

Термин «необязательный» или «необязательно» означает, что описанное впоследствии явление или обстоятельство может произойти, но не обязательно. Описание включает случаи, когда явление или обстоятельство происходит, и случаи, когда явление или обстоятельство не происходит. Определенная группа, являющаяся «необязательно замещенной», означает, что группа может быть замещенной или незамещенной, например, этил, «необязательно» замещенный галогеном, означает, что этил может быть незамещенным (CH_2CH_3), монозамещенным (например, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{F}$), полизамещенным (например, CHFCH_2F , CH_2CHF_2 и т.п.), или полностью замещенным (CF_2CF_3). Специалистам в данной области техники будет понятно, что для любых групп, включающих один или более заместителей, не вводятся любые заместители или схемы замещения, которые могут не существовать или не могут быть синтезированы пространственно.

В контексте данного документа « C_{m-n} » означает, что часть имеет целое число атомов углерода в данном диапазоне. Например, « C_{1-6} » означает, что группа может иметь 1 атом углерода, 2 атома углерода, 3 атома углерода, 4 атома углерода, 5 атомов углерода или 6 атомов углерода.

Когда какая-либо переменная (например, R) встречается более одного раза в строении или структуре соединения, эта переменная в каждом случае определяется независимо. Поэтому, например, если группа заменена на 2 R, определение каждого R является независимым.

Когда соединительная группа имеет номер 0, например $-(\text{CH}_2)_0-$, это означает, что соединительная группа представляет собой ковалентную связь.

Когда переменная представляет собой одинарную связь, это означает, что две

группы связаны напрямую. Например, в A-L-Z, когда L представляет собой одинарную связь, это означает, что структура на самом деле является A-Z.

Термин «гало-» или «галоген» относится к фтору, хлору, бром и йоду.

Термин «гидрокси» относится к группе -ОН.

Термин «циано» относится к группе -CN.

Термин «сульфидрил» относится к группе -SH.

Термин «амино» относится к группе -NH₂.

Термин «нитро» относится к группе -NO₂.

Термин «алкил» относится к гидрокарбилю общей формулы C_nH_{2n+1}. Алкил может быть линейным или разветвленным. Например, термин «C₁₋₆ алкил» относится к алкилу, содержащему от 1 до 6 атомов углерода (например, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, н-пентил, 1-метилбутил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, неопентил, гексил, 2-метилпентил и т.п.). Алкильные фрагменты (а именно, алкил) алкокси, алкиламино, диалкиламино, алкилсульфонила и алкилтио определены так же, как указано выше.

Термин «алкоксил» относится к -О-алкилу.

Термин «алкиламино» относится к -NH-алкилу.

Термин «диалкиламино» относится к -N(алкил)₂.

Термин «алкилсульфонил» относится к -SO₂-алкилу.

Термин «алкилтио» относится к -S-алкилу.

Термин «алкенил» относится к линейному или разветвленному ненасыщенному алифатическому углеводородному радикалу, состоящему из атомов углерода и атомов водорода по меньшей мере с одной двойной связью. Неограничивающие примеры алкенила включают, но не ограничиваются ими, этенил, 1-пропенил, 2-пропенил, 1-бутенил, изобутенил, 1,3-бутадиенил и т.п.

Термин «алкинил» относится к линейному или разветвленному ненасыщенному алифатическому углеводородному радикалу, состоящему из атомов углерода и атомов водорода по меньшей мере с одной тройной связью. Неограничивающие примеры алкинила включают, но не ограничиваются ими, этинил (-C≡CH), 1-пропинил (-C≡C-CH₃), 2-пропинил (-CH₂-C≡CH), 1,3-бутадиинил (-C≡C-C≡CH) и т.п.

Термин «циклоалкил» относится к углеродному кольцу, которое является полностью насыщенным и может существовать в форме моноциклической, мостиковой циклической или спироциклической структуры. Если не указано иное, углеродное кольцо обычно представляет собой 3-10-членное кольцо. Неограничивающие примеры циклоалкила включают, но не ограничиваются ими, циклопропил, циклобутил,

циклопентил, циклогексил, норборнил(бицикло[2.2.1]гептил), бицикло[2.2.2]октил, адамантил и т.п.

Термин «циклоалкенил» относится к неароматическому углеродному кольцу, которое не является полностью насыщенным и может существовать в форме моноциклической, мостиковой циклической или спироциклической структуры. Если не указано иное, углеродное кольцо, как правило, представляет собой 5-8-членное кольцо. Неограничивающие примеры циклоалкенила включают, но не ограничиваются ими, циклопентенил, циклопентадиенил, циклогексенил, циклогексадиенил, циклогептенил, циклогептадиенил и т.п.

Термин «гетероциклил» относится к полностью насыщенному или частично ненасыщенному (но не полностью ненасыщенной гетероароматической группе) неароматическому кольцу, которое может существовать в форме моноциклической, мостиковой циклической или спироциклической структуры. Если не указано иное, гетероциклил обычно представляет собой 3-7-членное кольцо, содержащее 1-3 гетероатома (предпочтительно 1 или 2 гетероатома), независимо выбранных из группы, состоящей из серы, кислорода и/или азота. Неограничивающие примеры гетероциклила включают, но не ограничиваются ими, оксиранил, тетрагидрофуранил, дигидрофуранил, пирролидинил, N-метилпирролидинил, дигидропирролил, пиперидинил, пиперазинил, пиразолидинил, 4H-пиранил, морфолинил, тиоморфолинил, тетрагидротиенил и т.п.

Термин «гетероциклоалкил» относится к полностью насыщенной циклической группе, которая может существовать в форме моноциклической, мостиковой циклической или спироциклической структуры. Если не указано иное, гетероциклил обычно представляет собой 3-7-членное кольцо, содержащее 1-3 гетероатома (предпочтительно 1 или 2 гетероатома), независимо выбранных из группы, состоящей из серы, кислорода и/или азота. Примеры 3-членного гетероциклоалкила включают, но не ограничиваются ими, оксиранил, тирианил и азирианил; неограничивающие примеры 4-членного гетероциклоалкила включают, но не ограничиваются ими, азетидинил, оксетанил и тиетанил; примеры 5-членного гетероциклоалкила включают, но не ограничиваются ими, тетрагидрофуранил, тетрагидротиенил, пирролидинил, изоксазолидинил, оксазолидинил, изотиазолидинил, тиазолидинил, имидазолидинил и тетрагидропиразолил; примеры 6-членного гетероциклоалкила включают, но не ограничиваются ими, пиперидинил, тетрагидропиранил, тетрагидротиопиранил, морфолинил, пиперазинил, 1,4-тиоксанил, 1,4-диоксанил, тиоморфолинил, 1,3-дитианил и 1,4-дитианил; примеры 7-членного гетероциклоалкила включают, но не ограничиваются ими, азабициклогептанил, оксабициклогептанил и тиобициклогептанил. Предпочтительно гетероциклоалкил

представляет собой моноциклический гетероциклоалкил, имеющий 5 или 6 атомов в кольце.

Термин «арил» относится к ароматической моноциклической или конденсированной полициклической группе атомов углерода с сопряженной пи-электронной системой. Например, арил может иметь 6-20 атомов углерода, 6-14 атомов углерода или 6-12 атомов углерода. Неограничивающие примеры арила включают, но не ограничиваются ими, фенил, нафтил, антрил, 1,2,3,4-тетрагидронафталин и т.п.

Термин «гетероарил» относится к моноциклической или конденсированной полициклической системе, содержащей по меньшей мере один кольцевой атом, выбранный из группы, состоящей из N, O и S, при этом остальные кольцевые атомы представляют собой C и имеют по меньшей мере одно ароматическое кольцо. Предпочтительно гетероарил имеет одно 4-8-членное кольцо, в частности, 5-8-членное кольцо, или представляет собой множество конденсированных колец, содержащих 6-14 атомов в кольце, в частности 6-10 атомов в кольце. Неограничивающие примеры гетероарила включают, но не ограничиваются ими, пирролил, фуранил, тиенил, имидазолил, оксазолил, пиразолил, пиридинил, пиримидинил, пиразинил, хинолил, изохинолил, тетразолил, триазолил, триазинил, бензофуранил, бензотиенил, индолил, изоиндолил и подобное, аналогичное, похожее.

«Производное»: соединение, образованное путем замещения атомов или групп атомов в молекуле исходного соединения другими атомами или группами атомов, называется производным исходного соединения.

Любой атом соединения, меченого и синтезированного в данном документе, может представлять собой любой стабильный изотоп атома, если он специально не указан. Если не указано иное, когда положение в структуре определяется как H, то есть водород (H-1), это положение содержит только встречающийся в природе изотоп. Точно так же, если не указано иное, когда положение в структуре определяется как D, т. е. дейтерий (H-2), это положение имеет изотоп, количество которого по меньшей мере в 3340 раз превышает количество встречающегося в природе изотопа (0,015%) (т.е. по меньшей мере 50,1% изотопа дейтерия), когда одно или более положений в структуре меченого синтетического соединения определены как D, т.е. дейтерий (H-2), содержание соединения, представленного структурой, может составлять по меньшей мере 52,5%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 67,5%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 82,5%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98,5%, по меньшей мере 99% или по меньшей мере 99,5%. Соотношение дейтерированного соединения, меченого и синтезированного в данном документе, относится к отношению

количества меченого синтетического изотопа к количеству встречающегося в природе изотопа. Соотношение дейтерирования для указанного атома дейтерия соединения, меченого и синтезированного согласно настоящему описанию, может составлять по меньшей мере 3500 раз (52,5%), по меньшей мере 4000 раз (60%), по меньшей мере 4500 раз (67,5%), по меньшей мере 5000 раз (75%), по меньшей мере 5500 раз (82,5%), по меньшей мере 6000 раз (90%), по меньшей мере 6333,3 раза (95%), по меньшей мере 6466,7 раза (97%), по меньшей мере 6566,7 раза (98,5%), по меньшей мере 6600 раз (99%), по меньшей мере 6633,3 раза (99,5%). Изотопологи в данном документе относятся к соединениям, которые отличаются только изотопным составом с точки зрения химической структуры. Соединение, меченое и синтезированное согласно настоящему описанию, имеет ту же химическую структуру, только с изотопными изменениями в атомном составе его молекул. Таким образом, дейтерий-содержащее соединение в определенном положении, помеченное и синтезированное согласно настоящему описанию, также содержит очень мало изотопа водорода в этом положении, а количество изотополога водорода в определенном положении в меченом и синтезированном согласно настоящему описанию соединении зависит от многих факторов, в том числе изотопную чистоту дейтерированного агента (D_2O , D_2 , $NaBD_4$, $LiAlD_4$ и т.п.) и эффективность методов внесения дейтериевых изотопов. Однако, как упоминалось ранее, общее количество такого изотопа водорода в определенном положении будет меньше 49,9%. Общее количество изотополога водорода в определенном положении в меченом и синтезированном согласно настоящему описанию соединении будет составлять менее 47,5%, 40%, 32,5%, 25%, 17,5%, 10%, 5%, 3%, 1% или 0,5%.

В настоящей заявке любой отдельный атом, не обозначенный как дейтерий, присутствует в своем естественном изотопном изобилии.

Термин «процесс лечения» или «лечение» означает введение соединения или состава, описанного в данном документе, для предотвращения, облегчения или устранения заболевания или одного или более симптомов, связанных с заболеванием, включая: (i) предотвращение возникновения заболевания или болезненного состояния у млекопитающего, в частности, когда такое млекопитающее предрасположено к заболеванию, но оно еще не диагностировано; (ii) подавление заболевания или болезненного состояния, т.е. остановку его развития; (iii) облегчение заболевания или болезненного состояния, т.е. вызывание его регрессии.

Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству соединения по настоящей заявке для (i) лечения или профилактики конкретного заболевания, патологического состояния или нарушения; (ii) облегчение, уменьшение

интенсивности или устранение одного или более симптомов конкретного заболевания, патологического состояния или нарушения, или (iii) предотвращение или задержку появления одного или более симптомов определенного заболевания, патологического состояния или нарушения, описанных в данном документе. Количество соединения по настоящей заявке, составляющее «терапевтически эффективное количество», варьируется в зависимости от соединения, болезненного состояния и его степени тяжести, пути введения и возраста млекопитающего, подлежащего лечению, но может быть определено обычным путем специалистом в данной области техники в соответствии с его собственными знаниями и настоящим изобретением.

Термин «фармацевтически приемлемый» используется в данном документе для тех соединений, материалов, композиций и/или дозированных форм, которые, в рамках здравого медицинского заключения, подходят для использования в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений и соизмеримы с разумным соотношением польза/риск.

Фармацевтически приемлемая соль, например, может быть солью металлов, солью аммония, солью, образованной органическим основанием, солью, образованной неорганической кислотой, солью, образованной органической кислотой, солью, образованной основной или кислой аминокислотой, и тому подобное.

Термин «сольват» относится к веществу, образованному ассоциацией соединения с молекулой растворителя.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к смеси, состоящей из одного или более соединений или их солей, описанных в данном документе, и фармацевтически приемлемого эксципиента. Фармацевтическая композиция предназначена для облегчения введения соединения органическому объекту.

Термин «фармацевтически приемлемые эксципиенты» относится к тем, которые не оказывают значительного раздражающего действия на органический объект и не ухудшают биологическую активность и свойства активного соединения. Подходящие эксципиенты хорошо известны специалистам в данной области техники, например, углевод, воск, водорастворимые и/или набухающие в воде полимеры, гидрофильный или гидрофобный материал, желатин, масло, растворитель, вода и т.п.

Соединения и промежуточные соединения, описанные в данном документе, могут также существовать в различных таутомерных формах, и все такие формы включены в объем настоящей заявки. Термин «таутомер» или «таутомерная форма» относится к структурным изомерам с различной энергией, которые могут взаимно преобразовываться через низкий энергетический барьер. Например, протонный таутомер (также называемый

прототропным таутомером) включает взаимопревращение посредством протонного переноса, такое как кето-енольная изомерия и имин-енаминовая изомерия. Конкретным примером протонного таутомера является имидазольный фрагмент, в котором протон может переноситься между двумя атомами азота в кольце. Валентный таутомер включает взаимопревращение посредством рекомбинации некоторых связывающих электронов.

Термин «антитело» используется в самом широком смысле и, в частности, включает интактные моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), образованные по меньшей мере из двух интактных антител, многофункциональные антитела и фрагменты антител, если они обладают желаемой биологической активностью.

Термин «гуманизированное антитело» относится к антителу, содержащему CDR, полученные из нечеловеческого антитела, а остальная часть молекулы антитела получена из одного или более человеческих антител.

Термин «мутант» используется для обозначения пептида, содержащего аминокислотную последовательность, полученную из аминокислотной последовательности пептида, следующим образом: замена одной, двух или более аминокислот аминокислотами, отличными от исходного пептида, делеция одной или две или более аминокислот дикого типа, вставку одной, двух или более аминокислот, не существующих в диком типе, и/или добавление аминокислот, не существующих в диком типе, к амино-концу (N-концу) и/или карбокси-концу (C-концу) дикого типа (далее в совокупности называемые «мутация»). В настоящей заявке «вставка» также может быть включена в «добавление».

Термин «CDR» (определяющая комплементарность область), также известная как «гипервариабельная область», относится к каждой области вариабельного домена антитела, которая является сильно вариабельной по последовательности и/или образует структурно определенную петлю. Природные четырехцепочечные антитела обычно содержат шесть CDR, три в вариабельной области тяжелой цепи и три в вариабельной области легкой цепи.

Термин «вариабельная область»: структурная единица антитела состоит из двух пар полипептидных цепей, каждая пара имеет одну тяжелую цепь и одну легкую цепь, и N-концевой домен каждой цепи, образующий область от 100 до 110 или более аминокислот, отвечающую в основном за распознавание антигена, является вариабельной областью.

Термин «Fab» означает объединение константного домена (CL) легкой цепи и первого константного домена (CH1) тяжелой цепи вместе с вариабельными доменами VL

(вариабельной областью легкой цепи) и VH (вариабельной областью тяжелой цепи) в легкой и тяжелой цепи, соответственно. Вариабельный домен содержит определяющие комплементарность области (CDR), которые участвуют в связывании антигена.

Термин «scFv» включает домены VH и VL антитела, где эти домены присутствуют в одной полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления scFv дополнительно содержит полипептидный линкер между доменами VH и VL, который позволяет scFv формировать необходимую структуру для связывания антигена.

Термин «ВКД» относится к внеклеточному домену. Рецепторы HER представляют собой рецепторные протеинтирозинкиназы, принадлежащие к семейству рецепторов эпидермального фактора роста (HER) человека, и включают рецепторы EGFR, HER2, HER3 и HER4, где рецептор HER2, как правило, содержит внеклеточный домен, который может связывать лиганд HER, липофильный трансмембранный домен, консервативный внутриклеточный тирозинкиназный домен и карбоксиконцевой сигнальный домен с несколькими тирозиновыми остатками, которые могут быть фосфорилированы, а внеклеточный домен HER2 содержит четыре домена: ВКД1, ВКД2, ВКД3 и ВКД4, соответственно.

Термин «фрагмент антитела» относится к фрагменту антитела в конъюгате антитело-лекарственное средство, который в некоторых вариантах осуществления связан с промежуточным линкерным компонентом через специфическую функциональную группу, и компонент в виде антитела может специфически связываться с антигеном.

Термин «линкерный компонент» относится к части конъюгата антитело-лекарственное средство, которая связывает компонент в виде антитела с цитотоксическим лекарственным компонентом и может быть расщепляемой или нерасщепляемой, где расщепляемый линкер относится к части, которая может быть расщеплена в клетке-мишени таким образом для высвобождения цитотоксического лекарственного средства.

Термин «цитотоксический лекарственный фрагмент» относится к цитотоксическому лекарственному компонента в конъюгате антитело-лекарственное средство, и в некоторых конкретных вариантах осуществления цитотоксический лекарственный компонент связан с промежуточным линкерным компонентом через функциональную группу, так что молекулы цитотоксического лекарственного средства могут высвобождаться в опухолевых клетках, оказывая противоопухолевое действие.

Общий термин «трастузумаб» относится к рекомбинантному гуманизированному моноклональному антителу, которое избирательно действует на внеклеточный участок рецептора эпидермального фактора роста человека 4 типа (HER4) и может быть

использовано для лечения HER2-положительного злокачественного новообразования, примером которого является коммерчески доступный терапевтический продукт моноклонального антитела под торговым названием HERCEPTIN®.

Общий термин «пертузумаб» относится к рекомбинантному гуманизированному моноклональному антителу, которое избирательно действует на внеклеточный участок рецептора эпидермального фактора роста человека 2 типа (HER2) и может использоваться для лечения HER2-положительного злокачественного новообразования.

Термин «HER2» представляет собой второй член семейства EGFR, обладающий тирозинкиназной активностью, при этом уровни экспрессии HER2 можно определить с помощью иммуногистохимического анализа, положительное по HER2 относится к IHC3+, отрицательное по HER2 относится к IHC1+/0, а для определения IHC2+ для дальнейшего уточнения следует провести ISH-анализ.

Термин «злокачественное новообразование» относится к физиологическому состоянию у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток.

Термин «трижды негативный рак молочной железы» представляет собой рак молочной железы, который является негативным в отношении экспрессии рецепторов эстрогена, рецепторов прогестерона и рецептора эпидермального фактора роста человека 2 типа.

В контексте данного документа, если не указано иное, термины «содержать», «содержит» и «содержащий» или их эквиваленты (содержат, содержит, содержат, включает, включают, включая) являются открытыми утверждениями и означают, что элементы, компоненты и стадии, которые не указаны, могут быть включены в дополнение к перечисленным.

Как используется в данном документе, если не указано иное, все числа, выражающие количества ингредиентов, измерения или реакционные условия, используемые в данном документе, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином «около». Термин «около» при соединении с процентом может означать, например, $\pm 0,1\%$, предпочтительно $\pm 0,05\%$ и более предпочтительно $\pm 0,01\%$.

Если иное не оговорено четко в настоящем документе, термины в единственном числе охватывают термины во множественном числе, и наоборот. Аналогичным образом, если в данном документе четко не указано иное, слово «или» включает «и».

В контексте данного документа процент идентичности (степень гомологии) между последовательностями может быть определен путем сравнения двух последовательностей, например, с использованием свободно доступных компьютерных программ (например,

BLASTp или BLASTn с настройками по умолчанию), обычно используемых для этой цели во всемирной сети интернет (например, www.ncbi.nlm.nih.gov).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Для ясности настоящая заявка дополнительно описана с помощью следующих примеров, которые, однако, не предназначены для ограничения объема настоящей заявки. В контексте данного документа реагенты являются коммерчески доступными и могут использоваться без дополнительной очистки.

