

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391214** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.08.17

(22) Дата подачи заявки
2021.10.25

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

(54) **СРЕДСТВА И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЬЮГАТОВ АНТИТЕЛО-ЛИНКЕР**

(31) 20020492.3; 20203887.3

(32) 2020.10.25; 2020.10.26

(33) EP

(86) PCT/EP2021/079560

(87) WO 2022/084560 2022.04.28

(71) Заявитель:
АРАРИС БАЙОТЕК АГ (CH)

(72) Изобретатель:

Шпихер Филипп, Пробст Филипп,
Аттингер-Толлер Изабелла, Берtrand
Ромэн, Старк Рамона, Грабуловски
Драган (CH)

(74) Представитель:
Безрукова О.М. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способу получения конъюгата антитело-нагрузка с помощью микробной трансглутаминазы (MTG). Данный способ включает этап конъюгирования линкера, содержащего структуру (показана в направлении N -> C) (Sp1)-RK-(Sp2)-B-(Sp3) или (Sp1)-B-(Sp2)-RK-(Sp3), с остатком Gln, входящим в состав антитела, где (Sp1) является химическим спейсером или отсутствует; (Sp2) является химическим спейсером или отсутствует; (Sp3) является химическим спейсером или отсутствует; R - аргинин, или производное аргинина, или миметик аргинина; K - лизин, или производное лизина, или миметик лизина; B - связующий компонент или нагрузка; и где линкер конъюгирован с остатком Gln, входящим в состав антитела, через первичный амин, входящий в боковую цепь остатка лизина, производного лизина или миметика лизина. Также изобретение относится к конъюгатам антитело-линкер, конъюгатам антитело-лекарственное средство и линкерным конструкциям, содержащим мотив RK.

A1

202391214

202391214

A1

СРЕДСТВА И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЬЮГАТОВ АНТИТЕЛО-ЛИНКЕР

Настоящее изобретение относится к способам получения конъюгата антитело-линкер с помощью микробной трансглутаминазы. Изобретение также включает конъюгаты антитело-линкер, конъюгаты антитело-лекарственное средство, линкерные конструкции и фармацевтические композиции, содержащие конъюгаты антитело-линкер или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению, а также способы их применения.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) обычно состоят из антитела и низкомолекулярного лекарственного средства, конъюгированного с антителом с помощью химического линкера. После десятилетий доклинических и клинических исследований для лечения определенных типов опухолей был одобрен ряд конъюгатов ADC, таких как брентуксимаб ведотин (Adcetris®) для лечения рецидивирующей лимфомы Ходжкина и системной анапластической крупноклеточной лимфомы, гемтузумаб озогамицин (Mylotarg®) для лечения острого миелоидного лейкоза, адо-трастузумаб эмтансин (Kadcyla®) для лечения HER2-положительного метастатического рака молочной железы, инотузумаб озогамицин (Besponsa®) и недавно полатузумаб ведотин-piiq (Polivy®) для лечения В-клеточных злокачественных образований. Относительно недавно были одобрены для реализации на рынке энфортумаб ведотин (Padcev®), трастузумаб дерукстекан (Enhertu®), сацитузумаб говитекан (Trodelyv®) и белантамаб мафадотин (Blenrep®). См. обзор конъюгатов ADC, например, в (Zhao P. et al., 2020, Acta Pharmaceutica Sinica B, 10, 1589-1600). Хотя многие конъюгаты ADC продемонстрировали впечатляющую противораковую активность, многие пациенты не отвечают на эти методы лечения, испытывают тяжелые побочные эффекты до появления признаков эффективности или испытывают рецидив через определенный период времени, поэтому все еще существует большая медицинская потребность в новых форматах ADC, которые обладают благоприятными лекарственными свойствами, могут быть произведены в достаточном количестве и необходимого качества при разумных затратах для поддержки разработки лекарственных средств и которые подходят в качестве терапевтических средств.

Ключевым этапом в приготовлении конъюгата ADC является этап ковалентной конъюгации нагрузки с антителом. Большинство ADC, находящихся в стадии клинической разработки, были созданы путем конъюгации с эндогенными лизиновым или цистеиновым остатками антитела, с тщательным контролем средней степени модификации для получения среднего отношения лекарственного средства к антителу (DAR) в диапазоне 3,5-4,0. Это отношение исторически выбирали на основе (а) минимизации количества неконъюгированного антитела и (б) недопущения наличия видов в смеси с очень высоким DAR, что может создавать проблемы в производстве и приготовлении из-за более высокой гидрофобности и более низкой растворимости (Lambert JM and Berkenbilt A., 2018, Annu. Rev. Med. 69, 191-207) и обычно приводит к плохим фармакокинетическим свойствам (Lyon RP, et al., 2015, Nat Biotechnol, 33, 733-735). Недавно были разработаны различные генетические, химические и ферментативные методы для сайт-специфической конъюгации, которые могут обеспечить DAR 2 (или 4) и при этом не допустить недостаточную или чрезмерную модификацию антитела. Обзор этих методик приведен в работе Yamada et al. (обзор в Kei Yamada and Yuji Ito, 2019, ChemBioChem, 20, 2729-2739).

Ферментативная конъюгация представляет большой интерес, поскольку эти реакции конъюгации, как правило, протекают быстро, сайт-специфичны и могут быть проведены в физиологических условиях. Среди доступных ферментов микробная трансглутаминаза (МТГ) из вида *Streptomyces mobaraensis* вызывает все больший интерес как привлекательная альтернатива традиционной химической белковой конъюгации функциональных фрагментов, включая антитела. МТГ катализирует в физиологических условиях реакцию трансамидирования между «реакционноспособным» глутамином белка или пептида и «реакционноспособным» лизиновым остатком белка или пептида, при этом последний также может быть простым низкомолекулярным амином, таким как 5-аминопентиловая группа (Jeger S. et al., 2010, Angew. Chem. Int. Ed., 49, 9995-9997).

Jeger et al. описали, что конъюгация антитела с использованием трансглутаминазы в качестве фермента происходит на остатке Q295, однако конъюгация была возможна только после удаления гликановой молекулы на аспарагиновом остатке 297 (N297) с помощью PNGase F, в то время как гликозилированные антитела не могли быть

конъюгированы эффективным образом (эффективность конъюгации ниже 20%) (Jeger S. et al., 2010, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49, 9995-9997; Mindt T. et al. 2008, *Bioconj Chem*, 9, 271-278).

Другие подходы к получению конъюгатов ADC с помощью МТГ основаны на использовании агликозилированных антител, в которых остаток N297 заменяется на аминокислотный остаток, не поддающийся гликозилированию. Однако замена N297 на другую аминокислоту может привести к нежелательным последствиям, поскольку это может повлиять на общую стабильность всего Fc-домена (Subedi GP and Barb AW., 2015, *Structure*, 23, 1573-1583), а также на эффективность всего конъюгата. Как следствие, это может привести к повышенной агрегации антител и снижению растворимости, что становится особенно важным для гидрофобных нагрузок. Кроме того, гликан, присутствующий на N297, обладает важным иммуномодулирующим действием, поскольку запускает эффекторные функции, такие как антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ (ADCC)) и другие. Такое иммуномодулирующее действие утрачивается при дегликозилировании или любом другом из рассмотренных выше подходов для получения агликозилированного антитела. Кроме того, любая модификация последовательности указанного антитела может также привести к сложностям нормативно-правового характера, что проблематично, поскольку часто в качестве отправной точки для конъюгации ADC используется принятое и клинически проверенное антитело.

Недавно Spycher и др. описали подход к конъюгации на основе транслугтаминазы, который не требует предварительного дегликозилирования антитела для конъюгации нагрузки (Spycher et al., WO 2019/057772). Возможность конъюгировать нативные, гликозилированные антитела дает значительные преимущества с точки зрения производства: этап ферментативного дегликозилирования нежелателен с точки зрения надлежащей производственной практики (GMP), поскольку необходимо убедиться в том, что фермент дегликозилирования (например, PNGase F), а также расщепленный гликан удалены из реакционной смеси. Кроме того, не требуется генная инженерия антитела для присоединения нагрузки, что позволяет избежать вставок последовательностей, которые могут повысить иммуногенность и снизить общую стабильность антитела.

В связи с вышеизложенным, в данной области все еще существует потребность в улучшенных методах получения конъюгатов ADC с высокой эффективностью конъюгации.

Кроме того, в данной области техники существует потребность в новых ADC с улучшенной эффективностью и/или фармакокинетическими свойствами, а также с необходимым соотношением лекарственного средства и антитела.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение характеризуется представленными здесь вариантами осуществления и формулой изобретения. В частности, настоящее изобретение относится, *inter alia*, к следующим вариантам осуществления:

1. Способ получения конъюгата антитело-линкер с помощью микробной трансглутаминазы (МТГ), причем этот способ включает этап конъюгирования линкера, содержащего структуру (показанную в направлении N -> C)



с остатком Gln, содержащимся в антителе, где

- (Sp₁) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp₂) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp₃) является химическим спейсером или отсутствует;
- **R** представляет собой аргинин, или производное аргинина, или миметик аргинина;
- **K** представляет собой лизин, или производное лизина, или миметик лизина;
- **B** представляет собой связующий компонент или нагрузку;

и где линкер конъюгирован с остатком Gln, содержащимся в антителе, через первичный амин, содержащийся в боковой цепи лизинового остатка, производного лизина или миметика лизина.

2. Способ по варианту осуществления 1, при котором химические спейсеры (Sp₁), (Sp₂) и (Sp₃) каждый независимо содержат от 0 до 12 аминокислотных остатков.

3. Способ по варианту осуществления 1 или 2, при котором линкер содержит не более 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 аминокислотных остатков.

4. Способ по любому из вариантов осуществления с 1 по 3, при котором суммарный заряд линкера является нейтральным или положительным.

5. Способ по любому из вариантов осуществления с 1 по 4, при котором линкер не содержит отрицательно заряженных аминокислотных остатков.

6. Способ по любому из вариантов осуществления с 1 по 5, при котором линкер содержит аминокислотную последовательность RКАА (SEQ ID NO:1), RКА (SEQ ID NO:2), АRК (SEQ ID NO:3) или RKR (SEQ ID NO:4).

7. Способ по любому из вариантов осуществления с 1 по 6, при котором линкер содержит аминокислотную последовательность RКАА (SEQ ID NO:1), RКА (SEQ ID NO:2) или АRК (SEQ ID NO:3).

8. Способ по любому из вариантов осуществления с 1 по 7, при котором линкер содержит аминокислотную последовательность RКАА (SEQ ID NO:1).

9. Способ по любому из вариантов осуществления с 1 по 8, при котором **В** является связующим компонентом.

10. Способ по варианту осуществления 9, при котором связующий компонент **В** содержит

- биоортогональную маркерную группу; или
- небioортогональное соединение для перекрестного сшивания.

11. Способ по варианту осуществления 10, при котором биоортогональная маркерная группа или небioортогональное соединение для перекрестного сшивания состоит из или содержит, по меньшей мере, одну молекулу или фрагмент, выбранный из группы, состоящей из:

- $-N-N\equiv N$ или $-N_3$;
- Lys(N_3);

- тетразина;
- алкина;
- напряженного циклооктина;
- BCN;
- напряженного алкена;
- фотореактивной группы;
- альдегида;
- ацилтрифторбората;
- средства деградации белков ("PROTAC");
- цикlopентадиена/спиролоциклопентадиена;
- тиоселективного электрофила;
- -SH; и
- цистеина.

12. Способ по любому из вариантов осуществления с 9 по 11, при этом данный способ включает дальнейший этап конъюгирования одной или более нагрузок со связующим компонентом **В**.

13. Способ по варианту осуществления 12, при котором одна или более нагрузок конъюгированы со связующим компонентом **В** посредством клик-реакции.

14. Способ по любому из вариантов осуществления с 1 по 8, при котором **В** является нагрузкой.

15. Способ по любому из вариантов осуществления с 12 по 14, при котором нагрузка содержит, по меньшей мере, один из следующих компонентов:

- токсин;
- цитокин;
- фактор роста;
- радионуклид;

- гормон;
- противовирусное средство;
- антибактериальное средство;
- флуоресцентный краситель;
- иммунорегуляторное/иммуностимулирующее средство;
- компонент, увеличивающий период полураспада;
- компонент, повышающий растворимость;
- конъюгат полимер-токсин;
- нуклеиновая кислота;
- биотиновый или стрептавидиновый компонент;
- витамин;
- средство деградации белков ("PROTAC");
- связывающееся с мишенью соединение; и/или
- противовоспалительное средство.

16. Способ по варианту осуществления 15, при котором токсин представляет собой, по меньшей мере, один компонент, выбранный из группы, состоящей из

- пирролобензодиазепина (например, PBD);
- ауристатина (например, MMAE, MMAF);
- майтанзиноида (например, майтанзина, DM1, DM4, DM21);
- дуокармицина;
- ингибитора никотинамидфосфорибозилтрансферазы (NAMPT);
- тубулизина;
- энедиина (например, калихеамицина);
- производного антрациклина (PNU) (например, доксорубицина);
- ингибитора кинезина веретенообразного белка (KSP) на основе пиррола;
- криптофицина;

- ингибитора эффлюксного насоса лекарственного препарата;
- сандамицина;
- аманитина (например, α -аманитина); и
- камптотецина (например, эксатеканов, дерукстеканов).

17. Способ по любому из вариантов осуществления с 14 по 16, при котором химический спейсер (Sp_2) содержит самоотщепляющийся компонент.

18. Способ по варианту осуществления 17, при котором самоотщепляющийся компонент непосредственно присоединен к нагрузке **B**.

19. Способ по варианту осуществления 17 или 18, при котором самоотщепляющийся компонент содержит *p*-аминобензилкарбамоилловый (PABC) компонент.

20. Способ по любому из вариантов осуществления с 1 по 19, при котором антитело представляет собой антитело IgG, в частности, антитело IgG1.

21. Способ по варианту осуществления 20, при котором остаток Gln, с которым конъюгирован линкер, входит в Fc домен антитела, в частности, при котором остаток Gln, с которым конъюгирован линкер, является остатком Gln Q295 (нумерация EU) домена C_{H2} антитела IgG.

22. Способ по варианту осуществления 20, при котором остаток Gln, с которым конъюгирован линкер, был введен в тяжелую или легкую цепь антитела с помощью молекулярной инженерии.

23. Способ по варианту осуществления 22, при котором остаток Gln, введенный в тяжелую или легкую цепь антитела с помощью молекулярной инженерии, представляет собой N297Q (нумерация EU) домена C_{H2} гликозилированного антитела IgG.

24. Способ по варианту осуществления 22, при котором остаток Gln, введенный в тяжелую или легкую цепь антитела с помощью молекулярной инженерии, входит в состав пептида, который был (а) интегрирован в тяжелую или

легкую цепь антитела или (b) слит с N- или C-концевой областью тяжелой или легкой цепи антитела.

25. Способ по варианту осуществления 24, при котором пептид, содержащий остаток Gln, был слит с C-концевой областью тяжелой цепи антитела.

26. Способ по любому из вариантов осуществления с 20 по 22 или с 24 по 25, при котором антитело IgG представляет собой гликозилированное антитело IgG, в частности, при котором антитело IgG гликозилировано на остатке N297 (нумерация EU) домена C_H2.

27. Способ по любому из вариантов осуществления с 1 по 26, при котором антитело выбрано из группы, состоящей из: Brentuxимаба, Трастузумаба, Гемтузумаба, Инотузумаба, Авелумаба, Цетуксимаба, Ритуксимаба, Даратумумаба, Пертузумаба, Ведолизумаба, Окрелизумаба, Тоцилизумаба, Устекинумаба, Голимумаба, Обинутузумаба, Сацитузумаба, Белантамаба, Полатузумаба и Энфортумаба.

28. Способ по любому из вариантов осуществления с 1 по 27, при котором антитело выбрано из группы, состоящей из: Brentuxимаба, Гемтузумаба, Трастузумаба, Инотузумаба, Полатузумаба, Энфортумаба, Сацитузумаба и Белантамаба.

29. Способ по любому из вариантов осуществления с 1 по 28, при котором антитело представляет собой Полатузумаб, или Трастузумаб, или Энфортумаб.

30. Способ по любому из вариантов осуществления с 1 по 29, при котором линкер конъюгирован с γ -карбоксамидной группой остатка Gln, входящего в состав антитела.

31. Способ по любому из вариантов осуществления с 1 по 30, при котором линкер подходит для конъюгации с гликозилированным антителом с эффективностью конъюгации, по меньшей мере, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%.

32. Способ по любому из вариантов осуществления с 1 по 31, при котором микробная трансглутаминаза получена из вида *Streptomyces*, в частности *Streptomyces mobaraensis*.

33. Конъюгат антитело-линкер, полученный способом по любому из вариантов осуществления с 1 по 32.

34. Конъюгат антитело-линкер, содержащий:

a) антитело; и

b) линкер, содержащий структуру:

(Sp₁)-RK-(Sp₂)-B-(Sp₃) или

(Sp₁)-B-(Sp₂)-RK-(Sp₃); при этом

- (Sp₁) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp₂) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp₃) является химическим спейсером или отсутствует;
- **R** представляет собой аргинин, или производное аргинина, или миметик аргинина;
- **K** представляет собой лизин, или производное лизина, или миметик лизина;
- **B** представляет собой связующий компонент или нагрузку;

при этом линкер конъюгирован с антителом посредством изопептидной связи, образованной между γ -карбоксамидной группой глутаминового остатка, входящего в состав антитела, и первичным амином, входящим в состав боковой цепи лизинового остатка, производного лизина или миметика лизина, входящего в состав RK-мотива, входящего в состав линкера.

35. Конъюгат антитело-линкер по варианту осуществления 34, при котором химические спейсеры (Sp₁), (Sp₂) и (Sp₃) каждый независимо содержат от 0 до 12 аминокислотных остатков.

36. Конъюгат антитело-линкер по варианту осуществления 34 или 35, при

котором линкер содержит не более 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 аминокислотных остатков.

37. Конъюгат антитело-линкер по любому из вариантов осуществления с 34 по 36, при котором суммарный заряд линкера является нейтральным или положительным.

38. Конъюгат антитело-линкер по любому из вариантов осуществления с 34 по 37, при котором линкер не содержит отрицательно заряженных аминокислотных остатков.

39. Конъюгат антитело-линкер по любому из вариантов осуществления с 34 по 38, при котором линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2), ARK (SEQ ID NO:3) и RKR (SEQ ID NO:4).

40. Конъюгат антитело-линкер по любому из вариантов осуществления с 34 по 39, при котором линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2) и ARK (SEQ ID NO:3).

41. Конъюгат антитело-линкер по любому из вариантов осуществления с 34 по 40, при котором линкер содержит аминокислотную последовательность RCAA (SEQ ID NO:1).

42. Конъюгат антитело-линкер по любому из вариантов осуществления с 34 по 41, при котором **В** представляет собой связующий компонент.

43. Конъюгат антитело-линкер по варианту осуществления 42, при котором связующий компонент **В** содержит

- биоортогональную маркерную группу или
- небиоортогональное соединение для перекрестного сшивания.

44. Конъюгат антитело-линкер по варианту осуществления 43, при котором биоортогональная маркерная группа или небиоортогональное соединение для

перекрестного сшивания состоит из или содержит, по меньшей мере, одну молекулу или фрагмент, выбранный из группы, состоящей из:

- $-N-N\equiv N$ или $-N_3$;
- Lys(N_3);
- тетразина;
- алкина;
- напряженного циклооктина;
- BCN;
- напряженного алкена;
- фотореактивной группы;
- альдегида;
- ацилтрифторбората;
- средства деградации белков ("PROTAC");
- цикlopентадиена/спиролоциклопентадиена;
- тиоселективного электрофила;
- -SH; и
- цистеина.

45. Конъюгат антитело-линкер по любому из вариантов осуществления с 42 по 44, при котором одна или более нагрузок конъюгированы со связующим компонентом **В**.

46. Конъюгат антитело-линкер по варианту осуществления 45, при котором одна или несколько нагрузок конъюгированы со связующим компонентом **В** посредством клик-реакции.

47. Конъюгат антитело-линкер по любому из вариантов осуществления с 34 по 41, при котором **В** представляет собой нагрузку.

48. Конъюгат антитело-линкер по любому из вариантов осуществления с 45 по 47, при котором нагрузка содержит, по меньшей мере, один из следующих компонентов:

- токсин;
- цитокин;
- фактор роста;
- радионуклид;
- гормон;
- противовирусное средство;
- антибактериальное средство;
- флуоресцентный краситель;
- иммунорегуляторное/иммуностимулирующее средство;
- компонент, увеличивающий период полураспада;
- компонент, повышающий растворимость;
- конъюгат полимер-токсин;
- нуклеиновая кислота;
- биотиновый или стрептавидиновый компонент;
- витамин;
- средство деградации белков ("PROTAC");
- связывающееся с мишенью соединение; и/или
- противовоспалительное средство.

49. Конъюгат антитело-линкер по варианту осуществления 48, при котором токсин представляет собой, по меньшей мере, один компонент, выбранный из группы, состоящей из

- пирролобензодиазепина (например, PBD);
- ауристатина (например, MMAE, MMAF);

- майтанзиноида (например, майтанзина, DM1, DM4, DM21);
- дуокармицина;
- ингибитора никотинамидфосфорибозилтрансферазы (NAMPT);
- тубулизина;
- энедиина (например, калихеамицина);
- производного антрациклина (PNU) (например, доксорубицина);
- ингибитора кинезина веретенообразного белка (KSP) на основе пиррола;
- криптофицина;
- ингибитора эффлюксного насоса лекарственного препарата;
- сантрамицина;
- аманитина (например, α -аманитина); и
- камптотецина (например, эксатеканов, дерукстеканов).

50. Конъюгат антитело-линкер по любому из вариантов осуществления с 47 по 49, при котором химический спейсер (Sp_2) содержит самоотщепляющийся компонент.

51. Конъюгат антитело-линкер по варианту осуществления 50, при котором самоотщепляющийся компонент непосредственно присоединен к нагрузке **В**.

52. Конъюгат антитело-линкер по варианту осуществления 50 или 51, при котором самоотщепляющийся компонент содержит *p*-аминобензилкарбамоильный (PABC) компонент.

53. Конъюгат антитело-линкер по любому из вариантов осуществления с 34 по 52, при котором антитело представляет собой антитело IgG, в частности, антитело IgG1.

54. Конъюгат антитело-линкер по варианту осуществления 53, при котором остаток Gln, с которым конъюгирован линкер, входит в Fc домен антитела, в частности, при котором остаток Gln, с которым конъюгирован линкер, является остатком Gln Q295 (нумерация EU) домена C_H2 антитела IgG.

55. Конъюгат антитело-линкер по варианту осуществления 53, при котором остаток Gln, с которым конъюгирован линкер, был введен в тяжелую или легкую цепь антитела с помощью молекулярной инженерии.

56. Конъюгат антитело-линкер по варианту осуществления 55, при котором остаток Gln, введенный в тяжелую или легкую цепь антитела с помощью молекулярной инженерии, представляет собой N297Q (нумерация EU) домена C_H2 агликозилированного антитела IgG.

57. Конъюгат антитело-линкер по варианту осуществления 55, при котором остаток Gln, введенный в тяжелую или легкую цепь антитела с помощью молекулярной инженерии, входит в состав пептида, который был (а) интегрирован в тяжелую или легкую цепь антитела или (b) слит с N- или C-концевой областью тяжелой или легкой цепи антитела.

58. Конъюгат антитело-линкер по варианту осуществления 57, при котором пептид, содержащий остаток Gln, был слит с C-концевой областью тяжелой цепи антитела.

59. Конъюгат антитело-линкер по любому из вариантов осуществления с 53 по 55 или с 57 по 58, при котором антитело IgG представляет собой гликозилированное антитело IgG, в частности, при котором антитело IgG гликозилировано на остатке N297 (нумерация EU) домена C_H2.

60. Конъюгат антитело-линкер по любому из вариантов осуществления с 34 по 59, при котором антитело выбрано из группы, состоящей из: Brentuximab, Trastuzumab, Gemtuzumab, Inotuzumab, Avetumab, Cetuximab, Rituximab, Daratumumab, Pertuzumab, Vedolizumab, Ocrelizumab, Tocilizumab, Ustekinumab, Golimumab, Obinutuzumab, Sacituzumab, Belantamab, Polatuzumab и Enfortumab.

61. Конъюгат антитело-линкер по любому из вариантов осуществления с 34 по 60, при котором антитело выбрано из группы, состоящей из: Brentuximab, Gemtuzumab, Trastuzumab, Inotuzumab, Polatuzumab, Enfortumab, Sacituzumab и Belantamab.

62. Конъюгат антитело-линкер по любому из вариантов осуществления с 34 по 61, при котором антитело представляет собой Полатузумаб, или Трастузумаб, или Энфортумаб.

63. Конъюгат антитело-линкер, содержащий:

a) антитело IgG; и

b) линкер, содержащий лекарственное соединение **В**, при этом лекарственное соединение **В** ковалентно связано с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: RКАА (SEQ ID NO:1), RКА (SEQ ID NO:2), АRК (SEQ ID NO:3) и RKR (SEQ ID NO:4).

при этом линкер конъюгирован с антителом IgG посредством изопептидной связи, образованной между γ -карбоксамидной группой остатка глутамина Q295 (нумерация ЕС) домена С_{H2} антитела и первичным амином, входящим в боковую цепь лизинового остатка, входящего в состав линкера.

64. Конъюгат антитело-лекарственное средство по варианту осуществления 63, в котором лекарственное соединение **В** связано с N- или C-концевой областью аминокислотной последовательности, входящей в состав линкера, посредством самоотщепляющегося компонента.

65. Конъюгат антитело-лекарственное средство по варианту осуществления 64, при этом самоотщепляющийся компонент содержит р-аминобензилкарбамоиловый (РАВС) компонент.

66. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления с 63 по 65, при этом антитело IgG представляет собой гликозилированное антитело IgG, в частности, при этом антитело IgG гликозилировано на остатке N297 (нумерация EU) домена С_{H2}.

67. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления с 63 по 66, при этом антитело IgG представляет собой антитело IgG1.

68. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления с 63 по 67, при этом антитело IgG представляет собой Полатузумаб

или антитело, содержащее тяжелую цепь, указанную в SEQ ID NO:5, и легкую цепь, указанную в SEQ ID NO:6.

69. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления с 63 по 67, при этом антитело IgG представляет собой Трастузумаб или антитело, содержащее тяжелую цепь, указанную в SEQ ID NO:7, и легкую цепь, указанную в SEQ ID NO:8.

70. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления с 63 по 67, при этом антитело IgG представляет собой Энфортумаб или антитело, содержащее тяжелую цепь, указанную в SEQ ID NO:9, и легкую цепь, указанную в SEQ ID NO:10 или 11.

71. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления с 63 по 70, при этом лекарственное средство является токсином, выбранным из группы, состоящей из:

- пирролобензодиазепина (например, PBD);
- ауристатина (например, MMAE, MMAF);
- майтанзиноида (например, майтанзина, DM1, DM4, DM21);
- дуокармицина;
- ингибитора никотинамидфосфорибозилтрансферазы (NAMPT);
- тубулизина;
- энедиина (например, калихеамицина);
- производного антрациклина (PNU) (например, доксорубицина);
- ингибитора кинезина веретенообразного белка (KSP) на основе пиррола;
- криптофицина;
- ингибитора эффлюксного насоса лекарственного препарата;
- сантрамицина;
- аманитина (например, α -аманитина); и
- камптотецина (например, эксатеканов, дерукстеканов).

72. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления с 63 по 71, при этом линкер имеет структуру RКАА-РАВС-В, в частности, где **В** представляет собой ауристин или майтанзиноид, в частности, где ауристин представляет собой **ММАЕ**, а майтанзиноид представляет собой **DM1** или майтанзин.

73. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления с 63 по 71, при этом линкер имеет структуру RКА-РАВС-В, в частности, где **В** представляет собой ауристин или майтанзиноид, в частности, где ауристин представляет собой **ММАЕ**, а майтанзиноид представляет собой **DM1** или майтанзин.

74. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления с 63 по 71, при этом линкер имеет структуру ARK-РАВС-В, в частности, где **В** представляет собой ауристин или майтанзиноид, в частности, где ауристин представляет собой **ММАЕ**, а майтанзиноид представляет собой **DM1** или майтанзин.

75. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления с 63 по 71, при этом линкер имеет структуру RKR-РАВС-В, в частности, где **В** представляет собой ауристин или майтанзиноид, в частности, где ауристин представляет собой **ММАЕ**, а майтанзиноид представляет собой **DM1** или майтанзин.

76. Линкерная конструкция, содержащая структуру:

(Sp_1) -RK- (Sp_2) -B- (Sp_3) или

(Sp_1) -B- (Sp_2) -RK- (Sp_3) ; при этом

- (Sp_1) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp_2) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp_3) является химическим спейсером или отсутствует;
- **R** представляет собой аргинин, или производное аргинина, или миметик аргинина;

- **К** представляет собой лизин, или производное лизина, или миметик лизина;
- **В** представляет собой связующий компонент или нагрузку.

77. Линкерная конструкция по варианту осуществления 76, при этом химические спейсеры (Sp₁), (Sp₂) и (Sp₃) каждый независимо содержат от 0 до 12 аминокислотных остатков.

78. Линкерная конструкция по варианту осуществления 76 или 77, при этом линкер содержит не более 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 аминокислотных остатков.

79. Линкерная конструкция по любому из вариантов осуществления с 76 по 78, при этом суммарный заряд линкера является нейтральным или положительным.

80. Линкерная конструкция по любому из вариантов осуществления с 76 по 79, при этом линкер не содержит отрицательно заряженных аминокислотных остатков.

81. Линкерная конструкция по любому из вариантов осуществления с 76 по 80, при этом линкер содержит аминокислотную последовательность RКАА (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2), ARK (SEQ ID NO:3) или RKR (SEQ ID NO:4).

82. Линкерная конструкция по любому из вариантов осуществления с 76 по 81, при этом В является связующим компонентом.

83. Линкерная конструкция по варианту осуществления 82, при этом связующий компонент **В** содержит

- биоортогональную маркерную группу, или
- небиоортогональное соединение для перекрестного сшивания.

84. Линкерная конструкция по варианту осуществления 83, при этом биоортогональная маркерная группа или небиоортогональное соединение для перекрестного сшивания состоит из или содержит, по меньшей мере, одну молекулу или фрагмент, выбранный из группы, состоящей из:

- $-N-N\equiv N$ или $-N_3$;

- Lys(N₃);
- тетразина;
- алкина;
- напряженного циклооктина;
- BCN;
- напряженного алкена;
- фотореактивной группы;
- альдегида;
- ацилтрифторбората;
- средства деградации белков ("PROTAC");
- циклопентадиена/спиролоциклопентадиена;
- тиоселективного электрофила;
- -SH; и
- цистеина.

85. Линкерная конструкция по любому из вариантов осуществления с 76 по 84, при этом линкерная конструкция состоит из или содержит структуру RКАА-В, в частности, где **В** представляет собой Lys(N₃) или цистеин.

86. Линкерная конструкция по любому из вариантов осуществления с 76 по 84, при этом линкерная конструкция состоит из или содержит структуру RКА-В, в частности, где **В** представляет собой Lys(N₃) или цистеин.

87. Линкерная конструкция по любому из вариантов осуществления с 76 по 84, при этом линкерная конструкция состоит из или содержит структуру АRК-В, в частности, где **В** представляет собой Lys(N₃) или цистеин.

88. Линкерная конструкция по любому из вариантов осуществления с 76 по 84, при этом линкерная конструкция состоит из или содержит структуру В-RKR, в частности, где **В** представляет собой Lys(N₃) или цистеин.

89. Линкерная конструкция по любому из вариантов осуществления с 76 по 81, при этом **В** является нагрузкой.

90. Линкерная конструкция по варианту осуществления 89, при этом нагрузка **В** содержит, по меньшей мере, один из следующих компонентов:

- токсин;
- цитокин;
- фактор роста;
- радионуклид;
- гормон;
- противовирусное средство;
- антибактериальное средство;
- флуоресцентный краситель;
- иммунорегуляторное/иммуностимулирующее средство;
- компонент, увеличивающий период полураспада;
- компонент, повышающий растворимость;
- конъюгат полимер-токсин;
- нуклеиновая кислота;
- биотиновый или стрептавидиновый компонент;
- витамин;
- средство деградации белков ("PROTAC");
- связывающееся с мишенью соединение; и/или
- противовоспалительное средство.

91. Линкерная конструкция по варианту осуществления 90, при этом токсин представляет собой, по меньшей мере, один компонент, выбранный из группы, состоящей из

- пирролобензодиазепина (например, PBD);

- ауристатина (например, MMAE, MMAF);
- майтанзиноида (например, майтанзина, DM1, DM4, DM21);
- дуокармицина;
- ингибитора никотинамидфосфорибозилтрансферазы (NAMPT);
- тубулизина;
- энедиина (например, калихеамицина);
- производного антрациклина (PNU) (например, доксорубицина);
- ингибитора кинезина веретенообразного белка (KSP) на основе пиррола;
- криптофицина;
- ингибитора эффлюксного насоса лекарственного препарата;
- сантрамицина;
- аманитина (например, α -аманитина); и
- камптотецина (например, эксатеканов, дерукстеканов).

92. Линкерная конструкция по любому из вариантов осуществления с 89 по 91, при этом химический спейсер (Sp_2) содержит самоотщепляющийся компонент.

93. Линкерная конструкция по варианту осуществления 92, при этом самоотщепляющийся компонент непосредственно присоединен к нагрузке **В**.

94. Линкерная конструкция по варианту осуществления 92 или 93, при этом самоотщепляющийся компонент содержит р-аминобензилкарбамоилловый (РАВС) компонент.

95. Линкерная конструкция по любому из вариантов осуществления с 89 по 94, при этом линкер имеет структуру RКАА-РАВС-В, в частности, где **В** представляет собой ауристатин или майтанзиноид, в частности, где ауристатин представляет собой MMAE, а майтанзиноид представляет собой DM1 или майтанзин.

96. Линкерная конструкция по любому из вариантов осуществления с 89 по 94, при этом линкер имеет структуру RКА-РАВС-В, в частности, где **В** представляет

собой ауристин или майтанзиноид, в частности, где ауристин представляет собой MMAE, а майтанзиноид представляет собой DM1 или майтанзин.

97. Линкерная конструкция по любому из вариантов осуществления с 89 по 94, при этом линкер имеет структуру ARK-PAVC-B, в частности, где **B** представляет собой ауристин или майтанзиноид, в частности, где ауристин представляет собой MMAE, а майтанзиноид представляет собой DM1 или майтанзин.

98. Линкерная конструкция по любому из вариантов осуществления с 89 по 94, при этом линкер имеет структуру B-PAVC-RKR, в частности, где **B** представляет собой ауристин или майтанзиноид, в частности, где ауристин представляет собой MMAE, а майтанзиноид представляет собой DM1 или майтанзин.

99. Применение линкерной конструкции по любому из вариантов осуществления с 76 по 98 в получении конъюгата антитело-линкер с помощью микробной трансглутаминазы.

100. Применение по варианту осуществления 99, при этом антитело представляет собой антитело IgG, в частности антитело IgG1.

101. Применение по варианту осуществления 65 или 66, при этом антитело представляет собой Полатузумаб, или Трастузумаб, или Энфортумаб.

102. Фармацевтическая композиция, содержащая

а) конъюгат антитело-линкер по любому из вариантов осуществления с 33 по 62, в частности, при этом конъюгат антитело-линкер содержит, по меньшей мере, одну нагрузку;

или

б) конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления с 63 по 75; и

фармацевтическую композицию, содержащую, по меньшей мере, один фармацевтически приемлемый ингредиент.

103. Фармацевтическая композиция по варианту осуществления 102, содержащая, по меньшей мере, одно дополнительное терапевтически активное средство.

104. Конъюгат антитело-линкер по любому из вариантов осуществления с 33 по 62, в частности, при этом конъюгат антитело-линкер содержит, по меньшей мере, одну нагрузку, конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления с 63 по 75, или фармацевтическая композиция по варианту осуществления 102 или 103 для применения в лечении и/или диагностике.

105. Конъюгат антитело-линкер по любому из вариантов осуществления с 33 по 62, в частности, при этом конъюгат антитело-линкер содержит, по меньшей мере, одну нагрузку, конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления с 63 по 75, или фармацевтическая композиция по варианту осуществления 102 или 103 для применения в лечении пациента, который

- страдает от,
- подвержен риску развития, и/или
- у которого диагностировано

неопластическое заболевание, неврологическое заболевание, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или инфекционное заболевание.

106. Конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция для применения по варианту осуществления 105, при этом конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство, входящие в фармацевтическую композицию, содержит Полатузумаб, и при этом неопластическое заболевание представляет собой рак, ассоциированный с В-клетками.

107. Конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция для применения по варианту осуществления 106, при этом рак, ассоциированный с В-клетками, является неходжкинской лимфомой, в частности, при этом рак, ассоциированный с В-клетками, является диффузной В-крупноклеточной лимфомой.

108. Конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция для применения по варианту осуществления 106 или 107, при этом конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция вводятся в комбинации с бендамустином и/или ритуксимабом.

109. Конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция для применения по варианту осуществления 105, при этом конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство, входящие в фармацевтическую композицию, содержит Трастузумаб, и при этом неопластическое заболевание представляет собой HER2-положительный рак, в частности, HER2-положительный рак молочной железы, желудка, яичников или легких.

110. Конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция для применения по варианту осуществления 109, при этом конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция вводятся в комбинации с лапатинибом, капецитабином и/или таксаном.

111. Конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция для применения по варианту осуществления 105, при этом конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство, входящий в состав фармацевтической композиции, содержит Энфортумаб или вариант Энфортумаба, и при этом неопластическое заболевание представляет собой Нектин-4-положительный рак, в частности Нектин-4-положительный рак поджелудочной железы, рак легких, рак мочевого пузыря или рак молочной железы.

112. Конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция для применения по варианту осуществления 111, при этом конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция вводятся в комбинации с химиотерапевтическим средством на основе цисплатина и/или Пембролизумабом.

113. Применение конъюгата антитело-линкер по любому из вариантов осуществления с 33 по 62, в частности, при этом конъюгат антитело-линкер содержит, по меньшей мере, одну нагрузку, конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления с 63 по 75, или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 102 или 103 для изготовления лекарственного препарата для лечения пациента, который

- страдает от,
- подвержен риску развития, и/или
- у которого диагностировано

неопластическое заболевание, неврологическое заболевание, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или инфекционное заболевание.

114. Способ лечения или профилактики неопластического заболевания, при этом указанный способ включает введение нуждающемуся в этом пациенту конъюгата антитело-линкер по любому из вариантов осуществления с 33 по 62, в частности, при этом конъюгат антитело-линкер содержит, по меньшей мере, одну нагрузку, конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления с 63 по 75, или фармацевтическую композицию по варианту осуществления 102 или 103.

Соответственно, по одному варианту осуществления настоящее изобретение относится к способу получения конъюгата антитело-линкер с помощью микробной трансглутаминазы (МТГ), причем этот способ включает этап конъюгирования линкера, содержащего структуру (показанную в направлении N -> C)



с остатком Gln, содержащимся в антителе, где

- (Sp₁) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp₂) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp₃) является химическим спейсером или отсутствует;
- **R** представляет собой аргинин, или производное аргинина, или миметик

аргинина;

- **К** представляет собой лизин, или производное лизина, или миметик лизина;
- **В** представляет собой связующий компонент или нагрузку;

и где линкер конъюгирован с остатком Gln, содержащимся в антителе, через первичный амин, содержащийся в боковой цепи лизинового остатка, производного лизина или миметика лизина.

Таким образом, изобретение основано, по крайней мере частично, на неожиданном открытии, что линкеры, содержащие пептидный мотив RK (аргинил-лизил), могут быть конъюгированы с гликозилированными антителами с высокой эффективностью. В патентной заявке WO 2019/057772 было продемонстрировано, что линкеры на основе пептидов могут быть эффективно конъюгированы с глутаминовым остатком гликозилированного антитела через лизиновый остаток в линкере. Однако теперь было неожиданно обнаружено, что расширенный мотив RK обеспечивает дальнейшее повышение эффективности конъюгации.

Изобретатели показали, что лизин-содержащие линкеры без мотива RK обеспечивают эффективность конъюгации от 27 до 77% при непосредственном присоединении к молекуле лекарственного средства (см. Таблицу 4). Линкеры, содержащие мотив RK, как показано в настоящем документе, были конъюгированы с гликозилированными антителами с эффективностью не менее 82% и, в некоторых случаях, до 100% (см. Таблицы 3 и 5). Таким образом, линкеры, содержащие мотив RK, особенно предпочтительны по сравнению с другими линкерами на основе лизина для конъюгации на основе МТГ с гликозилированными антителами, в частности, когда нагрузка непосредственно конъюгируется с гликозилированным антителом в одноэтапной реакции.

В рамках настоящего изобретения предпочтительно, чтобы линкер содержал структуру (Sp_1) -RK- (Sp_2) -B- (Sp_3) или (Sp_1) -B- (Sp_2) -RK- (Sp_3) , при этом линкер должен быть конъюгирован с глутаминовым остатком в антителе через первичный амин, содержащийся в остатке К, содержащимся в RK-мотиве линкера. В определенном варианте осуществления остаток К представляет собой лизиновый остаток. Однако в

определенных вариантах осуществления остаток К также может быть миметиком лизина или производным лизина, при условии, что миметик лизина или производное лизина содержит первичный амин в своей аминокислотной боковой цепи.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления остаток К может быть миметиком лизина. Термин "миметик лизина", который используется в настоящем документе, означает соединение, которое имеет структуру, отличную от лизина, но имеет сходные характеристики с лизином и, таким образом, может быть использовано для замены лизина в пептиде или белке без существенного изменения функции и/или структуры указанного пептида или белка. В определенных вариантах осуществления миметик лизина может отличаться от лизина длиной или составом алифатической цепи, соединяющей первичный амин и α -углеродный атом. Таким образом, в определенных вариантах осуществления миметик лизина может быть орнитином или 2,7-диаминогептановой кислотой. В определенных вариантах осуществления миметик лизина может быть бета-аминокислотой, например, бета-гомолизином.

В некоторых вариантах осуществления остаток К может быть производным лизина. Термин "производное лизина", который используется в настоящем документе, означает лизин или миметик лизина, при этом одна или несколько функциональных групп, входящих в состав лизина или миметика лизина, модифицированы или замещены. В рамках настоящего изобретения предпочтительно, чтобы аминокислотная группа в боковой цепи производного лизина была немодифицированной и была доступной для конъюгации с глутаминовым остатком в белке. В вариантах осуществления, в которых остаток К расположен в С-концевом положении линкера, К может быть производным лизина, при этом α -карбоксовая группа модифицирована или замещена. В определенных вариантах осуществления α -карбоксовая группа миметика лизина может быть амидирована.

Линкер также содержит остаток R, который в сочетании с остатком К образует RK-мотив линкера. В определенных вариантах осуществления остаток R представляет собой аргининовый остаток. Однако, в определенных вариантах осуществления остаток R также может быть миметиком аргинина или производным аргинина.

Таким образом, в определенных вариантах осуществления остаток R может быть

миметиком аргинина. Термин "миметик аргинина", который используется в настоящем документе, означает соединение, которое имеет структуру, отличную от аргинина, но имеет сходные характеристики с аргинином и, таким образом, может быть использовано для замены аргинина в пептиде или белке без существенного изменения функции и/или структуры указанного пептида или белка. Миметик аргинина может отличаться от аргинина длиной или составом алифатической цепи, соединяющей гуанидиновую группу и α -углеродный атом. Как вариант или дополнительно миметики аргинина могут отличаться от аргинина самой гуанидиновой группой. То есть, миметик аргинина может содержать функциональную группу с физико-химическими свойствами, схожими со свойствами гуанидиновой группы. В определенных вариантах осуществления миметик аргинина может быть гомоаргинином, 2-амино-3-гуанидинопропионовой кислотой, β -уреидоаланином или цитруллином.

В определенных вариантах осуществления остаток R может быть производным аргинина. Термин "производное аргинина", который используется в настоящем документе, означает аргинин или миметик аргинина, при этом одна или несколько функциональных групп, входящих в состав аргинина или миметика аргинина, модифицированы или замещены. Производным аргинина может быть аргинин или миметик аргинина, в котором гуанидиновая группа замещена или модифицирована. В определенных вариантах осуществления производное аргинина может быть ω -метиларгинином. В вариантах осуществления, в которых остаток R расположен в N-концевом положении линкера, R может быть производным аргинина, при этом α -аминогруппа модифицирована или замещена. В определенных вариантах осуществления α -аминогруппа миметика аргинина может быть ацетилирована.

Следует понимать, что мотив RK предпочтительно состоит из аминокислот аргинина и лизина. Однако аргининовый или лизиновый остаток, или оба из них, могут быть заменены миметиком или производным, которые были описаны выше. В определенных вариантах осуществления мотив RK может состоять из аминокислот аргинина и орнитина. В определенных вариантах осуществления мотив RK может состоять из аминокислот аргинина и 2,7-диаминогептановой кислоты. В определенных вариантах осуществления мотив RK может состоять из аминокислот

гомоаргинина и лизина. В определенных вариантах осуществления мотив RK может состоять из аминокислот 2-амино-3-гуанидинопропионовой кислоты и лизина. В определенных вариантах осуществления мотив RK может состоять из аминокислот гомоаргинина и орнитина. В определенных вариантах осуществления мотив RK может состоять из аминокислот гомоаргинина и 2,7-диаминогептановой кислоты. В определенных вариантах осуществления мотив RK может состоять из аминокислот 2-амино-3-гуанидинопропионовой кислоты и орнитина. В определенных вариантах осуществления мотив RK может состоять из аминокислот 2-амино-3-гуанидинопропионовой кислоты и 2,7-диаминогептановой кислоты.

В рамках настоящего изобретения мотив RK встроен в структуру (Sp₁)-RK-(Sp₂)-B-(Sp₃) или (Sp₁)-B-(Sp₂)-RK-(Sp₃). То есть, линкер может содержать один или несколько химических спейсеров (Sp). Используемый здесь термин "химический спейсер" описывает химическое соединение, которое ковалентно присоединено к химическому остатку линкера и/или расположено между двумя химическими остатками линкера.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором химические спейсеры (Sp₁), (Sp₂) и (Sp₃) независимо содержат от 0 до 12 аминокислотных остатков.

То есть, в определенных вариантах осуществления химические спейсеры (Sp₁), (Sp₂) и/или (Sp₃) могут присутствовать или отсутствовать. В вариантах осуществления, где присутствуют (Sp₁), (Sp₂) и/или (Sp₃), (Sp₁), (Sp₂) и/или (Sp₃) могут содержать один или более аминокислотных остатков. В таких вариантах осуществления каждый спейсер из (Sp₁), (Sp₂) и/или (Sp₃) может содержать от 0 до 12 аминокислотных остатков. Следует отметить, что химические спейсеры (Sp₁), (Sp₂) и/или (Sp₃) могут также содержать неаминокислотные остатки, что более подробно описано далее.

Аминокислотный остаток", входящий в состав химического спейсера (Sp₁), (Sp₂) и/или (Sp₃), может быть аминокислотой, миметиком аминокислоты или производным аминокислоты. Следует понимать, что термин "аминокислота" охватывает не только α-аминокислоты, но и другие аминокислоты, такие как β-, γ- или δ-аминокислоты. Остаток α-аминокислоты может присутствовать в химическом спейсере (Sp₁), (Sp₂)

и/или (Sp_3) в его L- или D-форме. В вариантах осуществления, где (Sp_1), (Sp_2) и/или (Sp_3) содержит хиральную β -, γ - или δ -аминокислоту, хиральная β -, γ - или δ -аминокислота может присутствовать в S- или R-форме. Таким образом, в самом широком смысле термин "аминокислотный остаток" в контексте настоящего документа может означать любое органическое соединение, которое содержит аминогруппу ($-NH_2$) и карбоксильную группу ($-COOH$). Таким образом, в случаях, когда в настоящем описании изобретения используется термин "аминокислота" или "аминокислотный остаток", следует понимать, что термин "аминокислотный остаток" может также охватывать миметики или производные аминокислот.

Далее следует понимать, что термин "аминокислотный остаток" не ограничивается известным набором протеиногенных аминокислот, а именно аланином, аргинином, аспарагином, аспаргиновой кислотой, цистеином, глутаминовой кислотой, глутамином, глицином, гистидином, изолейцином, лейцином, лизином, метионином, фенилаланином, пролином, серином, треонином, триптофаном, тирозином и валином, но также включает неканонические и неприродные аминокислоты. «Неканоническая аминокислота» в контексте настоящего документа может быть любой аминокислотой, которая не входит в набор протеиногенных аминокислот, но может быть получена из природного источника. Однако следует отметить, что некоторые неканонические аминокислоты могут также встречаться в пептидах и/или белках природного происхождения.

«Неприродная аминокислота» или «синтетическая аминокислота» в контексте настоящего документа может быть любой молекулой, которая подпадает под общее определение аминокислоты, т.е. содержит аминогруппу и карбоксильную группу, но не встречается в природе. Таким образом, неприродные аминокислоты предпочтительно получают путем химического синтеза. Следует понимать, что различие между неканонической аминокислотой и неприродной аминокислотой в некоторых случаях может быть неопределенным. Например, аминокислота, которая определена как неприродная аминокислота, может быть позднее идентифицирована в природе и таким образом переклассифицирована как неканоническая аминокислота.

Примерами неканонических или неприродных аминокислот могут быть, без ограничения, D-аминокислоты (например, D-аланин, D-аргинин, D-метионин), гомо-

аминокислоты (например, гомосерин, гомоаргинин, гомоцистеин, α -аминоадипиновая кислота), N-метилированные аминокислоты (например, саркозин, N-Me-лейцин), α -метил-аминокислоты (например, α -метил-гистидин, α -аминоизомасляная кислота), β -аминокислоты (например, β -аланин, D-3-аминоизомасляная кислота, L- β -гомоаланин), γ -аминокислоты (например, γ -аминомасляная кислота), миметики или производные аланина (например, β -циклопропилаланин, фенилглицин, дегидроаланин, β -цианоаланин, β -(3-пиридил)-аланин, β -(1,2,4-триазол-1-ил)-аланин, β -(1-пиперазинил)-аланин), миметики или производные фенилаланина (например, 4-йодофенилаланин, пентафторфенилаланин, нафтил-аланин, 4-аминофенилаланин), миметики или производные аргинина (например, β -уреидоаланин, ω -метиларгинин), миметики или производные лизина (например, (3-(3-метил-3H-диазиридин-3-ил)пропамино)карбонил-лизин, N ϵ ,N ϵ ,N ϵ -триметиллизин), миметики или производные гистидина (например, 2,5-ди-йодгистидин, 1-метилгистидин), миметики или производные тирозина (например, 3-аминотирозин, тиронин, 3,5-динитротирозин, 3-гидрокси-метил-тирозин, O-фосфо-L-тирозин), миметики или производные триптофана (например, 5-гидрокси-триптофан, 1-метилтриптофан), миметики или производные серина (например, β -(2-тиенил)-серин, β -(3,4-дигидроксифенил)-серин, O-фосфосерин), миметики или производные треонина (например, алло-треонин, O-фосфотреонин), миметики или производные пролина (например, гидроксипролин, 3,4-дегидропролин, пироглутаминовая кислота, тиапролин, цис-октагидроиндол-2-карбоновая кислота), миметики или производные лейцина и изолейцина (например, алло-изолейцин, норлейцин, 4,5-дегидролейцин, (4S)-4-гидрокси-L-изолейцин), миметики или производные валина (например, норвалин, γ -гидроксивалин), миметики или производные цитруллина (например, тиоцитруллин, гомоцитруллин), миметики или производные цистеина (например, пеницилламин, селеноцистеин, бутионин-сульфоксимин), миметики или производные метионина (например, S-метилметионин, L-метионин сульфон, L-метионин сульфоксид, L-метионин сульфоксимин, селенометионин), миметики или производные аспаргиновой кислоты (например, DL-*meo*- β -гидроксиаспаргиновая кислота, L-аспаргиновой кислоты β -метиловый эфир), миметики или производные глутаминовой кислоты (например, γ -метиленглутаминовая кислота, γ -карбоксиглутаминовая кислота, γ -гидроксиглутаминовая кислота, L-глутаминовой

кислоты 5-метилового эфира, L- 2-аминогептанедионовая кислота), миметики или производные аспарагина (например, L-трео-3-гидроксиаспарагин, N,N-диметил-L-аспарагин, L-2-амино-2-карбоксивансульфонамид, 5-диазо-4-оксо-L-норвалин), миметики или производные глутамина (например, 4-F-(2*S*,4*R*)-фторглутамин, γ -глутамилметиламид, теанин, L-глутаминовой кислоты γ -моногидроксамат), аминокислоты, содержащие циклическое соединение (например, 4-аминопиперидин-4-карбоновая кислота, азетидин-2-карбоновая кислота, пипеколиновая кислота, 1-аминоциклопентанкарбоновая кислота, спинацин), или аминокислоты, содержащие био-ортогональное соединение (например, пропаргилглицин, α -аллилглицин, L-азидо-гомоаланин, *p*-бензоил-1-фенилаланин, *p*-2-фторацетил-1-фенилаланин, (*S*)-2-амино-3-(4-(6-метил-1,2,4,5-тетразин-3-ил) фенил) пропановая кислота).

Кроме описанных выше альфа-аминокислот, химические спейсеры (Sp_1), (Sp_2) и/или (Sp_3) могут содержать одну или несколько β -, γ -, δ - или ϵ -аминокислот. Таким образом, в определенных вариантах осуществления линкер может быть пептидомиметиком. Пептидомиметик может содержать не только классические пептидные связи, образованные между двумя α -аминокислотами, но может дополнительно или вместо этого содержать одну или несколько амидных связей, образованных между альфа-аминокислотой и β -, γ -, δ - или ϵ -аминокислотой, или между двумя β -, γ -, δ - или ϵ -аминокислотами, соответственно. Следовательно, в любом примере по настоящему изобретению, где линкер описан как пептид, следует понимать, что линкер также может быть пептидомиметиком и, таким образом, не состоять исключительно из α -аминокислот, но вместо этого может содержать одну или несколько β -, γ -, δ - или ϵ -аминокислот или молекул, которые не классифицируются как аминокислота. Примеры β -, γ -, δ - или ϵ -аминокислот, которые могут содержаться в линкере по настоящему изобретению, включают, помимо прочего, β -аланин, γ -аминомасляную кислоту, 4-амино-3-гидрокси-5-фенилпентановую кислоту, 4-амино-3-гидрокси-6-метилгептановую кислоту, 6-аминогексановую кислоту и статин.

Кроме того, химические спейсеры (Sp_1), (Sp_2) и/или (Sp_3) могут содержать производные аминокислот и/или миметики аминокислот. В вариантах осуществления, где (Sp_1), (Sp_2) и/или (Sp_3) могут содержать одно или более производных

аминокислот, предпочтительно, чтобы производные аминокислот имели свободные амино- и карбоксильные группы, чтобы обеспечить возможность образования пептидных или изопептидных связей. В вариантах осуществления, где (Sp_1), (Sp_2) и/или (Sp_3) могут содержать один или более миметиков аминокислот, предпочтительно, чтобы миметики аминокислот имели свободные амино- и карбоксильные группы, чтобы обеспечить возможность образования пептидных или изопептидных связей. Однако в определенных вариантах осуществления миметики или производные аминокислот могут иметь замещенную аминогруппу, которая не препятствует образованию пептидной связи. Примерами таких миметиков или производных аминокислот могут быть N-метилированные аминокислоты, такие как саркозин или N-Me-лейцин.

В вариантах осуществления, где аминокислотный остаток, содержащийся в (Sp_1) или (Sp_3), является терминальным аминокислотным остатком, терминальный аминокислотный остаток может содержать модифицированную, защищенную или замещенную N-концевую аминогруппу или C-концевую карбоксильную группу.

Кроме того, миметик или производное аминокислоты может быть аминокислотой, содержащей дериватизированную аминогруппу, например, миметики или производные пролина или других циклических аминокислот, например, азетидин-2-карбоновая кислота, пипеколиновая кислота или спинацин. Кроме того, миметик аминокислоты может также содержать другие функциональные группы, которые замещают амино и/или карбоксильные группы стандартной аминокислоты, что позволяет миметику аминокислоты подвергаться образованию альтернативных связей с соседними аминокислотами, производными аминокислот и/или миметиками аминокислот и образовывать пептидомиметик.

Термин "миметик аминокислоты" в контексте настоящего документа означает соединение, которое имеет структуру, отличную от структуры конкретной аминокислоты, но функционирует подобно данной конкретной аминокислоте и, таким образом, может быть использовано для замены данной конкретной аминокислоты. Считается, что миметик аминокислоты функционирует аналогично конкретной аминокислоте, если он, по крайней мере, в некоторой степени обладает сходными структурными и/или функциональными характеристиками с

аминокислотой, которую он имитирует. Термин "производное аминокислоты" означает аминокислоту, определение которой приведено в настоящем документе, при этом одна или несколько функциональных групп, входящих в состав аминокислоты, модифицированы или замещены. Производное аминокислоты предпочтительно может быть производным протеиногенной или неканонической аминокислоты. Любая функциональная группа производного аминокислоты может быть замещена или модифицирована.

В вариантах осуществления, в которых линкер содержит один или несколько терминальных аминокислотных остатков, терминальные аминокислотные остатки могут быть защищены. Например, в вариантах осуществления, где (Sp₁) содержит N-концевой аминокислотный остаток, N-концевая аминогруппа может быть защищена. Например, в определенных вариантах осуществления N-концевой аминокислотный остаток, содержащийся в спейсере (Sp₁), может быть ацетилирован. В других вариантах осуществления остаток R, содержащийся в мотиве RK, может быть N-концевой аминокислотой линкера. В таких вариантах осуществления N-концевая аминогруппа аргинина, миметика аргинина или производного аргинина может быть защищена, например, путем ацетилирования. В определенных вариантах осуществления связующий компонент В или нагрузка В могут быть аминокислотой или могут быть основаны на аминокислоте. В таких вариантах осуществления N-концевая аминогруппа нагрузки или связующего компонента В на основе аминокислоты может быть защищена, например, путем ацетилирования.

Аналогичным образом, в вариантах осуществления, в которых (Sp₃) содержит C-концевой аминокислотный остаток, C-концевая карбоксильная группа может быть защищена. Например, в определенных вариантах осуществления, C-концевой аминокислотный остаток в спейсере (Sp₃) может быть амидирован. В других вариантах осуществления остаток K, содержащийся в мотиве RK, может быть C-концевой аминокислотой линкера. В таких вариантах осуществления C-концевая карбоксильная группа лизина, миметика лизина или производного лизина может быть защищена, например, путем амидирования. В определенных вариантах осуществления связующий компонент В или нагрузка В могут быть аминокислотой или могут быть основаны на аминокислоте. В таких вариантах осуществления C-

концевая карбоксильная группа нагрузки или связующего компонента В на основе аминокислоты может быть защищена, например, путем амидирования.

В определенных вариантах осуществления каждый из химических спейсеров (Sp_1), (Sp_2) и/или (Sp_3) может содержать от 0 до 12 аминокислотных остатков, включая производные аминокислот и миметики аминокислот. То есть, в определенных вариантах осуществления (Sp_1) может содержать 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных остатков, (Sp_2) может содержать 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных остатков и (Sp_3) может содержать 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислотных остатков.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором линкер содержит не более 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 аминокислотных остатков.

То есть, в определенных вариантах осуществления линкер может содержать 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 аминокислотных остатка, включая миметики аминокислот и производные аминокислот. Следует понимать, что аминокислотные остатки, входящие в состав линкера, включая миметики аминокислот и производные аминокислот, предпочтительно являются аминокислотными остатками, содержащимися в мотиве RK, в химических спейсерах (Sp_1), (Sp_2) и/или (Sp_3) и в определенных вариантах осуществления также в В, когда В является связующим компонентом или нагрузкой на основе аминокислот. В вариантах осуществления, в которых линкер содержит только два аминокислотных остатка, эти два аминокислотных остатка содержатся в мотиве RK. В таких вариантах осуществления (Sp_1), (Sp_2) и/или (Sp_3) либо отсутствуют, либо не содержат какие-либо аминокислоты, миметики аминокислот или производные аминокислот.

То есть, в определенных вариантах осуществления линкер может содержать от 2 до 25 аминокислотных остатков, включая миметики аминокислот и производные аминокислот. В других вариантах осуществления линкер может содержать от 2 до 20 аминокислотных остатков, включая миметики аминокислот и производные аминокислот. В других вариантах осуществления линкер может содержать от 2 до 15

аминокислотных остатков, включая миметики аминокислот и производные аминокислот. В других вариантах осуществления линкер может содержать от 2 до 10 аминокислотных остатков, включая миметики аминокислот и производные аминокислот. В других вариантах осуществления линкер может содержать от 3 до 10 аминокислотных остатков, включая миметики аминокислот и производные аминокислот. В других вариантах осуществления линкер может содержать от 3 до 8 аминокислотных остатков, включая миметики аминокислот и производные аминокислот. В других вариантах осуществления линкер может содержать от 3 до 6 аминокислотных остатков, включая миметики аминокислот и производные аминокислот.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, в котором суммарный заряд линкера является нейтральным или положительным.

В определенных вариантах осуществления линкер представляет собой пептидный линкер (или пептидомиметик, описанный в настоящем документе). То есть, химические спейсеры (Sp_1), (Sp_2) и/или (Sp_3), если они присутствуют, состоят исключительно из аминокислот, миметиков аминокислот или производных аминокислот. Суммарный заряд пептида обычно рассчитывается при нейтральном pH (7,0). При самом простом подходе суммарный заряд определяется путем сложения количества положительно заряженных аминокислотных остатков (Arg и Lys и опционально His) и количества отрицательно заряженных остатков (Asp и Glu) и вычисления разности двух групп. В случаях, когда линкер содержит неканонические аминокислоты или производные аминокислот, в которых заряженная функциональная группа модифицирована или замещена, специалистам известны способы определения заряда неканонической аминокислоты или производного аминокислоты при нейтральном pH.

В определенных вариантах осуществления нагрузка или связующий компонент В или любой неаминокислотный компонент, входящие в состав (Sp_1), (Sp_2) и/или (Sp_3), также могут вносить вклад в суммарный заряд линкера. Однако специалистам известны способы расчета суммарного заряда всего линкера, включая любые неаминокислотные компоненты, предпочтительно при нейтральном pH (7,0).

В определенных[вариантах осуществления суммарный заряд линкера рассчитывается исключительно на основе остатков аминокислот, входящих в состав линкера, включая миметики аминокислот и производные аминокислот. Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором суммарный заряд аминокислотных остатков, входящих в состав линкера, является нейтральным или положительным.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором линкер не содержит отрицательно заряженные аминокислотные остатки.

То есть, линкер может не содержать отрицательно заряженные аминокислотные остатки, включая миметики аминокислот и производные аминокислот. Отрицательно заряженный аминокислотный остаток - это аминокислота, миметик аминокислоты или производное аминокислоты, которое несет отрицательный заряд при нейтральном рН (7,0). Отрицательно заряженными каноническими аминокислотами являются глутаминовая и аспарагиновая кислоты. Однако в данной области известны отрицательно заряженные неканонические аминокислоты, миметики аминокислот и производные аминокислот.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором линкер содержит, по меньшей мере, один положительно заряженный аминокислотный остаток вне мотива RK. То есть, (Sp₁), (Sp₂) и/или (Sp₃) содержат, по меньшей мере, одну положительно заряженную аминокислоту. В определенных вариантах осуществления (Sp₁), (Sp₂) и/или (Sp₃) содержат, по меньшей мере, один остаток гистидина.

Помимо или вместо аминокислотных остатков, включая миметики и производные аминокислот, химические спейсеры (Sp₁), (Sp₂) и/или (Sp₃) могут содержать или состоять из неаминокислотных компонентов.

То есть, в определенных вариантах осуществления химические спейсеры (Sp₁), (Sp₂) и/или (Sp₃) могут состоять не только из аминокислот, миметиков аминокислот или производных аминокислот. То есть, химические спейсеры (Sp₁), (Sp₂) и/или (Sp₃) могут содержать неаминокислотные компоненты или состоять исключительно из

неаминокислотных компонентов. В определенных вариантах осуществления химические спейсеры (Sp_1), (Sp_2) и/или (Sp_3) могут содержать аминокислотные и неаминокислотные компоненты.

Например, но без ограничений, каждый из химических спейсеров (Sp_1), (Sp_2) и/или (Sp_3) может содержать углерод-содержащий каркас из 1-200 атомов, опционально углерод-содержащий каркас, по меньшей мере, из 10 атомов, например, 10-100 атомов или 20-100 атомов, замещенный на одном или более атомах, при этом опционально углерод-содержащий каркас представляет собой линейный углеводород или содержит циклическую группу, симметрично или асимметрично разветвленный углеводород, моносахарид, дисахарид, линейный или разветвленный олигосахарид (асимметрично разветвленный или симметрично разветвленный), другие природные линейные или разветвленные олигомеры (асимметрично разветвленные или симметрично разветвленные), или в более общем случае любой димер, тример или высший олигомер (линейный, асимметрично разветвленный или симметрично разветвленный), полученный в результате любого процесса полимеризации с ростом цепи или ступенчатой полимеризации.

(Sp_1), (Sp_2) и/или (Sp_3) может быть любым прямым, разветвленным и/или циклическим C_{2-30} алкилом, C_{2-30} алкенилом, C_{2-30} алкинилом, C_{2-30} гетероалкилом, C_{2-30} гетероалкенилом, C_{2-300} гетероалкинилом, при этом опционально в него может быть вставлен один или более радикалов гомоциклического ароматического соединения или радикалов гетероциклического соединения; в частности, любым прямым или разветвленным C_{2-5} алкилом, C_{5-10} алкилом, C_{11-20} алкилом, $-O-C_{1-5}$ алкилом, $-O-C_{5-10}$ алкилом, $-O-C_{11-20}$ алкилом или $(CH_2-CH_2-O)_{1-24}$ или $(CH_2)_{x1}-(CH_2-O-CH_2)_{1-24}-(CH_2)_{x2}$ группой, где $x1$ и $x2$ независимо являются целым числом, выбранным из диапазона от 0 до 20, аминокислотой, олигопептидом, гликаном, сульфатом, фосфатом или карбоксилатом. В некоторых вариантах осуществления (Sp_1), (Sp_2) и/или (Sp_3) могут содержать C_{2-6} алкильную группу.

В некоторых вариантах осуществления химические спейсеры (Sp_1), (Sp_2) и/или (Sp_3) могут содержать один или несколько полиэтиленгликольных (ПЭГ) компонентов или сопоставимые конденсационные полимеры, такие как поли(карбоксибетаинметакрилат) (pCBMA), полиоксазолин, полиглицерин,

поливинилпирролидон или поли(гидроксиэтилметакрилат) (pHEMA). Полиэтиленгликоль (ПЭГ) — это полиэфирное соединение, имеющее множество применений от промышленного производства до медицины. ПЭГ также известен как полиэтиленоксид (PEO) или полиоксиэтилен (POE), в зависимости от его молекулярного веса. Структура ПЭГ обычно выражается как $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$. Специалистам известны способы функционализации конденсационных полимеров для их соединения с аминокислотным остатком или нагрузкой.

