

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393576 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.05.20

(22) Дата подачи заявки
2022.07.22

(51) Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 31/357 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) КОНЬЮГАТ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ПРОИЗВОДНОГО ЭРИБУЛИНА

(31) 202110830783.6

(32) 2021.07.22

(33) CN

(86) PCT/CN2022/107479

(87) WO 2023/001300 2023.01.26

(71) Заявитель:

ШАНХАЙ СЭНЬХУЭЙ МЕДИЦИН
КО., ЛТД.; ШАНХАЙ ШЭНДИ
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО.,
ЛТД.; ШАНХАЙ ХЭНЖУЙ
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО.,
ЛТД.; ЦЗЯНСУ ХЭНЖУЙ
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ КО., ЛТД. (CN)

(72) Изобретатель:

Сунь Син, Ян Чанюн, Лян Цзиньдун,
Ляо Чэн (CN)

(74) Представитель:

Хмара М.В. (RU)

(57) Конъюгат лекарственного средства производного Эрибулина. В частности, предложен конъюгат антитела против HER2, который образован посредством связывания производного Эрибулина со структурным доменом II HER2, способ его получения и его фармацевтическое применение. Кроме того, настоящее изобретение относится к способу лечения рака посредством введения конъюгата антитело-лекарственное средство и композиции.

A1

202393576

202393576

A1

КОНЬЮГАТ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ПРОИЗВОДНОГО ЭРИБУЛИНА

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее раскрытие относится к конъюгату лекарственного средства
5 производного эрибулина.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Конъюгат антитело - лекарственное средство (ADC - от англ. Antibody drug
conjugate) связывает моноклональное антитело или фрагмент антитела с
10 биологически активным лекарственным средством посредством стабильного
химического линкерного соединения, с полным использованием специфичности
связывания антитела с поверхностными антигенами нормальных клеток и
опухолевых клеток и высокой эффективности данного лекарственного средства, и
также избегая недостатка первого, заключающегося в обладании плохим
15 терапевтическим эффектом, недостатка последнего, заключающегося в серьезных
токсичных побочных эффектах, и т.п. Это означает, что конъюгат антитело –
лекарственное средство может точно связываться с опухолевыми клетками и
оказывает уменьшенное воздействие на нормальные клетки, по сравнению с
общепринятыми химиотерапевтическими лекарственными средствами предыдущих
20 лет.

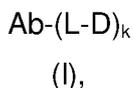
С тех пор, как первый конъюгат антитело-лекарственное средство, Милотарг
(гемтузумаб озогамин, Wyeth Pharmaceutical Co., Ltd.), был одобрен FDA (от англ.
Food and Drug Administration - Управление по контролю качества пищевых продуктов
и лекарственных средств) в Соединенных Штатах Америки для лечения острого
25 миелоидного лейкоза в 2000 году, в общей сложности 164 ADC-лекарственных
средств вступили в фазу клинических исследований, наибольшее количество (n =
100) - в фазу клинических исследований I, 46 – в фазу клинических исследований II,
7 – в фазу клинических исследований III и 3 – в фазу заявления BLA (от англ.
biologics license application - заявление о регистрации биологического
30 лекарственного препарата). Репрезентативными конъюгатами антитело-
лекарственное средство третьего поколения, представленными на рынке, являются
полатузумаб ведотин (торговое название Polivy, запущенный в продажу в июне 2019
года), совместно разработанный Genentech и Genetics, энфортумаб ведотин
(торговое название Padcev, запущенный в продажу в декабре 2019 года), совместно
35 разработанный Agensys (дочерняя компания Astellas) и Seattle Genetics, и фам-

трастузумаб дерукстекан (торговое название Enhertu), разработанный Daiichi Sankyo.

Микротрубочки представляют собой активные филаментные белки цитоскелета, ассоциированные с множеством клеточных функций, включая
 5 внутриклеточную миграцию и транспорт, клеточную сигнализацию и поддержание формы клетки. Микротрубочки также играют решающую роль в митотическом делении клетки за счет образования митотического веретена, требуемого для
 10 разделения хромосом на две дочерние клетки. Биологические функции микротрубочек во всех клетках регулируются по большей части их динамикой полимеризации, и полимеризация микротрубочек происходит за счет обратимого, нековалентного добавления димеров α - и β -тубулина с обоих концов микротрубочек. Данное динамическое поведение и достигаемый контроль над длиной микротрубочки являются крайне важными для правильной функции митотического
 15 веретена. Даже незначительные изменения в динамике микротрубочек затрагивают контрольную точку сборки веретена деления, ингибируют прохождение по клеточному циклу во время митоза и, впоследствии, вызывают гибель клетки. Поскольку раковые клетки делятся быстро, они обычно более чувствительны к соединениям, которые связываются с тубулином и нарушают их нормальные функции, чем нормальные клетки. Таким образом, ожидают, что ингибиторы
 20 тубулина и другие агенты, нацеленные на микротрубочки, представляют собой класс лекарственных средств для лечения рака.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

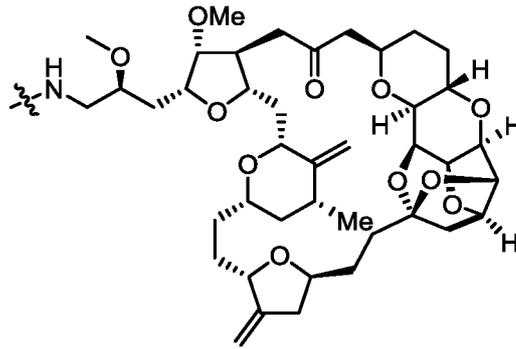
Согласно настоящему раскрытию предложен конъюгат антитело-
 25 лекарственное средство (ADC), имеющий структуру формулы (I), или его фармацевтически приемлемая соль или сольват:



где Ab представляет собой антитело против HER2 или его
 30 антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с доменом II HER2,

L представляет собой линкер, ковалентно связывающий Ab с D, и k составляет от 1 до 20 (включая 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, или любое значение между любыми двумя значениями);

-D показано ниже в виде следующей формулы:



В некоторых воплощениях k в конъюгате антитело-лекарственное средство $Ab-(L-D)_k$ может быть выбран из группы, состоящей из 1-10, и может представлять собой целое число или десятичное число.

5 В некоторых воплощениях линкер является внеклеточно стабильным, таким образом, что ADC остается интактным, когда находится во внеклеточной среде, но может расщепляться при поглощении клеткой, такой как раковая клетка. В некоторых воплощениях группировка лекарственного средства - производного эрибулина отщепляется от группировки антитела, когда ADC поступает в клетку, которая экспрессирует антиген, специфичный для группировки антитела ADC, и в результате отщепления высвобождается немодифицированная форма производного эрибулина.

10

В некоторых воплощениях расщепляемая группировка в линкере представляет собой расщепляемую пептидную группировку. В некоторых воплощениях ADC, содержащий расщепляемую пептидную группировку, показывает более низкий уровень агрегирования, улучшенное отношение антитела к лекарственному средству, усиленное целенаправленное уничтожение раковых клеток, ослабленное нецелевое уничтожение нераковых клеток и/или более высокую загрузку лекарственным средством, по сравнению с ADC, содержащим другие расщепляемые группировки. В некоторых воплощениях добавление расщепляемой группировки увеличивает цитотоксичность и/или силу, по сравнению с нерасщепляемым линкером. В некоторых воплощениях расщепляемая пептидная группировка может расщепляться под действием фермента, и данный линкер представляет собой линкер, способный расщепляться под действием фермента. В некоторых воплощениях фермент представляет собой катепсин, и линкер представляет собой линкер, способный расщепляться под действием катепсина. В некоторых воплощениях линкер, расщепляемый ферментом (например, линкер, расщепляемый катепсином) демонстрирует одно или более из улучшенных свойств, описанных выше, по сравнению с другими механизмами расщепления.