Трастузумаб и пертузумаб, использованные в примерах настоящей заявки, были приготовлены в соответствии с обычными методами для антител, где сначала конструировали векторы, а эукариотические клетки трансфицировали, а затем очищали для экспрессии, при этом последовательность трастузумаба указана в лекарственном вестнике ВОЗ INN. RL78, а последовательность пертузумаба приведена в примерах WO0100245. DS-8201 является активным ингредиентом Enhertu, имеющегося в продаже препарата от Daiichi Sankyo Co., Ltd, и имеет ту же структуру, что и трастузумаб-DXD, полученный в настоящей заявке (см. структуру в Примере 15).

Пример 1. Конструирование, экспрессия и очистка анти-Her2 scFv-Fc и их вариантов

При конструировании анти-Her2 scFv-Fc человеческий IgG1 использовали в качестве части Fc, а последовательность вариабельной области плеча к Her2 представляла собой последовательность, основанную на моноклональном антителе Герцептин®. Вариабельные области легкой и тяжелой цепей моноклонального антитела Герцептин® последовательно соединяли с помощью сконструированного линкера 1 (т.е. (GGGS)₃) с образованием анти-Her2 scFv-Fc (SEQ ID NO: 1), аминокислотная последовательность которой приводится ниже:

```
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTN
GYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQ
GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWY
QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTF
GQGTKVEIKGEPKSSDKTHTCPPCPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK.
```

Кроме того, в последовательность анти-Her2 scFv-Fc были внесены точечные мутации для создания следующих вариантов:

анти-Her2-scFv-VL-F53Y-Fc (SEQ ID NO: 3): полученный из анти-Her2 scFv-Fc дикого типа с мутацией F53Y в области VL; аминокислотная последовательность приводится ниже:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTN
GYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQ
GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWY
QQKPGKAPKLLIYSASYLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTF
GQGTKVEIKGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK.

анти-Her2-scFv-VL-F53A-Fc (SEQ ID NO: 5): полученный из анти-Her2 scFv-Fc дикого типа с мутацией F53A в области VL; аминокислотная последовательность приводится ниже:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTN
GYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQ
GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWY
QQKPGKAPKLLIYSASALYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTF
GQGTKVEIKGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK.

анти-Her2-scFv-VL-F53R-Fc (SEQ ID NO: 7): полученный из анти-Her2 scFv-Fc дикого типа с мутацией F53R в области VL; аминокислотная последовательность приводится ниже:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTN
GYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQ
GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWY
QQKPGKAPKLLIYSASRLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTF
GQGTKVEIKGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLS

LSPGK.

анти-Her2-scFv-VH-K30E-Fc (SEQ ID NO: 9): получено из анти-Her2 scFv-Fc дикого типа с мутацией K30E в области VH; аминокислотная последовательность приводится ниже:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIEDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTN
GYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQ
GTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWY
QQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTF
GQGTKVEIKGEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK.

Последовательности ДНК анти-Her2 scFv-Fc и их вариантов (SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 и 10) синтезировали и каждую клонировали в вектор экспрессии pсDNA3.1. Вектор экспрессии анти-Her2 scFv-Fc или его варианты трансфицировали в клетки ExpiCHO (CHO-S, Thermo) с использованием набора для экспрессии ExpiCHO™ (Thermo Fisher, кат. № A29133). Клетки культивировали в среде для экспрессии ExpiCHO в увлажненной атмосфере в инкубаторе при 37 °C с 8% CO₂ на орбитальном шейкере, вращающемся со скоростью 130 об/мин. Собирали культуральный супернатант и проводили очистку белка с использованием магнитных частиц с белком А (Genscript, кат. № L00273). Концентрацию белка измеряли с помощью спектрофотометра в УФ и видимой областях спектра (NanoDroplite, Thermo Scientific).

Таблица 1: Информация о последовательности анти-Her2 scFv-Fc и его вариантов

Название	Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO)	Кодирующая последовательность ДНК (SEQ ID NO)	Сайт мутации в вариабельной области
анти-Her2 scFv-Fc	1	2	Отсутствует
анти-Her2-scFv-VL-F53 Y-Fc	3	4	F53Y
анти-Her2-scFv-VL-F53 A-Fc	5	6	F53A
анти-Her2-scFv-VL-F53 R-Fc	7	8	F53R

анти-Her2-scFv-VH-K30 E-Fc	9	10	K30E
-------------------------------	---	----	------

Пример 2. Проверка агрегатов и анализ связывания антигена Her2 человека с анти-Her2 scFv-Fc и их вариантами

Для экспрессированного и очищенного анти-Her2 scFv-Fc и его вариантов аффинность тестируемых молекул к человеческому белку Her2 определяли с помощью Biacore T200 (GE) следующим образом:

некоторое количество анти-Her2 scFv-Fc или его варианта захватывали чипом, конъюгированным с анти-hIgG, а затем антиген человеческий белок HER2 (Sino Biological, кат. № 10004-H08H) пропускают через поверхность чипа. Сигналы ответа регистрировали в режиме реального времени с помощью Biacore T200 и получали кривые ассоциации и диссоциации. В эксперименте использовали универсальный буфер Biacore (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 1,8 mM KH₂PO₄, 0,05% ПАВ P20 (GE, кат. № BR-1000-54), pH 7,4). Антитело к hIgG (захваченное набором для захвата антител человека, GE, кат. № 29-2346-00) было конъюгировано с поверхностью чипа CM5 при значении ответа примерно до 9000 RU, а значение ответа после анти-Her2 scFv-Fc или его захваченный вариант составлял около 200 RU. Затем измеряли значения сигнала взаимодействия различных концентраций белка HER2 человека (100 нМ, 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ и 3,125 нМ) с анти-Her2 scFv-Fc или его вариантом. Скорость потока в проточной кювете составляла 50 мкл/мин, ассоциацию проводили в течение 240 с, диссоциацию проводили в течение 1400 с, регенерацию проводили с использованием 3 M MgCl₂ (GE) в течение 60 с, исходный уровень был стабильным. Результаты были получены путем расчета в соответствии с режимом аффинности и кинетики связывания 1:1 в программном обеспечении для оценки Biacore. Аффинность анти-Her2 scFv-Fc или вариантов антигена человеческого белка Her2 показана в таблице 2. По сравнению с анти-Her2 scFv-Fc (KD = 0,77 нМ) мутация F53A оказывала большее влияние на аффинность связывания вариант анти-Her2-scFv-VL-F53A-Fc (KD = 1,26 нМ) для антигена человеческого белка Her2. Варианты анти-Her2-scFv-VL-F53Y-Fc (KD = 0,8 нМ) и анти-Her2 scFv-Fc (KD = 0,77 нМ) показали сходную аффинность связывания с антигеном человеческим белком Her2. Вариант анти-Her2-scFv-VH-K30E-Fc имеет KD связывания 0,54 нМ для антигена человеческого белка Her2. Известно, что введение мутаций F53Y и K30E не снижает аффинность связывания антигена человеческого белка Her2.

Компоненты анти-Her2 scFv-Fc или их вариантов разделяли колоночной гель-хроматографией, при этом компоненты элюировали в порядке убывания в соответствии с их молекулярными массами. Используемая колонка для

гель-хроматографии представляла собой колонку ACQUITY UPLC Protein BEH SEC 200 Å, 1,7 мкм, 4,6 × 300 мм, а температура колонки составляла 25 °С. Подвижная фаза представляла собой 50 ммоль/л фосфатно-солевой буферный раствор-200 ммоль/л хлорида натрия при рН 7,0 (2,33 г дигидрата дигидрофосфата натрия, 12,53 г додекагидрата динатрийгидрофосфата и 11,69 г хлорида натрия добавляли в 800 мл сверхчистой воды и полностью растворяли при перемешивании; сверхчистую воду добавляли до тех пор, пока объем не достиг 1000 мл; смесь хорошо перемешивали и затем отфильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм). Образец разбавляли подвижной фазой для получения тестируемого раствора с концентрацией 10 мг/мл, 2 мкл которого точно отмеряли и вводили в жидкостный хроматограф (регулируя объем впрыскивания таким образом, чтобы вводилось 20 мкг белка, если концентрация образца была менее 10 мг/мл) для обнаружения при 280 нм. Скорость потока составляла 0,30 мл/мин, изократическое элюирование проводили в течение 15 мин. Данные были обработаны, а результаты количественно проанализированы с использованием метода нормализации площадей. Рассчитывали процент площади пика для агрегата, мономера иммуноглобулина и низкомолекулярных примесей. Пик агрегата появляется перед основным пиком, который представляет собой мономер иммуноглобулина, а пики низкомолекулярных примесей появляются после основного пика. Процентное содержание основного пика и агрегата в анти-Her2 scFv-Fc или его вариантах показано в таблице 2. Варианты анти-Her2-scFv-VL-F53Y-Fc и анти-Her2-scFv-VH-K30E-Fc имеют значительно снижено содержание агрегатов, при этом содержание агрегатов было снижено с 6,31% (в анти-Her2 scFv-Fc) до 4,94% и 3,39% соответственно.

Таблица 2. Содержание агрегата и аффинность связывания анти-Her2 scFv-Fc и его вариантов с антигеном Her2

Название	анти-Her2 scFv-Fc	анти-Her2-sc Fv-VL-F53Y-Fc	анти-Her2-sc Fv-VL-F53A-Fc	анти-Her2-sc Fv-VL-F53R-Fc	анти-Her2-sc Fv-VH-K30E-Fc
Агрегат	6,31%	4,94%	6,96%	7,83%	3,39%
Мономер	93,43%	94,83%	92,80%	91,90%	96,32%
Низкомолекулярные фрагменты	0,25%	0,24%	0,23%	0,26%	0,28%
Антиген Her2 (KD)	0,77 нМ	0,8 нМ	1,26 нМ	Не измерено	0,54 нМ

Пример 3. Конструирование, экспрессия и очистка биспецифических антител к

Her2

Биспецифические антитела к Her2 получали в виде IgG1 человека путем конструирования «выступы-во-впадины» Fc (Ridgway, et al., 1996). Мутации H435R и Y436F (Jendeberg et al., 1997) конструировали в последовательности области Fc одной тяжелой цепи для снижения аффинности Fc к белку A, что было благоприятно для удаления гомодимеров, образующихся при сборке биспецифических антител в процессе аффинной очистки белка A (патент US5945311A). Из Примера 2 видно, что мутация анти-Her2-scFv-VL-F53Y-Fc и мутация анти-Her2-scFv-VH-K30E-Fc могут значительно снизить совокупность анти-Her2-scFv, в то время как аффинность к антигену Her2 остается неизменной. Антигенсвязывающий домен одного плеча к Her2 биспецифических антител к Her2 в этом примере был в форме scFv (структура VH-линкер-VL), а последовательности переменной области содержали мутацию K30E (бис-анти-Her2-scFv-VH-K30E-Fc, SEQ ID NO: 21), мутация F53Y (бис-анти-Her2-scFv-VL-F53Y-Fc, SEQ ID NO: 23) или обе точковые мутации (анти-Her2-scFv-VH-K30E-VL-F53Y-Fc, SEQ ID NO: 11). Антигенсвязывающий домен другого плеча к Her2 биспецифических антител в этом примере был в форме Fab, включая анти-Her2-домен2-НС-Fc (SEQ ID NO: 13) и анти-Her2-домен2-LC (SEQ ID NO: 15). Кроме того, биспецифическое антитело к Her2 без мутаций было сконструировано в форме scFv (структура VH-линкер-VL или структура VL-линкер-VH) в качестве контроля.

Таблица 3: Информация о последовательности биспецифических антител к Her2

Название	Композиция	Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO)	Нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO)
Exp1 Her2-1	анти-Her2-scFv-VL-VH-Fc	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTA VAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTP PTFGQGTKVEIKGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS GEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK DTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDT AVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS AAEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPK	18

		PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLICLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENRYMTWPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 17)	
	анти-Her2-до мен2-HC-Fc- 2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTD YTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIY NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NRFTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 19)	20
	анти-Her2-до мен2-LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIG VAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPSTRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQYYIYP YTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 15)	16

Expi Her2-2	анти-Her2-sc Fv-VH-K30E- VL-F53Y-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIEDT YIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYAD SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKA PKLLIYSASYLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTISS LQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKG EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 11)	12
	анти-Her2-до мен2-HC-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTD YTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIY NQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARNLGPSFYFDYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NRFTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 13)	14
	анти-Her2-до мен2-LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIG VAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRYTGVPFRFS GSGSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQYYIYP YTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS	16

		GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 15)	
Expi Her2-3	бис-анти-Her 2-scFv-VH-K 30E-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIEDT YIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYAD SVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSGG GGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSA SVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKA PKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISS LQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKG EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSG GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 21)	22
	анти-Her2-до мен2-HC-Fc	SEQ ID NO: 13	14
	анти-Her2-до мен2-LC	SEQ ID NO: 15	16
Expi Her2-4	бис-анти-Her 2-scFv-VL-F5 3Y-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKD TYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSG GGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLS ASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASYLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK GEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY	24

		VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 23)	
	анти-Her2-до мен2-HC-Fc	SEQ ID NO: 13	14
	анти-Her2-до мен2-LC	SEQ ID NO: 15	16
Expi Her2-5	анти-Her2-sc Fv-VH-VL-Fc	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFMKD TYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTA VYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSSG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLS ASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGK APKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFLTIS SLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGGQTKVEIKG EPKSSDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 25)	26
	анти-Her2-до мен2-HC-Fc	SEQ ID NO: 13	14
	анти-Her2-до мен2-LC	SEQ ID NO: 15	16

Были синтезированы последовательности ДНК биспецифических антител к Her2 (SEQ ID NO: 12, 14 и 16), и каждая из них была клонирована в вектор экспрессии pсDNA3.1. Векторы экспрессии анти-Her2-scFv-VH-K30E-VL-F53Y-Fc (SEQ ID NO: 11),

анти-Her2-домен2-НС-Fc (SEQ ID NO: 13) и анти-Her2-домен2-LC (SEQ ID NO: 15) совместно трансфицировали в клетки ExpiCHO в соотношении трансфекции 1:1:1,5 с использованием системы экспрессии с высоким выходом CHOgro® (кат. № MIR 6270). Плотность трансфекции составила 6×10^6 клеток/мл. Среда представляла собой среду для экспрессии CHOgro® (кат. № MIR 6200, производитель: Mirus). Культивирование продолжали до 10-го дня после трансфекции, и супернатант клеточной культуры собирали центрифугированием. Очистку белка проводили с использованием магнитных частиц с белком А (Genscript, кат. № L00273). Концентрацию белка измеряли с помощью спектрофотометра в УФ и видимой областях спектра (NanoDroplite, Thermo Scientific). Этот образец был обозначен как Expi Her2-2. Что касается этого метода, другие биспецифические антитела, Expi Her2-1, Expi Her2-3, Expi Her2-4 и Expi Her2-5, были получены путем экспрессии и очистки.

Пример 4. Получение и проверка биспецифических антител с нокаутом по фукозе

Взаимодействие IgG1 с FcγRIIIa можно улучшить путем нокаута связанного с экспрессией фукозы гена FUT8, и тем самым усилить ADCC антитела (Shields et al., 2002; Yamane-Ohnuki et al., 2004). В этом примере биспецифические антитела к Her2 с нокаутом по фукозе получали с использованием клеток CHO-S с нокаутом по FUT8 (обозначенных как FUT8^{-/-} клетки CHO). Были синтезированы последовательности ДНК биспецифических антител к Her2 (SEQ ID NO: 12, 14 и 16), и каждая из них была клонирована в вектор экспрессии pcDNA3.1, соответственно. Векторы экспрессии анти-Her2-scFv-VH-K30E-VL-F53Y-Fc, анти-Her2-домен2-НС-Fc и анти-Her2-домен2-LC котрансфицировали в клетки CHO-S с нокаутом FUT8. в соотношении трансфекции 1:1:1,5 с использованием системы экспрессии с высоким выходом CHOgro® (кат. № MIR 6270). Плотность трансфекции составила 6×10^6 клеток/мл. Среда представляла собой среду для экспрессии CHOgro® (кат. № MIR 6200, производитель: Mirus). Культивирование продолжали до 10-го дня после трансфекции, и супернатант клеточной культуры собирали центрифугированием. Очистку белка проводили с использованием магнитных частиц с белком А (Genscript, кат. № L00273). Концентрацию белка измеряли с помощью спектрофотометра в УФ и видимой областях спектра (NanoDroplite, Thermo Scientific). Этот образец был обозначен как 23C2 Her2-2. Что касается этого метода, последовательности Expi Her2-1, Expi Her2-3, Expi Her2-4 и Expi Her2-5 экспрессировали в FUT8^{-/-} клетках CHO для получения соответствующих биспецифических антител к Her2 с нокаутом по фукозе 23C2 Her2-1, 23C2 Her2-3, 23C2 Her2-4, и 23C2 Her2-5.

Образцы биспецифического антитела к Her2, экспрессированные FUT8^{-/-} клетками CHO и клетками CHO-S, обрабатывали с использованием набора GlycoWorks

RapiFluor-MS N-Glycan (Waters, Милфорд, штат Массачусетс, США). N-гликаны были освобождены от белка и помечены. После разделения колоночной хроматографией был проведен анализ с использованием детектора FLR (Waters, Милфорд, штат Массачусетс, США), и можно было определить структуру и содержание N-гликана. Процентное содержание гликанов показано в таблице 4. В нормальном биспецифическом антителе к Her2 Exp1 HER2-2 процент дефукозилированных гликанов составил 21,85%, а в биспецифическом антителе к Her2 23C2 HER2-2, экспрессированном нокаутными по FUT8 клетками CHO-S, процент дефукозилированных гликанов составил 99,40%.

Таблица 4: Анализ содержания гликанов в биспецифических антителах к Her2

Название компонента	Содержание (%)	
	Exp1 HER2-2	23C2 HER2-2
A1(M3B)	1,81	9,84
A1G(4)1	0,16	0,17
A2	1,14	70,33
A2[3]G(4)1	/	2,34
A2[6]G(4)1	/	4,19
A2[3]BG(4)1	/	0,11
A2G(4)2	/	0,55
A2G(4)2S(3)1	/	0,21
A2G(4)2S(3,3)2	/	0,46
F(6)A1G(4)1	/	/
F(6)A1[3]G(4)1S(3)1	/	/
F(6)A1	12,77	/
F(6)A2	60,69	0,60
F(6)A2[3]G(4)1	1,20	/
F(6)A2[6]G(4)1	0,70	/
F(6)A2G(4)2	/	/
F(6)A2G(4)2S(3)1	/	/
M3	/	0,26
M4	/	0,07
M4A1G(4)1	/	0,36
M4 D1	/	0,08
M5	12,31	5,67

M5A1G(4)1	/	0,05
M6 D1	2,11	0,75
M6 D3	0,73	0,18
M7 D1	0,80	0,44
M8	0,20	0,15
Дефукозилированные гликаны	21,85	99,40
Дисиалилированные гликаны	/	0,46
Гликаны с высоким содержанием маннозы	20,07	7,24
Моносиалилированные гликаны	0,18	0,21
Несиалилированные гликаны	99,82	99,33

Пример 5. Проверка агрегатов биспецифических антител

Этот пример относится к проверке агрегатов биспецифических антител к her2 23C2 Her2-1, 23C2 Her2-2, 23C2 Her2-3, 23C2 Her2-4 и 23C2 Her2-5.

Биспецифические антитела к her2 разделяли с помощью колоночной гель-хроматографии и подтверждали содержание агрегатов, при этом компоненты элюировали в порядке убывания в соответствии с их молекулярными массами. Используемая колонка для гель-хроматографии представляла собой колонку ACQUITY UPLC Protein BEH SEC 200 Å, 1,7 мкм, 4,6 × 300 мм, а температура колонки составляла 25 °С. Подвижная фаза представляла собой 50 ммоль/л фосфатно-солевой буферный раствор-200 ммоль/л хлорида натрия при pH 7,0 (2,33 г дигидрата дигидрофосфата натрия, 12,53 г додекагидрата динатрийгидрофосфата и 11,69 г хлорида натрия добавляли в 800 мл сверхчистой воды и полностью растворяли при перемешивании; сверхчистую воду добавляли до тех пор, пока объем не достиг 1000 мл, смесь хорошо перемешивали и затем отфильтровывали через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм). Образец разбавляли подвижной фазой для получения тестируемого раствора с концентрацией 10 мг/мл, 2 мкл которого точно отмеряли и вводили в жидкостный хроматограф (регулируя объем впрыскивания таким образом, чтобы вводилось 20 мкг белка, если концентрация образца была менее 10 мг/мл) для обнаружения при 280 нм. Скорость потока составляла 0,30 мл/мин, изократическое элюирование проводили в течение 15 мин. Данные были обработаны, а результаты количественно проанализированы с использованием метода нормализации площадей. Рассчитывали процент площади пика для агрегата, мономера иммуноглобулина и низкомолекулярных примесей. Пик агрегата появляется перед основным пиком, который представляет собой мономер иммуноглобулина, а пики низкомолекулярных примесей появляются после основного пика.