Изобретатели показали, что линкеры, включающие компонент ПЭГ, могут быть конъюгированы с гликозилированным антителом так же эффективно, как и аналогичные линкеры без компонента ПЭГ. Например, линкеры ARK-PEG₂-PABC-MMAE (ФИГ.14) и ARK-ARK-PEG₂-(NH)-(CH₃)-S-C4-майтанин (ФИГ.15) были конъюгированы с гликозилированным Полатузумабом с эффективностью 92 и 90%, соответственно (по сравнению с 94% для ARK-PABC-MMAE). В другом примере линкеры ARK-PEG₂-PABC-MMAE (ФИГ.14) и ARK-PEG₂-(NH)-(CH₃)-S-C4-майтанин (ФИГ.15) были конъюгированы с гликозилированным Трастузумабом с эффективностью 99% (по сравнению с 100% для ARK-PABC-MMAE).

Так, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором линкер содержит один или более ПЭГ компонентов. В некоторых вариантах осуществления ПЭГ компонент может входить в состав химических спейсеров (Sp₁), (Sp₂) и/или (Sp₃). В определенных вариантах осуществления каждый ПЭГ компонент, входящий в состав линкера, может содержать от 2 до 20 мономеров этиленгликоля, от 2 до 15 мономеров этиленгликоля, от 2 до 10 мономеров этиленгликоля или от 2 до 5 мономеров этиленгликоля. В определенных вариантах осуществления ПЭГ компонент входит в (Sp₂) для прямого соединения связующего компонента или нагрузки с мотивом RK. В определенных вариантах осуществления ПЭГ компонент входит в (Sp₂) для прямого соединения связующего компонента или нагрузки с аминокислотным остатком, содержащимся в (Sp₂). В определенных вариантах осуществления ПЭГ компонент входит в (Sp₂) для соединения мотива RK с самоотщепляющимся компонентом, который, в свою очередь, соединен с нагрузкой. В определенных вариантах осуществления ПЭГ компонент входит в состав (Sp₂) для соединения аминокислотного остатка, входящего

в состав (Sp_2), с самоотщепляющимся компонентом, который, в свою очередь, соединен с нагрузкой.

В определенных вариантах осуществления химические спейсеры (Sp_1), (Sp_2) и/или (Sp_3) могут содержать декстран. Используемый здесь термин "декстран" означает сложный, разветвленный глюкан, состоящий из цепей различной длины, который может иметь вес от 3 до 2000 кДа. Прямая цепь обычно состоит из альфа-1,6 гликозидных связей между молекулами глюкозы, а ответвления начинаются от альфа-1,3 связей. Декстран может быть синтезирован из сахарозы, например, молочнокислыми бактериями. В контексте настоящего изобретения декстран, используемый в качестве носителя, предпочтительно имеет молекулярный вес от 15 до 1500 кДа.

В определенных вариантах осуществления химические спейсеры (Sp_1), (Sp_2) и/или (Sp_3) могут содержать олигонуклеотид. Термин "олигонуклеотид", используемый в настоящем документе, означает олигомер или полимер рибонуклеиновой кислоты (РНК) или дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), а также олигонуклеотиды неприродного происхождения. Из-за более высокой стабильности олигонуклеотид предпочтительно представляет собой полимер ДНК.

В определенных вариантах осуществления химические спейсеры (Sp_1), (Sp_2) и/или (Sp_3), если они присутствуют, состоят исключительно из аминокислотных остатков, включая миметики и производные аминокислот, и ПЭГ компонентов. В определенных вариантах осуществления химические спейсеры (Sp_1), (Sp_2) и/или (Sp_3), если они присутствуют, состоят исключительно из аминокислотных остатков, включая миметики и производные аминокислот. В определенных вариантах осуществления все аминокислотные остатки, входящие в состав химических спейсеров (Sp_1), (Sp_2) и/или (Sp_3), являются α -L-аминокислотами. То есть, в определенных вариантах осуществления линкер, за исключением нагрузки или связующего компонента В, состоит исключительно из аминокислотных остатков. В определенных вариантах осуществления линкер, за исключением нагрузки или связующего компонента В, состоит исключительно из остатков α -L-аминокислот. Такие линкеры на основе пептидов могут содержать защитную группу на N- и/или C-

конце. То есть, N-концевая аминогруппа может быть ацетилирована, и/или C-концевая карбоксильная группа может быть амидирована.

Следует отметить, что химические спейсеры (Sp₁), (Sp₂) и/или (Sp₃) могут иметь идентичную структуру. Однако предпочтительно, чтобы каждый из химических спейсеров (Sp₁), (Sp₂) и/или (Sp₃) имел различную структуру и/или чтобы не все химические спейсеры (Sp₁), (Sp₂) и/или (Sp₃) присутствовали одновременно. То есть, в определенных вариантах осуществления в линкере может присутствовать только один или два из химических спейсеров (Sp₁), (Sp₂) и/или (Sp₃).

В определенных вариантах осуществления мотив RK может быть непосредственно соединен с одним или несколькими малыми гидрофобными аминокислотными остатками. Например, в определенных вариантах осуществления мотив RK может быть непосредственно соединен с одним или несколькими остатками аланина.

То есть, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором линкер содержит аминокислотную последовательность RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2), ARK (SEQ ID NO:3), RKR (SEQ ID NO:4) или RK-Val-Cit (SEQ ID NO:54). Следует понимать, что мотив RK, используемый для конъюгации линкера с остатком глутамина антитела, может содержаться в аминокислотных последовательностях RCAA, RKA, ARK, RKR или RK-Val-Cit.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором линкер содержит аминокислотную последовательность RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2) или ARK (SEQ ID NO:3).

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором линкер содержит аминокислотную последовательность RCAA (SEQ ID NO:1).

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором линкер содержит аминокислотную последовательность RK-Val-Cit (SEQ ID NO:54).

В рамках настоящего изобретения предпочтительно, чтобы линкер был конъюгирован с антителом через первичный амин, содержащийся в боковой цепи остатка K, содержащегося в мотиве RK. Таким образом, предпочтительно, чтобы химические спейсеры (Sp₁), (Sp₂) и/или (Sp₃) не содержали дополнительные остатки лизина, миметики лизина или производные лизина, которые могли бы служить дополнительными донорами аминов в реакции конъюгации на основе трансаглутаминазы. В других вариантах осуществления любая свободная N-концевая аминокислота, содержащаяся в линкере, может быть замещена, например, ацетилирована, чтобы она не могла служить субстратом для микробной трансаглутаминазы.

Линкер по настоящему изобретению дополнительно содержит, по меньшей мере, одно связующий компонент или нагрузку В. Линкер по настоящему изобретению может использоваться для прямой конъюгации нагрузки с антителом в одноэтапном процессе конъюгации. В других вариантах осуществления линкер, содержащий один или несколько связующих компонентов, может быть конъюгирован с антителом на первом этапе, а одна или несколько нагрузок могут быть затем связаны с конъюгатом антитело-линкер на втором этапе. В следующей таблице 1 приводится пояснение для этих двух терминов, используемых в настоящем документе:

Таблица 1. Одно- и двухэтапная конъюгация

Пептид линкера (пример)	Тип процесса	Этапы
(Sp ₁)-RK-(Sp ₂)-нагрузка-(Sp ₃) или (Sp ₁)-нагрузка-(Sp ₂)-RK-(Sp ₃)	Одноэтапная конъюгация	Этап 1: конъюгация линкера, содержащего нагрузку, с остатком Gln в антителе
(Sp ₁)-RK-(Sp ₂)-связующий компонент-(Sp ₃) или (Sp ₁)-связующий компонент-(Sp ₂)-RK-(Sp ₃)	Двухэтапная конъюгация	Этап 1: конъюгация линкера, содержащего связующий компонент, с остатком Gln в антителе Этап 2: конъюгация нагрузки со связующим компонентом

В определенных вариантах осуществления линкер может содержать один или

несколько связующих компонентов В. Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором В является связующим компонентом.

«Связующий компонент» в контексте настоящего документа обычно означает, по меньшей мере, бифункциональную молекулу. В рамках настоящего изобретения связующий компонент содержит первую функциональную группу, которая позволяет соединять связующий компонент с линкером по настоящему изобретению, и вторую функциональную группу, которая может быть использована для соединения дополнительной молекулы с линкером до или после конъюгации линкера с антителом. В определенных вариантах осуществления связующим компонентом по настоящему изобретению является аминокислота, миметик аминокислоты или производное аминокислоты. В таких вариантах осуществления связующий компонент предпочтительно соединяется с линкером через его аминогруппу, а функциональная группа, входящая в состав боковой цепи аминокислоты, может быть использована для соединения дополнительной молекулы с линкером. Как вариант, связующий компонент может быть соединен с линкером через его карбоксильную группу, а функциональная группа, входящая в состав боковой цепи аминокислоты, может быть использована для соединения дополнительной молекулы с линкером.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором связующий компонент В содержит

- биоортогональную маркерную группу или
- небииортогональное соединение для перекрестного сшивания.

Термин "биоортогональная маркерная группа" был введен Слеттенем и Бертоцци (A Bioorthogonal Quadricyclane Ligation. J Am Chem Soc 2011, 133 (44), 17570-17573) для обозначения реактивных групп, которые могут привести к химическим реакциям, происходящим внутри живых систем без вмешательства в естественные биохимические процессы. «Небиортогональное соединение для перекрестного сшивания» может быть любой молекулой, которая содержит или состоит из первой функциональной группы, при этом первая функциональная группа может быть химически или ферментативно сшита с нагрузкой, содержащей совместимую вторую

функциональную группу. Даже в тех случаях, когда реакция сшивания является небиоортогональной реакцией, предпочтительно, чтобы реакция не вносила дополнительных модификаций в антитело, кроме сшивания нагрузки с линкером. В связи с вышеизложенным, связующий компонент В может состоять или из "биоортогональной маркерной группы", или "небиоортогонального соединения", либо может содержать "биоортогональную маркерную группу" или "небиоортогональное соединение". Например, в случае со связующим компонентом $\text{Lys}(\text{N}_3)$, как весь $\text{Lys}(\text{N}_3)$, так и только азидная группа могут рассматриваться в качестве биоортогональной маркерной группы в рамках настоящего изобретения. $\text{Lys}(\text{N}_3)$ относится к 6-азидо-L-лизину, который также может сокращенно называться $\text{K}(\text{N}_3)$.

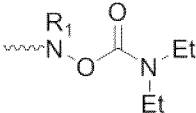
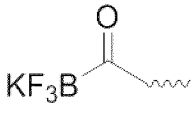
В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором биоортогональная маркерная группа или небиоортогональное соединение для перекрестного сшивания состоит из или содержит, по меньшей мере, одну молекулу или фрагмент, выбранный из группы, состоящей из:

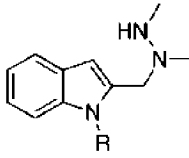
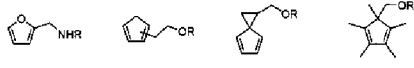
- $-\text{N}-\text{N}\equiv\text{N}$ или $-\text{N}_3$;
- $\text{Lys}(\text{N}_3)$;
- тетразина;
- алкина;
- напряженного циклооктина;
- BCN ;
- напряженного алкена;
- фотореактивной группы;
- альдегида;
- ацилтрифторбората;
- средства деградации белков ("PROTAC");
- циклопентадиена/спиролоциклопентадиена;
- тиоселективного электрофила;

- -SH; и
- цистеина.

Биоортогональная маркерная группа или небоортогональное образование для сшивания, входящее в состав линкера, может, например, участвовать в любой из реакций связывания, приведенных в Таблице 2:

Таблица 2

Партнер по связыванию 1	Партнер по связыванию 2	Тип реакции
-N-N≡N	производные циклооктина (например, DIFO, BCN, DIBAC, DIBO, ADIBO/DBCO)	SPAAC
-N-N≡N	Алкин	CuAAC
-N-N≡N	Триарилфосфины	Лигирование по Штаудингеру
Тетразин	Циклопропен Норборен Транс-циклооктен Циклооктин (BCN)	Тетразин-лигирование
-SH, например, остаток Cys	Малеимид	Тиол-малеимидная конъюгация
Амин	N-гидроксисукцинимид	
-O-карбамоилгидроксиламины 	Ацилтрифторбораты 	КАТ-лигирование (ацил-трифторборат калия)

Партнер по связыванию 1	Партнер по связыванию 2	Тип реакции
$R_x-S-S-R_y$	R_z-SH + восстановитель (например, TCEP, DTT)	Прямая дисульфидная биконъюгация
-CHO (альдегид)	HIPS-зонд 	Реакция гидразино-изо-Пикте-Шпенглер (HIPS)
-CHO (альдегид)	Производное пирролилаланина N-	Реакция пирролил аланин Пикте-Шпенглер (PAPS)
-CHO (альдегид)	$R_1-N-N-R_2$ $HO-N-R_1$ $H_2N-CHR_1-CH_2-SH$	Гидразон-лигирование Оксим-лигирование Тиазолидин-лигирование
Малеимид	-SH, например, остаток Cys	Тиол-малеимидная конъюгация
Малеимид		Тиол-циклопентадиеновая конъюгация (реакция Дильса-Альдера)
Биотин	Стрептавидин	Взаимодействие биотин-стрептавидин

Связующий компонент В может представлять собой или содержать то, что в Таблице 2 названо "Партнером по связыванию 1" или "Партнером по связыванию 2".

В определенных вариантах осуществления связующий компонент В может быть цистеином, миметиком цистеина или производным цистеина со свободной сульфгидрильной группой.

Свободная сульфгидрильная группа такого остатка Cys (или миметика, или производного) может быть конъюгирована с конструкцией нагрузки, содержащей

тиоселективный электрофил, такой как малеимид. Часто используются и также одобрены медицинскими органами, например, Adcetris, конструкции токсинов, содержащие малеимидный компонент. Таким образом, конструкции токсинов, содержащие токсин MMAE, могут быть соединены со свободной сульфгидрильной группой остатка Cys в линкере по настоящему изобретению.

Следует отметить, что вместо малеимида в способе по настоящему изобретению могут использоваться и другие тиоселективные электрофилы, такие как 3-арилпропионитрил (APN) или фосфонамидат.

Поэтому обеспечение Cys-остатка в линкере по настоящему изобретению имеет преимущество, позволяющее использовать готовые конструкции токсин-малеимид для создания конъюгатов антитело-нагрузка, или, в более общем случае, полностью использовать преимущества химии связывания Cys-малеимида. В то же время можно использовать готовые антитела, которые не нужно дегликозилировать. В конкретных вариантах осуществления остаток Cys может быть C-концевым или внутрицепочечным в линкере на основе аминокислоты.

В другом варианте осуществления связующий компонент В может содержать азидную группу. Специалистам известны молекулы, содержащие азидную группу, которые могут быть включены в линкер по настоящему изобретению, например, 6-азидо-лизин (Lys(N₃)) или 4-азидо-гомоаланин (Xaa(N₃)). Связующие компоненты, содержащие азидную группу, могут использоваться в качестве субстратов в различных био-ортогональных реакциях, таких как промотируемое напряжением азид-алкиновое циклоприсоединение (SPAAC), катализируемое медью азид-алкиновое циклоприсоединение (CuAAC) или лигирование по Штаудингеру. Например, в определенных вариантах осуществления нагрузка, содержащая производное циклооктина, такое как DBCO, DIBO, BCN или BARAC, может быть соединена с линкером, содержащим азидную группу, посредством SPAAC.

В еще одном варианте осуществления связующий компонент В может содержать тетразиновую группу. Специалистам известны молекулы, содержащие тетразин, которые могут быть включены в линкер по настоящему изобретению, предпочтительно производные аминокислот, содержащие тетразиновую группу.

Связующие компоненты, включающие тетразин, могут использоваться в качестве субстратов в биоортогональном тетразиновом лигировании. Например, в определенных вариантах осуществления нагрузки, содержащие циклопропен, норборен, производное норборена или циклооктиновую группу, например, бицикло[6.1.0]нонин (BCN), могут быть соединены с линкером, содержащим тетразиновую группу.

В определенных вариантах осуществления связующий компонент В может содержать циклический диен, например, производное циклопентадиена. Потенциальные производные циклопентадиена, которые могут быть связаны с молекулой нагрузки, содержащей малеимид, были описаны в работах Amant et al., Tuning the Diels-Alder Reaction for Bioconjugation to Maleimide Drug-Linkers; *Bioconjugate Chem.* 2018, 29, 7, 2406-2414 и Amant et al., A Reactive Antibody Platform for One-Step Production of Antibody-Drug Conjugates through a Diels-Alder Reaction with Maleimide; *Bioconjugate Chem.* 2019, 30, 9, 2340-2348.

В определенных вариантах осуществления связующий компонент В может содержать фотореактивную группу. Термин "фотореактивная группа" в контексте настоящего документа означает химическую группу, которая реагирует на приложенный внешний источник энергии и подвергается образованию активных видов, что приводит к ковалентной связи с соседней химической структурой (например, отщепляемым водородом). Примерами фотореактивных групп являются, помимо прочего, арил-азиды, такие как фенил-азид, о-гидроксифенил-азид, m-гидроксифенилазид, тетрафторфенил-азид, о-нитрофенил-азид, m-нитрофенил-азид или азидо-метилкумарин, диазириин, псорален или бензофенон.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, причем данный способ включает следующий этап конъюгации одной или нескольких нагрузок со связующим компонентом В.

Вместо непосредственной конъюгации линкера, содержащего одну или несколько нагрузок, с антителом в одноэтапном процессе, изобретение, в определенных вариантах осуществления, относится к двухэтапному процессу, в котором линкер, содержащий, по меньшей мере, один связующий компонент В, конъюгируется с

антителом на первом этапе, а одна или несколько нагрузок могут быть впоследствии соединены со связующим компонентом В на втором этапе.

Термин "нагрузка" в контексте настоящего документа представляет собой любую молекулу природного происхождения или полученную синтетическим путем, включая молекулы с низким молекулярным весом или химические соединения, которые могут быть синтезированы химическим путем, и более крупные молекулы или биологические соединения, которые должны быть получены путем ферментации клеток-хозяев или могут быть также синтезированы химическим путем и которые придают новое функциональное свойство антителу. Следует понимать, что нагрузка может содержать дополнительные структуры или функциональные группы, которые позволяют соединить нагрузку со связующим компонентом, входящим в состав линкера, или с другими частями линкера, такими как химические спейсеры (Sp_1) и/или (Sp_3) или мотив RK.

В двухэтапном процессе конъюгации нагрузка может быть связана со связующим компонентом любым подходящим способом, известным в данной области. Предпочтительно, нагрузка может быть связана с любой из биоортогональных маркерных групп или небиоортогональных соединений для сшивания, которые были описаны в настоящем документе. То есть, нагрузка предпочтительно содержит функциональную группу, совместимую с биоортогональной маркерной группой или небиоортогональными соединениями для сшивания, входящими в состав, по меньшей мере, одного связующего компонента В.

В данной области известны некоторые биоортогональные реакции, которые могут применяться для связывания нагрузки с биоортогональной маркерной группой, входящей в состав связующего компонента В. Например, был разработан ряд химических стратегий лигирования, которые отвечают требованиям биоортогональности, включая 1,3-диполярное циклоприсоединение между азидами и циклооктинами (также называемое клик-химией без меди, Baskin et al ("Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging". Proceedings of the National Academy of Sciences. 104 (43): 16793-7)), между нитронами и циклооктинами (Ning et al. ("Protein Modification by Strain-Promoted Alkyne-Nitrone Cycloaddition". Angewandte Chemie International Edition. 49 (17): 3065)), образование оксимов/гидразонов из альдегидов и

кетонов (Yarema, et al. ("Metabolic Delivery of Ketone Groups to Sialic Acid Residues. Application To Cell Surface Glycoform Engineering". *Journal of Biological Chemistry*. 273 (47): 31168-79)), тетразиновое лигирование (Blackman et al ("The Tetrazine Ligation: Fast Bioconjugation based on Inverse-electron-demand Diels-Alder Reactivity". *Journal of the American Chemical Society*. 130 (41): 13518-9)), клик-реакция на основе изонитрила (Stöckmann et al. ("Exploring isonitrile-based click chemistry for ligation with biomolecules". *Organic & Biomolecular Chemistry*. 9 (21): 7303)), и совсем недавно - квадрициклановое лигирование (Sletten & Bertozzi (*JACS, A Bioorthogonal Quadricyclane Ligation. J Am Chem Soc* 2011, 133 (44), 17570-17573)), катализируемое медью(I) азидо-алкиновое циклоприсоединение (CuAAC, Kolb & Sharpless ("The growing impact of click chemistry on drug discovery". *Drug Discov Today*. 8 (24): 1128-1137)), промотируемое напряжением азид-алкиновое циклоприсоединение (SPAAC, Agard et al ("A Comparative Study of Bioorthogonal Reactions with Azides". *ACS Chem. Biol.* 1: 644-648)), или промотируемое напряжением алкин-нитроновое циклоприсоединение (SPANC, MacKenzie et al. ("Strain-promoted cycloadditions involving nitrones and alkynes-rapid tunable reactions for bioorthogonal labeling". *Curr Opin Chem Biol.* 21: 81-8)). Все эти документы включены в настоящий документ посредством ссылки, чтобы обеспечить достаточное раскрытие информации и избежать многословных повторов.

Следует понимать, что нагрузка предпочтительно соединяется с био-ортогональной маркерной группой или не-био-ортогональным соединением для сшивания, входящим в состав линкера по настоящему изобретению, после того, как этот линкер был конъюгирован с остатком Gln антитела с помощью микробной трансглутаминазы. Однако настоящее изобретение также охватывает конъюгаты антитело-линкер, в которых одна или несколько нагрузок были соединены с линкером, содержащим, по меньшей мере, один связующий компонент В, на первом этапе и в которых полученная конструкция линкер-нагрузка конъюгируется с антителом с помощью микробной трансглутаминазы на втором этапе.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором одна или несколько нагрузок конъюгируются со связующим компонентом В посредством клик-реакции.

То есть, одна или несколько нагрузок могут быть связаны со связующим компонентом В в клик-реакции, в частности, в любой из клик-реакций, описанных в настоящем документе.

В особенно предпочтительном варианте осуществления, по меньшей мере, одна нагрузка может быть конъюгирована со связующим компонентом В, входящим в состав линкера, посредством тиол-малеимидной конъюгации. То есть, в некоторых вариантах осуществления нагрузка может содержать малеимидную группу, а связующий компонент В может представлять собой молекулу, содержащую тиольную группу, такую как, помимо прочего, остаток цистеина или миметик цистеина, например, гомоцистеин. Однако В также может быть неаминокислотной молекулой, содержащей свободную тиольную группу. В другом варианте осуществления нагрузка может содержать свободную тиольную группу, а связующий компонент В может содержать малеимидную группу.

В другом особенно предпочтительном варианте осуществления, по меньшей мере, одна нагрузка может быть конъюгирована со связующим компонентом В, входящим в состав линкера, посредством промотируемое напряжением азид-алкинового циклоприсоединения (SPAAC). То есть, в определенных вариантах осуществления нагрузка может содержать алкиновую группу, например, помимо прочего, циклооктиновую группу, а связующий компонент В может представлять собой молекулу, содержащую азидную группу, например, помимо прочего, производное лизина $\text{Lys}(\text{N}_3)$, описанное в настоящем документе. Однако В также может быть неаминокислотными молекулами, содержащими свободную азидную группу. В другом варианте осуществления нагрузка может содержать алкиновую группу, например, циклооктиновую группу, а связующий компонент В может содержать азидную группу.

Помимо клик-реакции между связующим компонентом в линкере и функциональной группой в нагрузке, нагрузка может быть ковалентно связана со связующим компонентом с помощью любой ферментативной или неферментативной реакции, известной в данной области.

Предпочтительно, чтобы нагрузка была связана со связующим компонентом посредством ковалентной связи. Однако в определенных вариантах осуществления нагрузка может быть связана со связующим компонентом посредством прочной нековалентной связи. То есть, в определенных вариантах осуществления связующий компонент В может содержать биотиновый компонент, такой как, помимо прочего, производное лизина биоцитин. В таких вариантах осуществления нагрузка, содержащая стрептавидиновый компонент, может быть связана с линкером, содержащим биотиновый компонент.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором связующий компонент В является нагрузкой.

В определенных вариантах осуществления нагрузка может уже быть частью линкера, так что нагрузка может быть конъюгирована с антителом в одноэтапном процессе. В таких вариантах осуществления линкер предпочтительно соединяется с линкером путем химического синтеза. Нагрузка предпочтительно соединяется с химическим спейсером, входящим в состав линкера, или непосредственно с мотивом R_K. В вариантах осуществления, в которых нагрузка соединена с аминокислотным остатком, включая миметики и производные аминокислот, нагрузка может быть соединена с С-концевой карбоксильной группой или N-концевой аминогруппой аминокислотного остатка. Как вариант, нагрузка может быть связана с функциональной группой, входящей в состав боковой цепи аминокислотного остатка. Специалистам известны методы функционализации нагрузки, благодаря которым она может быть соединена с карбоксильной группой, аминогруппой или боковой цепью аминокислоты.

Кроме того, специалистам известны методы соединения нагрузки с линкером на основе аминокислот путем химического синтеза. Например, амин-содержащая нагрузка, или тиол-содержащая нагрузка (например, аналоги майтанзина), или гидроксил-содержащая нагрузка (например, аналоги SN-38) может быть присоединена к С-концу линкера на основе аминокислоты путем химического синтеза. Однако специалистам известны другие реакции и реакционноспособные группы, которые могут быть использованы для присоединения нагрузки к N-концу, С-концу или боковой цепи аминокислоты или производного аминокислоты путем

химического синтеза. Типичные реакции, которые могут быть использованы для соединения нагрузки с линкером на основе аминокислоты путем химического синтеза, включают, помимо прочего: образование пептидной связи, активированное образование сложноэфирной связи (NHS-эфир, PFP-эфир), клик-реакцию (CuAAC, SPAAC), присоединение по Михаэлю (тиол-малеимидная конъюгация). Соединение нагрузки с пептидами было подробно описано ранее, например, в работах Costoplus et al. (Peptide-Cleavable Self-immolative Maytansinoid Antibody-Drug Conjugates Designed To Provide Improved Bystander Killing. ACS Med Chem Lett. 2019 Sep 27;10(10):1393-1399), Sonzini et al. (Improved Physical Stability of an Antibody-Drug Conjugate Using Host-Guest Chemistry. Bioconjug Chem. 2020 Jan 15;31(1):123-129), Boderо et al. (Synthesis and biological evaluation of RGD and isoDGR peptidomimetic- α -amanitin conjugates for tumor-targeting. Beilstein J. Org. Chem. 2018, 14, 407–415), Nunes et al. (Use of a next generation maleimide in combination with THIOMAB™ antibody technology delivers a highly stable, potent and near homogeneous THIOMAB™ antibody-drug conjugate (TDC). RSC Adv., 2017,7, 24828-24832), Doronina et al. (Enhanced activity of monomethylauristatin F through monoclonal antibody delivery: effects of linker technology on efficacy and toxicity. Bioconjug Chem. 2006 Jan-Feb;17(1):114-24), Nakada et al. (Novel antibody drug conjugates containing exatecan derivative-based cytotoxic payloads. ACS Med Chem Lett. 2016 Mar 15;26(6):1542-1545) и Dickgiesser et al. (Site-Specific Conjugation of Native Antibodies Using Engineered Microbial Transglutaminases. Bioconjug Chem. 2020 Mar 12. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00061).

Следует понимать, что нагрузка может быть соединена с N-концом или C-концом линкера на основе пептида или содержащего пептид линкера по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления нагрузка может быть соединена непосредственно с N-концевой аминогруппой или C-концевой карбоксильной группой пептида или аминокислотного остатка (см., например, ФИГ.22).

Специалистам известны реакционноспособные группы, которые подходят для соединения нагрузки с аминокислотным остатком. Например, амин-содержащая нагрузка может быть соединена с C-концевой карбоксильной группой аминокислотного остатка через амидную связь (ФИГ.22). Как вариант, нагрузка,

содержащая тиольную группу или гидроксильную группу, может быть соединена с С-концевой карбоксильной группой аминокислоты через тиоэфирную или сложноэфирную связь, соответственно. Нагрузка, содержащая группу карбоновой кислоты, может быть соединена с N-концевой аминогруппой аминокислотного остатка через амидную связь.

В определенных вариантах осуществления нагрузка может быть опосредованно соединена с N- или С-концевой областью пептида или аминокислотного остатка, входящего в состав линкера по настоящему изобретению. Специалистам известны молекулы линкеров, которые могут быть использованы для соединения нагрузки с N-концевой аминогруппой или С-концевой карбоксильной группой аминокислотного остатка, входящего в состав линкера по настоящему изобретению.

В определенных вариантах осуществления нагрузка, содержащая гидроксильную группу, может быть соединена с N-концом аминокислотного остатка через молекулу линкера. Например, нагрузки, содержащие гидроксильную группу, могут быть соединены с N-концевой аминогруппой через молекулу карбаматного линкера (ФИГ.24).

В определенных вариантах осуществления нагрузка, содержащая тиольную группу, может быть соединена с N-концом аминокислотного остатка через молекулу линкера. Например, нагрузки, содержащие тиольную группу, могут быть соединены с N-концевой аминогруппой через молекулу тиокарбаматного линкера (ФИГ.28). Как вариант, нагрузка, содержащая тиольную группу, может быть соединена с N-концевой аминогруппой через молекулу алкильного линкера, содержащую карбоксильную группу и тиольную группу. В определенных вариантах осуществления молекула алкильного линкера может представлять собой молекулу линкера 3-меркаптопропионовой кислоты, при этом нагрузка образует ди-серную связь с тиольной группой, входящей в молекулу линкера 3-меркаптопропионовой кислоты (ФИГ.29).

В определенных вариантах осуществления нагрузка, содержащая амидную группу, может быть соединена с N-концом аминокислотного остатка через молекулу линкера. Например, нагрузки, содержащие аминную группу, могут быть соединены с N-

концевой аминогруппой через молекулу линкера дикарбоновой кислоты, при этом линкер дикарбоновой кислоты образует амидную связь с нагрузкой и аминогруппой N-концевого аминокислотного остатка. Примерами дикарбоновых кислот, которые могут быть использованы в качестве молекул линкера в настоящем изобретении, являются, помимо прочего, янтарная кислота или пимелиновая кислота (см. ФИГ.9 и 30).

Альтернативные молекулы линкера для опосредованного соединения нагрузок с N-концом аминокислотного остатка, входящего в линкер по настоящему изобретению, или молекулы линкера, подходящие для опосредованного соединения нагрузок с C-концом аминокислотного остатка, входящего в линкер по настоящему изобретению, были описаны в данной области и охватываются настоящим изобретением.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором нагрузка содержит, по меньшей мере, один из следующих компонентов:

- токсин;
- цитокин;
- фактор роста;
- радионуклид;
- гормон;
- противовирусное средство;
- антибактериальное средство;
- флуоресцентный краситель;
- иммунорегуляторное/иммуностимулирующее средство;
- компонент, увеличивающий период полураспада;
- компонент, повышающий растворимость;
- конъюгат полимер-токсин;
- нуклеиновая кислота;
- биотиновый или стрептавидиновый компонент;

- витамин;
- средство деградации белков ("PROTAC");
- связывающееся с мишенью соединение; и/или
- противовоспалительное средство.

Любая из нагрузок, описанных в настоящем документе, может быть либо непосредственно соединена с линкером для использования в одноэтапном процессе конъюгации, описанном в настоящем документе, либо может быть соединена со связующим компонентом, входящим в состав конъюгата антитело-линкер, который был получен в рамках двухэтапного процесса, описанного в настоящем документе.

В определенных вариантах осуществления нагрузка может быть цитокином. Термин "цитокин" в контексте настоящего документа означает любой секретируемый полипептид, который влияет на функции других клеток и модулирует взаимодействие между клетками в иммунной или воспалительной реакции. Цитокины включают, помимо прочего, монокины, лимфокины и хемокины, независимо от того, какие клетки их производят. Например, монокины обычно производятся и секретируются моноцитом, однако многие другие клетки производят монокины, например, естественные клетки-киллеры, фибробласты, базофилы, нейтрофилы, эндотелиальные клетки, астроциты головного мозга, стромальные клетки костного мозга, эпидермальные кератиноциты и В-лимфоциты. Лимфокины обычно производятся лимфоцитами. Примеры цитокинов включают, помимо прочего, интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-6 (IL-6), фактор некроза опухоли альфа (TNF α) и фактор некроза опухоли бета (TNF β).

В определенных вариантах осуществления нагрузка может представлять собой противовоспалительное средство. В контексте настоящего документа термин "противовоспалительное средство" означает те классы средств, основной способ действия и применения которых лежат в области лечения воспаления, а также любое другое средство из другого терапевтического класса, обладающее полезным противовоспалительным действием. Такие противовоспалительные средства включают, помимо прочего, нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), болезнь-модифицирующие антиревматические препараты (БМАРП),

макролидные антибиотики и статины. Предпочтительно, НПВС включают, помимо прочего, салицилаты (например, аспирин), арилпропионовые кислоты (например, ибупрофен), антраниловые кислоты (например, мефенаминовую кислоту), пиразолы (например, фенилбутазон), циклические уксусные кислоты (индометацин) и оксикамы (например, пироксикам). Предпочтительно, противовоспалительные средства для применения в способах по настоящему изобретению включают сулиндак, диклофенак, теноксикам, кеторолак, напроксен, набуметон, дифлуназал, кетопрофен, арлпропионовые кислоты, тенидап, гидроксихлорохин, сульфасалазин, целекоксиб, рофекоксиб, мелоксикам, эторикоксиб, вальдекоксиб, метотрексат, этанерцепт, инфликсимаб, адалимумаб, аторвастатин, флувастатин, ловастатин, правастатин, симвастатин, кларитромицин, азитромицин, рокситромицин, эритромицин, ибупрофен, дексипрофен, флурбипрофен, фенопрофен, фенбуфен, беноксапрофен, декскетопрофен, толфенамовую кислоту, нимесулид и оксапрозин.

В определенных вариантах осуществления противовоспалительное средство может быть противовоспалительным цитокином, который, будучи конъюгированным с мишень-специфичным антителом, может уменьшать воспаления, вызванные, например, аутоиммунными заболеваниями. Цитокинами с противовоспалительным действием могут быть, помимо прочего, IL-1RA, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13 или TGF- β .

В определенных вариантах осуществления нагрузка может быть фактором роста. Термин "фактор роста" в контексте настоящего документа означает вещество природного происхождения, способное стимулировать клеточный рост, пролиферацию, клеточную дифференциацию и/или клеточное созревание. Факторы роста существуют в виде белков или стероидных гормонов. Факторы роста важны для регуляции различных клеточных процессов. Факторы роста обычно действуют как сигнальные молекулы между клетками. Однако способность способствовать клеточному росту, пролиферации, клеточной дифференциации и клеточному созреванию у разных факторов роста различна. Неограничивающий список примеров факторов роста включает: основной фактор роста фибробластов, адреномедуллин, ангиопоэтин, аутокринный фактор подвижности раковых клеток, костные морфогенетические белки, нейротрофический фактор мозга, эпидермальный фактор

роста, эпителиальный фактор роста, фактор роста фибробластов, нейротрофический фактор линии глиальных клеток, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, гранулоцитарный макрофагальный колониестимулирующий фактор, фактор роста и дифференцировки 9, фактор роста гепатоцитов, фактор роста гепатомы, фактор роста инсулина, инсулиноподобный фактор роста, фактор, стимулирующий миграцию, миостатин, фактор роста нервов и другие нейротрофины, фактор роста тромбоцитов, трансформирующий фактор роста альфа, трансформирующий фактор роста бета, фактор некроза опухоли-альфа, фактор роста эндотелия сосудов, плацентарный фактор роста, фетальный бычий соматотрофин и цитокины (например, IL-1 - кофактор для IL-3 и IL-6, IL-2-фактор роста Т-клеток, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 и IL-7).

В определенных вариантах осуществления нагрузка может быть гормоном. Термин "гормон" в контексте настоящего документа означает химическое вещество, выделяемое клеткой или железой в одной части тела, которое посылает сообщения, влияющие на клетки в других частях организма. Примерами гормонов, полезных в настоящем изобретении, являются, помимо прочего, мелатонин (MT), серотонин (5-НТ), тироксин (Т4), трийодтиронин (Т3), эпинефрин или адреналин (ЕРІ), норэпинефрин или норадреналин (NRE), дофамин (DPM или DA), антимюллеров гормон (AMH), адипонектин (Acsp30), адренкортикотропный гормон или кортикотрофин (ACTH), ангиотензиноген и ангиотензин (AGT), антидиуретический гормон или вазопрессин (ADH), предсердный натрийуретический пептид или атриопептин (ANP), кальцитонин (CT), холецистокинин (ССК), кортикотрофин-рилизинг гормон (CRH), эритропоэтин (ЕРО), фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), гастрин (GRP), грелин, глюкагон (GCG), гонадотрофин-рилизинг гормон (GnRH), высвобождающий гормон роста гормон (GHRH), хорионический гонадотрофин человека (hCG), плацентарный лактоген человека (HPL), гормон роста (GH или hGH), ингибин, инсулин (INS), инсулиноподобный фактор роста или соматомедин (IGF), лептин (LEP), лютеинизирующий гормон (LH), меланоцитстимулирующий гормон (MSH или α -MSH), орексин, окситоцин (OXT), паратиреоидный гормон (PTH), пролактин (PRL), релаксин (RLN), секретин (SCT), соматостатин (SRIF), тромбопоэтин (TPO), тирестимулирующий гормон или тиреотропин (TSH), тиреотропин-рилизинг гормон (TRH), кортизол, альдостерон, тестостерон, дегидроэпиандростерон (DHEA), андростенедион, дигидротестостерон

(DHT), эстрон, эстриол (E3), прогестерон, кальцитриол, кальцидиол, простагландины (PG), лейкотриены (LT), простаглицин (PGI₂), тромбоксан (TXA₂), пролактин-релизинг гормон (PRH), липотропин (PRH), мозговой натрийуретический пептид (BNP), нейропептид Y (NPY), гистамин, эндотелин, панкреатический полипептид, ренин и энкефалин.

В определенных вариантах осуществления нагрузка может быть противовирусным средством. Термин "противовирусное средство" в контексте настоящего документа означает средство (соединение или биологический препарат), которое эффективно для ингибирования образования и/или репликации вируса в организме млекопитающего. Сюда входят средства, которые нарушают механизмы хозяина или вируса, необходимые для образования и/или репликации вируса в организме млекопитающего. Противовирусные средства включают, например, рибавирин, амантадин, VX-497 (меримеподиб, Vertex Pharmaceuticals), VX-498 (Vertex Pharmaceuticals), левовирин, вирамидин, цеппин (максамин), XTL-001 и XTL-002 (XTL Biopharmaceuticals).

В определенных вариантах осуществления нагрузка может быть антибактериальным средством. Термин "антибактериальное средство" в контексте настоящего документа означает любое вещество, соединение, комбинацию веществ или комбинацию соединений, способных: (i) подавлять, уменьшать или предотвращать рост бактерий; (ii) подавлять или уменьшать способность бактерий вызывать инфекцию у субъекта; или (iii) подавлять или уменьшать способность бактерий размножаться или оставаться инфекционными в окружающей среде. Термин "антибактериальное средство" также означает соединения, способные снижать инфекционность или вирулентность бактерий.

В определенных вариантах осуществления нагрузка может быть иммунорегуляторным средством. Термин "иммунорегуляторное средство", используемый в настоящем документе для комбинированной терапии, означает вещества, которые подавляют, маскируют или усиливают иммунную систему хозяина. Примеры иммуномодулирующих средств включают, помимо прочего, белковые средства, такие как цитокины, пептидные миметики и антитела (например, человеческие, гуманизированные, химерные, моноклональные, поликлональные, Fvs,

ScFvs, Fab или F(ab)₂ фрагменты или эпитопсвязывающие фрагменты), молекулы нуклеиновых кислот (например, молекулы антисмысловых нуклеиновых кислот, иРНК и тройные спирали), малые молекулы, органические соединения и неорганические соединения. В частности, иммуномодулирующие средства включают, помимо прочего, метотрексат, лефлуномид, циклофосфамид, цитоксан, иммуран, циклоспорин А, миноциклин, азатиоприн, антибиотики (например, FK506 (такролимус)), метилпреднизолон (MP), кортикостероиды, стероиды, микофенолат мофетил, рапамицин (сиролимус), мизорибин, дезоксиспергуалин, бреквинар, малонитрилоаминд (например, лефлунамид), модуляторы рецепторов Т-клеток и модуляторы рецепторов цитокинов.

В определенных вариантах осуществления иммунорегуляторное средство может быть иммуностимулирующим средством. Термин "иммуностимулирующее средство" в контексте настоящего документа предпочтительно означает любое вещество или вещество, способное вызвать иммунный ответ (например, иммунный ответ против определенного патогена). Соединения, активирующие иммунные клетки, включают агонисты Toll-подобных рецепторов (TLR). Такие агонисты включают ассоциированные с патогеном молекулярные фрагменты (PAMP), например, композицию, имитирующую инфекцию, такую как иммуномодулятор бактериального происхождения (также известную как сигнал опасности), и ассоциированные с повреждением молекулярные фрагменты (DAMP), например, композицию, имитирующую подверженную стрессу или поврежденную клетку. Агонисты TLR включают нуклеинокислотные или липидные композиции (например, монофосфориллипид А (MPLA)). В одном примере агонист TLR включает агонист TLR9, такой как цитозин-гуанозинный олигонуклеотид (CpG-ODN), поли(этиленимин) (PEI)-конденсированный олигонуклеотид (ODN), такой как PEI-CpG-ODN, или двухцепочечную дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК). В другом примере агонист TLR включает агонист TLR3, такой как полиинозин-полицитидиловая кислота (поли (I:C)), PEI-поли (I:C), полиаденил-полиуридиловая кислота (поли (A:U)), PEI-поли (A:U), или двухцепочечная рибонуклеиновая кислота (РНК). Другие примеры вакцинных иммуностимулирующих соединений включают липополисахарид (ЛПС), хемокины/цитокины, грибковые бета-глюканы (такие как лентинан), имиквимод, CRX-527 и OM-174.

В определенных вариантах осуществления нагрузка может быть соединением, увеличивающим период полураспада, или соединением, повышающим растворимость. Соединениями, увеличивающими период полураспада, являются, например, ПЭГ-соединения (полиэтиленгликолевые соединения; ПЭГилирование), другие полимерные соединения, ПАС-соединения (олигопептиды, включающие пролин, аланин и серин; ПАСилирование) или соединения, связывающиеся с сывороточным альбумином. Соединения, повышающие растворимость, представляют собой, например, ПЭГ-соединения (ПЭГилирование) или ПАС-соединения (ПАСилирование).

В определенных вариантах осуществления нагрузка может быть конъюгатом полимер-токсин. Конъюгаты полимер-токсин - это полимеры, способные нести множество молекул нагрузки. Такие конъюгаты иногда также называют флексимерами, как, например, продаваемые компанией Mersana therapeutics. Конъюгат полимер-токсин может содержать любой из токсинов, описанных в настоящем документе.

В определенных вариантах осуществления нагрузка может быть нуклеотидом. Одним из примеров нуклеинокислотной нагрузки является МСТ-485, которая представляет собой очень маленькую некодирующую двухцепочечную РНК, обладающую онколитическими и иммуноактивирующими свойствами, разработанную компанией MultiCell Technologies, Inc.

В определенных вариантах осуществления нагрузка может быть флуоресцентным красителем. Термин "флуоресцентный краситель" в контексте настоящего документа означает краситель, который поглощает свет на первой длине волны и излучает на второй длине волны, которая длиннее первой длины волны. В определенном варианте осуществления флуоресцентный краситель представляет собой флуоресцентный краситель ближнего инфракрасного диапазона, который излучает свет на длине волны от 650 до 900 нм. В этой области автофлуоресценция тканей ниже, а меньшее угасание флуоресценции способствует глубокому проникновению в ткани с минимальными фоновыми помехами. Соответственно, флуоресцентная визуализация в ближней инфракрасной области может быть использована для того, чтобы сделать ткани, которые связаны конъюгатом антитело-нагрузка по настоящему изобретению,

видимыми во время операции. "Флуоресцентные красители ближнего инфракрасного диапазона" известны в данной области и коммерчески доступны. В некоторых вариантах осуществления флуоресцентный краситель ближнего инфракрасного диапазона может представлять собой IRDye 800CW, Cy7, Cy7.5, NIR CF750/770/790, DyLight 800 или Alexa Fluor 750.

В определенных вариантах осуществления нагрузка содержать радионуклид. Термин "радионуклид" в контексте настоящего документа означает полезные в медицинских целях радионуклиды, включая, например, положительно заряженные ионы радиометаллов, таких как Y, In, Tb, Ac, Cu, Lu, Tc, Re, Co, Fe и им подобных, таких как ^{90}Y , ^{111}In , ^{67}Cu , ^{77}Lu , ^{99}Tc , ^{161}Tb , ^{225}Ac и т.п. Радионуклид может содержаться в хелатообразующем средстве, например, DOTA или NODA-GA. Кроме того, радионуклид может быть терапевтическим радионуклидом или радионуклидом, который может применяться в качестве контрастного вещества в методах визуализации, что описано ниже. Радионуклиды или молекулы, содержащие радионуклиды, известны в данной области и коммерчески доступны.

В определенных вариантах осуществления нагрузка может быть витамином. Витамин может быть выбран из группы, состоящей из фолатов, включая фолиевую кислоту, фолацин и витамин B9.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором токсин представляет собой, по меньшей мере, один токсин, выбранный из группы, состоящей из

- пирролобензодиазепина (например, PBD);
- ауристатина (например, MMAE, MMAF);
- майтанзиноида (например, майтанзина, DM1, DM4, DM21);
- дуокармицина;
- ингибитора никотинамидфосфорибозилтрансферазы (NAMPT);
- тубулизина;

- энедина (например, калихеамицина);
- производного антрациклина (PNU) (например, доксорубицина);
- ингибитора кинезина веретенообразного белка (KSP) на основе пиррола;
- криптофицина;
- ингибитора эффлюксного насоса лекарственного препарата;
- сандрамицина;
- аманитина (например, α -аманитина); и
- камптотецина (например, эксатеканов, дерукстеканов).

То есть, конъюгаты антитело-линкер, полученные данным способом по изобретению, предпочтительно содержат токсинную нагрузку. Термин "токсин" в контексте настоящего документа означает любое соединение, вырабатываемое живыми клетками или организмами и являющееся ядовитым для клетки или организма. Токсины, таким образом, могут быть, например, малыми молекулами, пептидами или белками. Конкретными примерами являются нейротоксины, некротоксины, гемотоксины и цитотоксины. В определенных вариантах осуществления токсин представляет собой токсин, который используется при лечении неопластических заболеваний. То есть токсин может быть конъюгирован с антителом с помощью способа по изобретению и доставлен к злокачественной клетке или внутрь нее благодаря целевой специфичности антитела.

В определенных вариантах осуществления токсин может быть ауристатином. В контексте настоящего документа термин "ауристатин" относится к семейству антимитотических средств. Производные ауристатина также входят в определение термина "ауристатин". Примеры ауристатина включают, помимо прочего, синтетические аналоги ауристатина E (AE), метил ауристатин E (MMAE), метил ауристатин F (MMAF) и доластатин.

В определенных вариантах осуществления токсин может быть майтанзиноидом. В контексте настоящего изобретения термин "майтанзиноид" относится к классу высокоцитотоксичных препаратов, первоначально выделенных из африканского кустарника *Maytenus ovatus*, а также к майтансинолу (Maytansinol) и С-3 эфиру природного майтансинола (Патент США № 4,151,042); аналогу С-3 эфира синтетического майтансинола (Kupchan et al., J. Med. Chem. 21: 31-37, 1978; Higashide et al., Nature 270: 721-722, 1977; Kawai et al., Chem. Farm. Bull. 32: 3441-3451; и Патент США № 5,416,064); С-3 эфирам простых карбоновых кислот (Патент США 4,248,870; 4,265,814; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,317,821; 4,322,348; и 4,331,598); и С-3 эфирам с производными N-метил-L-аланина (Патенты США № 4,137,230; Kawai et al., Chem. Pharm Bull. 12: 3441, 1984). Примерами майтанзиноидов, которые могут быть использованы в способе по изобретению или которые могут входить в конъюгат антитело-нагрузка по изобретению, являются майтанзин, DM1, DM3, DM4 и/или DM21.

В определенных вариантах осуществления токсин может быть дуокармицином. Подходящими дуокармицинами могут быть, например, дуокармицин А, дуокармицин В1, дуокармицин В2, дуокармицин С1, дуокармицин С2, дуокармицин D, дуокармицин SA, дуокармицин МА и СС-1065. Термин "дуокармицин" следует понимать как относящийся также к синтетическим аналогам дуокармицинов, таким как адозелезин, бизелезин, карзелезин, KW-2189 и СВ1-ТМ1.

В определенных вариантах осуществления токсин может быть ингибитором NAMPT. В контексте настоящего документа термины "ингибитор NAMPT" и "ингибитор никотинамид фосфорибозилтрансферазы" означают ингибитор, который снижает активность NAMPT. Термин "ингибитор NAMPT" может также включать пролекарства ингибитора NAMPT. Примеры ингибиторов NAMPT включают, помимо прочего, FK866 (также называемый APO866), гидрохлорид GPP 78, ST 118804, STF31, пиридил цианогуанидин (также называемый CH-828), GMX-1778 и P7C3. Дополнительные ингибиторы NAMPT известны в данной области и могут быть пригодны для использования в композициях и способах, описанных в настоящем документе. См., например, публикацию PCT WO 2015/054060, Патенты США №8,211,912 и 9,676,721, содержание которых полностью включено в настоящий

документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления ингибитор NAMPT представляет собой FK866. В некоторых вариантах осуществления ингибитор NAMPT представляет собой GMX-1778.

В определенных вариантах осуществления таким токсином может быть тубулизин. Тубулизины — это цитотоксические пептиды, которые включают 9 членов (А-І). Тубулизин А имеет потенциальное применение в качестве противоракового средства. Он останавливает клетки в фазе G2/M. Тубулизин А ингибирует полимеризацию более эффективно, чем винбластин, и индуцирует деполимеризацию изолированных микротрубочек. Тубулизин А обладает мощным цитостатическим действием на различные линии опухолевых клеток с IC50 в пиколярном диапазоне. Другим тубулизином, который может быть использован в способе по изобретению, может быть тубулизин Е.

В определенных вариантах осуществления таким токсином может быть ендиин. Термин "ендиин", используемый в настоящем документе, относится к классу бактериальных природных продуктов, характеризующихся девяти- и десятичленными кольцами, содержащими две тройные связи, разделенные двойной связью (см., например, работу К. С. Nicolaou; А. L. Smith; Е. W. Yue (1993). "Chemistry and biology of natural and designed enediynes". PNAS 90 (13): 5881-5888; все содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки). Некоторые ендиины способны подвергаться циклизации Бергмана, и образующийся дирадикал, производное 1,4-дегидробензола, способен отрывать атомы водорода от сахарного остова ДНК, что приводит к расщеплению нити ДНК (см., например, работу S. Walker; R. Landovitz; W. D. Ding; G. A. Ellestad; D. Kahne (1992). "Cleavage behavior of calicheamicin gamma 1 and calicheamicin T". Proc Natl Acad Sci U.S.A. 89 (10): 4608-12; все содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки). Их реактивность с ДНК придает многим ендиинам антибиотический характер, а некоторые ендиины клинически исследуются как противораковые антибиотики. Неограничивающими примерами ендиинами являются динемидин, неокарзиностатин, калихемицин, эсперамицин (см., например, работы Adrian L. Smith и К. С. Nicolaou, "The Eneidyne Antibiotics" J. Med. Chem., 1996, 39 (11), pp 2103-2117; и Donald Borders, "Eneidyne antibiotics as antitumor agents," Informa Healthcare; 1st edition (Nov. 23, 1994, ISBN-10:

0824789385; все содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки). В конкретном варианте осуществления таким токсином может быть калихеамицин.

В определенных вариантах осуществления таким токсином может быть доксорубицин. "Доксорубицин" в контексте настоящего документа относится к членам семейства антрациклинов, полученных из бактерии *Streptomyces Streptomyces peucetius* var. *caesius*, и включает доксорубицин, даунорубицин, эпирубицин и идарубицин.

В определенных вариантах осуществления таким токсином может быть ингибитор KSP. Термин "ингибитор KSP" означает соединение, которое ингибирует белок KSP, участвующий в сборке биполярного веретена во время деления клетки. Ингибиторы KSP исследуются для лечения рака. Примеры ингибитора KSP включают испинезиб. Также термин "ингибитор KSP" включает SB715992 или SB743921 от GlaxoSmithKline и пентамидин/хлорпромарин от CombinatoRx.

В определенных вариантах осуществления таким токсином может быть криптофицин, описанный в документе US20180078656A1, который включен в настоящий документ посредством ссылки.

В определенных вариантах осуществления таким токсином может быть сандрамицин. Сандрамицин - это депсипептид, который впервые был выделен из *Nocardioides* (ATCC 39419) и который обладает цитотоксической и противоопухолевой активностью.

В определенных вариантах осуществления таким токсином может быть аматоксин. Аматоксины (включая альфа-аманитин, бета-аманитин и аманитин) представляют собой циклические пептиды, состоящие из 8 аминокислот. Они могут быть выделены из грибов *Amanita phalloides* или получены из строительных блоков путем синтеза. Аматоксины специфически ингибируют ДНК-зависимую РНК-полимеразу II клеток млекопитающих, вследствие чего нарушается транскрипция и биосинтез белка в клетках. Ингибирование транскрипции в клетке приводит к остановке роста и пролиферации. Несмотря на отсутствие ковалентной связи, комплекс между аманитином и РНК-полимеразой II очень прочный (KD=3 нМ). Диссоциация

аманитина от фермента - очень медленный процесс, что делает восстановление пораженной клетки маловероятным. Когда в клетке ингибирование транскрипции длится слишком долго, клетка подвергается запрограммированной клеточной смерти (апоптозу). В одном предпочтительном варианте осуществления термин "аматоксин", используемый в настоящем документе, означает альфа-аманитин или его вариант, что описано, например, в WO2010/115630, WO2010/115629, WO2012/119787, WO2012/041504 и WO2014/135282.

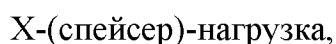
В определенных вариантах осуществления таким токсином может быть камптотецин. Термин "камптотецин", используемый в настоящем документе, означает камптотецин или производное камптотецина, которое функционирует как ингибитор топоизомеразы I. Примеры камптотецинов включают, например, топотекан, экзатекан, дерукстекан, иринотекан, DX-8951f, SN38, BN 80915, луртотекан, 9-нитрокамптотецин и аминокамптотезин. Описано множество камптотецинов, включая камптотецины, используемые для лечения больных раком. Некоторые камптотецины описаны, например, в Kehrer et al., *Anticancer Drugs*, 12 (2) : 89-105, (2001) или Li et al., *ACS Med. Chem. Lett.* 2019, 10, 10, 1386-1392).

Таким токсином в рамках настоящего изобретения также может быть ингибитор эффлюксного транспортера лекарства. Конъюгаты антитело-нагрузка, включающие токсин и ингибитор эффлюксного транспортера лекарства, могут иметь преимущество, заключающееся в том, что при интернализации в клетку ингибитор эффлюксного транспортера лекарства предотвращает эффлюкс токсина из клетки. В рамках настоящего изобретения таким эффлюксным транспортером лекарства может быть Р-гликопротеин. Некоторые распространенные фармакологические ингибиторы Р-гликопротеина включают: амиодарон, кларитромицин, циклоспорин, колхицин, дилтиазем, эритромицин, фелодипин, кетоконазол, лансопразол, омепразол и другие ингибиторы протонной помпы, нифедипин, пароксетин, ресерпин, саквинавир, сертралин, хинидин, тамоксифен, верапамил и дулоксетин. Элакридар и CP 100356 - другие распространенные ингибиторы Р-гликопротеина. Также с этой целью были разработаны зосуквидар и тариквидар. Наконец, другими примерами таких средств являются валсподар и реверсан.

Следует понимать, что нагрузка В, как определено в настоящем документе, должна

пониматься не как исключительно фактическая нагрузка как таковая, а скорее как молекула нагрузки. Молекула нагрузки в рамках настоящего изобретения может содержать дополнительные структуры, например, для упрощения соединения нагрузки со связующим компонентом В или с мотивом РК или химическими спейсерами посредством химического синтеза.

То есть, в определенных вариантах осуществления фактическая нагрузка может содержаться в молекуле нагрузки, которая связана с линкером по настоящему изобретению. Молекула нагрузки может иметь структуру:



где нагрузка представляет фактическую нагрузку, например, одно из соединений, описанных в настоящем документе, X представляет реакционноспособную группу, которая подходит для присоединения молекулы нагрузки к совместимой функциональной группе в связующем компоненте (двухэтапный процесс) или в химическом спейсере или мотиве РК линкера (одноэтапный процесс), и где (спейсер) представляет химический спейсер, который пространственно отделяет фактическую нагрузку от реакционноспособной группы X. Однако следует понимать, что в определенных вариантах осуществления реакционноспособная группа X может быть частью спейсера или фактической нагрузки. Например, спейсер может содержать пептид или аминокислотный остаток, при этом реакционноспособная группа X может быть аминогруппой N-концевого аминокислотного остатка, входящего в спейсер. В других вариантах осуществления спейсер может отсутствовать. В вариантах осуществления, в которых спейсер отсутствует, функциональная группа может входить в фактическую нагрузку. В определенных вариантах осуществления спейсер может использоваться для присоединения представляющей интерес функциональной группы, т.е. функциональной группы, совместимой с функциональной группой, входящей в состав связующего компонента, к фактической нагрузке. В определенных вариантах осуществления реакционноспособная группа X может быть малеимидной группой или циклооктиновой группой, например, помимо прочего, группой DBCO или BCSN.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором химический спейсер (Sp_2) включает самоотщепляющийся компонент.

То есть, линкер может содержать самоотщепляющийся компонент для упрощения высвобождения нагрузки в целевой клетке или ткани. Самоотщепляющийся компонент может входить в любую часть линкера. Однако предпочтительно, чтобы самоотщепляющийся компонент входил в химический спейсер (Sp_2), который отделяет нагрузку от мотива RK. Как вариант, самоотщепляющийся компонент может входить в (спейсер), который входит в молекулу нагрузки, как было определено выше.

В контексте настоящего документа термин "самоотщепляющийся компонент" означает, по меньшей мере, бифункциональную молекулу, которая может быть включена в линкер и самопроизвольно разлагается после того, как произошла первоначальная реакция, и таким образом высвобождает нагрузку. Первоначальная реакция может представлять собой гидролиз ковалентной связи между самоотщепляющимся компонентом и аминокислотным остатком. В определенных вариантах осуществления ковалентная связь между самоотщепляющимся компонентом и аминокислотным остатком может представлять собой амидную связь, образованную между α -карбоксильной группой аминокислоты и аминной группой, входящей в состав самоотщепляющегося компонента, а первоначальная реакция может быть катализирована пептидазой или протеазой. Однако настоящее изобретение охватывает и другие химические составы.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором самоотщепляющийся компонент непосредственно присоединен к нагрузке В.

Более предпочтительно, самоотщепляющийся компонент непосредственно присоединяется к нагрузке В, вследствие чего нагрузка высвобождается при разложении самоотщепляющегося компонента. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент расположен между нагрузкой и мотивом RK, входящим в состав линкера. То есть, самоотщепляющийся компонент

может быть соединен с N-концом остатка R или с C-концом остатка K. Как вариант, самоотщепляющийся компонент может быть расположен между нагрузкой и аминокислотным остатком, входящим в химический спейсер (Sp_2), предпочтительно на N- или C-конце указанного аминокислотного остатка. Кроме того, самоотщепляющийся компонент может быть расположен между нагрузкой и неаминокислотным остатком, входящим в химический спейсер (Sp_2), любым способом, известным в данной области.

Следует понимать, что выбор самоотщепляющегося компонента зависит, помимо прочего, от функциональных групп, имеющихся в молекуле нагрузки.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором самоотщепляющийся компонент содержит p-аминобензилкарбамоиловый (РАВС) компонент.

То есть, в определенных вариантах осуществления линкер может содержать самоотщепляющийся компонент p-аминобензилкарбамоил (РАВС). РАВС содержит свободную аминную группу, которая подходит для соединения с C-концом аминокислотного остатка или пептида, и карбамоильную группу, через которую он может быть соединен с нагрузкой, в частности, с нагрузкой, содержащей амин. Однако специалистам известны методы функционализации нагрузки для включения в нее аминной группы. Самоотщепляющийся компонент РАВС предпочтительно расположен между нагрузкой и аминокислотным остатком, входящим в состав линкера. Аминокислотный остаток предпочтительно представляет собой остаток K, входящий в мотив RK, или аминокислоту, входящую в химический спейсер (Sp_2). В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент РАВС расположен между нагрузкой и остатком аланина, входящим в состав химического спейсера (Sp_2). В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может быть расположен между нагрузкой и участком расщепления пептидазой. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может быть расположен между нагрузкой и участком расщепления катепсином. То есть, самоотщепляющийся компонент может быть расположен между нагрузкой и мотивом, который, как известно, может быть расщеплен катепсином.

Термин "катепсин", используемый в настоящем документе, относится к семейству протеаз. Термин «катепсин» включает катепсин А, катепсин В, катепсин С, катепсин D, катепсин Е, катепсин F, катепсин G, катепсин H, катепсин K, катепсин L1, катепсин L2, катепсин O, катепсин S, катепсин W и катепсин Z. В конкретном варианте осуществления расщепляемое соединение может представлять собой мотив, который специфически гидролизует катепсином В, например, валин-аланин, валин-цитруллин или аланин-аланин. Другие мотивы, которые могут быть специфически гидролизованы пептидазой, были описаны в Salomon et al., Optimizing Lysosomal Activation of Antibody-Drug Conjugates (ADCs) by Incorporation of Novel Cleavable Dipeptide Linkers, Mol Pharm. 2019, 16(12), p.4817-4825.

Одной из типичных дипептидных структур, используемых в линкерах ADC, является валин-цитруллиновый мотив, который, например, представлен в брентуксимабе ведотине и обсуждается в Dubowchik and Firestone; Cathepsin B-labile dipeptide linkers for lysosomal release of doxorubicin from internalizing immunoconjugates: model studies of enzymatic drug release and antigen-specific in vitro anticancer activity; Bioconjug Chem; 2002; 13(4); p.855-69. Этот линкер может быть расщеплен катепсином В для высвобождения фактической нагрузки в очаге заболевания. То же самое относится к валин-аланиновому мотиву, который, например, представлен в SGN-CD33A.

Таким образом, в определенных вариантах осуществления линкер может включать структуру (Sp₁)-RK-(Sp₂)-Val-Cit-(самоотщепляющийся компонент)- нагрузка. В определенных вариантах осуществления линкер может включать структуру (Sp₁)-RK-(Sp₂)-Val-Cit-нагрузка. В определенных вариантах осуществления линкер может включать структуру (Sp₁)-RK-(Sp₂)-Val-Cit-РАВС-нагрузка.

В определенных вариантах осуществления линкер может включать структуру RK-Val-Cit (Seq ID NO:54). Таким образом, в определенных вариантах осуществления линкер может включать или состоять из структуры RK-Val-Cit-(самоотщепляющийся компонент)-нагрузка. В определенных вариантах осуществления линкер может включать или состоять из структуры RK-Val-Cit-РАВС-нагрузка. В определенных вариантах осуществления линкер может включать или состоять из структуры RK-Val-Cit-РАВС-ММАЕ. В определенных вариантах осуществления линкер может включать или состоять из структуры RK-Val-Cit-РАВС-майтанин.

Следует отметить, что место расщепления пептидом может также представлять собой мотив, расщепляемый другими пептидазами, такими как каспаза 3, легумин или нейтрофильная эластаза, или описанными в Dal Corso et al., *Innovative Linker Strategies for Tumor-Targeted Drug Conjugates*; *Chemistry*;25(65); p.14740-14757.

Однако следует отметить, что клетки содержат широкий спектр клеточных пептидаз и что другие, менее стабилизированные аминокислотные мотивы могут быть эффективно расщеплены пептидазой. Так, в определенных вариантах осуществления линкер может содержать структуру (Sp₁)-RK-(Sp₂)-PABC-нагрузка, где (Sp₂) отсутствует или состоит из аминокислотных остатков.

В определенных вариантах осуществления линкер может содержать структуру (Sp₁)-RK-(Sp₂)-PABC-нагрузка, при этом (Sp₂) содержит ПЭГ компонент между PABC компонентом и самым C-концевым аминокислотным остатком, входящим в (Sp₂) или в мотив RK.

В определенных вариантах осуществления линкеры, содержащие самоотщепляющийся компонент PABC, соединены с нагрузкой, содержащей амин, в частности, с нагрузками, содержащими первичный или вторичный амин. В определенных вариантах осуществления нагрузка, содержащая амин, представляет собой ауристин, такой как MMAE. В определенных вариантах осуществления нагрузка, содержащая амин, представляет собой майтанзиноид, например, майтанзин.

Следует отметить, что нагрузка может быть соединена с самоотщепляющимся компонентом PABC через дополнительную молекулу линкера. Например, нагрузка, содержащая амин, может быть соединена с компонентом PABC через р-нитрофенольную (PNP) группу. Другие молекулы линкера, которые позволяют соединять нагрузки, содержащие другие реакционноспособные группы, кроме амина, с компонентом PABC, были описаны в Su et al., *Bioconjugate Chem.* 2018, 29, 4, 1155–1167; и Dokter et al., *Mol Cancer Ther.* 2014 Nov;13(11):2618-29. Например, нагрузки, содержащие спиртовую или фенольную группу, могут быть соединены с PABC через линкер этилендиамин (EDA) (см. ФИГ.18 и 19).

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором самоотщепляющийся компонент содержит

метиламиновую группу. Ранее было продемонстрировано, что метиламиновые группы могут быть использованы в качестве самоотщепляющихся компонентов в линкерах на основе пептидов конъюгатов ADC (Costoplus et al., *ACS Med. Chem. Lett.*, 2019, 10, 10, 1393-1399 и Li et al., *ACS Med. Chem. Lett.* 2019, 10, 10, 1386-1392).

В частности, самоотщепляющийся компонент, содержащий метиламиновую группу, может быть соединен с С-концом аминокислотного остатка посредством амидной связи, образованной между α -карбоксильной группой аминокислотного остатка и амином, входящим в состав метиламиновой группы. Таким аминокислотным остатком может быть аминокислотный остаток, входящий в состав (Sp_2), или остаток К, входящий в состав мотива RK. Метильная группа, входящая в состав метиламиновой группы, может быть соединена с нагрузкой эфирной или тиоэфирной связью. Таким образом, метиламиновая группа может предпочтительно использоваться в качестве самоотщепляющейся группы, когда нагрузка содержит гидроксильную или тиольную группу. В определенных вариантах осуществления нагрузка, содержащая гидроксил, может быть камптотецином, например, производным эксатекана Dxd, или антрациклином, например, PNU-159682. В определенных вариантах осуществления тиол-содержащая нагрузка может быть майтанзиноидом, например, DM1, DM4 или DM21.