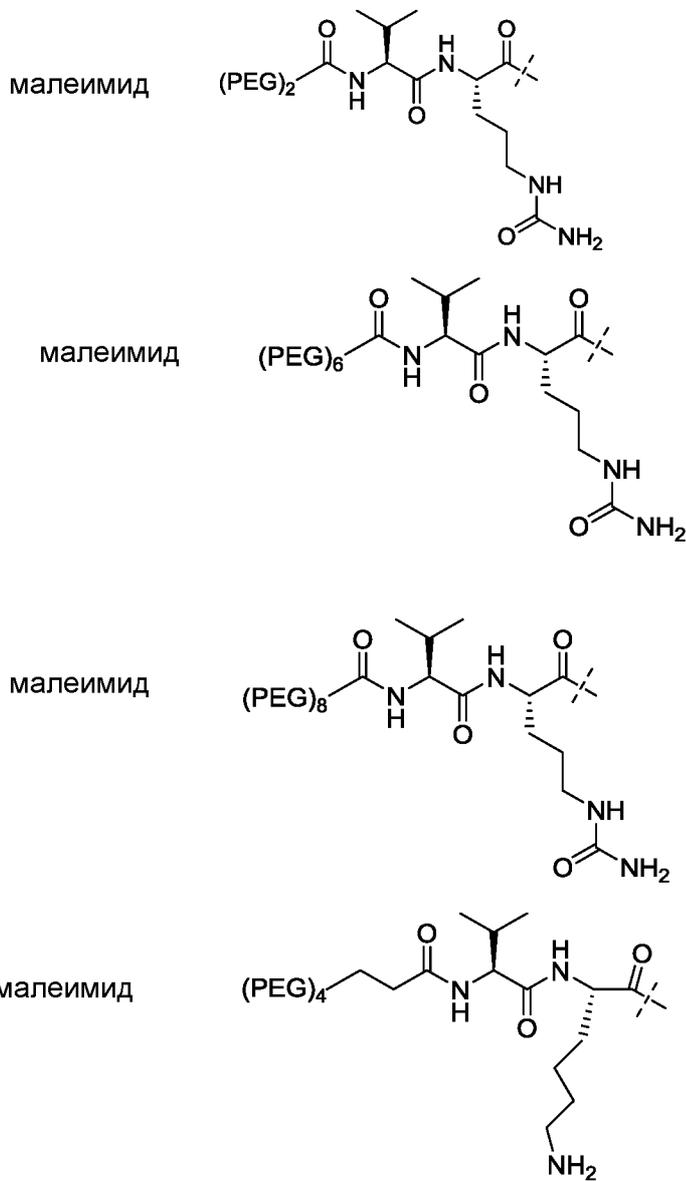
15

20

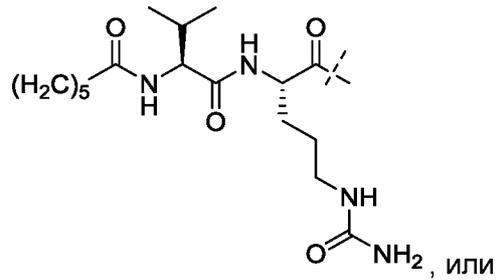
25

В некоторых воплощениях линкер содержит аминокислотное звено, и данное аминокислотное звено предпочтительно содержит остаток пептида, состоящий из 2-7 аминокислот, выбранных из группы, состоящей из фенилаланина, глицина, валина, лизина, цитруллина, серина, глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты, и более предпочтительно валина-цитруллина (Val-Cit), аланина-аланина-аспарагина (Ala-Ala-Asn), глицина-глицина-лизина (Gly-Gly-lys), валина-лизина (Val-lys), валина-аланина (Val-Ala), валина-фенилаланина (Val-Phe) и глицина-глицина-фенилаланина-глицина (Gly-Gly-Phe-Gly).

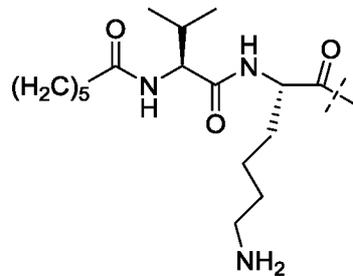
В некоторых воплощениях линкер, содержащий аминокислотное звено по настоящему раскрытию, выбран из группы, состоящей из нижеследующего:



малеимид



малеимид



В некоторых воплощениях аминокислотное звено содержит валин-цитруллин (Val-Cit). В некоторых воплощениях ADC, содержащий Val-Cit, показывает

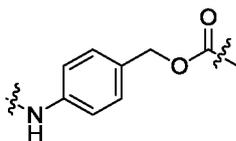
5 повышенную стабильность, ослабленное ненаправленное уничтожение клеток, повышенное направленное уничтожение клеток, пониженный уровень агрегирования и/или более высокую загрузку лекарственным средством, по сравнению с ADC, содержащим другие аминокислотные звенья или другие расщепляемые группировки.

10 В еще одном аспекте линкер, предложенный согласно некоторым воплощениям, содержит расщепляемую сульфонамидную группировку, и данный линкер может расщепляться в восстанавливающих условиях.

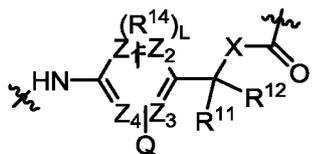
В некоторых воплощениях линкер содержит расщепляемую дисульфидную группировку, и данный линкер может расщепляться в восстанавливающих условиях.

15 В еще одном аспекте линкер в конъюгате антитела по настоящему раскрытию содержит по меньшей мере одно спейсерное звено, которое связывает производное эрибулина D с расщепляемой группировкой. В некоторых воплощениях линкер содержит спейсерное звено, связывающееся с D.

20 В некоторых воплощениях спейсерное звено содержит пара-аминобензилоксикарбонил (pAB)

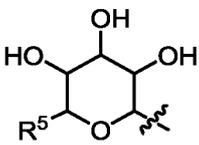


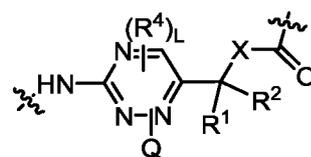
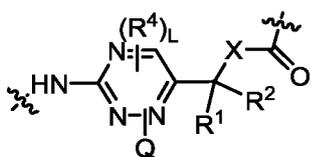
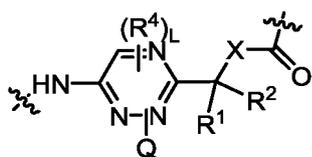
В некоторых воплощениях спейсерное звено содержит:



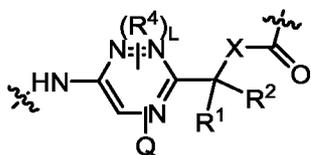
где каждый из Z_1 - Z_4 независимо выбран из группы, состоящей из атома углерода и атома азота; R^4 выбран из группы, состоящей из алкила, циклоалкила, арила и гетероарила, и каждый из алкила, циклоалкила, арила и гетероарила
 5 независимо возможно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из алкила, алкокси, галогена, амина, циано, нитро, гидроксид, гидроксилалкила, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила и гетероарила; каждый из R^1 и R^2 независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, C_{1-6} алкила, галогеналкила и C_{3-6} циклоалкила, предпочтительно, атома водорода; или R^1 и R^2 ,
 10 вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют C_{3-6} циклоалкил; X выбран из группы, состоящей из -O- и -NH-; L выбран из группы, состоящей из целых чисел от 1 до 4;