Таблица 5: Содержание агрегатов биспецифических антител к Her2

Название образца	Агрегат	Мономер	Низкомолекулярные фрагменты
23C2 Her2-2	8,51%	91,02%	0,47%
23C2 Her2-1	19,55%	80,05%	0,40%

Результаты показывают, что после сборки scFV в биспецифические антитела, собранные биспецифические антитела по-прежнему образовывали большое количество агрегатов; однако содержание агрегатов среди биспецифических антител может быть снижено путем введения мутаций. Содержание агрегатов в 23C2 Her2-2 может быть снижено до 8,51% по сравнению с таковым в 23C2 Her2-1, не содержащем мутаций (таблица 5).

Пример 6. Анализ связывания антигена биспецифическими антителами к Her2

Для экспрессированных и очищенных биспецифических антител к Her2 аффинность тестируемых молекул к белку HER2 определяли с помощью Biacore T200 (GE) следующим образом:

Некоторое количество биспецифического антитела к Her2 захватывают чипом, связанным с анти-hIgG, и затем Her2 человека (Sino Biological, кат. № 10004-H08H) пропускают через поверхность чипа. Сигналы ответа регистрировали в режиме реального времени с помощью Biacore T200 и получали кривые ассоциации и диссоциации. В эксперименте использовали универсальный буфер Biacore (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 1,8 mM KH₂PO₄, 0,05% ПАВ P20, pH 7,4). Анти-hIgG (захваченное набором для захвата человеческих антител, GE, кат. № 29-2346-00) конъюгировали с поверхностью чипа CM5 при значении ответа до около 9000 RU, и значение ответа захваченного биспецифического антитела к Her2 составляло около 200 RU. Затем измеряли значения сигнала взаимодействия различных концентраций белка Her2 (100 нМ, 50 нМ, 25 нМ, 12,5 нМ, 6,25 нМ и 3,125 нМ) с биспецифическим антителом к Her2. Скорость потока в проточной кювете составляла 50 мкл/мин, ассоциацию проводили в течение 240 с, диссоциацию проводили в течение 1400 с, регенерацию проводили с использованием 3 М MgCl₂ (GE) в течение 60 с, исходный уровень был стабильным.

Результаты были получены расчетным путем в соответствии с программным обеспечением для оценки Biacore. Аффинность связывания биспецифического антитела 23C2 Her2-2 к Her2, а также контролей трастузумаба и пертузумаба с антигеном Her2 показана в таблице 6. KD связывания биспецифического антитела к Her2 23C2 Her2-2 с

антигеном Her2 составляет $6,11E-10$ М, KD связывания трастузумаба с антигеном Her2 составляет $1,22E-09$ М, а KD связывания пертузумаба с антигеном Her2 составляет $2,35E-09$ М. Биспецифическое антитело к Her2 23C2 Her2-2 показало более высокую аффинность к антигену Her2, чем трастузумаб и пертузумаб.

Таблица 6. Аффинность биспецифических антител к Her2 к антигену Her2 человека

	k_a (1/М*с)	k_d (1/с)	KD (М)
23C2 Her2-2	$1,79E+05$	$1,09E-04$	$6,11E-10$
Контрольный образец трастузумаба	$1,73E+05$	$2,12E-04$	$1,22E-09$
Контрольный образец пертузумаба	$1,15E+05$	$2,69E-04$	$2,35E-09$

Пример 7. Анализ связывания антигена с помощью биспецифических антител к Her2

Со ссылкой на процедуры в Примере 6, аффинность экспрессированных и очищенных биспецифических антител к белку HER2 23C2 Her2-1, 23C2 Her2-2, 23C2 Her2-3, 23C2 Her2-4 и 23C2 Her2-5 определяли с помощью Biacore T200 (GE).

Результат определения аффинности биспецифического антитела к Her2 23C2 Her2-1 к антигену белку Her2 человека показан в таблице 7. Из результатов в таблицах 6 и 7 видно, что аффинность связывания биспецифические антитела к Her2 с антигеном белком Her2 человека можно улучшить путем введения мутаций F53Y и K30E.

Таблица 7. Аффинность биспецифических антител к Her2 к антигену Her2 человека

Название образца	23C2 Her2-1
KD антигена Her2	4,02 нМ

Пример 8. Уничтожение Her2-положительных клеток-мишеней BT474 биспецифическими антителами к Her2

Эффект уничтожения биспецифическими антителами к Her2 на клетки-мишени (BT474 Her2⁺⁺⁺, источник: банк клеток центра коллекции типовых культур Китайской академии наук) изучали с использованием НК-клеток, полученных из РВМС человека (моноклеарные клетки периферической крови), а активность биспецифических антител к Her2 *in vitro* оценивали по значению EC₅₀.

Конкретные процедуры были следующими: клетки BT474 доводили до плотности 3

$\times 10^5$ клеток/мл, используя среду 1640, содержащую 2% FBS (эмбриональную бычью сыворотку), и высевали в 96-луночный планшет для культивирования клеток (Eppendorf, кат. № 0030730199) по 50 мкл на лунку. Различные концентрации биспецифических антител к Her2 (1000 нг/мл, 333 нг/мл, 111 нг/мл, 37 нг/мл, 12,3 нг/мл, 4,11 нг/мл, 1,37 нг/мл, 0,46 нг/мл, 0,15 нг/мл и 0,05 нг/мл) готовили с использованием среды 1640 и добавляли в указанный выше 96-луночный планшет для культивирования клеток по 50 мкл на лунку. РВМС человека доводили до плотности $1,5 \times 10^6$ клеток/мл с использованием среды 1640 и добавляли по 100 мкл на лунку. Группа введения (клетка-мишень + эффекторная клетка + антитело), группа клеток-мишеней (клетки BT474), группа эффекторных клеток (РВМС человека), группа клеток-мишеней + эффекторных клеток, группа отрицательного контроля (среда) и группа контроля с раствором для лизиса и группа с максимальным высвобождением клеток-мишеней (клетка-мишень + раствор для лизиса), при этом соотношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням составляло 10:1. За 45 минут до анализа к группе с максимальным высвобождением клеток-мишеней и группе контроля с раствором для лизиса добавляли 20 мкл/лунку раствора для лизиса (Promega, кат. № G182A). Через 45 минут измеряли скорость лизиса клеток с помощью нерадиоактивного анализа цитотоксичности CytoTox96® (Promega, G1780).

$$\text{Уровень лизиса (\%)} = \frac{(\text{ОП}_{\text{группа введения}} - \text{ОП}_{\text{группа клеток-мишеней + эффекторных клеток}})}{(\text{ОП}_{\text{группа с максимальным высвобождением клеток-мишеней}} - \text{ОП}_{\text{группа клеток-мишеней}})} \times 100\%$$

На Фиг. 1 показан уровень уничтожения биспецифическими антителами к Her2 Her2+++ опухолевых клеток BT474. Биспецифические антитела к Her2, усиленные ADCC (обозначенные как 23C2 HER2-1 и 23C2 HER2-2 на Фиг. 1), оказывали лучший эффект уничтожения на опухолевые клетки BT474, чем комбинация трастузумаба и пертузумаба, и чем биспецифические антитела к Her2 (Expi HER2-1 и Expi HER2-2), экспрессируемые клетками CHO-S; где EC_{50} комбинации трастузумаба и пертузумаба (1:1) составляет 8,627 нг/мл, EC_{50} Expi HER2-1 составляет 38,05 нг/мл, а EC_{50} Expi HER2-2 составляет 35,17 нг/мл, так что Expi HER2-2 превосходит Expi HER2-1; EC_{50} усиленного ADCC 23C2 HER2-1 составляет 4,728 нг/мл, а EC_{50} усиленного ADCC 23C2 HER2-2 составляет 3,658 нг/мл, так что усиленное ADCC 23C2 HER2-2 превосходит 23C2 HER2-1.

Пример 9. Уничтожение Her2-положительных клеток-мишеней NCI-N87 биспецифическими антителами к Her2

Эффект уничтожения биспецифическими антителами к Her2 на клетки-мишени (NCI-N87 Her2++, источник: банк клеток центра коллекции типовых культур Китайской академии наук) изучали с использованием НК-клеток, полученных из РВМС человека

(моноклеональные клетки периферической крови), а активность биспецифических антител к Her2 *in vitro* оценивали по значению EC₅₀.

Конкретные процедуры были следующими: клетки NCI-N87 доводили до плотности 3×10^5 клеток/мл, используя среду 1640, содержащую 2% FBS (эмбриональную бычью сыворотку), и высевали в 96-луночный планшет для культивирования клеток (Eppendorf, кат. № 0030730199) по 50 мкл на лунку. Различные концентрации биспецифических антител к Her2 или контрольных лекарственных средств (8,1 нМ, 2,7 нМ, 0,9 нМ, 0,3 нМ, 0,1 нМ, 0,03 нМ, 0,01 нМ, 0,003 нМ, 0,001 нМ и 0,0004 нМ) готовили с использованием среды для эксперимента и добавляли в указанный выше 96-луночный планшет для культивирования клеток по 50 мкл на лунку. РВМС человека доводили до плотности $1,5 \times 10^6$ клеток/мл, используя среду для эксперимента, и добавляли по 100 мкл на лунку. Группа введения (клетка-мишень + эффекторная клетка + антитело или контрольное лекарственное средство), группа клеток-мишеней (клетки NCI-N87), группа эффекторных клеток (РВМС человека), группа клеток-мишеней + эффекторных клеток, группа отрицательного контроля (среда) и группа контроля с раствором для лизиса и группа с максимальным высвобождением клеток-мишеней (клетка-мишень + раствор для лизиса), при этом соотношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням составляло 10:1. За 45 минут до анализа к группе с максимальным высвобождением клеток-мишеней и группе контроля с раствором для лизиса добавляли 20 мкл/лунку раствора для лизиса (Promega, кат. № G182A). Через 45 минут измеряли скорость лизиса клеток с помощью нерадиоактивного анализа цитотоксичности CytoTox96® (Promega, G1780). В качестве контрольных лекарственных средств использовали трастузумаб, T-DM1 (конъюгат трастузумаб-энтанзин, торговое название Kadcyла®), трастузумаб и пертузумаб (1:1) и Expi HER2-1.

Уровень лизиса (%) = $\frac{(\text{ОП}_{\text{группа введения}} - \text{ОП}_{\text{группа клеток-мишеней + эффекторных клеток}})}{(\text{ОП}_{\text{группа с максимальным высвобождением клеток-мишеней}} - \text{ОП}_{\text{группа клеток-мишеней}})} \times 100\%$

На Фиг. 2 показан уровень уничтожения биспецифическими антителами к Her2 опухолевых клеток NCI-N87. Усиленное ADCC биспецифическое антитело к Her2 23C2 HER2-2 обладало лучшим эффектом уничтожения опухолевых клеток NCI-N87, чем комбинация трастузумаба и пертузумаба, трастузумаба, T-DM1 и Expi HER2-1; где EC₅₀ усиленного ADCC 23C2 HER2-2 составляет 0,02447 нМ, EC₅₀ комбинации трастузумаба и пертузумаба составляет 0,08267 нМ, EC₅₀ Expi HER2-1 составляет 0,1048 нМ, EC₅₀ T-DM1 составляет 0,07392 нМ, и EC₅₀ трастузумаба составляет 0,07468 нМ.

Пример 10. Уничтожение устойчивых к трастузумабу клеток JIMT-1 биспецифическими антителами к Her2

Эффект уничтожения биспецифическими антителами к Her2 на клетки-мишени (JMT-1, источник: AddexBio, кат. № C0006005) изучали с использованием НК-клеток, полученных из РВМС человека (моноклеарных клеток периферической крови), а активности *in vitro* биспецифические антитела против Her2 оценивали по значению EC₅₀.

Конкретные процедуры были следующими: клетки JMT-1 доводили до плотности клеток 3×10^5 клеток/мл, используя среду 1640, содержащую 2% FBS (эмбриональную бычью сыворотку), и высевали в 96-луночный планшет для культивирования клеток (Eppendorf, кат. № 0030730199) по 50 мкл на лунку. Различные концентрации биспецифических антител к Her2 или контрольных лекарственных средств (8,1 нМ, 2,7 нМ, 0,9 нМ, 0,3 нМ, 0,1 нМ, 0,03 нМ, 0,01 нМ, 0,003 нМ, 0,001 нМ и 0,0004 нМ) готовили с использованием среды для эксперимента и добавляли в указанный выше 96-луночный планшет для культивирования клеток по 50 мкл на лунку. РВМС человека доводили до плотности $1,5 \times 10^6$ клеток/мл, используя среду для эксперимента, и добавляли по 100 мкл на лунку. Группа введения (клетка-мишень + эффекторная клетка + антитело или контрольное лекарственное средство), группа клеток-мишеней (клетки BT474), группа эффекторных клеток (РВМС человека), группа клеток-мишеней + эффекторных клеток, группа отрицательного контроля (среда) и группа контроля с раствором для лизиса и группа с максимальным высвобождением клеток-мишеней (клетка-мишень + раствор для лизиса), при этом соотношение эффекторных клеток к клеткам-мишеням составляло 20:1. За 45 минут до анализа к группе с максимальным высвобождением клеток-мишеней и группе контроля с раствором для лизиса добавляли 20 мкл/лунку раствора для лизиса (Promega, кат. № G182A). Через 45 минут измеряли скорость лизиса клеток с помощью нерадиоактивного анализа цитотоксичности CytoTox96® (Promega, G1780). В качестве контрольных лекарственных средств использовали трастузумаб, Т-DM1, комбинацию трастузумаба и пертузумаба (1:1) и Expi HER2-1.

Уровень лизиса (%) = $\frac{(\text{ОП}_{\text{группа введения}} - \text{ОП}_{\text{группа клеток-мишеней + эффекторных клеток}})}{(\text{ОП}_{\text{группа с максимальным высвобождением клеток-мишеней}} - \text{ОП}_{\text{группа клеток-мишеней}})} \times 100\%$

На Фиг. 3 показан уровень уничтожения биспецифическими антителами к Her2 опухолевых клеток JMT-1. Усиленное ADCC биспецифическое антитело к Her2 23C2 HER2-2 обладало лучшим эффектом уничтожения опухолевых клеток JMT-1, чем комбинация трастузумаба и пертузумаба, трастузумаба, Т-DM1 и Expi HER2-1; где EC₅₀ усиленного ADCC 23C2 HER2-2 составляет 0,01006 нМ, EC₅₀ комбинации трастузумаба и пертузумаба составляет 0,06727 нМ, EC₅₀ Expi HER2-1 составляет 0,08066 нМ, EC₅₀ Т-DM1 составляет 0,08357 нМ, и EC₅₀ трастузумаба составляет 0,07443 нМ; кроме того, биспецифическое антитело к Her2 23C2 HER2-2 продемонстрировало более высокий

уровень лизиса клеток.

Пример 11. Ингибирование пролиферации Her2+++ опухолевых клеток BT474 биспецифическими антителами к Her2

23C2 Her2-2, трастузумаб и пертузумаб разводили средой DMEM/F12 (GIBCO, кат. № 11330-032), содержащей 2% FBS (фетальная бычья сыворотка, производитель: GIBCO, кат. № 10099-141) до конечной концентрации 3,2 мкг/мл, а затем последовательно разводили в соотношении 1:1 до 9 концентраций (1,6 мкг/мл, 0,8 мкг/мл, 0,4 мкг/мл, 0,2 мкг/мл, 0,1 мкг/мл, 0,05 мкг/мл, 0,025 мкг/мл, 0,0125 мкг/мл и 0,00625 мкг/мл). Her2+++ клетки BT474, растущие в логарифмической фазе, собирали, доводили до плотности 1×10^5 клеток/мл и высевали по 100 мкл на лунку, а холостую лунку без каких-либо клеток устанавливали в качестве контроля. Приведенные выше серийно разведенные образцы добавляли по 50 мкл на лунку. Планшет инкубировали в инкубаторе при 37°C с 5% CO₂ в течение 5 дней. Культуральную среду удаляли и добавляли рабочий раствор ССК-8 (Dojindo, Япония, кат. № СК04) по 100 мкл на лунку. Планшет инкубировали в течение 4–5 ч для проявления окраски и помещали в микропланшетный ридер (производитель: Thermo, модель: VarioskanFlash). Значения поглощения при длине волны 450 нм считывали и регистрировали, используя эталонную длину волны 630 нм. Рассчитывали скорость ингибирования пролиферации опухолевых клеток.

Результаты показаны на Фиг. 4. Степень ингибирования пролиферации опухолевых клеток BT474 с помощью усиленного ADCC биспецифического антитела к Her2 23C2 Her2-2 составляет 78,38%, что лучше, чем у трастузумаба (54,12%) и комбинации трастузумаба и пертузумаба (53,7%).

Пример 12. Ингибирование ксенотрансплантатной опухоли Her2++ NCI-N87 у голых мышей с раком желудка с помощью биспецифических антител к Her2

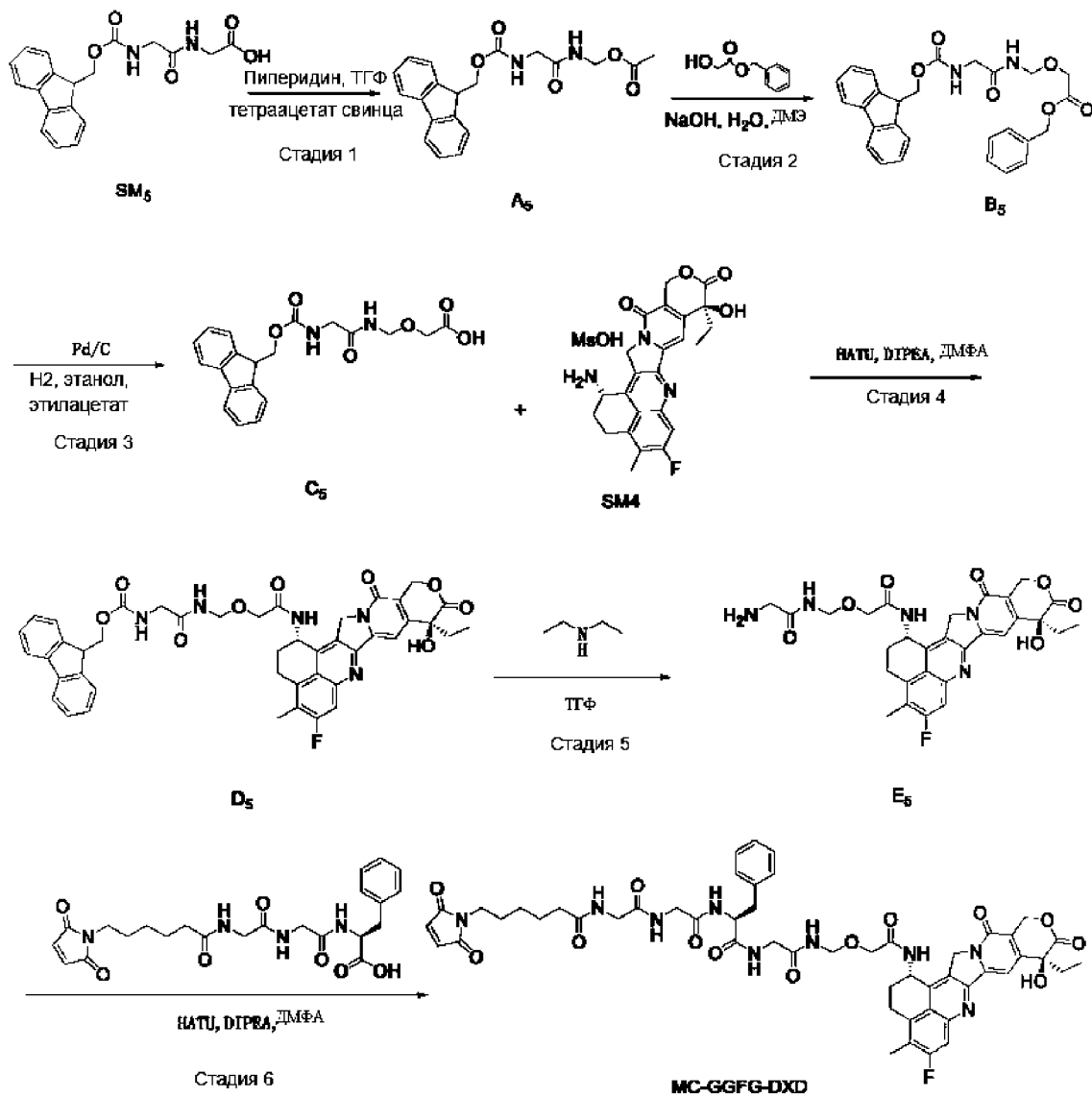
Эффективность биспецифических антител к Her2 *in vivo* оценивали на мышинной модели ксенотрансплантатов с использованием клеток рака желудка Her2++ NCI-N87 (банк клеток центра коллекции типовых культур Китайской академии наук). Клетки рака желудка Her2++ NCI-N87 получали в концентрации 5×10^7 клеток/мл и инокулировали голым мышам (от Changzhou Cavens Laboratory Animal Ltd., 14–17 г, самцы, которые содержались в свободной от патогенной флоры среде) в область правой подмышечной впадины из расчета 0,1 мл на мышь. Диаметр опухоли ксенотрансплантата голых мышей измеряли с помощью штангенциркуля, и при достижении опухоли 100–250 мм³ в объеме животных рандомизировали на 5 групп:

Группа 1: контроль

Группа 2: Expi Her2-1, 10 мг/кг

Контроль	-	в/в	6	6	204±40	284±58	363±78	481±09	586±61	724±61	808±41	863±51
Exp1 Her2-1	10	в/в	6	6	204±23	235±46	207±35	179±30	195±4	204±4	195±5	178±3
23C2 Her2-2	5	в/в	6	6	204±31	246±37	250±47	277±7	318±9	348±6	353±4	358±01
23C2 Her2-2	10	в/в	6	6	204±44	201±39	154±39	136±3	151±5	173±6	165±5	144±9
Per+Tra	5+5	в/в	6	6	204±34	224±48	199±59	202±5	205±5	231±3	218±4	218±9

Пример 13. Синтез MC-GGFG-DXD



Стадия

1.