Линкер, содержащий метиламиновую группу, может содержать молекулярную структуру C-(NH)-(CH₃)-O-C или C-(NH)-(CH₃)-S-C. Пример линкера, включающего метиламиновую группу, показан на ФИГ.15, 17 и 21.

Следует понимать, что PABC и самоотщепляющиеся компоненты, содержащие метиламиновую группу, предпочтительно используются для присоединения нагрузок к С-концевой карбоксильной группе аминокислотного остатка.

Другие самоотщепляющиеся компоненты, которые могут использоваться для соединения нагрузок с С-концевой карбоксильной группой аминокислотного остатка, включают *p*-аминобензилэтаноловые (PABE) линкеры для соединения фенол-содержащих нагрузок с С-концевой карбоксильной группой аминокислотного остатка (Zhang et al., *Bioconjugate Chem.* 2018, 29, 6, 1852-1858) или пара-метил-анилиновые (PMA) линкеры для соединения нагрузок, содержащих третичный амин или

гетероарильное соединение, с С-концевой карбоксильной группой аминокислотного остатка (Staben et al., *Nature Chemistry* том 8, страницы 1112-1119(2016)) (см. ФИГ. 20 и 23, соответственно). Неограничивающими примерами нагрузок, содержащих фенольную группу, являются дуокармицин GA или пирролобензодиазепин PBD. Неограничивающим примером нагрузки, содержащей третичный амин, является дуокармицин GA.

Однако нагрузки также могут быть соединены с N-концевой аминогруппой через самоотщепляющийся компонент. Например, нагрузки могут быть соединены с N-концевой аминогруппой аминокислотного остатка через самоотщепляющийся компонент, содержащий орто-гидрокси-защищенный арилсульфат. Например, орто-гидрокси-защищенный арилсульфат (ОНPAS) может использоваться для присоединения фенольной нагрузки, такой как PBD, к N-концевой аминогруппе аминокислотного остатка (см. ФИГ. 27). Предпочтительно, ОНPAS содержит карбоксильную группу, через которую он может быть соединен непосредственно с N-концевой аминогруппой аминокислотного остатка. Как вариант, ОНPAS может быть соединен с N-концевой аминогруппой аминокислотного остатка через функционализированный ПЭГ линкер, например, помимо прочего, функционализированный (ПЭГ)₂ линкер. Предпочтительно, ПЭГ линкер функционализирован на одном конце аминогруппой для обеспечения связи с карбоксильной группой, входящей в ОНPAS, и карбоксильной группой на другой стороне для обеспечения связи с N-концевой аминогруппой аминокислотного остатка (Park et al., *Bioconjugate Chem.* 2019, 30, 7, 1957-1968) (см. ФИГ. 26).

Как вариант или дополнительно, между сульфатной группой ОНPAS и нагрузкой может быть расположена молекула линкера для обеспечения связи нефенольных нагрузок с ОНPAS. Например, молекула пара-гидроксибензилового (PHB) линкера может использоваться для соединения нагрузок, содержащих первичный или вторичный амин, с ОНPAS через образование карбамата (см. ФИГ.31 и 32). Нагрузка, содержащая третичный амин, может быть соединена с ОНPAS, содержащим линкер, через образование четвертичного аммония (см. ФИГ.33 и 34). Кроме того, молекула пара-гидрокси-бензил-этилендиаминового (PHB-EDA) линкера может использоваться для соединения гидроксилсодержащей нагрузки с ОНPAS через образование

карбамата (Park et al., *Bioconjugate Chem.* 2019, 30, 7, 1957-1968) (см. ФИГ. 26). 25)

В определенных вариантах осуществления нагрузка может быть соединена с аминокислотным остатком, входящим в состав линкера, через расщепляемый компонент. Расщепляемый компонент" в контексте настоящего документа представляет собой химическую единицу, которая может быть отделена от фактической нагрузки путем ферментативного или неферментативного гидролиза. В определенных вариантах осуществления расщепляемый компонент может представлять собой аминокислотный мотив, который гидролизуется пептидазой или протеазой.

В других вариантах осуществления расщепляемый компонент, входящий в состав линкера, может быть углеводным соединением. В таких вариантах осуществления расщепляемый компонент может быть соединением, которое расщепляется глюкозидазой. Таким образом, в определенных вариантах осуществления расщепляемый компонент может быть соединением, которое расщепляется бета-глюкуронидазой или бета-галактозидазой.

В других вариантах осуществления расщепляемый компонент, входящий в состав линкера, может быть фосфатным соединением. В таких вариантах осуществления расщепляемый компонент может быть соединением, расщепляемым фосфатазой. Таким образом, в определенных вариантах осуществления расщепляемый компонент может быть соединением, расщепляемым бета-лизосомальной кислотой пирофосфатазой или кислотой фосфатазой.

Примеры других расщепляемых компонентов, которые могут использоваться для высвобождения нагрузок из молекулы линкера, были описаны в Bargh et al., *Cleavable linkers in antibody-drug conjugates*; *Chem Soc Rev.* 2019 Aug 12;48(16):4361-4374. В определенных вариантах осуществления линкер может включать структуру (расщепляемый компонент)-(самоотщепляющийся компонент)-нагрузка. В таком варианте осуществления самоотщепляющийся компонент может разрушаться при расщеплении расщепляемого компонента и высвобождать нагрузку.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором линкер представляет собой любой из

линкером, показанных на ФИГ.1, ФИГ.2, ФИГ.3, ФИГ.8, ФИГ.9, ФИГ.14, ФИГ.15, ФИГ.17, ФИГ.18, ФИГ.19, ФИГ.20, ФИГ.21, ФИГ.22, ФИГ.23, ФИГ.24, ФИГ.25, ФИГ.26, ФИГ.27, ФИГ.28, ФИГ.29, ФИГ.30, ФИГ.31, ФИГ.32, ФИГ.33 или ФИГ.34.

В определенных вариантах осуществления линкер может содержать два или более связывающих компонентов и/или нагрузок В. То есть, в определенных вариантах осуществления линкер может содержать структуру

a) (Sp_1) -RK- (Sp_2) - B_1 - (Sp_3) - B_2 - (Sp_4) ,

b) (Sp_4) - B_2 - (Sp_1) -RK- (Sp_2) - B_1 - (Sp_3) ,

c) (Sp_1) - B_1 - (Sp_2) -RK- (Sp_3) - B_2 - (Sp_4) , или

d) (Sp_4) - B_2 - (Sp_1) - B_1 - (Sp_2) -RK- (Sp_3) .

В таких вариантах осуществления химические спейсеры (Sp_1) , (Sp_2) , (Sp_3) и мотив RK могут иметь такие же характеристики, которые были определены выше. Кроме того, компоненты B_1 и B_2 могут быть любыми из связующих компонентов и/или нагрузок, определенных выше. Также химический спейсер (Sp_4) может иметь те же характеристики, что и химические спейсеры (Sp_1) , (Sp_2) или (Sp_3) , или может отсутствовать.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором линкер содержит второй связующий компонент или нагрузку B_2 , в частности, при этом B_2 соединяется с линкером через химический спейсер (Sp_1) или (Sp_3) .

То есть, нагрузка или связующий компонент B_2 могут быть соединены с химическим спейсером (Sp_1) или (Sp_3) или непосредственно с нагрузкой или связующим компонентом B_1 . Нагрузка или связующий компонент B_2 могут содержать любую функциональную группу, которая подходит для соединения B_2 с функциональной группой, входящей в состав (Sp_1) , (Sp_3) или B_1 .

В определенных вариантах осуществления нагрузка или связующий компонент B_2 могут содержать аминогруппу, с помощью которой B_2 соединяется с (Sp_3) или B_1 . То есть, B_2 может быть соединен с карбоксильной группой, входящей в состав (Sp_3) или

V_1 , через указанную аминогруппу. В определенных вариантах осуществления карбоксильная группа, входящая в состав (Sp_3), может быть карбоксильной группой, содержащейся в С-концевом аминокислотном остатке химического спейсера (Sp_3). В определенных вариантах осуществления карбоксильная группа, входящая в состав V_1 , может быть α -карбоксильной группой нагрузки на основе аминокислоты или связующего компонента. В определенных вариантах осуществления V_2 может быть соединен с карбоксильной группой, входящей в состав (Sp_3) или V_1 , через молекулу линкера. В определенных вариантах осуществления молекула линкера может содержать самоотщепляющийся компонент.

В определенных вариантах осуществления нагрузка или связующий компонент V_2 могут содержать карбоксильную группу, с помощью которой V_2 соединяется с (Sp_1) или V_1 . То есть, V_2 может быть соединен с аминогруппой, входящей в состав (Sp_1) или V_1 , через указанную карбоксильную группу. В определенных вариантах осуществления аминная группа, входящая в (Sp_1), может быть аминной группой, содержащейся в N-концевом аминокислотном остатке химического спейсера (Sp_1). В определенных вариантах осуществления аминная группа, входящая в состав V_1 , может быть α -аминогруппой нагрузки на основе аминокислоты или связующего компонента. В определенных вариантах осуществления V_2 может быть соединен с аминной группой, входящей в состав (Sp_1) или V_1 , через молекулу линкера. В определенных вариантах осуществления молекула линкера может содержать самоотщепляющийся компонент.

Однако следует отметить, что V_2 может содержать и другие функциональные группы, кроме аминной или карбоксильной группы. В таких вариантах осуществления V_2 может быть соединен с (Sp_1), (Sp_3) или V_1 любым способом, известным в данной области, либо непосредственно, либо через линкер или самоотщепляющуюся группу.

В определенных вариантах осуществления нагрузка или связующий компонент V_2 могут быть соединены с боковой цепью аминокислоты, входящей в (Sp_1) или (Sp_3). То есть, V_2 может быть соединен с функциональной группой боковой цепи аминокислоты, входящей в (Sp_1) или (Sp_3), через совместимую функциональную группу.

В определенных вариантах осуществления (Sp_1), (Sp_2), (Sp_3) и мотив RK состоят исключительно из аминокислот, миметиков аминокислот и/или производных аминокислот. В определенных вариантах осуществления B_1 и/или B_2 также содержат аминокислотный остов. В таких вариантах осуществления таким линкером может быть линейный пептид или пептидомиметик. В вариантах осуществления, в которых B_1 представляет собой аминокислоту, миметик аминокислоты или производное аминокислоты, линкер может иметь структуру (Sp_1) -RK- (Sp_2) - B_1 , где (Sp_1) -RK- (Sp_2) - B_1 представляет собой линейный пептид или пептидомиметик. В вариантах осуществления, в которых B_1 представляет собой аминокислоту, миметик аминокислоты или производное аминокислоты, линкер может иметь структуру (Sp_1) -RK- (Sp_2) - B_1 - (Sp_3) , где (Sp_1) -RK- (Sp_2) - B_1 - (Sp_3) представляет собой линейный пептид или пептидомиметик. В вариантах осуществления, в которых B_1 представляет собой аминокислоту, миметик аминокислоты или производное аминокислоты, линкер может иметь структуру RK- (Sp_2) - B_1 - (Sp_3) , где RK- (Sp_2) - B_1 - (Sp_3) представляет собой линейный пептид или пептидомиметик. В вариантах осуществления, в которых B_1 представляет собой аминокислоту, миметик аминокислоты или производное аминокислоты, линкер может иметь структуру RK- (Sp_2) - B_1 , где RK- (Sp_2) - B_1 представляет собой линейный пептид или пептидомиметик. В вариантах осуществления, в которых B_1 представляет собой аминокислоту, миметик аминокислоты или производное аминокислоты, линкер может иметь структуру RK- B_1 - (Sp_3) , где RK- B_1 - (Sp_3) представляет собой линейный пептид или пептидомиметик. В вариантах осуществления, в которых B_1 представляет собой аминокислоту, миметик аминокислоты или производное аминокислоты, линкер может иметь структуру RK- B_1 , где RK- B_1 представляет собой линейный пептид или пептидомиметик.

В вариантах осуществления, в которых B_1 и B_2 являются аминокислотами, миметиками аминокислот или производными аминокислот, линкер может иметь структуру (Sp_1) -RK- (Sp_2) - B_1 - (Sp_3) - B_2 - (Sp_4) , где (Sp_1) -RK- (Sp_2) - B_1 - (Sp_3) - B_2 - (Sp_4) представляет собой линейный пептид или пептидомиметик. В других вариантах осуществления, в которых B_1 и B_2 являются аминокислотами, миметиками аминокислот или производными аминокислот, линкер может иметь структуру (Sp_4) - B_2 - (Sp_1) -RK- (Sp_2) - B_1 - (Sp_3) , где (Sp_4) - B_2 - (Sp_1) -RK- (Sp_2) - B_1 - (Sp_3) представляет собой линейный пептид или пептидомиметик. В других вариантах осуществления, в которых B_1 и

являются аминокислотами, миметиками аминокислот или производными аминокислот, линкер может иметь структуру $(Sp_4)-B_2-(Sp_1)-B_1-(Sp_2)-RK-(Sp_3)$, где $(Sp_4)-B_2-(Sp_1)-B_1-(Sp_2)-RK-(Sp_3)$ представляет собой линейный пептид или пептидомиметик.

В вариантах осуществления, в которых B_1 не является аминокислотой, миметиком аминокислоты или производным аминокислоты, линкер может иметь структуру $(Sp_1)-RK-(Sp_2)-B_1-(Sp_3)$, где $(Sp_1)-RK-(Sp_2)$ представляет собой линейный пептид или пептидомиметик, а B_1 соединен с С-концевой карбоксильной группой, входящей в состав (Sp_2) . В вариантах осуществления, в которых B_1 не является аминокислотой, миметиком аминокислоты или производным аминокислоты, линкер может иметь структуру $(Sp_1)-B_1-(Sp_2)-RK-(Sp_3)$, где $(Sp_2)-RK-(Sp_3)$ представляет собой линейный пептид или пептидомиметик, а B_1 соединен с N-концевой аминогруппой, входящей в состав (Sp_2) . Однако следует отметить, что B_1 не обязательно должен быть соединен с пептидом или пептидомиметиком напрямую. Вместо этого, B_1 может быть соединен с пептидом или пептидомиметиком через молекулу линкера и/или самоотщепляющийся компонент.

В вариантах осуществления, в которых B_1 является аминокислотой, миметиком аминокислоты или производным аминокислоты, а B_2 не является аминокислотой, миметиком аминокислоты или производным аминокислоты, линкер может иметь структуру $(Sp_1)-RK-(Sp_2)-B_1-(Sp_3)-B_2-(Sp_4)$, $(Sp_4)-B_2-(Sp_1)-RK-(Sp_2)-B_1-(Sp_3)$, $(Sp_1)-B_1-(Sp_2)-RK-(Sp_3)-B_2-(Sp_4)$ или $(Sp_4)-B_2-(Sp_1)-B_1-(Sp_2)-RK-(Sp_3)$, где $(Sp_1)-RK-(Sp_2)-B_1-(Sp_3)$ или $(Sp_1)-B_1-(Sp_2)-RK-(Sp_3)$ представляет собой линейный пептид или пептидомиметик, а B_2 соединен с С-концевой карбоксильной группой, входящей в состав (Sp_3) , B_1 или RK , или с N-концевой аминогруппой (Sp_1) , B_1 или RK .

В таких вариантах осуществления конъюгат антитело-нагрузка может быть получен, например, с соотношением антитело/нагрузка 2 или 4, например, с одной или двумя нагрузками, конъюгированными с каждым остатком Q295.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором B_1 и B_2 идентичны или отличаются друг от друга.

То есть, нагрузка или связующие компоненты V_1 и V_2 могут быть идентичными, то есть иметь одинаковую химическую структуру, или могут быть структурно различными. В определенных вариантах осуществления V_1 и V_2 одновременно являются нагрузкой или одновременно являются связующими компонентами. В вариантах осуществления, в которых V_1 и V_2 одновременно являются нагрузками, нагрузки V_1 и V_2 могут быть одинаковыми или разными нагрузками. В вариантах осуществления, в которых V_1 и V_2 являются связующими компонентами, связующие компоненты V_1 и V_2 могут быть одинаковыми или разными связующими компонентами. В определенных вариантах осуществления V_1 может быть связующим компонентом, а V_2 может быть нагрузкой или наоборот.

Следует понимать, что не все нагрузки или связующие компоненты могут функционировать как внутрицепные нагрузки или связующие компоненты в положении V_1 , например, потому что они не имеют функциональных групп для образования ковалентных связей с (Sp_2) или RK с одной стороны, и (Sp_3), (Sp_1) или V_2 с другой стороны. Таким образом, предпочтительно, чтобы в вариантах осуществления, в которых V_1 является внутрицепочечной нагрузкой или связующим компонентом, V_1 представлял собой двухвалентную или поливалентную молекулу. Например, V_1 может быть аминокислотой, миметиком аминокислоты или производным аминокислоты. В таких вариантах осуществления V_1 может быть соединен через свою аминогруппу с C-концевой карбоксильной группой (Sp_2) или RK и через свою карбоксильную группу с N-концевой аминогруппой (Sp_3) или V_2 . Как вариант, V_1 может быть соединен через свою карбоксильную группу с N-концевой аминогруппой (Sp_2) или RK и через свою аминогруппу с C-концевой карбоксильной группой (Sp_1) или V_2 .

В определенных вариантах осуществления линкер может содержать два связующих компонента V_1 и V_2 .

То есть, в определенных вариантах осуществления изобретение охватывает линкеры, содержащие две био-ортогональные маркерные группы и/или не-био-ортогональные соединения. Например, линкер по настоящему изобретению может содержать азид-содержащий связующий компонент, например, $Lys(N_3)$ или $Xaa(N_3)$, и сульфгидрил-содержащий связующий компонент, например, цистеин. В определенных вариантах

осуществления линкер по настоящему изобретению может содержать азид-содержащий связующий компонент, например, Lys(N₃) или Xaa(N₃), и тетразин-содержащий связующий компонент, например, тетразин-модифицированную аминокислоту. В определенных вариантах осуществления линкер по настоящему изобретению может содержать сульфгидрил-содержащий связующий компонент, например, цистеин, и тетразин-содержащий связующий компонент, например, тетразин-модифицированную аминокислоту. Линкеры, содержащие две различные био-ортогональные маркерные группы и/или не-био-ортогональные соединения, имеют то преимущество, что они могут принимать две различные нагрузки и, таким образом, давать конъюгаты антитело-нагрузка, содержащие более одной нагрузки.

Таким образом, можно получить соотношение антитело/нагрузка 2+2. Применение второй нагрузки может позволить разработать совершенно новый класс конъюгатов антитело-нагрузка, которые выходят за рамки существующих терапевтических подходов в отношении эффективности и активности.

Такие варианты осуществления могут позволить, *inter alia*, воздействовать на две различные структуры в клетке, например, ДНК и микротрубочку. Поскольку некоторые виды рака могут быть устойчивы к одному препарату, например, к токсину микротрубочек, ДНК-токсин все равно может убивать раковые клетки.

Согласно другому варианту осуществления, можно использовать два препарата, которые обладают полным действием только тогда, когда они высвобождаются в одно и то же время и в одной и той же ткани. Это может привести к снижению нецелевой токсичности в случае частичной деградации антитела в здоровых тканях или преждевременной потери одного препарата.

Кроме того, двояко-меченные зонды могут применяться для неинвазивной визуализации и терапии или интра/послеоперационной визуализации/хирургии. В таких вариантах осуществления пациент с опухолью может быть выбран с помощью неинвазивной визуализации. Затем опухоль может быть удалена хирургическим путем с использованием другого средства визуализации (например, флуоресцентного красителя), которое помогает хирургу или роботу выявить все раковые ткани во время операции.

В определенных вариантах осуществления один из V_1 и V_2 может быть связующим компонентом, содержащим тиольную группу, например, цистеин, а другой из V_1 и V_2 может быть связующим компонентом, содержащим азидный компонент, например, $Lys(N_3)$. В таких вариантах осуществления две различные нагрузки могут быть соединены с линкером, одна из них посредством тиол-малеимидной конъюгации, а другая - посредством реакции SPAAC.

В определенных вариантах осуществления линкер может содержать две нагрузки. Линкеры, содержащие только нагрузки, но не содержащие связующих компонентов, могут быть конъюгированы с антителом в одноэтапном процессе.

Следует понимать, что в вариантах осуществления, в которых V_1 и V_2 являются нагрузками одновременно, V_1 и V_2 могут быть идентичными или могут отличаться по структуре. В определенных вариантах осуществления линкеры, содержащие одну или несколько нагрузок, могут быть синтезированы химическим путем. Как вариант, одна или несколько нагрузок могут быть соединены с связующим компонентом, входящим в состав линкера, любым из способов, описанных в настоящем документе, до того, как линкер будет конъюгирован с антителом.

В определенных вариантах осуществления линкеры по настоящему изобретению могут обеспечить конъюгацию двух различных нагрузок с остатком Q295 домена C_{H2} антитела. Применение второй нагрузки позволяет разработать совершенно новый класс конъюгатов антитело-нагрузка, которые выходят за рамки существующих терапевтических подходов в отношении эффективности и активности. Также предполагаются новые области применения, например, двойная визуализация для визуализации и терапии или интра-/послеоперационной хирургии (ср. Azhdarinia A. et al., Dual-Labeling Strategies for Nuclear and Fluorescence Molecular Imaging: A Review and Analysis. *Mol Imaging Biol.* 2012 Jun; 14(3): 261–276). Например, двояко-меченные антитела, включающие молекулярное средство визуализации для предоперационной позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) и флуоресцентный краситель ближнего инфракрасного диапазона для направленного определения границ хирургического поля, могут значительно улучшить диагностику, стадирование и резекцию рака (см. Houghton JL. et al., Site-specifically labeled CA19.9-targeted immunoconjugates for the PET, NIRF, and multimodal PET/NIRF imaging of pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U*

S A. 2015 Dec 29;112(52):15850-5). Оптическая визуализация методом ПЭТ и посредством применения флуоресцентного красителя ближнего инфракрасного диапазона обеспечивают дополнительные области клинического применения, делая возможной неинвазивную визуализацию всего тела для локализации заболевания и определения краев опухоли во время операции, соответственно. Однако до настоящего времени создание таких двойко-меченных зондов было затруднено из-за отсутствия подходящих сайт-специфических методов; присоединение двух различных зондов химическим путем делает анализ и воспроизводимость практически невозможными из-за случайной конъюгации зондов.

Кроме того, в исследовании Levensgood M. et al., (Orthogonal Cysteine Protection Enables Homogeneous Multi-Drug Antibody-Drug Conjugates. *Angewandte Chemie*, Volume 56, Issue 3, January 16, 2017) антитело, меченное двумя препаратами, после присоединения к двум различным ауристатиновым токсинам (имеющим различные физико-химические свойства и обладающим взаимодополняющим противораковым действием), обеспечивало активность в моделях клеточных линий и ксенотрансплантатных моделях, которые были устойчивы к конъюгатам ADC, содержащим отдельные ауристатиновые компоненты. Это говорит о том, что двойко-меченные ADC позволяют бороться с гетерогенностью и резистентностью рака более эффективно, чем отдельные, обычно используемые ADC. Поскольку один из механизмов резистентности в отношении ADC включает активное выкачивание цитотоксического компонента из раковой клетки, другое применение двух препаратов может включать дополнительную и одновременную доставку препарата, который специфически блокирует механизм эффлюкса цитотоксического препарата. Таким образом, двойко-меченные ADC могут помочь преодолеть устойчивость рака к ADC более эффективно, чем обычно используемые ADC.

Термин "антитело" здесь используется в самом широком смысле и, в частности, охватывает моноклональные антитела, поликлональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), образованные, по меньшей мере, из двух интактных антител, и фрагменты антител, если они проявляют желаемую биологическую активность. Термины "антитело" и "антитела" в широком смысле охватывают встречающиеся в природе формы антител

(например, IgG, IgA, IgM, IgE).

Антитело предпочтительно представляет собой моноклональное антитело. Антитело может быть человеческого происхождения, но также может быть антителом мыши, крысы, козы, осла, хомяка или кролика. Если конъюгат предназначен для терапии, антитело мыши или кролика может быть опционально химеризовано или гуманизировано.

Фрагменты или рекомбинантные варианты антител, содержащие домен C_{H2} , могут быть, например,

- форматами антител, содержащими только домены тяжелой цепи (антитела акулы/IgNAR $(V_H-C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}-C_{H4}-C_{H5})_2$ или антитела верблюдовых/hcIgG $(V_H-C_{H2}-C_{H3})_2$)
- scFv-Fc $(V_H-V_L-C_{H2}-C_{H3})_2$
- Fc-слитыми пептидами, содержащими Fc-домен и один или несколько рецепторных доменов.

Антитело также может быть биспецифическим (например, DVD-IgG, crossMab, присоединенным IgG - HC слиянием) или бипаратопным. См. обзор в Brinkmann and Kontermann; Bispecific antibodies; Drug Discov Today; 2015; 20(7); p.838-47.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором антитело представляет собой антитело IgG, в частности, антитело IgG1.

Под "IgG" в настоящем документе подразумевается полипептид, принадлежащий к классу антител, которые в основном кодируются распознаваемым гамма-геном иммуноглобулина. У человека IgG включает подклассы или изоотипы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. У мышей IgG включает IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3. Полноразмерные IgG состоят из двух идентичных пар двух иммуноглобулиновых цепей, причем каждая пара имеет одну легкую и одну тяжелую цепи, каждая легкая цепь включает домены иммуноглобулина VL и CL, а каждая тяжелая цепь включает домены иммуноглобулина VH, $C_{\gamma 1}$ (также называемый C_{H1}), $C_{\gamma 2}$ (также называемый C_{H2}) и

O_{у3} (также называемый CH3). В человеческом IgG1 "CH1" относится к положениям 118-215, домен CH2 относится к положениям 231-340 и домен CH3 относится к положениям 341-447 в соответствии с нумерацией EU, как в Kabat. IgG1 также включает шарнирный домен, который относится к позициям 216-230 в случае IgG1.

Антитело, используемое в способе по изобретению, или конъюгат антитело-нагрузка по изобретению могут представлять собой или могут содержать любое антитело, предпочтительно антитело любого типа IgG. Например, таким антителом может быть, помимо прочего, Brentuximab, Trastuzumab, Gemtuzumab, Inotuzumab, Avelumab, Cetuximab, Rituximab, Daratumumab, Pertuzumab, Vedolizumab, Okrelizumab, Tocilizumab, Ustekinumab, Golimumab, Obinutuzumab, Sacituzumab, Belantamab, Polatuzumab и Enfortumab.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором антитело выбрано из группы, состоящей из: Brentuximaba, Trastuzumaba, Gemtuzumaba, Inotuzumaba, Avelumaba, Cetuximaba, Rituximaba, Daratumumaba, Pertuzumaba, Vedolizumaba, Okrelizumaba, Tocilizumaba, Ustekinumaba, Golimumaba, Obinutuzumaba, Sacituzumaba, Belantamaba, Polatuzumaba и Enfortumaba.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором антитело выбрано из группы, состоящей из: Brentuximaba, Gemtuzumaba, Trastuzumaba, Inotuzumaba, Polatuzumaba, Enfortumaba, Sacituzumaba и Belantamaba.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором антитело представляет собой Полатузумаб, или Трастузумаб, или Энфортумаб.

То есть, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер, в котором антитело представляет собой Полатузумаб, а линкер представляет собой любой из описанных здесь линкеров.

В другом варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер, в котором антитело представляет собой Трастузумаб, а линкер представляет

собой любой из описанных здесь линкеров.

В другом варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер, в котором антитело представляет собой Энфортумаб, а линкер представляет собой любой из описанных здесь линкеров.

Антитело для применения в способе по настоящему изобретению может быть гликозилированным антителом, дегликозилированным антителом или агликозилированным антителом.

То есть, в определенных вариантах осуществления антитело может быть антителом IgG, которое гликозилировано, предпочтительно на остатке N297. Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором антитело IgG представляет собой гликозилированное антитело IgG, в частности, при котором антитело IgG гликозилировано на остатке N297 (нумерация EU) домена C_H2.

Как уже было описано здесь, антитела IgG, гликозилированные на остатке N297, имеют ряд преимуществ перед негликозилированными антителами.

Однако антитело также может быть дегликозилированным антителом, предпочтительно, если гликан на остатке N297 был расщеплен ферментом PNGase F. Также антитело может быть агликозилированным антителом, предпочтительно, при этом остаток N297 был заменен неаспарагиновым остатком. Методы дегликозилирования антител и получения агликозилированных антител известны в данной области.

В определенных вариантах осуществления линкер по настоящему изобретению может быть конъюгирован с эндогенным остатком Gln в Fc домене антитела или с остатком Gln, который был введен в антитело с помощью молекулярной инженерии.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором остаток Gln, с которым конъюгирован линкер, входит в Fc домен антитела, в частности, при котором остаток Gln, с которым конъюгирован линкер, является остатком Gln Q295 (нумерация EU) домена C_H2 антитела IgG.

Линкеры по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с любым остатком Gln в Fc домене антитела, которое может служить субстратом для микробной трансглутаминазы. Как правило, термин Fc домен, используемый в настоящем документе, относится к двум последним доменам константной области иммуноглобулина IgA, IgD и IgG (C_{H2} и C_{H3}) и трем последним доменам константной области IgE, IgY и IgM (C_{H2}, C_{H3} и C_{H4}). То есть, линкер по настоящему изобретению может быть конъюгирован с доменами C_{H2}, C_{H3} и, если применимо, C_{H4} антитела.

В определенных вариантах осуществления эндогенный остаток Gln может быть остатком Gln Q295 (нумерация EU) домена CH2 антитела IgG. Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором остаток Gln в Fc домене антитела представляет собой остаток Gln Q295 (нумерация EU) домена CH2 антитела IgG.

Важно понимать, что Q295 является чрезвычайно консервативным аминокислотным остатком в антителах типа IgG. Он консервативен в IgG1, 2, 3, 4 человека, а также в антителах кроликов и крыс, помимо прочего. Таким образом, возможность использования Q295 является значительным преимуществом для создания терапевтических конъюгатов антитело-нагрузка или диагностических конъюгатов, в которых антитело часто имеет нечеловеческое происхождение. В связи с этим способ по настоящему изобретению представляет собой чрезвычайно универсальный и широко применяемый инструмент. Несмотря на то, что остаток Q295 чрезвычайно консервативен среди антител типа IgG, некоторые антитела типа IgG не имеют этого остатка, например, антитела IgG2a мыши и крысы. Таким образом, следует понимать, что антитело, используемое в способе по настоящему изобретению, предпочтительно представляет собой антитело типа IgG, включающее остаток Q295 (нумерация EU) домена C_{H2}.

Кроме того, было показано, что разработанные конъюгаты с использованием Q295 для присоединения нагрузки демонстрируют хорошую фармакокинетику и эффективность (Lhospice et al., Site-Specific Conjugation of Monomethyl Auristatin E to Anti-Cd30 Antibodies Improves Their Pharmacokinetics and Therapeutic Index in Rodent Models, *Mol Pharm*; 2015; **12**(6), p.1863-1871.), и способны переносить даже нестабильные токсины, подверженные деградации (Dorywalska et al.; Site-Dependent

Degradation of a Non-Cleavable Auristatin-Based Linker-Payload in Rodent Plasma and Its Effect on ADC Efficacy. PLoS ONE ;2015; 10(7): e0132282). Поэтому предполагается, что при использовании этого сайт-специфического способа будет наблюдаться аналогичный эффект, поскольку модифицируется тот же остаток, но гликозилированных антител. Гликозилирование может дополнительно улучшать общую стабильность ADC, удаление гликановых компонентов, как это было показано в упомянутых подходах, приводит к менее стабильным антителам (Zheng et al.; The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability. Mabs-Austin; 2011, 3(6), p.568-576).

В литературе, обсуждающей конъюгацию линкеров с остатком Gln C_H2 с помощью трансглутаминазы, основное внимание уделяли небольшим низкомолекулярным субстратам. Однако в литературе известного уровня техники для осуществления такой конъюгации всегда описывается необходимость этапа дегликозилирования в положении N297 или использования агликозилированного антитела (WO 2015/015448; WO 2017/025179; WO 2013/092998).

Однако, вопреки всем ожиданиям, сайт-специфическая конъюгация с Q295 гликозилированных антител действительно эффективно возможна при использовании обсуждаемой выше структуры линкера. В частности, соединение линкеров, содержащих молекулы токсинов, достигалось с эффективностью конъюгации более 80%.

Несмотря на то, что Q295 очень близок к N297, который в нативном состоянии является гликозилированным, способ по настоящему изобретению с использованием указанного линкера все равно позволяет конъюгировать с ним линкер или нагрузку.

Как показано, способ по настоящему изобретению не требует предварительного ферментативного дегликозилирования N297, использования агликозилированного антитела, замены N297 на другую аминокислоту или введения мутации T299A для предотвращения гликозилирования.

Эти два пункта обеспечивают значительные преимущества в производственном отношении. Этап ферментативного дегликозилирования нежелателен с точки зрения надлежащей производственной практики, поскольку необходимо убедиться, что

фермент дегликозилирования (например, PNGase F), а также расщепленный гликан должны быть удалены из среды.

Кроме того, не требуется генная инженерия антитела для присоединения нагрузки, что позволяет избежать вставок последовательностей, которые могут повысить иммуногенность и снизить общую стабильность антитела.

Замена N297 на другую аминокислоту также имеет нежелательные последствия, поскольку может повлиять на общую стабильность всего Fc домена (Subedi et al, The Structural Role of Antibody N-Glycosylation in Receptor Interactions. Structure 2015, 23 (9), 1573-1583), и, как следствие, эффективность всего конъюгата, что может привести к увеличению агрегации антител и снижению растворимости (Zheng et al.; The impact of glycosylation on monoclonal antibody conformation and stability. Mabs-Austin 2011, 3 (6), 568-576), что становится особенно важно для гидрофобных нагрузок, таких как PBD. Кроме того, гликан, присутствующий на N297, обладает важным иммуномодулирующим действием, поскольку он запускает антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) и т.п. Такое иммуномодулирующее действие утрачивается при дегликозилировании или любом другом из рассмотренных выше подходов для получения агликозилированного антитела. Кроме того, любая модификация последовательности указанного антитела может также привести к сложностям нормативно-правового характера, что проблематично, поскольку часто в качестве отправной точки для конъюгации ADC используется принятое и клинически проверенное антитело.

Таким образом, способ по настоящему изобретению позволяет легко и без недостатков получать стехиометрически хорошо определенные конъюгаты ADC с сайт-специфическим связыванием нагрузки.

В связи с вышеизложенным утверждается, что способ по настоящему изобретению предпочтительно используется для конъюгации антитела IgG на остатке Q295 (нумерация EU) домена C_H2 антитела, при этом антитело гликозилировано на остатке N297 (нумерация EU) домена C_H2. Однако прямо указано, что способ по изобретению также включает конъюгацию дегликозилированных или агликозилированных антител на остатке Q295 или любом другом подходящем остатке Gln антитела, при этом

остаток Gln может быть эндогенным остатком Gln или остатком Gln, который был введен с помощью молекулярной инженерии.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором остаток Gln, с которым конъюгирован линкер, был введен в тяжелую или легкую цепь антитела с помощью молекулярной инженерии.

Термин "молекулярная инженерия" в контексте настоящего документа относится к использованию методов молекулярной биологии для манипулирования последовательностями нуклеиновых кислот. В рамках настоящего изобретения молекулярная инженерия может применяться для введения остатков Gln в тяжелую или легкую цепь антитела. В общем, в рамках настоящего изобретения предусмотрены две различные стратегии введения остатков Gln в тяжелую или легкую цепь антитела. Во-первых, отдельные остатки тяжелой или легкой цепи антитела могут быть заменены на остаток Gln. Во-вторых, Gln-содержащие пептидные метки, состоящие из двух или более аминокислотных остатков, могут быть интегрированы в тяжелую или легкую цепь антитела. Для этого пептидная метка может быть либо интегрирована во внутреннее положение тяжелой или легкой цепи, то есть между двумя существующими аминокислотными остатками тяжелой или легкой цепи или путем их замены, либо пептидная метка может быть слита с N- или C-концевой областью тяжелой или легкой цепи антитела (присоединена к ней).

Например, аминокислотный остаток тяжелой или легкой цепи антитела может быть заменен на остаток Gln, при условии, что полученное антитело может быть конъюгировано с линкерами по изобретению с помощью микробной трансглутаминазы. В определенных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело, в котором аминокислотный остаток N297 (нумерация EU) домена C_H2 антитела IgG заменен, в частности, такая замена представляет собой замену N297Q. Антитела, содержащие мутацию N297Q, могут быть конъюгированы с более чем одним линкером на тяжелую цепь антитела. Например, антитела, содержащие мутацию N297Q, могут быть конъюгированы с четырьмя линкерами, при этом один линкер конъюгируется с остатком Q295 первой тяжелой цепи антитела, один линкер конъюгируется с остатком N297Q первой тяжелой цепи антитела, один линкер

конъюгируется с остатком Q295 второй тяжелой цепи антитела и один линкер конъюгируется с остатком N297Q второй тяжелой цепи антитела. Специалистам известно, что замена остатка N297 антитела IgG на остаток Gln приводит к образованию агликозилированного антитела.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором остаток Gln, введенный в тяжелую или легкую цепь антитела с помощью молекулярной инженерии, представляет собой N297Q (нумерация EU) домена C_H2 агликозилированного антитела IgG.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором остаток Gln, введенный в тяжелую или легкую цепь антитела с помощью молекулярной инженерии, входит в состав пептида, который был (а) интегрирован в тяжелую или легкую цепь антитела или (b) слит с N- или C-концевой областью тяжелой или легкой цепи антитела.

Вместо замены отдельных аминокислотных остатков антитела в тяжелую или легкую цепь антитела могут быть введены пептидные метки, содержащие остаток Gln, доступный для трансклутаминазы. Такие пептидные метки могут быть слиты с N- или C-концом тяжелой или легкой цепи антитела. Как вариант, пептидные метки могут быть вставлены в тяжелую или легкую цепь антитела в подходящем положении. Предпочтительно, пептидные метки, содержащие доступный для трансклутаминазы остаток Gln, сливаются с C-концом тяжелой цепи антитела. Предпочтительнее, пептидные метки, содержащие доступный для трансклутаминазы остаток Gln, сливаются с C-концом тяжелой цепи антитела IgG. Некоторые пептидные метки, которые могут быть слиты с C-концом тяжелой цепи антитела и служить субстратом для микробной трансклутаминазы, описаны в WO 2012/059882 и WO 2016/144608.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором пептид, содержащий остаток Gln, слит с C-концом тяжелой цепи антитела.

Примерами пептидных меток, которые могут быть введены в тяжелую или легкую цепь антитела, в частности, слиты с C-концом тяжелой цепи антитела, являются

LLQGG (SEQ ID NO:16), LLQG (SEQ ID NO:17), LSLSQG (SEQ ID NO:18), GGGLLQGG (SEQ ID NO:19), GLLQG (SEQ ID NO:20), LLQ (SEQ ID NO:21), GSPLAQSHGG (SEQ ID NO:22), GLLQGGG (SEQ ID NO:23), GLLQGG (SEQ ID NO:24), GLLQ (SEQ ID NO:25), LLQLLQGA (SEQ ID NO:26), LLQGA (SEQ ID NO:27), LLQYQGA (SEQ ID NO:28), LLQGS (SEQ ID NO:29), LLQYQG (SEQ ID NO:30), LLQLLQG (SEQ ID NO:31), SLLQG (SEQ ID NO:32), LLQLQ (SEQ ID NO:33), LLQLLQ (SEQ ID NO:34), LLQGR (SEQ ID NO:35), EEQYASTY (SEQ ID NO:36), EEQYQSTY (SEQ ID NO:37), EEQYNSTY (SEQ ID NO:38), EEQYQS (SEQ ID NO:39), EEQYQST (SEQ ID NO:40), EQYQSTY (SEQ ID NO:41), QYQS (SEQ ID NO:42), QYQSTY (SEQ ID NO:43), YRYRQ (SEQ ID NO:44), DYALQ (SEQ ID NO:45), FGLQRPY (SEQ ID NO:46), EQKLISEEDL (SEQ ID NO:47), LQR (SEQ ID NO:48) and YQR (SEQ ID NO:49).

Специалистам известны способы замены аминокислотных остатков антител или введения пептидных меток в антитела, например, с помощью методов молекулярного клонирования, описанных в Sambrook, Joseph. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

В целом, специалистам известны способы определения того, в каком положении антитела конъюгирован линкер. Например, место конъюгации может быть определено путем протеолитического расщепления конъюгата антитело-нагрузка и ЖХ-МС анализа полученных фрагментов. Например, образцы могут быть дегликозилированы с помощью GlyciNATOR (Genovis) в соответствии с инструкцией и затем расщеплены с помощью трипсина Trypsin Gold (для масс-спектрометрических исследований, Promega), соответственно. Поэтому 1 мкг белка можно инкубировать с 50 нг трипсина при 37°C в течение ночи. ЖХ-МС анализ может быть выполнен с помощью системы ВЭЖХ nanoAcquity, соединенной с масс-спектрометром Synapt-G2 (Waters). Для этого 100 нг пептидного раствора вводят в предколону Acquity UPLC Symmetry C18 (Waters, артикул 186006527) и фиксируют при расходе 5 мкл/мин в 1 % буфере А (вода, 0,1 % муравьиная кислота) и 99 % буфере В (ацетонитрил, 0,1 % муравьиная кислота) в течение 3 мин. Затем пептиды могут быть элюированы с линейным градиентом от 3 % до 65 % буфера В в течение 25 мин. Данные могут быть получены в режиме разрешения с положительной полярностью и в масс-диапазоне от

50 до 2000 м/з. Другие настройки прибора могут быть следующими: капиллярное напряжение 3,2 кВ, пробоотборный конус 40 В, экстракционный конус 4,0 В, температура источника 130 °С, газ в конусе 35 л/ч, нано поточный газ 0,1 бар и продувочный газ 150 л/ч. Масс-спектрометр может быть откалиброван с помощью [Glu1]-фибринопептида.

Кроме того, специалистам известны способы определения отношения лекарственное средство/антитело (DAR) или отношения нагрузка/антитело в конструкции антитело-нагрузка. Например, DAR может быть определено с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия (ХГВ) или ЖХ-МС.

Для хроматографии гидрофобного взаимодействия (ХГВ) образцы могут быть скорректированы до 0,5 М сульфата аммония и проанализированы при помощи колонки MAB PAK HIC Butyl (5 мкм, 4,6 x 100 мм, Thermo Scientific) с использованием полного градиента от А (1,5 М сульфат аммония, 25 mM Tris HCl, pH 7,5) до В (20% изопропанол, 25 mM Tris HCl, pH 7,5) в течение 20 мин при 1 мл/мин и 30 °С. Как правило, можно использовать 40 мкг образца и регистрировать сигналы при 280 нм. Относительное время удерживания ХГВ (ХГВ-ОБУ) может быть рассчитано путем деления абсолютного времени удерживания вида ADC DAR 2 на время удерживания соответствующего неконъюгированного mAb.

Для определения DAR методом ЖХ-МС конъюгаты ADC можно разбавлять NH_4HCO_3 до конечной концентрации 0,025 мг/мл. Затем 40 мкл этого раствора могут быть восстановлены 1 мкл ТСЕР (500 mM) в течение 5 мин при комнатной температуре и затем алкилированы добавлением 10 мкл хлорацетамида (200 mM) с последующей инкубацией в течение ночи при 37 °С в темноте. Для обращенно-фазовой хроматографии можно использовать систему Dionex U3000 в сочетании с программным обеспечением Chromeleon. Система может быть оборудована колонкой RP-1000 (1000 Å, 5 мкм, 1,0 x 100 мм, Seraph), нагретой до 70 °С, и УФ-детектором, настроенным на длину волны 214 нм. Растворитель А может состоять из воды с 0,1 % муравьиной кислотой, а растворитель В может содержать 85 % ацетонитрил с 0,1 % муравьиной кислоты. Восстановленный и алкилированный образец может быть введен в колонку и разделен с градиентом от 30 до 55% растворителя В в течение 14 минут. Система жидкостной хроматографии может быть соединена с масс-

спектрометром Synapt-G2 для идентификации видов DAR. Капиллярное напряжение масс-спектрометра может быть установлено на 3 кВ, пробоотборный конус - на 30 В, а экстракционный конус может иметь дополнительное значение 5 В. Температура источника может быть установлена на 150 °С, температура десольватации - на 500 °С, газ для конуса - на 20 л/ч, газ для десольватации - на 600 л/ч, и данные могут быть получены в позитивном режиме в масс-диапазоне от 600-5000 Da с временем сканирования 1 с. Прибор может быть откалиброван с помощью йодида натрия. Деконволюция спектров может быть выполнена с помощью алгоритма MaxEnt1 программы MassLynx до сходимости. После отнесения видов DAR к хроматографическим пикам, DAR может быть рассчитано на основе интегрированных площадей пиков обращенно-фазовой хроматограммы.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором линкер конъюгирован с γ -карбоксамидной группой остатка Gln, входящего в состав антитела.

То есть, линкер по настоящему изобретению предпочтительно конъюгирован с амидной группой в боковой цепи остатка Gln, входящего в состав антитела, предпочтительно любого из остатков Gln, описанных в настоящем документе, еще предпочтительнее остатка Gln Q295 (нумерация EU).

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором линкер подходит для конъюгации с гликозилированным антителом с эффективностью конъюгации, по меньшей мере, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%.

То есть, в определенных вариантах осуществления такой линкер может быть линкером, который может быть конъюгирован с гликозилированным антителом с эффективностью, по меньшей мере, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%. В предпочтительном варианте осуществления такой линкер может быть линкером, который может быть конъюгирован с гликозилированным антителом с эффективностью, по меньшей мере, 70%. В другом предпочтительном варианте осуществления такой линкер может быть линкером, который может быть конъюгирован с гликозилированным антителом с эффективностью, по меньшей мере,

75%. В другом предпочтительном варианте осуществления такой линкер может быть линкером, который может быть конъюгирован с гликозилированным антителом с эффективностью, по меньшей мере, 80%. В другом предпочтительном варианте осуществления такой линкер может быть линкером, который может быть конъюгирован с гликозилированным антителом с эффективностью, по меньшей мере, 85%. В другом предпочтительном варианте осуществления такой линкер может быть линкером, который может быть конъюгирован с гликозилированным антителом с эффективностью, по меньшей мере, 90%. В другом предпочтительном варианте осуществления такой линкер может быть линкером, который может быть конъюгирован с гликозилированным антителом с эффективностью, по меньшей мере, 95%. Предпочтительно, такое гликозилированное антитело представляет собой гликозилированное IgG антитело, еще предпочтительнее антитело IgG, которое гликозилировано на остатке N297 (нумерация EU).

Специалистам известны способы определения эффективности конъюгации антитела с конкретным линкером. Например, эффективность конъюгации может быть определена так, как описано в настоящем документе. То есть, антитело, в частности антитело IgG1, можно инкубировать с концентрацией 1-5 мг/мл с 5-20 экв. молярных эквивалентов линкера и 3-6 ед. микробной трансглутаминазы на мг антитела в подходящем буфере в течение 20-48 часов при 37°C или таким способом, который описан в Примере 1. После периода инкубации эффективность конъюгации может быть определена с помощью ЖХ-МС анализа в восстановительных условиях. Микробная трансглутаминаза может представлять собой МТГ из *Streptomyces tobaraensis*, которую производит Zedira (Германия). Подходящим буфером может быть буфер Tris, MOPS, HEPES, PBS или BisTris. Однако следует понимать, что выбор буферной системы может быть различным и в значительной степени зависит от химических свойств линкера. Однако специалист способен определить оптимальные буферные условия на основании описания настоящего изобретения. Как вариант, эффективность конъюгации может быть определена так, как описано в Spycher et al. (Dual, Site-Specific Modification of Antibodies by Using Solid-Phase Immobilized Microbial Transglutaminase, ChemBioChem 2019 18(19):1923-1927), и проанализирована так, как описано в Benjamin et al. (Thiolation of Q295: Site-Specific Conjugation of Hydrophobic Payloads without Need for Genetic Engineering, Mol.

Pharmaceutics 2019, 16: 2795-2807).

В определенных вариантах осуществления антитела могут быть конъюгированы так, как описано в Примере 1. То есть, 5 мг/мл нативного, гликозилированного моноклонального антитела можно инкубировать в течение 24 часов при 37°C в 50 мМ Tris pH 7,6 с микробной трансглутаминазой (MTG, Zedira) в концентрации 5 Ед/мг антитела и 5 молярных эквивалентов указанных линкер- нагрузки во вращающемся термомиксере.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором микробная трансглутаминаза получена из вида *Streptomyces*, в частности, *Streptomyces mobaraensis*.

То есть микробная трансглутаминаза, используемая в способе по настоящему изобретению, может быть получена из вида *Streptomyces*, в частности, из *Streptomyces mobaraensis*, предпочтительно с идентичностью последовательности 80% по отношению к нативному ферменту. Соответственно, МТГ может быть нативным ферментом или может представлять собой модифицированный вариант нативного фермента.

Одна из таких микробных трансглутаминаз коммерчески доступна от компании Zedira (Германия). Она рекомбинантно продуцируется в *E. coli*. Трансглутаминаза *Streptomyces mobaraensis* имеет аминокислотную последовательность, раскрытую в SEQ ID NO:12. Ранее сообщалось о вариантах МТГ *S. mobaraensis* с другими аминокислотными последовательностями, которые также охватываются настоящим изобретением (SEQ ID NO:13 и 14).

В другом варианте осуществления может быть использована микробная трансглутаминаза из *Streptomyces ladakanum* (ранее известная как *Streptoverticillium ladakanum*). Трансглутаминаза *Streptomyces ladakanum* (Патент США № 6,660,510 В2) имеет аминокислотную последовательность, раскрытую в SEQ ID NO:15.

Обе вышеперечисленные трансглутаминазы могут быть модифицированы по последовательности. В некоторых вариантах осуществления могут быть использованы трансглутаминазы, которые имеют идентичность последовательности

80%, 85%, 90% или 95% или более с любой из SEQ ID NO:12 - 15.

Другая подходящая микробная трансглутаминаза производится компанией Ajinomoto под названием АСТИВА ТГ. По сравнению с трансглутаминазой производства Zedira, АСТИВА ТГ лишена 4 N-концевых аминокислот, но имеет схожее действие.

Другие микробные трансглутаминазы, которые могут быть использованы в рамках настоящего изобретения, раскрыты в публикациях Kieliszek и Misiewicz (Folia Microbiol (Praha). 2014; 59(3): 241-250), WO 2015/191883 A1, WO 2008/102007 A1 и US 2010/0143970, содержание которых полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

В определенных вариантах осуществления для конъюгации линкера с антителом можно использовать мутантный вариант микробной трансглутаминазы. То есть микробная трансглутаминаза, используемая в способе по настоящему изобретению, может представлять собой вариант трансглутаминазы *S. morabaensis*, раскрытый в SEQ ID NO: 12 или 13. В определенных вариантах осуществления рекомбинантная трансглутаминаза *S. morabaensis*, представленная в SEQ ID NO:12, может содержать мутацию G254D. В определенных вариантах осуществления рекомбинантная трансглутаминаза *S. morabaensis*, представленная в SEQ ID NO:12, может содержать мутации G254D и E304D. В определенных вариантах осуществления рекомбинантная трансглутаминаза *S. morabaensis*, представленная в SEQ ID NO:12, может содержать мутации D8E и G254D. В определенных вариантах осуществления рекомбинантная трансглутаминаза *S. morabaensis*, представленная в SEQ ID NO:12, может содержать мутации E124A и G254D. В определенных вариантах осуществления рекомбинантная трансглутаминаза *S. morabaensis*, представленная в SEQ ID NO:12, может содержать мутации A216D и G254D. В определенных вариантах осуществления рекомбинантная трансглутаминаза *S. morabaensis*, представленная в SEQ ID NO:12, может содержать мутации G254D и K331T.

Микробная трансглутаминаза может быть добавлена к реакции конъюгации в любой концентрации, позволяющей эффективно конъюгировать антитело с линкером. В определенных вариантах реализации концентрация микробной трансглутаминазы в реакции конъюгации может зависеть от количества антитела, используемого в той же

реакции. Например, микробная трансглутаминаза может быть добавлена к реакции конъюгации в концентрации менее 100 ед/мг антитела, 90 ед/мг антитела, 80 ед/мг антитела, 70 ед/мг антитела, 60 ед/мг антитела, 50 ед/мг антитела, 40 ед/мг антитела, 30 ед/мг антитела, 20 ед/мг антитела, 10 ед/мг антитела или 6 ед/мг антитела. В определенных вариантах осуществления микробная трансглутаминаза может быть добавлена к реакции конъюгации в концентрации 1, 3, 5 или 6 ед/мг антитела.

То есть, в определенных вариантах осуществления микробная трансглутаминаза может быть добавлена к реакции конъюгации в концентрации от 1 - 20 ед/мг антитела, предпочтительно 1 - 10 ед/мг антитела, еще предпочтительнее 1 - 7,5 ед/мг антитела, еще предпочтительнее 2 - 6 ед/мг антитела, еще предпочтительнее 2 - 4 ед/мг антитела, предпочтительнее всего 3 ед/мг антитела.

Данный способ по настоящему изобретению включает использование микробной трансглутаминазы. Однако следует отметить, что может быть осуществлена эквивалентная реакция при помощи фермента, обладающего действием трансглутаминазы, который имеет немикробное происхождение. Соответственно, конъюгаты антитело-линкер по настоящему изобретению также могут быть получены с помощью фермента, имеющего действие трансглутаминазы, который имеет немикробное происхождение.

Антитело может быть добавлено к реакции конъюгации в любой концентрации. Однако предпочтительно, чтобы антитело добавляли к реакции конъюгации в концентрации в пределах 0,1 - 20 мг/мл. То есть, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором антитело добавляют к реакции конъюгации в концентрации 0,1 - 20 мг/мл, предпочтительно 0,25 - 15 мг/мл, предпочтительнее 0,5 - 12,5 мг/мл, еще предпочтительнее 1 - 10 мг/мл, еще предпочтительнее 2 - 7,5 мг/мл, предпочтительнее всего около 5 мг/мл.

Как вариант, антитело может быть добавлено к реакции конъюгации в концентрации от 1 до 20 мг/мл, предпочтительно от 2,5 до 20 мг/мл, предпочтительнее от 5 до 20 мг/мл, предпочтительнее всего от 5 до 17 мг/мл.

Для обеспечения эффективной конъюгации предпочтительно, чтобы линкер

добавляли к антителу в молярном избытке. То есть, в определенных вариантах осуществления антитело смешивают, по меньшей мере, с 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 молярными эквивалентами линкера.

То есть, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором на антитело воздействуют 2 - 100 молярными эквивалентами линкера, предпочтительно 2 - 80 молярными эквивалентами линкера, предпочтительнее 2 - 70 молярными эквивалентами линкера, еще предпочтительнее 2 - 60 молярными эквивалентами линкера, еще предпочтительнее 2 - 50 молярными эквивалентами линкера, еще предпочтительнее 2 - 40 молярными эквивалентами линкера, еще предпочтительнее 2 - 30 молярными эквивалентами линкера, еще предпочтительнее 2 - 25 молярными эквивалентами линкера, еще предпочтительнее 2 - 20 молярными эквивалентами линкера, еще предпочтительнее 2 - 15 молярными эквивалентами линкера, предпочтительнее всего 2 - 10 молярными эквивалентами линкера.

Как вариант, на антитело можно воздействовать 2,5-100 молярными эквивалентами линкера, предпочтительно 2,5-80 молярными эквивалентами линкера, предпочтительнее 2,5-70 молярными эквивалентами линкера, еще предпочтительнее 2,5-60 молярными эквивалентами линкера, еще предпочтительнее 2,5-50 молярными эквивалентами линкера, еще предпочтительнее 2,5-40 молярными эквивалентами линкера, еще предпочтительнее 2,5-30 молярными эквивалентами линкера, еще предпочтительнее 2,5-20 молярными эквивалентами линкера, еще предпочтительнее 2,5-15 молярными эквивалентами линкера, еще предпочтительнее 2,5-10 молярными эквивалентами линкера, предпочтительнее всего 2,5-8 молярными эквивалентами линкера.

Как вариант, на антитело можно воздействовать 5 - 100 молярными эквивалентами линкера, предпочтительно 5-80 молярными эквивалентами линкера, предпочтительнее 5-70 молярными эквивалентами линкера, еще предпочтительнее 5-60 молярными эквивалентами линкера, еще предпочтительнее 5-50 молярными эквивалентами линкера, еще предпочтительнее 5-40 молярными эквивалентами линкера, еще предпочтительнее 5-30 молярными эквивалентами линкера, еще предпочтительнее 5 - 20 молярными эквивалентами линкера, еще предпочтительнее

5-15 молярными эквивалентами линкера, еще предпочтительнее 5-10 молярными эквивалентами линкера, предпочтительнее всего 5-10 молярными эквивалентами линкера.

Данный способ по настоящему изобретению предпочтительно осуществляют при рН в диапазоне от 6 до 9. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором конъюгация линкера с антителом происходит при рН в диапазоне от 6 до 8,5, предпочтительно при рН в диапазоне от 6,5 до 8, еще предпочтительнее при рН в диапазоне от 7 до 8. В наиболее предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способу по настоящему изобретению, при котором конъюгация линкера с антителом происходит при рН 7,6.

Данный способ по настоящему изобретению может быть осуществлен в любом буфере, который подходит для конъюгации нагрузки с линкером. Буферы, подходящие для данного способа по изобретению, включают, помимо прочего, Tris, MOPS, HEPES, PBS или BisTris буфер. Концентрация буфера зависит, помимо прочего, от концентрации антитела и/или линкера и может составлять 10-1000 мМ, 10-500 мМ, 10-400 мМ, 10-250 мМ, 10-150 мМ или 10-100 мМ. Кроме того, буфер может включать любую концентрацию солей, которая подходит для осуществления способа по изобретению. Например, буфер, используемый в способе по изобретению, может иметь концентрацию солей ≤ 150 мМ, ≤ 140 мМ, ≤ 130 мМ, ≤ 120 мМ, ≤ 110 мМ, ≤ 100 мМ, ≤ 90 мМ, ≤ 80 мМ, ≤ 70 мМ, ≤ 60 мМ, ≤ 50 мМ, ≤ 40 мМ, ≤ 30 мМ, ≤ 20 мМ или ≤ 10 мМ или может не содержать солей. В конкретном варианте осуществления способ по изобретению осуществляют в 50 мМ Tris (рН 7,6), предпочтительно без солей.

Следует отметить, что оптимальные условия реакции (например, рН, буфер, концентрация солей) могут быть различными для разных нагрузок и в некоторой степени зависят от физико-химических свойств линкеров и/или нагрузок. Однако специалисту не требуется излишних экспериментов для определения условий реакции, подходящих для осуществления способа по изобретению.

Следует понимать, что заявка охватывает любую комбинацию вышеописанных

концентраций линкера, МТГ антитела и/или буфера.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения конъюгата антитело-линкер с помощью микробной трансглутаминазы (МТГ), причем этот способ включает этап конъюгирования линкера, содержащего структуру (показанную в направлении N -> C)

(Sp_1) -RK- (Sp_2) -B- (Sp_3) или (Sp_1) -B- (Sp_2) -RK- (Sp_3)

с остатком Gln, содержащимся в антителе, где

- (Sp_1) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp_2) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp_3) является химическим спейсером или отсутствует;
- R представляет собой аргинин, или производное аргинина, или миметик аргинина;
- K представляет собой лизин, или производное лизина, или миметик лизина;
- B представляет собой связующий компонент или нагрузку;

при этом линкер конъюгирован с остатком Gln, содержащимся в антителе, через первичный амин, содержащийся в боковой цепи лизинового остатка, производного лизина или миметика лизина; и

при этом на антитело воздействуют 2- 80 молярными эквивалентами линкера; и/или

при этом микробную трансглутаминазу добавляют к реакции конъюгации в концентрации от 1 до 20 ед/мг антитела и, опционально, при этом антитело добавляют к реакции конъюгации в концентрации от 0,1 до 20 мг/мл.

В еще более предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения конъюгата антитело-линкер с помощью микробной

трансглутаминазы (МТГ), причем этот способ включает этап конъюгирования линкера, содержащего структуру (показанную в направлении N → C)



с остатком Gln, содержащимся в антителе, где

- (Sp₁) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp₂) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp₃) является химическим спейсером или отсутствует;
- R представляет собой аргинин, или производное аргинина, или миметик аргинина;
- K представляет собой лизин, или производное лизина, или миметик лизина;
- B представляет собой связующий компонент или нагрузку;

при этом линкер конъюгирован с остатком Gln, содержащимся в антителе, через первичный амин, содержащийся в боковой цепи лизинового остатка, производного лизина или миметика лизина; и

при этом на антитело воздействуют 2-50 молярными эквивалентами линкера; и/или

при этом микробную трансглутаминазу добавляют к реакции конъюгации в концентрации от 1 до 10 ед/мг антитела и, опционально, при этом антитело добавляют к реакции конъюгации в концентрации от 1 до 20 мг/мл.

В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способу получения конъюгата антитело-связующее звено с помощью микробной трансглутаминазы (МТГ), способ включает этап конъюгирования связующего звена, имеющего структуру (показана в направлении N → C)



с остатком Gln, содержащимся в антителе, где

- (Sp₁) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp₂) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp₃) является химическим спейсером или отсутствует;
- R представляет собой аргинин, или производное аргинина, или миметик аргинина;
- K представляет собой лизин, или производное лизина, или миметик лизина;
- B представляет собой связующий компонент или нагрузку;

при этом линкер конъюгирован с остатком Gln, содержащимся в антителе, через первичный амин, содержащийся в боковой цепи лизинового остатка, производного лизина или миметика лизина; и

при этом на антитело воздействуют 2-30 молярными эквивалентами линкера; и/или

при этом микробную трансглутаминазу добавляют к реакции конъюгации в концентрации от 2 до 10 ед/мг антитела и, опционально, при этом антитело добавляют к реакции конъюгации в концентрации от 5 до 20 мг/мл.

В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способу получения конъюгата антитело-связующее звено с помощью микробной трансглутаминазы (МТГ), способ включает этап конъюгирования связующего звена, имеющего структуру (показана в направлении N -> C)



с остатком Gln, содержащимся в антителе, где

- (Sp₁) является химическим спейсером или отсутствует;

- (Sp₂) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp₃) является химическим спейсером или отсутствует;
- R представляет собой аргинин, или производное аргинина, или миметик аргинина;
- K представляет собой лизин, или производное лизина, или миметик лизина;
- B представляет собой связующий компонент или нагрузку;

при этом линкер конъюгирован с остатком Gln, содержащимся в антителе, через первичный амин, содержащийся в боковой цепи лизинового остатка, производного лизина или миметика лизина; и

при этом на антитело воздействуют примерно 2 - 20 молярными эквивалентами линкера; и/или при этом микробную трансглутаминазу добавляют к реакции конъюгации в концентрации 2 - 10 ед/мг антитела и, опционально, при этом антитело добавляют к реакции конъюгации в концентрации 5 - 20 мг/мл.

В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способу получения конъюгата антитело-связующее звено с помощью микробной трансглутаминазы (МТГ), способ включает этап конъюгирования связующего звена, имеющего структуру (показана в направлении N -> C)



с остатком Gln, содержащимся в антителе, где

- (Sp₁) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp₂) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp₃) является химическим спейсером или отсутствует;
- R представляет собой аргинин, или производное аргинина, или миметик аргинина;

- К представляет собой лизин, или производное лизина, или миметик лизина;
- В представляет собой связующий компонент или нагрузку;

при этом линкер конъюгирован с остатком Gln, содержащимся в антителе, через первичный амин, содержащийся в боковой цепи лизинового остатка, производного лизина или миметика лизина; и

при этом на антитело воздействуют примерно 2,5-15 молярными эквивалентами линкера; и/или при этом микробную транслугтаминазу добавляют к реакции конъюгации в концентрации 2-10 ед/мг антитела и, опционально, при этом антитело добавляют к реакции конъюгации в концентрации 5-20 мг/мл.

В самом предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу получения конъюгата антитело-линкер с помощью микробной транслугтаминазы (МТГ), причем этот способ включает этап конъюгирования линкера, содержащего структуру (показанную в направлении N -> C)



с остатком Gln, содержащимся в антителе, где

- (Sp₁) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp₂) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp₃) является химическим спейсером или отсутствует;
- R представляет собой аргинин, или производное аргинина, или миметик аргинина;
- К представляет собой лизин, или производное лизина, или миметик лизина;
- В представляет собой связующий компонент или нагрузку;

при этом линкер конъюгирован с остатком Gln, содержащимся в антителе, через

первичный амин, содержащийся в боковой цепи лизинового остатка, производного лизина или миметика лизина; и

при этом на антитело воздействуют примерно 2,5-10 молярными эквивалентами линкера; и/или при этом микробную трансглутаминазу добавляют к реакции конъюгации в концентрации 2-10 ед/мг антитела и, опционально, при этом антитело добавляют к реакции конъюгации в концентрации 5-20 мг/мл.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер, который был получен с помощью способа по настоящему изобретению.

То есть, изобретение относится к конъюгату антитело-линкер, который был получен с помощью любого из вышеупомянутых этапов.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер, содержащему:

а) антитело; и

б) линкер, содержащий структуру:

(Sp_1) -RK- (Sp_2) -B- (Sp_3) или

(Sp_1) -B- (Sp_2) -RK- (Sp_3) ; при этом

- (Sp_1) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp_2) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp_3) является химическим спейсером или отсутствует;
- R представляет собой аргинин, или производное аргинина, или миметик аргинина;
- K представляет собой лизин, или производное лизина, или миметик лизина;
- B представляет собой связующий компонент или нагрузку;

при этом линкер конъюгирован с антителом посредством изопептидной связи, образованной между γ -карбоксамидной группой глутаминового остатка, входящего в состав антитела, и первичным амином, входящим в состав боковой цепи лизинового остатка, производного лизина или миметика лизина, входящего в состав RK-мотива,

входящего в состав линкера.

То есть, изобретение также относится к конъюгатам антитело-линкер, которые были получены с помощью способа по настоящему изобретению. В частности, изобретение относится к антителам, которые были конъюгированы на глутаминовом остатке, входящем в состав тяжелой или легкой цепи антитела, с любым из линкеров, описанных в настоящем документе, для осуществления способа по настоящему изобретению. То есть, все линкеры, которые были описаны выше для способа по настоящему изобретению, могут входить в конструкцию антитело-линкер по настоящему изобретению. Предпочтительно, линкер по настоящему изобретению конъюгирован с глутаминовым остатком в антителе через амидную связь, образованную между амидной боковой цепью глутаминового остатка, входящего в состав антитела, и первичным амином, входящим в состав остатка К, входящего в мотив РК линкера. В определенных вариантах осуществления первичный амин, входящий в состав остатка К, представляет собой аминную группу, входящую в состав боковой цепи лизинового остатка, миметика лизина или производного лизина, что описано в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления изобретения К представляет собой лизиновый остаток, а первичный амин, через который линкер конъюгируется с антителом, представляет собой ϵ -аминогруппу, входящую в состав лизинового остатка.