Q представляет собой V-E, V-E обеспечивает гликозидную связь, расщепляемую под действием внутриклеточно расположенной гликозидазы, и E
 15 выбран из группы, состоящей из -O-, -S- и -NR³-, где R^3 выбран из группы,

состоящей из атома водорода и метила; кроме того, V выбран из , где R^5 выбран из группы, состоящей из -COOH и CH₂OH. В некоторых воплощениях V выбран из -COOH. В некоторых воплощениях спейсерное звено содержит:



или



20

В еще одном аспекте L-D в конъюгате антитела (ADC) по настоящему раскрытию представляет собой химическую группировку, представленную формулой, указанной ниже:

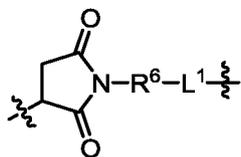
25 -Str- (Pep)-Sp-D,

где Str представляет собой вставочное звено, ковалентно связанное с Ab,

Sp представляет собой спейсерное звено, и

Per выбран из группы, состоящей из аминокислотных звеньев.

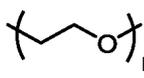
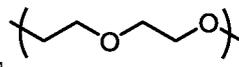
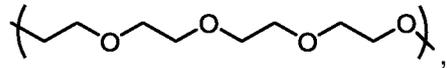
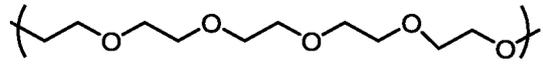
В еще одном аспекте Str в ADC выбран из химической группировки, представленной формулой, указанной ниже:



5 , где R⁶ выбран из группы, состоящей из -W-C(O)-, -C(O)-W-C(O)-, (CH₂CH₂O)_{p1}C(O)-, (CH₂CH₂O)_{p1}CH₂C(O)- и (CH₂CH₂O)_{p1}CH₂CH₂C(O)-, где W выбран из группы, состоящей из C₁₋₈ алкилена, C₁₋₈ алкилен-циклоалкила и линейного гетероалкилена с 1 - 8 атомами, и данный гетероалкилен содержит от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из N, O и S, где каждый из C₁₋₈ алкилена, C₁₋₈ алкилен-циклоалкила и линейного гетероалкилена независимо возможно дополнительно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксид, циано, амино, алкила, хлоралкила, алкокси и циклоалкила;

15 L¹ выбран из группы, состоящей из -NR⁷(CH₂CH₂O)_{p1}CH₂CH₂C(O)-, -NR⁷(CH₂CH₂O)_{p1}CH₂C(O)-, -S(CH₂)_{p1}C(O)-, -(CH₂)_{p1}C(O)-, и химической связи, предпочтительно химической связи, где p1 представляет собой целое число от 1 до 20, и R⁷ выбран из группы, состоящей из атома водорода, алкила, галогеналкила и гидроксилалкила.

20 В некоторых воплощениях линкер может содержать по меньшей мере одну группировку полиэтиленгликоля (PEG – от англ. polyethyleneglycol). Группировка

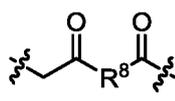
PEG может, например, содержать -(PEG)_{p1}, _{p1}, где p1 представляет собой целое число от 1 до 20, как например, ₂; ₄; ₅.

25 В некоторых воплощениях спейсерное звено в линкере содержит (PEG)₂. В некоторых воплощениях ADC, содержащий более короткое спейсерное звено (например, (PEG)₂), демонстрирует более низкий уровень агрегирования и/или более высокую загрузку лекарственным средством, по сравнению с ADC, содержащим более длинное спейсерное звено (например, (PEG)₈), несмотря на
30 меньшую длину линкера.

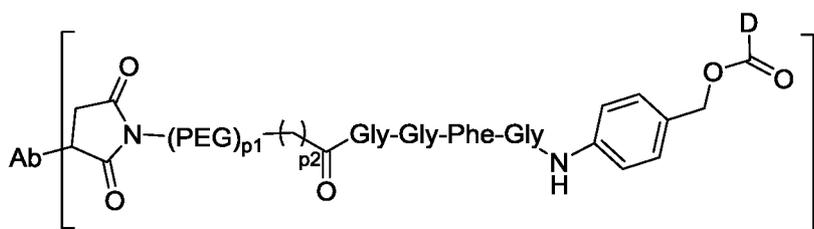
В некоторых воплощениях R^7 в конъюгате антитело-лекарственное средство выбран из группы, состоящей из C_{1-6} алкилена $C(O)-$, $-(CH_2-CH_2O)_2C(O)-$, $-(CH_2-CH_2O)_2CH_2C(O)-$, $-(CH_2-CH_2O)_2CH_2CH_2C(O)-$, $-(CH_2-CH_2O)_3C(O)-$ и $-(CH_2-CH_2O)_4C(O)-$.

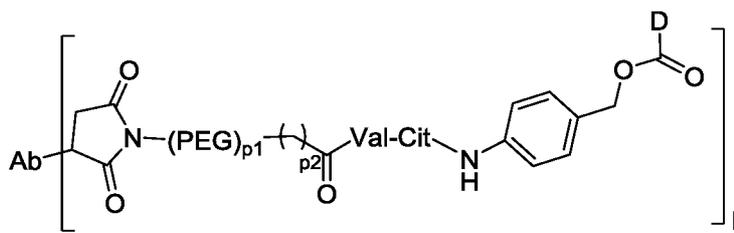
В некоторых воплощениях линкер L в конъюгате антитело-лекарственное средство содержит: малеимид-(PEG)₂-Val-Cit, малеимид-(PEG)₆-Val-Cit, малеимид-(PEG)₈-Val-Cit, малеимид-(PEG)₄-CH₂CH₂C(O)-Val-lys, малеимид-(CH₂)₅-Val-Cit, малеимид-(CH₂)₅-Val-lys, малеимид-(CH₂)₅-Gly-Gly-Phe-Gly, малеимид-(PEG)₂-Ala-Ala-Asn, малеимид-(PEG)₆-Ala-Ala-Asn, малеимид-(PEG)₈-Ala-Ala-Asn, малеимид-(PEG)₄-триазол-(PEG)₃-сульфонамид, малеимид-(PEG)₂-CH₂CH₂C(O)-Val-lys, малеимид-(PEG)₄-триазол-(PEG)₃-сульфонамид или Mal-(PEG)₄-триазол-(PEG)₃-дисульфид.