Синтез

A5

((N-[(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]глицил)амино)метилацетата)

20 г SM5 (N-[(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]глицилглицин) отвешивали в трехгорлую колбу емкостью 1 л, добавляли 300 мл тетрагидрофурана и 100 мл толуола и смесь равномерно перемешивали и затем добавляли 30 г тетраацетата свинца и 5,4 г пиридина. Смесь нагревали до 65°C и реагировали в течение 4 часов. Реакционный раствор охлаждали до комнатной температуры и отфильтровывали твердое вещество. Органическую фазу концентрировали досуха при 40°C. К концентрированной сухой органической фазе добавляли 300 мл этилацетата и 300 мл воды. Органическую фазу перемешивали в течение 20 мин. Этилацетатную фазу отделяют. К этилацетатной фазе добавляли 100 мл насыщенного раствора хлорида натрия и смесь перемешивали в течение 20 мин. Этилацетатную фазу отделяют и концентрируют досуха. Концентрат подвергли колоночной хроматографии на силикагеле (петролейный эфир:этилацетат = 1:1) с получением 13 г A5. Выход составил 63%. ИЭР-МС:m/z=391,1 [M+Na]⁺.

Стадия	2.	Синтез	B5
--------	----	--------	----

(((N-[(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]глицил)амино)метокси]бензилацетата)

1,0 г A5 отвешивали в одногорлую колбу на 250 мл, добавляли 15 мл ДМЭ (диметилового эфира этиленгликоля), добавляли 0,897 г бензилгликолята и смесь охлаждали до 0 °С на бане со льдом и водой. Раствор готовили из 0,27 мл воды и 0,108 г NaOH. Приготовленный раствор NaOH добавляли в реакционный раствор. Через 1 ч реакции при 0°C к реакционному раствору добавляли 0,078 г ледяной уксусной кислоты. Добавляли 100 мл воды и 100 мл этилацетата, перемешивали 20 мин при комнатной температуре, отделяли органическую фазу и концентрировали досуха. Реакционный раствор подвергли хроматографии на колонке с силикагелем (петролейный эфир:этилацетат = 1:1) с получением 0,68 г B5. Выход составил 53%. ИЭР-МС:m/z=497,1 [M+Na]⁺.

Стадия	3.	Синтез	C5
--------	----	--------	----

(((N-[(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]глицил)амино)метокси]уксусной кислоты)

0,68 г B5 отвешивали в колбу для гидрирования на 250 мл, добавляли 20 мл этанола и 10 мл этилацетата и добавляли 0,34 г влажном палладиевом катализаторе на углеродном носителе (содержание палладия 10%). Реакционный раствор продували водородом через водородный баллон. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 1 часа. Палладиевый катализатор на углеродном носителе отфильтровывали через целит. Фильтрат концентрировали досуха при 40°C. Получали 425 мг C5. Выход составил 77%. ИЭР-МС:m/z=407,1 [M+Na]⁺.

Стадия	4.	Синтез	D5
--------	----	--------	----

(((N-[(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]глицил)амино)метокси]ацетил-N-[(2-[(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}-2-оксоэтокси)метил]глицинамида)

50 мг SM4 (мезилат экзатекана) и 50 мг C5 отвешивали в одnogорлую колбу на 100 мл, добавляли 2 мл ДМФ (N,N-диметилформаида), реакциюю смесь охлаждали до 0 °С и добавляли 54 мг HATU (2-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилуроний гексафторфосфата) и 30 мг DIEA (N,N-диизопропилэтиламина). Реакциюю смесь нагревали до комнатной температуры. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 3 часов. Добавляли 100 мл дихлорметана и 100 мл воды. Органическую фазу перемешивали в течение 20 мин. Органическую фазу отделяют и концентрируют досуха. Реакционный раствор подвергали хроматографии на колонке с силикагелем (дихлорметан:метанол = 10:1) с получением 88 мг D5. Выход составил 84%. ИЭР-МС:m/z=802,4 [M+H]⁺.

Стадия	5.	Синтез	E5
({{(глицил)амино]метокси}ацетил-N-[(2-{{[(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}-2-оксоэтокси)метил]глицинамида)			

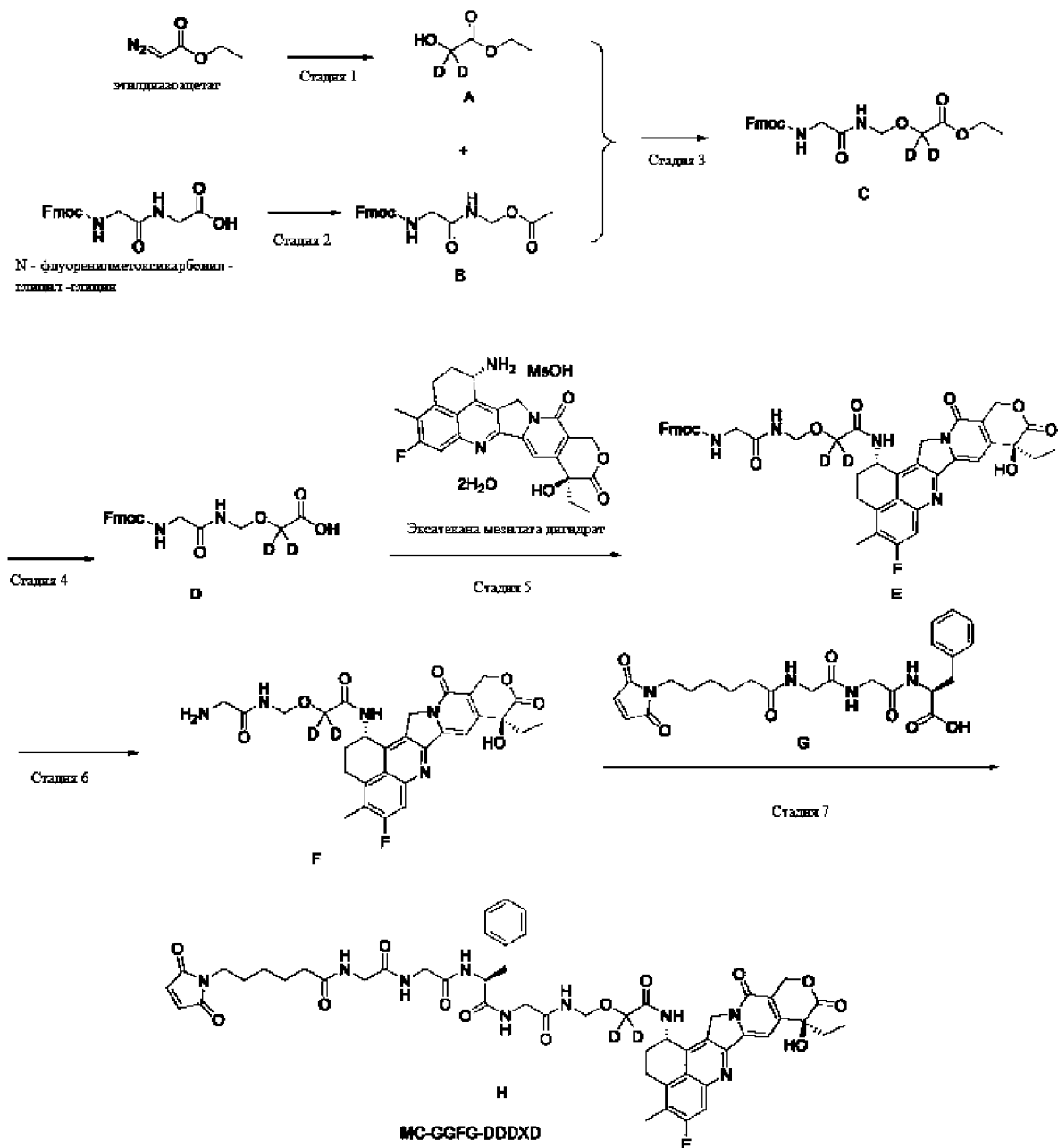
78 мг D5 отвешивали в одnogорлую колбу на 100 мл, добавляли 4 мл тетрагидрофурана, реакциюю систему охлаждали до 0°С и добавляли 78 мг этилендиамина. Реакциюю смесь нагревали до комнатной температуры. Реакцию проводили в течение 5 часов. Реакционный раствор концентрировали досуха при 40°С. Было получено 55 мг E5. Выход составил 98%. ИЭР-МС:m/z=580,3 [M+H]⁺.

Стадия 6. Синтез MC-GGFG-DXD

55 мг E5 отвешивали в одnogорлую колбу на 100 мг, добавляли 2 мл N,N-диметилформаида, добавляли 48 мг MC-GGF-ОН (малеимидокапроил-глицил-глицил-фенилаланина) и реакциюю смесь охлаждали до 0°С. Добавляли 54 мг HATU и добавляли 30 мг DIEA. Реакциюю смесь нагревали до комнатной температуры. Реакцию проводили в течение 1 часа. Туда добавляли 100 мл этилацетата и 100 мл воды и смесь перемешивали в течение 20 мин. Органическую фазу отделяли. Органическую фазу концентрировали досуха при 40°С. Реакционный раствор подвергали хроматографии на колонке с силикагелем (этилацетат:метанол = 10:1) с получением 26 мг MC-GGFG-DXD. Выход составил 27%. ИЭР-МС:m/z=1034,51 ([M+H]⁺). ¹H-ЯМР (500 МГц, ДМСО-d₆) 8,62 (1H, т, J=6,5 Гц), 8,50 (1H, д, J=9,0 Гц), 8,29 (1H, т, J=6,0 Гц), 8,12 (1H, д, J=8,0 Гц), 8,06 (1H, т, J=6,0 Гц), 8,00 (1H, т, J=6,0 Гц), 7,76 (1H, д, J=11 Гц), 7,30 (1H, с), 7,25~7,15 (5H, м), 6,90 (2H, с), 6,52 (1H, уш. с), 5,61~5,57 (1H, м), 5,42~5,40

(2H, м), 5,19~5,16 (2H, м), 4,64 (2H, д, J=7,0 Гц), 4,49~4,44 (1H, м), 4,05~4,01 (2H, м), 3,76~3,51 (6H, м), 3,37~3,32 (2H, м), 3,21 ~3,11 (2H, м), 3,02 (1H, дд, J=4,5, 14,0), 2,77 (1H, дд, J=9,5, 13,5), 2,37 (3H, с), 2,21~2,15 (2H, м), 2,09 (2H, т, J=7,5 Гц), 1,91~1,81 (2H, м), 1,49~1,42 (4H, м), 1,20~1,14 (2H, м), 0,87 (3H, т, J=6,5 Гц).

Пример 14. Синтез дейтерированного MC-GGFG-DXD (MC-GGFG-DDDXD), дейтерированного DXD (DDDXD) и DXD



Стадия 1. Синтез интермедиата А

В одnogорлую колбу емкостью 3 л в атмосфере азота помещали 80 г этилдиазоацетата, и добавляли 800 мл дихлорметана и 800 мл 1%-ного раствора дейтерированной уксусной кислоты (8 г дейтерированной уксусной кислоты растворяли в 800 мл дейтериевой воды). Реакционный раствор перемешивали при комнатной

температуре в течение 75 ч в условиях защиты от света. Органическую фазу отделяют и собирают, водную фазу 2 раза экстрагируют дихлорметаном (200 мл × 2) и объединяют органические фазы. Органическую фазу промывали 200 мл дейтериевой воды, полученную органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия, сульфат натрия удаляли фильтрованием, фильтрат концентрировали досуха при пониженном давлении при 20°C, получая 49,25 г интермедиата А. Выход составил 66%. ^1H ЯМР (500 МГц, CDCl_3) δ 4,27 (к, J = 7,1 Гц, 1H), 1,31 (т, J = 7,1 Гц, 2H).

Стадия 2. Синтез интермедиата В

В круглодонную колбу вместимостью 2 л отвешивали 50 г N-флуоренилметоксикарбонил-глицил-глицина, добавляли 750 мл тетрагидрофурана и 150 мл ледяной уксусной кислоты, смесь перемешивали при 40 °С в течение 20 мин, добавляли 100 г тетраацетата свинца, нагревали реакционную смесь до 80 °С и затем проводили реакцию в течение 3 часов. Реакционный раствор охлаждали до комнатной температуры и фильтровали под вакуумом, а осадок на фильтре промывали 250 мл этилацетата. Фильтрат концентрировали досуха. Фильтрат растворяли, добавляя 330 мл дихлорметана и 670 мл этилацетата, с получением органической фазы. Органическую фазу промывали 3 раза 30% водным раствором бикарбоната калия (500 мл × 3). Органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат концентрировали досуха при пониженном давлении и растворяли, добавляя 100 мл дихлорметана; Затем добавляли 100 мл н-гексана, смесь перемешивали при комнатной температуре до осаждения твердого вещества, а затем добавляли 300 мл смешанного раствора н-гексана и дихлорметана (н-гексан:дихлорметан = 1:1) и перемешивали в течение ночи. Реакционный раствор фильтровали и осадок на фильтре сушили в вакуумном сушильном шкафу при 40°C в течение 4 ч, получая 37,3 г интермедиата В. Выход составил 72%. ЖХ-МС (ИЭР) m/z: 391,09 [M+Na]⁺.

Стадия 3. Синтез интермедиата С

78 г интермедиата В отвешивали в одногорлую колбу на 3000 мл, туда же добавляли 800 мл дихлорметана и к смеси добавляли 45 г соединения А. Одногорлую колбу на 3000 мл помещали в баню со льдом и водой, и реакционную смесь охлаждали до 0°C. 16 г трет-бутоксид лития растворяли в 400 мл дихлорметана с получением раствора трет-бутоксид лития. Раствор трет-бутоксид лития добавляли в круглодонную колбу на 3000 мл. Реакцию проводили при 0°C в течение 3 часов. Реакционный раствор нагревали до комнатной температуры, добавляли 800 мл воды и перемешивали. Органическую фазу отделяли и собирали. Водную фазу экстрагировали 400 мл дихлорметана. Органические фазы объединяли. Органическую фазу один раз промывали 800 мл насыщенного солевого

раствора, сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали; фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Реакционный раствор подвергли хроматографии на колонке с силикагелем (петролейный эфир:этилацетат = 3:1) с получением 61 г интермедиата С. Выход составил 70%. ЖХ-МС (ИЭР) m/z : 437,34 $[M+Na]^+$.

Стадия 4. Синтез соединения D

31,2 г соединения С добавляли к 270 мл дейтерированного метанола и 70 мл тяжелой воды, смесь перемешивали на бане со льдом, затем добавляли 5,5 г NaOH, нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение ночи. К реакционному раствору добавляли 300 мл этилацетата и 300 мл воды для экстракции, а к водному слою добавляли 20 мл ледяной уксусной кислоты для доведения pH до 2-3; твердое вещество выпадало в осадок и фильтровалось под вакуумом с получением 20,3 г соединения D. Выход составил 69,8%. ЖХ-МС (ИЭР) m/z : 409,08 $[M + Na]^+$.

Стадия 5. Синтез соединения E

2,0 г дигидрата мезилата экзатекана и 1,63 г соединения D взвешивали в круглодонной колбе на 100 мл. Туда добавляли 40 мл N,N-диметилформамида и смесь перемешивали. Реакционный раствор охлаждали до 0°C. Туда последовательно добавляли 2,0 г 2-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония гексафторфосфата и 1,82 г N,N-диизопропилэтиламина. Реакцию проводили при 0°C в течение 3 часов. Реакционный раствор выливали в 120 мл воды со льдом. Реакционный раствор перемешивали в течение 1 ч и фильтровали. Осадок на фильтре растворяли в дихлорметане. Реакционный раствор подвергли колоночной хроматографии (100 г силикагеля 100-200 меш, дихлорметан:метанол = 30:1, 2 л) с получением 2,6 г соединения E. Выход составил 92%. ЖХ-МС (ИЭР) m/z : 804,84 $[M + H]^+$.

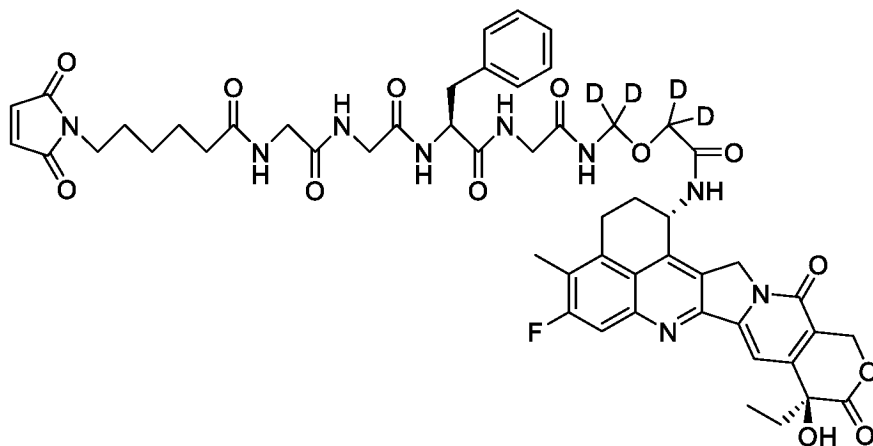
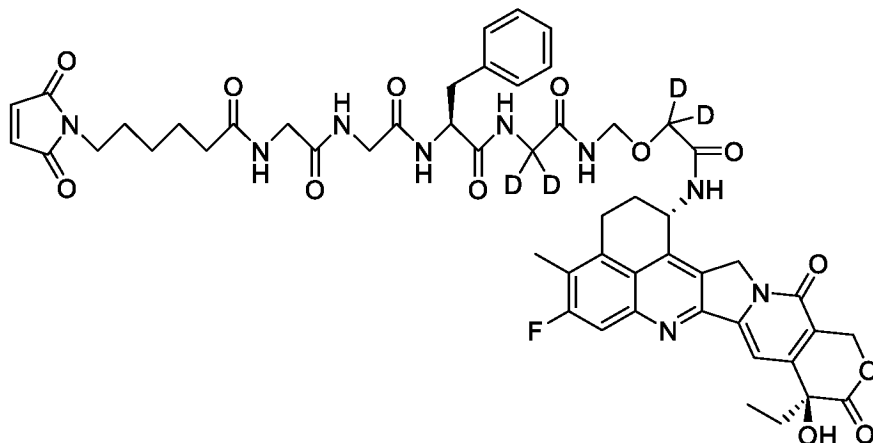
Стадия 6. Получение соединения F