Химический спейсер, входящий в конструкцию антитело-линкер, описанную в настоящем документе, может быть любым из РК-содержащих линкеров, описанных в настоящем документе. То есть, линкер может быть линкером, содержащим один связующий компонент или нагрузку В, или может быть линкером, содержащим два или более связующих компонентов и/или нагрузок V_1 , V_2 и так далее.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором химические спейсеры (Sp_1), (Sp_2) и (Sp_3) каждый независимо содержат от 0 до 12 аминокислотных остатков.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором линкер содержит не более 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 аминокислотных остатков.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором суммарный заряд линкера является нейтральным или положительным.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором линкер не содержит отрицательно заряженных аминокислотных остатков.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2), ARK (SEQ ID NO:3) и RKR (SEQ ID NO:4).

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2) и ARK (SEQ ID NO:3).

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором линкер содержит аминокислотную последовательность RCAA (SEQ ID NO:1).

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором линкер содержит аминокислотную последовательность RK-Val-Cit (SEQ ID NO:54).

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором В представляет собой связующий компонент.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором связующий компонент В содержит

- биоортогональную маркерную группу или
- небииортогональное соединение для перекрестного сшивания.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором биоортогональная маркерная группа или небиоортогональное соединение для перекрестного сшивания состоит из или содержит, по меньшей мере, одну молекулу или фрагмент, выбранный из группы, состоящей из:

- $-N-N\equiv N$ или $-N_3$;
- Lys(N_3);
- тетразина;
- алкина;
- напряженного циклооктина;
- BCN;
- напряженного алкена;
- фотореактивной группы;
- альдегида;
- ацилтрифторбората;
- средства деградации белков ("PROTAC");
- цикlopентадиена/спиролоциклопентадиена;
- тиоселективного электрофила;
- -SH; и
- цистеина.

То есть, конъюгат антитело-линкер по настоящему изобретению может представлять собой антитело, конъюгированное с линкером, содержащим один или более связующих компонентов. Такие конъюгаты антитело-линкер могут быть впоследствии изменены путем добавления одной или более нагрузок, в частности, нагрузок, которые подходят для соединения с одним или несколькими связующими компонентами.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором одна или несколько нагрузок конъюгированы со связующим компонентом В.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором одна или несколько нагрузок конъюгированы со связующим компонентом В посредством клик-реакции.

То есть, конъюгаты антитело-линкер по настоящему изобретению могут быть конъюгатами антитело-нагрузка, которые были получены в двухэтапном процессе, описанном в настоящем документе.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором В представляет собой нагрузку.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором нагрузка В содержит, по меньшей мере, один из следующих компонентов:

- токсин;
- цитокин;
- фактор роста;
- радионуклид;
- гормон;
- противовирусное средство;
- антибактериальное средство;
- флуоресцентный краситель;
- иммунорегуляторное/иммуностимулирующее средство;
- компонент, увеличивающий период полураспада;
- компонент, повышающий растворимость;
- конъюгат полимер-токсин;
- нуклеиновая кислота;

- биотиновый или стрептавидиновый компонент;
- витамин;
- средство деградации белков ("PROTAC");
- связывающееся с мишенью соединение; и/или
- противовоспалительное средство.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором токсин представляет собой, по меньшей мере, один токсин, выбранный из группы, состоящей из

- пирролобензодиазепина (например, PBD);
- ауристатина (например, MMAE, MMAF);
- майтанзиноида (например, майтанзина, DM1, DM4, DM21);
- дуокармицина;
- ингибитора никотинамидфосфорибозилтрансферазы (NAMPT);
- тубулизина;
- энедиина (например, калихеамицина);
- производного антрациклина (PNU) (например, доксорубицина);
- ингибитора кинезина веретенообразного белка (KSP) на основе пиррола;
- криптофицина;
- ингибитора эффлюксного насоса лекарственного препарата;
- сантрамицина;
- аманитина (например, α -аманитина); и
- камптотецина (например, эксатеканов, дерукстеканов).

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором химический спейсер (Sp₂) включает самоотщепляющийся компонент.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором самоотщепляющийся компонент непосредственно присоединен к нагрузке В.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором самоотщепляющийся компонент содержит р-аминобензилкарбамоильный (РАВС) компонент.

То есть, конъюгаты антитело-линкер по настоящему изобретению могут быть конъюгатами антитело-нагрузка, которые были получены в одноэтапном процессе, описанном в настоящем документе.

Антитело, входящее в состав конъюгата антитело-линкер по настоящему изобретению, может быть любым из антител, в частности, любым из антител типа IgG, описанных в настоящем документе, для осуществления способа по настоящему изобретению. То есть, антитело, входящее в состав конъюгата антитело-линкер по настоящему изобретению, может включать тот же профиль гликозилирования, мутации и/или модификации, что и антитела, описанные в настоящем документе, для осуществления способа по настоящему изобретению.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-нагрузка по настоящему изобретению, в котором линкер представляет собой любой из линкеров, показанных на ФИГ.1, ФИГ.2, ФИГ.3, ФИГ.8, ФИГ.9, ФИГ.14, ФИГ.15, ФИГ.17, ФИГ.18, ФИГ.19, ФИГ.20, ФИГ.21, ФИГ.22, ФИГ.23, ФИГ.24, ФИГ.25, ФИГ.26, ФИГ.27, ФИГ.28, ФИГ.29, ФИГ.30, ФИГ.31, ФИГ.32, ФИГ.33 или ФИГ.34.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, при котором антитело представляет собой антитело IgG, в частности, антитело IgG1.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором остаток Gln, с которым конъюгирован линкер, входит в Fc домен антитела, в частности, в котором остаток Gln, с которым конъюгирован линкер, является остатком Gln Q295 (нумерация EU) домена C_H2 антитела IgG.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором остаток Gln, с которым конъюгирован линкер, был введен в тяжелую или легкую цепь антитела с помощью молекулярной инженерии.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором остаток Gln, введенный в тяжелую или легкую цепь антитела с помощью молекулярной инженерии, представляет собой N297Q (нумерация EU) домена C_H2 агликозилированного антитела IgG.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором остаток Gln, введенный в тяжелую или легкую цепь антитела с помощью молекулярной инженерии, входит в состав пептида, который был (a) интегрирован в тяжелую или легкую цепь антитела или (b) слит с N- или C-концевой областью тяжелой или легкой цепи антитела.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, при котором пептид, содержащий остаток Gln, слит с C-концом тяжелой цепи антитела.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором антитело IgG представляет собой гликозилированное антитело IgG, в частности, в котором антитело IgG гликозилировано на остатке N297 (нумерация EU) домена C_H2.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором антитело выбрано из группы, состоящей из: Брентуксимаба, Трастузумаба, Гемтузумаба, Инотузумаба, Авелумаба, Цетуксимаба, Ритуксимаба, Даратумумаба, Пертузумаба, Ведолизумаба, Окрелизумаба, Тоцилизумаба, Устекинумаба, Голимумаба, Обинутузумаба, Сацитузумаба, Белантамаба, Полатузумаба и Энфортумаба.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором антитело выбрано из группы, состоящей из: Брентуксимаба, Гемтузумаба, Трастузумаба, Инотузумаба, Полатузумаба, Энфортумаба, Сацитузумаба и Белантамаба.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором антитело представляет собой Полатузумаб, или Трастузумаб, или Энфортумаб.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство. То есть, антитело может быть конъюгировано с линкером по настоящему изобретению, при этом линкер содержит один или несколько токсинов.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, содержащему:

a) антитело IgG; и

b) линкер, содержащий лекарственное соединение В, при этом лекарственное соединение В ковалентно связано с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: RКАА (SEQ ID NO:1), RКА (SEQ ID NO:2), АRК (SEQ ID NO:3) или RKR (SEQ ID NO:4);

при этом линкер конъюгирован с антителом IgG посредством изопептидной связи, образованной между γ -карбоксамидной группой остатка глутамина Q295 (нумерация ЕС) домена С_H2 антитела и первичным амином, входящим в боковую цепь лизинового остатка, входящего в состав линкера.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, содержащему:

a) антитело IgG; и

b) линкер, содержащий лекарственный компонент В, при этом лекарственный компонент В ковалентно связан с аминокислотной последовательностью, содержащей или состоящей из последовательности RK-Val-Cit (SEQ ID NO:54);

при этом линкер конъюгирован с антителом IgG посредством изопептидной связи, образованной между γ -карбоксамидной группой остатка глутамина Q295 (нумерация ЕС) домена C_H2 антитела и первичным амином, входящим в боковую цепь лизинового остатка, входящего в состав линкера.

То есть, в определенных вариантах осуществления линкер может содержать любую из последовательностей RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2), ARK (SEQ ID NO:3), RKR (SEQ ID NO:4) или RK-Val-Cit (SEQ ID NO:54), при этом линкер конъюгирован с остатком глутамина в антителе через первичный амин, входящий в состав остатка К. Следует понимать, что лекарственный компонент В не обязательно должен быть непосредственно связан со структурой RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2), ARK (SEQ ID NO:3), RKR (SEQ ID NO:4) или RK-Val-Cit (SEQ ID NO:54). Вместо этого лекарственный компонент В может быть косвенно связан со структурой RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2), ARK (SEQ ID NO:3), RKR (SEQ ID NO:4) или RK-Val-Cit (SEQ ID NO:54). Например, линкер может содержать дополнительные химические структуры, расположенные между лекарственным компонентом В и структурой RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2), ARK (SEQ ID NO:3), RKR (SEQ ID NO:4) или RK-Val-Cit (SEQ ID NO:54). Такие химические структуры могут быть любыми из структур, которые были описаны в настоящем документе для химических спейсеров (Sp₁), (Sp₂) или (Sp₃). В определенных вариантах осуществления линкер может содержать один или несколько аминокислотных остатков, расположенных между лекарственным компонентом В и структурой RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2), ARK (SEQ ID NO:3), RKR (SEQ ID NO:4) или RK-Val-Cit (SEQ ID NO:54). В определенных вариантах осуществления линкер может содержать один или несколько ПЭГ компонентов, расположенных между лекарственным компонентом В и структурой RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2), ARK (SEQ ID NO:3), RKR (SEQ ID NO:4) или RK-Val-Cit (SEQ ID NO:54). В определенных вариантах осуществления линкер может содержать расщепляемый и/или самоотщепляющийся компонент, расположенный между лекарственным компонентом В и структурой RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2), ARK (SEQ ID NO:3), RKR (SEQ ID NO:4) или RK-Val-Cit (SEQ ID NO:54).

То есть, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату

антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором лекарственный компонент В связан с N- или C-концом аминокислотной последовательности, входящей в состав линкера, посредством самоотщепляющегося компонента.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором самоотщепляющийся компонент содержит p-аминобензилкарбамоиловый (РАВС) компонент.

То есть, самоотщепляющийся компонент, входящий в состав линкера по настоящему изобретению, может быть любым из самоотщепляющихся компонентов, которые были описаны в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может представлять собой РАВС или метил-аминовую группу, описанные в настоящем документе.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором антитело IgG представляет собой гликозилированное антитело IgG, в частности, в котором антитело IgG гликозилировано на остатке N297 (нумерация EU) домена C_H2.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором антитело представляет собой антитело IgG, в частности, антитело IgG1.

То есть, антитело предпочтительно представляет собой антитело IgG, в частности, антитело IgG1, в частности, при этом антитело IgG или IgG1 гликозилировано на остатке N297 (нумерация EU).

Конъюгат антитело-лекарственное средство может содержать один или более токсинов, описанных в настоящем документе. Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором лекарственное средство представляет собой токсин, выбранный из группы, состоящей из:

- пирролобензодиазепина (например, PBD);

- ауристатина (например, MMAE, MMAF);
- майтанзиноида (например, майтанзина, DM1, DM4, DM21);
- дуокармицина;
- ингибитора никотинамидфосфорибозилтрансферазы (NAMPT);
- тубулизина;
- энедиина (например, калихеамицина);
- производного антрациклина (PNU) (например, доксорубицина);
- ингибитора кинезина веретенообразного белка (KSP) на основе пиррола;
- криптофицина;
- ингибитора эффлюксного насоса лекарственного препарата;
- сандамицина;
- аманитина (например, α -аманитина); и
- камптотецина (например, эксатеканов, дерукстеканов).

Следует понимать, что токсин может быть непосредственно соединен с линкером путем химического синтеза. Однако в других вариантах осуществления токсин может быть также связан со связующим компонентом, входящим в состав линкера, в двухэтапном процессе.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором линкер содержит или состоит из структуры RКАА-В или RКАА-(молекула линкера)-В.

То есть, нагрузка В может быть соединена непосредственно с С-концом аланинового остатка или может быть соединена с С-концом аланинового остатка через молекулу линкера. Следует понимать, что выбор молекулы линкера в значительной степени зависит от функциональных групп, имеющих в нагрузке В. В настоящем документе раскрыты молекулы линкера, которые подходят для соединения нагрузок с различными функциональными группами с пептидом. Молекула линкера может быть расщепляемой или нерасщепляемой молекулой линкера. В частности, молекула линкера может содержать самоотщепляющийся компонент, в частности, любой из самоотщепляющихся компонентов, описанных в настоящем документе. Таким

образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором линкер содержит или состоит из структуры RКАА-(самоотщепляющийся компонент)-В.

Как вариант, нагрузка может быть соединена с N-концом остатка аргинина либо напрямую, либо через молекулу линкера, например, через любую из молекул линкера, описанных в настоящем документе. То есть, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором линкер содержит или состоит из структуры В-RКАА или В-(молекула линкера)-RКАА. В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором линкер содержит или состоит из структуры В-(самоотщепляющийся компонент)-RКАА. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент, входящий в структуру В-(самоотщепляющийся компонент)-RКАА, может быть самоотщепляющимся компонентом, содержащим орто-гидрокси-защищенный арилсульфатный (ОНРАS) компонент, описанный в настоящем документе.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором линкер имеет структуру RКАА-РАВС-В, в частности, в котором В представляет собой ауристин или майтанзиноид, в частности, в котором ауристин представляет собой ММАЕ и в котором майтанзиноид представляет собой DM1 или майтанзин.

В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру RКАА-РАВС-В. То есть, линкер может содержать линейный пептид RКАА, в котором карбоксильная группа C-концевого остатка аланина соединена с аминогруппой, входящей в состав РАВС, посредством амидной связи. Токсин В может присоединяться к РАВС через образование карбамата. Следует понимать, что не все токсины содержат функциональные группы, позволяющие образовывать карбамат с РАВС. Таким образом, токсин может быть соединен с РАВС через линкер.

В определенных вариантах осуществления такой токсин может быть токсином, содержащим первичный или вторичный амин. В определенных вариантах осуществления такой токсин может быть MMAE или майтанзином.

В определенных вариантах осуществления линкер может иметь защищенную N-концевую область. В определенных вариантах осуществления N-концевая область может быть ацелирована. В определенных вариантах осуществления линкер представляет собой линкер, показанный на ФИГ.1 или ФИГ.8.

В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру RКАА-РАВС-MMAE. В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру RКАА-(PEG)_n-РАВС-MMAE, где n представляет собой целое число от 2 до 20. В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру RКАА-(PEG)₂-РАВС-MMAE. В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру RКАА-MMAE. В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру RКАА-Val-Cit-РАВС-MMAE. В определенных вариантах осуществления изобретения линкер может содержать дополнительный линкер между РАВС и MMAE. В определенных вариантах осуществления таким дополнительным линкером может быть p-нитрофенольная (PNP) группа.

Следует отметить, что линкер может содержать другие самоотщепляющиеся компоненты, кроме РАВС. То есть, линкер может иметь структуру RКАА-(самоотщепляющийся компонент)-токсин. Специалистам известны другие самоотщепляющиеся компоненты, которые могут быть использованы в рамках настоящего изобретения. Кроме того, специалистам известны токсины, которые могут быть соединены с самоотщепляющимся компонентом, опционально через дополнительный линкер.

В определенных вариантах осуществления такой токсин может быть токсином, содержащим гидроксильную группу, а линкер может содержать самоотщепляющуюся метил-аминную группу. То есть, линкер может иметь структуру RКАА-(NH)-(CH₃)-O-токсин. В определенных вариантах осуществления гидроксилсодержащий токсин может быть камптотецином, таким как эксатекан или производное эксатекана, в частности производное эксатекана Dxd, или антрациклином, таким как PNU-159682.

В определенных вариантах осуществления такой токсин может быть токсином, содержащим тиольную группу, а линкер может содержать самоотщепляющуюся метил-аминную группу. То есть, линкер может иметь структуру RCAA-(NH)-(CH₃)-S-токсин. В определенных вариантах осуществления тиол-содержащий токсин может быть майтанзиноидом, таким как DM1 или его тиол-содержащее производное.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором линкер содержит или состоит из структуры RKA-B или RKA-(молекула линкера)-B.

То есть, нагрузка B может быть соединена непосредственно с C-концом аланинового остатка или может быть соединена с C-концом аланинового остатка через молекулу линкера. Следует понимать, что выбор молекулы линкера в значительной степени зависит от функциональных групп, имеющих в нагрузке B. В настоящем документе раскрыты молекулы линкера, которые подходят для соединения нагрузок с различными функциональными группами с пептидом. Молекула линкера может быть расщепляемой или нерасщепляемой молекулой линкера. В частности, молекула линкера может содержать самоотщепляющийся компонент, в частности, любой из самоотщепляющихся компонентов, описанных в настоящем документе. Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором линкер содержит или состоит из структуры RKA-(самоотщепляющийся компонент)-B.

Как вариант, нагрузка может быть соединена с N-концом остатка аргинина либо напрямую, либо через молекулу линкера, например, через любую из молекул линкера, описанных в настоящем документе. То есть, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором линкер содержит или состоит из структуры B-RKA или B-(молекула линкера)-RKA. В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором линкер содержит или состоит из структуры B-(самоотщепляющийся компонент)-RKA. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент, входящий в структуру B-(самоотщепляющийся компонент)-RKA, может быть самоотщепляющимся компонентом, содержащим орто-

гидрокси-защищенный арилсульфатный (ОНPAS) компонент, описанный в настоящем документе.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором линкер имеет структуру RKA-PAVC-B, в частности, где B представляет собой ауристин или майтанзиноид, в частности, где ауристин представляет собой MMAE, а майтанзиноид представляет собой DM1 или майтанзин.

В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру RKA-PAVC-B. То есть, линкер может содержать линейный пептид RKA, в котором карбоксильная группа С-концевого остатка аланина соединена с аминогруппой, входящей в состав PAVC, посредством амидной связи. Токсин B может присоединяться к PAVC через образование карбамата. Следует понимать, что не все токсины содержат функциональные группы, позволяющие образовывать карбамат с PAVC. Таким образом, токсин может быть соединен с PAVC через линкер.

В определенных вариантах осуществления такой токсин может быть токсином, содержащим первичный или вторичный амин. В определенных вариантах осуществления такой токсин может быть MMAE или майтанзином.

В определенных вариантах осуществления линкер может иметь защищенную N-концевую область. В определенных вариантах осуществления N-концевая область может быть ацелирована. В определенных вариантах осуществления линкер представляет собой линкер, показанный на ФИГ.2.

В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру RKA-PAVC-MMAE. В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру RKA-(PEG)_n-PAVC-MMAE, где n представляет собой целое число от 2 до 20. В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру RKA-(PEG)₂-PAVC-MMAE. В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру RKA-MMAE. В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру RKA-Val-Cit-PAVC-MMAE. В определенных вариантах осуществления изобретения линкер может содержать дополнительный линкер между

РАВС и ММАЕ. В определенных вариантах осуществления таким дополнительным линкером может быть р-нитрофенольная (PNP) группа.

Следует отметить, что линкер может содержать другие самоотщепляющиеся компоненты, кроме РАВС. То есть, линкер может иметь структуру RKA-(самоотщепляющийся компонент)-токсин. Специалистам известны другие самоотщепляющиеся компоненты, которые могут быть использованы в рамках настоящего изобретения. Кроме того, специалистам известны токсины, которые могут быть соединены с самоотщепляющимся компонентом, опционально через дополнительный линкер.

В определенных вариантах осуществления такой токсин может быть токсином, содержащим гидроксильную группу, а линкер может содержать самоотщепляющуюся метил-аминную группу. То есть, линкер может иметь структуру RKA-(NH)-(CH₃)-O-токсин. В определенных вариантах осуществления гидроксилсодержащий токсин может быть камптотецином, таким как эксатекан или производное эксатекана, в частности производное эксатекана Dxd, или антрациклином, таким как PNU-159682.

В определенных вариантах осуществления такой токсин может быть токсином, содержащим тиольную группу, а линкер может содержать самоотщепляющуюся метил-аминную группу. То есть, линкер может иметь структуру RKA-(NH)-(CH₃)-S-токсин. В определенных вариантах осуществления тиол-содержащий токсин может быть майтанзиноидом, таким как DM1 или его тиол-содержащее производное.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором линкер содержит или состоит из структуры ARK-B или ARK-(молекула линкера)-B.

То есть, нагрузка B может быть соединена непосредственно с С-концом лизинового остатка или может быть соединена с С-концом лизинового остатка через молекулу линкера. Следует понимать, что выбор молекулы линкера в значительной степени зависит от функциональных групп, имеющих в нагрузке B. В настоящем документе раскрыты молекулы линкера, которые подходят для соединения нагрузок с различными функциональными группами с пептидом. Молекула линкера может быть расщепляемой или нерасщепляемой молекулой линкера. В частности, молекула

линкера может содержать самоотщепляющийся компонент, в частности, любой из самоотщепляющихся компонентов, описанных в настоящем документе. Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором линкер содержит или состоит из структуры ARK-(самоотщепляющийся компонент)-В.

Как вариант, нагрузка может быть соединена с N-концом остатка аргинина либо напрямую, либо через молекулу линкера, например, через любую из молекул линкера, описанных в настоящем документе. То есть, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором линкер содержит или состоит из структуры В-ARK или В-(молекула линкера)-ARK. В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором линкер содержит или состоит из структуры В-(самоотщепляющийся компонент)-ARK. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент, входящий в структуру В-(самоотщепляющийся компонент)-ARK, может быть самоотщепляющимся компонентом, содержащим орто-гидрокси-защищенный арилсульфатный (ОНPAS) компонент, описанный в настоящем документе.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором линкер имеет структуру ARK-PAVC-В, в частности, в котором В представляет собой ауристин или майтанзиноид, в частности, в котором ауристин представляет собой MMAE, а майтанзиноид представляет собой DM1 или майтанзин.

В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру ARK-PAVC-В. То есть, линкер может содержать линейный пептид ARK, в котором карбоксильная группа С-концевого лизинового остатка соединена с аминогруппой, входящей в состав PAVC, посредством амидной связи. Токсин В может присоединяться к PAVC через образование карбамата. Следует понимать, что не все токсины содержат функциональные группы, позволяющие образовывать карбамат с PAVC. Таким образом, токсин может быть соединен с PAVC через линкер.

В определенных вариантах осуществления такой токсин может быть токсином, содержащим первичный или вторичный амин. В определенных вариантах осуществления такой токсин может быть MMAE или майтанзином.

В определенных вариантах осуществления линкер может иметь защищенную N-концевую область. В определенных вариантах осуществления N-концевая область может быть ацелирована. В определенных вариантах осуществления линкер представляет собой линкер, показанный на ФИГ.3.

В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру ARK-PAVC-MMAE. В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру ARK-(PEG)_n-PAVC-MMAE, где n представляет собой целое число от 2 до 20. В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру ARK-(PEG)₂-PAVC-MMAE (см. ФИГ. 14). В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру ARK-MMAE. В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру ARK-Val-Cit-PAVC-MMAE. В определенных вариантах осуществления изобретения линкер может содержать дополнительный линкер между PAVC и MMAE. В определенных вариантах осуществления таким дополнительным линкером может быть p-нитрофенольная (PNP) группа.

Следует отметить, что линкер может содержать другие самоотщепляющиеся компоненты, кроме PAVC. То есть, линкер может иметь структуру ARK-(самоотщепляющийся компонент)-токсин. Специалистам известны другие самоотщепляющиеся компоненты, которые могут быть использованы в рамках настоящего изобретения. Кроме того, специалистам известны токсины, которые могут быть соединены с самоотщепляющимся компонентом, опционально через дополнительный линкер.

В определенных вариантах осуществления такой токсин может быть токсином, содержащим гидроксильную группу, а линкер может содержать самоотщепляющуюся метил-аминную группу. То есть, линкер может иметь структуру ARK-(NH)-(CH₃)-O-токсин. В определенных вариантах осуществления гидроксилсодержащий токсин

может быть камптотецином, таким как эксатекан или производное эксатекана, в частности производное эксатекана Dxd, или антрациклином, таким как PNU-159682.

В определенных вариантах осуществления такой токсин может быть токсином, содержащим тиольную группу, а линкер может содержать самоотщепляющуюся метил-аминную группу. То есть, линкер может иметь структуру $ARK-(NH)-(CH_3)-S-$ токсин (аналогично ФИГ.15). В определенных вариантах осуществления тиол-содержащий токсин может быть майтанзиноидом, таким как DM1 или его тиол-содержащее производное.

В определенных вариантах осуществления линкер представляет собой линкер, показанный на ФИГ. 14 или ФИГ.15

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором линкер содержит или состоит из структуры RKR-B или RKR-(молекула линкера)-B.

То есть, нагрузка B может быть соединена непосредственно с C-концом остатка аргинина или может быть соединена с C-концом остатка аргинина через молекулу линкера. Следует понимать, что выбор молекулы линкера в значительной степени зависит от функциональных групп, имеющих в нагрузке B. В настоящем документе раскрыты молекулы линкера, которые подходят для соединения нагрузок с различными функциональными группами с пептидом. Молекула линкера может быть расщепляемой или нерасщепляемой молекулой линкера. В частности, молекула линкера может содержать самоотщепляющийся компонент, в частности, любой из самоотщепляющихся компонентов, описанных в настоящем документе. Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство на настоящему изобретению, в котором линкер содержит или состоит из структуры RKR-(самоотщепляющийся компонент)-B.

Как вариант, нагрузка может быть соединена с N-концом остатка аргинина либо напрямую, либо через молекулу линкера, например, через любую из молекул линкера, описанных в настоящем документе. То есть, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором линкер содержит или состоит из структуры B-RKR или B-

(молекула линкера)-RKR. В определенных вариантах осуществления линкер может быть линкером дикарбоновой кислоты (см. ФИГ.9). В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором линкер содержит или состоит из структуры В-(самоотщепляющийся компонент)-RKR. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент, входящий в структуру В-(самоотщепляющийся компонент)-RKR, может быть самоотщепляющимся компонентом, содержащим орто-гидрокси-защищенный арилсульфатный (ОНPAS) компонент, описанный в настоящем документе.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором линкер имеет структуру RKR-PAVC-B, в частности, где В представляет собой ауристин или майтанзиноид, в частности, где ауристин представляет собой MMAE, а майтанзиноид представляет собой DM1 или майтанзин.

В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру RKR-PAVC-B. То есть, линкер может содержать линейный пептид RKR, в котором карбоксильная группа С-концевого остатка аргинина соединена с аминогруппой, входящей в состав PAVC, посредством амидной связи. Токсин В может присоединяться к PAVC через образование карбамата. Следует понимать, что не все токсины содержат функциональные группы, позволяющие образовывать карбамат с PAVC. Таким образом, токсин может быть соединен с PAVC через линкер.

В определенных вариантах осуществления такой токсин может быть токсином, содержащим первичный или вторичный амин. В определенных вариантах осуществления такой токсин может быть MMAE или майтанзином.

В определенных вариантах осуществления линкер может иметь защищенную N-концевую область. В определенных вариантах осуществления N-концевая область может быть ацетилирована.

В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру RKR-PAVC-MMAE. В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру RKR-(PEG)_n-PAVC-MMAE, где n представляет собой целое число от 2 до

20. В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру RKR-(PEG)₂-PABC-MMAE. В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру RKR-MMAE. В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру RKR-Val-Cit-PABC-MMAE. В определенных вариантах осуществления изобретения линкер может содержать дополнительный линкер между PABC и MMAE. В определенных вариантах осуществления таким дополнительным линкером может быть р-нитрофенольная (PNP) группа.

Следует отметить, что линкер может содержать другие самоотщепляющиеся компоненты, кроме PABC. То есть, линкер может иметь структуру RKR-(самоотщепляющийся компонент)-токсин. Специалистам известны другие самоотщепляющиеся компоненты, которые могут быть использованы в рамках настоящего изобретения. Кроме того, специалистам известны токсины, которые могут быть соединены с самоотщепляющимся компонентом, опционально через дополнительный линкер.

В определенных вариантах осуществления такой токсин может быть токсином, содержащим гидроксильную группу, а линкер может содержать самоотщепляющуюся метил-аминную группу. То есть, линкер может иметь структуру RKR-(NH)-(CH₃)-O-токсин. В определенных вариантах осуществления гидроксилсодержащий токсин может быть камптотецином, таким как эксатекан или производное эксатекана, в частности производное эксатекана Dxd, или антрациклином, таким как PNU-159682.

В определенных вариантах осуществления такой токсин может быть токсином, содержащим тиольную группу, а линкер может содержать самоотщепляющуюся метил-аминную группу. То есть, линкер может иметь структуру RKR-(NH)-(CH₃)-S-токсин (аналогично ФИГ.15). В определенных вариантах осуществления тиолсодержащий токсин может быть майтанзиноидом, таким как DM1 или его тиолсодержащее производное.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором линкер содержит или состоит из структуры RK-Val-Cit-B или RK-Val-Cit-(молекула линкера)-B.

То есть, нагрузка В может быть соединена непосредственно с С-концом остатка цитруллина или может быть соединена с С-концом остатка цитруллина через молекулу линкера. Следует понимать, что выбор молекулы линкера в значительной степени зависит от функциональных групп, имеющихся в нагрузке В. В настоящем документе раскрыты молекулы линкера, которые подходят для соединения нагрузок с различными функциональными группами с пептидом. Молекула линкера может быть расщепляемой или нерасщепляемой молекулой линкера. В частности, молекула линкера может содержать самоотщепляющийся компонент, в частности, любой из самоотщепляющихся компонентов, описанных в настоящем документе. Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором линкер содержит или состоит из структуры RK-Val-Cit-(самоотщепляющийся компонент)-В.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором линкер имеет структуру RK-Val-Cit-РАВС-В, в частности, где В представляет собой ауристин или майтанзиноид, в частности, где ауристин представляет собой MMAE, а майтанзиноид представляет собой DM1 или майтанзин.

В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру RK-Val-Cit-РАВС-В. То есть, линкер может содержать линейный пептид RK-Val-Cit, в котором карбоксильная группа С-концевого остатка цитруллина соединена с аминогруппой, входящей в состав РАВС, посредством амидной связи. Токсин В может присоединяться к РАВС через образование карбамата. Следует понимать, что не все токсины содержат функциональные группы, позволяющие образовывать карбамат с РАВС. Таким образом, токсин может быть соединен с РАВС через линкер.

В определенных вариантах осуществления такой токсин может быть токсином, содержащим первичный или вторичный амин. В определенных вариантах осуществления такой токсин может быть MMAE или майтанзином.

В определенных вариантах осуществления линкер может иметь защищенную N-концевую область. В определенных вариантах осуществления N-концевая область может быть ацетилирована.

В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру RK-Val-Cit-PAVC-MMAE. В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру RK-(PEG)_n-Val-Cit-PAVC-MMAE, где n представляет собой целое число от 2 до 20. В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру RK-(PEG)₂-Val-Cit-PAVC-MMAE. В определенных вариантах осуществления линкер может иметь структуру RK-Val-Cit-MMAE. В определенных вариантах осуществления изобретения линкер может содержать дополнительный линкер между PAVC и MMAE. В определенных вариантах осуществления таким дополнительным линкером может быть p-нитрофенольная (PNP) группа.

Следует отметить, что линкер может содержать другие самоотщепляющиеся компоненты, кроме PAVC. То есть, линкер может иметь структуру RK-Val-Cit-(самоотщепляющийся компонент)-токсин. Специалистам известны другие самоотщепляющиеся компоненты, которые могут быть использованы в рамках настоящего изобретения. Кроме того, специалистам известны токсины, которые могут быть соединены с самоотщепляющимся компонентом, опционально через дополнительный линкер.

В определенных вариантах осуществления такой токсин может быть токсином, содержащим гидроксильную группу, а линкер может содержать самоотщепляющуюся метил-аминную группу. То есть, линкер может иметь структуру RK-Val-Cit-(NH)-(CH₃)-O-токсин. В определенных вариантах осуществления гидроксилсодержащий токсин может быть камптотецином, таким как эксатекан или производное эксатекана, в частности производное эксатекана Dxd, или антрациклином, таким как PNU-159682.

В определенных вариантах осуществления такой токсин может быть токсином, содержащим тиольную группу, а линкер может содержать самоотщепляющуюся метил-аминную группу. То есть, линкер может иметь структуру RK-Val-Cit-(NH)-(CH₃)-S-токсин. В определенных вариантах осуществления тиол-содержащий токсин может быть майтанзиноидом, таким как DM1 или его тиол-содержащее производное.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер или конъюгату антитело-лекарственное средство, содержащему антитело Полатузумаб или, как вариант, антитело против CD79b.

То есть, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер, содержащему:

а) Полатузумаб или антитело против CD79b; и

б) линкер, содержащий структуру:

- (Sp1)-RK-(Sp2)-B-(Sp3) или
- (Sp1)-B-(Sp2)-RK-(Sp3); при этом
- (Sp1) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp2) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp3) является химическим спейсером или отсутствует;
- R представляет собой аргинин, или производное аргинина, или миметик аргинина;
- K представляет собой лизин, или производное лизина, или миметик лизина;
- B представляет собой связующий компонент или нагрузку;

при этом линкер конъюгирован с Полатузумабом или антителом против CD79b посредством изопептидной связи, образованной между γ -карбоксамидной группой глутаминового остатка, входящего в состав Полатузумаба или антитела против CD79b, и первичным амином, входящим в состав боковой цепи лизинового остатка, производного лизина или миметика лизина, входящего в состав мотива RK, входящего в состав линкера.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-нагрузка, содержащему Полатузумаб или антитело против CD79b, в котором линкер представляет собой любой из линкеров, показанных на ФИГ.1, ФИГ.2, ФИГ.3, ФИГ.8, ФИГ.9, ФИГ.14, ФИГ.15, ФИГ.17, ФИГ.18, ФИГ.19, ФИГ.20, ФИГ.21, ФИГ.22, ФИГ.23, ФИГ.24, ФИГ.25, ФИГ.26, ФИГ.27, ФИГ.28, ФИГ.29, ФИГ.30, ФИГ.31, ФИГ.32, ФИГ.33 или ФИГ.34.

Полатузумаб коммерчески доступен в виде конъюгата антитело-лекарство Полатузумаб ведотин и продается под названием Polivy. Полатузумаб ведотин содержит антитело против CD79b Полатузумаб и линкер малеимидокапроил-L-валин-

L-цитруллин-РАВС-ММАЕ (mc-vc-РАВС-ММАЕ), который обычно известен как ведотин. Линкер mc-vc-РАВС-ММАЕ Полатузумаб-ведотина конъюгирован со свободными остатками цистеина, входящими в состав антитела. Антитело Полатузумаб описано в документе WO 2009/012268, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Кроме того, модифицированные цистеином варианты Полатузумаба были описаны в документе WO 2009/099728, полное содержание которого также включено в настоящий документ посредством ссылки.

Изобретателями было показано, что конъюгат Полатузумаб, содержащий линкер по настоящему изобретению, имеет более длительный период полураспада в плазме по сравнению с коммерчески доступным конъюгатом Полатузумаб ведотин. Таким образом, конъюгаты антитело-линкер, которые были конъюгированы с линкером по настоящему изобретению с помощью микробной трансклутаминазы, более стабильны, чем антитела, которые были получены с помощью других способов, например, путем конъюгации малеимид-содержащих линкеров с цистеиновыми остатками антитела. Таким образом, конъюгаты антитело-линкер по настоящему изобретению с большей вероятностью достигнут целевой клетки или ткани без преждевременной потери нагрузки.

В определенных вариантах осуществления антитело представляет собой Полатузумаб, содержащий тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO:5, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO:6. Однако изобретение также охватывает варианты Полатузумаба, в которых тяжелая и/или легкая цепь имеют, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:5 и/или SEQ ID NO:6, соответственно. В частности, антитело может включать любой из вариантов последовательности, описанных в WO 2009/012268 или WO 2009/099728.

В данном случае предпочтительно, чтобы Полатузумаб или антитело против CD79b присутствовали в конъюгате антитело-линкер в гликозилированной форме. То есть, Полатузумаб, или антитело против CD79b, предпочтительно, гликозилированы на остатке N297 (нумерация EU). Однако Полатузумаб, или антитело против CD79b, также могут быть дегликозилированными, как описано в настоящем документе.

Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с любым из линкеров, описанных в настоящем документе, в частности, для способа по настоящему изобретению. Предпочтительно, линкер конъюгирован катализируемым МТГ образом с глутаминовым остатком Q295 (нумерация EU) антитела. Однако линкер также может быть конъюгирован с модифицированным остатком глутамина, таким как N297Q (нумерация EU), и/или с любой из меток, содержащих глутамин, которые были описаны в настоящем документе.

Линкер, конъюгированный с Полатузумабом, или антителом против CD79b, может содержать один связующий компонент или нагрузку В или может содержать несколько связующих компонентов и/или нагрузок В₁, В₂ и так далее.

То есть, в определенных вариантах осуществления линкер, входящий в состав конъюгата Полатузумаб-линкер, может содержать один или несколько связующих компонентов В. Такие конъюгаты Полатузумаб-линкер могут быть впоследствии функционализированы подходящей нагрузкой в двухэтапном процессе, описанном в настоящем документе.

В определенных вариантах осуществления линкер, входящий в состав конъюгата Полатузумаб-нагрузка, может содержать одну или несколько нагрузок В. Такие конъюгаты Полатузумаб-нагрузка могут быть получены в ходе двухэтапного процесса, при этом линкер, содержащий связующий компонент, конъюгируется с Полатузумабом на первом этапе, а нагрузка связывается со связующим компонентом на втором этапе. Как вариант, конъюгаты Полатузумаб-нагрузка могут быть получены в одноэтапном процессе, в котором линкер, содержащий нагрузку, непосредственно конъюгируется с Полатузумабом.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, содержащему Полатузумаб или антитело против CD79b. То есть линкер, входящий в состав конъюгата антитело-лекарственное средство, может содержать один или несколько токсинов, как описано в настоящем документе.

В определенных вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий Полатузумаб, или антитело против CD79b, может содержать

линкер, включающий аминокислотную последовательность RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2), ARK (SEQ ID NO:3), RKR (SEQ ID NO:4) или RK-Val-Cit (SEQ ID NO:54).

То есть, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, содержащему:

а) Полатузумаб или антитело против CD79b; и

б) линкер, содержащий лекарственное соединение В, при этом лекарственное соединение В ковалентно связано с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2), ARK (SEQ ID NO:3), RKR (SEQ ID NO:4) или RK-Val-Cit (SEQ ID NO:54);

при этом линкер конъюгирован с Полатузумабом или антителом против CD79b посредством изопептидной связи, образованной между γ -карбоксамидной группой остатка глутамина CD79b (нумерация EU) домена C_H2 антитела и первичным амином, входящим в боковую цепь лизинового остатка, входящего в состав линкера.

Предпочтительно антитело представляет собой Полатузумаб, включающий тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO:5, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO:6. Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором антитело IgG представляет собой Полатузумаб или антитело, включающее тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO:5, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO:6.

В определенных вариантах осуществления линкер, конъюгированный с Полатузумабом или антителом против CD79b, может содержать структуру RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2), ARK (SEQ ID NO:3), RKR (SEQ ID NO:4) или RK-Val-Cit (SEQ ID NO:54). В определенных вариантах осуществления линкер, содержащий структуру RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2), ARK (SEQ ID NO:3), RKR (SEQ ID NO:4) или RK-Val-Cit (SEQ ID NO:54), может быть конъюгирован с остатком Q295 Полатузумаба или антителом против CD79b через первичный амин, входящий в состав остатка К.

В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-В, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-(самоотщепляющийся компонент)-В, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к С-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может представлять собой РАВС или метил-амин-содержащую группу.

В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-РАВС-В. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-РАВС-ММАЕ (см. ФИГ.1). В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-РАВС-майтанин (см. ФИГ.8). В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-ММАЕ. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-РАВС-PNP-ММАЕ. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-(NH)-(CH₃)-O-В, где O представляет собой атом кислорода эфирной связи, а В представляет собой гидроксилсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-(NH)-(CH₃)-O-камптотецин. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-(NH)-(CH₃)-S-В, где S представляет собой атом серы тиоэфирной связи, а В представляет собой тиолсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-(NH)-(CH₃)-S-DM1.

В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером В-РКАА, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером В-(самоотщепляющийся компонент)-РКАА, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к N-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может быть самоотщепляющимся компонентом, содержащим орто-гидрокси-защищенный арилсульфатный (ОНРАС) компонент. В определенных вариантах осуществления амин, содержащий нагрузку В, может быть соединен с N-концевым компонентом аргинина через линкер дикарбоновой кислоты, аналогично ФИГ.9.

В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером РКА-В, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером РКА-(самоотщепляющийся компонент)-В, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к С-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может представлять собой РАВС или метил-амин-содержащую группу.

В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером РКА-РАВС-В. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером РКА-РАВС-ММАЕ (см. ФИГ.2). В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером РКА-РАВС-майтанин. В определенных вариантах

осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RKA-MMAE. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RKA-PAVC-PNP-MMAE. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RKA-(NH)-(CH₃)-O-B, где O представляет собой атом кислорода эфирной связи, а B представляет собой гидроксилсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RKA-(NH)-(CH₃)-O-камптотecin. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RKA-(NH)-(CH₃)-S-B, где S представляет собой атом серы тиоэфирной связи, а B представляет собой тиолсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RKA-(NH)-(CH₃)-S-DM1.

В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером B-RKA, описанном в настоящем документе, причем B предпочтительно представляет собой токсин. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером B-(самоотщепляющийся компонент)-RKA, описанном в настоящем документе, причем B предпочтительно представляет собой токсин. Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к N-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может быть самоотщепляющимся компонентом, содержащим орто-гидрокси-защищенный арилсульфатный (ONPAS) компонент. В определенных вариантах осуществления амин, содержащий нагрузку B, может быть соединен с N-концевым компонентом аргинина через линкер дикарбоновой кислоты, аналогично ФИГ.9.

В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером ARK-B, описанном в настоящем документе, причем B предпочтительно представляет собой токсин. В определенных вариантах

осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером ARK-(самоотщепляющийся компонент)-В, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к С-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может представлять собой PABC или метил-амин-содержащую группу.

В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером ARK-PABC-В. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером ARK-PABC-MMAE (см. ФИГ.3). В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером ARK-PABC-майтанин. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером ARK-MMAE. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером ARK-PABC-PNP-MMAE. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером ARK-(NH)-(CH₃)-O-В, где O представляет собой атом кислорода эфирной связи, а В представляет собой гидроксилсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером ARK-(NH)-(CH₃)-O-камптотecin. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером ARK-(NH)-(CH₃)-S-В, где S представляет собой атом серы тиоэфирной связи, а В представляет собой тиолсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером ARK-(NH)-(CH₃)-S-DM1.

В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером В-ARK, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. В определенных вариантах

осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером В-(самоотщепляющийся компонент)-ARK, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к N-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может быть самоотщепляющимся компонентом, содержащим орто-гидрокси-защищенный арилсульфатный (OHPAS) компонент.

В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RKR-B, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RKR-(самоотщепляющийся компонент)-B, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к C-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может представлять собой PABC или метил-амин-содержащую группу.

В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RKR-PABC-B. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RKR-PABC-MMAE. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RKR-PABC-майтанин. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RKR-MMAE. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RKR-PABC-PNP-MMAE. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RKR-(NH)-

(CH₃)-O-B, где O представляет собой атом кислорода эфирной связи, а B представляет собой гидроксилсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RKR-(NH)-(CH₃)-O-камптотecin. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RKR-(NH)-(CH₃)-S-B, где S представляет собой атом серы тиоэфирной связи, а B представляет собой тиолсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RKR-(NH)-(CH₃)-S-DM1.

В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером B-RKR, описанном в настоящем документе, причем B предпочтительно представляет собой токсин. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером B-(самоотщепляющийся компонент)-RKR, описанном в настоящем документе, причем B предпочтительно представляет собой токсин. Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к N-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может быть самоотщепляющимся компонентом, содержащим орто-гидрокси-защищенный арилсульфатный (ONPAS) компонент. В определенных вариантах осуществления амин, содержащий нагрузку B, может быть соединен с N-концевым компонентом аргинина через линкер дикарбоновой кислоты, что показано на ФИГ.9.

В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-B, описанном в настоящем документе, причем B предпочтительно представляет собой токсин. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-(самоотщепляющийся компонент)-B, описанном в настоящем документе, причем B предпочтительно представляет собой токсин. Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе,

который подходит для присоединения нагрузки к С-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может представлять собой PABC или метил-амин-содержащую группу.

В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-PABC-B. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-PABC-MMAE. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-PABC-майтанин. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-MMAE. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-PABC-PNP-MMAE. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-(NH)-(CH₃)-O-B, где O представляет собой атом кислорода эфирной связи, а B представляет собой гидроксилсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-(NH)-(CH₃)-O-камптотецин. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-(NH)-(CH₃)-S-B, где S представляет собой атом серы тиоэфирной связи, а B представляет собой тиолсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Полатузумаб, или антитело против CD79b, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-(NH)-(CH₃)-S-DM1.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер или конъюгату антитело-лекарственное средство, содержащему антитело Трастузумаб или, как вариант, антитело к HER2/neu.

То есть, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер, содержащему:

а) Трастузумаб или антитело к HER2/neu; и

b) линкер, содержащий структуру:

- (Sp1)-RK-(Sp2)-B-(Sp3) или
- (Sp1)-B-(Sp2)-RK-(Sp3); при этом
- (Sp1) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp2) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp3) является химическим спейсером или отсутствует;
- R представляет собой аргинин, или производное аргинина, или миметик аргинина;
- K представляет собой лизин, или производное лизина, или миметик лизина;
- B представляет собой связующий компонент или нагрузку;

при этом линкер конъюгирован с Трастузумабом, или антителом к HER2/neu, посредством изопептидной связи, образованной между γ -карбоксамидной группой глутаминового остатка, входящего в состав Трастузумаба или антитела к HER2/neu, и первичным амином, входящим в состав боковой цепи лизинового остатка, производного лизина или миметика лизина, входящего в состав мотива RK, входящего в состав линкера.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-нагрузка, содержащему Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, в котором линкер представляет собой любой из линкеров, показанных на ФИГ.1, ФИГ.2, ФИГ.3, ФИГ.8, ФИГ.9, ФИГ.14, ФИГ.15, ФИГ.17, ФИГ.18, ФИГ.19, ФИГ.20, ФИГ.21, ФИГ.22, ФИГ.23, ФИГ.24, ФИГ.25, ФИГ.26, ФИГ.27, ФИГ.28, ФИГ.29, ФИГ.30, ФИГ.31, ФИГ.32, ФИГ.33 или ФИГ.34.

Трастузумаб коммерчески доступен в виде конъюгата антитело-лекарственное средство Трастузумаб эмтазин и продается под названием Kadcyra. Трастузумаб эмтазин содержит антитело к HER2/neu Трастузумаб и токсин DM1, который соединен с Трастузумабом через линкер N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (SMCC). Конструкция линкер-DM1 может быть конъюгирована с восемью различными остатками лизина, входящими в состав антитела, что позволяет получать антитела с различным соотношением лекарственное

средство/антитело. Предпочтительно, Трастузумаб включает тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO:7, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO:8. Однако изобретение также охватывает варианты Трастузумаба, в которых тяжелая и/или легкая цепь имеют, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:7 и/или SEQ ID NO:8, соответственно. В определенных вариантах осуществления антитело может быть антителом к HER2/neu, например, описанном, помимо прочего, в документах WO 1998/006692, WO 1999/905536, WO 2003/087131, полное содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки.

В данном случае предпочтительно, чтобы Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, присутствовали в конъюгате антитело-линкер в гликозилированной форме. То есть, Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, предпочтительно, гликозилированы на остатке N297 (нумерация EU). Однако Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, также могут быть дегликозилированными, как описано в настоящем документе.

Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с любым из линкеров, описанных в настоящем документе, в частности, для способа по настоящему изобретению. Предпочтительно, линкер конъюгирован катализируемым МТГ образом с глутаминовым остатком Q295 (нумерация EU) антитела. Однако линкер также может быть конъюгирован с модифицированным остатком глутамина, таким как N297Q (нумерация EU), и/или с любой из меток, содержащих глутамин, которые были описаны в настоящем документе.

Линкер, конъюгированный с Трастузумабом, или антителом к HER2/neu, может содержать один связующий компонент или нагрузку В или может содержать несколько связующих компонентов и/или нагрузок В₁, В₂ и так далее.

То есть, в определенных вариантах осуществления линкер, входящий в состав конъюгата Трастузумаб-линкер, может содержать один или несколько связующих компонентов В. Такие конъюгаты Трастузумаб-линкер могут быть впоследствии функционализированы подходящей нагрузкой в двухэтапном процессе, описанном в настоящем документе.

В определенных вариантах осуществления линкер, входящий в состав конъюгата Трастузумаб-нагрузка, может содержать одну или несколько нагрузок В. Такие конъюгаты Трастузумаб-нагрузка могут быть получены в ходе двухэтапного процесса, при этом линкер, содержащий связующий компонент, конъюгируется с Трастузумабом на первом этапе, а нагрузка связывается со связующим компонентом на втором этапе. Как вариант, конъюгаты Трастузумаб-нагрузка могут быть получены в одноэтапном процессе, в котором линкер, содержащий нагрузку, непосредственно конъюгируется с Трастузумабом.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, содержащему Трастузумаб, или антитело к HER2/neu. То есть линкер, входящий в состав конъюгата антитело-лекарственное средство, может содержать один или несколько токсинов, как описано в настоящем документе.

В определенных вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, может содержать линкер, включающий аминокислотную последовательность RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2), ARK (SEQ ID NO:3), RKR (SEQ ID NO:4) или RK-Val-Cit (SEQ ID NO:54).

То есть, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, содержащему:

- a) Трастузумаб или антитело к HER2/neu; и
- b) линкер, содержащий лекарственное соединение В, при этом лекарственное соединение В ковалентно связано с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2), ARK (SEQ ID NO:3), RKR (SEQ ID NO:4) или RK-Val-Cit (SEQ ID NO:54);

при этом линкер конъюгирован с Трастузумабом, или антителом к HER2/neu, посредством изопептидной связи, образованной между γ -карбоксамидной группой остатка глутамина CD79b (нумерация EU) домена C_H2 антитела и первичным амином, входящим в боковую цепь лизинового остатка, входящего в состав линкера.

Предпочтительно антитело представляет собой Трастузумаб, включающий тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO:7, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO:8. Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором антитело IgG представляет собой Трастузумаб или антитело, включающее тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO:7, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO:8.

В определенных вариантах осуществления линкер, конъюгированный с Трастузумабом, или антителом к HER2/neu, может содержать структуру RКАА (SEQ ID NO:1), RКА (SEQ ID NO:2), АRК (SEQ ID NO:3), RКR (SEQ ID NO:4) или RК-Val-Cit (SEQ ID NO:54). В определенных вариантах осуществления линкер, содержащий структуру RКАА (SEQ ID NO:1), RКА (SEQ ID NO:2), АRК (SEQ ID NO:3), RКR (SEQ ID NO:4) или RК-Val-Cit (SEQ ID NO:54), может быть конъюгирован с остатком Q295 Трастузумаба, или антитела против HER2/neu, через первичный амин, входящий в состав остатка К.

В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-В, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-(самоотщепляющийся компонент)-В, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к С-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может представлять собой РАВС или метил-амин-содержащую группу.

В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-РАВС-В. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-РАВС-ММАЕ (см. ФИГ.1). В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-РАВС-майтанин (см. ФИГ.8). В определенных вариантах

осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-ММАЕ. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-РАВС-PNP-ММАЕ. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-(NH)-(CH₃)-O-B, где O представляет собой атом кислорода эфирной связи, а B представляет собой гидроксилсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-(NH)-(CH₃)-O-камптотедин. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-(NH)-(CH₃)-S-B, где S представляет собой атом серы тиоэфирной связи, а B представляет собой тиолсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-(NH)-(CH₃)-S-DM1.

В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером В-RКАА, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером В-(самоотщепляющийся компонент)-RКАА, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к N-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может быть самоотщепляющимся компонентом, содержащим орто-гидрокси-защищенный арилсульфатный (ОНРАS) компонент. В определенных вариантах осуществления амин, содержащий нагрузку В, может быть соединен с N-концевым компонентом аргинина через линкер дикарбоновой кислоты, аналогично ФИГ.9.

В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RКА-B, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. В определенных вариантах

осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RKA-(самоотщепляющийся компонент)-В, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к С-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может представлять собой РАВС или метил-амин-содержащую группу.

В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RKA-РАВС-В. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RKA-РАВС-ММАЕ (см. ФИГ.2). В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RKA-РАВС-майтганзин. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RKA-ММАЕ. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RKA-РАВС-PNP-ММАЕ. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RKA-(NH)-(CH₃)-O-В, где О представляет собой атом кислорода эфирной связи, а В представляет собой гидроксилсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RKA-(NH)-(CH₃)-O-камптотecin. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RKA-(NH)-(CH₃)-S-В, где S представляет собой атом серы тиоэфирной связи, а В представляет собой тиолсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RKA-(NH)-(CH₃)-S-DM1.

В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером В-RKA, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с

линкером В-(самоотщепляющийся компонент)-RKA, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к N-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может быть самоотщепляющимся компонентом, содержащим орто-гидрокси-защищенный арилсульфатный (ONPAS) компонент. В определенных вариантах осуществления амин, содержащий нагрузку В, может быть соединен с N-концевым компонентом аргинина через линкер дикарбоновой кислоты, аналогично ФИГ.9.

В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером ARK-B, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером ARK-(самоотщепляющийся компонент)-B, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к C-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может представлять собой PABC или метил-амин-содержащую группу.

В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером ARK-PABC-B. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером ARK-PABC-MMAE (см. ФИГ.3). В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером ARK-PABC-майтанин. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером ARK-MMAE. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером ARK-PABC-PNP-MMAE. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть

конъюгированы с линкером ARK-(NH)-(CH₃)-O-B, где O представляет собой атом кислорода эфирной связи, а B представляет собой гидроксилсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером ARK-(NH)-(CH₃)-O-камптотецин. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером ARK-(NH)-(CH₃)-S-B, где S представляет собой атом серы тиоэфирной связи, а S представляет собой гидроксилсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером ARK-(NH)-(CH₃)-S-DM1.

В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером B-ARK, описанном в настоящем документе, причем B предпочтительно представляет собой токсин. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером B-(самоотщепляющийся компонент)-ARK, описанном в настоящем документе, причем B предпочтительно представляет собой токсин. Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к N-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может быть самоотщепляющимся компонентом, содержащим орто-гидрокси-защищенный арилсульфатный (ONPAS) компонент.

В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RKR-B, описанном в настоящем документе, причем B предпочтительно представляет собой токсин. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RKR-(самоотщепляющийся компонент)-B, описанном в настоящем документе, причем B предпочтительно представляет собой токсин. Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к C-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может представлять собой

РАВС или метил-амин-содержащую группу.

В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RKR-РАВС-В. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RKR-РАВС-ММАЕ. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RKR-РАВС-майтанин. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RKR-ММАЕ. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RKR-РАВС-PNP-ММАЕ. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RKR-(NH)-(CH₃)-O-В, где O представляет собой атом кислорода эфирной связи, а В представляет собой гидроксилсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RKR-(NH)-(CH₃)-O-камптотецин. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RKR-(NH)-(CH₃)-S-В, где S представляет собой атом серы тиоэфирной связи, а S представляет собой тиолсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RKR-(NH)-(CH₃)-S-DM1.

В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером В-RKR, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером В-(самоотщепляющийся компонент)-RKR, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к N-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может быть самоотщепляющимся компонентом, содержащим орто-гидрокси-защищенный

арилсульфатный (ONPAS) компонент. В определенных вариантах осуществления амин, содержащий нагрузку В, может быть соединен с N-концевым компонентом аргинина через линкер дикарбоновой кислоты, что показано на ФИГ.9.

В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-B, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-(самоотщепляющийся компонент)-B, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к С-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может представлять собой PABC или метил-амин-содержащую группу.

В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-PABC-B. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-PABC-MMAE. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-PABC-майтанин. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-MMAE. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-PABC-PNP-MMAE. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-(NH)-(CH₃)-O-B, где O представляет собой атом кислорода эфирной связи, а В представляет собой гидроксилсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-(NH)-(CH₃)-O-камптотecin. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/neu, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-(NH)-(CH₃)-S-B, где S представляет собой атом серы тиоэфирной связи, а В

представляет собой тиолсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Трастузумаб, или антитело к HER2/неи, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-(NH)-(CH₃)-S-DM1.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер или конъюгату антитело-лекарственное средство, содержащему антитело Энфортумаб или, как вариант, антитело против Нектина-4.

То есть, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер, содержащему:

a) Энфортумаб или антитело против Нектина-4; и

b) линкер, содержащий структуру:

- (Sp1)-RK-(Sp2)-B-(Sp3) или
- (Sp1)-B-(Sp2)-RK-(Sp3); при этом
- (Sp1) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp2) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp3) является химическим спейсером или отсутствует;
- R представляет собой аргинин, или производное аргинина, или миметик аргинина;
- K представляет собой лизин, или производное лизина, или миметик лизина;
- B представляет собой связующий компонент или нагрузку;

при этом линкер конъюгирован с Энфортумабом, или антителом против Нектина-4, посредством изопептидной связи, образованной между γ -карбоксамидной группой глутаминового остатка, входящего в состав Энфортумаба, или антитела против Нектина-4, и первичным амином, входящим в состав боковой цепи лизинового остатка, производного лизина или миметика лизина, входящего в состав мотива RK, входящего в состав линкера.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-нагрузка, содержащему Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, в котором линкер представляет собой любой из линкеров, показанных на ФИГ.1, ФИГ.2, ФИГ.3,

ФИГ.8, ФИГ.9, ФИГ.14, ФИГ.15, ФИГ.17, ФИГ.18, ФИГ.19, ФИГ.20, ФИГ.21, ФИГ.22, ФИГ.23, ФИГ.24, ФИГ.25, ФИГ.26, ФИГ.27, ФИГ.28, ФИГ.29, ФИГ.30, ФИГ.31, ФИГ.32, ФИГ.33 или ФИГ.34.

Энфортумаб коммерчески доступен в виде конъюгата антитело-лекарственное средство Энфортумаб ведотин и продается под названием Padcev. Энфортумаб ведотин содержит антитело против Нектина-4 Энфортумаб и линкер малеимидакапроил-L-валин-L-цитруллин-РАВС-ММАЕ (mc-vc-РАВС-ММАЕ), который обычно известен как ведотин. Линкер mc-vc-РАВС-ММАЕ Энфортумаб ведотина конъюгирован со свободными остатками цистеина, входящими в состав антитела. Антитело Энфортумаб описано в документе WO 2012/047724, полное содержание которого включено в настоящий документ посредством ссылки.

В определенных вариантах осуществления антитело представляет собой 2012/047724, содержащий тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO:9, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO:10. Однако изобретение также охватывает варианты Энфортумаба, в которых тяжелая и/или легкая цепь имеют, по меньшей мере, 80%, по меньшей мере, 85%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95% идентичности последовательности с SEQ ID NO:9 и/или SEQ ID NO:10, соответственно. В частности, антитело может включать любой из вариантов последовательности, описанных в WO 2012/047724. В определенных вариантах осуществления легкая цепь Энфортумаба может включать мутацию в остатке Q55 из SEQ ID NO:10. В частности, мутация представляет собой Q55N (SEQ ID NO:11).

В данном случае предпочтительно, чтобы Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, присутствовали в конъюгате антитело-линкер в гликозилированной форме. То есть, Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, предпочтительно, гликозилированы на остатке N297 (нумерация EU). Однако Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, также могут быть дегликозилированными, как описано в настоящем документе.

Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с любым из линкеров, описанных в настоящем документе, в частности, для способа по настоящему изобретению. Предпочтительно, линкер конъюгирован катализируемым

МТГ образом с глутаминовым остатком Q295 (нумерация EU) антитела. Однако линкер также может быть конъюгирован с модифицированным остатком глутамина, таким как N297Q (нумерация EU), и/или с любой из меток, содержащих глутамин, которые были описаны в настоящем документе.

Линкер, конъюгированный с Энфортумабом, или антителом против Нектина-4, может содержать один связующий компонент или нагрузку В или может содержать несколько связующих компонентов и/или нагрузок В₁, В₂ и так далее.

То есть, в определенных вариантах осуществления линкер, входящий в состав конъюгата Энфортумаб-линкер, может содержать один или несколько связующих компонентов В. Такие конъюгаты Энфортумаб-линкер могут быть впоследствии функционализированы подходящей нагрузкой в двухэтапном процессе, описанном в настоящем документе.

В определенных вариантах осуществления линкер, входящий в состав конъюгата Энфортумаб-нагрузка, может содержать одну или несколько нагрузок В. Такие конъюгаты Энфортумаб-нагрузка могут быть получены в ходе двухэтапного процесса, при этом линкер, содержащий связующий компонент, конъюгируется с Энфортумабом на первом этапе, а нагрузка связывается со связующим компонентом на втором этапе. Как вариант, конъюгаты Энфортумаб-нагрузка могут быть получены в одноэтапном процессе, в котором линкер, содержащий нагрузку, непосредственно конъюгируется с Энфортумабом.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, содержащему Энфортумаб, или антитело против Нектина-4. То есть линкер, входящий в состав конъюгата антитело-лекарственное средство, может содержать один или несколько токсинов, как описано в настоящем документе.

В определенных вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, может содержать линкер, включающий аминокислотную последовательность RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2), ARK (SEQ ID NO:3), RKR (SEQ ID NO:4) или RK-Val-Cit (SEQ ID NO:54).

То есть, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, содержащему:

а) Энфортумаб, или антитело против Нектина-4; и

б) линкер, содержащий лекарственное соединение В, при этом лекарственное соединение В ковалентно связано с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: RКАА (SEQ ID NO:1), RКА (SEQ ID NO:2), АRК (SEQ ID NO:3), RKR (SEQ ID NO:4) или RК-Val-Cit (SEQ ID NO:54);

при этом линкер конъюгирован с Энфортумабом, или антителом против Нектина-4, посредством изопептидной связи, образованной между γ -карбоксамидной группой остатка глутамина CD79b (нумерация EU) домена C_H4 антитела и первичным амином, входящим в боковую цепь лизинового остатка, входящего в состав линкера.

Предпочтительно антитело представляет собой Энфортумаб, включающий тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO:9, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO:10. Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором антитело IgG представляет собой Энфортумаб или антитело, включающее тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO:9, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO:10.

В определенных вариантах осуществления линкер, конъюгированный с Энфортумабом, или антителом против Нектина-4, может содержать структуру RКАА (SEQ ID NO:1), RКА (SEQ ID NO:2), АRК (SEQ ID NO:3), RKR (SEQ ID NO:4) или RК-Val-Cit (SEQ ID NO:54). В определенных вариантах осуществления линкер, содержащий структуру RКАА (SEQ ID NO:1), RКА (SEQ ID NO:2), АRК (SEQ ID NO:3), RKR (SEQ ID NO:4) или RК-Val-Cit (SEQ ID NO:54), может быть конъюгирован с остатком Q295 Энфортумаба, или антитела против Нектина-4, через первичный амин, входящий в состав остатка К.

В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-В, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. В определенных

вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-(самоотщепляющийся компонент)-В, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к С-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может представлять собой РАВС или метил-амин-содержащую группу.

В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-РАВС-В. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-РАВС-ММАЕ (см.ФИГ.1). В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-РАВС-майтанзин (см.ФИГ.8). В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-ММАЕ. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-РАВС-РNP-ММАЕ. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-(NH)-(CH₄)-O-В, где O представляет собой атом кислорода эфирной связи, а В представляет собой гидроксилсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-(NH)-(CH₃)-O-камптотецин. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-(NH)-(CH₄)-S-В, где S представляет собой атом серы тиоэфирной связи, а В представляет собой тиолсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RКАА-(NH)-(CH₃)-S-DM1.

В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером В-RКАА, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. В определенных

вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером В-(самоотщепляющийся компонент)-РКАА, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к N-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может быть самоотщепляющимся компонентом, содержащим орто-гидрокси-защищенный арилсульфатный (ОНРАС) компонент. В определенных вариантах осуществления амин, содержащий нагрузку В, может быть соединен с N-концевым компонентом аргинина через линкер дикарбоновой кислоты, аналогично ФИГ.9.

В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером РКА-В, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером РКА-(самоотщепляющийся компонент)-В, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к С-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может представлять собой РАВС или метил-амин-содержащую группу.

В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером РКА-РАВС-В. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером РКА-РАВС-ММАЕ (см.ФИГ.2). В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером РКА-РАВС-майтанин. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером РКА-ММАЕ. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером

RKA-PAVC-PNP-MMAE. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RKA-(NH)-(CH₄)-O-B, где O представляет собой атом кислорода эфирной связи, а B представляет собой гидроксилсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RKA-(NH)-(CH₃)-O-камптотецин. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RKA-(NH)-(CH₄)-S-B, где S представляет собой атом серы тиоэфирной связи, а B представляет собой тиолсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RKA-(NH)-(CH₃)-S-DM1.

В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером B-RKA, описанном в настоящем документе, причем B предпочтительно представляет собой токсин. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером B-(самоотщепляющийся компонент)-RKA, описанном в настоящем документе, причем B предпочтительно представляет собой токсин. Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к N-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может быть самоотщепляющимся компонентом, содержащим орто-гидрокси-защищенный арилсульфатный (ONPAS) компонент. В определенных вариантах осуществления амин, содержащий нагрузку B, может быть соединен с N-концевым компонентом аргинина через линкер дикарбоновой кислоты, аналогично ФИГ.9.

В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером ARK-B, описанном в настоящем документе, причем B предпочтительно представляет собой токсин. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером ARK-(самоотщепляющийся компонент)-B, описанном в настоящем документе, причем B предпочтительно представляет собой токсин.

Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к С-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может представлять собой РАВС или метил-амин-содержащую группу.