В еще одном аспекте Str в конъюгате антитело-лекарственное средство, предложенном согласно некоторым воплощениям, выбран из химической группировки, представленной нижеуказанной формулой:

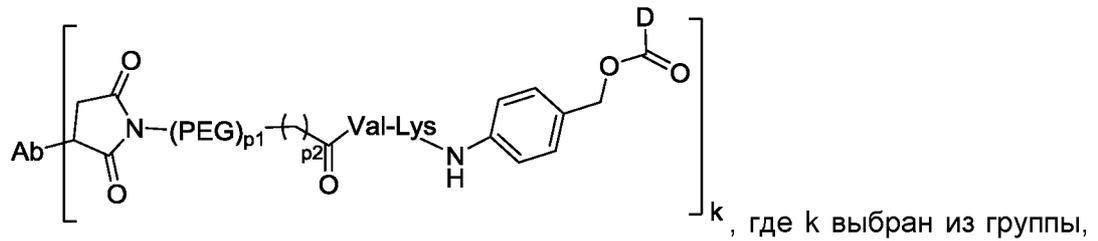
 где R^8 выбран из группы, состоящей из C_{1-10} алкилена, C_{2-10} алкенила, $(C_{1-10}$ алкилена)O-, $N(R^d)-(C_{2-6}$ алкилена)- $N(R^d)$ и $N(R^d)-(C_{2-6}$ алкилена); каждый R^d независимо представляет собой H или C_{1-6} алкил.

В некоторых воплощениях конъюгат антитело-лекарственное средство представлен указанными ниже формулами:

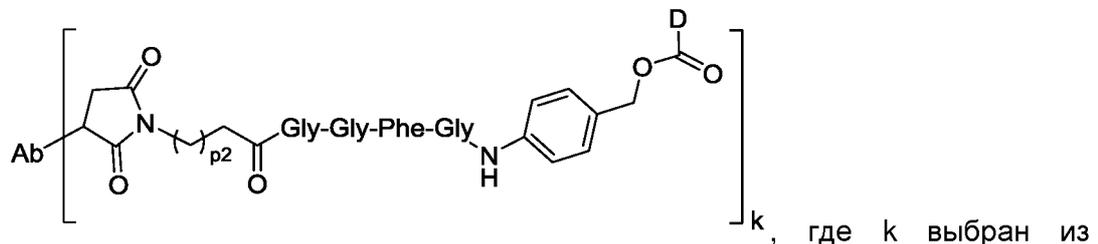
 где k выбран из группы, состоящей из 1 – 10, и может представлять собой целое число или десятичное число; p1 выбран из группы, состоящей из 2, 4, 6 и 8; p2 выбран из группы, состоящей из 0, 1 и 2;

 где k выбран из группы, состоящей из 1 – 10, и может представлять собой целое число или десятичное число;

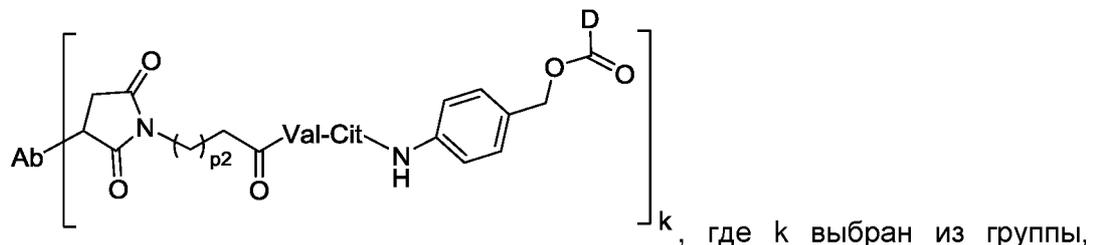
десятичное число; p_1 выбран из группы, состоящей из 2, 4, 6 и 8; p_2 выбран из группы, состоящей из 0, 1 и 2;



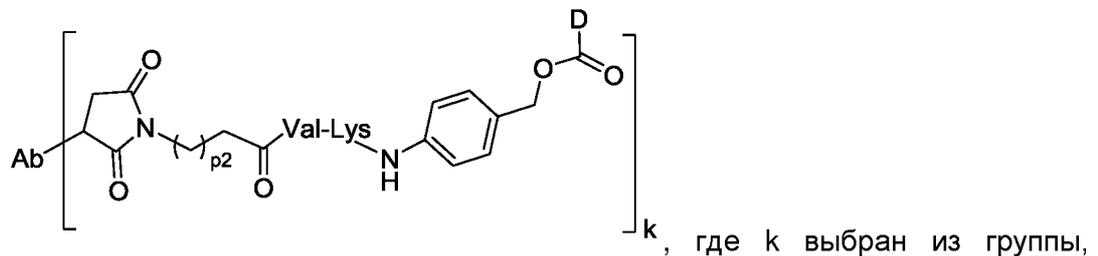
состоящей из 1 – 10, и может представлять собой целое число или десятичное число; p_1 выбран из группы, состоящей из 2, 4, 6 и 8; p_2 выбран из группы, состоящей из 0, 1 и 2;



группы, состоящей из 1 – 10, и может представлять собой целое число или десятичное число; p_2 выбран из группы, состоящей из целых чисел от 1 до 6;

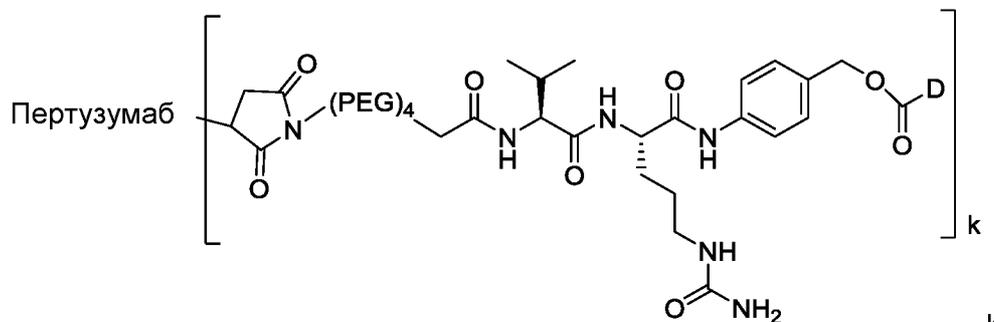
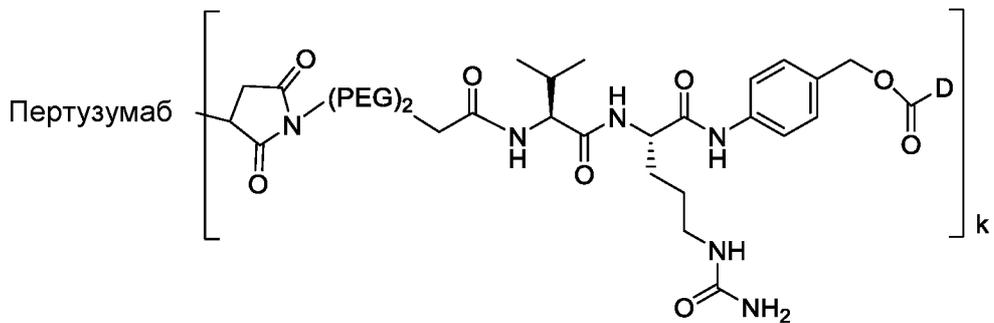
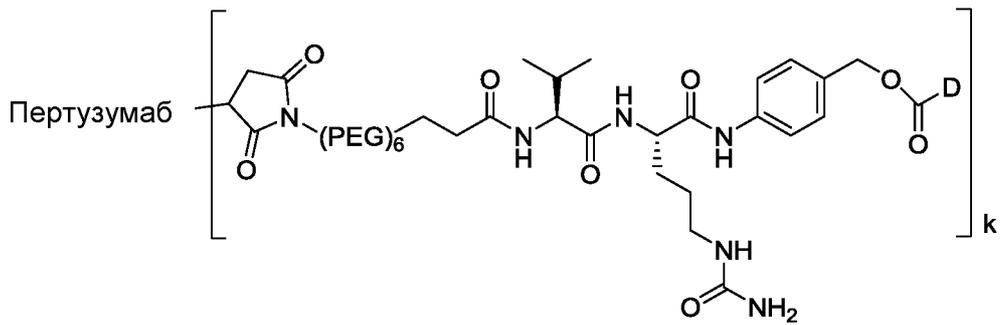
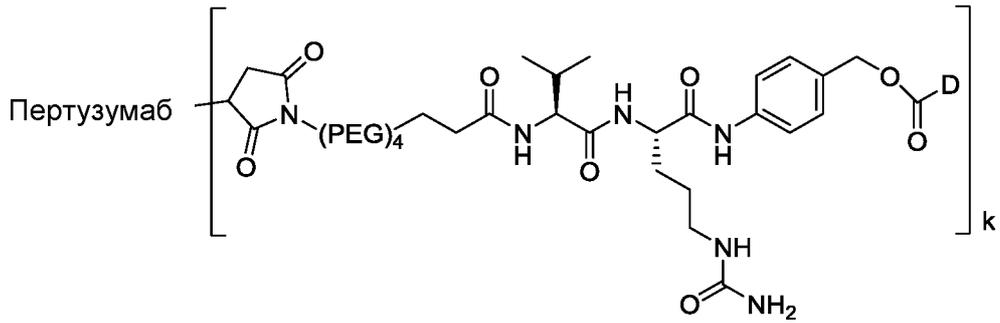
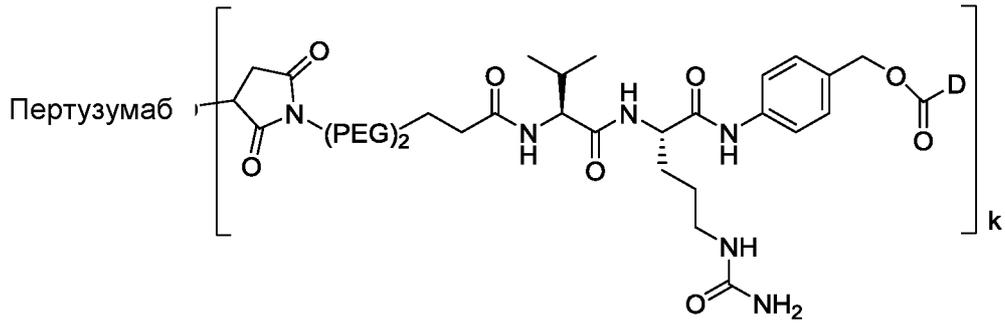