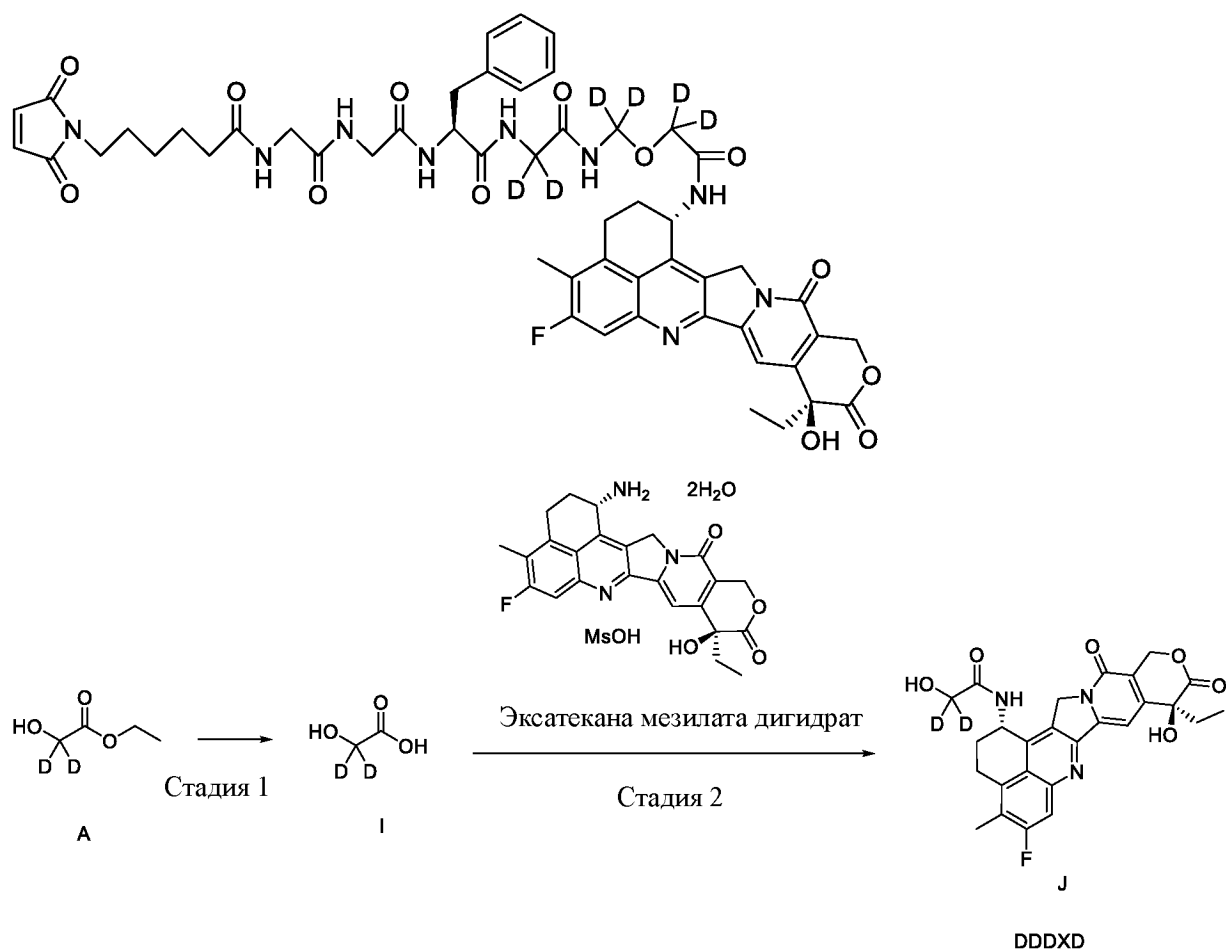
0,38 г 1,8-диазабицикло[5.4.0]ундец-7-ена отвешивали в круглодонную колбу на 100 мл. В круглодонную колбу добавляли 20 мл тетрагидрофурана и смесь перемешивали. Реакционный раствор охлаждали до 0°C. Отвешивали 2,0 г соединения E и растворяли в 20 мл тетрагидрофурана. Приготовленный раствор соединения E медленно добавляли в круглодонную колбу на 100 мл. Реакционную смесь естественным образом нагревали до комнатной температуры и оставляли реагировать в течение 3 часов. Реакционный раствор фильтровали в атмосфере азота. Получали 1,45 г соединения F. Выход составил 98%. ЖХ-МС (ЭИР) m/z : 582,39 $[M + H]^+$.

Стадия 7. Получение соединения H

1,00 г соединения F и 0,97 г соединения G отвешивали в круглодонную колбу на

100 мл и добавляли туда 10 мл N,N-диметилформамида. Реакционный раствор охлаждали до -20°C и добавляли 0,34 г 1-гидроксibenзотриазола и 0,49 г гидрохлорида 1-(3-диметиламинопропил)-3-этилкарбодиимида. Реакцию проводили при -20°C в течение 3 часов. В реакционный раствор добавляли 20 мл ДХМ и 20 мл воды, смесь перемешивали в течение 0,5 ч, оставляли для разделения жидкости и собирали органическую фазу. Органическую фазу сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат концентрировали досуха при пониженном давлении. Реакционный раствор подвергали хроматографии на колонке с силикагелем (дихлорметан:метанол = 15:1) с получением 400 мг соединения Н. Выход составлял около 22%. МС m/s: 1037,08 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Н-ЯМР (500 МГц, ДМСO-d6) 8,62 (1H, т, J=6,5), 8,49 (1H, д, J=8,5), 8,29 (1H, т, J=5,5), 8,12 (1H, д, J=8,0), 8,06 (1H, т, J=5,5), 8,00 (1H, т, J=5,5), 7,74 (1H, д, J=10,5), 7,30 (1H, с), 7,27~7,12 (5H, м), 6,98 (2H, с), 6,51 (1H, уш. с), 5,61~5,58 (1H, м), 5,45~5,37 (2H, м), 5,22~5,13 (2H, м), 4,64 (2H, д, J=6,5), 4,49~4,45 (1H, м), 3,76~3,57 (6H, м), 3,37~3,32 (2H, м), 3,24~3,09 (2H, м), 3,02 (1H, дд, J=4,5, 14,0), 2,77 (1H, дд, J=9,5, 13,5), 2,36 (3H, с), 2,23~2,14 (2H, м), 2,09 (2H, т, J=7,5), 1,91~1,79 (2H, м), 1,49~1,42 (4H, м), 1,20~1,14 (2H, м), 0,87 (3H, т, J=7,5).





Стадия 1. Синтез интермедиата I

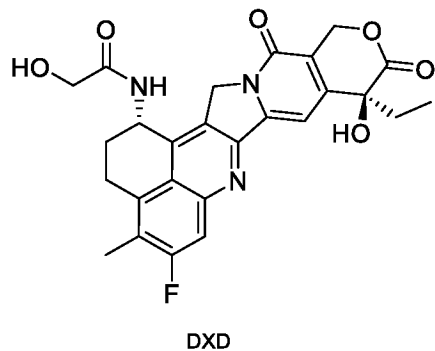
0,85 г соединения А добавляли к 9 мл дейтерированного метанола и 1 мл тяжелой воды, смесь перемешивали на бане со льдом, затем добавляли 0,32 г гидроксида натрия и перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Реакционный раствор концентрировали при пониженном давлении при 40°C с получением соединения I, которое непосредственно использовали на следующей стадии без очистки.

Стадия 2. Синтез соединения J (DDDXD)

0,30 г дигидрата мезилата экзатекана и 0,056 г интермедиата I добавляли к 3 мл N,N-диметилформамида. Смесь перемешивали на ледяной бане с последующим добавлением 0,32 г 1H-бензотриазол-1-ил-окситрипирролидинилгексафторфосфата и 0,22 г N,N-диизопропилэтиламина и перемешивали при комнатной температуре в течение 4 часов. Реакционный раствор подвергали жидкостной хроматографии с получением 0,18 г соединения J. Выход составил 64,3%. ЖХ-МС (ИЭР) m/z : 496,37 $[M+H]^+$. 1H -ЯМР (500 МГц, ДМСО- d_6) 8,39 (д, J = 8,9 Гц, 1H), 7,70 (д, J = 10,9 Гц, 1H), 7,29 (с, 1H), 6,52 (с, 1H), 5,58 ~ 5,54 (м, 1H), 5,47 (с, 1H), 5,40 (с, 2H), 5,17~5,02 (м, 2H), 3,24~3,03 (м, 2H), 2,34 (с, 3H), 2,25~2,09 (м, 2H), 1,92~1,80 (м, 2H), 0,87 (т, J = 7,3 Гц, 3H).

Кроме того, DXD был приготовлен в соответствии со способом, описанным в

Примере 76 из описания патента WO 2014057687.



Пример 15. Получение конъюгатов антитело-лекарственное средство

Реагенты:

Раствор А: буфер PBS с pH 7,4

Раствор В: 10 мМ водный раствор ТСЕР

(трис(2-карбоксиэтил)фосфингидрохлорида)

Раствор С: ДМСО (диметилсульфоксид)

Раствор D: гистидиновый буфер (содержащий 0,89 мг/мл L-гистидина и 4,04 мг/мл моногидрата гидрохлорида L-гистидина)

Раствор E: раствор сахарозы 700 мг/мл (содержит раствор D)

Раствор F: 20 мг/мл Tween 80 (содержит раствор D)

Антитело: трастузумаб, 23C2 Her2-2

Линкер-полезная нагрузка (линкер-цитотоксический лекарственный компонент):
MC-GGFG-DXD и MC-GGFG-DDDXD

Таблица 9: Экспериментальные условия и группы:

Антитело (N1): ТСЕР (N2)		Антитело (N1): соединение (N3)
1:6/1:6,6		1:11,6/1:9,6
Серийный номер	Группы	
1	Насыщенная конъюгация трастузумаба с MC-GGFG-DXD (N1:N2 = 1:6, N1:N3 = 1:11,6)	
2	Насыщенная конъюгация трастузумаба с MC-GGFG-DDDXD (N1:N2 = 1:6, N1:N3 = 1:11,6)	
3	Насыщенная конъюгация 23C2 Her2-2 с MC-GGFG-DXD (N1:N2 = 1:6,6, N1:N3 = 1:9,6)	
4	Насыщенная конъюгация 23C2 Her2-2 с MC-GGFG-DDDXD (N1:N2 = 1:6,6, N1:N3 = 1:9,6)	

Процедуры:

1. Замена антител

- a. центрифужная пробирка для ультрафильтрации с 30 кД полностью смачивалась раствором А;
- b. антитело заменяли раствором А;
- c. добавляли соответствующее количество раствора А, чтобы довести концентрацию антител до 5 мг/мл (23С2 Her2-2) и 7,5 мг/мл (трастузумаб).

2. Восстановление антитела

- a. рассчитывали молярную массу антитела и записывали как N1;
- b. в раствор антител добавляли соответствующее количество раствора В, чтобы убедиться, что молярная масса ТСЕР в реакционной смеси равна N2;
- c. центрифужную пробирку для ультрафильтрации заворачивали в алюминиевую фольгу, помещали на роторную качалку для культивирования и встряхивали на низкой скорости (20 об/мин) и оставляли реагировать в течение 1 ч при 37°C в темноте.

3. Конъюгация

- a. брали соответствующее количество линкера-полезной нагрузки и растворяли в ДМСО, чтобы довести конечную концентрацию до 10 мг/мл;
- b. в раствор антитела добавляли ДМСО, чтобы довести концентрацию антитела до 5 мас.%, а затем к смеси добавляли соответствующее количество раствора линкер-полезная нагрузка, чтобы довести молярную концентрацию до N3;
- c. центрифужную пробирку для ультрафильтрации заворачивали в алюминиевую фольгу, помещали на роторную качалку для культивирования и встряхивали на низкой скорости (20 об/мин) и оставляли реагировать в течение 2 ч при 20°C в темноте.

4. Завершение конъюгации

- a. центрифужную пробирку для ультрафильтрации смачивали раствором D;
- b. антитело заменяли раствором D, добавляли соответствующее количество растворов E и F, довели концентрацию сахарозы и Tween 80 до 90 мг/мл и 0,3 мг/мл, соответственно, смесь замораживали и хранили при -80 °C.

Определение значения DAR (среднее количество лекарственных соединений на молекулу антитела) для конъюгатов антитело-лекарственное средство

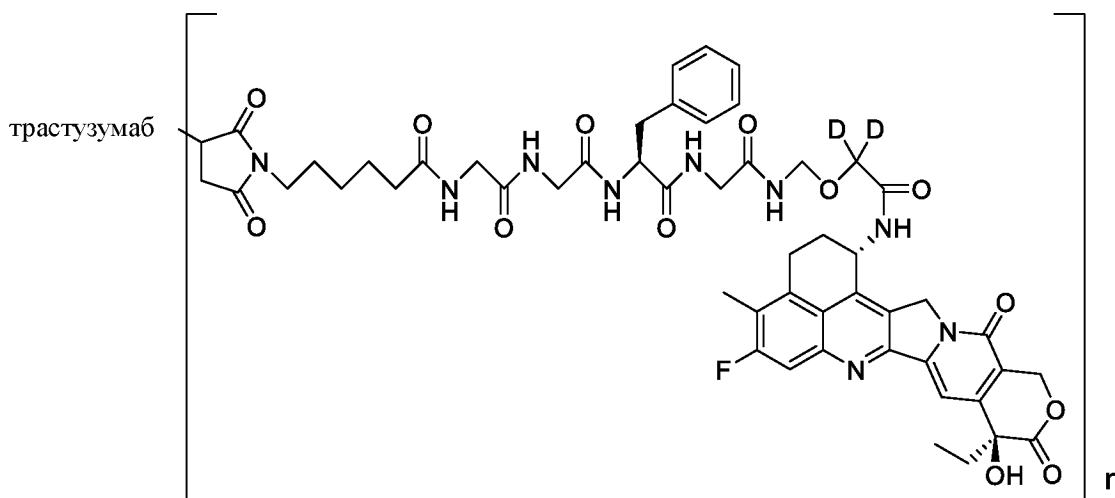
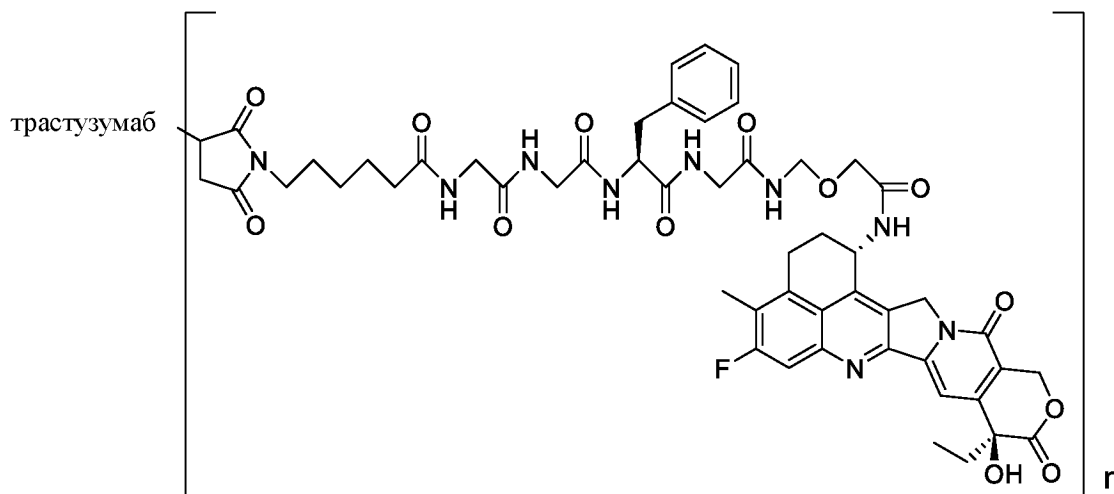
Значения DAR определяли методом ЖХ-МС. К 50 мкг приготовленного образца ADC добавляли 1 мкл гликозидазы ПНГазы F (RHINO BIO, Китай) и инкубировали при 37 °C в течение 20 ч. В эксперименте использовался масс-спектрометр высокого

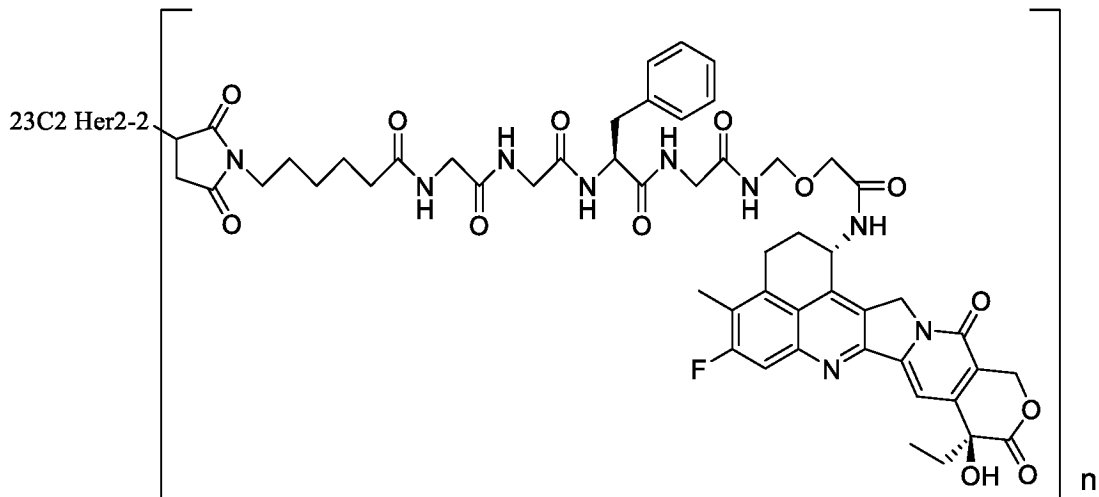
разрешения Xevo G2-XS (Waters, США). Концентрацию образца довели до 5 мкМ, а масс-спектральные данные собирали в режиме определения положительных ионов, применяя метод прямого отбора проб. Собранные масс-спектральные данные для невозстанавливающих условий анализировали и обрабатывали с помощью программного обеспечения UNIFI 1.8.2.169 (Waters, США).

Определение концентрации белка в конъюгатах антитело-лекарственное средство

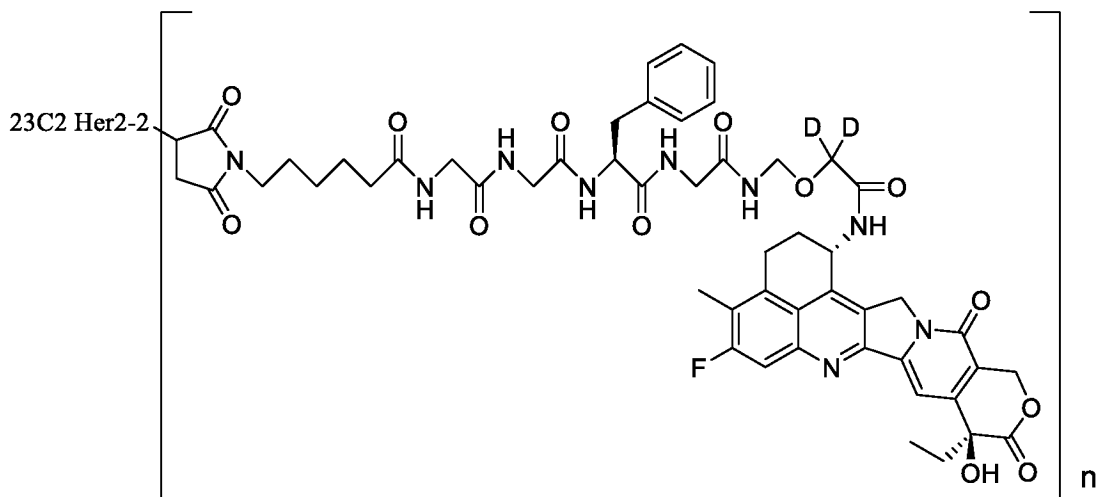
Концентрацию белка определяли методом Лоури. В качестве стандартного вещества использовали трастузумаб и 23С2 Her2-2. Значения поглощения стандартного вещества и приготовленного образца ADC при длине волны ОП650 определялись с помощью микропланшетного ридера, строилась стандартная кривая, значение поглощения образца подставлялось в стандартную кривую, и рассчитывалась концентрация белка.

Следующие конъюгаты антитело-лекарственное средство получали и анализировали описанным выше способом:





23C2 Her2-2-DXD, концентрация антитела: 4,35 мг/мл, DAR: 5,7.



23C2 Her2-2-DDDXD, концентрация антитела: 4,16 мг/мл, DAR: 5,8.

Пример 16 Ферментативная активность дейтерированного DXD in vitro (DDDXD)

1. Получение реагента

- был приготовлен 1% агарозный гель для электрофореза;
- готовили раствор красителя GelRed для замачивания и хранили в темноте;
- рабочий раствор топоизомеразы I готовили из сверхчистой воды и буфера.

2. Состав образца

- соединение (DDDXD) повторно растворяли и разбавляли в ДМСО (серийно разбавляли в 10 раз от исходной концентрации 200 мкМ до 5 концентраций).