В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером ARK-РАВС-В. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером ARK-РАВС-ММАЕ (см.ФИГ.3). В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером ARK-РАВС-майтанин. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером ARK-ММАЕ. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером ARK-РАВС-РNP-ММАЕ. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером ARK-(NH)-(CH₄)-О-В, где О представляет собой атом кислорода эфирной связи, а В представляет собой гидроксилсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером ARK-(NH)-(CH₃)-О-камптотecin. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером ARK-(NH)-(CH₃)-S-В, где S представляет собой атом серы тиоэфирной связи, а В представляет собой тиолсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером ARK-(NH)-(CH₃)-S-DM1.

В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером В-ARK, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером В-(самоотщепляющийся компонент)-ARK, описанном в настоящем документе, причем В предпочтительно представляет собой токсин.

Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к N-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может быть самоотщепляющимся компонентом, содержащим орто-гидрокси-защищенный арилсульфатный (ОНPAS) компонент.

В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RKR-B, описанном в настоящем документе, причем B предпочтительно представляет собой токсин. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RKR-(самоотщепляющийся компонент)-B, описанном в настоящем документе, причем B предпочтительно представляет собой токсин. Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к C-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может представлять собой PABC или метил-амин-содержащую группу.

В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RKR-PABC-B. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RKR-PABC-MMAE. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RKR-PABC-майтанин. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RKR-MMAE. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RKR-PABC-PNP-MMAE. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RKR-(NH)-(CH₃)-O-B, где O представляет собой атом кислорода эфирной связи, а B представляет собой гидроксилсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером

RKR-(NH)-(CH₃)-O-камптотecin. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RKR-(NH)-(CH₃)-S-B, где S представляет собой атом серы тиоэфирной связи, а S представляет собой тиолсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RKR-(NH)-(CH₃)-S-DM1.

В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером B-RKR, описанном в настоящем документе, причем B предпочтительно представляет собой токсин. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером B-(самоотщепляющийся компонент)-RKR, описанном в настоящем документе, причем B предпочтительно представляет собой токсин. Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к N-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может быть самоотщепляющимся компонентом, содержащим орто-гидрокси-защищенный арилсульфатный (ONPAS) компонент. В определенных вариантах осуществления амин, содержащий нагрузку B, может быть соединен с N-концевым компонентом аргинина через линкер дикарбоновой кислоты, что показано на ФИГ.9.

В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-B, описанном в настоящем документе, причем B предпочтительно представляет собой токсин. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-(самоотщепляющийся компонент)-B, описанном в настоящем документе, причем B предпочтительно представляет собой токсин. Самоотщепляющийся компонент может быть любым самоотщепляющимся компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки к C-концу пептида. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может представлять собой PABC или метил-амин-содержащую группу.

В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-PABC-B. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-PABC-MMAE. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-PABC-майтанин. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-MMAE. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-PABC-PNP-MMAE. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-(NH)-(CH₃)-O-B, где O представляет собой атом кислорода эфирной связи, а B представляет собой гидроксилсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-(NH)-(CH₃)-O-камптотecin. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-(NH)-(CH₃)-S-B, где S представляет собой атом серы тиоэфирной связи, а B представляет собой тиолсодержащий токсин. В определенных вариантах осуществления Энфортумаб, или антитело против Нектина-4, могут быть конъюгированы с линкером RK-Val-Cit-(NH)-(CH₃)-S-DM1.

Также изобретение относится к линкерным конструкциям, содержащим мотив RK. Линкерные конструкции по настоящему изобретению могут быть использованы для конъюгации широкого спектра антител. Благодаря высоко консервативному сайту конъюгации Q295 линкерные конъюгаты по настоящему изобретению могут быть использованы готовыми для получения конъюгатов антитело-нагрузка практически любого антитела типа IgG. По сравнению с линкерами, известными из уровня техники, РК-линкеры по настоящему изобретению могут быть использованы для высокоэффективной конъюгации гликозилированных антител и даже приводить к высокой эффективности конъюгации при включении громоздких нагрузок, таких как токсины.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции, содержащей структуру:

(Sp₁)-RK-(Sp₂)-B-(Sp₃) или

(Sp₁)-B-(Sp₂)-RK-(Sp₃); при этом

- (Sp₁) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp₂) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp₃) является химическим спейсером или отсутствует;
- R представляет собой аргинин, или производное аргинина, или миметик аргинина;
- K представляет собой лизин, или производное лизина, или миметик лизина;
- B представляет собой связующий компонент или нагрузку.

Следует понимать, что линкерная конструкция может иметь ту же структуру и/или характеристики, что и линкеры, описанные выше для способа по настоящему изобретению, для конъюгата антитело-линкер по настоящему изобретению и/или для конъюгатов антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой химические спейсеры (Sp₁), (Sp₂) и (Sp₃) каждый независимо содержат от 0 до 12 аминокислотных остатков.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой линкер содержит не более 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 аминокислотных остатков.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой суммарный заряд линкера является нейтральным или положительным.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой линкер не содержит отрицательно заряженные аминокислотные остатки.

То есть, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной

конструкции по настоящему изобретению, в которой линкер содержит аминокислотную последовательность RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2), ARK (SEQ ID NO:3), RKR (SEQ ID NO:4) или RK-Val-Cit (SEQ ID NO:54).

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой В представляет собой связующий компонент.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой связующий компонент В содержит

- биоортогональную маркерную группу или
- небиоортогональное соединение для перекрестного сшивания.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой биоортогональная маркерная группа или небиоортогональное соединение для перекрестного сшивания состоит из или содержит, по меньшей мере, одну молекулу или фрагмент, выбранный из группы, состоящей из:

- $-N-N\equiv N$ или $-N_3$;
- Lys(N3);
- тетразина;
- алкина;
- напряженного циклооктина;
- BCN;
- напряженного алкена;
- фотореактивной группы;
- альдегида;
- ацилтрифторбората;
- средства деградации белков ("PROTAC");

- циклопентадиена/спиролоциклопентадиена;
- тиоселективного электрофила;
- -SH; и
- цистеина.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, причем линкерная конструкция состоит из или содержит структуру RCAA-B или B-RCAA, в частности, где В представляет собой Lys(N₃) или цистеин.

То есть, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкеру, содержащему структуру RCAA-B или B-RCAA, где В представляет собой связующий компонент. Следует понимать, что В может быть любым связующим компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления В может представлять собой тиол-содержащий связующий компонент, например, цистеин, азид-содержащий связующий компонент, например, Lys(N₃), или тетразин-содержащий связующий компонент. Следует понимать, что линкер, содержащий структуру RCAA-B или B-RCAA, может содержать дополнительные аминокислотные остатки, связующие компоненты, нагрузки и/или другие химические группы, такие как, помимо прочего, ПЭГ компоненты. В определенных вариантах осуществления линкерная конструкция состоит из структуры RCAA-B или B-RCAA.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, причем линкерная конструкция состоит из или содержит структуру RKA-B или B-RKA, в частности, где В представляет собой Lys(N₃) или цистеин.

То есть, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкеру, содержащему структуру RKA-B или B-RKA, где В представляет собой связующий компонент. Следует понимать, что В может быть любым связующим компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления В может представлять собой тиол-содержащий связующий компонент, например, цистеин, азид-содержащий

связующий компонент, например, $\text{Lys}(\text{N}_3)$, или тетразин-содержащий связующий компонент. Следует понимать, что линкер, содержащий структуру RKA-B или B-RKA, может содержать дополнительные аминокислотные остатки, связующие компоненты, нагрузки и/или другие химические группы, такие как, помимо прочего, ПЭГ компоненты. В определенных вариантах осуществления линкерная конструкция состоит из структуры RKA-B или B-RKA.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, причем линкерная конструкция состоит из или содержит структуру ARK-B или B-ARK, в частности, где В представляет собой $\text{Lys}(\text{N}_3)$ или цистеин.

То есть, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкеру, содержащему структуру ARK-B или B-ARK, где В представляет собой связующий компонент. Следует понимать, что В может быть любым связующим компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления В может представлять собой тиол-содержащий связующий компонент, например, цистеин, азид-содержащий связующий компонент, например, $\text{Lys}(\text{N}_3)$, или тетразин-содержащий связующий компонент. Следует понимать, что линкер, содержащий структуру ARK-B или B-ARK, может содержать дополнительные аминокислотные остатки, связующие компоненты, нагрузки и/или другие химические группы, такие как, помимо прочего, ПЭГ компоненты. В определенных вариантах осуществления линкерная конструкция состоит из структуры ARK-B или B-ARK.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, причем линкерная конструкция состоит из или содержит структуру RKR-B или B-RKR, в частности, где В представляет собой $\text{Lys}(\text{N}_3)$ или цистеин.

То есть, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкеру, содержащему структуру RKR-B или B-RKR, где В представляет собой связующий компонент. Следует понимать, что В может быть любым связующим компонентом, известным в данной области и/или описанным в настоящем документе. В

определенных вариантах осуществления В может представлять собой тиол-содержащий связующий компонент, например, цистеин, азид-содержащий связующий компонент, например, Lys(N₃), или тетразин-содержащий связующий компонент. Следует понимать, что линкер, содержащий структуру RKR-B или B-RKR, может содержать дополнительные аминокислотные остатки, связующие компоненты, нагрузки и/или другие химические группы, такие как, помимо прочего, ПЭГ компоненты. В определенных вариантах осуществления линкерная конструкция состоит из структуры RKR-B или B-RKR.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой В представляет собой нагрузку.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой нагрузка содержит, по меньшей мере, один из следующих компонентов:

- токсин;
- цитокин;
- фактор роста;
- радионуклид;
- гормон;
- противовирусное средство;
- антибактериальное средство;
- флуоресцентный краситель;
- иммунорегуляторное/иммуностимулирующее средство;
- компонент, увеличивающий период полураспада;
- компонент, повышающий растворимость;
- конъюгат полимер-токсин;
- нуклеиновая кислота;
- биотиновый или стрептавидиновый компонент;
- витамин;

- средство деградации белков ("PROTAC");
- связывающееся с мишенью соединение; и/или
- противовоспалительное средство.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой токсин представляет собой, по меньшей мере, один токсин, выбранный из группы, состоящей из

- пирролобензодиазепина (например, PBD);
- ауристатина (например, MMAE, MMAF);
- майтанзиноида (например, майтанзина, DM1, DM4, DM21);
- дуокармицина;
- ингибитора никотинамидфосфорибозилтрансферазы (NAMPT);
- тубулизина;
- энедина (например, калихеамицина);
- производного антрациклина (PNU) (например, доксорубицина);
- ингибитора кинезина веретенообразного белка (KSP) на основе пиррола;
- криптофицина;
- ингибитора эффлюксного насоса лекарственного препарата;
- сандрамицина;
- аманитина (например, α -аманитина); и
- камптотецина (например, эксатеканов, дерукстеканов).

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой химический спейсер (Sp_2) включает самоотщепляющийся компонент.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой самоотщепляющийся компонент непосредственно присоединен к нагрузке В.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой самоотщепляющийся компонент содержит р-аминобензилкарбамоилловый (РАВС) компонент.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой линкер содержит или состоит из структуры РКАА-(самоотщепляющийся компонент)-В. Таким образом, линкерная конструкция может содержать любой самоотщепляющийся компонент, известный в данной области и/или описанный в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки В к С-концу пептида. В определенных вариантах осуществления нагрузка В может быть токсином. Специалистам известны токсины, которые могут быть соединены с С-концом пептида через подходящий самоотщепляющийся компонент. Предпочтительно, такой самоотщепляющийся компонент представляет собой любой из самоотщепляющихся компонентов, описанных в настоящем документе, таких как, помимо прочего, самоотщепляющийся линкер на основе РАВС, самоотщепляющийся линкер на основе РАВЕ или метиламин-содержащий самоотщепляющийся компонент.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой линкер состоит из или содержит структуру В-(самоотщепляющийся компонент)-РКАА. Таким образом, линкерная конструкция может содержать любой самоотщепляющийся компонент, известный в данной области и/или описанный в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки В к N-концу пептида. В определенных вариантах осуществления нагрузка В может быть токсином. Специалистам известны токсины, которые могут быть соединены с N-концом пептида через подходящий самоотщепляющийся компонент. Предпочтительно, такой самоотщепляющийся компонент представляет собой любой из самоотщепляющихся компонентов, описанных в настоящем документе, таких как, помимо прочего, самоотщепляющийся компонент, содержащий компонент ОНРАС.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой линкер состоит из или содержит структуру В-РКАА или РКАА-В. То есть, нагрузка В может быть соединена

непосредственно с N- или C-концом пептида. В случаях, когда функциональные группы, входящие в состав нагрузки, не совместимы с N- и/или C-концом пептида, для соединения нагрузки с N- и/или C-концом пептида, соответственно, может быть использована молекула линкера. В настоящем документе раскрыты подходящие молекулы линкера для соединения нагрузки с N- или C-концом пептида.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой линкер состоит из или содержит структуру RКАА-РАВС-В, в частности, в которой В представляет собой ауристин или майтанзиноид, в частности, в которой ауристин представляет собой ММАЕ и в которой майтанзиноид представляет собой майтанзин.

То есть, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкеру, содержащему структуру RКАА-В, где В представляет собой нагрузку. Следует понимать, что В может быть любой нагрузкой, известной в данной области и/или описанной в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления В может быть токсином. В определенных вариантах осуществления нагрузка В может быть отделена от пептида RКАА самоотщепляющимся компонентом. Таким образом, линкер может содержать или состоять из структуры RКАА-(самоотщепляющийся компонент)-В, где В представляет собой нагрузку. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может представлять собой РАВС или метил-аминную группу. В определенных вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RКАА-РАВС-В. В определенных вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RКАА-(NH)-(СН₃)-О-В, где О представляет собой атом кислорода, входящий в эфирную связь, а В представляет собой гидроксилсодержащая нагрузка. В определенных вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RКАА-(NH)-(СН₃)-S-В, где S представляет собой атом серы, входящий в тиоэфирную связь, а В представляет собой тиолсодержащая нагрузка. В определенных вариантах осуществления нагрузка может представлять собой ауристин или майтанзиноид. В определенных вариантах осуществления ауристин может представлять собой ММАЕ. В определенных вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RКАА-РАВС-ММАЕ или RКАА-ММАЕ. В определенных

вариантах осуществления майтанзиноид может быть майтанзином. В таких вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RКАА-РАВС-майтанзин или RКАА-майтанзин. В определенных вариантах осуществления майтанзиноид может быть DM1 или производным DM1. В определенных вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RКАА-(NH)-(CH₃)-S-DM1. В определенных вариантах осуществления нагрузка может быть камптотецином. В определенных вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RКАА-(NH)-(CH₃)-O-камптотецин.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой линкер содержит или состоит из структуры RКА-(самоотщепляющийся компонент)-В. Таким образом, линкерная конструкция может содержать любой самоотщепляющийся компонент, известный в данной области и/или описанный в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки В к С-концу пептида. В определенных вариантах осуществления нагрузка В может быть токсином. Специалистам известны токсины, которые могут быть соединены с С-концом пептида через подходящий самоотщепляющийся компонент. Предпочтительно, такой самоотщепляющийся компонент представляет собой любой из самоотщепляющихся компонентов, описанных в настоящем документе, таких как, помимо прочего, самоотщепляющийся линкер на основе РАВС, самоотщепляющийся линкер на основе РАВЕ или метиламин-содержащий самоотщепляющийся компонент.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой линкер состоит из или содержит структуру В-(самоотщепляющийся компонент)-RКА. Таким образом, линкерная конструкция может содержать любой самоотщепляющийся компонент, известный в данной области и/или описанный в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки В к N-концу пептида. В определенных вариантах осуществления нагрузка В может быть токсином. Специалистам известны токсины, которые могут быть соединены с N-концом пептида через подходящий самоотщепляющийся компонент. Предпочтительно, такой самоотщепляющийся компонент представляет собой любой из самоотщепляющихся компонентов,

описанных в настоящем документе, таких как, помимо прочего, самоотщепляющийся компонент, содержащий компонент ОНРАС.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой линкер состоит из или содержит структуру В-RKA или RKA-В. То есть, нагрузка В может быть соединена непосредственно с N- или С-концом пептида. В случаях, когда функциональные группы, входящие в состав нагрузки, не совместимы с N- и/или С-концом пептида, для соединения нагрузки с N- и/или С-концом пептида, соответственно, может быть использована молекула линкера. В настоящем документе раскрыты подходящие молекулы линкера для соединения нагрузки с N- или С-концом пептида.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой линкер состоит из или содержит структуру RKA-РАВС-В, в частности, в которой В представляет собой ауристин или майтанзиноид, в частности, в которой ауристин представляет собой ММАЕ и в которой майтанзиноид представляет собой майтанзин.

То есть, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкеру, содержащему структуру RKA-В, где В представляет собой нагрузку. Следует понимать, что В может быть любой нагрузкой, известной в данной области и/или описанной в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления В может быть токсином. В определенных вариантах осуществления нагрузка В может быть отделена от пептида RKA самоотщепляющимся компонентом. Таким образом, линкер может содержать или состоять из структуры RKA-(самоотщепляющийся компонент)-В, где В представляет собой нагрузка. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может представлять собой РАВС или метил-аминную группу. Таким образом, в определенных вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RKA-РАВС-В. В определенных вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RKA-(NH)-(CH₃)-O-В, где O представляет собой атом кислорода, входящий в эфирную связь, а В представляет собой гидроксилсодержащая нагрузка. В определенных вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RKA-(NH)-(CH₃)-S-В, где S представляет собой атом серы, входящий в тиоэфирную связь,

а В представляет собой тиолсодержащая нагрузка. В определенных вариантах осуществления нагрузка может представлять собой ауристин или майтанзиноид. В определенных вариантах осуществления ауристин может представлять собой ММАЕ. В определенных вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RKA-PAVC-MMAE или RKA-MMAE. В определенных вариантах осуществления майтанзиноид может быть майтанзином. В таких вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RKA-PAVC-майтанзин или RKA-майтанзин. В определенных вариантах осуществления майтанзиноид может быть DM1 или производным DM1. В определенных вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RKA-(NH)-(CH₃)-S-DM1. В определенных вариантах осуществления нагрузка может быть камптотецином. В определенных вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RKA-(NH)-(CH₃)-O-камптотецин.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой линкер содержит или состоит из структуры ARK-(самоотщепляющийся компонент)-В. Таким образом, линкерная конструкция может содержать любой самоотщепляющийся компонент, известный в данной области и/или описанный в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки В к С-концу пептида. В определенных вариантах осуществления нагрузка В может быть токсином. Специалистам известны токсины, которые могут быть соединены с С-концом пептида через подходящий самоотщепляющийся компонент. Предпочтительно, такой самоотщепляющийся компонент представляет собой любой из самоотщепляющихся компонентов, описанных в настоящем документе, таких как, помимо прочего, самоотщепляющийся линкер на основе PAVC, самоотщепляющийся линкер на основе PAVE или метиламин-содержащий самоотщепляющийся компонент.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой линкер состоит из или содержит структуру В-(самоотщепляющийся компонент)-ARK. Таким образом, линкерная конструкция может содержать любой самоотщепляющийся компонент, известный в данной области и/или описанный в настоящем документе, который подходит для

присоединения нагрузки В к N-концу пептида. В определенных вариантах осуществления нагрузка В может быть токсином. Специалистам известны токсины, которые могут быть соединены с N-концом пептида через подходящий самоотщепляющийся компонент. Предпочтительно, такой самоотщепляющийся компонент представляет собой любой из самоотщепляющихся компонентов, описанных в настоящем документе, таких как, помимо прочего, самоотщепляющийся компонент, содержащий компонент ОНРАС.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой линкер состоит из или содержит структуру В-АРК или АРК-В. То есть, нагрузка В может быть соединена непосредственно с N- или С-концом пептида. В случаях, когда функциональные группы, входящие в состав нагрузки, не совместимы с N- и/или С-концом пептида, для соединения нагрузки с N- и/или С-концом пептида, соответственно, может быть использована молекула линкера. В настоящем документе раскрыты подходящие молекулы линкера для соединения нагрузки с N- или С-концом пептида.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой линкер состоит из или содержит структуру АРК-РАВС-В, в частности, в которой В представляет собой ауристин или майтанзиноид, в частности, в которой ауристин представляет собой ММАЕ и в которой майтанзиноид представляет собой майтанзин.

То есть, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкеру, содержащему структуру АРК-В, где В представляет собой нагрузку. Следует понимать, что В может быть любой нагрузкой, известной в данной области и/или описанной в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления В может быть токсином. В определенных вариантах осуществления нагрузка В может быть отделена от пептида АРК самоотщепляющимся компонентом. Таким образом, линкер может содержать или состоять из структуры АРК-(самоотщепляющийся компонент)-В, где В представляет собой нагрузка. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может представлять собой РАВС или метил-аминную группу. Таким образом, в определенных вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры АРК-РАВС-В. В определенных

вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры ARK-(NH)-(CH₃)-O-B, где O представляет собой атом кислорода, входящий в эфирную связь, а B представляет собой гидроксилсодержащая нагрузка. В определенных вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры ARK-(NH)-(CH₃)-S-B, где S представляет собой атом серы, входящий в тиоэфирную связь, а B представляет собой тиолсодержащая нагрузка. В определенных вариантах осуществления нагрузка может представлять собой ауристин или майтанзиноид. В определенных вариантах осуществления ауристин может представлять собой MMAE. В определенных вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры ARK-PABC-MMAE или ARK-MMAE. В определенных вариантах осуществления майтанзиноид может быть майтанзином. В таких вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры ARK-PABC-майтанзин или ARK-майтанзин. В определенных вариантах осуществления майтанзиноид может быть DM1 или производным DM1. В таких вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры ARK-(NH)-(CH₃)-S-DM1. В определенных вариантах осуществления нагрузка может быть камптотецином. В таких вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры ARK-(NH)-(CH₃)-O-камптотецин.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой линкер содержит или состоит из структуры RKR-(самоотщепляющийся компонент)-B. Таким образом, линкерная конструкция может содержать любой самоотщепляющийся компонент, известный в данной области и/или описанный в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки B к C-концу пептида. В определенных вариантах осуществления нагрузка B может быть токсином. Специалистам известны токсины, которые могут быть соединены с C-концом пептида через подходящий самоотщепляющийся компонент. Предпочтительно, такой самоотщепляющийся компонент представляет собой любой из самоотщепляющихся компонентов, описанных в настоящем документе, таких как, помимо прочего, самоотщепляющийся линкер на основе PABC, самоотщепляющийся линкер на основе PABE или метиламин-содержащий самоотщепляющийся компонент.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой линкер состоит из или содержит структуру В-(самоотщепляющийся компонент)-RKR. Таким образом, линкерная конструкция может содержать любой самоотщепляющийся компонент, известный в данной области и/или описанный в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки В к N-концу пептида. В определенных вариантах осуществления нагрузка В может быть токсином. Специалистам известны токсины, которые могут быть соединены с N-концом пептида через подходящий самоотщепляющийся компонент. Предпочтительно, такой самоотщепляющийся компонент представляет собой любой из самоотщепляющихся компонентов, описанных в настоящем документе, таких как, помимо прочего, самоотщепляющийся компонент, содержащий компонент ОНРАС.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой линкер состоит из или содержит структуру В-RKR или RKR-В. То есть, нагрузка В может быть соединена непосредственно с N- или С-концом пептида. В случаях, когда функциональные группы, входящие в состав нагрузки, не совместимы с N- и/или С-концом пептида, для соединения нагрузки с N- и/или С-концом пептида, соответственно, может быть использована молекула линкера. В настоящем документе раскрыты подходящие молекулы линкера для соединения нагрузки с N- или С-концом пептида.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, в которой линкер состоит из или содержит структуру RKR-РАВС-В, в частности, в которой В представляет собой ауристин или майтанзиноид, в частности, в которой ауристин представляет собой ММАЕ и в которой майтанзиноид представляет собой майтанзин.

То есть, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкеру, содержащему структуру RKR-В, где В представляет собой нагрузку. Следует понимать, что В может быть любой нагрузкой, известной в данной области и/или описанной в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления В может быть токсином. В определенных вариантах осуществления нагрузка В может быть отделена от пептида RKR самоотщепляющимся компонентом. Таким образом,

линкер может содержать или состоять из структуры RKR-(самоотщепляющийся компонент)-В, где В представляет собой нагрузка. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может представлять собой РАВС или метил-аминную группу. Таким образом, в определенных вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RKR-РАВС-В. В определенных вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RKR-(NH)-(CH₃)-О-В, где О представляет собой атом кислорода, входящий в эфирную связь, а В представляет собой гидроксилсодержащая нагрузка. В определенных вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RKR-(NH)-(CH₃)-S-В, где S представляет собой атом серы, входящий в тиоэфирную связь, а В представляет собой тиолсодержащая нагрузка. В определенных вариантах осуществления нагрузка может представлять собой ауристин или майтанзиноид. В определенных вариантах осуществления ауристин может представлять собой ММАЕ. В определенных вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RKR-РАВС-ММАЕ или RKR-ММАЕ. В определенных вариантах осуществления майтанзиноид может быть майтанзином. В таких вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RKR-РАВС-майтанзин или RKR-майтанзин. В определенных вариантах осуществления майтанзиноид может быть DM1 или производным DM1. В таких вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RKR-(NH)-(CH₃)-S-DM1. В определенных вариантах осуществления нагрузка может быть камптотецином. В таких вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RKR-(NH)-(CH₃)-О-камптотецин.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, при этом линкерная конструкция содержит или состоит из структуры RK-Val-Cit-(самоотщепляющийся компонент)-В. Таким образом, линкерная конструкция может содержать любой самоотщепляющийся компонент, известный в данной области и/или описанный в настоящем документе, который подходит для присоединения нагрузки В к С-концу пептида. В определенных вариантах осуществления нагрузка В может быть токсином. Специалистам известны токсины, которые могут быть соединены с С-концом пептида через подходящий самоотщепляющийся компонент. Предпочтительно, такой

самоотщепляющийся компонент представляет собой любой из самоотщепляющихся компонентов, описанных в настоящем документе, таких как, помимо прочего, самоотщепляющийся линкер на основе РАВС, самоотщепляющийся линкер на основе РАВЕ или метиламин-содержащий самоотщепляющийся компонент.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, при этом линкерная конструкция состоит из или содержит структуру RK-Val-Cit-B. То есть, нагрузка В может быть соединена непосредственно с С-концом пептида. В случаях, когда функциональные группы, входящие в состав нагрузки, не совместимы с С-концом пептида, для соединения нагрузки с С-концом пептида может быть использована молекула линкера. В настоящем документе раскрыты подходящие молекулы линкера для соединения нагрузки с С-концом пептида.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкерной конструкции по настоящему изобретению, при этом линкерная конструкция состоит из или содержит структуру RK-Val-Cit-РАВС-В, в частности, в которой В представляет собой ауристин или майтанзиноид, в частности, в которой ауристин представляет собой ММАЕ и в которой майтанзиноид представляет собой майтанзин.

То есть, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к линкеру, содержащему структуру RK-Val-Cit-B, где В представляет собой нагрузку. Следует понимать, что В может быть любой нагрузкой, известной в данной области и/или описанной в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления В может быть токсином. В определенных вариантах осуществления нагрузка В может быть отделена от пептида RK-Val-Cit самоотщепляющимся компонентом. Таким образом, линкер может содержать или состоять из структуры RK-Val-Cit-(самоотщепляющийся компонент)-В, где В представляет собой нагрузку. В определенных вариантах осуществления самоотщепляющийся компонент может представлять собой РАВС или метил-аминную группу. Таким образом, в определенных вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RK-Val-Cit-РАВС-В. В определенных вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RK-Val-Cit-(NH)-(CH₃)-O-В, где О представляет собой атом кислорода, входящий в эфирную связь, а В представляет

собой гидроксилсодержащая нагрузка. В определенных вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RK-Val-Cit-(NH)-(CH₃)-S-B, где S представляет собой атом серы, входящий в тиоэфирную связь, а B представляет собой тиолсодержащая нагрузка. В определенных вариантах осуществления нагрузка может представлять собой ауристин или майтанзиноид. В определенных вариантах осуществления ауристин может представлять собой MMAE. В определенных вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RK-Val-Cit-PABC-MMAE или RK-Val-Cit-MMAE. В определенных вариантах осуществления майтанзиноид может быть майтанзином. В таких вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RK-Val-Cit-PABC-майтанзин или RK-Val-Cit-майтанзин. В определенных вариантах осуществления майтанзиноид может быть DM1 или производным DM1. В таких вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RK-Val-Cit-(NH)-(CH₃)-S-DM1. В определенных вариантах осуществления нагрузка может быть камптотецином. В таких вариантах осуществления линкер может содержать или состоять из структуры RK-Val-Cit-(NH)-(CH₃)-O-камптотецин.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер или конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, при этом конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство содержит, по меньшей мере, один токсин.

То есть, конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению содержит антитело, конъюгированное, по меньшей мере, с одним линкером, при этом этот один линкер содержит, по меньшей мере, один токсин. В определенных вариантах осуществления конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство содержит два линкера, при этом каждая тяжелая цепь антитела конъюгирована с одним линкером. В определенных вариантах осуществления конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство содержит четыре линкера, при этом каждая тяжелая цепь антитела конъюгирована с двумя линкерами. В таких случаях каждый линкер может содержать одну или несколько нагрузок, например, токсины.

В определенных вариантах осуществления конъюгат антитело-линкер или конъюгат

антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению содержит два линкера, при этом каждый линкер содержит одну нагрузку, например, токсин. В других вариантах осуществления конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению содержит две нагрузки, например, один токсин и одну другую нагрузку или два одинаковых или разных токсина. В вариантах осуществления, в которых конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство содержит два линкера, предпочтительно, чтобы эти линкеры были конъюгированы с остатком Q295 двух тяжелых цепей антитела IgG. Еще предпочтительнее, антитело представляет собой антитело IgG, гликозилированное на остатке N297.

В определенных вариантах осуществления конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению содержит четыре линкера, при этом каждый линкер содержит одну нагрузку, например, токсин. В других вариантах осуществления конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению содержит четыре линкера, при этом каждый линкер содержит две нагрузки, например, один токсин и одну другую нагрузку или два одинаковых или разных токсина. В вариантах осуществления, в которых конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство содержит четыре линкера, предпочтительно, чтобы эти линкеры были конъюгированы с остатками Q295 и N297Q двух тяжелых цепей антитела IgG.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер или конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, при этом конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство содержит два разных токсина.

В определенных вариантах осуществления конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению может содержать два разных токсина. То есть, в определенных вариантах осуществления конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению может содержать два линкера, при этом каждый линкер содержит два разных токсина. Конъюгаты антитело-линкер или конъюгаты антитело-лекарственное средство, содержащие два разных токсина, имеют то преимущество, что они могут

обладать повышенной цитотоксической активностью. Такая повышенная цитотоксическая активность может быть достигнута путем комбинирования двух токсинов, направленных на два различных клеточных механизма. Например, конъюгаты антитело-линкер или конъюгаты антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению могут содержать первый токсин, который ингибирует деление клеток, и второй токсин представляет собой токсин, который нарушает репликацию и/или транскрипцию ДНК.

Соответственно, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер или конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором первый токсин представляет собой токсин, который ингибирует деление клеток, а второй токсин представляет собой токсин, который нарушает репликацию и/или транскрипцию ДНК.

Токсин, ингибирующий деление клеток, например, антимитотическое средство или веретенный яд - это средство, которое может ингибировать или предотвратить митотическое деление клетки. Веретенный яд - это яд, который нарушает деление клеток, воздействуя на белковые нити, соединяющие центромерные участки хромосом, известные как веретена. Веретенные яды эффективно прекращают производство новых клеток, прерывая фазу митоза клеточного деления в контрольной точке сборки веретена деления (SAC). Митотическое веретено состоит из микротрубочек (полимеризованного тубулина), которые вместе с регуляторными белками помогают друг другу в правильной сегрегации реплицированных хромосом. Некоторые соединения, воздействующие на митотическое веретено, доказали свою высокую эффективность в борьбе с солидными опухолями и гематологическими злокачественными новообразованиями.

Два конкретных семейства антимитотических средств - алкалоиды винка и таксаны - прерывают деление клетки путем возбуждения динамики микротрубочек. Алкалоиды винка воздействуют путем ингибирования полимеризации тубулина в микротрубочки, что приводит к остановке G2/M в клеточном цикле и в конечном итоге к гибели клетки. В отличие от них, таксаны останавливают митотический клеточный цикл, стабилизируя микротрубочки против деполимеризации. Несмотря на существование множества других веретенных белков, которые могут стать мишенью

для новых химиотерапевтических препаратов, тубулин-связывающие средства являются единственными средствами, используемыми в клинической практике. Средства, воздействующие на моторный белок кинезин, начинают выходить на клинические испытания. Другой тип, паклитаксел, воздействует путем присоединения к тубулину в существующих микротрубочках. Предпочтительными токсинами, ингибирующими деление клеток в рамках настоящего изобретения, являются ауристатины, такие как MMAE и MMAF, и майтанзиноиды, такие как DM1, DM3, DM4 и/или DM21.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер или конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, в котором, по меньшей мере, один из токсинов представляет собой ауристин или майтанзиноид.

Специалистам в данной области известно несколько средств, препятствующих правильной репликации и/или транскрипции молекул ДНК и доказавших свою пригодность для лечения рака. Например, антиметаболиты, такие как нуклеотидные или нуклеозидные аналоги, которые неправильно инкорпорируются во вновь образованные молекулы ДНК и/или РНК, известны в данной области техники и были описаны в Tsesmetzis et al, *Cancers (Basel)*, 2018, 10(7): 240. Другими токсинами, которые, как известно, нарушают репликацию и/или транскрипцию ДНК, являются дуоромицины.

Соответственно, в определенных вариантах осуществления конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению содержит два различных токсина, при этом первый токсин представляет собой дуоромицин, а вторая нагрузка представляет собой ауристин или майтанзиноид.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер или конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, при этом конъюгат антитело-линкер содержит два разных ауристатина.

Одним из основных преимуществ конъюгатов антитело-линкер или конъюгатов антитело-лекарственное средство, содержащих два разных токсина, является то, что конъюгаты антитело-линкер или конъюгаты антитело-лекарственное средство могут

по-прежнему воздействовать на клетки-мишени, избежавшие механизма действия одного из токсинов, и/или что конъюгат антитело-нагрузка может иметь более высокую эффективность против гетерогенных опухолей.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер или конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, при этом конъюгат антитело-линкер содержит токсин и ингибитор эффлюксного транспортера лекарственного средства.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер или конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, при этом конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство содержит токсин и компонент, повышающий растворимость.

То есть, конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство может содержать две нагрузки, при этом первая нагрузка представляет собой токсин, а вторая нагрузка представляет собой компонент, повышающий растворимость. Как вариант, конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство могут быть получены путем присоединения токсина к азид-содержащему связующему компоненту линкера и путем присоединения малеимид-содержащего компонента, повышающего растворимость, к цистеиновой боковой цепи того же линкера. Как вариант, токсин и/или компонент, повышающий растворимость, могут быть присоединены к линкеру путем химического синтеза.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер или конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, при этом конъюгат антитело-линкер содержит токсин и иммуностимулирующее средство.

При использовании в настоящем документе и в зависимости от контекста, термин "иммуностимулирующее средство" включает соединения, которые усиливают иммунный ответ субъекта на антиген. Примеры иммуностимулирующих средств включают стимуляторы иммунитета и соединения, активирующие иммунные клетки. Конъюгаты антитело-линкер по настоящему изобретению могут содержать иммуностимулирующие средства, которые помогают программировать иммунные

клетки на распознавание лигандов и усиление презентации антигена. Соединения, активирующие иммунные клетки, включают агонисты Toll-подобных рецепторов (TLR). Такие агонисты включают ассоциированные с патогеном молекулярные фрагменты (PAMP), например, композицию, имитирующую инфекцию, такую как иммуномодулятор бактериального происхождения (также известную как сигнал опасности), и ассоциированные с повреждением молекулярные фрагменты (DAMP), например, композицию, имитирующую подверженную стрессу или поврежденную клетку. Агонисты TLR включают нуклеинокислотные или липидные композиции (например, монофосфорил-липид А (MPLA)). В одном примере агонист TLR включает агонист TLR9, такой как цитозин-гуанозинный олигонуклеотид (CpG-ODN), поли(этиленимин) (PEI)-конденсированный олигонуклеотид (ODN), такой как PEI-CpG-ODN, или двухцепочечную дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК). В другом примере агонист TLR включает агонист TLR3, такой как полиинозин-полицитидиловая кислота (поли (I:C)), PEI-поли (I:C), полиаденил-полиуридиловая кислота (поли (A:U)), PEI-поли (A:U), или двухцепочечная рибонуклеиновая кислота (РНК). Другие примеры вакцинных иммуностимулирующих соединений включают липополисахарид (ЛПС), хемокины/цитокины, грибковые бета-глюканы (такие как лентинан), имиквимод, CRX-527 и OM-174.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер или конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, при этом конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство содержит два разных иммуностимулирующих средства.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер или конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, при этом, по меньшей мере, одно иммуностимулирующее средство представляет собой агонист TLR.

Термин "агонист TLR" в контексте настоящего документа означает молекулу, которая способна вызывать сигнальный ответ через сигнальный путь TLR, либо как прямой лиганд, либо опосредованно через генерацию эндогенных или экзогенных. Агонистическими лигандами рецепторов TLR являются (i) природные лиганды фактического рецептора TLR или их функционально эквивалентные варианты,

которые сохраняют способность связываться с рецептором TLR и вызывать на нем сигналы костимуляции, или (ii) антитело-агонист против рецептора TLR или его функционально эквивалентный вариант, способное специфически связываться с рецептором TLR и, в частности, с внеклеточным доменом этого рецептора и вызывать некоторые из иммунных сигналов, контролируемых этим рецептором и связанными с ним белками. Специфичность связывания может быть для человеческого рецептора TLR или для рецептора TLR другого вида, гомологичного человеческому.

В определенных вариантах осуществления конъюгат антитело-линкер может содержать одно или несколько средств для визуализации. Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, при этом конъюгат антитело-линкер содержит радионуклид и флуоресцентный краситель.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором радионуклид представляет собой радионуклид, который подходит для использования в томографии, в частности, однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) или позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), и в котором флуоресцентный краситель представляет собой флуоресцентный краситель ближнего инфракрасного диапазона.

Термин "радионуклид", используемый в настоящем документе, имеет то же значение, что и радиоактивный нуклид, радиоизотоп или радиоактивный изотоп.

Радионуклид предпочтительно обнаруживается с помощью метода(ов) молекулярной визуализации ядерной медицины, таких как позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ), гибрид ОФЭКТ и/или ПЭТ или их комбинации. Здесь однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ) включает в себя планарную сцинтиграфию (ПС).

Гибридом ОФЭКТ и/или ПЭТ является, например, ОФЭКТ/КТ, ПЭТ/КТ, ПЭТ/МРТ или ОФЭКТ/МРТ.

ОФЭКТ и ПЭТ получают информацию о концентрации (или поглощении) радионуклидов, введенных в организм субъекта. ПЭТ генерирует изображения,

обнаруживая пары гамма-лучей, косвенно испускаемых позитронно-активным радионуклидом. Результатом анализа ПЭТ является серия изображений тонких срезов тела над интересующей областью (например, мозгом, молочными железами, печенью и т.д.). Эти изображения тонких срезов могут быть собраны в трехмерное изображение исследуемой области. ОФЭКТ похожа на ПЭТ, но радиоактивные вещества, используемые в ОФЭКТ, имеют большее время распада, чем в ПЭТ, и испускают одинарное, а не двойное гамма-излучение. Хотя изображения ОФЭКТ обладают меньшей чувствительностью и менее детальны, чем изображения ПЭТ, метод ОФЭКТ гораздо дешевле, чем ПЭТ, и имеет то преимущество, что не требует близости ускорителя частиц. Фактическая клиническая ПЭТ обладает более высокой чувствительностью и лучшим пространственным разрешением, чем ОФЭКТ, и имеет преимущество точной коррекции ослабления из-за высокой энергии фотонов; поэтому ПЭТ предоставляет более точные количественные данные, чем ОФЭКТ. Планарная сцинтиграфия (ПС) похожа на ОФЭКТ, поскольку в ней используются те же радионуклиды. Однако ПС предоставляет только двумерную информацию.

ОФЭКТ дает сгенерированные компьютером изображения локального поглощения радиоактивных веществ, а КТ - трехмерные анатомические изображения рентгенологической плотности человеческого тела. Комбинированная визуализация ОФЭКТ/КТ обеспечивает последовательное получение функциональной информации от ОФЭКТ и анатомической информации от КТ в ходе одного исследования. Данные КТ также используются для быстрой и оптимальной коррекции ослабления данных однофотонной эмиссии. Благодаря точной локализации областей аномального и/или физиологического поглощения радиоактивного вещества, ОФЭКТ/КТ повышает чувствительность и специфичность, но также может помочь в достижении точных дозиметрических оценок, а также в проведении интервенционных процедур или в лучшем определении целевого объема для наружной дистанционной лучевой терапии. Большинство процедур проводится с использованием гамма-камерной визуализации с однофотонными радиоактивными метками.

Радионуклид может быть выбран из группы, состоящей из технеция-99m (^{99m}Tc), галлия-67 (^{67}Ga), галлия-68 (^{68}Ga) иттрия-90 (^{90}Y), индия-111 (^{111}In), рения-186 (^{186}Re), фтора-18 (^{18}F), меди-64 (^{64}Cu), тербия-149 (^{149}Tb) или таллия-201 (^{201}Tl). Радионуклид

может содержаться в молекуле или может быть связан с хелатообразующим средством.

В конкретном воплощении изобретение относится к использованию линкерной конструкции по настоящему изобретению в получении конъюгата антитело-линкер с помощью микробной трансглутаминазы.

То есть, линкерная конструкция, описанная выше, может использоваться для получения конъюгатов антитело-линкер, описанных в настоящем документе. Предпочтительно, антитело представляет собой антитело IgG, содержащее эндогенный глутаминовый остаток Q295 (нумерация EU). В определенных вариантах осуществления линкер по настоящему изобретению используется для получения конъюгатов антитело-линкер путем применения любых условий реакции, описанных в настоящем документе.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к применению по настоящему изобретению, при этом антитело представляет собой антитело IgG, в частности, антитело IgG1.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в котором антитело представляет собой Полатузумаб, или Трастузумаб, или Энфортумаб.

Кроме того, изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей

а) конъюгат антитело-линкер по настоящему изобретению, в частности, при этом конъюгат антитело-линкер содержит, по меньшей мере, одну нагрузку;

или

б) конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению; и

фармацевтическую композицию, содержащую, по меньшей мере, один фармацевтически приемлемый ингредиент.

Следует понимать, что фармацевтическая композиция может содержать конъюгат антитело-нагрузка, который был получен с помощью одноэтапного или двухэтапного процесса, описанных в настоящем документе.

Тип нагрузки, входящей в конструкцию антитело-нагрузка, включенную в фармацевтическую композицию, зависит от применения фармацевтической композиции. В вариантах осуществления, в которых фармацевтическая композиция используется для лечения заболевания, нагрузка предпочтительно представляет собой лекарственное средство. Если такое заболевание является неопластическим заболеванием, нагрузка предпочтительно представляет собой токсин. В вариантах осуществления, в которых фармацевтическая композиция используется в диагностике, нагрузка предпочтительно представляет собой средство для визуализации.

Как вариант, фармацевтическая композиция может содержать конъюгат антитело-лекарственное средство, описанное в настоящем документе. Фармацевтические композиции, содержащие конъюгат антитело-лекарственное средство, предпочтительно используются для лечения заболеваний.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции по настоящему изобретению, содержащей, по меньшей мере, одно дополнительное терапевтически активное средство.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать, по меньшей мере, один фармацевтически приемлемый ингредиент.

Фармацевтически приемлемый ингредиент означает ингредиент в фармацевтической композиции, кроме активного ингредиента, который нетоксичен для субъекта. Фармацевтически приемлемый ингредиент включает, помимо прочего, буфер, вспомогательное вещество, стабилизатор или консервант.

Фармацевтические составы конъюгатов антитело-линкер, описанные в настоящем документе, готовятся путем смешивания таких конъюгатов, имеющих желаемую

степень чистоты, с одним или несколькими опциональными фармацевтически приемлемыми ингредиентами (Flemington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Oslo, A. Ed. (1980)), в виде лиофилизированных составов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые ингредиенты обычно нетоксичны для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и включают, помимо прочего: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензил аммония хлорид; гексаметония хлорид; бензалкония хлорид; хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропил парабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол; и m-крезол); полипептиды с низкой молекулярной массой (менее 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие средства, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннитол, трегалоза или сорбитол; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, Zn-белковые комплексы); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ). Примеры фармацевтически приемлемых ингредиентов в настоящем документе также включают средства диспергирования лекарственных средств в интерстициальном пространстве, такие как растворимые нейтрально-активные гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например, человеческие растворимые гликопротеины гиалуронидазы PH-20, такие как rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Некоторые примеры sHASEGP и способов их использования, включая rHuPH20, описаны в публикациях патентов США № 2005/0260186 и 2006/0104968. Например, sHASEGP может быть объединен с одной или несколькими дополнительными гликозаминогликаназами, такими как хондроитиназы.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в частности, при этом конъюгат антитело-линкер содержит, по меньшей мере, одну нагрузку, конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению или фармацевтической

композиции по настоящему изобретению для применения в терапии и/или диагностике.

То есть, конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению могут применяться в лечении субъекта или в диагностике заболевания или состояния у субъекта. Индивидуумом или субъектом предпочтительно является млекопитающее. Млекопитающие включают, помимо прочего, одомашненных животных (например, коров, овец, кошек, собак и лошадей), приматов (например, людей и нечеловекообразных приматов, таких как макаки), кроликов и грызунов (например, мышей и крыс). В определенных вариантах осуществления индивидуумом или субъектом является человек. Когда конъюгат антитело-линкер или фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антитело-линкер по настоящему изобретению, используются в терапии, предпочтительно, чтобы линкер содержал лекарственное средство. Когда конъюгат антитело-линкер или фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антитело-линкер по настоящему изобретению, используются в диагностике, предпочтительно, чтобы линкер содержал, по меньшей мере, одно средство для визуализации.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в частности, при этом конъюгат антитело-линкер содержит, по меньшей мере, одну нагрузку, конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в лечении пациента, который

- страдает от,
- подвержен риску развития и/или
- у которого диагностировано

неопластическое заболевание, неврологическое заболевание, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или инфекционное заболевание.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в частности, при этом конъюгат антитело-

линкер содержит, по меньшей мере, одну нагрузку, конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в лечении пациента, который страдает от неопластического заболевания.

Термин "неопластическое заболевание", используемый в настоящем документе, означает состояние, характеризующееся неконтролируемым, аномальным ростом клеток. К неопластическим заболеваниям относится рак. Примеры рака включают, помимо прочего, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкемию. Более конкретные примеры таких раков включают рак молочной железы, рак простаты, рак толстой кишки, плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, рак яичников, рак шейки матки, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, колоректальный рак, рак шейки матки, карциному эндометрия, карциному слюнных желез, рак почек, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциному печени, рак кожи, меланому, рак головного мозга, рак яичников, нейробластому, миелому, различные виды рака головы и шеи, острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, саркому Юинга и периферическую нейроэпителиому. Предпочтительные виды рака включают рак печени, лимфому, острый лимфобластный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, саркому Юинга и периферическую нейроэпителиому.

То есть, конъюгаты антитело-линкер или конъюгаты антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению предпочтительно используются для лечения рака. Таким образом, в определенных вариантах осуществления изобретения конъюгаты антитело-линкер или конъюгаты антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению содержат антитело, которое специфически связывается с антигеном, присутствующим на опухолевой клетке. В определенных вариантах осуществления такой антиген может быть антигеном на поверхности опухолевой клетки. В определенных вариантах осуществления антиген на поверхности опухолевой клетки может быть интернализован в клетку вместе с конъюгатом антитело-линкер после связывания конъюгата антитело-линкер с антигеном.

Если конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство по

настоящему изобретению используются в лечении рака, предпочтительно, чтобы конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство содержали, по меньшей мере, одну нагрузку, способную убивать или ингибировать пролиферацию опухолевой клетки, с которой связывается конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство. В определенных вариантах осуществления, по меньшей мере, одна нагрузка проявляет свою цитотоксическую активность после того, как конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство были интернализированы в опухолевую клетку. В определенных вариантах осуществления, по меньшей мере, одна нагрузка представляет собой токсин.

Воспалительное заболевание может быть аутоиммунным заболеванием. Инфекционное заболевание может быть бактериальной или вирусной инфекцией.

В определенных вариантах осуществления конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство и/или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению могут применяться для лечения рака, ассоциированного с В-клетками.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к конъюгату антитело-линкер, конъюгату антитело-лекарственное средство или фармацевтической композиции для применения по настоящему изобретению, при этом конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство, входящие в фармацевтическую композицию, содержат Полатузумаб, и при этом неопластическое заболевание представляет собой рак, ассоциированный с В-клетками.

Для этого предпочтительно, чтобы конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство содержали антитело к CD79b, описанное в настоящем документе, предпочтительно, при этом антитело к CD79b интернализуется в клетку-мишень после связывания с CD79b. В определенных вариантах осуществления антитело к CD79b представляет собой Полатузумаб с тяжелой цепью, представленной в SEQ ID NO:5, и легкой цепью, представленной в SEQ ID NO:6.

Кроме того, предпочтительно, чтобы конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство содержали, по меньшей мере, один токсин.

В определенных вариантах осуществления антитело к CD79b, входящее в конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическую композицию, может быть конъюгировано с любым из линкеров, показанных на ФИГ. 1, 2, 3, 8, 9, 14 или 15, или с любым из линкеров, описанных в настоящем документе.

Рак, ассоциированный с В-клетками, может быть любым раком, выбранным из группы, состоящей из: лимфом высокой, средней и низкой степени дифференцировки (включая В-клеточные лимфомы, например, В-клеточную лимфому лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистыми оболочками, и неходжкинскую лимфому, мантийноклеточную лимфому, лимфому Беркитта, мелкоклеточную лимфоцитарную лимфому, лимфому маргинальной зоны, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, фолликулярную лимфому, лимфому Ходжкина и Т-клеточные лимфомы) и лейкозий (включая вторичные лейкозии, хроническую лимфоцитарную лейкемию, например, В-клеточную лейкемию (CD5+ В-лимфоциты), миелоидную лейкемию, например, острую миелоидную лейкемию, хроническую миелоидную лейкемию, лимфоидный лейкоз, например, острый лимфобластный лейкоз и миелодисплазию), и других гематологических и/или ассоциированных с В-клетками или Т-клетками раков, включая раки дополнительных гемопоэтических клеток, включая полиморфноядерные лейкоциты, такие как базофилы, эозинофилы, нейтрофилы и моноциты, дендритные клетки, тромбоциты, эритроциты и естественные клетки-киллеры. Также включены раковые В-клеточные пролиферативные заболевания, выбранные из следующих: лимфома, неходжкинская лимфома (НХЛ), агрессивная НХЛ, рецидивирующая агрессивная НХЛ, рецидивирующая медленно растущая НХЛ, рефрактерная НХЛ, рефрактерная медленно растущая НХЛ, хроническая лимфоцитарная лейкемия (ХЛЛ), мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома, лейкемия, волосатоклеточный лейкоз (ВКЛ), острая лимфоцитарная лейкемия (ОЛЛ) и мантийноклеточная лимфома.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер, конъюгату антитело-лекарственное средство или фармацевтической композиции для применения по настоящему изобретению, при этом ассоциированный

с В-клетками рак является неходжкинской лимфомой, в частности, при этом ассоциированный с В-клетками рак является диффузной В-крупноклеточной лимфомой.

Кроме того, конъюгат антитело к CD79b-линкер, конъюгат антитело к CD79b-лекарственное средство и/или фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антитело к CD79b-линкер или конъюгат антитело к CD79b-лекарственное средство, могут применяться в сочетании с другими видами терапии, подходящими для лечения ассоциированного с В-клетками рака.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер, конъюгату антитело-лекарственное средство или фармацевтической композиции для применения по настоящему изобретению, при этом конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция вводятся в комбинации с бендамустином и/или ритуксимабом.

Следует понимать, что конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция не обязательно должны вводиться одновременно с дополнительным терапевтическим средством, таким как бендамустин и/или ритуксимаб. Вместо этого конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция могут вводиться по другому графику введения и, следовательно, в разные дни с другими терапевтическими средствами, которые используются для лечения того же заболевания.

В определенных вариантах осуществления конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство и/или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению могут применяться для лечения HER2-положительного рака.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер, конъюгату антитело-лекарственное средство или фармацевтической композиции для применения по настоящему изобретению, при этом конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство,

входящие в фармацевтическую композицию, содержат Трастузумаб, и при этом неопластическое заболевание представляет собой HER2-положительный рак, в частности, HER2-положительный рак молочной железы, желудка, яичников или легких.

В этом отношении предпочтительно, чтобы конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство содержали антитело к HER2/neu, описанное в настоящем документе, предпочтительно, при этом антитело к HER2/neu интернализуется в клетку-мишень после связывания с HER2/neu. В определенных вариантах осуществления антитело к HER2/neu представляет собой Трастузумаб с тяжелой цепью, представленной в SEQ ID NO:7, и легкой цепью, представленной в SEQ ID NO:8. Кроме того, предпочтительно, чтобы конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство содержали, по меньшей мере, один токсин.

В определенных вариантах осуществления антитело к HER2/neu, входящее в конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическую композицию, может быть конъюгировано с любым из линкеров, показанных на ФИГ. 1, 2, 3, 8, 9, 14 или 15, или с любым из линкеров, описанных в настоящем документе.

HER2-положительный рак в контексте настоящего документа может быть, помимо прочего, HER2-положительным раком молочной железы, желудка, яичников или легких. Специалист может определить, является ли рак HER2-положительным раком. Например, опухолевые клетки могут быть выделены при биопсии, а присутствие HER2/neu может быть определено любым способом, известным в данной области.

Кроме того, конъюгат антитело к HER2//neu-линкер, конъюгат антитело к HER2/neu-лекарственное средство и/или фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антитело к HER2/neu-линкер или конъюгат антитело к HER2/neu-лекарственное средство, могут применяться в сочетании с другими видами терапии, подходящими для лечения HER2-положительного рака.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер, конъюгату антитело-лекарственное средство или

фармацевтической композиции для применения по настоящему изобретению, при этом конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция вводятся в комбинации с лапатинибом, капецитабином и/или таксаном.

Следует понимать, что конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция не обязательно должны вводиться одновременно с дополнительным терапевтическим средством, таким как лапатиниб, капецитабин и/или таксан. Вместо этого конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция могут вводиться по другому графику введения и, следовательно, в разные дни с другими терапевтическими средствами, которые используются для лечения того же заболевания.

В определенных вариантах осуществления конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство и/или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению могут применяться для лечения Нектин-4-положительного рака.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер, конъюгату антитело-лекарственное средство или фармацевтической композиции для применения по настоящему изобретению, при этом конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство, входящий в состав фармацевтической композиции, содержит Энфортумаб или вариант Энфортумаба, и при этом неопластическое заболевание представляет собой Нектин-4-положительный рак, в частности Нектин-4-положительный рак поджелудочной железы, рак легких, рак мочевого пузыря или рак молочной железы.

В этом отношении предпочтительно, чтобы конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство содержали антитело против Нектина-4, описанное в настоящем документе, предпочтительно, при этом антитело против Нектина-4 интернализуется в клетку-мишень после связывания с Нектином-4. В определенных вариантах осуществления антитело против Нектина-4 представляет собой Энфортумаб с тяжелой цепью, представленной в SEQ ID NO:9, и легкой цепью,

представленной в SEQ ID NO:10. Кроме того, предпочтительно, чтобы конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство содержали, по меньшей мере, один токсин.

В определенных вариантах осуществления антитело против Нектина-4, входящее в конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическую композицию, может быть конъюгировано с любым из линкеров, показанных на ФИГ. 1, 2, 3, 8, 9, 14 или 15, или с любым из линкеров, описанных в настоящем документе.

Нектин-4-положительный рак в контексте настоящего документа может быть, помимо прочего, Нектин-4-положительным раком поджелудочной железы, раком легких, раком мочевого пузыря или раком молочной железы. Опытный специалист может определить, является ли рак Нектин-4-положительным раком. Например, опухолевые клетки могут быть выделены при биопсии, а присутствие Нектина-4 может быть определено любым способом, известным в данной области.

Кроме того, конъюгат антитело против Нектина-4-линкер, конъюгат антитело против Нектина-4-лекарственное средство и/или фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антитело против Нектина-4-линкер или конъюгат антитело против Нектина-4-лекарственное средство, могут применяться в сочетании с другими видами терапии, подходящими для лечения Нектин-4-положительного рака.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер, конъюгату антитело-лекарственное средство или фармацевтической композиции для применения по настоящему изобретению, при этом конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция вводятся в комбинации с химиотерапевтическим средством на основе цисплатина и/или Пембролизумабом.

Следует понимать, что конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция не обязательно должны вводиться одновременно с дополнительным терапевтическим средством, таким как химиотерапевтическое средство на основе цисплатина и/или Пембролизумаб. Вместо этого конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или

фармацевтическая композиция могут вводиться по другому графику введения и, следовательно, в разные дни с другими терапевтическими средствами, которые используются для лечения того же заболевания.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в частности, при этом конъюгат антитело-линкер содержит, по меньшей мере, одну нагрузку, конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для производства лекарственного препарата для лечения пациента, который

- страдает от,
- подвержен риску развития и/или
- у которого диагностировано

неопластическое заболевание, неврологическое заболевание, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или инфекционное заболевание.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к способу лечения или профилактики неопластического заболевания, при этом указанный способ включает введение нуждающемуся в этом пациенту конъюгата антитело-линкер по настоящему изобретению, в частности, при этом конъюгат антитело-линкер содержит, по меньшей мере, одну нагрузку, конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению, или фармацевтической композиции по настоящему изобретению.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в частности, при этом конъюгат антитело-линкер содержит, по меньшей мере, одну нагрузку, конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в пред-, интра- или послеоперационной визуализации.

Таким образом, конъюгат антитело-линкер по настоящему изобретению может применяться в медицинской визуализации. Для этого конъюгат антитело-линкер может быть визуализирован при связывании с конкретной целевой молекулой,

клеткой или тканью. В данной области техники известны различные методы визуализации конкретных нагрузок. Например, если нагрузка представляет собой радионуклид, молекулы, клетки или ткани, с которыми связывается конъюгат антитело-линкер, могут быть визуализированы с помощью ПЭТ или ОФЭКТ. Если нагрузка представляет собой флуоресцентный краситель, молекулы, клетки или ткани, с которыми связывается конъюгат антитело-линкер, могут быть визуализированы с помощью флуоресцентной визуализации. В определенных вариантах осуществления конъюгат антитело-линкер по настоящему изобретению содержит две различные нагрузки, например, радионуклид и флуоресцентный краситель. В этом случае молекула, клетка или ткань, с которой связывается конъюгат антитело-линкер, может быть визуализирована с помощью двух различных и/или взаимодополняющих методов визуализации, например, ПЭТ/ОФЭКТ и флуоресцентной визуализации.

Конъюгат антитело-линкер может применяться для пред-, интра- и/или послеоперационной визуализации.

Предоперационная визуализация включает в себя все методы визуализации, которые могут применяться до операции, чтобы сделать конкретные целевые молекулы, клетки или ткани видимыми при диагностике определенного заболевания или состояния и, опционально, для руководства операцией. Предоперационная визуализация может включать этап обеспечения видимости опухоли с помощью ПЭТ или ОФЭКТ до проведения операции с использованием конъюгата антитело-линкер, который содержит антитело, специфически связывающееся с антигеном на опухоли, и конъюгированное с нагрузкой, содержащей радионуклид.

Интраоперационная визуализация включает в себя все методы визуализации, которые могут применяться во время операции, чтобы сделать видимыми определенные целевые молекулы, клетки или ткани и, таким образом, обеспечить руководство операцией. В определенных вариантах осуществления конъюгат антитело-линкер, содержащий флуоресцентный краситель ближнего инфракрасного диапазона, может применяться для визуализации опухоли во время операции с помощью флуоресцентной визуализации в ближнем инфракрасном диапазоне. Интраоперационная визуализация позволяет хирургу определить конкретные ткани,

например, опухолевую ткань, во время операции и, таким образом, может сделать возможной полное удаление опухолевой ткани.

Послеоперационная визуализация включает в себя все методы визуализации, которые могут применяться после операции, чтобы сделать видимыми определенные целевые молекулы, клетки или ткани и, таким образом, оценить результат операции. Послеоперационная визуализация может проводиться аналогично предоперационной визуализации.

В определенных вариантах осуществления изобретение относится к конъюгатам антитело-линкер, содержащим две или более различных нагрузок. Например, конъюгат антитело-линкер может содержать радионуклид и флуоресцентный краситель ближнего инфракрасного диапазона. Такой конъюгат антитело-нагрузка может применяться для визуализации методом ПЭТ/ОФЭКТ и флуоресцентной визуализации в ближней инфракрасной области. Преимущество такого антитела заключается в том, что его можно использовать для визуализации целевой ткани, например, опухоли до и после операции с помощью ПЭТ или ОФЭКТ. В то же время опухоль может быть визуализирована во время операции с помощью флуоресцентной визуализации в ближней инфракрасной области.

В конкретном варианте осуществления изобретение относится к конъюгату антитело-линкер по настоящему изобретению, в частности, при этом конъюгат антитело-линкер содержит, по меньшей мере, одну нагрузку, конъюгату антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для применения в хирургии рака под контролем интраоперационной визуализации.

Как упоминалось выше, конъюгат антитело-линкер по настоящему изобретению может применяться для визуализации целевой молекулы, клетки или ткани и для направления хирурга или робота во время операции. То есть, конъюгат антитело-линкер может применяться для визуализации опухолевой ткани во время операции, например, с помощью визуализации в ближнем инфракрасном диапазоне, что позволяет полностью удалить опухолевую ткань.

Конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или

фармацевтическая композиция по настоящему изобретению могут вводиться человеку или животному в количестве или дозе, которые эффективно лечат заболевание или достаточны для диагностических целей.

Конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению могут вводиться любым подходящим способом, включая парентеральное, внутрилегочное, интраназальное и, если желательно для местного лечения, внутриочаговое, внутриматочное или внутрипузырное введение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Дозирование может осуществляться любым подходящим способом, например, путем инъекций, таких как внутривенные или подкожные инъекции, частично, в зависимости от того, является ли введение препарата кратковременным или хроническим. В настоящем документе рассматриваются различные режимы дозирования, включая, помимо прочего, однократное или многократное введение в различные временные точки, болюсное введение и импульсную инфузию.

Конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению могут быть приготовлены, дозированы и введены способом, соответствующим изобретению, и должны быть приготовлены, дозированы и введены способом, соответствующим надлежащей медицинской практике. Факторы, которые необходимо учитывать в этом контексте, включают конкретное нарушение, требующее лечения, конкретное вскармливающее, получающее лечение, клиническое состояние конкретного пациента, причину нарушения, место доставки средства, способ введения, график введения и другие факторы, известные врачам. Конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению не обязательно должны быть, но по желанию могут быть приготовлены с одним или несколькими средствами, используемыми в настоящее время для профилактики или лечения рассматриваемого нарушения. Эффективное количество таких других средств зависит от количества конъюгата антитело-линкер, присутствующего в препарате, типа нарушения или лечения и других факторов, рассмотренных выше. Они обычно используются в тех же дозах и с теми же путями

введения, которые были описаны в настоящем документе, или примерно в объеме от 1 до 99% доз, описанных в настоящем документе, или в любой дозе и любым путем, которые были эмпирически/клинически определены как подходящие.

Для профилактики или лечения заболевания подходящая доза конъюгата антитело-линкер, конъюгата антитело-лекарственное средство или фармацевтической композиции по настоящему изобретению (при использовании отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими дополнительными терапевтическими средствами) будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа конъюгата антитело-нагрузка, тяжести и течения заболевания, от того, вводится ли конъюгат антитело-линкер в профилактических или терапевтических целях, предшествующей терапии, истории болезни и ответа пациента на применение конъюгата антитело-линкер, а также от решения лечащего врача. Конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению предпочтительно вводятся пациенту за один раз или в течение серии процедур.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЛЛЮСТРАЦИЙ

На **ФИГ.1** показана химическая структура комплекса линкер RКАА-ММАЕ-нагрузка по настоящему изобретению, в котором пептид Ас-RКАА с защищенным N-концом ковалентно связан с РАВС и ММАЕ.

На **ФИГ.2** показана химическая структура комплекса линкер RКА-ММАЕ-нагрузка по настоящему изобретению, в котором пептид Ас-RКА с защищенным N-концом ковалентно связан с РАВС и ММАЕ.

На **ФИГ.3** показана химическая структура комплекса линкер АRК-ММАЕ-нагрузка по настоящему изобретению, в котором пептид Ас-АRК с защищенным N-концом ковалентно связан с РАВС и ММАЕ.

На **ФИГ.4** показана химическая структура комплекса линкер КRА-ММАЕ-нагрузка по настоящему изобретению, в котором пептид Ас-КRА с защищенным N-концом ковалентно связан с РАВС и ММАЕ.

На **ФИГ.5** показана химическая структура комплекса линкер АKR-ММАЕ-нагрузка

по настоящему изобретению, в котором пептид Ас-АКР с защищенным N-концом ковалентно связан с РАВС и ММАЕ.

На **ФИГ.6** показана химическая структура комплекса линкер КААР-ММАЕ-нагрузка (не по настоящему изобретению), в котором пептид Ас-КААР с защищенным N-концом ковалентно связан с РАВС и ММАЕ.

На **ФИГ.7** показана химическая структура комплекса линкер КАРА-ММАЕ-нагрузка (не по настоящему изобретению), в котором пептид Ас-КАРА с защищенным N-концом ковалентно связан с РАВС и ММАЕ.

На **ФИГ.8** показана химическая структура комплекса линкер РКАА-майтанин-нагрузка по настоящему изобретению, в котором пептид Ас-РКАА с защищенным N-концом ковалентно связан с РАВС и мйтанином.

На **ФИГ.9** показана химическая структура комплекса линкер мйтанин-РКР-нагрузка по настоящему изобретению, в котором мйтанин ковалентно связан с С4-алкил-амидным спейсером, соединенным с пептидом РКР (имеющим С-концевую амидную защитную группу).

На **ФИГ.10** представлена хроматограмма эксклюзионной хроматографии конъюгата антитело-лекарственное средство АРА-01-РКАА-РАВС-ММАЕ по настоящему изобретению.