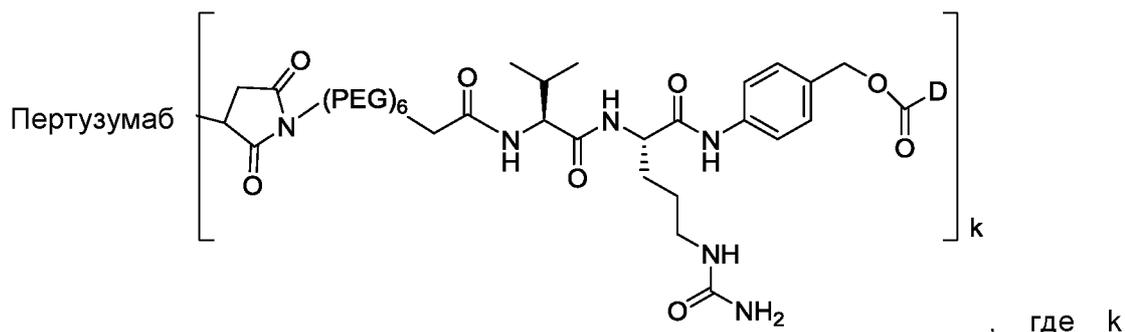
состоящей из 1 – 10, и может представлять собой целое число или десятичное число; p_2 выбран из группы, состоящей из целых чисел от 1 до 6;



состоящей из 1 – 10, и может представлять собой целое число или десятичное число; p_2 выбран из группы, состоящей из целых чисел от 1 до 6.

Кроме того, конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) по настоящему раскрытию выбран из группы, состоящей из нижеследующего:





выбран из группы, состоящей из 1 – 10, и может представлять собой целое число или десятичное число.

5 Последовательности вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи антитела против HER2 или его антигенсвязывающего фрагмента, с которым связывается домен II HER2, описанный выше, изложены ниже:

Вариабельная область легкой цепи

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY
 10 TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKVEIK
 SEQ ID NO: 1

Вариабельная область тяжелой цепи

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVN
 PNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWG
 15 QGTLVTVSS
 SEQ ID NO: 2.

Последовательность пертузумаба выглядит следующим образом:

Легкая цепь

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPGKAPKLLIYSASYRY
 20 TGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYIYPYTFGQGTKVEIKRTVAAPSV
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
 LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 3

Тяжелая цепь

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVN
 PNSGGSIYNQRFKGRFTLSVDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWG
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKEVQLVESGGGLVQ
 PGGSLRLSCAASGFTFTDYTMDWVRQAPGKGLEWVADVNPNSGGSIYNQRFKGRFTLS
 30 VDRSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSFYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL

APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
 VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
 KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
 5 TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
 SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 4.

Последовательность трастузумаба выглядит следующим образом:

Легкая цепь

10 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLY
 SGVPSRFRSGSRSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSV
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
 LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 5

15 Тяжелая цепь

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPT
 NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWG
 QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 20 PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 6

25 В некоторых воплощениях k в конъюгате антитела по настоящему раскрытию
 выбран из 2,0 - 2,5, включая 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5 или значение между любыми
 двумя значениями. В некоторых других воплощениях k в конъюгате антитела по
 настоящему раскрытию выбран из 2,5 – 3,5, включая 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1,
 3,2, 3,3, 3,4, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0 или значение между любыми двумя значениями.

30 В некоторых других воплощениях k в конъюгате антитела по настоящему
 раскрытию выбран из 3,5 – 5,0, включая 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4,
 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, или значение между любыми двумя значениями.

В еще одном аспекте согласно раскрытию также предложена изотопно
 замещенная форма конъюгата антитела, описанного выше. В некоторых
 35 воплощениях изотопно замещенную форму получают посредством замещения
 атомом дейтерия.

В еще одном аспекте согласно настоящему раскрытию также предложена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество конъюгата антитело-лекарственное средство или его изотопно замещенной формы, описанной выше, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

В некоторых воплощениях однократная доза фармацевтической композиции составляет от 0,001 мг до 1000 мг.

В определенных воплощениях фармацевтическая композиция содержит от 0,01% до 99,99% конъюгата антитело-лекарственное средство или его изотопно замещенной формы, описанной выше, в расчете на общую массу композиции. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция содержит от 0,1% до 99,9% конъюгата антитело-лекарственное средство или его изотопно замещенной формы, описанной выше. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция содержит от 0,5% до 99,5% конъюгата антитело-лекарственное средство или его изотопно замещенной формы, описанной выше. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция содержит от 1% до 99% конъюгата антитело-лекарственное средство или его изотопно замещенной формы, описанной выше. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция содержит от 2% до 98% конъюгата антитело-лекарственное средство или его изотопно замещенной формы, описанной выше.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция содержит от 0,01% до 99,99% фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества в расчете на общую массу композиции. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция содержит от 0,1% до 99,9% фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция содержит от 0,5% до 99,5% фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция содержит от 1% до 99% фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества. В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция содержит от 2% до 98% фармацевтически приемлемого вспомогательного вещества.