3. Реакционная смесь

- положительный контроль: 15 мкл сверхчистой воды + 2 мкл 10× буфера для ДНК-топоизомеразы I + 2 мкл 0,1% BSA + 1 мкл pBR322DNA;
- отрицательный контроль: 14 мкл сверхчистой воды + 2 мкл 10× буфера для

ДНК-топоизомеразы I + 2 мкл 0,1% BSA + 1 мкл pBR322DNA + 1 мкл рабочего раствора топоизомеразы I;

с. группа образца: 12 мкл сверхчистой воды + 2 мкл 10× буфера для ДНК-топоизомеразы + 2 мкл 0,1% BSA + 1 мкл pBR322DNA + 1 мкл рабочего раствора топоизомеразы I + 2 мкл соединения.

4. Процедуры

а. указанную выше реакционную смесь помещали на водяную баню при 37°C на 30 мин;

б. в каждую систему пробирок добавляли по 2 мкл загрузочного буфера для прекращения реакции;

с. электрофорез в агарозном геле проводили в течение 1,5 ч при напряжении 2-2,5 В/см;

д. гель после электрофореза окрашивали темными пузырьками GelRed в течение 1,5 ч и фотографировали с помощью устройства для визуализации геля.

Пример 17. Анализ связывания антигена для конъюгатов антитело-лекарственное средство

Со ссылкой на метод Примера 6 измеренные аффинности трастузумаба, 23C2 HER2-2, трастузумаба-DDDXD и 23C2 HER2-2-DDDXD к белку HER2 показаны в таблице 10 ниже:

Название	ka (1/M*c)	kd (1/c)	KD (M)
Трастузумаб	1,23E +05	1,12E-04	9,16E-10
23C2 HER2-2	1,73E+05	6,06E-05	3,49E-10
Трастузумаб-DDDXD	1,28E+05	1,19E-04	9,25E-10
23C2 HER2-2-DDDXD	1,28E+05	3,26E-05	2,55E-10

Результаты демонстрируют, что биспецифическое антитело к Her2 обладало более сильной антигенсвязывающей активностью по сравнению с трастузумабом, а ADC биспецифического антитела к Her2 обладало более сильной антигенсвязывающей активностью по сравнению с ADC трастузумаба.

Пример 18. Анализ эндоцитоза конъюгатов антитело-лекарственное средство

Экспериментальный способ: собирали 1 флакон клеток в логарифмической фазе роста (клетки NCI-N87 и клетки SK-BR-3), плотность доводили до $2,5 \times 10^6$ клеток/мл, и клетки добавляли в 96-луночный планшет по 20 мкл/луночку. Образцы ADC трастузумаб-DDDXD и 23C2 HER2-2-DDDXD, приготовленные в Примере 15, предварительно разбавляли до концентрации 40 мкг/мл и обозначали как S1, а затем

подвергали 3-кратному градиентному разведению для получения соответствующих образцов S1-S9. Кроме того, в качестве контролей использовали DS-8201, контрольный IgG1 (IgG1, не специфичный к HER2; Sino Biological, кат. № HG1K) и конъюгат DDDXD IgG1-DDDXD. Раствор образца, разведенный в градиенте, и меченый реагент для эндоцитоза (Sartorius, 90564) добавляли в планшет для культивирования клеток в количестве 20 мкл/лунку и инкубировали при 37 °С в течение 15 минут. Брали 96-луночный планшет для культивирования клеток и добавляли два типа клеток в количестве 20 мкл на лунку, а затем планшет для культивирования клеток инкубировали при 37 °С в течение 2 часов. 96-луночный планшет для культивирования клеток удаляли и помещали в проточный цитометр для измерения интенсивности сигнала.

Результаты экспериментов по эндоцитозу двух HER2-положительных клеток NCI-N87 и SK-BR-3 показаны на Фиг. 8 и 9, которые демонстрируют, что эндоцитоз ADC биспецифического антитела к Her2 был сильнее, чем эндоцитоз ADC трастузумаба.

Пример 19. Клеточная активность дейтерированного DXD и конъюгатов антитело-лекарственное средство

DXD и DDDXD предварительно разбавляли до 140000 нг/мл в культуральной среде и обозначали как S1, а затем серийно разбавляли в пять раз для получения соответствующих эталонных образцов S1-S9; конечный диапазон концентраций лекарственного средства составлял от 35000 нг/мл до 0,0896 нг/мл, всего 9 концентраций. Собирали HER2-положительные опухолевые клетки NCI-N87 в логарифмической фазе роста, доводили до плотности 1×10^5 клеток/мл и высевали по 100 мкл на лунку, а холостую лунку без каких-либо клеток устанавливали в качестве контроля. Приведенные выше серийно разведенные два образца добавляли по 50 мкл на лунку. Планшет инкубировали в инкубаторе при 37°C с 5% CO₂ в течение 5 дней. Культуральную среду удаляли и добавляли рабочий раствор ССК-8 (Dojindo, Япония, кат. № СК04) по 100 мкл на лунку. Планшет инкубировали в течение 4–5 ч для проявления окраски и помещали в микропланшетный ридер (производитель: Thermo, модель: VarioskanFlash). Значения поглощения при длине волны 450 нм считывали и регистрировали, используя эталонную длину волны 630 нм. Рассчитывали ингибирование пролиферации опухолевых клеток.

Результаты эксперимента с клетками NCI-N87 показаны в таблице 11 ниже:

Название	IC ₅₀ (нМ)
DXD	4,45
DDDXD	4,01

DDDXD показал более сильную ингибирующую активность в отношении пролиферации опухолевых клеток, чем DXD.

Выявляемое антитело и конъюгат антитело-лекарственное средство, приготовленный в Примере 15, предварительно разбавляли до концентрации 20 мкг/мл с использованием культуральной среды и маркировали как S1, а затем серийно разбавляли в пять раз для получения соответствующих образцов S1-S9. Конечный диапазон концентраций лекарственного средства составлял от 5000 нг/мл до 0,0128 нг/мл, всего 9 концентраций. Собирали HER2-положительные опухолевые клетки (NCI-N87, BT474 и SK-BR-3) в логарифмической фазе роста, каждую доводили до плотности 2×10^4 клеток/мл и высевали по 100 мкл на лунку, а холостой лунку без каких-либо клеток устанавливали в качестве контроля. Серийно разведенные образцы добавляли по 50 мкл на лунку. Планшет инкубировали в инкубаторе при 37°C с 5% CO₂. Культуральную среду удаляли, в каждую лунку добавляли 100 мкл среды для детектирования CTG (Promega, кат. № G7572), планшет инкубировали в течение 10 мин для проявления окраски и помещали в устройство для считывания микропланшетов (производитель Thermo, модель: VarioskanFlash) для считывания значения хемилюминесценции. Рассчитывали скорость ингибирования пролиферации опухолевых клеток.

Результаты эксперимента с клетками NCI-N87 показаны в таблице 12 ниже:

Название	Уровень ингибирования, %
Трастузумаб	34,51
Трастузумаб-DDDXD	70,81
23C2 HER2-2	75,73
23C2 HER2-2-DDDXD	90,08

Результаты эксперимента с клетками BT474 показаны в таблице 13 ниже:

Название	Уровень ингибирования, %
Трастузумаб	67,91
Трастузумаб-DDDXD	47,82
23C2 HER2-2	75,56
23C2 HER2-2-DDDXD	73,76

Результаты экспериментов с клетками SK-BR-3 показаны в Таблице 14 ниже:

Название	Уровень ингибирования, %

Трастузумаб	20,36
Трастузумаб-DDDXD	67,15
23C2 HER2-2	62,89
23C2 HER2-2-DDDXD	75,56

Из приведенных выше результатов видно, что способность ADC биспецифического антитела к Her2 уничтожать клетки была лучше, чем у ADC трастузумаба.

Пример 20. Анализ стабильности *in vitro* в микросомах печени

Каждая система инкубации содержала фосфатно-солевой буфер (PBS, pH 7,4), микросомальный белок печени, субстрат (ацетонитриловый раствор тестируемого образца) и НАДФН, инкубацию проводили на водяной бане при 37 °С, а реакцию останавливали путем добавления того же объема ледяного ацетонитрила через 0, 5, 15, 30 и 60 мин. Отрицательные контроли инкубировали с инактивированными нагреванием микросомами печени соответствующих видов. Оставшееся содержимое исходного субстрата определяли методом ЖХ/МС/МС.

Пример 21. Фармакокинетические эксперименты *in vivo* с конъюгатами антитело-лекарственное средство

Метаболические пути *in vivo* и фармакокинетические параметры конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящей заявке определяли со ссылкой на методы, описанные в Yoko Nagai, et al., Comprehensive Preclinical Pharmacokinetic Evaluations of Trastuzumab Deruxtecan (DS-8201a), an HER2-targeting antibody-drug conjugate, in Synomolgus Monkeys, Xenobiotica, 2019, 49(9), 1086-1096.

Пример 22. Ингибирующий эффект конъюгатов антитело-лекарственное средство на ксенотрансплантатную опухоль JIMT-1 у голых мышей с Her2-положительный раком молочной железы

Клетки рака молочной железы JIMT-1 готовили в концентрации 2×10^7 мл \times 0,1 мл на мышь и инокулировали в асептических условиях в правую подмышечную впадину голых мышей. Животных случайным образом делили на 3 группы после подкожной инокуляции ксенотрансплантата опухоли до тех пор, пока объем опухоли не составлял около 100-300 мм³: модельная группа: растворитель (содержащий L-гистидин 0,89 мг/мл, L-гистидин гидрохлорид 4,04 мг/мл, полисорбат 80 0,3 мг/мл, сахараза 90 мг/мл), 6 животных; группа 23C2 Her2-2-DXD: 1,68 мг/кг, р/нед, в/в, 6 животных; группа 23C2 Her2-2-DDDXD: 1,59 мг/кг, раз/нед, в/в, 6 животных. Измерение объема опухоли 2-3 раза в неделю, взвешивание мыши и запись данных; за состоянием животных наблюдали ежедневно. за состоянием животных наблюдали ежедневно.

Относительный вес (RWt) рассчитывали по следующей формуле:

$$RWC(\%) = \frac{W_t}{W_{t_0}} \times 100\% - 100\%$$

где W_{t_0} представляет собой массу тела животного во время введения клетки (т.е. д0), а W_t представляет собой массу тела животного при каждом измерении.

Ингибирование роста опухоли (TGI) рассчитывали по следующей формуле:

$$TGI(\%) = \left(1 - \frac{TW}{TW_0}\right) \times 100\%$$

где TW представляет собой массу опухоли для группы введения, а TW_0 представляет собой массу опухоли для модельной группы.

Масса тела показана в Таблице 15 ниже:

Группы	Дозировка мг/кг	Частота введения	Путь введения	Количество животных		Относительное изменение массы тела (%) Среднее значение \pm стандартное отклонение			
				д0	д4	д6	д12	д18	д24
Модельная группа	-	р/нед	в/в	6	6	5,8 \pm 3,1	9,1 \pm 3,9	9,6 \pm 3,8	15,8 \pm 5,4
23C2 Her2-2-DXD	1,68	р/нед	в/в	6	6	6,7 \pm 6,6	9,9 \pm 5,6	10,2 \pm 4,3	14,5 \pm 4,7
23C2 Her2-2-DDDXD	1,59	р/нед	в/в	6	6	8,8 \pm 3,5	11,5 \pm 5,0	12,4 \pm 2,9	15,0 \pm 5,4

Эффект лекарственного средства показан в Таблице 16 ниже:

Группы	Дозировка мг/кг	Частота введения	Путь введения	Количество животных		Масса опухоли Среднее \pm станд. откл.	TGI (%)
				д0	д24		
Модельная группа	-	р/нед	в/в	6	6	0,594 \pm 0,166	-
23C2 Her2-2-DXD	1,68	р/нед	в/в	6	6	0,189 \pm 0,072	68,2%
23C2 Her2-2-DDDXD	1,59	р/нед	в/в	6	6	0,145 \pm 0,056	75,6%

Результаты демонстрируют, что: 23C2 Her2-2-DXD и 23C2 Her2-2-DDDXD оказывали значительный эффект лекарственного средства на клетки рака молочной железы человека в мышинной модели опухолевых ксенотрансплантатов JMT-1, а 23C2

Her2-2-DDDXD обладал более сильным эффектом ингибирования опухоли по сравнению с 23C2 Her2-2-DXD.

Согласно содержанию, раскрытому в настоящей заявке, способы настоящей заявки были описаны в терминах предпочтительных вариантов осуществления. Однако специалистам в данной области техники будет очевидно, что изменения и рекомбинации могут быть применены к продуктам, элементам, способам и стадиям или последовательности стадий способов, описанных в данном документе, без отклонения от концепции, духа и объема настоящей заявки.

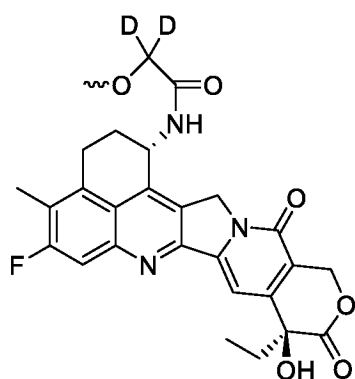
Все патенты, патентные заявки и другие публикации явным образом включены в данный документ посредством ссылки для целей описания и изобретения. Эти публикации предоставлены исключительно потому, что они были раскрыты до даты подачи настоящей заявки. Все заявления относительно дат этих документов или содержания этих документов основаны на информации, доступной заявителю, и не представляют собой какого-либо признания в отношении правильности дат или содержания этих документов. Кроме того, в любой стране или регионе любая ссылка на эти публикации в данном документе не должна рассматриваться как признание того, что публикации являются частью общепризнанных знаний в данной области техники. Раскрытое содержание всех документов, цитируемых в данном документе, настоящим включено посредством ссылки в той мере, в какой они предоставляют иллюстративные, процедурные и другие подробности, дополняющие описанные в данном документе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

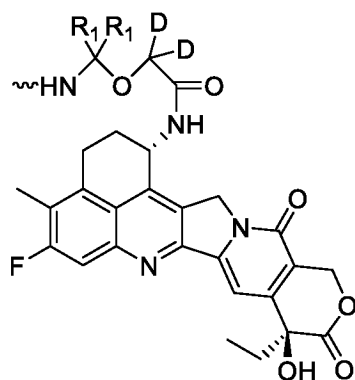
1. Конъюгат антитело-лекарственное средство общей формулы At-(L-U)_n или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где At представляет собой компонент в виде антитела, L представляет собой линкерный компонент, U представляет собой цитотоксический лекарственный компонент, а n является целым числом или десятичным числом, выбранным из группы, состоящей из 1-10, где U представляет собой ингибитор топоизомеразы I камптотecin, а компонент L и/или компонент U имеет дейтерированную модификацию.

2. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по п. 1, где U выбран из группы, состоящей из SN-38, производного SN-38, экзатекана и производного экзатекана.

3. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 1-2, причем конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру формулы III или формулы IV, приведенную ниже:



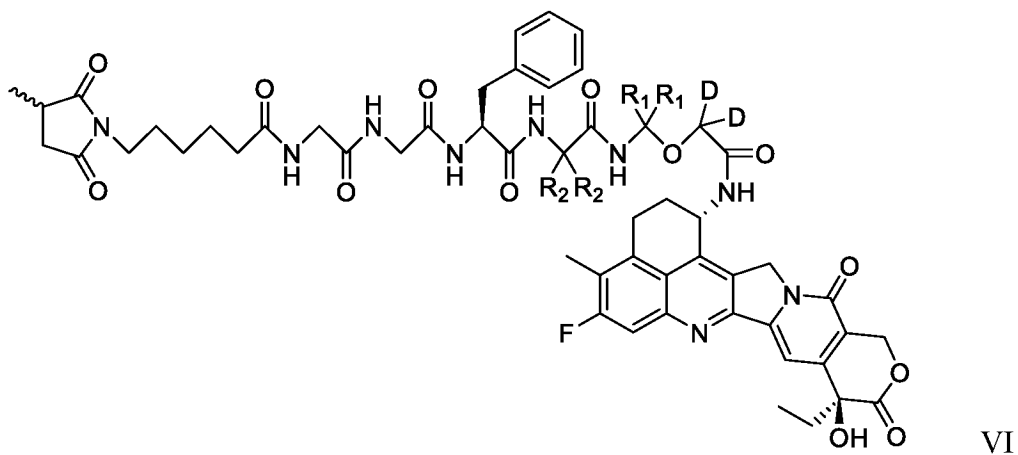
III или



IV

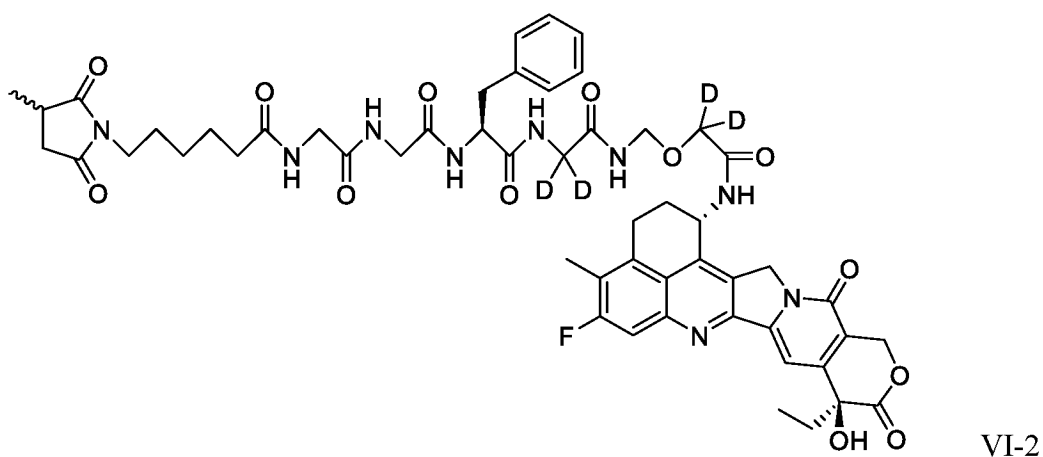
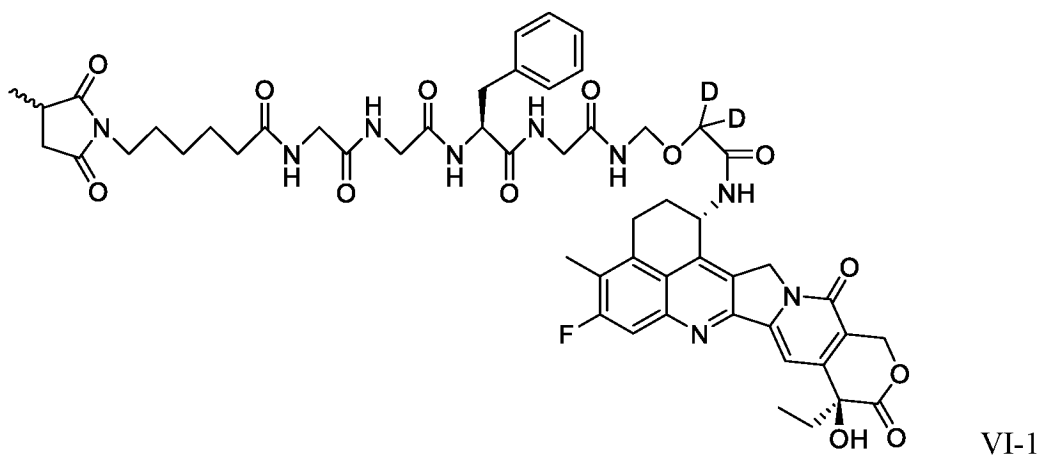
в формуле IV R₁ выбран из группы, состоящей из водорода (H) и дейтерия (D).