На **ФИГ.11** представлены результаты дозозависимого *in vitro* цитотоксического действия конъюгата антитело-лекарственное средство АРА-01-РКАА-РАВС-ММАЕ по настоящему изобретению против трех различных клеточных линий CD79b со сверхэкспрессией (а-с) и клеточной линии CD79b без экспрессии (d).

На **ФИГ.12** показаны концентрации в плазме полатузумаба (SEQ ID NO: 5 и 6), конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению (ARA01-РКАА-РАВС-ММАЕ) и полатузумаб-ведотина (Polivy®) в различные временные точки после однократной внутривенной инъекции 5 мг/кг мышам Swiss CD1. Концентрация в плазме определялась методом ИФА. Средние концентрации в плазме 5 мышей показаны в зависимости от времени, планки ошибок представляют собой стандартную ошибку среднего (СОС). Следует понимать, что сокращение АРА01-

РКАА-ММАЕ на ФИГ.12 означает конъюгат антитело-лекарственное средство АРА01-РКАА-РАВС-ММАЕ.

На **ФИГ.13** схематично показан одноэтапный процесс конъюгации.

На **ФИГ.14** показана химическая структура комплекса линкер АRK-PEG2-РАВС-ММАЕ-нагрузка по настоящему изобретению, в котором пептид Ас-ARK с защищенным N-концом ковалентно связан со спейсером PEG2 и нагрузкой РАВС-ММАЕ.

На **ФИГ.15** показана химическая структура комплекса линкер АRK-PEG2-(NH)-(CH₃)-S-C4-майтанин-нагрузка по настоящему изобретению, где пептид Ас-ARK с защищенным N-концом ковалентно связан со спейсером PEG2-(NH)-(CH₃)-S-C4 алкил и нагрузкой мйтанин.

На **ФИГ.16** изображена модель опухоли мыши Granta 519. Опухолевые клетки В-клеточной лимфомы человека-(Granta 519) подкожно прививали мышам СВ17 SCID (n=8 на группу лечения). Когда опухоли достигали размера около 200 мм³, животные получали однократную инъекцию 0,53 мг/кг или 2,1 мг/кг полатузумаб-ведотина (Polivy®) и либо 0,53 мг/кг, 1 мг/кг или 2,1 мг/кг АРА01-РКАА-РАВС-ММАЕ. АРА01-РКАА-РАВС-ММАЕ обеспечивал одинаковое ингибирование роста опухоли и выживаемость при примерно вдвое меньшей дозе нагрузки по сравнению с полатузумаб-ведотином (Фиг. 16А, и дозы 0,53 мг/кг на Фиг. 16В). При приблизительно равной дозе нагрузки по сравнению с полатузумаб-ведотином лечение АРА01-РКАА-РАВС-ММАЕ обеспечило более высокую противоопухолевую эффективность и значительное преимущество в плане выживаемости: 6/8 полных ремиссий опухоли по сравнению с полатузумаб-ведотином с 0/8 полных ремиссий опухоли (сравнение дозы 0,53 мг/кг полатузумаб-ведотина и дозы 1 мг/кг АРА01-РКАА-РАВС-ММАЕ на Фиг. 16В). Средние объемы опухолей показаны со ± стандартной ошибкой среднего (СОС).

На **ФИГ.17** показана химическая структура комплекса РКАА-нагрузка по настоящему изобретению, в котором пептид Ас-РКАА с защищенным N-концом ковалентно связан с производным эксатекана Dxd через самоотщепляющийся метил-аминовый линкер.

На **ФИГ.18** показана химическая структура комплекса РКАА-нагрузка по настоящему изобретению, в котором пептид Ас-РКАА с защищенным N-концом ковалентно связан с нагрузкой PNU-159682 через самоотщепляющийся компонент РАВС-ЕДА.

На **ФИГ.19** показана химическая структура комплекса РКАА-нагрузка по настоящему изобретению, в котором пептид Ас-РКАА с защищенным N-концом ковалентно связан с нагрузкой Дуокармицин ГА через самоотщепляющийся компонент РАВС-ЕДА.

На **ФИГ.20** показана химическая структура комплекса РКАА-нагрузка по настоящему изобретению, в котором пептид Ас-РКАА с защищенным N-концом ковалентно связан с нагрузкой РВД через самоотщепляющийся компонент РАВЕ.

На **ФИГ.21** показана химическая структура комплекса РКАА-нагрузка по настоящему изобретению, в котором пептид Ас-РКАА с защищенным N-концом ковалентно связан с нагрузкой майтанзин через самоотщепляющийся метил-аминовый линкер и дополнительную молекулу алькильного линкера.

На **ФИГ.22** показана химическая структура комплекса RKR-нагрузка по настоящему изобретению, в котором пептид Ас-RKR с защищенным N-концом непосредственно соединен с нагрузкой ММАЕ.

На **ФИГ.23** показана химическая структура комплекса РКАА-нагрузка по настоящему изобретению, в котором пептид Ас-РКАА с защищенным N-концом ковалентно связан с нагрузкой Дуокармицин ГА через самоотщепляющийся параметиланилиновый (РМА) компонент.

На **ФИГ.24** показана химическая структура комплекса RKR-нагрузка по настоящему изобретению, в котором пептид RKR-амид с защищенным C-концом ковалентно связан с нагрузкой PNU-159682 через карбамат.

На **ФИГ.25** показана химическая структура комплекса RKR-нагрузка по настоящему изобретению, в котором пептид RKR-амид с защищенным C-концом ковалентно связан с нагрузкой PNU-159682 через самоотщепляющийся компонент ОНРАС-РНВ-ЕДА и дополнительный компонент (РЕG)₂.

На **ФИГ.26** показана химическая структура комплекса RKR-нагрузка по настоящему изобретению, в котором пептид RKR-амид с защищенным С-концом ковалентно связан с нагрузкой PDB через самоотщепляющийся компонент ОНРАС и дополнительный компонент (PEG)₂.

На **ФИГ.27** показана химическая структура комплекса RKR-нагрузка по настоящему изобретению, в котором пептид RKR-амид с защищенным С-концом ковалентно связан с нагрузкой PDB через самоотщепляющийся компонент ОНРАС.

На **ФИГ.28** показана химическая структура комплекса RKR-нагрузка по настоящему изобретению, в котором пептид RKR-амид с защищенным С-концом непосредственно соединен с нагрузкой DM21.

На **ФИГ.29** показана химическая структура комплекса RKR-нагрузка по настоящему изобретению, в котором пептид RKR-амид с защищенным С-концом ковалентно связан с нагрузкой DM4 через молекулу алькильного линкера, содержащую карбоксильную группу и тиольную группу.

На **ФИГ.30** показана химическая структура комплекса RKR-нагрузка по настоящему изобретению, в котором пептид RKR-амид с защищенным С-концом ковалентно связан с нагрузкой MMAE через молекулу линкера дикарбоновой кислоты.

На **ФИГ.31** показана химическая структура комплекса RKR-нагрузка по настоящему изобретению, в котором пептид RKR-амид с защищенным С-концом ковалентно связан с нагрузкой MMAE через самоотщепляющийся компонент ОНРАС-РНВ и дополнительный компонент (PEG)₂.

На **ФИГ.32** показана химическая структура комплекса RKR-нагрузка по настоящему изобретению, в котором пептид RKR-амид с защищенным С-концом ковалентно связан с нагрузкой MMAE через самоотщепляющийся компонент ОНРАС-РНВ.

На **ФИГ.33** показана химическая структура комплекса RKR-нагрузка по настоящему изобретению, в котором пептид RKR-амид с защищенным С-концом ковалентно связан с нагрузкой Дуокармицин GA через самоотщепляющийся компонент ОНРАС-четвертичный аммоний и дополнительный компонент (PEG)₂.

На **ФИГ.34** показана химическая структура комплекса RKR-нагрузка по настоящему изобретению, в котором пептид RKR-амид с защищенным С-концом ковалентно связан с нагрузкой Дуокармицин GA через самоотщепляющийся компонент ОНРAS-четвертичный аммоний.

На **ФИГ.35** представлены результаты дозозависимого *in vitro* цитотоксического действия конъюгата антитело-лекарственное средство Трастузумаб-RKAA-PABC-MMAE или Трастузумаб-RKAA-PABC-майтанин по настоящему изобретению в отношении HER2-положительной клеточной линии SKBR-3.

На **ФИГ.36** представлены результаты дозозависимого *in vitro* цитотоксического действия конъюгатов антитело против CD79b-лекарственное средство ARA01-ARK-PABC-MMAE, ARA01-RKA-PABC-MMAE и ARA01-RKValCit-PABC-MMAE по настоящему изобретению в отношении CD79b-положительной клеточной линии Granta-519.

На **ФИГ.37** представлены результаты дозозависимого *in vitro* цитотоксического действия конъюгатов антитело против Нектина-4-лекарственное средство ARA04-RKAA-PABC-MMAE, ARA04-ARK-PABC-MMAE, ARA04-RKA-PABC-MMAE и ARA04-RKValCit-PABC-MMAE по настоящему изобретению в отношении Нектин-4-положительной клеточной линии SUM190PT.

На **ФИГ.38** представлены результаты дозозависимого *in vitro* цитотоксического действия конъюгатов антитело против Нектина-4-лекарственное средство ARA04-RKAA-PABC-MMAE, ARA04-ARK-PABC-MMAE, ARA04-RKA-PABC-MMAE и ARA04-RKValCit-PABC-MMAE по настоящему изобретению в отношении Нектин-4-отрицательной клеточной линии A549.

На **ФИГ.39** показаны концентрации в плазме полатузумаба/ARA01 (SEQ ID NO: 5 и 6), конъюгатов антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению (ARA01-ARK-PABC-MMAE, ARA01-RKA-PABC-MMAE, ARA01-RKValCit-PABC-MMAE) и полатузумаб-ведотина (Polivy®) в различные временные точки после однократной внутривенной инъекции 5 мг/кг мышам Swiss CD1. Концентрация ADC в плазме определялась методом ИФА. Средние концентрации в плазме 5 мышей показаны в зависимости от времени, планки ошибок представляют собой

стандартную ошибку среднего (СОС). Следует понимать, что сокращение ARA01-ARK/RKA/RKValCit-PABC-MMAE на ФИГ.39 означает конъюгаты антитело-лекарственное средство ARA01-ARK/RKA/RKValCit-PABC-MMAE.

На **ФИГ.40** показаны концентрации в плазме энфортумаба/ARA04 (SEQ ID NO: 9 и 11), конъюгатов антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению (ARA04-RKAA-PABC-MMAE, ARA04-ARK-PABC-MMAE, ARA04-RKA-PABC-MMAE, ARA04-RKValCit-PABC-MMAE) и энфортумаб-ведотина (Padcev®) в различные временные точки после однократной внутривенной инъекции 5 мг/кг мышам Swiss CD1. Концентрация ADC в плазме определялась методом ИФА. Средние концентрации в плазме 5 мышей показаны в зависимости от времени, планки ошибок представляют собой стандартную ошибку среднего (СОС). Следует понимать, что сокращение ARA04-ARK/RKA/RKValCit-PABC-MMAE на ФИГ.39 означает конъюгаты антитело-лекарственное средство ARA04-ARK/RKA/RKValCit-PABC-MMAE.

На **ФИГ.41** изображена модель опухоли мыши Ramos. Опухолевые клетки лимфомы Беркитта человека-(Ramos) подкожно прививали мышам CB17 SCID (n=6 на группу лечения). Когда опухоли достигали размера около 200 мм³, животные получали однократную инъекцию 1,43 мг/кг полатузумаб-ведотина (Polivy®) или 1,25 мг/кг (доза с поправкой на нагрузку полатузумаб ведотина) ARA01-RKAA-PABC-MMAE или ARA01-ARK-PABC-MMAE. Оба конъюгата ADC по настоящему изобретению обеспечивали одинаковое ингибирование роста опухоли, выживаемость и длительный противоопухолевый ответ при примерно вдвое меньшей дозе нагрузки по сравнению с полатузумаб-ведотином. Напротив, полатузумаб ведотин, с той же дозой нагрузки, продемонстрировал только преходящую элиминацию опухоли. Средние объемы опухолей показаны со ± стандартной ошибкой среднего (СОС).

На **ФИГ.42** изображена модель опухоли мыши SUM190PT. Опухолевые клетки рака молочной железы (SUM190PT) прививали в ткань молочной железы мышей CB17 SCID (n=6 на группу лечения). Когда опухоли достигали размера около 200 мм³, животные получали однократную инъекцию 1,5 мг/кг энфортумаб-ведотина (Padcev®) или 3 мг/кг (доза с коррекцией на нагрузку энфортумаб-ведотина) ARA04-RKAA-PABC-MMAE или ARA04-ARK-PABC-MMAE, соответственно. Оба

конъюгата ADC по настоящему изобретению обеспечили полный и длительный противоопухолевый ответ продолжительностью более 103 дней при тех же дозах нагрузки, что и энфортумаб-ведотин. Напротив, энфортумаб ведотин, с той же дозой нагрузки, продемонстрировал преходящий противоопухолевый ответ. При рассмотрении Фиг. 42 и 43 очевидно, что конъюгаты по настоящему изобретению, ARA04-RKAA-PABC-MMAE или ARA04-ARK-PABC-MMAE, показали более высокую эффективность даже при введении только 1/4 дозы нагрузки (= в 4 раза меньше). Несвязывающийся mAb-RKAA-PABC-MMAE не показал никакого влияния на рост опухоли. Средние объемы опухолей показаны со \pm стандартной ошибкой среднего (СОС).

На **ФИГ.43** изображена модель опухоли мыши SUM190PT. Опухолевые клетки рака молочной железы (SUM190PT) прививали в ткань молочной железы мышей CB17 SCID (n=6 на группу лечения). Когда опухоли достигали размера около 200 мм³, животные получали однократную инъекцию 0,5 мг/кг энфортумаб-ведотина (Padcev®) или 1 мг/кг (доза с коррекцией на нагрузку энфортумаб ведотина) ARA04-RKAA-PABC-MMAE или ARA04-ARK-PABC-MMAE. Оба конъюгата ADC по настоящему изобретению обеспечили полный и длительный противоопухолевый ответ продолжительностью более 103 дней при тех же дозах нагрузки, что и энфортумаб-ведотин. Напротив, энфортумаб-ведотин с той же дозой нагрузки обуславливал лишь незначительную задержку роста опухоли. Средние объемы опухолей показаны со \pm стандартной ошибкой среднего (СОС).

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Конъюгация линкеров пептид-MMAE с двумя различными антителами

Методы

Антитело трастузумаб было коммерчески доступным (Herceptin®, Roche, приобретено в аптеке), как и все конструкции линкер-нагрузка (синтезированы на заказ компанией Levena Biopharma). Полатузумаб с тяжелой и легкой цепью, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 5 и 6, временно трансфицировали в адаптированные к росту в суспензии клетки CHO-K1 и экспрессировали в среде без

сыворотки/компонентов животного происхождения. Белки очистили из супернатантов с помощью аффинной хроматографии на основе белка А (колонка Mab Select Sure; GE Healthcare).

Для 1-этапной конъюгации (см. Фиг. 13) использовали 5 мг/мл нативного, гликозилированного моноклонального антитела в 50 мМ Tris pH 7,6, микробную транскламиназу (MTG, Zedira) в концентрации 5 ед/мг в 50 мМ Tris pH 7,6 или воде и 5 молярные эквиваленты указанного соединения линкер-нагрузка и инкубировали в течение 24 часов при 37°C во вращающемся термомиксере. Эффективность конъюгации оценивали методом ЖХ-МС в условиях восстановления DTT. Восстановление образцов достигалось путем инкубации конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) в течение 10 мин при 37°C в буфере 50 мМ DTT/50 мМ Tris. Зонды анализировали в приборе Xevo G2-XS QTOF (Waters), соединенном с системой Acquity UPLC H-Class System (Waters) и колонкой ACQUITY UPLC BEH C18 Column. Эффективность конъюгации рассчитывали по деконволюированным спектрам и представляли в % антитела, конъюгированного с линкер-нагрузкой (=ADC). Интенсивности, полученные от обеих гликоформ (G1F и G0F), учитывали при расчете общей эффективности конъюгации, т.е.,

Общая эффективность конъюгации (%) = общая интенсивность - % интенсивности неконъюгированного антитела, что приводит к следующей формуле:

Эффективность конъюгации (%) = $100 * (1 - (\text{интенсивность (G1F)} + \text{интенсивность (G0F)}) / \text{общая интенсивность})$

Результаты

Эффективность конъюгации варьировалась в зависимости от структуры линкера и используемого антитела, однако можно заметить, что эффективность конъюгации была самой высокой, когда лизин-содержащие пептидные линкеры содержали мотив RK (Таблицы 3 и 4).

Таблица 3. Эффективность конъюгации комплексов линкер-нагрузка (по настоящему изобретению)

Линкер-нагрузка (по настоящему изобретению)	Эффективность конъюгации (%) к антителу трастузумаб	Эффективность конъюгации (%) к антителу полатузумаб
РКАА-ММАЕ (Фиг. 1)	100%	89%
РКА-ММАЕ (Фиг. 2)	100%	93%
АРК-ММАЕ (Фиг. 3)	100%	94%

Таблица 4. Показана эффективность конъюгации комплексов линкер-нагрузка (НЕ по настоящему изобретению).

Линкер-нагрузка (НЕ по настоящему изобретению)	Эффективность конъюгации (%) к антителу трастузумаб	Эффективность конъюгации (%) к антителу полатузумаб
KRA-ММАЕ (Фиг. 4) (SEQ ID NO:50)	43%	49%
AKR-ММАЕ (Фиг. 5) (SEQ ID NO:51)	68%	27%
КААР-ММАЕ (Фиг. 6) (SEQ ID NO:52)	64%	28%
KARA-ММАЕ (Фиг. 7) (SEQ ID NO:53)	77%	65%

Пример 2: Конъюгация пептид-майтанина с двумя различными антителами

Для того чтобы продемонстрировать, что высокая эффективность конъюгации может быть достигнута и с другой нагрузкой, кроме ММАЕ, мйтанин-содержащие конструкции линкер-нагрузка применили для конъюгации с двумя различными антителами.

Методы

Конъюгацию проводили точно так же, как описано в Примере 1. Соответствующие конструкции мйтанин-линкер были синтезированы на заказ компанией Levena Biopharm.

Результаты

При использовании другой нагрузки, кроме ММАЕ, в данном примере с майтанзином эффективность конъюгации также была очень высокой, когда лизин-содержащие пептидные линкеры содержали мотив РК (таблица 4). Этот пример показывает, что независимо от нагрузки эффективность конъюгации высока, когда лизин-содержащие пептидные линкеры содержат мотив РК.

Таблица 5. Показана эффективность конъюгации комплексов линкер-нагрузка (по настоящему изобретению)

Линкер-нагрузка (по настоящему изобретению)	Эффективность конъюгации (%) к антителу трастузумаб	Эффективность конъюгации (%) к антителу полатузумаб
РКАА-майтанзин (Фиг. 8)	92%	82%
Майтанзин-RKR (Фиг. 9)	96%	95%

Пример 3: Конъюгация конструкций линкер-нагрузка (по настоящему изобретению) с третьим антителом

Для дальнейшей демонстрации высокой эффективности конъюгации, полученной с конструкциями линкер нагрузка (по настоящему изобретению), было выбрано третье антитело, которое было успешно конъюгировано с высокой эффективностью (для двух различных нагрузок, что еще больше демонстрирует универсальность применения).

Методы

Конъюгацию проводили точно так же, как описано в Примере 1. Антитело Энфортумаб с тяжелой цепью, состоящей из последовательности SEQ ID NO: 9, и вариантом легкой цепи, состоящей из последовательности SEQ ID NO: 10, временно трансфицировали в адаптированные к росту в суспензии клетки CHO-K1 и экспрессировали в среде без сыворотки/компонентов животного происхождения.

Белки очистили из супернатантов с помощью аффинной хроматографии на основе белка А (колонка Mab Select Sure; GE Healthcare).

Результаты

Высокая эффективность конъюгации была получена с антителом Энфортумаб с использованием двух различных конструкций линкер-нагрузка по настоящему изобретению.

Таблица 6. Показана эффективность конъюгации комплексов линкер-нагрузка (по настоящему изобретению)

Линкер-нагрузка (по настоящему изобретению)	Эффективность конъюгации (%) к антителу Энфортумаб
РКАА-ММАЕ (Фиг.1)	91%
РКАА-майтанин (Фиг. 8)	97%

Пример 4: Конъюгация линкер-нагрузок (по настоящему изобретению), содержащих неаминокислотные спейсеры

Для того, чтобы дополнительно продемонстрировать высокую эффективность конъюгации, полученную с конструкциями линкер-нагрузка (по настоящему изобретению), использовали линкеры, имеющие полиэтиленгликолевые (ПЭГ) спейсеры, которые конъюгировали с двумя различными антителами с высокой эффективностью.

Методы

Конъюгацию проводили точно так же, как описано в Примере 1. Все конструкции линкер-нагрузка были синтезированы на заказ компанией Levena Biopharma.

Результаты

Высокая эффективность конъюгации с двумя различными антителами была получена с конструкциями линкер-нагрузка (по настоящему изобретению), содержащими ПЭГ спейсеры.

Таблица 7. Показана эффективность конъюгации комплексов линкер-нагрузка (по настоящему изобретению)

Линкер-нагрузка (по настоящему изобретению)	Эффективность конъюгации (%) к антителу трастузумаб	Эффективность конъюгации (%) к антителу полатузумаб
ARK-PEG2-PAVC-MMAE (Фиг.14)	99%	92%
ARK-PEG2-S-C4-майтанин (Фиг. 15)	99%	90%

Пример 5: Конъюгаты ADC по настоящему изобретению являются мономерными и не агрегируют

Конструкцию линкер-нагрузка RКАА-PAVC-MMAE (Фиг. 1) конъюгировали с антителом Полатузумаб (SEQ ID NO: 5 и 6), как описано выше в Примере 1. Полученный конъюгат ADC, названный АRA-01-RКАА-PAVC-MMAE, имел отношение лекарственное средство/ антитело (DAR) 1,9 (определенное с использованием стандартных методов масс-спектрометрии, описанных в Richard Y.C. Huang and Guodong Chen (2016) Characterization of antibody-drug conjugates by mass spectrometry: advances and future trends, Drug Discover Today Volume 21, Number 5), его анализировали методом эксклюзионной хроматографии.

Методы

Эксклюзионная хроматография (SEC) проводилась с использованием АКТА FPLC (Amersham Pharmacia Biotech) с колонкой Superdex™ 200 Increase 10/300 (Amersham Pharmacia Biotech). Белки определяли с помощью УФ/видимой области спектра при длине волны 280 нм. Образцы анализировали при расходе 1 мл/мин в подвижном буфере 50 мМ фосфат, 100 мМ NaCl, pH 7,4.

Результаты

Профили эксклюзионной хроматографии (SEC) после очистки показали, что АRA-01-RКАА-MMAE элюируется в виде одиночного мономерного пика, что свидетельствует о превосходных биофизических свойствах конъюгата ADC (Фиг. 10).

Пример 6: Конъюгаты ADC по настоящему изобретению демонстрируют значительный противоопухолевый эффект *in vitro*

Методы

Ингибирующий рост эффект ARA01-RKAA-PAVC-MMAE исследовали *in vitro* на следующих трех клеточных линиях CD79b со сверхэкспрессией: Granta-519 (DSMZ, Acc No: 342), ВJAB (CLS) и WSU-DLCL2 (DSMZ, ACC 575). В качестве отрицательного контроля использовали CD79-отрицательную клеточную линию НТ (ATCC, Ref: CRL-2260). 4000 клеток высевали в 96-луночные культуральные планшеты и инкубировали с ARA-01-RKAA-PAVC-MMAE в течение 72 часов при 37°C во влажной камере и 5% CO₂.

Жизнеспособность обработанных культур определяли посредством АТФ-количественного определения в системе люминесцентного анализа CellTiterGloLuminescence Assay в соответствии с описанием поставщика (Promega). % жизнеспособности по отношению к необработанным клеткам рассчитывали по формуле:

$$\% \text{жизнеспособности} = \left(\frac{OD_{\text{эксперимент.}} - OD_{\text{контроль}}}{OD_{\text{необработ.}} - OD_{\text{контроль}}} \right) \times 100$$

Средний % жизнеспособности определили по log₁₀ (концентрация), а полученные кривые доза-ответ анализировали методом нелинейной регрессии с помощью программы *Prism8* с применением уравнения кривой доза-ответ с четырьмя параметрами.

Результаты

На Фиг. 11 показано, что ARA01-RKAA-PAVC-MMAE обладал очень высокой цитотоксической активностью в отношении сверхэкспрессирующих клеток CD79b со значениями EC₅₀, сравнимыми с обычными конъюгатами ADC. Цитотоксическая активность была высокоселективной в отношении сверхэкспрессирующих клеток CD79b, поскольку в клеточной линии НТ, как и ожидалось, практически не наблюдалось снижения жизнеспособности клеток. В целом, ARA01-RKAA-PAVC-

ММАЕ продемонстрировал антиген-специфическую, значительную антипролиферативную активность *in vitro*.

Пример 7: Конъюгаты ADC по настоящему изобретению демонстрируют благоприятные фармакокинетические параметры *in vivo*

Фармакокинетический профиль конъюгата антитела против CD79b по настоящему изобретению ARA01-RKAA-MMAE исследовали на мышах и сравнили с коммерчески доступным конъюгатом антитела против CD79b полатузумаб-ведотин (Polivy®). Полатузумаб-ведотин - это конъюгат ADC, состоящий из антитела против CD79b полатузумаб, в котором MMAE конъюгирован с цистеинами антитела, что привело к образованию, в среднем, 3,5 связанных компонентов MMAE на антитело (Европейское агентство по лекарственным средствам, Отчет об оценке Polivy®, номер процедуры: EMEA/H/C/004879/0000, см. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/polivy>).

Методы

ARA01-RKAA-PABC-MMAE (произведено собственными силами, как описано в Примере 5 выше), Polivy® (Roche, приобретено в аптеке) и голое антитело против CD79b полатузумаб (SEQ ID NO: 5 и 6; экспрессированное и очищенное так, как описано выше) вводили внутривенно 5 самкам мышей (CD1 Swiss, Janvier) в дозе 5 мг/кг конъюгата ADC или антитела, соответственно. Через 10 минут, 5,5, 24, 48, 96, 144, 168 и 360 часов примерно 20 мкл крови из подкожной вены забирали в покрытые ЭДТА пробирки Microvettes CB 300 (Sarstedt). Образцы крови центрифугировали в течение 10 минут при 9500 x g, и плазму хранили при -80° до проведения анализа ИФА. Используя серии разведений с известными концентрациями соответствующего образца, концентрацию в плазме определяли методом ИФА с использованием His-меченного человеческого CD79b в качестве захватывающего средства: 125 нг HisCD79b (SinoBiological, спр.: 29750-H08H), разведенного в PBS, добавляли на никелевые панели (Ni-NTA HisSorb, Qiagen) и после блокирования 200 мкл PBS, 4% молока (Rapilait, Migros, Швейцария), добавляли 50 мкл разведенного образца плазмы (в PBS, 4% молока). После инкубации в течение 1 ч и промывки PBS определяли либо общее антитело посредством добавления HRP-связанного антитела осла к IgG

человека (Biolegend, Poly24109) к лункам, либо для определения общего конъюгата добавляли кроличье антитело к MMAE антитело (Levena, спр: LEV-PAE1) еще на час при комнатной температуре, промывали и определяли с помощью антитела к IgG кролика, HRP-связанного. Активность пероксидазы определяли добавлением 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (Sigma) и останавливали добавлением кислоты. Показания измеряли через 1-5 минут при длине волны 450 нм. На основании концентраций образцов, определенных методом ИФА в плазме в различные моменты времени после инъекции, и полученного наклона к фазы элиминации (временные точки 24ч-360ч) (построенного в полулогарифмической шкале), были рассчитаны периоды полураспада ($t_{1/2}$) образцов по формуле $t_{1/2} = \ln 2 / -k$.

Результаты

Концентрации в плазме, измеренные в образцах, взятых в различные моменты времени после введения препарата, показаны на Фиг. 12. Периоды полураспада ARA01-RKAA-PAVC-MMAE и Polivy® приведены ниже в таблице 4. Можно видеть, что конъюгат по настоящему изобретению, ARA01-RKAA-PAVC-MMAE, имел, по крайней мере, в 2 раза более длительный период полураспада, чем утвержденный конъюгат Polivy® *in vivo*. Улучшенная стабильность в плазме может привести к улучшению профиля безопасности, так как нагрузка, по-видимому, не высвобождается преждевременно.

Таблица 8. Период полураспада в плазме

Конструкция	Период полураспада ($t_{1/2}$), часы
Полатузумаб (SEQ ID NO: 5 и 6), голое антитело	385
ARA01-RKAA-MMAE, интактный конъюгат	248
Полатузумаб-ведотин (Polivy®), интактный конъюгат	120

Пример 8: Конъюгат антитела против CD79b по настоящему изобретению ингибирует рост опухоли *in vivo* более эффективно, чем утвержденный конъюгат антитела против CD79b полатузумаб-ведотин.

Конъюгат антитела против CD79b ARA01-RKAA-PABC-MMAE исследовали *in vivo* на предмет ингибирования роста опухоли и сравнили с коммерчески доступным полатузумаб-ведотином.

Методы

20 x 10⁶ опухолевых клеток В-клеточной лимфомы человека Granta 519 (DSMZ, Acc No: 342) ввели подкожно мышам CB17 SCID (Janvier). Размеры опухоли и вес тела регистрировали три раза в неделю. Объем опухоли рассчитывали по формуле $объем = (ширина)^2 \times длина \times 0,5$. Когда средний размер опухоли достигал примерно 200 мм³, мышей распределяли с помощью протокола неслучайной стратификации на группы лечения по восемь мышей в каждой. ARA01-RKAA-PABC-MMAE (полученный собственными силами, как описано в Примере 5 выше) в дозах 0,53 мг/кг, 1 мг/кг и 2,1 мг/кг и полатузумаб ведотин в дозах 0,53 мг/кг и 2,1 мг/кг вводили в виде одной внутривенной инъекции в день 0 (день рандомизации). Мышам контрольной группы вводили PBS. Все эксперименты на мышах проводились в соответствии со швейцарскими рекомендациями и были одобрены Ветеринарным управлением Цюриха, Швейцария. В соответствии с этими рекомендациями, мышей умертвили на 10 день для группы PBS и всех доз 0,53 мг/кг, а также 2 мышей в группе 1 мг/кг на 6 и 30 день (изъязвление опухоли).

Результаты:

Эффективность *in vivo* ARA01-RKAA-PABC-MMAE (DAR 1,9) по сравнению с полатузумаб-ведотином (DAR 3,5) оценивали на модели опухоли Granta 519. В частности, животные получали однократную инъекцию 0,53 мг/кг или 2,1 мг/кг полатузумаб-ведотина (Polivy®) и либо 0,53 мг/кг, 1 мг/кг или 2,1 мг/кг ARA01-RKAA-PABC-MMAE. Важен тот факт, что ARA01-RKAA-PABC-MMAE обеспечивал одинаковое ингибирование роста опухоли и выживаемость при примерно вдвое меньшей дозе нагрузки по сравнению с полатузумаб-ведотином (см. сравнение доз 2 мг/кг на Фиг. 16А и доз 0,53 мг/кг на Фиг. 16В). При приблизительно равной дозе нагрузки по сравнению с полатузумаб-ведотином лечение ARA01-RKAA-PABC-MMAE обеспечило более высокую противоопухолевую эффективность и значительное преимущество в плане выживаемости: 6/8 полных ремиссий опухоли по

сравнению с полатузумаб-ведотином с 0/8 полных ремиссий опухоли (сравнение дозы 0,53 мг/кг полатузумаб-ведотина и дозы 1 мг/кг ARA01-RKAA-PAVC-MMAE на Фиг. 16B). В целом, при примерно одинаковых дозах нагрузки лечение ARA01-RKAA-PAVC-MMAE обусловило более высокую противоопухолевую эффективность и значительное преимущество в выживаемости по сравнению с полатузумаб-ведотином.

Пример 9: Конъюгация различных пептидов с мотивом RK с антителом Трастузумаб

Все проанализированные РК-содержащие пептиды конъюгировались с высокой эффективностью.

Методы

Реакции конъюгации были адаптированы к условиям, описанным в примере 1. Если описать кратко, 5 мг/мл нативного, гликозилированного антитела Трастузумаб, МТГ в концентрации 1,5 ед/мг и 20 молярных эквивалентов указанного пептид-линкера, содержащего мотив RK, в Tris 50 mM pH 7,6 смешивали в течение 24 часов при 37°C во вращающемся термомиксере. Эффективность конъюгации оценивалась с помощью ЖХМС следующим образом: Эффективность конъюгации (ЭК) рассчитывали по деконволюированным спектрам и представляли в %. Для расчета учитывались интенсивности, полученные от обеих гликоформ (G1F и G0F), в соответствии с формулой:

$$CE \% = \frac{\sum((Int(G0F + G1F))_{cj})}{\sum(Int(G0F + G1F))_{cj,ncj}}$$

где cj = конъюгированный и ncj = неконъюгированный

Результаты

Все проанализированные линкеры с мотивом RK конъюгировались с нативным, полностью гликозилированным трастузумабом с эффективностью >50%, как показано в Таблице 9.

Таблица 9. Эффективность конъюгации пептидных линкеров, содержащих мотив RK, с трастузумабом

Пептидный линкер с мотивом RK	Эффективность конъюгации (%)
HRKHA (SEQ ID NO:55)	98%
HRKAH (SEQ ID NO:56)	91%
RKAH (SEQ ID NO:57)	91%
RKH (SEQ ID NO:58)	87%
RKAA (SEQ ID NO:1)	86%
RKA (SEQ ID NO:2)	86%
RKHA (SEQ ID NO:59)	86%
RKHH (SEQ ID NO:60)	85%
ARKAH (SEQ ID NO:61)	82%
ARKHA (SEQ ID NO:62)	82%
HRK (SEQ ID NO:63)	81%
RKAAH (SEQ ID NO:64)	81%
ARKHH (SEQ ID NO:65)	80%
RKAAA (SEQ ID NO:66)	80%

Пример 10: Конъюгация конструкций RK-мотив-пептид

Метод

Условия реакции: 5 мг/мл нативного, гликозилированного антитела Трастузумаб, МТГ в концентрации 5 ед/мг и 5 молярных эквивалентов указанного пептид-линкера в Tris 50 mM pH 7,6 в течение 24 часов при 37°C во вращающемся термомиксере. Эффективность конъюгации оценивали методом ЖХ-МС, описанном в Примере 9.

Результаты

Пептиды, содержащие мотив RK, конъюгировались со значительной эффективностью конъюгации, как показано в Таблице 10.

Таблица 10. Эффективность конъюгации пептидных линкеров, содержащих мотив RK, с трастузумабом

Пептидный линкер с мотивом RK	Эффективность конъюгации (%)
PKAAP (SEQ ID NO:67)	95%
RRKAY (SEQ ID NO:68)	100%
RRK (SEQ ID NO:69)	99%
ARKRA (SEQ ID NO:70)	98%

Пример 11: Конъюгация конструкций линкер-нагрузка с РК мотивом с MMAE

Для того, чтобы показать, что конструкции линкер-нагрузка с мотивом RK также подходят для одноэтапной конъюгации антител, дополнительные конструкции линкер-нагрузка, содержащие мотив RK, с использованием MMAE в качестве нагрузки, использовали для конъюгации с трастузумабом.

Метод

Реакции конъюгации проводили путем смешивания 5 мг/мл нативного, гликозилированного антитела Трастузумаб, МТГ в концентрации 5 ед/мг и 5 молярных эквивалентов указанной конструкции линкер-нагрузка в Tris 50 мМ pH 7,6, в течение 24 часов при 37°C во вращающемся термомиксере. Эффективность конъюгации оценивали методом ЖХ-МС, описанном в Примере 9.

Результаты

Удивительно, но была получена превосходная эффективность конъюгации (выше 85%) при использовании различных конструкций линкер-нагрузка с мотивом RK, содержащих MMAE, для конъюгации с нативным, гликозилированным антителом Трастузумаб, как показано в таблице 11А. Удивительно, но было замечено, что эффективность конъюгации была значительно ниже, когда конструкции линкер-нагрузка НЕ содержала мотив RK, как показано в таблицах 11А и 11В.

Таблица 11А. Эффективность конъюгации конструкций линкер-нагрузок с мотивом РК, содержащих MMAE, с трастузумабом (по настоящему изобретению)

РК-линкер-нагрузка с MMAE	Эффективность конъюгации (%)
RKAA-PABC-MMAE (SEQ ID NO:1)	100%
RKA-PABC-MMAE (SEQ ID NO:2)	100%
ARK-PABC-MMAE (SEQ ID NO:3)	100%
RKAAR-PABC-MMAE (SEQ ID NO:67)	99%
RRKAY-PABC-MMAE (SEQ ID NO:68)	100%
RRK-PABC-MMAE (SEQ ID NO:69)	96%
ARKRA-PABC-MMAE (SEQ ID NO:70)	89%
RKValCit-PABC-MMAE (SEQ ID NO:54)	91%
ARK-PEG2-PABC-MMAE (SEQ ID NO:3)	99%

Таблица 11В. Эффективность конъюгации конструкций линкер-нагрузка без мотива РК с MMAE (**НЕ** по настоящему изобретению).

Конструкция линкер-нагрузка без РК с MMAE	Эффективность конъюгации (%)
KRA-PABC-MMAE (SEQ ID NO:50)	43%
AKR-PABC-MMAE (SEQ ID NO:51)	68%
KR-PABC-MMAE (SEQ ID NO:71)	46%
KAAR-PABC-MMAE (SEQ ID NO:52)	64%
KARA-PABC-MMAE (SEQ ID NO:53)	77%
КАА-PABC-MMAE (SEQ ID NO:72)	57%

Пример 12: Конъюгация конструкций линкер-нагрузка с мотивом РК с использованием альтернативных классов нагрузок

Чтобы продемонстрировать универсальность технологии линкеров по настоящему изобретению, для конъюгации с трастузумабом использовали различные конструкции линкер-нагрузка с мотивом РК. Нагрузки выбрали из следующих классов нагрузок: цитотоксины, стероиды (кортизол = CS) и проанализировали иммуномодуляторы (т.е. агонисты STING).

Метод

Реакции конъюгации проводили путем смешивания 5 мг/мл нативного, гликозилированного антитела Трастузумаб, МТГ в концентрации 5-10 ед/мг и 5-10 молярных эквивалентов указанной конструкции линкер-нагрузка в Tris 50 мМ рН 7,6, в течение 24 часов при 37°C во вращающемся термомиксере. Эффективность конъюгации оценивали методом ЖХ-МС, описанном в Примере 9.

Результаты

Удивительно, но превосходная эффективность конъюгации (выше 80%) была достигнута при использовании различных вариантов линкеров с мотивом RK и классов нагрузок, показанных в таблице 4. Также было удивительно наблюдать, что нагрузка, расположенная в N-концевом положении, очень хорошо переносится (что продемонстрировал Май-C5-RKR).

Таблица 12. Эффективность конъюгации конструкции линкер-нагрузка, содержащих линкеры с мотивом RK, с 3 различными классами нагрузок.

Конструкция линкер с мотивом RK-нагрузка с различными токсинами и лекарственными средствами	Эффективность конъюгации (%)
RKAA-PABC-Май (SEQ ID NO:1)	92%
RKAA-PABC- Экза (SEQ ID NO:1)	98%
RKAA-PABC-EDA-PNU (SEQ ID NO:1)	99%
RKAA-PABE-Аманитин (SEQ ID NO:1)	90%
RKAA-EDA-Кортизол (SEQ ID NO:1)	88%
RKAA-PABC-EDA-STING (SEQ ID NO:1)	96%
RKAAR-PABC- Экза (SEQ ID NO:67)	99%
RKAAR-EDA-CS (SEQ ID NO:67)	98%
ARK-S-C5-Май (SEQ ID NO:3)	98%
ARK-PABC- Экза (SEQ ID NO:3)	94%
ARK-PEG2-S-C5-Май (SEQ ID NO:3)	99%
Май-C5-RKR (SEQ ID NO:4)	96%
RRK-PABC-Еха (SEQ ID NO:69)	83%

Май: Майтанзин; Экса: Производное экзатекана; STING (стимулятор генов интерферона; класс иммуностимуляторов); PNU (аналог антрациклина).

Пример 13: Конъюгация конструкций линкер-нагрузка с мотивом RK с тремя различными антителами

Для демонстрации универсальности применения реакции выбранные конструкции линкер с мотивом RK-нагрузка, содержащие MMAE или майтанзин (Май), конъюгировали с тремя различными антителами: Трастузумаб, Полатузумаб и вариант Энфортумаба (тяжелая цепь SEQ ID NO: 9 и легкая цепь SEQ ID: 11).

Метод

Реакции конъюгации проводили путем смешивания 5 мг/мл нативного, гликозилированного антитела, МТГ в концентрации 5-10 ед/мг и 5-10 молярных эквивалентов указанной конструкции линкер-нагрузка в Tris 50 mM pH 7,6, в течение 24 часов при 37°C во вращающемся термомиксере. Эффективность конъюгации оценивали методом ЖХ-МС, описанном в Примере 9.

Результаты

Удивительно, но была достигнута высокая эффективность конъюгации всех трех протестированных антител со всеми проанализированными конструкциями мотив RK-MMAE- или линкер Май-нагрузка, показанными в Таблице 13.

Таблица 13. Эффективность конъюгации конструкций линкер-нагрузка с тремя различными антителами

RK-линкер-нагрузка	Эффективность конъюгации (%) с Трастузумабом	Эффективность конъюгации (%) с Полатузумабом	Эффективность конъюгации (%) с Энфортумабом
RKAA-PABC-MMAE (SEQ ID NO:1)	100%	98%	96%
ARK-PABC-MMAE (SEQ ID NO:3)	100%	94%	97%
RKA-PABC-MMAE (SEQ ID NO:2)	100%	93%	95%
RKValCit-PABC-MMAE (SEQ ID NO:54)	91%	97%	87%

РК-линкер-нагрузка	Эффективность конъюгации (%) с Трастузумабом	Эффективность конъюгации (%) с Полатузумабом	Эффективность конъюгации (%) с Энфортумабом
РКАА-РАВС-Май (SEQ ID NO:1)	92%	82%	94%
Май-С5-RKR (SEQ ID NO:4)	96%	95%	НП

НП: не проанализировано

Пример 14: Конъюгация конструкции линкер с мотивом РК-нагрузка с различными условиями реакции

Чтобы продемонстрировать, что конъюгация с конструкциями РК-линкер-нагрузка допускает широкий спектр условий реакции, конъюгацию конструкций линкер-нагрузка с Полатузумабом проводили с использованием ряда условий реакции с различными параметрами.

Метод

В качестве стандартных условий использовались следующие параметры: 5 мг/мл нативного, гликозилированного антитела Полатузумаб, МТГ в концентрации 5 ед/мг и 5 молярных эквивалентов РКАА-РАВС-ММАЕ в Tris 50 мМ рН 7,6 в течение 24 часов при 37°C во вращающемся термомиксере. Эффективность конъюгации оценивали методом ЖХ-МС, описанном в Примере 9.

Переменные параметры приведены в Таблице 14.

Результаты

Конъюгирование конструкций линкер РКАА-РАВС-ММАЕ-нагрузка происходило с очень высокой эффективностью конъюгации в очень большом диапазоне условий реакции: Эффективность конъюгации > 80% была достигнута при использовании концентрации антитела от 5 до 17 мг/мл, концентрации МТГ относительно концентрации антитела (ед/мг) от 2 до 10 ед/мг. Кроме того, высокая эффективность конъюгации была получена при молярных концентрациях линкера по отношению к

антителу (от 2 до 8 эквивалентов), а также в очень широком диапазоне pH (от pH 6,0 с эффективностью конъюгации 67% и pH 8 - 86%).

Удивительно, но более высокая эффективность конъюгации была получена при меньшем избытке конструкции линкер-нагрузка по сравнению с антителом, т.е. 2-20 эквивалентов конструкции линкер-нагрузка обеспечивали более высокую эффективность конъюгации, чем использование 80 эквивалентов, что противоречит ожиданиям. (Таблица 14).

Таблица 14. Эффективность конъюгации конструкции РК-линкер-нагрузка с Полатузумабом в различных условиях реакции

Влияние параметров реакции на эффективность конъюгации									
Параметры	Конечная концентрация антитела (мг/мл)								
	5	6	8	10	15	17			
ЭК (%)	98%	95%	95%	96%	86%	95%			
Параметры	Нагрузка МТГ (ед/мг)								
	2	3	3,5	4,5	5	6	9	10	
ЭК (%)	94%	92%	95%	97%	98%	100%	96%	88%	
Параметры	Молярный эквивалент конструкции РК-линкер-нагрузка относительно антитела								
	2	2,5	3	4	5	6	8	20	80
ЭК (%)	70%	81%	80%	92%	98%	94%	93%	71%	50%
Параметры	pH								
	6,0	6,5	7,0	7,5	7,6	8,0			
ЭК (%)	67%	86%	91%	90%	98%	86%			

Пример 15: Конъюгаты ADC, содержащие конструкции линкер РК-мотив-РАВС-нагрузка, являются эффективными *in vitro* при использовании трех различных антител

Для демонстрации того, что конъюгаты ADC по настоящему изобретению, т.е. созданные с использованием конструкций линкер мотив RK-ММАЕ/майтанин-нагрузка, приводят к эффективному высвобождению и мишень-специфической токсичности на линиях раковых клеток, конъюгаты на основе Трастузумаба, Полатузумаба (ARA01) и Энфортумаба (SEQ ID 9 и SEQ ID 11; ARA04) проанализировали на мишень-экспрессирующих клетках с использованием линкеров RКАА-РАВС-ММАЕ, RКАА-РАВС-майтанин, АRK-РАВС-ММАЕ, RКА-РАВС-ММАЕ и RКValCit-ММАЕ.

Метод

Действие по ингибированию роста конъюгатов Трастузумаб-RКАА-РАВС-ММАЕ и Трастузумаб-RКАА-РАВС-майтанин проанализировали на HER-2 положительных клетках SKBR-3 (ATCC HTB-30), ингибирующее действие ARA01-ARK-РАВС-ММАЕ, ARA01-RКА-РАВС-ММАЕ и ARA01-RКValCit-РАВС-ММАЕ проанализировали на CD79b-положительных клетках лимфомы Granta-519, а цитотоксическое воздействие ARA04-RКАА-РАВС-ММАЕ, ARA04-ARK-РАВС-ММАЕ, ARA04-RКА-РАВС-ММАЕ и ARA04-RКValCit-РАВС-ММАЕ проанализировали на Нектин-4-положительных клетках рака молочной железы, SUM190PT (BIOIVT, 28068A16284). Зависимость от мишени и мишень-специфичность проанализировали на Нектин-4-отрицательных клетках карциномы легких A549 (ATCC CCL-185). Для всех условий 4000 клеток высеяли в 96-луночные культуральные планшеты и инкубировали с соответствующими конъюгатами ADC в течение 72 часов при 37°C во влажной камере и 5% CO₂.

Результаты

На Фиг. 35 показано, что и Трастузумаб-RКАА-РАВС-ММАЕ, и Трастузумаб-RКАА-РАВС-Майтанин по настоящему изобретению проявляют очень высокую цитотоксическую активность в отношении HER-2 сверхэкспрессирующих клеток со значениями EC₅₀, сравнимыми с обычными конъюгатами ADC.

Из конъюгатов, направленных на CD79b и Нектин-4, конъюгаты ARA01 и ARA04, содержащие различные линкеры по настоящему изобретению, проявляют очень высокую и мишень-специфическую цитотоксическую активность в отношении

мишень-положительных клеток Granta-519 (Фиг. 36) и SUM190PT (Фиг. 37), соответственно. Значения EC_{50} находятся в диапазоне обычных конъюгатов ADC. Напротив, те же конъюгаты ADC не влияют на мишень-отрицательные клетки A549 (Фиг. 38) и демонстрируют действие, сравнимое с обычными конъюгатами ADC.

В целом, все конъюгаты ADC, использующие конструкции линкер с мотивом RK-нагрузка по настоящему изобретению, конъюгированные с Трастузумабом, Полатузумабом или Энфортумабом в качестве исходных антител, показали мишень-специфическую и значительную антипролиферативную активность *in vitro*.

Пример 16: Конъюгаты ADC, содержащие конструкции линкер РК-мотив-РАВС-ММАЕ-нагрузка, демонстрируют благоприятные фармакокинетические свойства *in vivo*

Для оценки стабильности *in vivo* конъюгатов с РК-мотивом и ММАЕ были проведены фармакокинетические исследования на мышах с использованием различных конструкций линкер с мотивом RK-нагрузка, конъюгированных с Полатузумабом и Энфортумабом.

Фармакокинетический профиль конъюгатов антитела против CD79b ARA01-ARK-РАВС-ММАЕ, ARA01-RKA-РАВС-ММАЕ и ARA01-RKValCit-РАВС-ММАЕ, созданных с использованием конструкций линкер-нагрузка по настоящему изобретению, и конъюгатов антитела против Нектина-4, созданных с использованием различных линкеров ARA04-ARK-РАВС-ММАЕ, ARA04-RKA-РАВС-ММАЕ и ARA04-RKValCit-РАВС-ММАЕ, проанализировали на мышах и сравнили с коммерчески доступным конъюгата антитела против CD79b Полатузумаб-ведотин (Polivy®) и коммерчески доступным конъюгатом антитела против Нектина-4 Энфортумаб-ведотин (Padcev®).

Метод

Фармакокинетическое исследование проводили, как описано в Примере 7, с адаптацией временных точек забора проб: образцы крови брали через 10 минут, 4, 48, 96, 168, 264, 336 и 504 часа из подкожной вены. Для определения конъюгата антитела против CD79b адаптировали метод, описанный в Примере 7. Обнаружение конъюгата

антитела против Нектина-4, в общем, проводили следующим образом: Концентрацию конъюгата в плазме определяли методом ИФА с использованием His-меченного человеческого Нектина-4 в качестве захватывающего средства: 125 нг His-Нектина-4 (SinoBiological, Ref.: 19771-H08H) разводили в PBS и добавляли на никелевые панели (Ni-NTA HisSorb, Qiagen). После блокирования 200 мкл PBS, 4% молока (Rapilait, Migros, Швейцария), добавляли 50 мкл разбавленного образца плазмы (в PBS, 4% молока). После инкубации в течение 1 ч и промывки PBS общее содержание конъюгата определяли с помощью кроличьего антитела к MMAE (Levena, Ref: LEV-PAE1), которое добавляли еще на час при комнатной температуре, промывали и определяли с помощью антитела к IgG кролика, HRP-связанного. Активность пероксидазы определяли добавлением 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (Sigma) и останавливали добавлением кислоты. Показания измеряли через 1-5 минут при длине волны 450 нм. Период полураспада рассчитывали по концентрации конъюгата образцов в плазме относительно времени (полулогарифмическая шкала). Полученный наклон к фазы элиминации с использованием временных точек 48-504 ч использовали для определения периода полураспада ($t_{1/2}$) по следующей формуле: $t_{1/2} = \ln 2 / -k$.

Результаты

Концентрация интактных конъюгатов в плазме, измеренная в образцах, взятых в различные временные точки после инъекции, показана для конъюгатов антитела против CD79b (Фиг. 39) и для конъюгатов антитела против Нектина-4 (Фиг. 40).

Периоды полураспада для ARA01-ARK-PAVC-MMAE, ARA01-RKA-PAVC-MMAE и ARA01-RKValCit-PAVC-MMAE приведены ниже в таблице 15. Удивительно, но наблюдалось приблизительно 2-кратное увеличение периода полураспада всех конъюгатов по настоящему изобретению по сравнению с полатузумаб-ведотином.

Периоды полураспада для ARA04-RKAA-MMAE, ARA04-ARK-MMAE, ARA04-RKA-MMAE, ARA04-RKValCit-MMAE и Padcev® приведены ниже в таблице 16, где показано, что период полураспада этих конъюгатов, в среднем, в 2-2,5 раза больше по сравнению с утвержденным энфортумаб-ведотином.

В целом, все конъюгаты, созданные по настоящему изобретению с использованием Полатузумаба или Энфортумаба в качестве исходного антитела, демонстрируют 2-2,5-кратное улучшение периода полураспада по сравнению с эталонными препаратами ведотина. Это указывает на то, что конъюгаты, созданные с использованием конструкций линкер-нагрузка по настоящему изобретению, обладают улучшенной стабильностью конъюгата *in vivo*, что может привести к улучшению общего профиля безопасности и терапевтического индекса (ТИ), поскольку нагрузка не высвобождается преждевременно.

Таблица 15. Периоды полураспада в плазме для конъюгатов антитела против CD79b

Конструкция	Период полураспада ($t_{1/2}$), часы
Полатузумаб/ARA01 (SEQ ID NO: 5 и 6), голое антитело	393
ARA01-ARK-MMAE, интактный конъюгат	237
ARA01-RKA-MMAE, интактный конъюгат	197
ARA01-RKValCit-MMAE, интактный конъюгат	220
Полатузумаб-ведотин (Polivy®), интактный конъюгат	118

Таблица 16. Период полураспада в плазме для конъюгатов антитела против нектин-4

Конструкция	Период полураспада ($t_{1/2}$), часы
ARA04 (SEQ ID NO: 9 и 11), голое антитело	303
ARA04-RKAA-MMAE, интактный конъюгат	245
ARA04-ARK-MMAE, интактный конъюгат	242
ARA04-RKA-MMAE, интактный конъюгат	179
ARA04-RKValCit-MMAE, интактный конъюгат	199
Энфортумаб-ведотин (Padcev®), интактный конъюгат	109

Пример 17: Конъюгаты ADC, содержащие линкер РК-мотив-РАВС-MMAE и нагрузку, демонстрируют более эффективное ингибирование роста опухоли *in vivo* по сравнению с эталонными конъюгатами в CD79b-положительных моделях

опухолей жидкостных тканей и Нектин-4-положительных моделях твердых опухолей

Конъюгаты антител против CD79b по настоящему изобретению, ARA01-RKAA-PABC-MMAE и ARA01-ARK-PABC-MMAE, исследовали *in vivo* на ингибирование роста опухоли в модели Ramos (CD79b-положительная опухоль жидкостных тканей). Противоопухолевые свойства конъюгатов антител к Нектину-4 по настоящему изобретению ARA04-RKAA-PABC-MMAE и AR04-ARK-PAPBC-MMAE проанализировали на ксенотрансплантатной модели SUM190PT (Нектин-4 положительная солидная опухоль). Для исключения неспецифического действия конъюгата включили не-связывающийся контрольный конъюгат mAb-RKAA-PABC-MMAE.

Метод

Для ксенотрансплантатов SUM190PT 2×10^6 клеток ввели в ткань молочной железы; для Ramos 20×10^6 клеток ввели подкожно мышам CB17 SCID (Janvier). Размеры опухоли и вес тела регистрировали три раза в неделю. Объем опухоли рассчитывали по формуле $\text{объем} = (\text{ширина})^2 \times \text{длина} \times 0,5$. Когда средний размер опухоли достигал примерно 200 мм^3 , мышей распределяли с помощью протокола неслучайной стратификации на группы лечения по шесть мышей в каждой. Конъюгаты вводили внутривенно однократно в день рандомизации.

Все конъюгаты были получены собственными силами так, как описано в Примере 5.

ARA01-RKAA-PABC-MMAE и ARA01-RKAA-PABC-MMAE (для обоих DAR 1,9) вводили в дозе 1,25 мг/кг (что соответствует 25 мкг нагрузки на кг веса тела). Полатузумаб-ведотин (PV, DAR 3,6) вводили в дозе 1,43 мг/кг, что соответствует 50 мкг/кг нагрузки или двойной дозе нагрузки конъюгатов ARA01.

ARA04-RKAA-PABC-MMAE и ARA04-RKAA-PABC-MMAE (для обоих DAR 1,9) вводили в дозах 1 и 3 мг/кг (что соответствует 10 и 30 мкг нагрузки на кг массы тела) и сравнивали с энфортумаб-ведотином (EV, DAR 3,8) в дозах 0,5 мг/кг и 1,5 мг/кг. Несвязывающийся конъюгат mAb-RKAA-PABC-MMAE (с такой же конструкцией линкер-нагрузка и DAR, как и у конъюгатов ARA04) вводили в дозе 3 мг/кг. Мышам

контрольной группы вводили PBS. Все эксперименты на мышах проводились в соответствии со швейцарскими рекомендациями и были одобрены Ветеринарным управлением Цюриха, Швейцария.

Результаты:

Конъюгаты по настоящему изобретению ARA01-RKAA-PABC-MMAE и ARA01-ARK-PABC-MMAE сравнили с полатузумаб-ведотином (PV) в быстрорастущей ксенотрансплантатной модели Ramos.

На Фиг. 41 показано, что одна внутривенная инъекция 1,25 мг/кг (или 25 мкг нагрузки на кг веса мыши) обусловила высокоэффективный противоопухолевый ответ у всех мышей. Напротив, PV в дозе 1,43 мг/кг или 50 мкг нагрузки на кг веса тела, показал только короткое и преходящее уничтожение опухоли с отсутствием свободных от опухоли мышей на 20 день после лечения. Напротив, что очень удивительно, ARA01-RKAA-PABC-MMAE и ARA01-ARK-PABC-MMAE показали стойкий полный противоопухолевый ответ при вдвое более низкой дозе нагрузки.

В модели солидной опухоли ARA04-RKAA-PABC-MMAE и ARA04-ARK-PABC-MMAE сравнили с энфортумаб-ведотином (EV) в модели опухоли рака молочной железы SUM190PT. Важно отметить, что оба конъюгата по настоящему изобретению, ARA04-RKAA-PABC-MMAE и ARA04-ARK-PABC-MMAE, были высокоэффективными в дозе 1 и 3 мг/кг и обусловили полную элиминацию опухоли и длительный ответ в течение всего исследования (103 дня после введения), как показано на Фиг. 42 и 43.

При приблизительно одинаковых дозах нагрузки по отношению к энфортумаб-ведотину, лечение ARA04-RKAA-PABC-MMAE и ARA04-ARK-PABC-MMAE (3 мг/кг) обусловило более высокую и более длительную противоопухолевую эффективность и значительное преимущество в выживаемости с 4/6 полными ремиссиями опухоли по сравнению с EV с 0/6 полными ремиссиями опухоли (сравнение дозы 1,5 мг/кг EV и дозы 3 мг/кг ARA04-RKAA-PABC-MMAE на Фиг. 42). Несвязывающийся конъюгат mAb-RKAA-PABC-MMAE не оказывал никакого влияния на рост опухоли, что свидетельствует о высокой целевой специфичности направленных конъюгатов. Удивительно, но оба конъюгата ARA04-

RKAA-PAVC-MMAE и ARA04-ARK-PAVC-MMAE обеспечивали одинаковое ингибирование роста опухоли и выживаемость при примерно одной трети дозы по сравнению с энфортумаб-ведотином (сравнение доз 1,5 мг/кг = 30 мкг/кг нагрузки) и 1 мг/кг (= 10 мкг/кг нагрузки) ARA04-RKAA/ARK-MMAE, см. Фиг. 42 и 43. В совокупности, при дозах, составляющих примерно одну треть нагрузки, лечение конъюгатами ARA04-RKAA-PAVC-MMAE и ARA04-ARK-PAVC-MMAE обусловило более высокую и длительную противоопухолевую эффективность и значительное преимущество по выживаемости по сравнению с энфортумаб-ведотином.

В целом, можно резюмировать, что конъюгаты антитела против CD79b и Нектина-4, созданные с конструкциями линкер с мотивом RK-нагрузка по настоящему изобретению, состоящие из того же антитела и нагрузки, что и соответствующие эталонные конъюгаты, высоко активны *in vivo* и демонстрируют эффективность выше в два-три раза, обеспечивая значительное преимущество по выживаемости по сравнению с конъюгатами на основе ведотина, что весьма удивительно.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения конъюгата антитело-линкер с помощью микробной трансглутаминазы (МТГ), причем этот способ включает этап конъюгирования линкера, содержащего структуру (показанную в направлении N -> C)

(Sp1)-RK-(Sp2)-B-(Sp3) или (Sp1)-B-(Sp2)-RK-(Sp3)

с остатком Gln, содержащимся в антителе, где

- (Sp₁) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp₂) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp₃) является химическим спейсером или отсутствует;
- R представляет собой аргинин, или производное аргинина, или миметик аргинина;
- K представляет собой лизин, или производное лизина, или миметик лизина;
- B представляет собой связующий элемент или нагрузка;

и где линкер конъюгирован с остатком Gln, содержащимся в антителе, через первичный амин, содержащийся в боковой цепи лизинового остатка, производного лизина или миметика лизина.

2. Способ по пункту 1, при котором химические спейсеры (Sp₁), (Sp₂) и (Sp₃) каждый независимо содержат от 0 до 12 аминокислотных остатков.

3. Способ по пункту 1 или 2, при котором линкер содержит не более 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 аминокислотных остатков.

4. Способ по любому из пунктов с 1 по 3, при котором суммарный заряд линкера является нейтральным или положительным.

5. Способ по любому из пунктов с 1 по 4, при котором линкер не содержит отрицательно заряженных аминокислотных остатков.

6. Способ по любому из пунктов с 1 по 5, при котором линкер содержит аминокислотную последовательность RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2), ARK (SEQ ID NO:3), RKR (SEQ ID NO:4) или RK-Val-Cit (SEQ ID NO:54).

7. Способ по любому из пунктов с 1 по 6, при котором линкер содержит аминокислотную последовательность RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2), ARK (SEQ ID NO:3), или RK-Val-Cit (SEQ ID NO:54).

8. Способ по любому из пунктов с 1 по 7, при котором линкер содержит аминокислотную последовательность RCAA (SEQ ID NO:1).

9. Способ по любому из пунктов с 1 по 8, при котором В является связующим компонентом.

10. Способ по пункту 9, при котором связующий компонент В содержит

- биоортогональную маркерную группу или
- небиоортогональное соединение для перекрестного сшивания.

11. Способ по пункту 10, при котором биоортогональная маркерная группа или небиоортогональное соединение для перекрестного сшивания состоит из или содержит, по меньшей мере, одну молекулу или компонент, выбранный из группы, состоящей из:

- $-N-N\equiv N$ или $-N_3$;
- Lys(N_3);
- тетразина;
- алкина;
- напряженного циклооктина;
- BСN;
- напряженного алкена;
- фотореактивной группы;
- альдегида;
- ацилтрифторбората;
- средства деградации белков ("PROTAC");
- циклопентадиена/спиролоциклопентадиена;
- тиоселективного электрофила;
- -SH; и
- цистеина.

12. Способ по любому из пунктов с 9 по 11, при этом данный способ включает дальнейший этап конъюгирования одной или более нагрузок со связующим компонентом В.

13. Способ по пункту 12, при котором одна или более нагрузок конъюгированы со связующим компонентом В посредством клик-реакции.

14. Способ по любому из пунктов с 1 по 8, при котором В является нагрузкой.

15. Способ по любому из пунктов с 12 по 14, при котором нагрузка содержит, по меньшей мере, один из следующих компонентов:

- токсин;
- цитокин;
- фактор роста;
- радионуклид;
- гормон;
- противовирусное средство;
- антибактериальное средство;
- флуоресцентный краситель;
- иммунорегуляторное/иммуностимулирующее средство;
- компонент, увеличивающий период полураспада;
- компонент, повышающий растворимость;
- конъюгат полимер-токсин;
- нуклеиновая кислота;
- биотиновый или стрептавидиновый компонент;
- витамин;
- средство деградации белков ("PROTAC");
- связывающееся с мишенью соединение; и/или
- противовоспалительное средство.

16. Способ по пункту 15, при котором токсин представляет собой, по меньшей мере, один компонент, выбранный из группы, состоящей из

- пирролобензодиазепина (например, PBD);
- ауристатина (например, MMAE, MMAF);

- майтанзиноида (например, майтанзина, DM1, DM4, DM21);
- дуокармицина;
- ингибитора никотинамидфосфорибозилтрансферазы (NAMPT);
- тубулизина;
- энедина (например, калихеамицина);
- производного антрациклина (PNU) (например, доксорубицина);
- ингибитора кинезина веретенообразного белка (KSP) на основе пиррола;
- криптофицина;
- ингибитора эффлюксного насоса лекарственного препарата;
- сандрамицина;
- аманитина (например, α -аманитина); и
- камптотецина (например, эксатеканов, дерукстеканов).

17. Способ по любому из пунктов с 14 по 16, при котором химический спейсер (Sp₂) содержит самоотщепляющийся компонент.

18. Способ по пункту 17, при котором самоотщепляющийся компонент непосредственно присоединен к нагрузке В.

19. Способ по пункту 17 или 18, при котором самоотщепляющийся компонент содержит р-аминобензилкарбамоилловый (РАВС) компонент.

20. Способ по любому из пунктов с 1 по 19, при котором антитело представляет собой антитело IgG, в частности, антитело IgG1.

21. Способ по пункту 20, при котором остаток Gln, с которым конъюгирован линкер, входит в Fc домен антитела, в частности, при котором остаток Gln, с которым конъюгирован линкер, является остатком Gln Q295 (нумерация EU) домена C_H2 антитела IgG.

22. Способ по пункту 20, при котором остаток Gln, с которым конъюгирован линкер, был введен в тяжелую или легкую цепь антитела с помощью молекулярной инженерии.

23. Способ по пункту 22, при котором остаток Gln, введенный в тяжелую или легкую цепь антитела с помощью молекулярной инженерии, представляет собой N297Q (нумерация EU) домена C_H2 агликозилированного антитела IgG.

24. Способ по пункту 22, при котором остаток Gln, введенный в тяжелую или легкую цепь антитела с помощью молекулярной инженерии, входит в состав пептида, который был (а) интегрирован в тяжелую или легкую цепь антитела или (b) слит с N- или C-концевой областью тяжелой или легкой цепи антитела.
25. Способ по пункту 24, при котором пептид, содержащий остаток Gln, был слит с C-концевой областью тяжелой цепи антитела.
26. Способ по любому из пунктов с 20 по 22 или с 24 по 25, при котором антитело IgG представляет собой гликозилированное антитело IgG, в частности, при котором антитело IgG гликозилировано на остатке N297 (нумерация EU) домена C_H2.
27. Способ по любому из пунктов с 1 по 26, при котором антитело выбрано из группы, состоящей из: Brentuxимаба, Трастузумаба, Гемтузумаба, Инотузумаба, Авелумаба, Цетуксимаба, Ритуксимаба, Даратумумаба, Пертузумаба, Ведолизумаба, Окрелизумаба, Тоцилизумаба, Устекинумаба, Голимумаба, Обинутузумаба, Сацитузумаба, Белантамаба, Полатузумаба и Энфортумаба.
28. Способ по любому из пунктов с 1 по 27, при котором антитело выбрано из группы, состоящей из: Brentuxимаба, Гемтузумаба, Трастузумаба, Инотузумаба, Полатузумаба, Энфортумаба, Сацитузумаба и Белантамаба.
29. Способ по любому из пунктов с 1 по 28, при котором антитело представляет собой Полатузумаб, или Трастузумаб, или Энфортумаб.
30. Способ по любому из пунктов с 1 по 29, при котором линкер конъюгирован с γ -карбоксамидной группой остатка Gln, входящего в состав антитела.
31. Способ по любому из пунктов с 1 по 30, при котором линкер подходит для конъюгации с гликозилированным антителом с эффективностью конъюгации, по меньшей мере, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или 95%.
32. Способ по любому из пунктов с 1 по 31, при котором микробная трансглутаминаза получена из вида *Streptomyces*, в частности *Streptomyces mobaraensis*.
33. Конъюгат антитело-линкер, полученный способом по любому из пунктов с 1 по 32.