Согласно настоящему раскрытию также предложено применение конъюгата антитело-лекарственное средство или фармацевтической композиции, описанной выше, в получении лекарственного средства для лечения или предупреждения опухоли. В некоторых воплощениях опухоль представляет собой рак, ассоциированный с экспрессией домена II HER2.

Согласно настоящему раскрытию также предложено применение конъюгата антитело-лекарственное средство или фармацевтической композиции, описанной выше, в получении лекарственного средства для лечения и/или предупреждения рака. В некоторых воплощениях рак выбран из группы, состоящей из рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака матки, рака предстательной железы, рака почки, рака мочевыводящих путей, рака мочевого пузыря, рака печени, рака желудка, рака эндометрия, карциномы слюнной железы, рака пищевода, меланомы, нейроглиомы, нейробластомы, саркомы, рака легкого, рака толстой кишки, рака прямой кишки, рака толстой и прямой кишки, лейкоза, рака кости, рака кожи, рака щитовидной железы, рака поджелудочной железы и лимфомы.

Согласно настоящему раскрытию также предложен способ лечения или предупреждения рака, ассоциированного с экспрессией домена II HER2 у пациента, который включает введение пациенту терапевтически эффективного количества конъюгата антитело-лекарственное средство или его изотопно замещенной формы, описанной выше, или фармацевтической композиции, описанной выше.

Согласно настоящему раскрытию также предложен конъюгат антитело-лекарственное средство или его изотопно замещенная форма, описанная выше, или фармацевтическая композиция, описанная выше, для применения в лечении или предупреждении рака, ассоциированного с экспрессией домена II HER2.

Активное соединение может быть приготовлено в форме, подходящей для введения любым подходящим путем, предпочтительно в форме стандартной дозы или в форме однократной дозы, которую пациент может самостоятельно вводить. Стандартная доза соединения или композиции по настоящему изобретению может быть выражена в форме таблетки, капсулы, саше, флакона, порошка, гранулы, леденца, суппозитория, восстанавливаемого порошка или жидкого препарата.

Подробное описание изобретения

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, обычно подразумеваемое обычными специалистами в области, к которой принадлежит настоящее раскрытие. Несмотря на то, что любые материалы и методы, похожие или эквивалентные материалам и методам настоящего раскрытия, можно также использовать для осуществления или тестирования настоящего раскрытия, предпочтительные материалы и методы описаны в данном документе. В описании и формуле изобретения настоящего раскрытия следующие термины используют в соответствии с определениями, приведенными ниже.

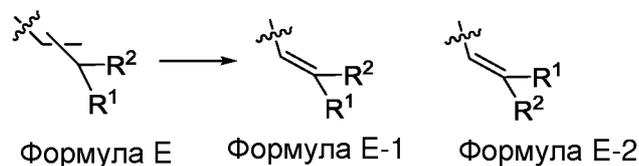
Когда в настоящем раскрытии используют торговое название, заявитель намерен включить изготовление коммерческого продукта под данным торговым названием и непатентное лекарственное средство и активный компонент лекарственного средства коммерческого продукта под данным торговым названием.

5 Если не указано иное, термины, используемые в описании изобретения и формуле изобретения, имеют следующие значения.

Соединения по настоящему раскрытию могут существовать в конкретных геометрических или стереоизомерных формах. В настоящем раскрытии рассматриваются все такие соединения, включая *цис*- и *транс*-изомеры, (-)- и (+)- энантиомеры, (R)- и (S)-энантиомеры, диастереомеры, (D)-изомер, (L)-изомер и рацемические смеси и другие их смеси, такие как энантиомерно или диастереомерно обогащенные смеси, все из которых находятся в пределах объема настоящего раскрытия. Дополнительные асимметрические атомы углерода могут находиться в заместителях, таких как алкильная группа. Все такие изомеры и их смеси включены в объем настоящего раскрытия. Соединения по настоящему раскрытию, содержащие асимметрические атомы углерода, могут быть выделены в оптически активной чистой форме или в рацемической форме. Оптически активная чистая форма может быть выделена из рацемической смеси или синтезирована, используя хиральное исходное сырье или хиральные реагенты.

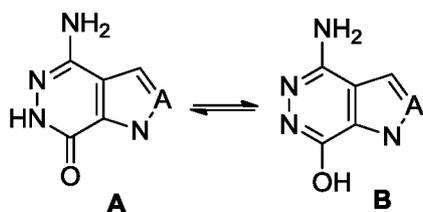
15 Оптически активные (R)- и (S)-энантиомеры и D- и L-изомеры могут быть получены посредством хирального синтеза, хиральных реагентов или других общепринятых методик. Если желают получить один энантиомер определенного соединения по настоящему раскрытию, он может быть получен посредством асимметрического синтеза или дериватизации с хиральным вспомогательным реагентом, когда полученную смесь диастереомеров разделяют, и вспомогательная группа расщепляется с получением чистого желательного энантиомера. В качестве альтернативы, когда молекула содержит основную функциональную группу (например, амина) или кислотную функциональную группу (например, карбоксил), соли диастереомеров образуются с соответствующей оптически активной кислотой или основанием с последующим разделением диастереомеров традиционными способами, известными в данной области, и чистые энантиомеры получают посредством восстановления. Кроме того, разделение энантиомеров и диастереомеров обычно осуществляют посредством хроматографии с использованием хиральной неподвижной фазы, возможно в комбинации с химической дериватизацией (например, образование карбамата из аминов).

В химической структуре соединения по настоящему раскрытию связь «/» представляет неуточненную конфигурацию; то есть, если хиральные изомеры существуют в химической структуре, связь «/», может представлять собой «.....» или «/» или содержит обе конфигурации «.....» и «/». Связь «~» представляет неуточненную конфигурацию, включающую *цис* (E) или *транс* (Z) конфигурацию. Или «\», описанная в данном документе, относится к двойной связи, и структура, имеющая характерной особенностью связывание посредством данной связи, может представлять собой «*цис*-изомер», «*транс*-изомер» или «смесь *цис*- и *транс*-изомеров в любом соотношении». Например, формула E представляет формулу E-1, формулу E-2 или смесь обеих формул в любом соотношении:



В химической структуре соединения, описанного в данном документе, связь «//» не уточняется конфигурацией; то есть, она может находиться в Z конфигурации или E конфигурации или содержит обе конфигурации.

Соединения и промежуточные соединения по настоящему раскрытию могут также существовать в разных таутомерных формах, и все такие формы включены в объем настоящего раскрытия. Термин «таутомер» или «таутомерная форма» относится к структурным изомерам разных энергий, которые могут взаимопревращаться через низкий энергетический барьер. Например, протонные таутомеры (также известные как таутомеры с переносом протона) включают взаимопревращение через миграцию протонов, как например, кето-енольную и имин-енаминную, лактам-лактимную изомеризацию. Пример лактам-лактимного равновесия присутствует между A и B, как показано ниже:



Все соединения в настоящем раскрытии можно нарисовать в виде формы A или формы B. Все таутомерные формы находится в пределах объема настоящего раскрытия. Номенклатура данных соединений не исключает каких-либо таутомеров.