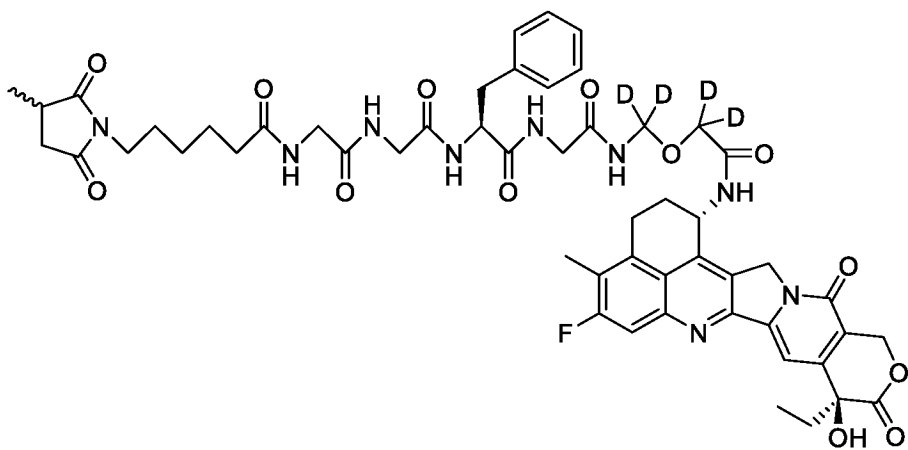
4. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 1-3, причем конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру формулы VI, приведенную ниже:



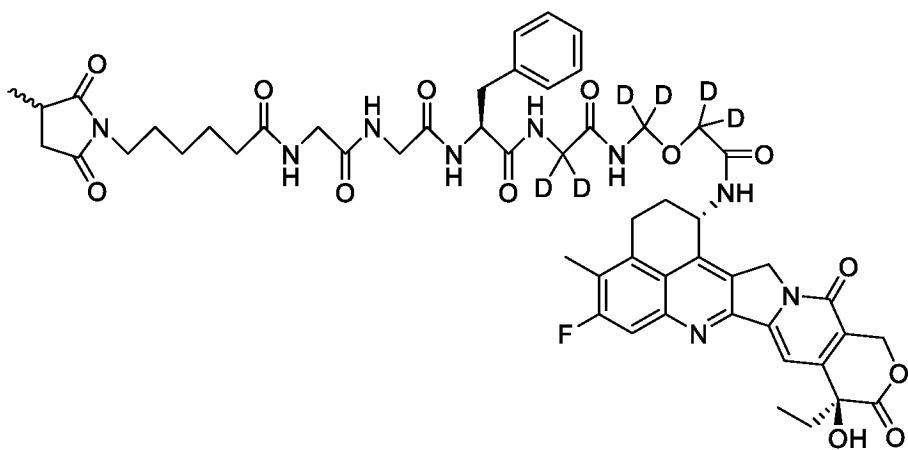
где каждый из R_1 и R_2 независимо выбран из группы, состоящей из водорода (H) и дейтерия (D).

5. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по п. 4, причем формула VI имеет структуру VI-1, VI-2, VI-3 или VI-4, приведенную ниже:





VI-3 или



VI-4.

6. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 1–5, в котором Ат представляет собой антитело, способное специфически связываться с HER2.

7. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по п. 6, в котором Ат содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, который является моновалентным и специфически связывается с эпитопом ВКД4 HER2 на HER2-экспрессирующей клетке, при этом первый антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv и содержит CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи, CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи и CDR3 тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 27, 28 и 29, соответственно, и CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 30, 34 и 32, соответственно.

8. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по п. 7, в котором первый антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи, CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи и CDR3 тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ

ID NO: 43, 28 и 29, соответственно, и CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 30, 31 и 32, соответственно.

9. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по п. 7, в котором первый антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из:

i. первого антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, которые включают аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 41 и 42, соответственно; и

ii. первого антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, которые включают аминокислотные последовательности, имеющие по меньшей мере 80% идентичности с аминокислотными последовательностями, указанными в SEQ ID NO: 41 и 42, соответственно.

10. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 7–9, в котором первый антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, при этом вариабельная область тяжелой цепи включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO:35, и вариабельную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID No:36.

11. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 9–10, в котором VH и VL первого антигенсвязывающего фрагмента расположены от N-конца к C-концу в следующем порядке: VH-линкер-VL.

12. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 6–11, в котором компонент в виде антитела Ат дополнительно содержит второй антигенсвязывающий фрагмент, который является моновалентным и специфически связывается с эпитопом ВКД2 HER2 на HER2-экспрессирующей клетке, второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab.

13. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по п. 12, в котором второй антигенсвязывающий фрагмент содержит CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи, CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи и CDR3 тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ

ID NO: 45, 46 и 47, соответственно, и CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 48, 49 и 50, соответственно.

14. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 12–13, в котором второй антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 37 и 38, соответственно.

15. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 6–14, в котором компонент в виде антитела Ат содержит функциональный домен иммуноглобулина, функционально связанный с первым антигенсвязывающим фрагментом и/или вторым антигенсвязывающим фрагментом, при этом функциональный домен иммуноглобулина, содержащий: i. один или более из CL, CH1, CH2 или CH3, или ii. Fc.

16. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по п. 15, в котором CL, CH1, CH2, CH3 и Fc получены из CL, CH1, CH2, CH3 и Fc IgG человека, соответственно.

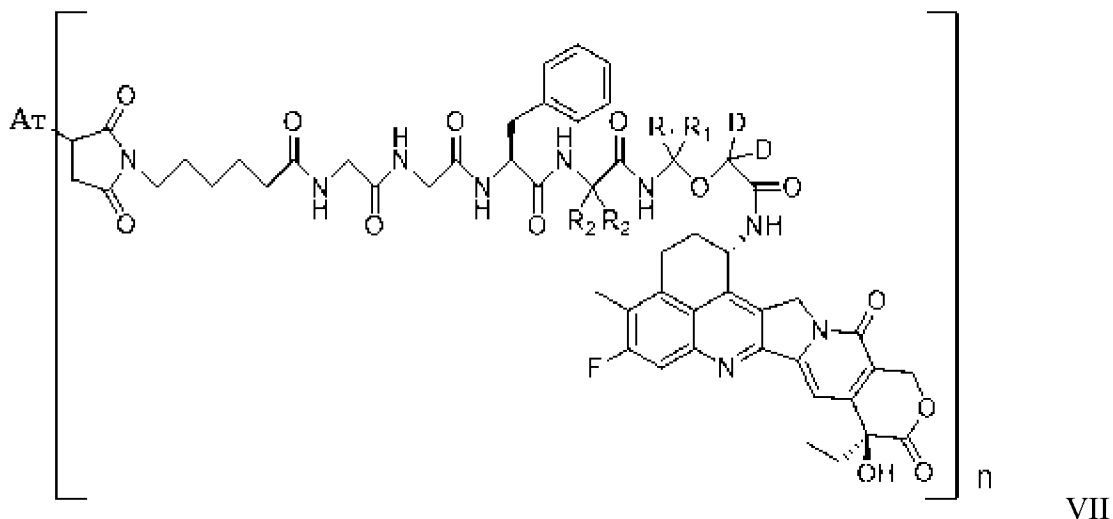
17. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по п. 16, в котором CL, CH1, CH2, CH3 или Fc имеют модификацию или не имеют модификации; предпочтительно, CH3 или Fc имеют модификацию, которая представляет собой аминокислотную замену в положении 435 и/или положении 436 по системе нумерации Kabat.

18. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 15-17, в котором Fc представляет собой димерную Fc, содержащую первый полипептид Fc и второй полипептид Fc, причем первый антигенсвязывающий фрагмент функционально связан с первым полипептидом Fc, а второй антигенсвязывающий фрагмент функционально связан со вторым полипептидом Fc.

19. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 6–18, в котором компонент в виде антитела Ат представляет собой двухвалентное биспецифическое антитело, содержащее: тяжелую цепь, указанную в SEQ ID NO: 11, тяжелую цепь, указанную в SEQ ID NO: 13, и легкую цепь, указанную в SEQ ID NO: 15.

20. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 1–5, причем конъюгат

антитело-лекарственное средство имеет структуру формулы VII, приведенную ниже:



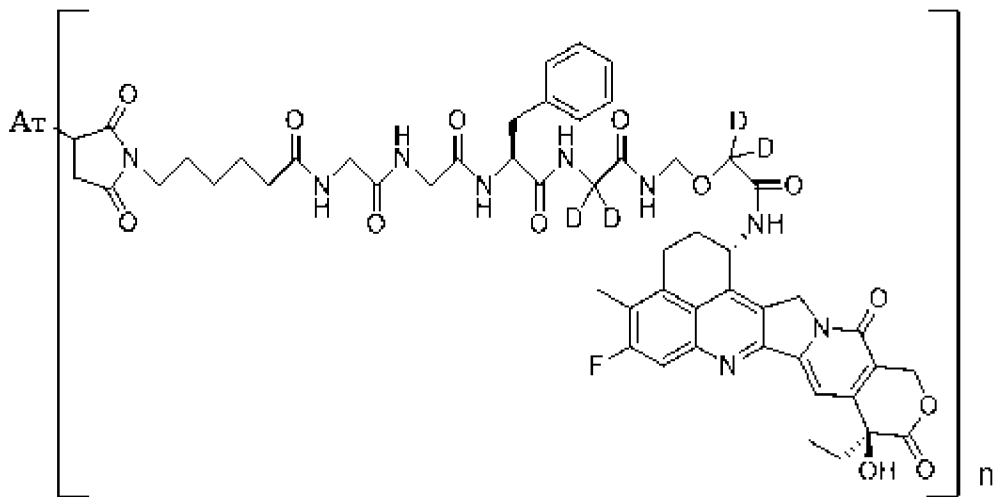
в котором Ат представляет собой компонент в виде антитела, содержащий первый антигенсвязывающий фрагмент и второй антигенсвязывающий фрагмент, причем первый антигенсвязывающий фрагмент представляет собой scFv и содержит CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи, CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 43, 28 и 29, соответственно, и CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 30, 31 и 32, соответственно, второй антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab и содержит CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи, CDR3 тяжелой цепи, CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи и CDR3 тяжелой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 45, 46. и 47, соответственно, и CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности, указанные в SEQ ID NO: 48, 49 и 50, соответственно,

n является целым числом или десятичным числом, выбранным из группы, состоящей из 1–10, и

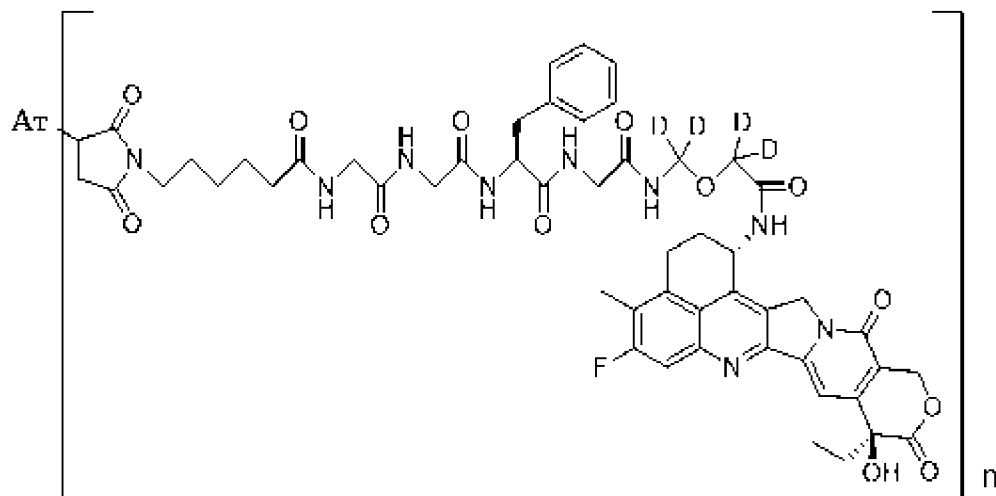
каждый из R_1 и R_2 независимо выбран из группы, состоящей из водорода (H) и дейтерия (D).

21. Конъюгат антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по п. 20, причем формула VII имеет структуру VII-1, VII-2, VII-3 или VII-4, приведенную ниже:

VII-1

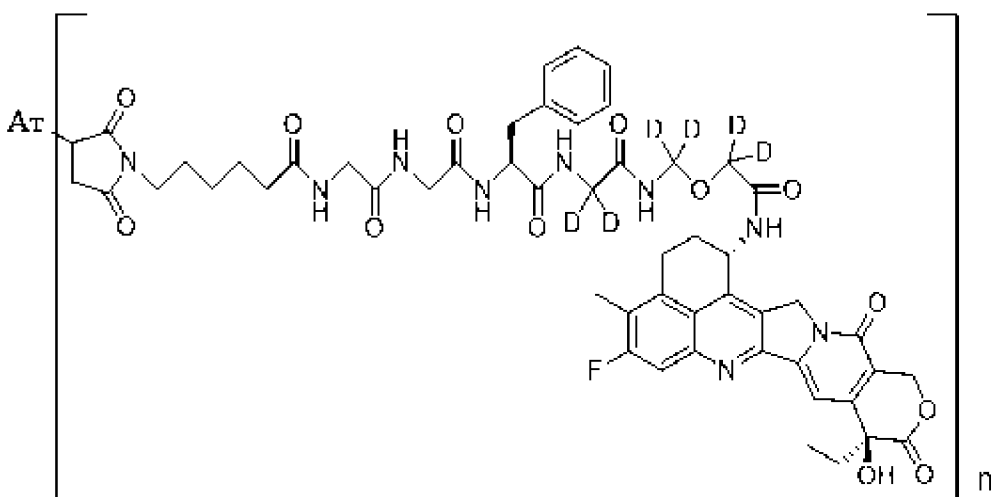


VII-2



VII-3,

или

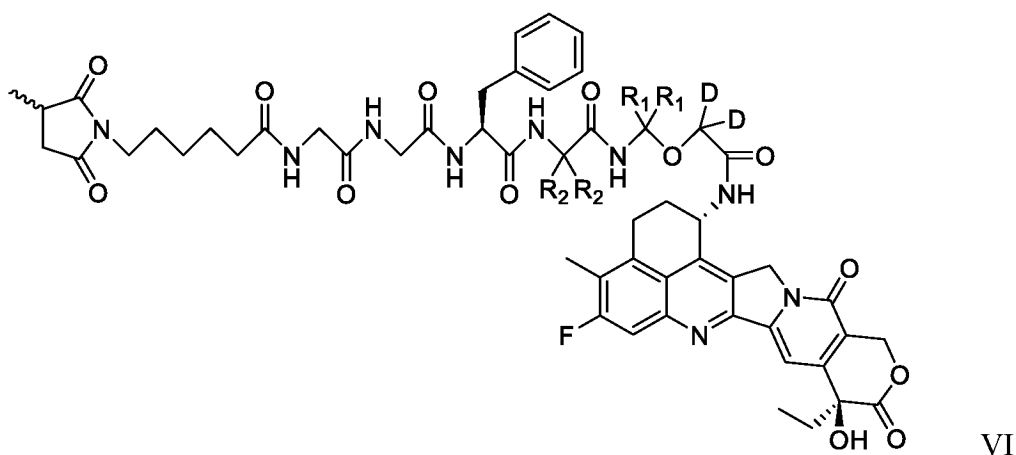


VII-4.

22. Применение конъюгата антитело-лекарственное средство или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата по любому из пп. 1–21 для получения лекарственного препарата для профилактики и лечения злокачественного новообразования, причем злокачественное новообразование предпочтительно представляет собой HER2-положительное злокачественное новообразование,

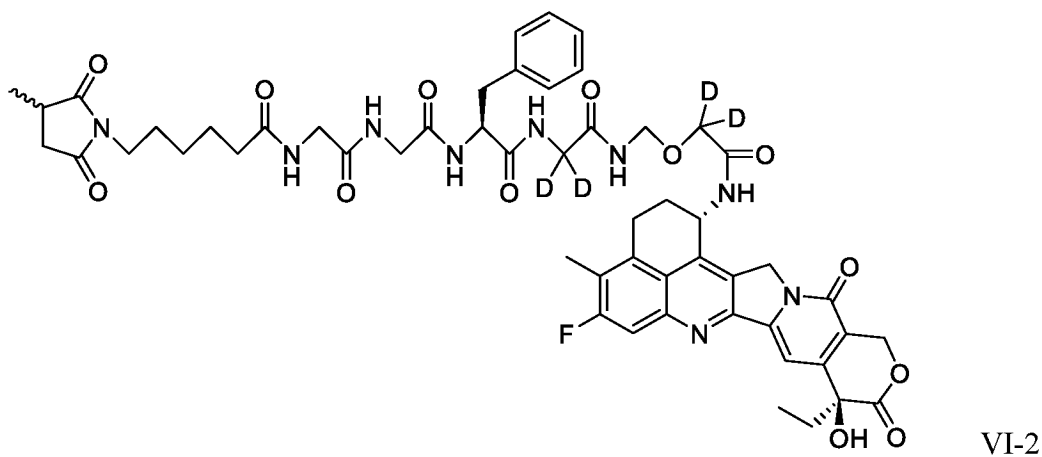
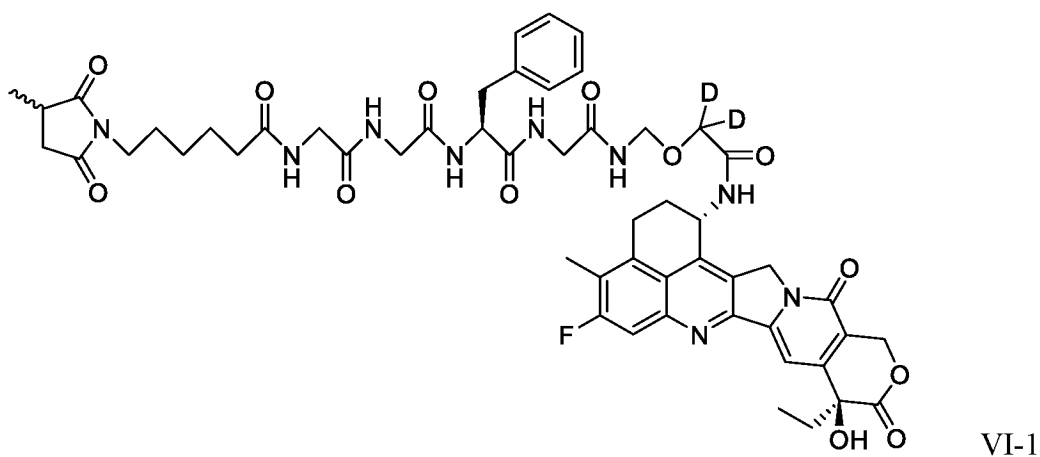
HER2-отрицательное злокачественное новообразование, и злокачественное новообразование, при котором экспрессия HER2 определяется иммуногистохимическим анализом как IHC2+.

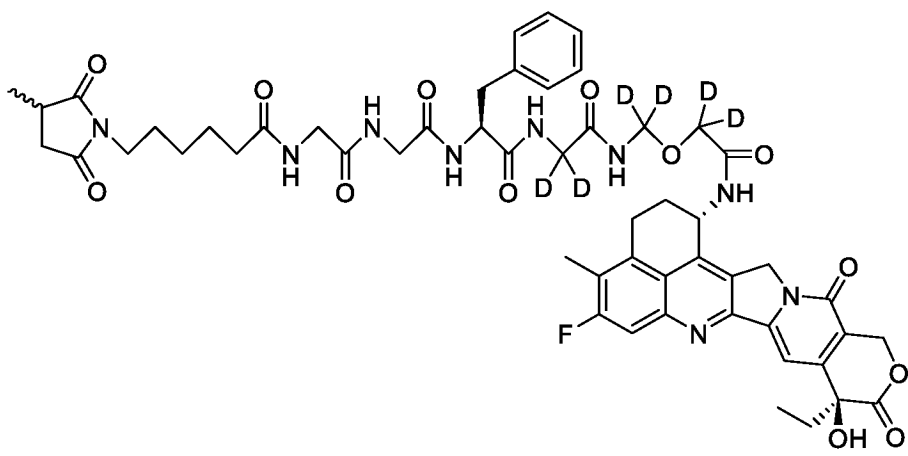
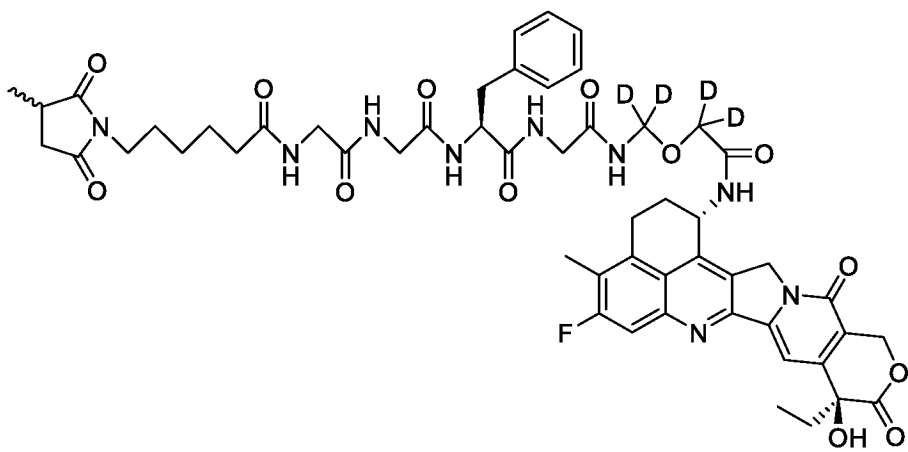
23. Промежуточное соединение линкер-лекарственное средство, имеющее структуру приведенной ниже формулы VI:



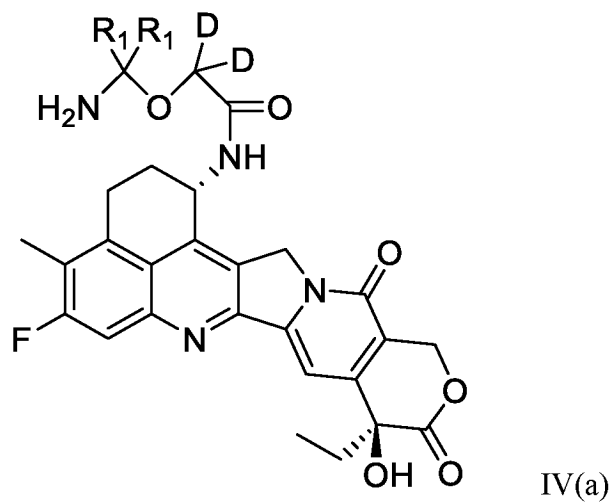
где каждый из R_1 и R_2 независимо выбран из группы, состоящей из водорода (H) и дейтерия (D).