34. Конъюгат антитело-линкер, содержащий:

а) антитело; и

б) линкер, содержащий структуру:

(Sp₁)-RK-(Sp₂)-B-(Sp₃) или

(Sp₁)-B-(Sp₂)-RK-(Sp₃); при этом

- (Sp₁) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp₂) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp₃) является химическим спейсером или отсутствует;
- R представляет собой аргинин, или производное аргинина, или миметик аргинина;
- K представляет собой лизин, или производное лизина, или миметик лизина;
- B представляет собой связующий элемент или нагрузка;

при этом линкер конъюгирован с антителом посредством изопептидной связи, образованной между γ -карбоксамидной группой глутаминового остатка, входящего в состав антитела, и первичным амином, входящим в состав боковой цепи лизинового остатка, производного лизина или миметика лизина, входящего в состав RK-мотива, входящего в состав линкера.

35. Конъюгат антитело-линкер по пункту 34, в котором химические спейсеры (Sp₁), (Sp₂) и (Sp₃) независимо содержат от 0 до 12 аминокислотных остатков.

36. Конъюгат антитело-линкер по пункту 34 или 35, в котором линкер содержит не более 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 аминокислотных остатков.

37. Конъюгат антитело-линкер по любому из пунктов с 34 по 36, при котором суммарный заряд линкера является нейтральным или положительным.

38. Конъюгат антитело-линкер по любому из пунктов с 34 по 37, в котором линкер не содержит отрицательно заряженных аминокислотных остатков.

39. Конъюгат антитело-линкер по любому из пунктов с 34 по 38, в котором линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы,

состоящей из: RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2), ARK (SEQ ID NO:3), RKR (SEQ ID NO:4) и RK-Val-Cit (SEQ ID NO:54).

40. Конъюгат антитело-линкер по любому из пунктов с 34 по 39, в котором линкер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2), ARK (SEQ ID NO:3) и RK-Val-Cit (SEQ ID NO:54).

41. Конъюгат антитело-линкер по любому из пунктов с 34 по 40, в котором линкер содержит аминокислотную последовательность RCAA (SEQ ID NO:1).

42. Конъюгат антитело-линкер по любому из пунктов с 34 по 41, в котором В представляет собой связующий компонент.

43. Конъюгат антитело-линкер по пункту 42, в котором связующий компонент В содержит

- биоортогональную маркерную группу или
- небиоортогональное соединение для перекрестного сшивания.

44. Конъюгат антитело-линкер по пункту 43, в котором биоортогональная маркерная группа или небиоортогональное соединение для перекрестного сшивания состоит из или содержит, по меньшей мере, одну молекулу или компонент, выбранные из группы, состоящей из:

- $-N-N\equiv N$ или $-N_3$;
- Lys(N_3);
- тетразина;
- алкина;
- напряженного циклооктина;
- BСN;
- напряженного алкена;
- фотореактивной группы;
- альдегида;
- ацилтрифторбората;
- средства деградации белков ("PROTAC");
- циклопентадиена/спиролоциклопентадиена;

- тиоселективного электрофила;
- -SH; и
- цистеина.

45. Конъюгат антитело-линкер по любому из пунктов с 42 по 44, в котором одна или более нагрузок конъюгированы со связующим компонентом В.

46. Конъюгат антитело-линкер по пункту 45, в котором одна или несколько нагрузок конъюгированы со связующим компонентом В посредством клик-реакции.

47. Конъюгат антитело-линкер по любому из пунктов с 34 по 41, в котором В представляет собой нагрузку.

48. Конъюгат антитело-линкер по любому из пунктов с 45 по 47, в котором нагрузка содержит, по меньшей мере, один из следующих компонентов:

- токсин;
- цитокин;
- фактор роста;
- радионуклид;
- гормон;
- противовирусное средство;
- антибактериальное средство;
- флуоресцентный краситель;
- иммунорегуляторное/иммуностимулирующее средство;
- компонент, увеличивающий период полураспада;
- компонент, повышающий растворимость;
- конъюгат полимер-токсин;
- нуклеиновая кислота;
- биотиновый или стрептавидиновый компонент;
- витамин;
- средство деградации белков ("PROTAC");
- связывающееся с мишенью соединение; и/или
- противовоспалительное средство.

49. Конъюгат антитело-линкер по пункту 48, в котором токсин представляет собой, по меньшей мере, один компонент, выбранный из группы, состоящей из

- пирролобензодиазепина (например, PBD);
- ауристатины (например, MMAE, MMAF);
- майтанзиноиды (например, майтанзина, DM1, DM4, DM21);
- дуокармицина;
- ингибитора никотинамидфосфорибозилтрансферазы (NAMPT);
- тубулизина;
- энедина (например, калихеамицина);
- производного антрациклина (PNU) (например, доксорубицина);
- ингибитора кинезина веретенообразного белка (KSP) на основе пиррола;
- криптофицина;
- ингибитора эффлюксного насоса лекарственного препарата;
- сантрамицина;
- аманитина (например, α -аманитина); и
- камптотецина (например, эксатеканов, дерукстеканов).

50. Конъюгат антитело-линкер по любому из пунктов с 47 по 49, в котором химический спейсер (Sp_2) содержит самоотщепляющийся компонент.

51. Конъюгат антитело-линкер по пункту 50, в котором самоотщепляющийся компонент непосредственно присоединен к нагрузке В.

52. Конъюгат антитело-линкер по пункту 50 или 51, в котором самоотщепляющийся компонент содержит р-аминобензилкарбамоильный (РАВС) компонент.

53. Конъюгат антитело-линкер по любому из пунктов с 34 по 52, в котором антитело представляет собой антитело IgG, в частности, антитело IgG1.

54. Конъюгат антитело-линкер по пункту 53, в котором остаток Gln, с которым конъюгирован линкер, входит в Fc домен антитела, в частности, в котором остаток Gln, с которым конъюгирован линкер, является остатком Gln Q295 (нумерация EU) домена CH2 антитела IgG.

55. Конъюгат антитело-линкер по пункту 53, в котором остаток Gln, с которым конъюгирован линкер, был введен в тяжелую или легкую цепь антитела с помощью молекулярной инженерии.
56. Конъюгат антитело-линкер по пункту 55, в котором остаток Gln, введенный в тяжелую или легкую цепь антитела с помощью молекулярной инженерии, представляет собой N297Q (нумерация EU) домена C_H2 агликозилированного антитела IgG.
57. Конъюгат антитело-линкер по пункту 55, в котором остаток Gln, введенный в тяжелую или легкую цепь антитела с помощью молекулярной инженерии, входит в состав пептида, который был (а) интегрирован в тяжелую или легкую цепь антитела или (b) слит с N- или C-концевой областью тяжелой или легкой цепи антитела.
58. Конъюгат антитело-линкер по пункту 57, в котором пептид, содержащий остаток Gln, был слит с C-концевой областью тяжелой цепи антитела.
59. Конъюгат антитело-линкер по любому из пунктов с 53 по 55 или с 57 по 58, в котором антитело IgG представляет собой гликозилированное антитело IgG, в частности, в котором антитело IgG гликозилировано на остатке N297 (нумерация EU) домена C_H2.
60. Конъюгат антитело-линкер по любому из пунктов с 34 по 59, в котором антитело выбрано из группы, состоящей из: Brentuximab, Trastuzumab, Gemtuzumab, Inotuzumab, Avellumab, Cetuximab, Rituximab, Daratumumab, Pertuzumab, Vedolizumab, Ocrelizumab, Tocilizumab, Ustekinumab, Golimumab, Obinutuzumab, Sacituzumab, Belantamab, Polatuzumab и Enfortumab.
61. Конъюгат антитело-линкер по любому из пунктов с 34 по 60, в котором антитело выбрано из группы, состоящей из: Brentuximab, Gemtuzumab, Trastuzumab, Inotuzumab, Polatuzumab, Enfortumab, Sacituzumab и Belantamab.
62. Конъюгат антитело-линкер по любому из пунктов с 34 по 61, в котором антитело представляет собой Polatuzumab, или Trastuzumab, или Enfortumab.

63. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий:

а) антитело IgG; и

б) линкер, содержащий лекарственное соединение В, при этом лекарственное соединение В ковалентно связано с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из: RКАА (SEQ ID NO:1), RКА (SEQ ID NO:2), АRК (SEQ ID NO:3), RKR (SEQ ID NO:4) или RК-Val-Cit (SEQ ID NO:54);

при этом линкер конъюгирован с антителом IgG посредством изопептидной связи, образованной между γ -карбоксамидной группой остатка глутамина Q295 (нумерация ЕС) домена С_H2 антитела и первичным амином, входящим в боковую цепь лизинового остатка, входящего в состав линкера.

64. Конъюгат антитело-лекарственное средство по пункту 63, в котором лекарственный компонент В связан с N- или C-концевой областью аминокислотной последовательности, входящей в состав линкера, посредством самоотщепляющегося компонента.

65. Конъюгат антитело-лекарственное средство по пункту 64, при этом самоотщепляющийся компонент содержит р-аминобензилкарбамоилловый (РАВС) компонент.

66. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов с 63 по 65, при этом антитело IgG представляет собой гликозилированное антитело IgG, в частности, при этом антитело IgG гликозилировано на остатке N297 (нумерация EU) домена С_H2.

67. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов с 63 по 66, при этом антитело IgG представляет собой антитело IgG1.

68. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов с 63 по 67, при этом антитело IgG представляет собой Полатузумаб или антитело, содержащее тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO:5, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO:6.

69. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов с 63 по 67, при этом антитело IgG представляет собой Трастузумаб или антитело,

содержащее тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO:7, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO:8.

70. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов с 63 по 67, при этом антитело IgG представляет собой Энфортумаб или антитело, содержащее тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO:9, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO:10 или 11.

71. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов с 63 по 70, при этом лекарственное средство является токсином, выбранным из группы, состоящей из:

- пирролобензодиазепина (например, PBD);
- ауристати́на (например, MMAE, MMAF);
- майтанзиноида (например, майтанзина, DM1, DM4, DM21);
- дуокармицина;
- ингибитора никотинамидфосфорибозилтрансферазы (NAMPT);
- тубулизина;
- энеди́на (например, калихеамицина);
- производного антрациклина (PNU) (например, доксорубицина);
- ингибитора кинезина веретенообразного белка (KSP) на основе пиррола;
- криптофицина;
- ингибитора эффлюксного насоса лекарственного препарата;
- сандрамицина;
- аманитина (например, α -аманитина); и
- камптотецина (например, эксатеканов, дерукстеканов).

72. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов с 63 по 71, при этом линкер имеет структуру RКАА-РАВС-В, в частности, где В представляет собой ауристатин или майтанзиноид, в частности, где ауристатин - MMAE, а майтанзиноид - DM1 или майтанзин.

73. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов с 63 по 71, при этом линкер имеет структуру RКА-РАВС-В, в частности, где В представляет собой ауристатин или майтанзиноид, в частности, где ауристатин - MMAE, а майтанзиноид - DM1 или майтанзин.

74. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов с 63 по 71, при этом линкер имеет структуру ARK-PAVC-B, в частности, где В представляет собой ауристин или майтанзиноид, в частности, где ауристин - MMAE, а майтанзиноид - DM1 или майтанзин.

75. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов с 63 по 71, при этом линкер имеет структуру RKR-PAVC-B, в частности, где В представляет собой ауристин или майтанзиноид, в частности, где ауристин - MMAE, а майтанзиноид - DM1 или майтанзин.

76. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов с 63 по 71, при этом линкер имеет структуру RK-Val-Cit-PAVC-B, в частности, где В представляет собой ауристин или майтанзиноид, в частности, где ауристин - MMAE, а майтанзиноид - DM1 или майтанзин.

77. Линкерная конструкция, содержащая структуру:

(Sp1)-RK-(Sp2)-B-(Sp3) или

(Sp1)-B-(Sp2)-RK-(Sp3); при этом

- (Sp1) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp2) является химическим спейсером или отсутствует;
- (Sp3) является химическим спейсером или отсутствует;
- R представляет собой аргинин, или производное аргинина, или миметик аргинина;
- K представляет собой лизин, или производное лизина, или миметик лизина;
- B представляет собой связующий компонент или нагрузку.

78. Линкерная конструкция по пункту 77, при этом химические спейсеры (Sp₁), (Sp₂) и (Sp₃) каждый независимо содержат от 0 до 12 аминокислотных остатков.

79. Линкерная конструкция по пункту 77 или 78, при этом линкер содержит не более 25, 20, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4 аминокислотных остатков.

80. Линкерная конструкция по любому из пунктов с 77 по 79, при этом суммарный заряд линкера является нейтральным или положительным.

81. Линкерная конструкция по любому из пунктов с 77 по 80, при этом линкер не содержит отрицательно заряженных аминокислотных остатков.

82. Линкерная конструкция по любому из пунктов с 77 по 81, при этом линкер содержит аминокислотную последовательность RCAA (SEQ ID NO:1), RKA (SEQ ID NO:2), ARK (SEQ ID NO:3), RKR (SEQ ID NO:4) или RK-Val-Cit (SEQ ID NO:54).

83. Линкерная конструкция по любому из пунктов с 77 по 82, при этом В является связующим компонентом.

84. Линкерная конструкция по пункту 83, при этом связующий компонент В содержит

- биоортогональную маркерную группу или
- небиоортогональное соединение для перекрестного сшивания.

85. Линкерная конструкция по пункту 84, при этом биоортогональная маркерная группа или небиоортогональное соединение для перекрестного сшивания состоит из или содержит, по меньшей мере, одну молекулу или компонент, выбранные из группы, состоящей из:

- $-N-N\equiv N$ или $-N_3$;
- Lys(N_3);
- тетразина;
- алкина;
- напряженного циклооктина;
- BCN;
- напряженного алкена;
- фотореактивной группы;
- альдегида;
- ацилтрифторбората;
- средства деградации белков ("PROTAC");
- циклопентадиена/спиролоциклопентадиена;
- тиоселективного электрофила;
- -SH; и

- цистеина.

86. Линкерная конструкция по любому из пунктов с 77 по 85, при этом линкерная конструкция состоит из или содержит структуру RКАА-В, в частности, где В представляет собой Lys(N₃) или цистеин.

87. Линкерная конструкция по любому из пунктов с 77 по 85, при этом линкерная конструкция состоит из или содержит структуру RКА-В, в частности, где В представляет собой Lys(N₃) или цистеин.

88. Линкерная конструкция по любому из пунктов с 77 по 85, при этом линкерная конструкция состоит из или содержит структуру АRК-В, в частности, где В представляет собой Lys(N₃) или цистеин.

89. Линкерная конструкция по любому из пунктов с 77 по 85, при этом линкерная конструкция состоит из или содержит структуру В-RRK, в частности, где В представляет собой Lys(N₃) или цистеин.

90. Линкерная конструкция по любому из пунктов с 77 по 82, при этом В является нагрузкой.

91. Линкерная конструкция по пункту 90, при этом нагрузка содержит, по меньшей мере, один из следующих компонентов:

- токсин;
- цитокин;
- фактор роста;
- радионуклид;
- гормон;
- противовирусное средство;
- антибактериальное средство;
- флуоресцентный краситель;
- иммунорегуляторное/иммуностимулирующее средство;
- компонент, увеличивающий период полураспада;
- компонент, повышающий растворимость;
- конъюгат полимер-токсин;
- нуклеиновая кислота;

- биотиновый или стрептавидиновый компонент;
- витамин;
- средство деградации белков ("PROTAC");
- связывающееся с мишенью соединение; и/или
- противовоспалительное средство.

92. Линкерная конструкция по пункту 91, при этом токсин представляет собой, по меньшей мере, один компонент, выбранный из группы, состоящей из

- пирролобензодиазепина (например, PBD);
- ауристатина (например, MMAE, MMAF);
- майтанзиноида (например, майтанзина, DM1, DM4, DM21);
- дуокармицина;
- ингибитора никотинамидфосфорибозилтрансферазы (NAMPT);
- тубулизина;
- энедина (например, калихеамицина);
- производного антрациклина (PNU) (например, доксорубицина);
- ингибитора кинезина веретенообразного белка (KSP) на основе пиррола;
- криптофицина;
- ингибитора эффлюксного насоса лекарственного препарата;
- сантрамицина;
- аманитина (например, α -аманитина); и
- камптотецина (например, эксатеканов, дерукстеканов).

93. Линкерная конструкция по любому из пунктов с 90 по 92, при этом химический спейсер (Sp_2) содержит самоотщепляющийся компонент.

94. Линкерная конструкция по пункту 93, при этом самоотщепляющийся компонент непосредственно присоединен к нагрузке В.

95. Линкерная конструкция по пункту 93 или 94, при этом самоотщепляющийся компонент содержит р-аминобензилкарбамоилловый (РАВС) компонент.

96. Линкерная конструкция по любому из пунктов с 90 по 95, при этом линкерная конструкция состоит из или содержит структуру РКAA-РАВС-В, в

частности, где В представляет собой ауристин или майтанзиноид, в частности, где ауристин - ММАЕ, а майтанзиноид - DM1 или майтанзин.

97. Линкерная конструкция по любому из пунктов с 90 по 95, при этом линкерная конструкция состоит из или содержит структуру RKA-PAVC-B, в частности, где В представляет собой ауристин или майтанзиноид, в частности, где ауристин - ММАЕ, а майтанзиноид - DM1 или майтанзин.

98. Линкерная конструкция по любому из пунктов с 90 по 95, при этом линкерная конструкция состоит из или содержит структуру ARK-PAVC-B, в частности, где В представляет собой ауристин или майтанзиноид, в частности, где ауристин - ММАЕ, а майтанзиноид - DM1 или майтанзин.

99. Линкерная конструкция по любому из пунктов с 90 по 95, при этом линкерная конструкция состоит из или содержит структуру B-PAVC-RKR, в частности, где В представляет собой ауристин или майтанзиноид, в частности, где ауристин - ММАЕ, а майтанзиноид - DM1 или майтанзин.

100. Линкерная конструкция по любому из пунктов с 90 по 95, при этом линкерная конструкция состоит из или содержит структуру RK-Val-Cit-PAVC-B, в частности, где В представляет собой ауристин или майтанзиноид, в частности, где ауристин - ММАЕ, а майтанзиноид - DM1 или майтанзин.

101. Применение линкерной конструкции по любому из пунктов с 77 по 100 в получении конъюгата антитело-линкер с помощью микробной трансглутаминазы.

102. Применение по пункту 99, при этом антитело представляет собой антитело IgG, в частности антитело IgG1.

103. Применение по пункту 101 или 102, при этом антитело представляет собой Полатузумаб, или Трастузумаб, или Энфортумаб.

104. Фармацевтическая композиция, содержащая

а) конъюгат антитело-линкер по любому из пунктов с 34 по 63, в частности, при этом конъюгат антитело-линкер содержит, по меньшей мере, одну нагрузку;

или

б) конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов с 64 по 76; и

фармацевтическую композицию, содержащую, по меньшей мере, один фармацевтически приемлемый ингредиент.

105. Фармацевтическая композиция по пункту 104, содержащая, по меньшей мере, одно дополнительное терапевтически активное средство.

106. Конъюгат антитело-линкер по любому из пунктов с 34 по 63, в частности, при этом конъюгат антитело-линкер содержит, по меньшей мере, одну нагрузку, конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов с 64 по 76, или фармацевтическая композиция по пункту 104 или 105 для применения в лечении и/или диагностике.

107. Конъюгат антитело-линкер по любому из пунктов с 34 по 63, в частности, при этом конъюгат антитело-линкер содержит, по меньшей мере, одну нагрузку, конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пунктов с 64 по 76, или фармацевтическая композиция по пункту 104 или 105 для применения в лечении пациента, который

- страдает от,
- подвержен риску развития и/или
- у которого диагностировано

неопластическое заболевание, неврологическое заболевание, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или инфекционное заболевание.

108. Конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция для применения по пункту 107, при этом конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство, входящие в фармацевтическую композицию, содержит Полатузумаб и при этом неопластическое заболевание представляет собой рак, ассоциированный с В-клетками.

109. Конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция для применения по пункту 108, при этом рак, ассоциированный с В-клетками, является неходжкинской лимфомой, в частности,

при этом рак, ассоциированный с В-клетками, является диффузной В-крупноклеточной лимфомой.

110. Конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция для применения по пункту 108 или 109, при этом конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция вводятся в комбинации с бендамустином и/или ритуксимабом.

111. Конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция для применения по пункту 107, при этом конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство, входящие в фармацевтическую композицию, содержит Трастузумаб, и при этом неопластическое заболевание представляет собой HER2-положительный рак, в частности, HER2-положительный рак молочной железы, желудка, яичников или легких.

112. Конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция для применения по пункту 111, при этом конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция вводятся в комбинации с лапатинибом, капецитабином и/или таксаном.

113. Конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция для применения по пункту 107, при этом конъюгат антитело-линкер или конъюгат антитело-лекарственное средство, входящий в состав фармацевтической композиции, содержит Энфортумаб или вариант Энфортумаба, и при этом неопластическое заболевание представляет собой Нектин-4-положительный рак, в частности Нектин-4-положительный рак поджелудочной железы, рак легких, рак мочевого пузыря или рак молочной железы.

114. Конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция для применения по пункту 113, при этом конъюгат антитело-линкер, конъюгат антитело-лекарственное средство или

фармацевтическая композиция вводятся в комбинации с химиотерапевтическим средством на основе цисплатина и/или Пембролизумабом.

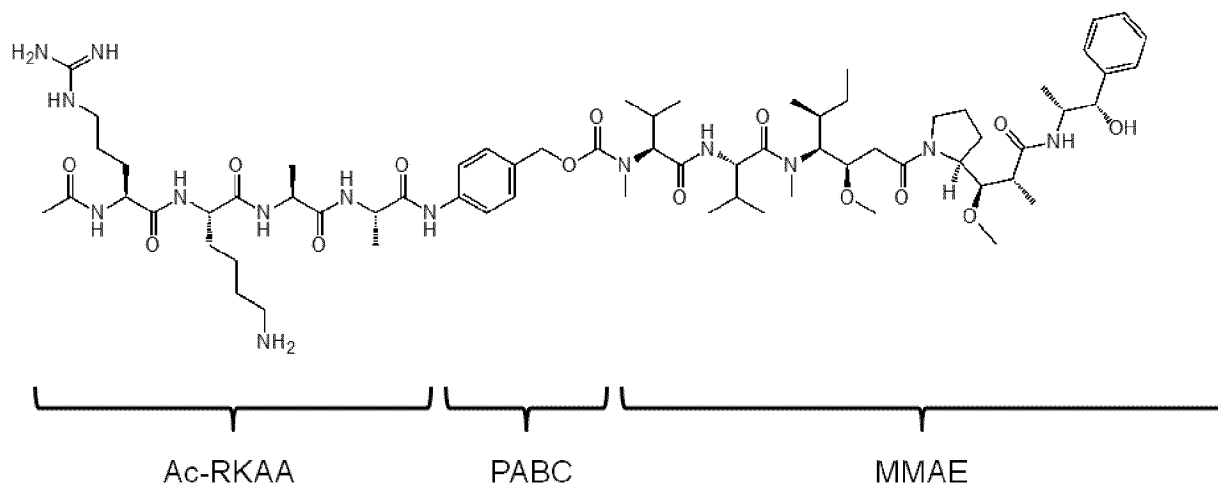
115. Применение конъюгата антитело-линкер по любому из пунктов с 34 по 63, в частности, при этом конъюгат антитело-линкер содержит, по меньшей мере, одну нагрузку, конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пунктов с 64 по 76, или фармацевтической композиции по пункту 104 или 105 для изготовления лекарственного препарата для лечения пациента, который

- страдает от,
- подвержен риску развития и/или
- у которого диагностировано

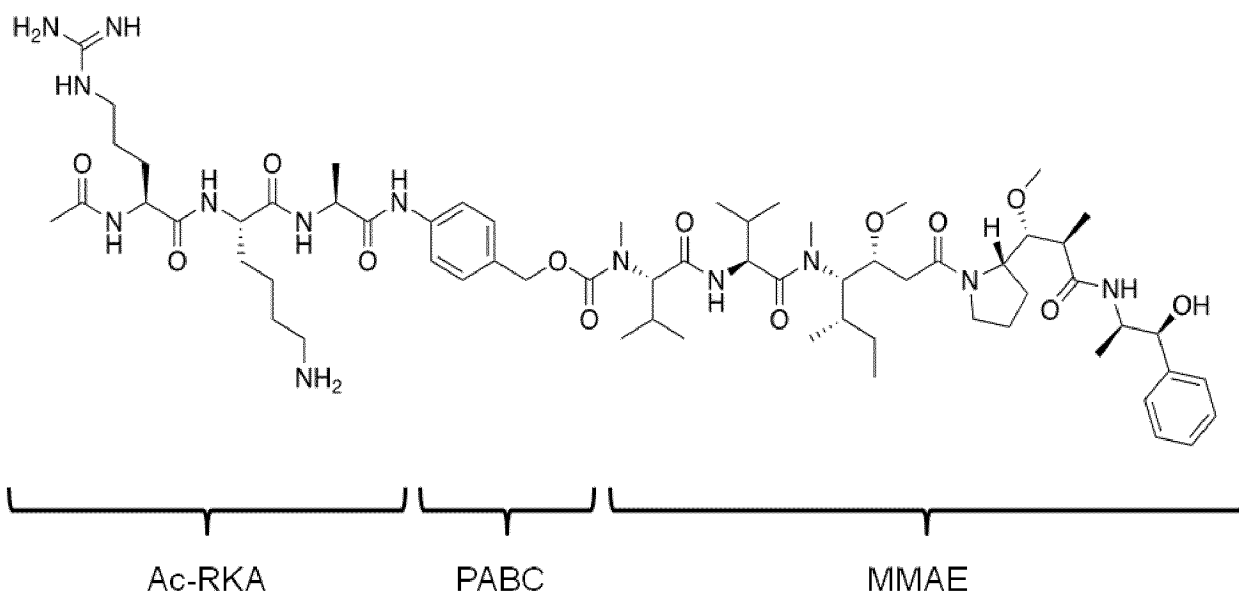
неопластическое заболевание, неврологическое заболевание, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание или инфекционное заболевание.

116. Способ лечения или профилактики неопластического заболевания, при этом указанный способ включает введение нуждающемуся в этом пациенту конъюгата антитело-линкер по любому из пунктов с 34 по 63, при этом конъюгат антитело-линкер содержит, по меньшей мере, одну нагрузку, конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пунктов с 64 по 76, или фармацевтической композиции по пункту 104 или 105.

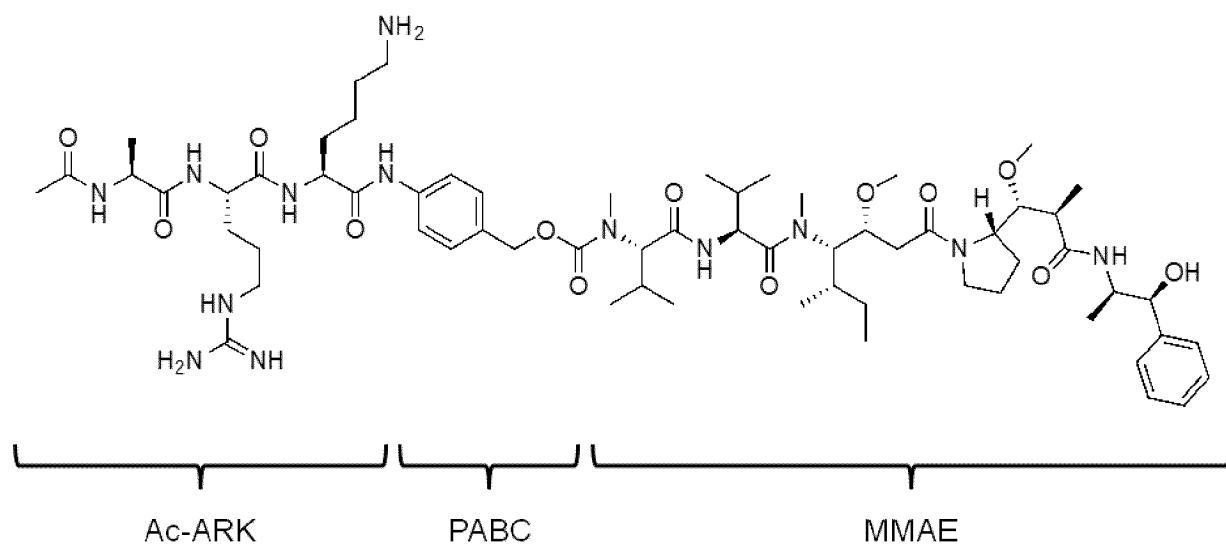
1/27



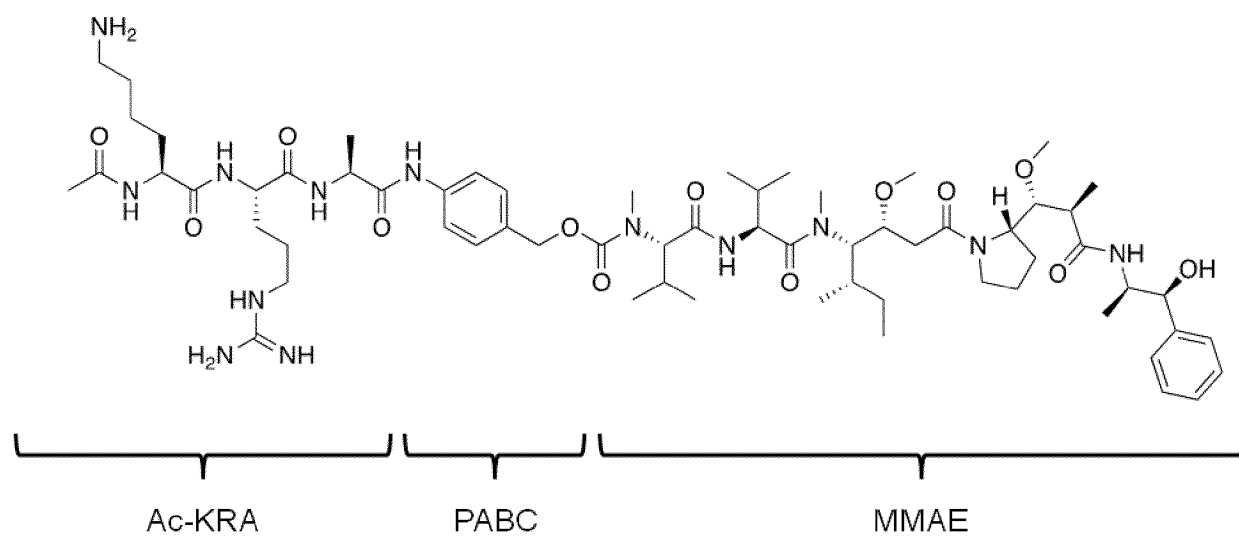
ФИГ. 1



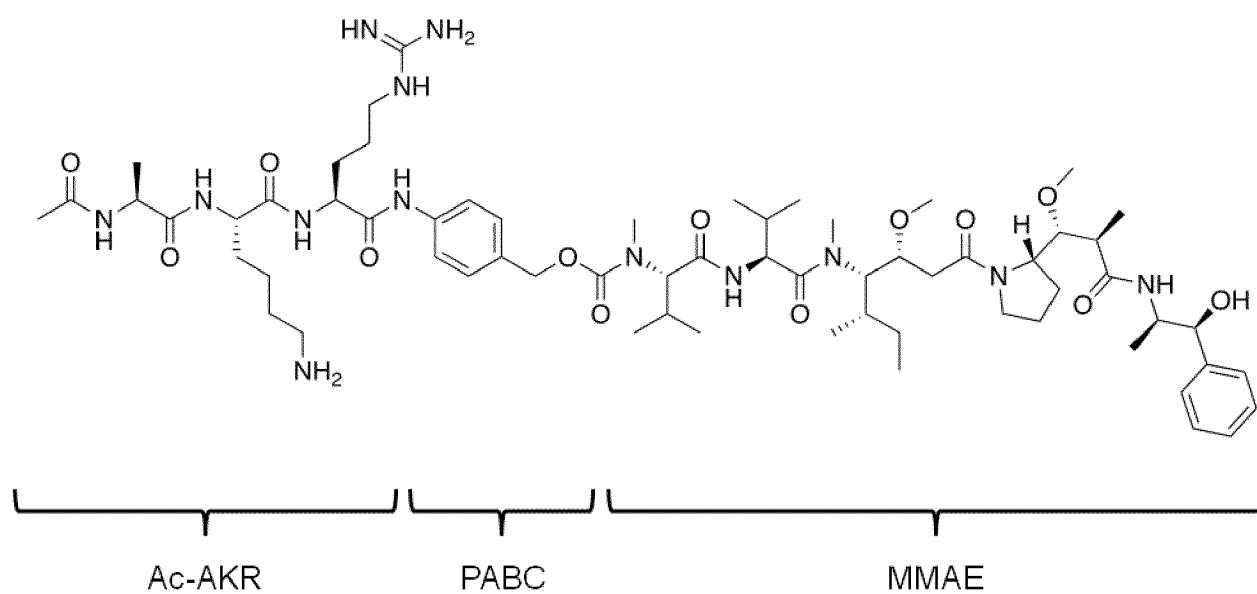
ФИГ. 2



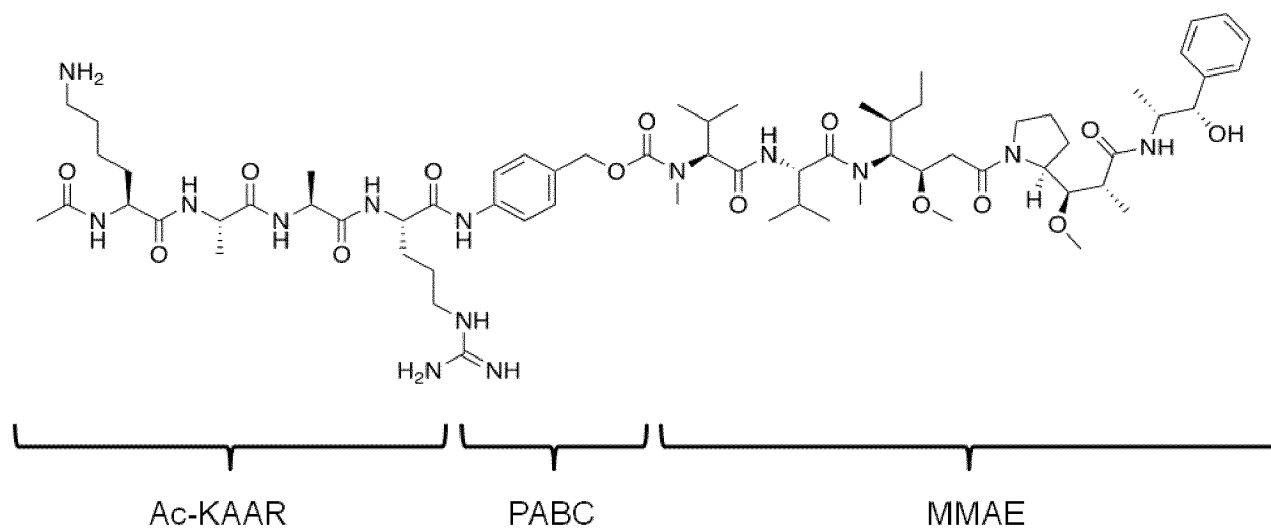
ФИГ. 3



ФИГ. 4

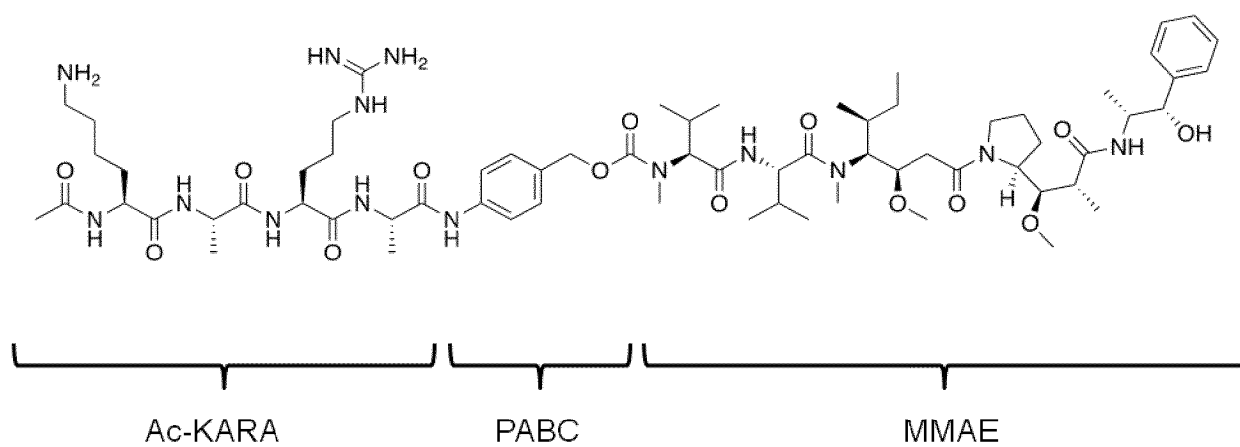


ФИГ. 5

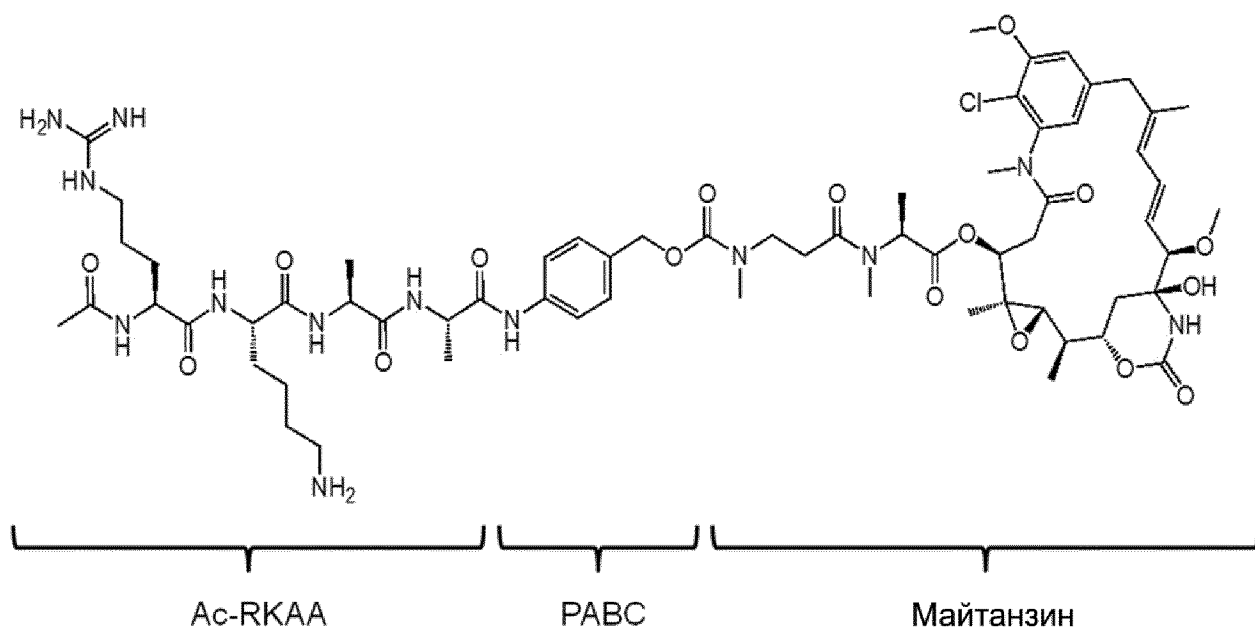


ФИГ. 6

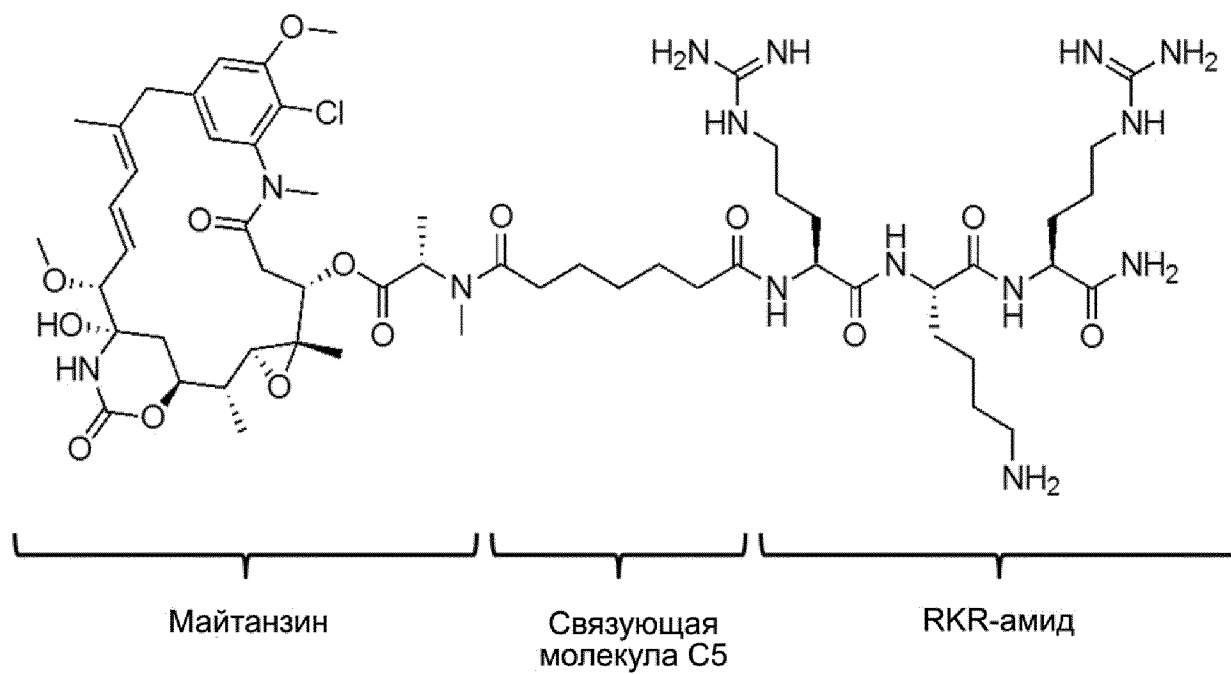
4/27



ФИГ. 7

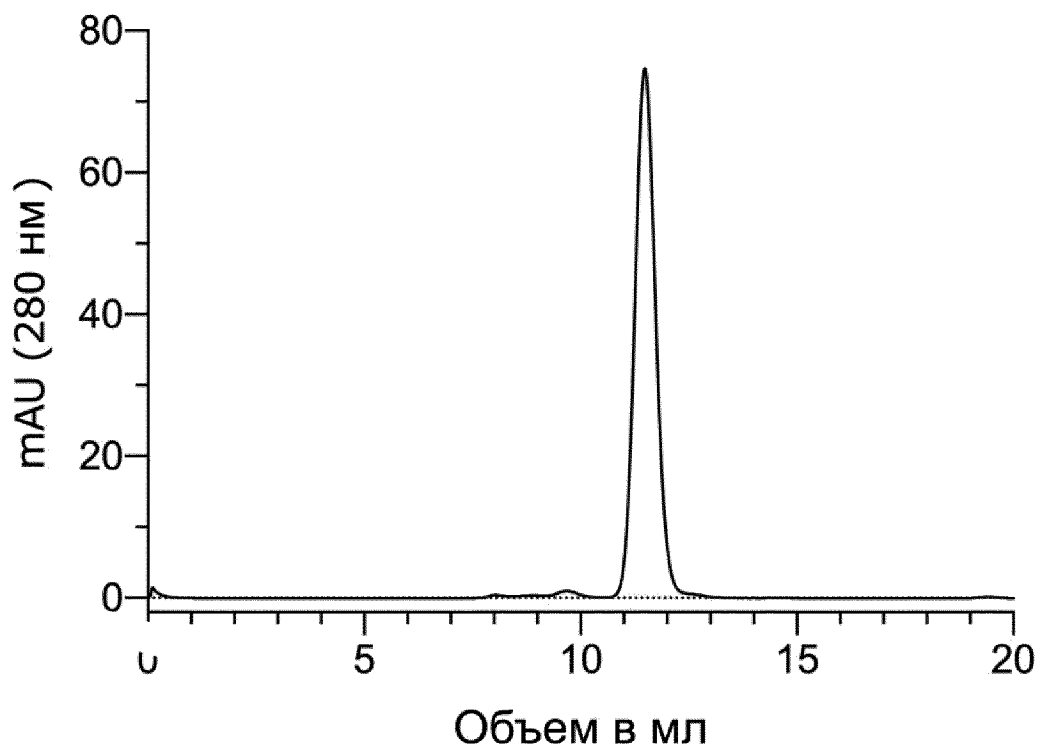


ФИГ. 8



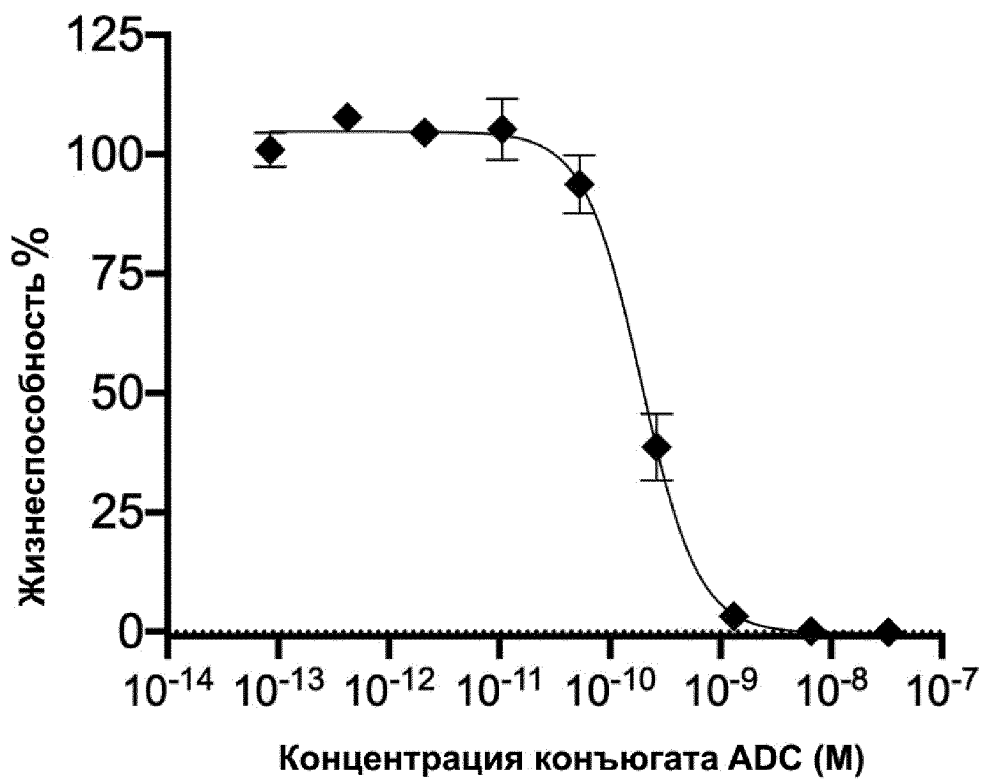
ФИГ. 9

6/27



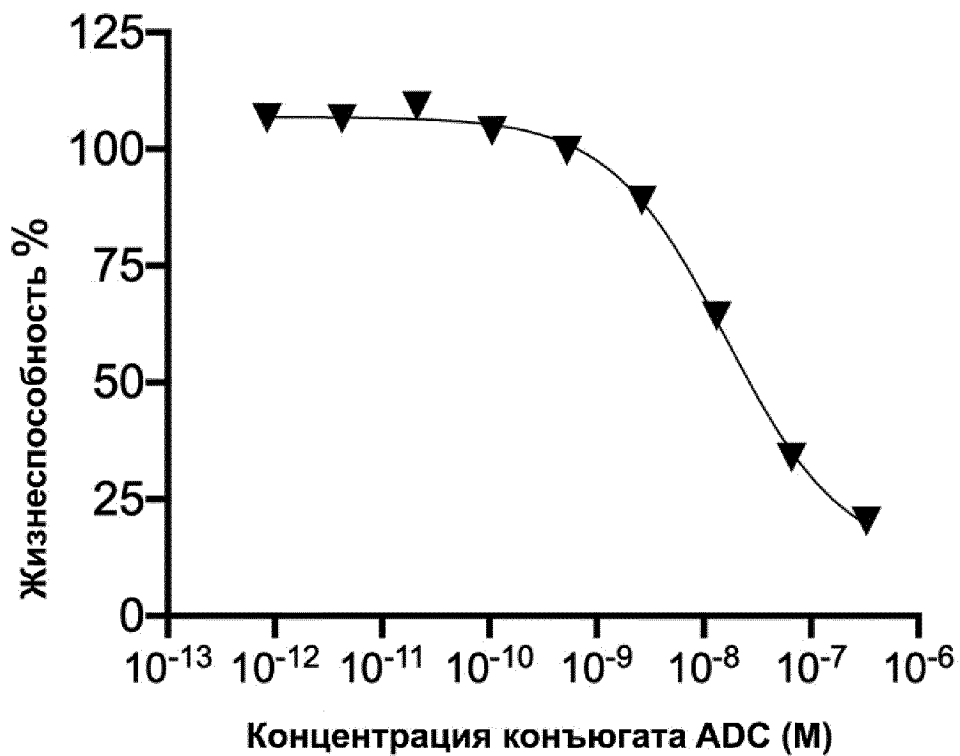
ФИГ. 10

(a) ВЈАВ



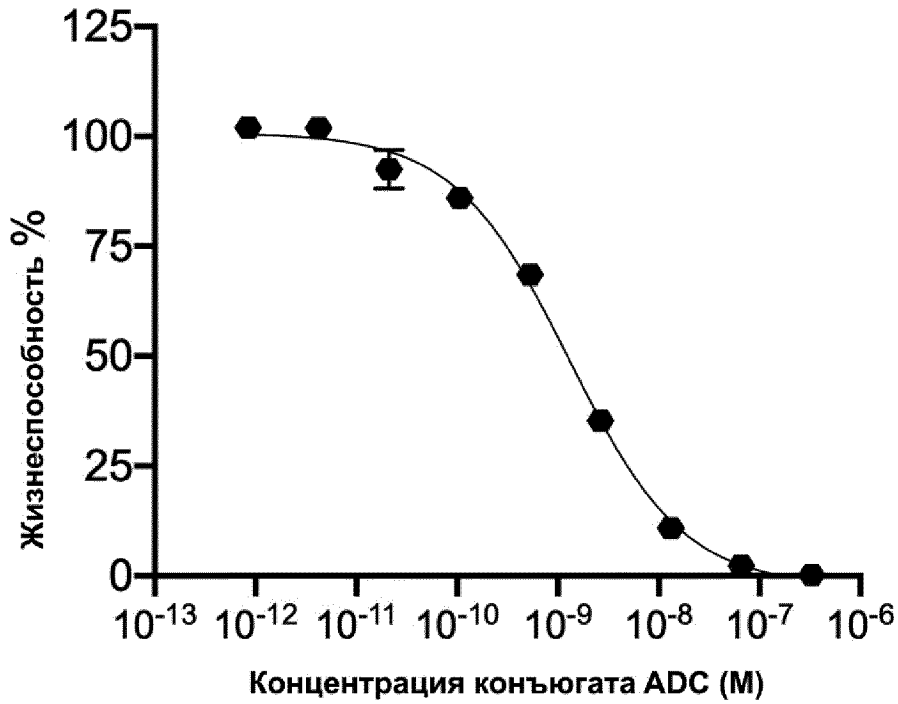
ФИГ. 11 (a)

(b) GRANTA-519



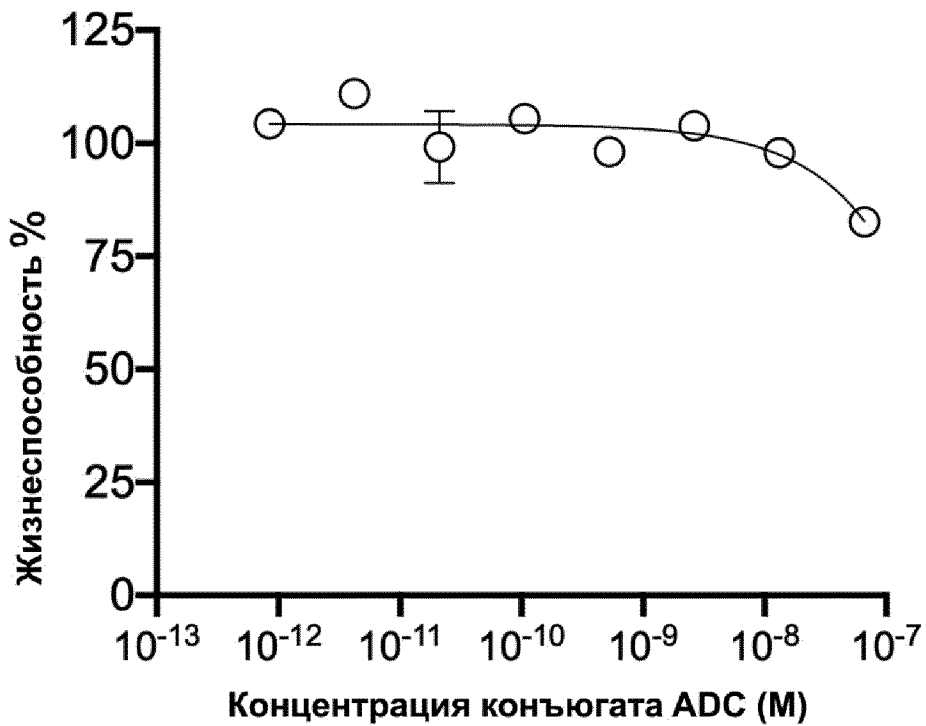
ФИГ. 11(b)

(c) WSU



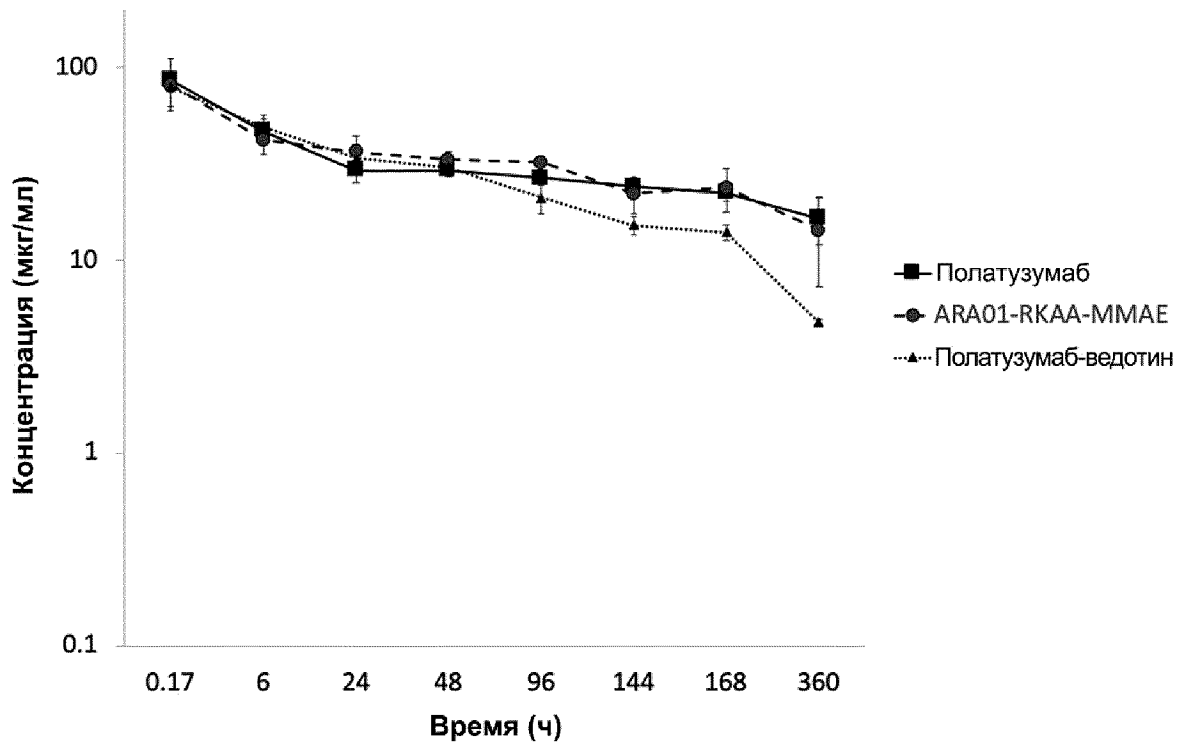
ФИГ. 11(c)

(d) HT (CD79b отрицат.)