Настоящее раскрытие дополнительно включает изотопно-меченные соединения, которые идентичны соединениям, перечисленным в данном документе, но имеют один или более атомов, замещенных атомом, имеющим атомную массу или массовое число, отличное от атомной массы или массового числа, обычно обнаруживаемых в природе. Примеры изотопов, которые могут быть включены в данное соединение по настоящему раскрытию, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, серы, фтора, йода и хлора, такие как ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F , ^{123}I , ^{125}I и ^{36}Cl .

Если не указано иное, когда положению конкретно приписан дейтерий (D), положение следует считать дейтерием с распространенностью, которая по меньшей мере в 1000 раз больше, чем распространенность дейтерия в природе (которая составляет 0,015%) (а именно, по меньшей мере 10% включение дейтерия). Соединения примеров содержат дейтерий, имеющий распространенность, которая превышает распространенность в природе по меньшей мере в 1000 раз, превышает распространенность в природе по меньшей мере в 2000 раз, превышает распространенность в природе по меньшей мере в 3000 раз, превышает распространенность в природе по меньшей мере в 4000 раз, превышает распространенность в природе по меньшей мере в 5000 раз, превышает распространенность в природе по меньшей мере в 6000 раз или превышает распространенность в природе в большее количество раз. Кроме того, в настоящем раскрытии включены разные дейтерированные формы соединения формулы (I).

Каждый доступный атом водорода, соединенный с атомом углерода, может быть независимо замещен атомом дейтерия. Специалисты в данной области могут синтезировать дейтерированные формы соединения формулы (I) в соответствии с релевантной литературой. Имеющееся в продаже дейтерированное исходное сырье можно использовать в получении дейтерированных форм соединения формулы (I), или их можно синтезировать, используя общепринятые методики с дейтерированными реагентами, включая, но, не ограничиваясь дейтерированным бораном, трижды дейтерированным бораном в тетрагидрофуране, дейтерированным алюмогидридом лития, дейтерированным йодэтаном, дейтерированным йодметаном и т.д.

Термин «возможно» или «возможный» означает, что событие или ситуация, описанная впоследствии, может происходить, но не обязательно происходит, и что описание включает примеры, в которых событие или ситуация происходит или не происходит. Например, фраза « C_{1-6} алкил, который возможно замещен галогеном или циано», означает, что галоген или циано могут существовать, но не обязательно

существуют, и описание включает пример, где алкил замещен галогеном или циано, и пример, где алкил не замещен галогеном или циано.

Термин «фармацевтическая композиция» относится к смеси, содержащей одно или более соединений или их физиологически/фармацевтически приемлемых солей или их пролекарств, описанных в данном документе, и другие химические компоненты, например, физиологически/фармацевтически приемлемые носители и вспомогательные вещества. Фармацевтическая композиция предназначена для содействия введению в организм, таким образом, чтобы облегчать поглощение активного вещества, вызывая, таким образом, биологическую активность.

«Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество» включает, но не ограничивается нижеследующим: любой адъювант, носитель, вспомогательное вещество, скользящее вещество, подсластитель, разбавитель, консервант, краситель/окрашивающее вещество, корригент, поверхностно-активное вещество, увлажнитель, диспергирующее средство, суспендирующий агент, стабилизатор, изотонический агент, растворитель или эмульгатор, которые были одобрены Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США в качестве приемлемых для применения для человека или животных, относящихся к домашнему скоту.

«Эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество», описанное в данном документе, включает количество, достаточное для облегчения или предупреждения симптома или расстройства медицинского заболевания. Эффективное количество также относится к количеству, достаточному для того, чтобы обеспечить или облегчить диагностирование. Эффективное количество для конкретного пациента или субъекта ветеринарии может варьировать, в зависимости от факторов, таких как расстройство, подлежащее лечению, общее состояние здоровья пациента, способ и путь и дозировка введения и тяжесть побочных эффектов. Эффективное количество может представлять собой максимальную дозу или схему введения, позволяющую избежать значительных побочных эффектов или токсичных воздействий.

Термин «лекарственное средство» относится к цитотоксическому лекарственному средству или иммуномодулятору. Цитотоксическое лекарственное средство может иметь химическую молекулу в пределах опухолевой клетки, которая является достаточно сильной для нарушения ее нормального роста. Цитотоксическое лекарственное средство может уничтожать опухолевые клетки как таковые при достаточно высокой концентрации; однако, вследствие недостатка специфичности, цитотоксическое лекарственное средство может вызывать апоптоз

нормальных клеток во время уничтожения опухолевых клеток, приводя к серьезным побочным эффектам. Цитотоксическое лекарственное средство включает токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибного, растительного или животного происхождения, радиоизотопы (например, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} и радиоактивные изотопы Lu), токсичные лекарственные средства, химиотерапевтические лекарственные средства, антибиотики и нуклеолитические ферменты. Иммуномодулятор представляет собой ингибитор молекул иммунных контрольных точек.

10 Термин «линкер», «линкерное звено» или «линкерный фрагмент» относится к химическому структурному фрагменту или связи, которые связаны с лигандом с одного конца и связаны с лекарственным средством с другого конца, и также могут быть связаны с другими линкерами и затем связаны с лекарственным средством.

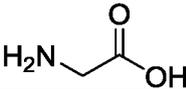
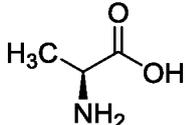
Линкер может содержать один или более компонентов линкера. Типичные
15 компоненты линкера включают 6-малеимидапроил (MC – от англ. maleimidocaproyl), малеимидопропионил (MP – от англ. maleimidopropionyl), валин-цитруллин (Val-Cit или vc), аланин-фенилаланин (ala-phe), *пара*-аминобензиллоксикарбонил (PAB – от англ. *p*-aminobenzyloxycarbonyl) и компоненты, происходящие в результате связывания с линкерным реагентом: *N*-сукцинимидил 4-(2-пиридилтио)пентаноат (SPP – от англ. *N*-succinimidyl 4-(2-pyridylthio)pentanoate),
20 *N*-сукцинимидил 4-(*N*-малеимидометил)циклогексан-1 карбоксилат (SMCC (от англ. *N*-succinimidyl 4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexane-1 carboxylate), также называемый в данном документе MCC) и *N*-сукцинимидил(4-йод-ацетил)аминобензоат (SIAB – от англ. *N*-succinimidyl(4-iodo-acetyl)aminobenzoate). Линкер может включать вставочное
25 звено, спейсерное звено, аминокислотное звено и звено расширения. Линкер может быть синтезирован, используя способы, известные в данной области, такие как способы, описанные в US2005-0238649A1. Линкер может представлять собой «расщепляемый линкер», способствующий высвобождению лекарственных средств в клетках. Например, можно использовать кислотонеустойчивые линкеры
30 (например, гидразоны), линкеры, чувствительные к протеазе (например, чувствительные к пептидазе), светочувствительные линкеры, диметилловые линкеры или дисульфид-содержащие линкеры (Chari et al., *Cancer Research* 52: 127-131(1992); Патент США No. 5208020).