24. Промежуточное соединение линкер-лекарственное средство по п. 23, причем формула VI имеет структуру VI-1, VI-2, VI-3 или VI-4, приведенную ниже:

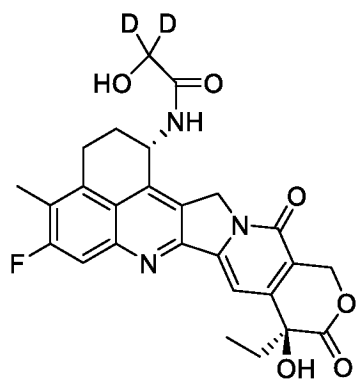




25. Соединение, имеющее структуру формулы IV(a) или формулы III(a), приведенной ниже:

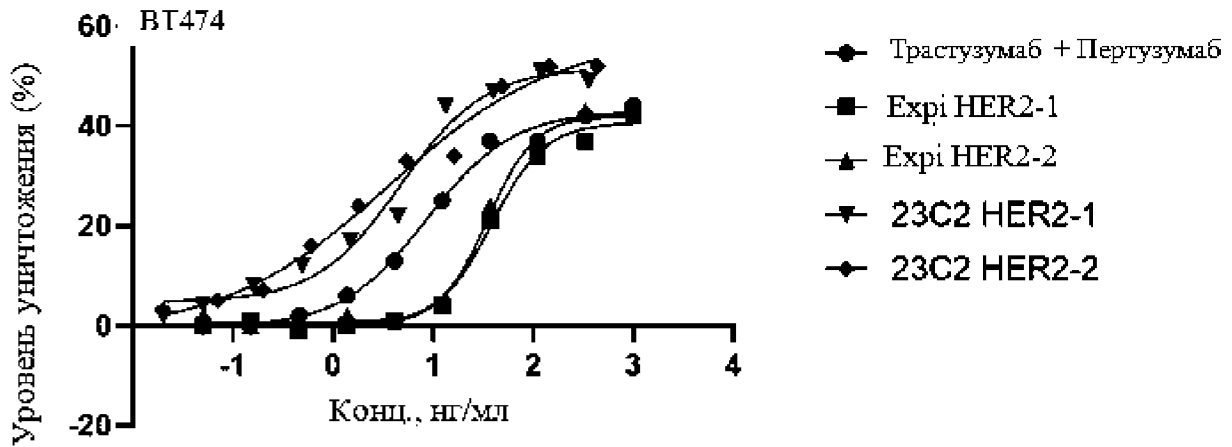


где R_1 выбран из группы, состоящей из водорода (H) и дейтерия (D); или

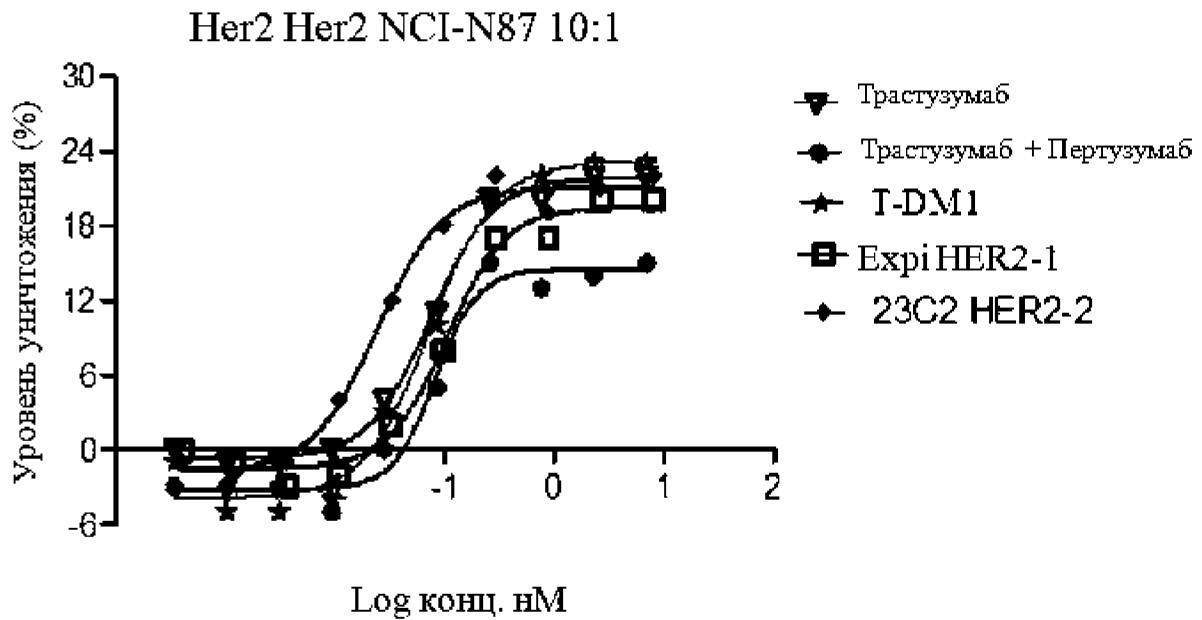


III(a).

КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО - ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

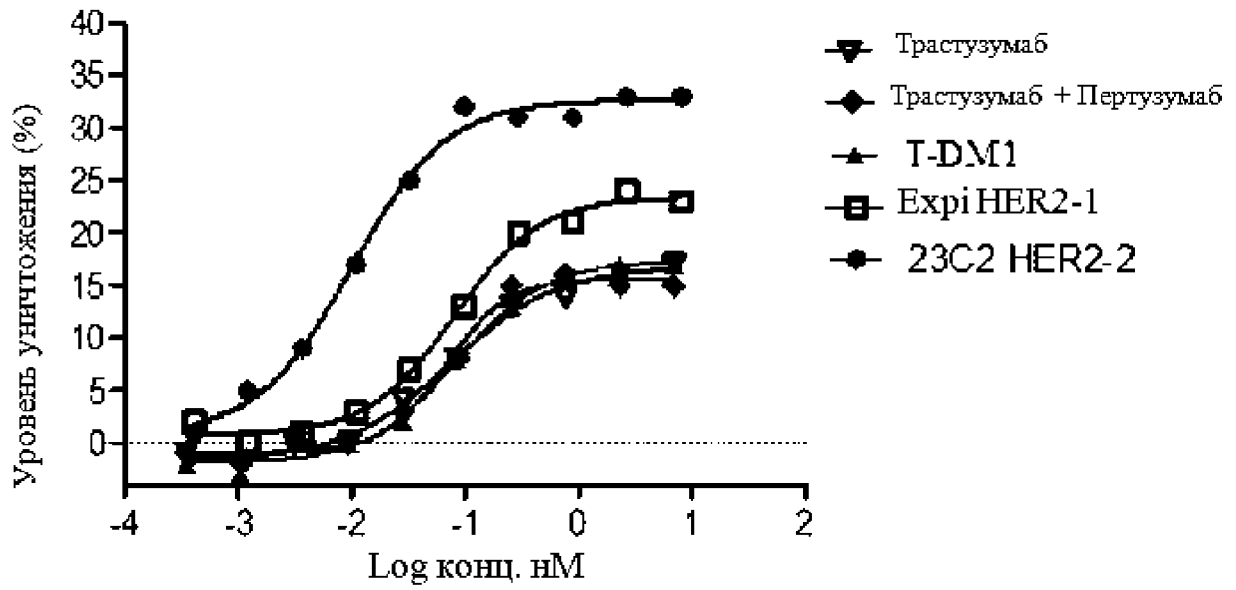


Фиг. 1

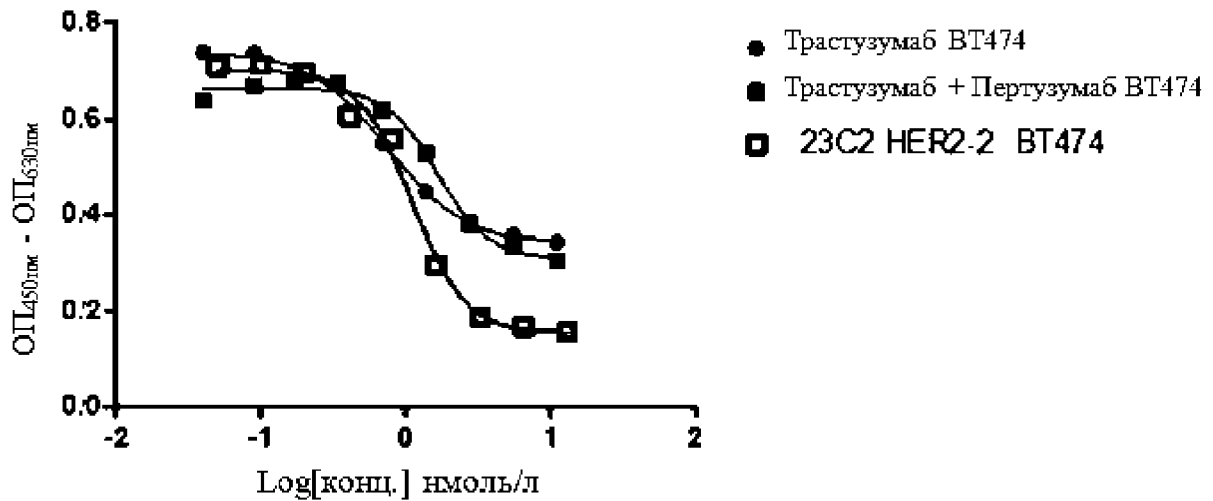


Фиг. 2

Her2 Her2 JИМТ-1 20: 1

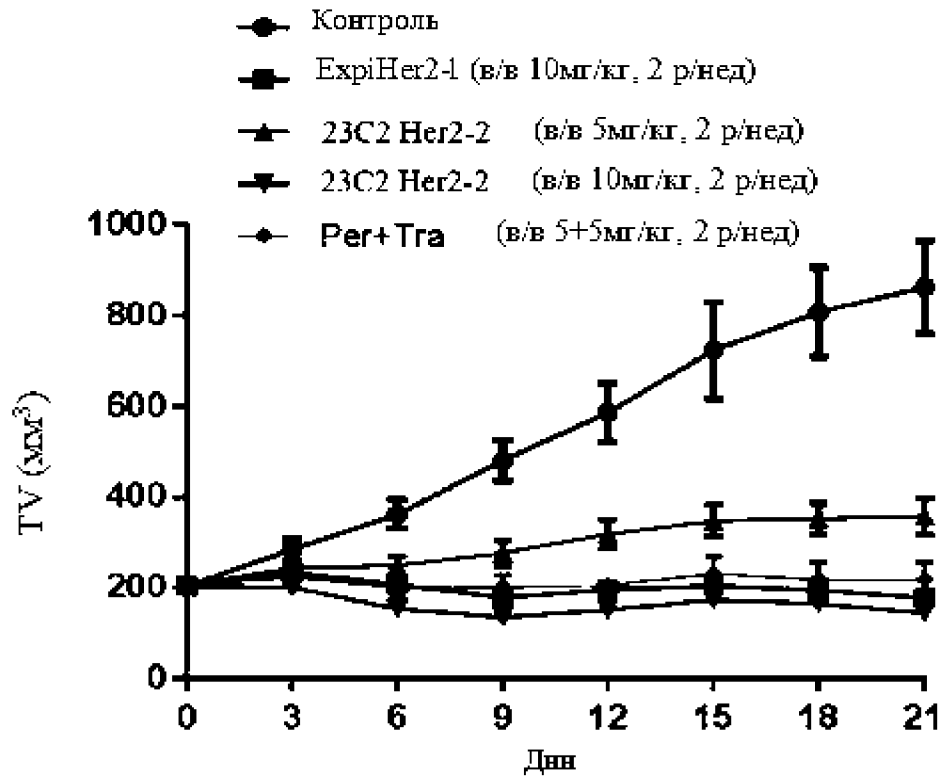


Фиг. 3

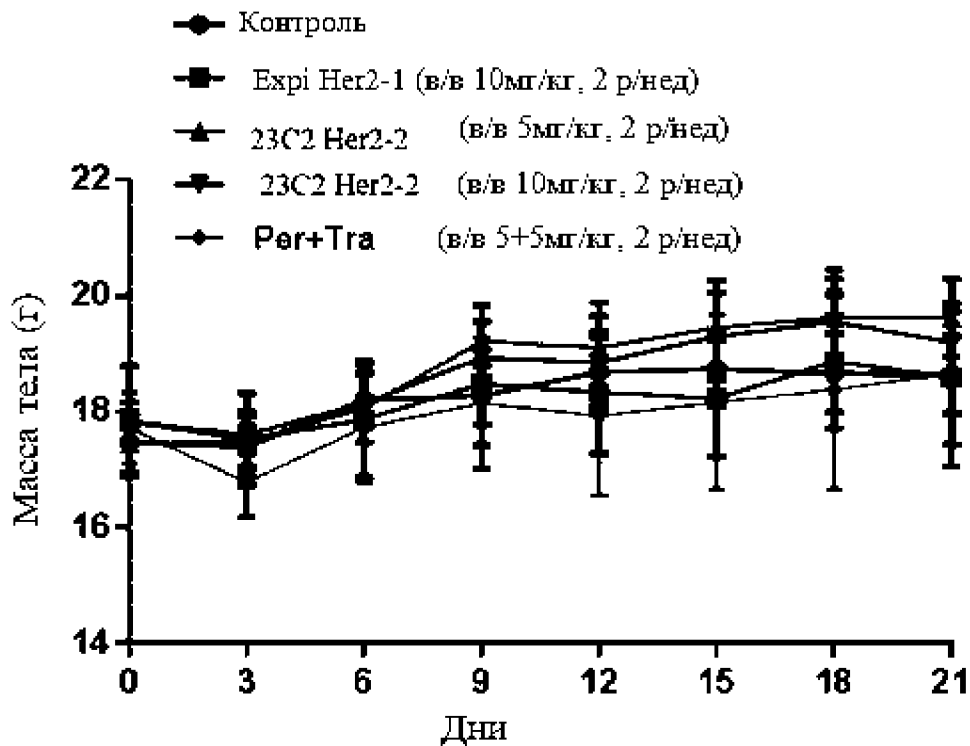


Фиг. 4

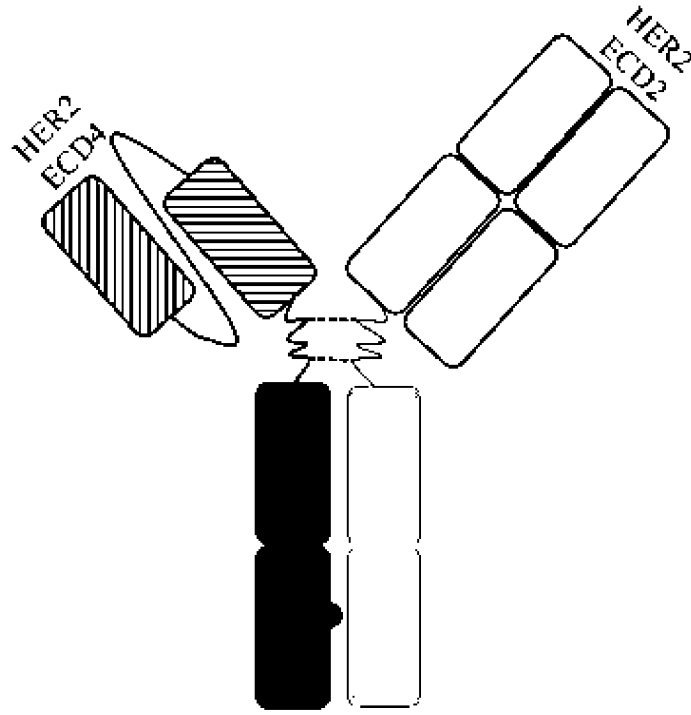
КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛО - ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО



ФИГ. 5

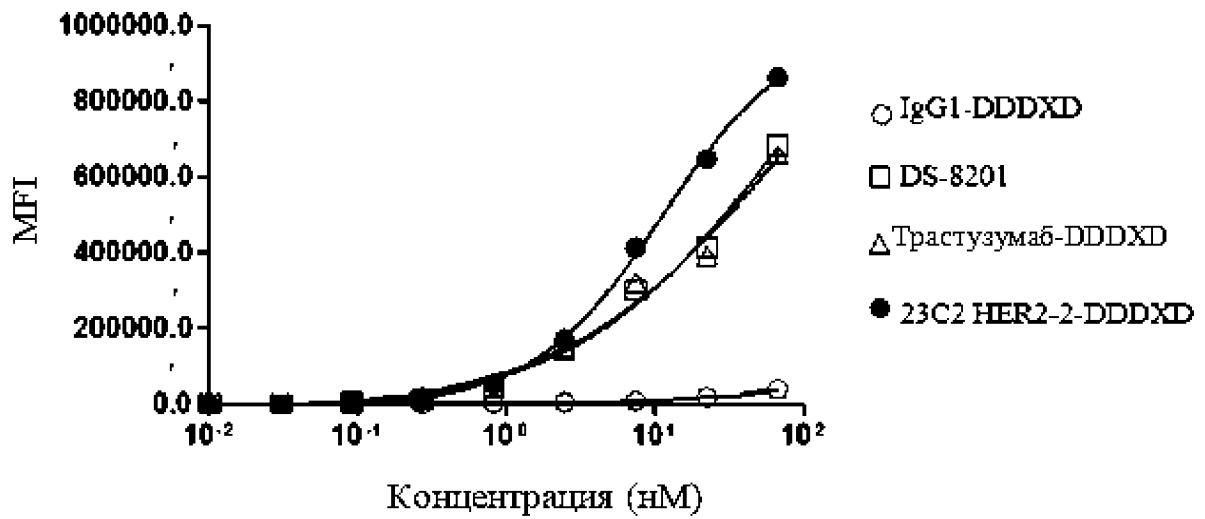


ФИГ. 6

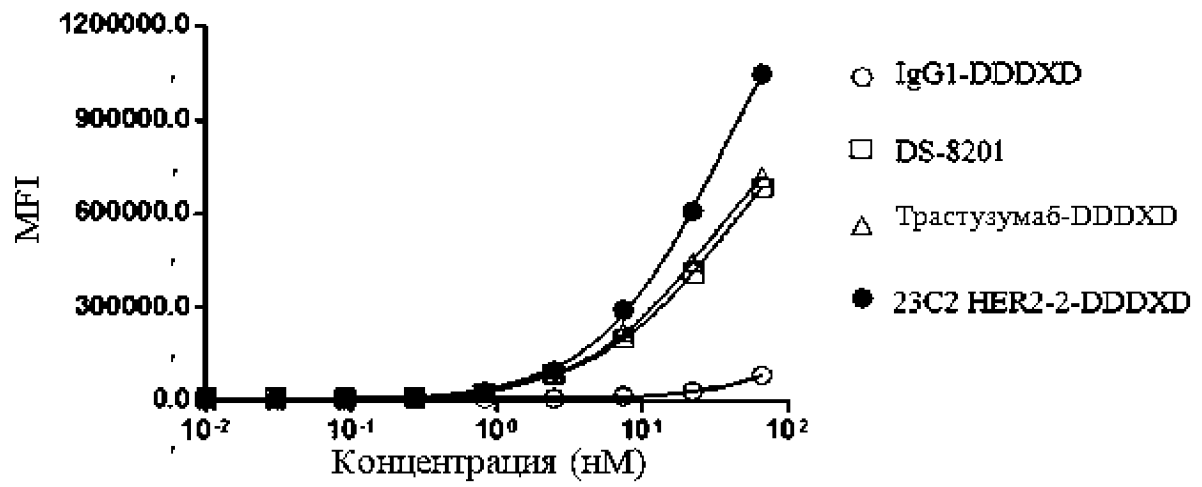


ФИГ. 7

Эндоцитарная активность
NCI-N87



ФИГ. 8

Эндоцитарная активность
SK-BR-3

Фиг. 9