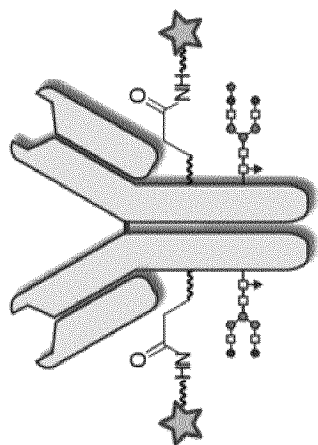
ФИГ. 11(d)

9/27

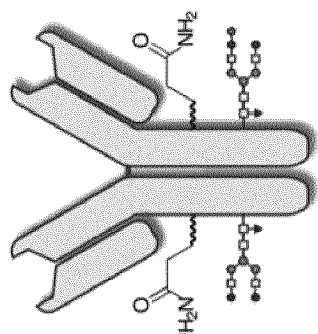
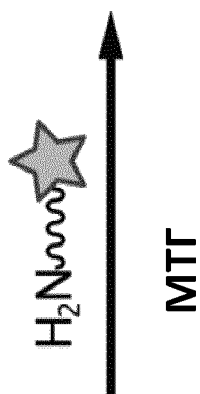


ФИГ. 12

10/27



Сайт-специфически
конъюгированное,
нативное IgG (DAR2)

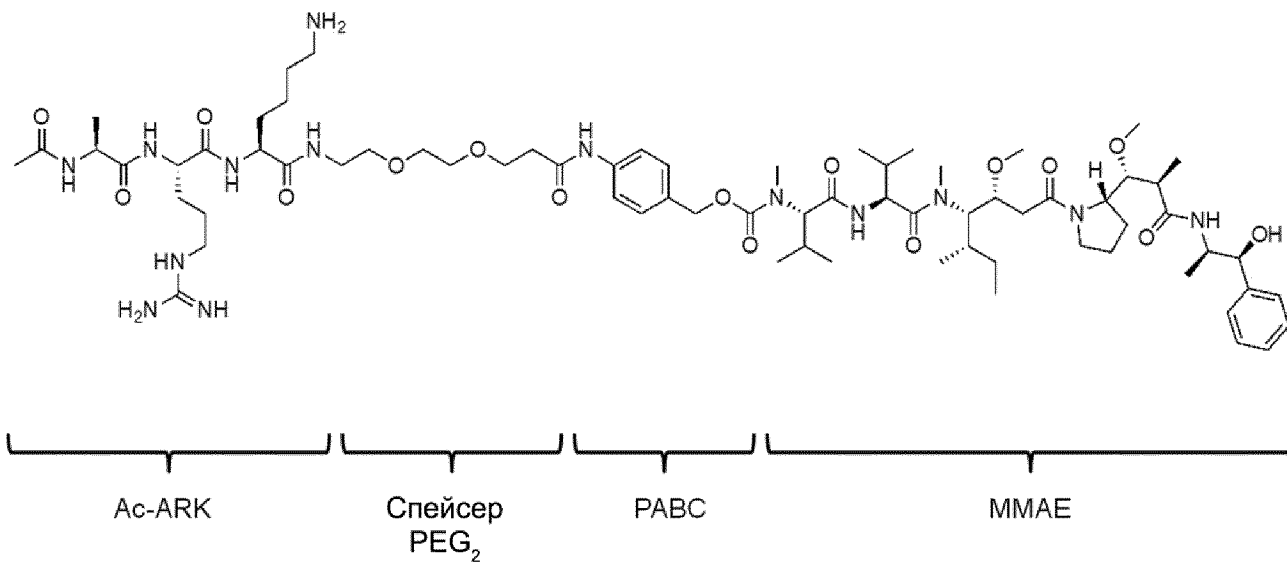


Нативное IgG
готовое

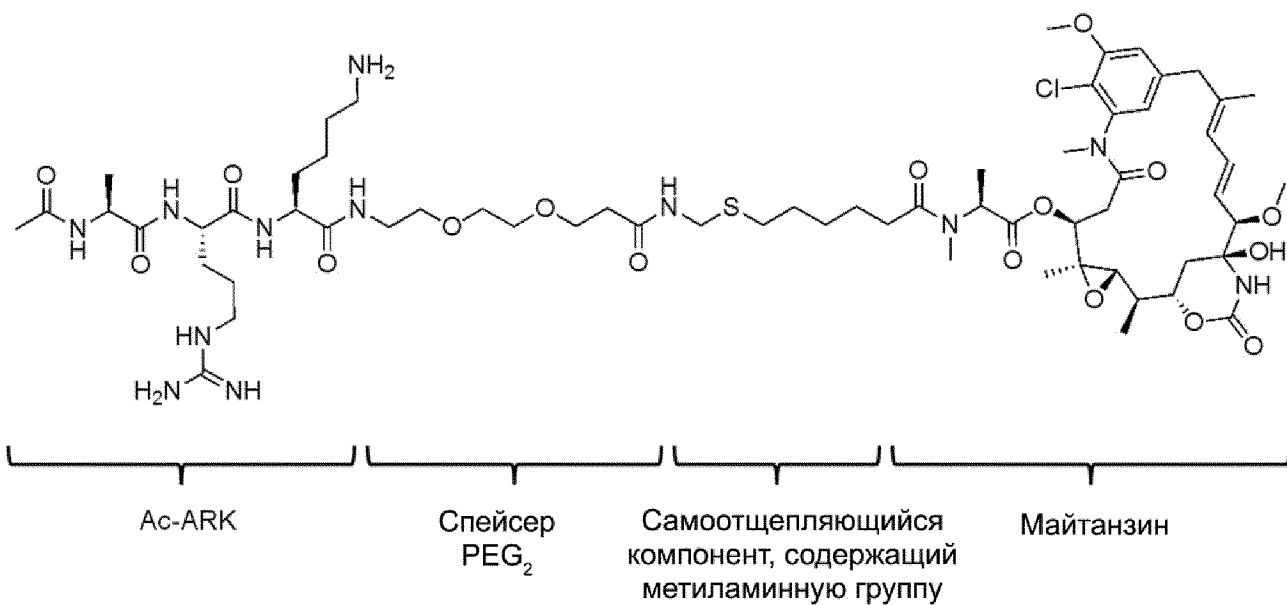
Глутамин Q

ФИГ. 13

11/27

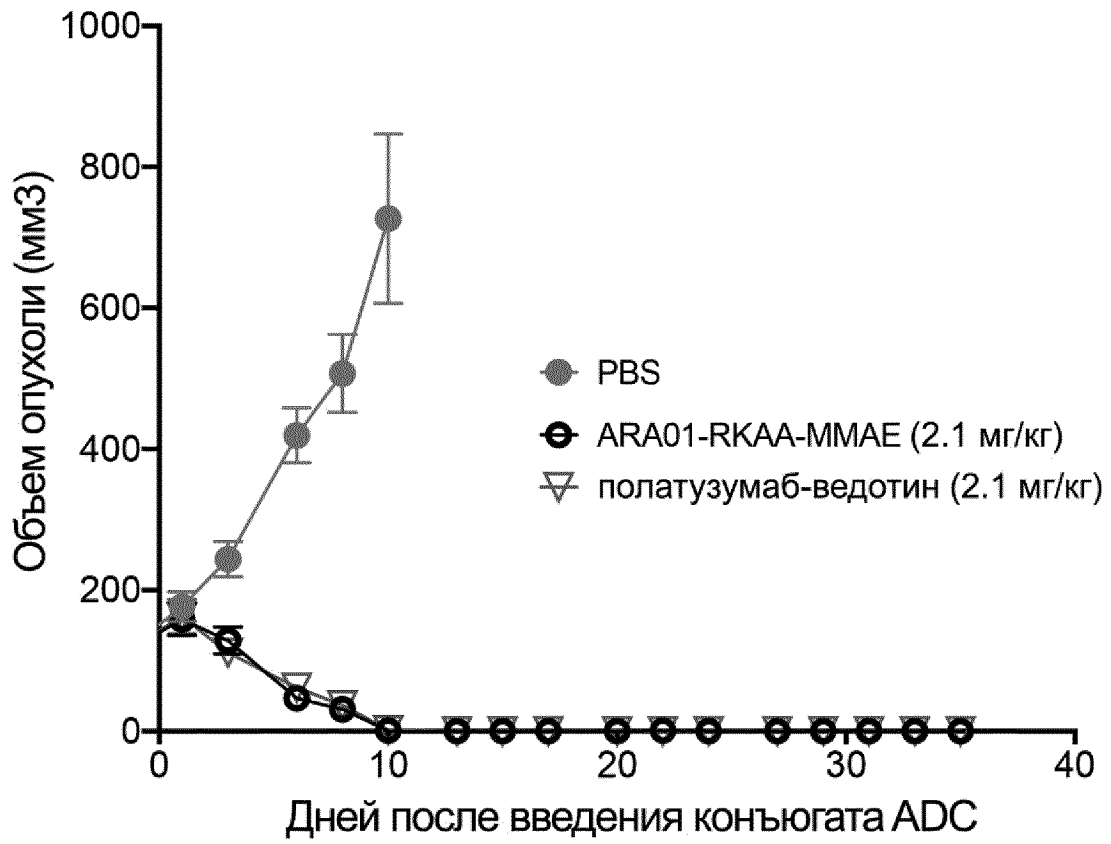


ФИГ. 14

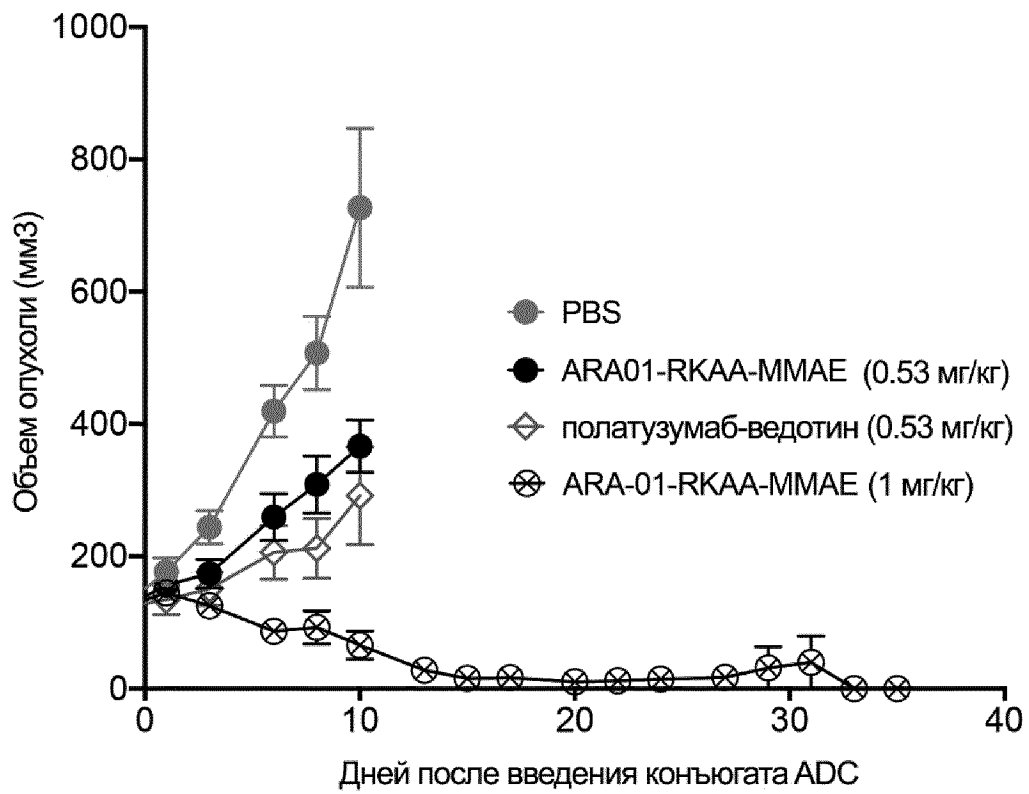


ФИГ. 15

12/27

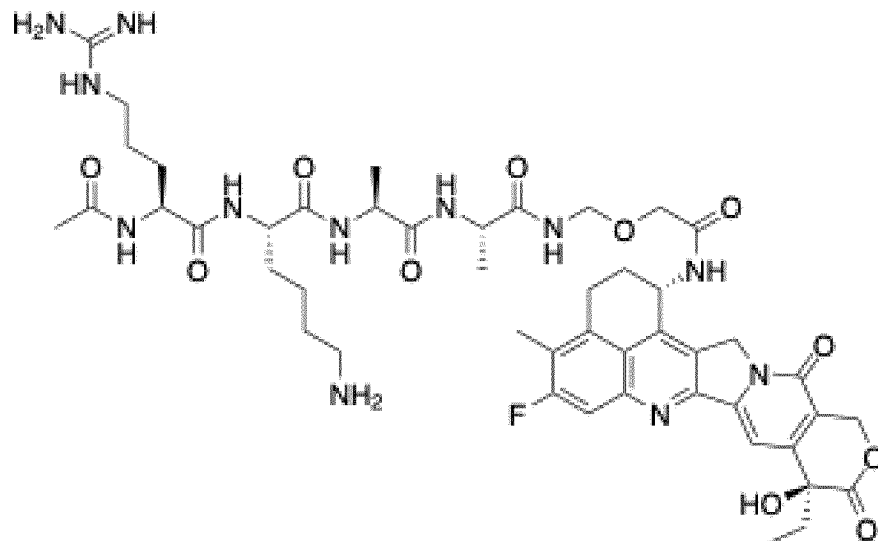


ФИГ. 16А

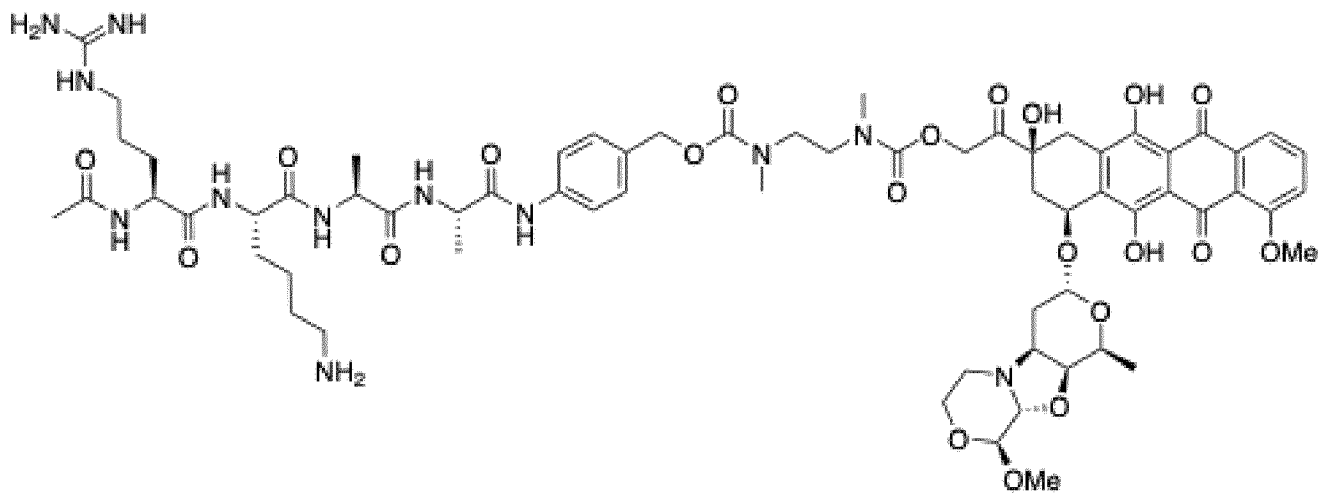


ФИГ. 16В

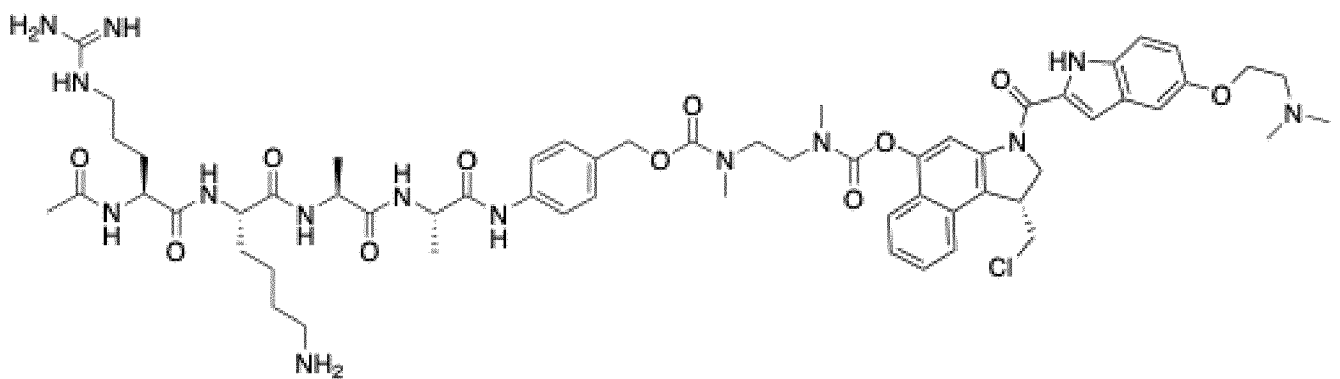
14/27



ФИГ. 17

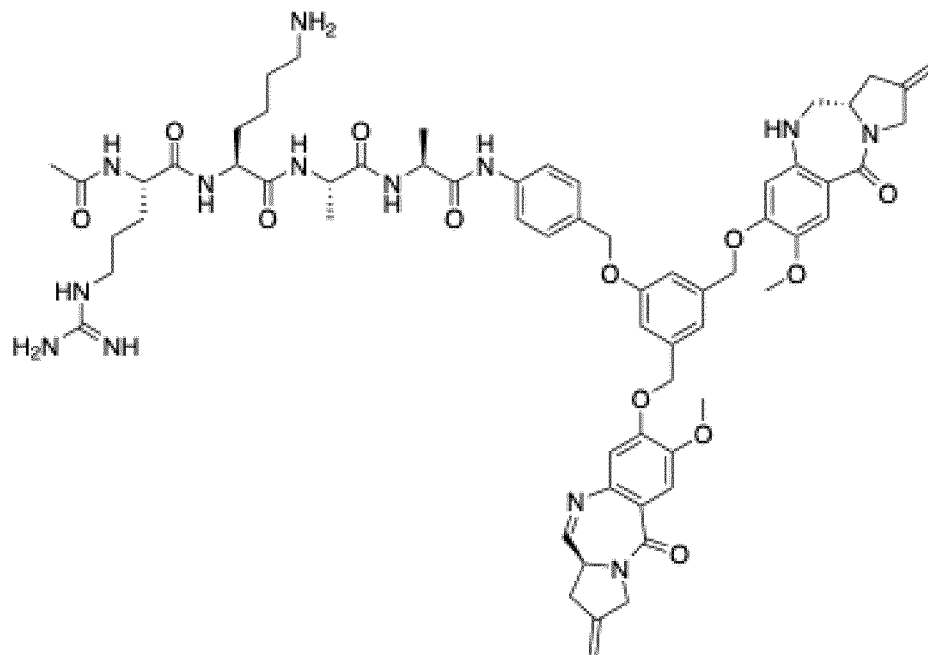


ФИГ. 18

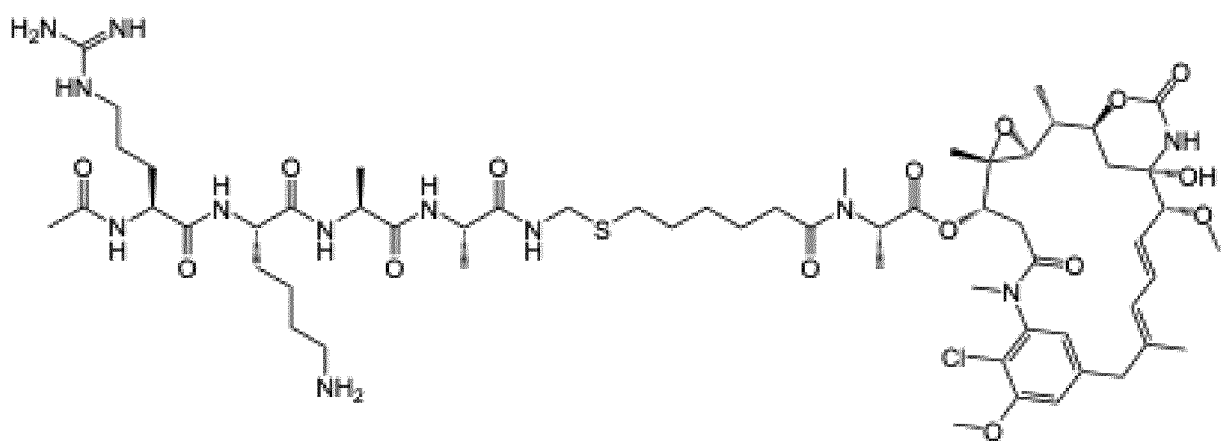


ФИГ. 19

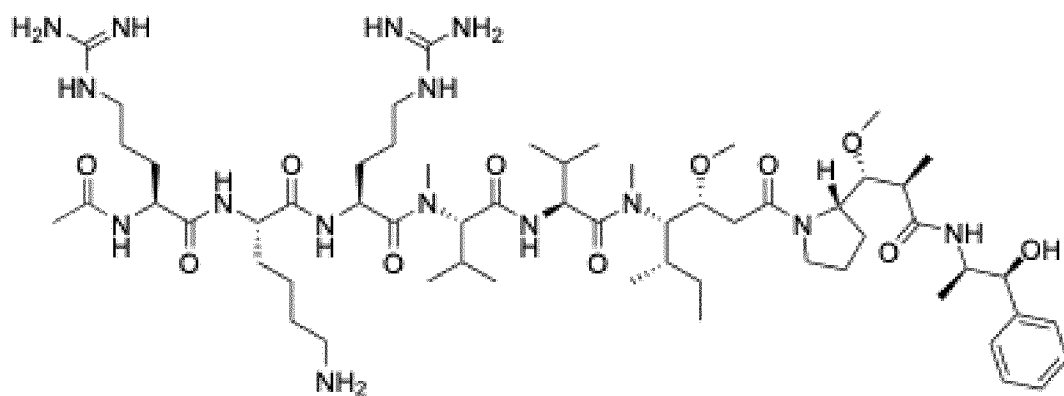
15/27



ФИГ. 20

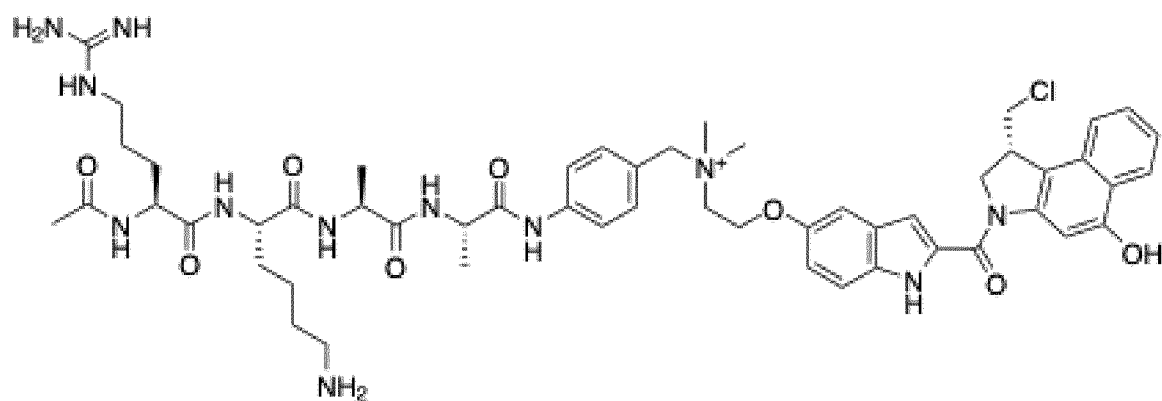


ФИГ. 21

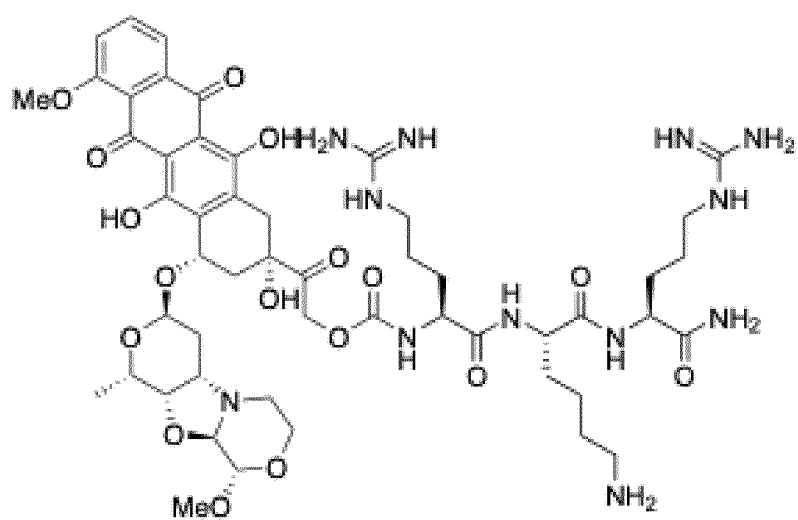


ФИГ. 22

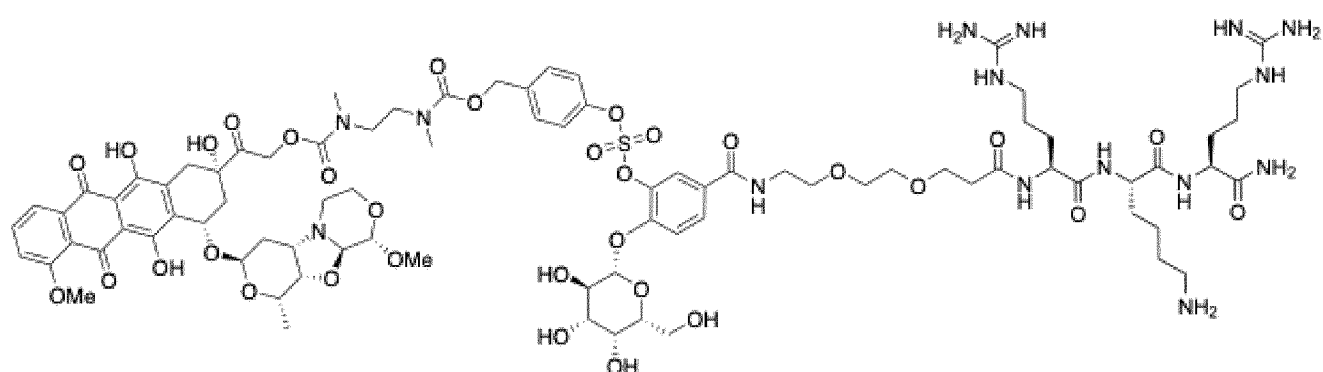
16/27



ФИГ. 23

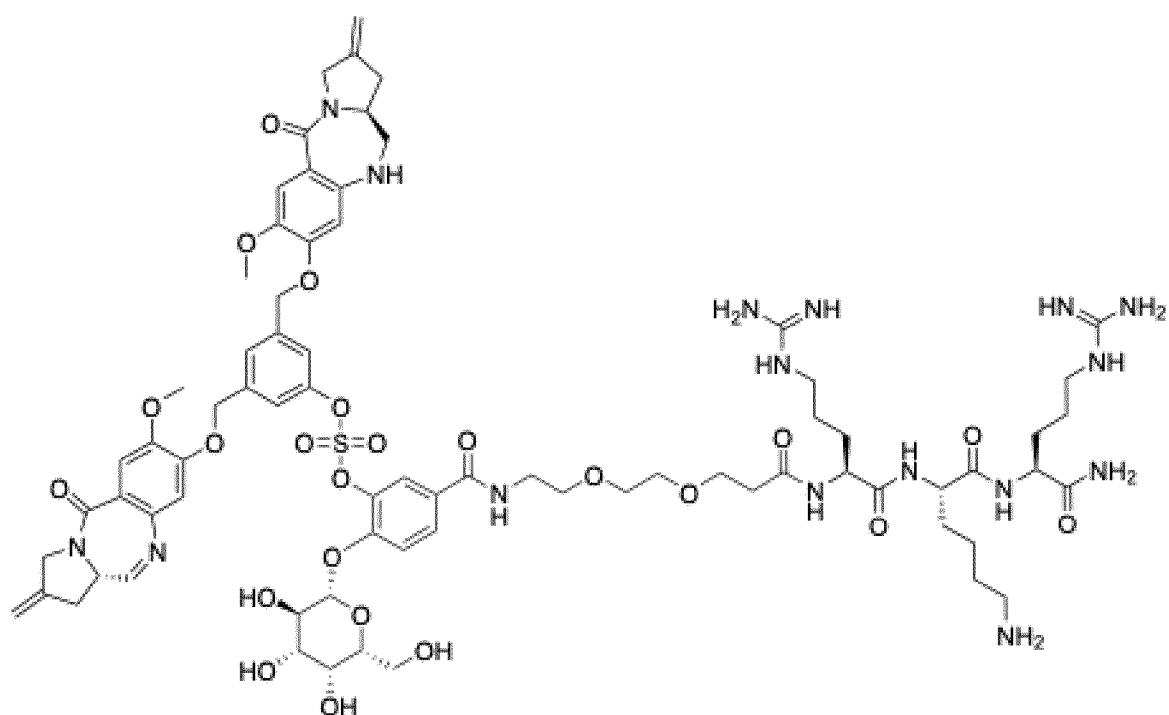


ФИГ. 24

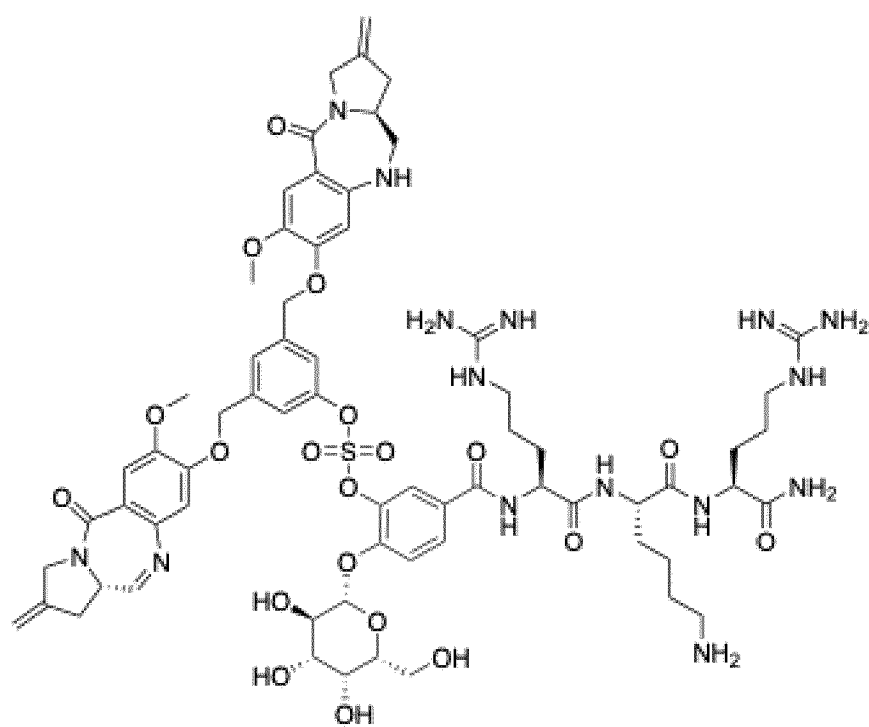


ФИГ. 25

17/27

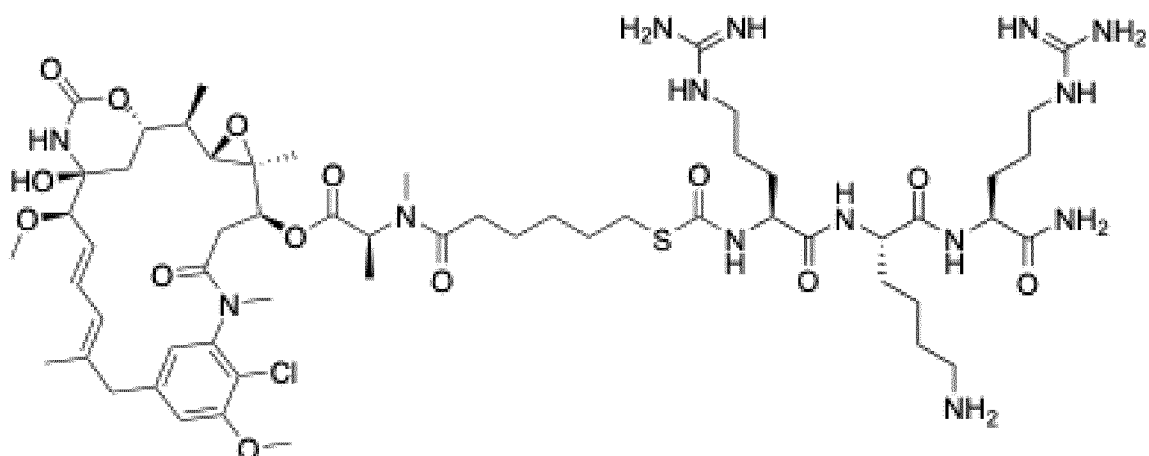


ФИГ. 26

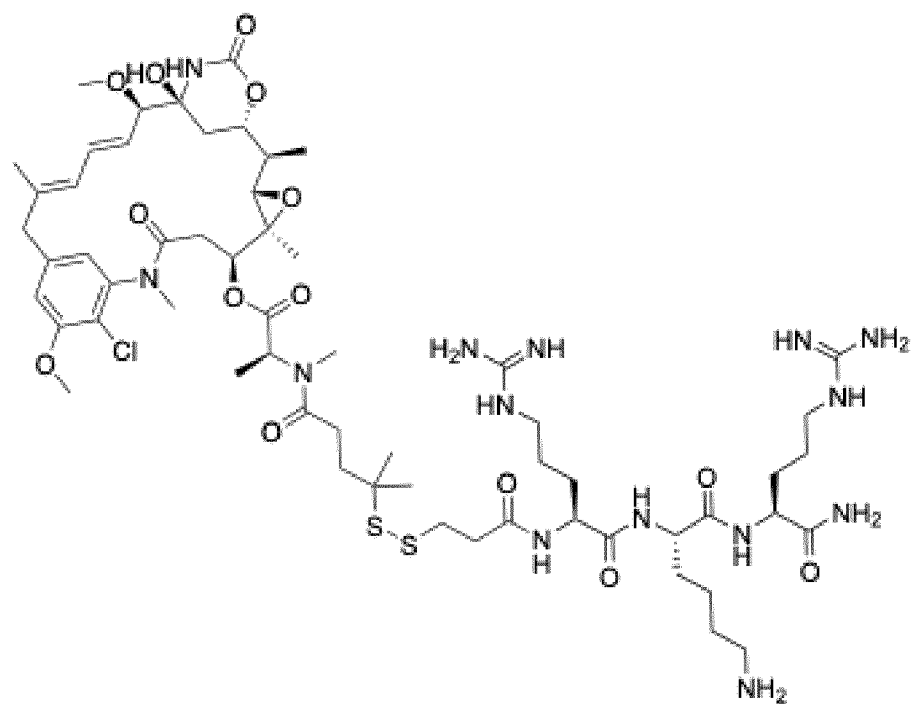


ФИГ. 27

18/27

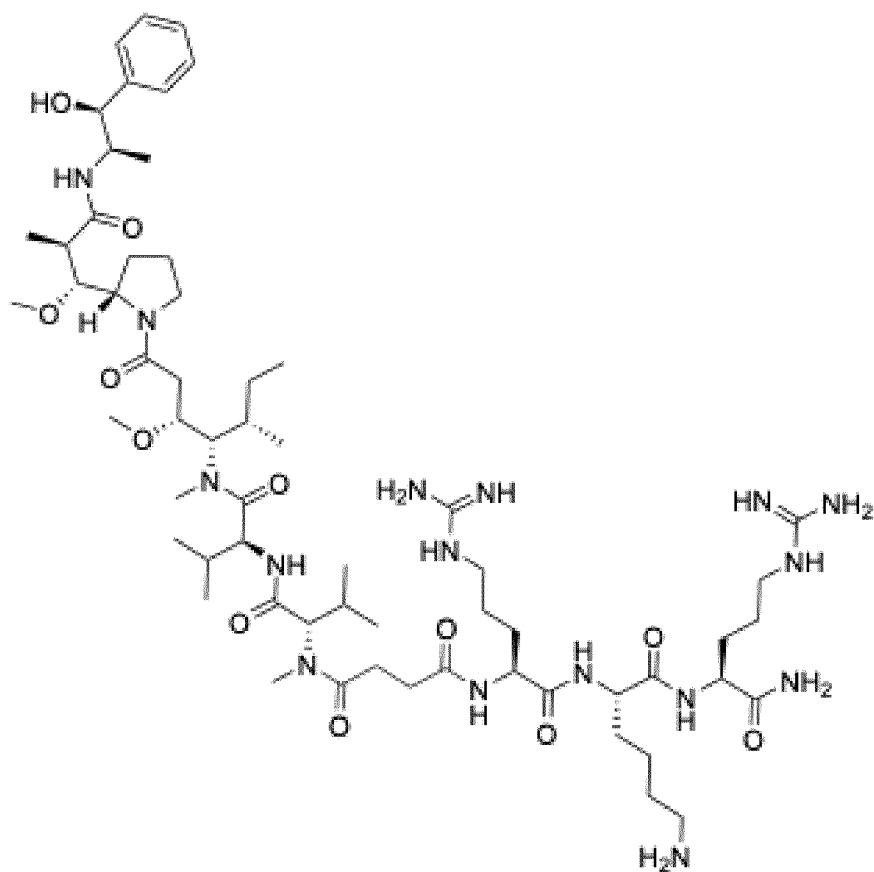


ФИГ. 28

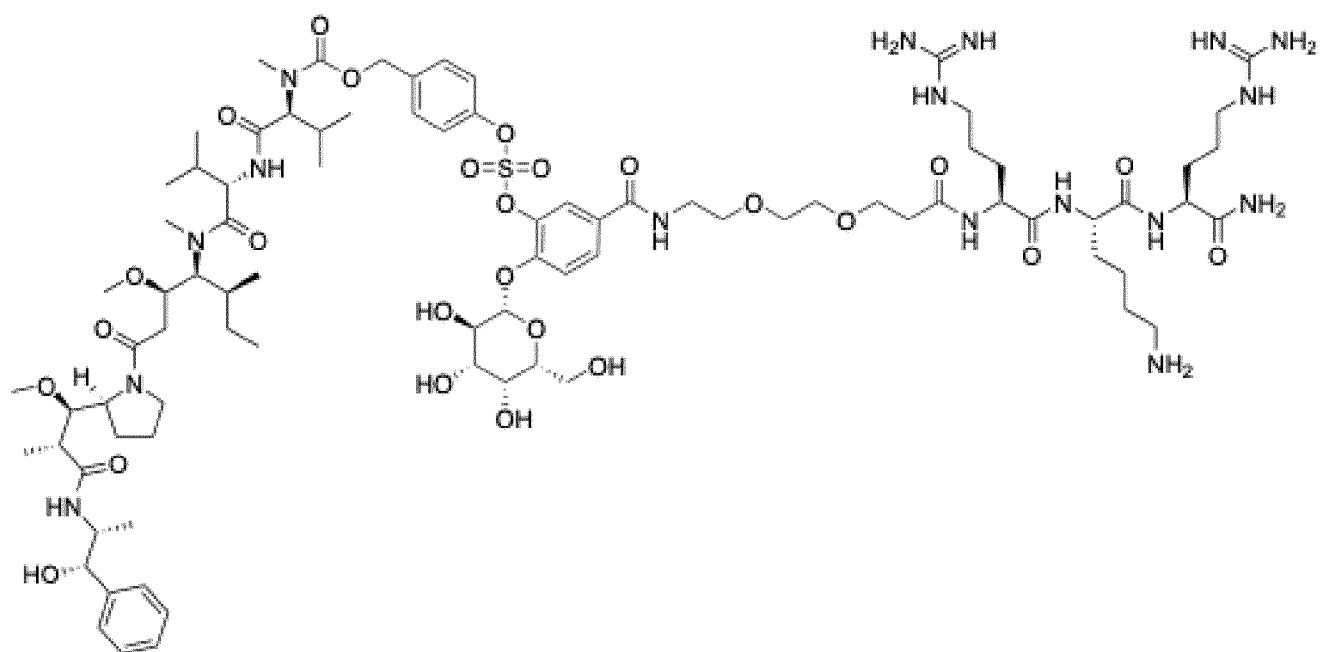


ФИГ. 29

19/27

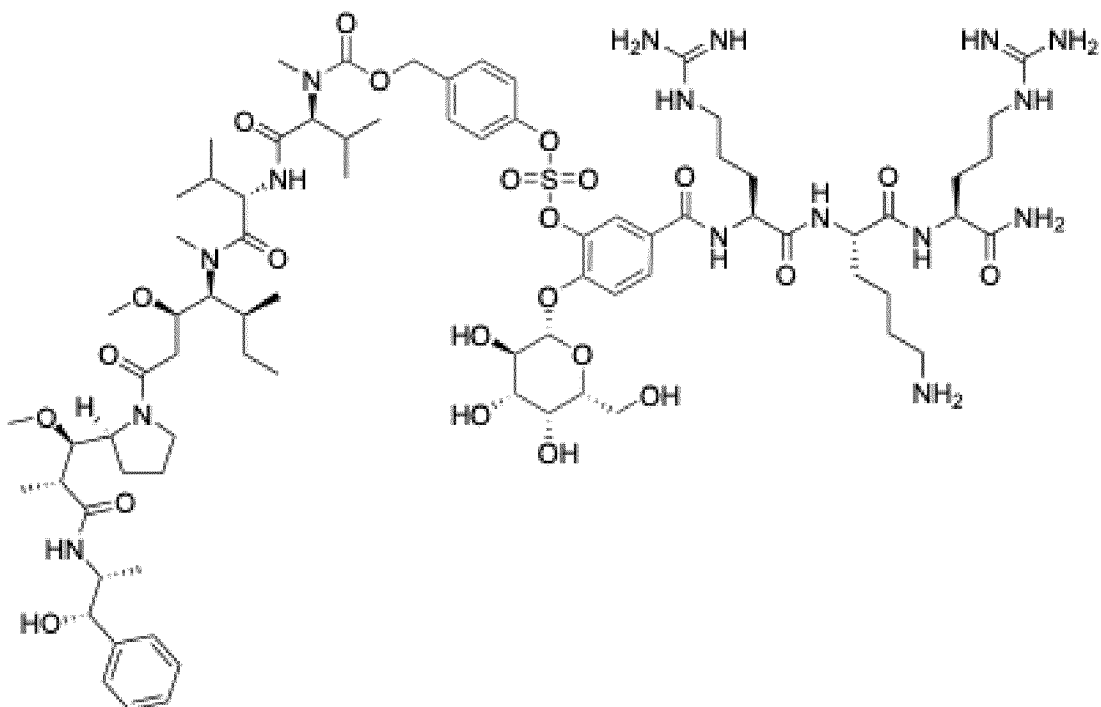


ФИГ. 30

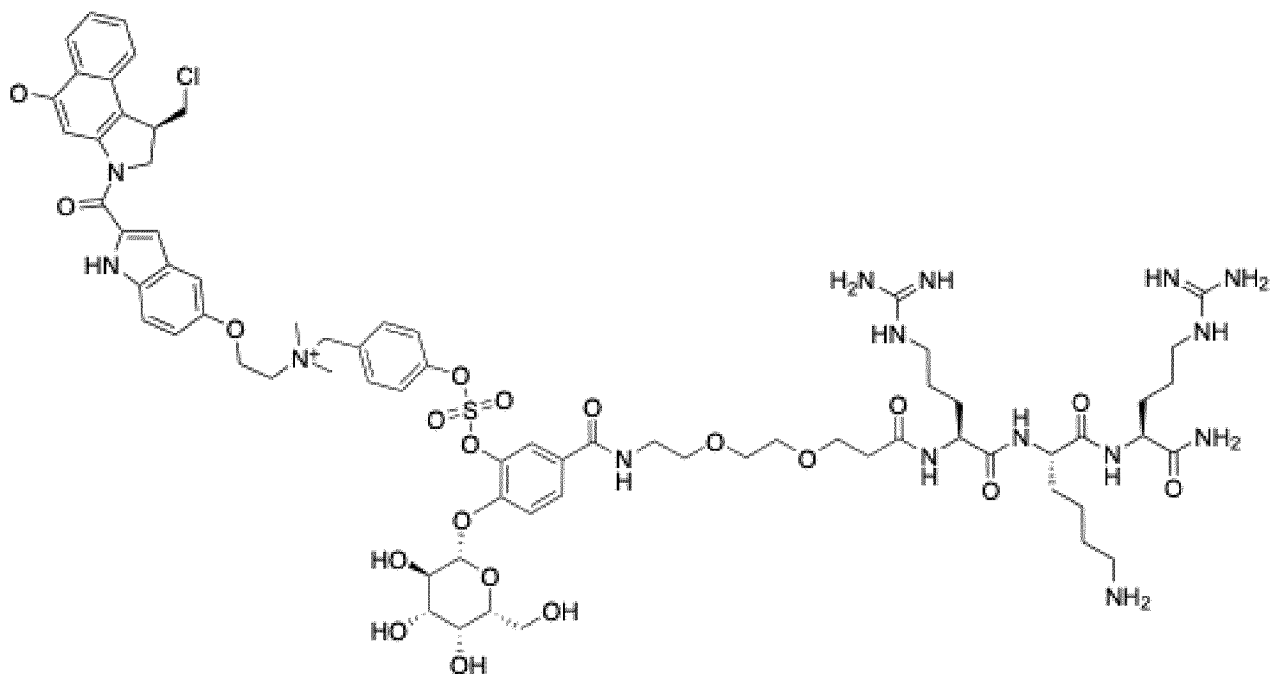


ФИГ. 31

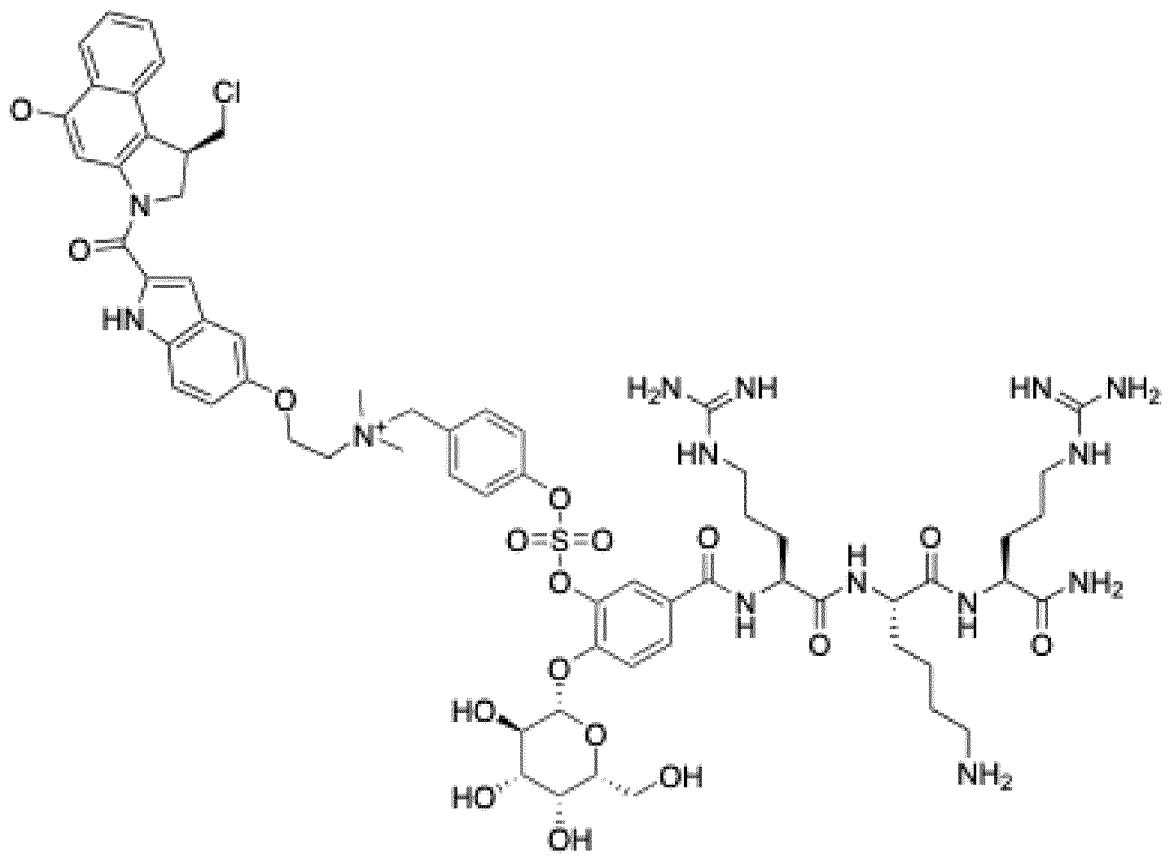
20/27



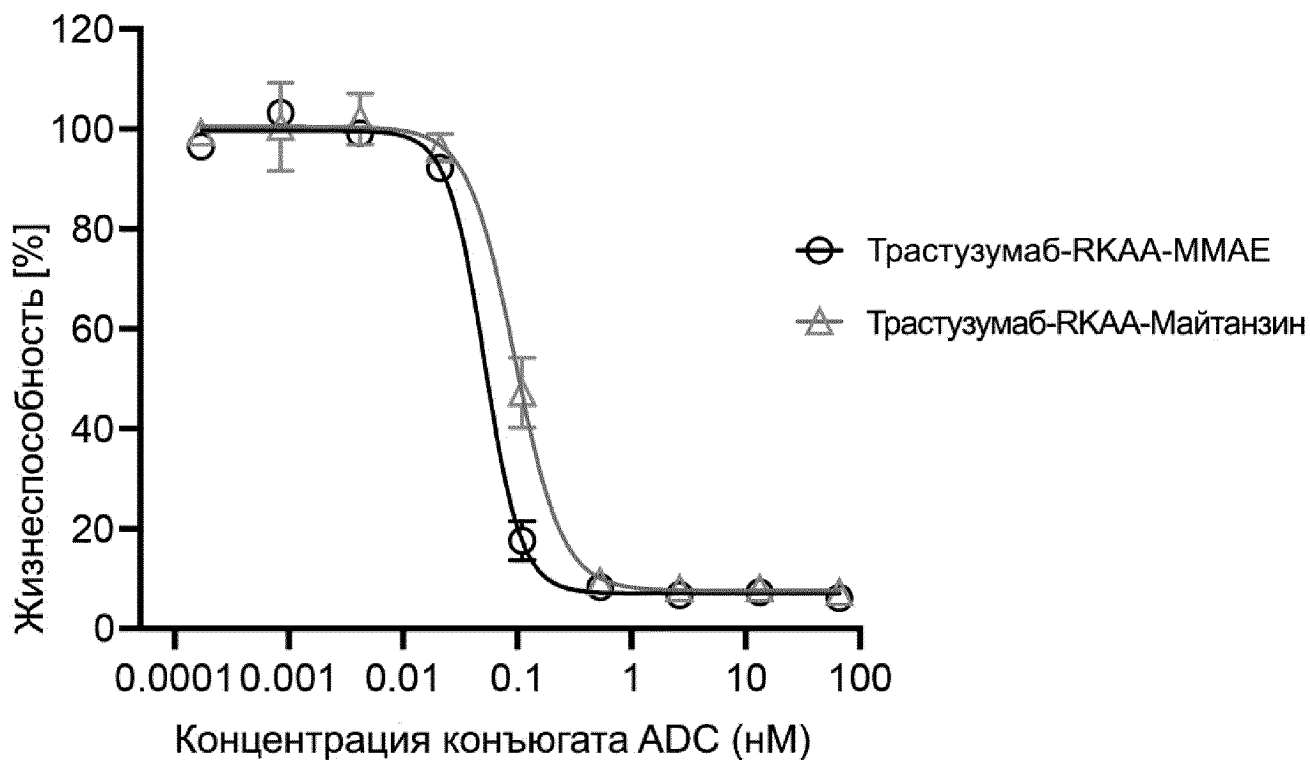
ФИГ. 32



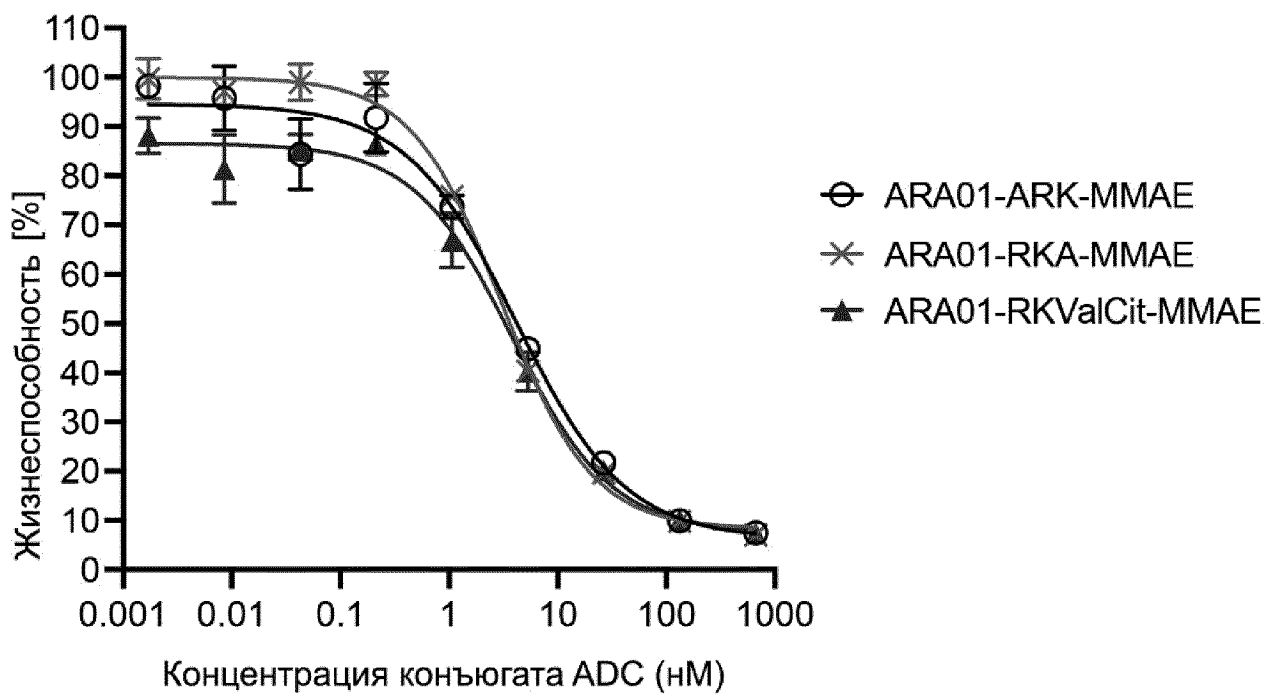
ФИГ. 33



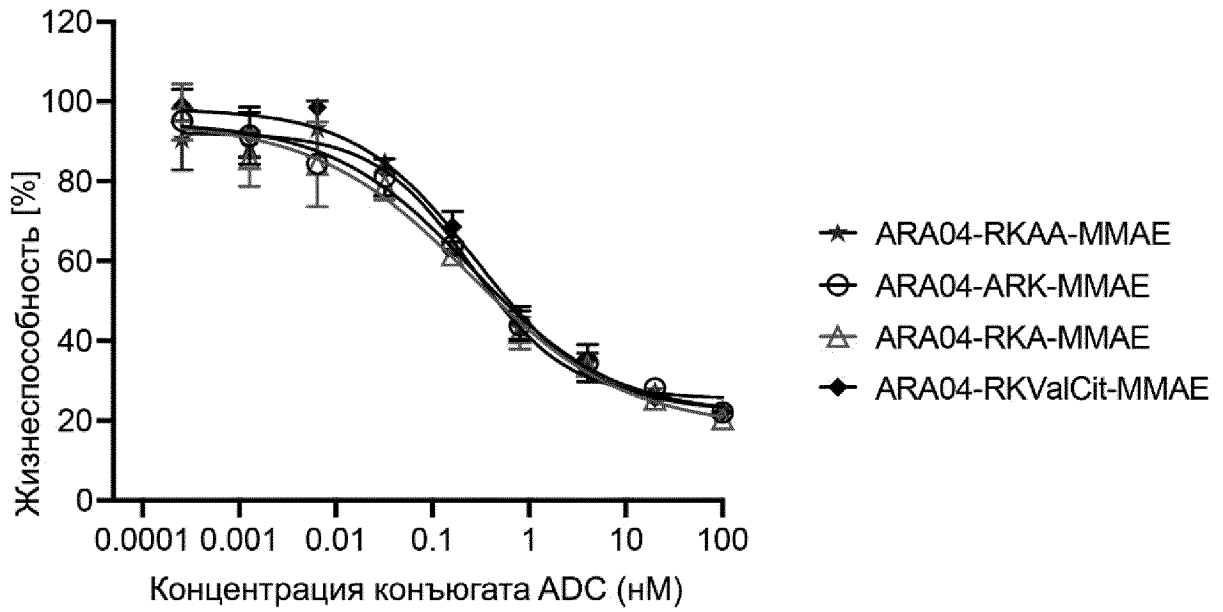
ФИГ. 34



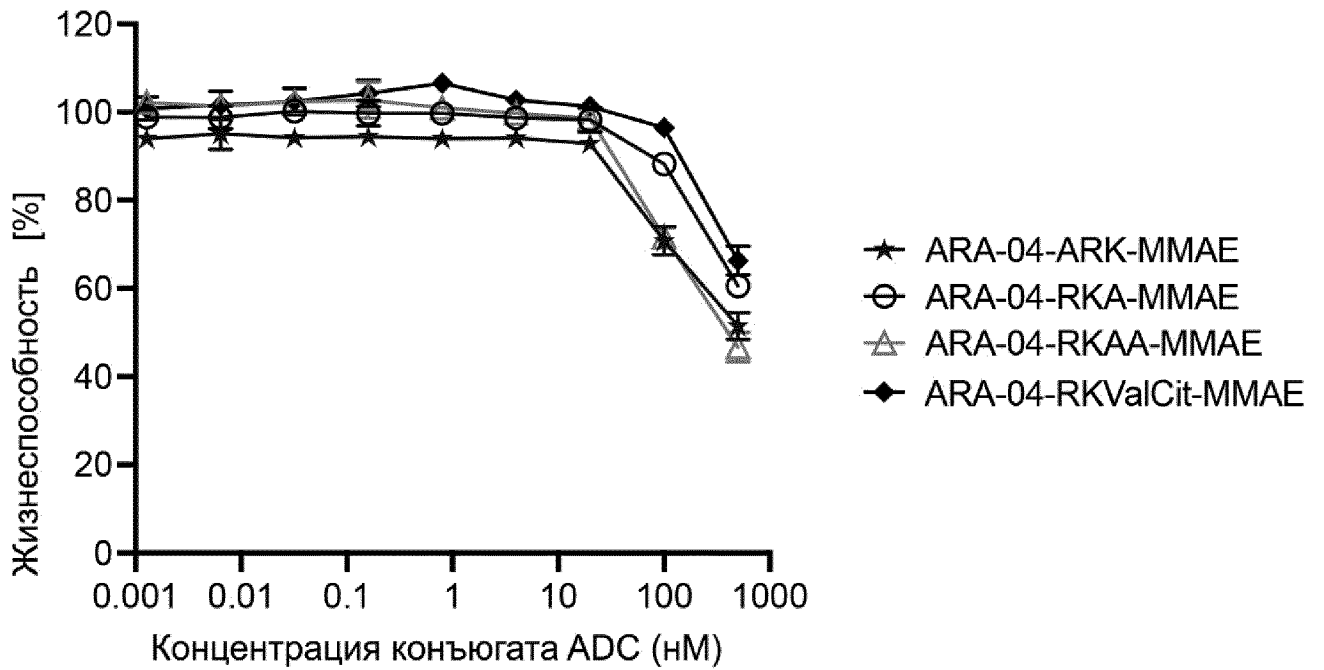
ФИГ. 35



ФИГ. 36

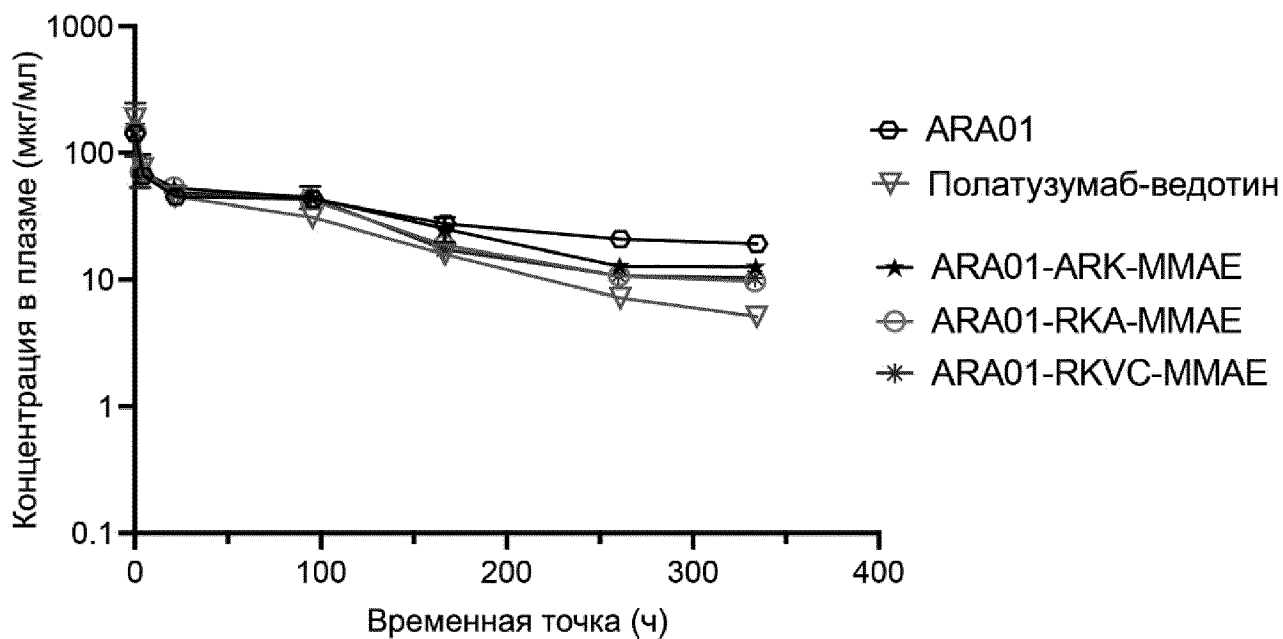


ФИГ. 37

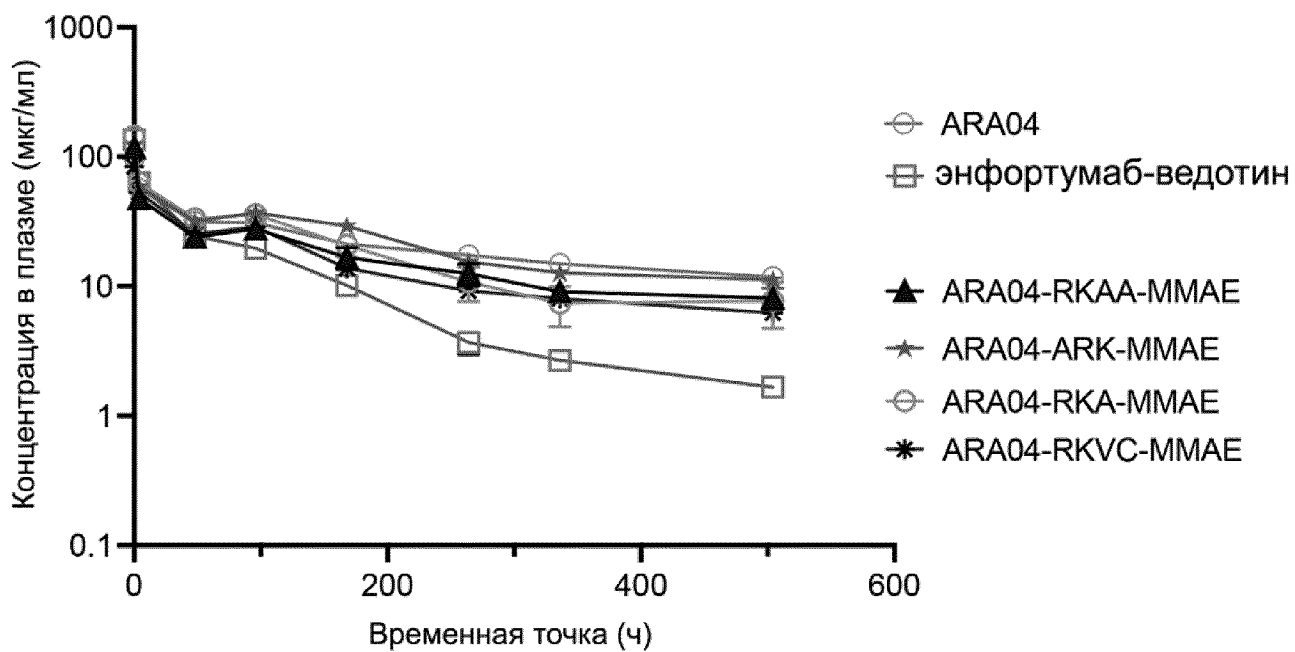


ФИГ. 38

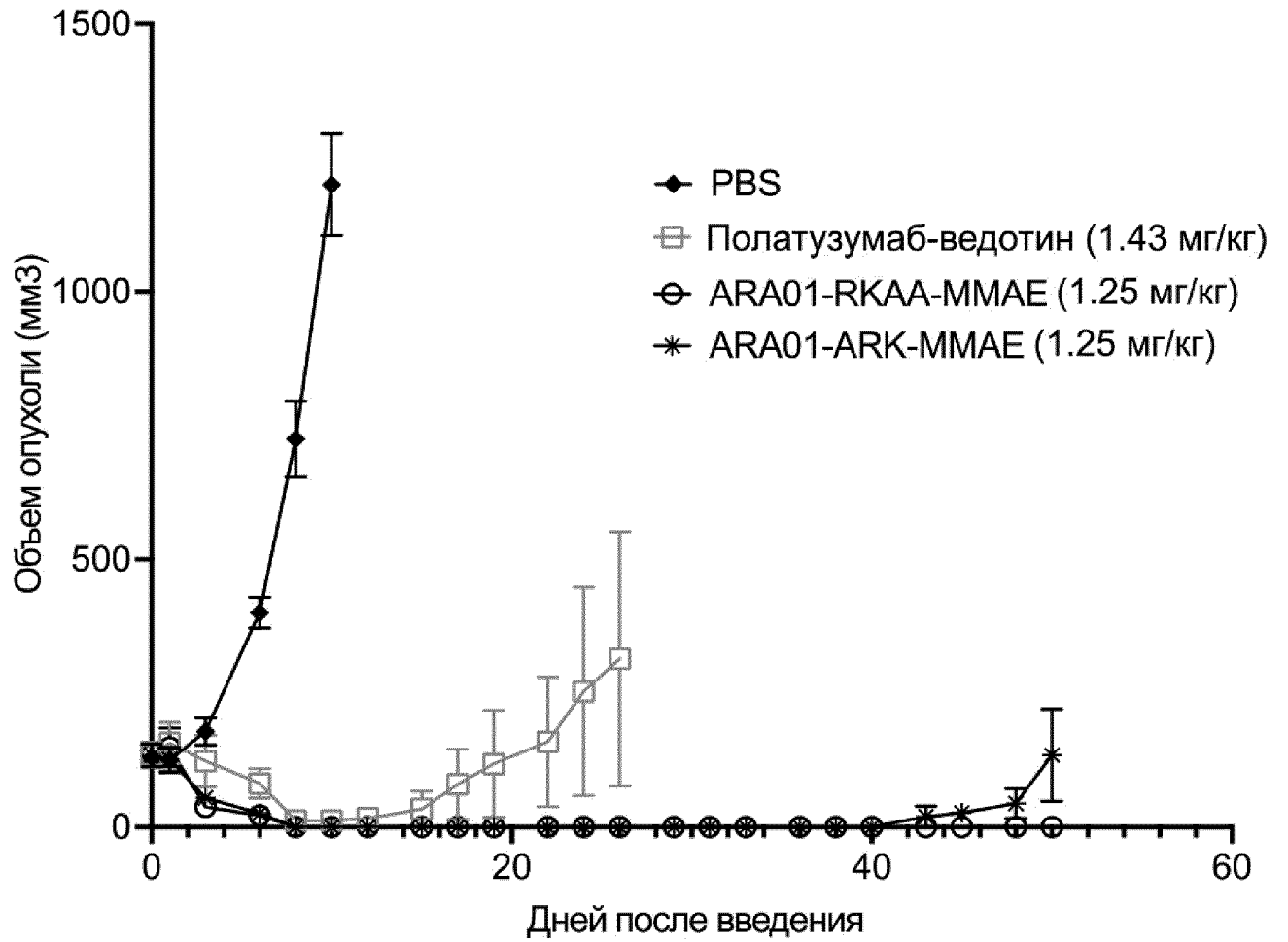
24/27



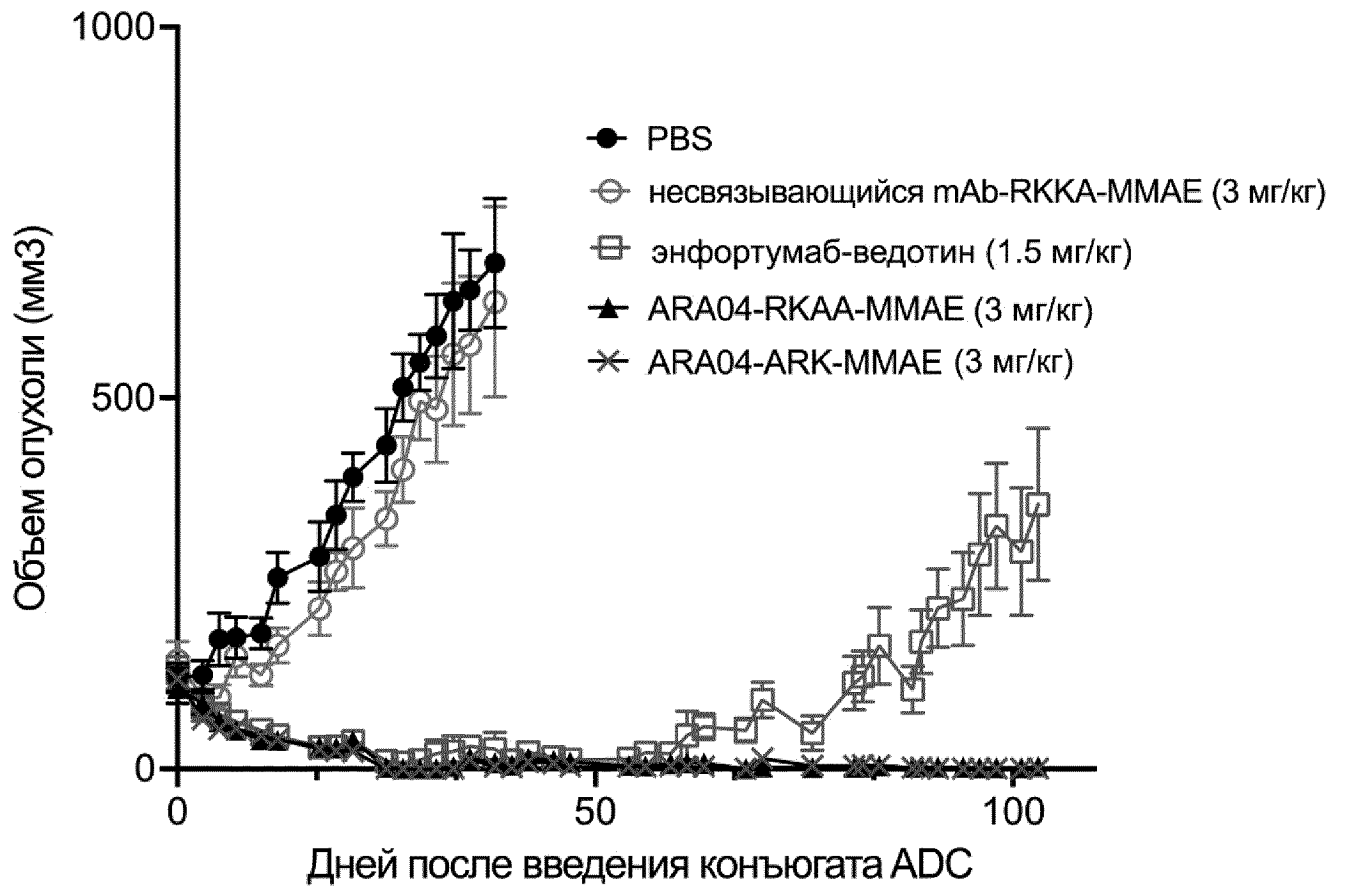
ФИГ. 39



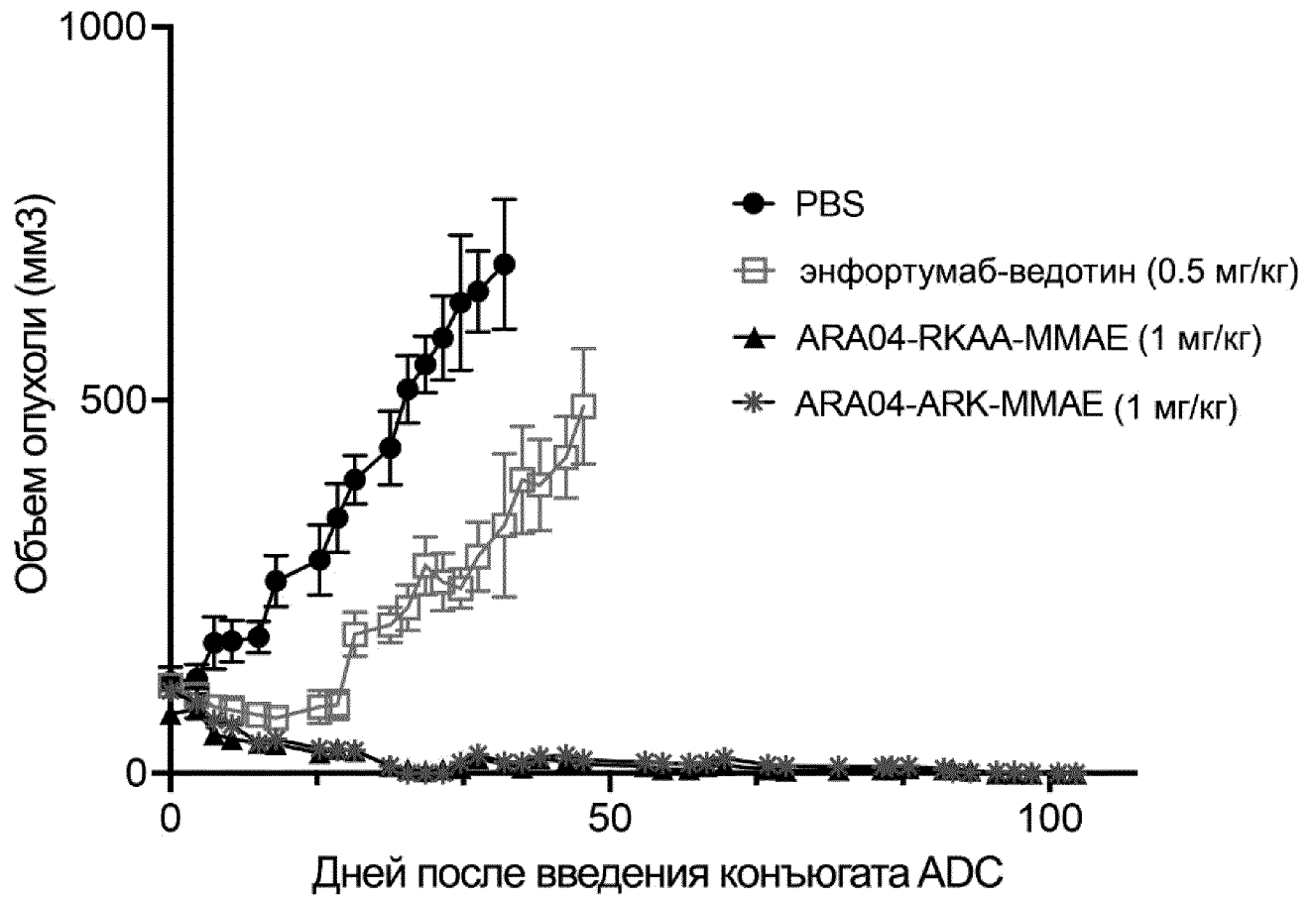
ФИГ. 40



ФИГ. 41



ФИГ. 42



ФИГ. 43