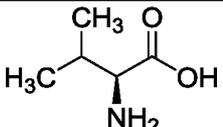
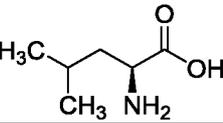
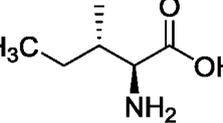
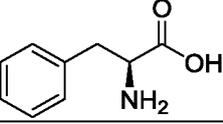
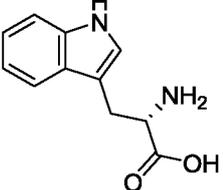
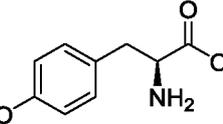
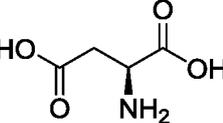
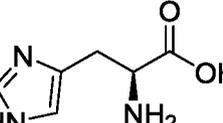
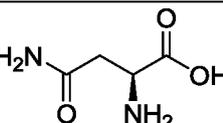
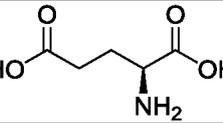
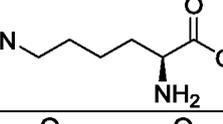
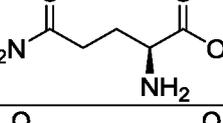
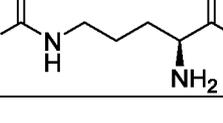
Термин «вставочное звено» относится к химическому структурному
35 фрагменту, который ковалентно связывается с антителом с помощью атомов углерода на одном конце и связывается с аминокислотным звеном, дисульфидной

группировкой, сульфонамидной группировкой или непептидной химической группировкой на другом конце.

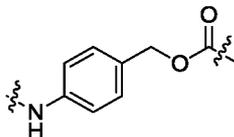
5 Термин «спейсерное звено» представляет собой бифункциональный структурный фрагмент соединения, который можно использовать для связывания аминокислотного звена с цитотоксическим лекарственным средством с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство, таким образом, что цитотоксическое лекарственное средство селективно связано с аминокислотным звеном.

10 Термин «аминокислота» относится к органическому соединению, которое содержит аминогруппу и карбоксильную группу в молекулярной структуре и в котором как аминогруппа, так и карбоксильная группа непосредственно связаны со структурой -CH-. Общая формула представляет собой $H_2NCHRCOOH$, где R представляет собой H, замещенный или незамещенный алкил и т.п. Аминокислоты подразделяются на α , β , γ , δ , ϵ ...-аминокислоты, в соответствии с положением атома углерода, с которым связана аминогруппа в карбоновой кислоте. В биологической области, аминокислоты, которые составляют нативные белки, имеют свои конкретные структурные характеристики; а именно, их аминогруппы присоединены прямо к α -атомам углерода, а именно, α -аминокислоты, включая Gly (Глицин), Ala (Аланин), Val (Валин), Leu (Лейцин), Ile (Изолейцин), Phe (Фенилаланин), Trp (Триптофан), Tyr (Тирозин), Asp (Аспарагиновая кислота), His (Гистидин), Asn (Аспарагин), Glu (Глутаминовая кислота), Lys (Лизин), Gln (Глутамин), Met (Метионин), Arg (Аргинин), Ser (Серин), Thr (Треонин), Cys (Цистеин), Pro (Пролин) и т.д. Неприродные аминокислоты представляют собой, например, цитруллин. Как хорошо известно специалистам в данной области, неприродные аминокислоты не составляют природные белки и, таким образом, не включены в синтез антител в настоящем раскрытии. Трехбуквенный и однобуквенный коды для аминокислот, используемые в настоящем раскрытии, представляют собой такие, как описано в *J. Biol. Chem*, 243, p3558 (1968).

Кратко	Сокращение	Название	Структура
G	Gly	Глицин	
A	Ala	Аланин	

V	Val	Валин	
L	Leu	Лейцин	
I	Ile	Изолейцин	
F	Phe	Фенилаланин	
W	Trp	Триптофан	
Y	Tyr	Тирозин	
D	Asp	Аспарагиновая кислота	
H	His	Гистидин	
N	Asn	Аспарагин	
E	Glu	Глутаминовая кислота	
K	Lys	Лизин	
Q	Gln	Глутамин	
C	Cit	Цитруллин	

Спейсерное звено в настоящем раскрытии представляет собой PAB, который имеет структуру, представленную пара-аминобензилоксикарбонильным фрагментом, имеет структуру, представленную формулой (VI), и связан с D,

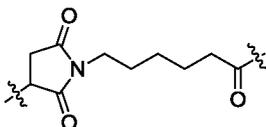


(VI).

5

Компоненты линкера включают, но, не ограничиваются нижеследующим:

MC = 6-малеимидаокапроил, чья структура показана ниже:



10

Val-Cit или «vc» = валин-цитруллин (иллюстративный дипептид в линкере, расщепляемом протеазой)

цитруллин = 2-амино-5- уреидопентановая кислота

Me-Val-Cit = *N*-метил-валин-цитруллин (где линкерная пептидная связь модифицирована для предотвращения ее расщепления катепсином B)

15

MC(PEG)₆-OH = малеимидаокапроил-полиэтиленгликоль (присоединенный к цистеину антитела)

SPP = *N*-сукцинимидил 4-(2-пиридилтио)валерат

SPDP = *N*-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат

SMCC = сукцинимидил-4-(*N*-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат

IT = имиотиолан

20

PBS = фосфатно-солевой буферный раствор.

25

Термин «конъюгат антитело-лекарственное средство», который означает, что лиганд связан с биологически активным лекарственным средством стабильным линкерным звеном. В настоящем раскрытии «конъюгат антитело-лекарственное средство» (ADC) означает, что моноклональное антитело или фрагмент антитела связан с биологически активным токсичным лекарственным средством посредством стабильного линкерного звена.

30

Термин «загрузка лекарственным средством» может быть выражен как отношение количества лекарственного средства к количеству антитела, то есть среднее число конъюгированных лекарственных средств на антитело в ADC. Загрузка лекарственным средством может находиться в интервале от 1 до 20, предпочтительно от 1 до 10 присоединенных цитотоксических лекарственных средств (D) на антитело (Ab). В воплощениях настоящего раскрытия загрузка

лекарственным средством представлена как k и может для иллюстрации составлять 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или среднее любых двух значений; предпочтительно среднее 1 - 10, и более предпочтительно среднее 1 - 8 или 2 - 8 или 2 - 7 или 3 - 8 или 3 - 7 или 3 - 6 или 4 - 7 или 4 - 6 или 4 - 5.

5 Среднее число лекарственных средств на молекулу ADC после реакций связывания может характеризоваться общепринятыми способами, такими как УФ-спектроскопия/спектроскопия в видимой области, масс-спектрометрия, анализы ELISA (от англ. enzyme-linked immunosorbent assay - твердофазный иммуноферментный анализ), анализ вариантов размера молекул моноклональных
10 антител (CE-SDS (от англ. Capillary Electrophoresis-Sodium Dodecyl Sulfate - капиллярный электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия)) и ВЭЖХ (Высокоэффективная жидкостная хроматография).

Анализ вариантов размера молекул моноклонального антитела (CE-SDS) по настоящему раскрытию можно использовать для количественного определения
15 чистоты рекомбинантного продукта моноклонального антитела посредством внедрения анализа в ультрафиолетовой области на основе капиллярного электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (CE-SDS) в расчете на молекулярную массу в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях и в соответствии с методом капиллярного электрофореза (Chinese Pharmacopoeia 0542,
20 2015 Edition).

Загрузку конъюгата антитело-лекарственное средство можно контролировать следующими неограничивающими способами, включая:

- (1) осуществление контроля над молярным отношением связывающего реагента к моноклональному антителу,
- 25 (2) осуществление контроля над временем взаимодействия и температурой,
и
- (3) отбор разных реакционных реагентов.

Термин «антитело» относится к иммуноглобулину, который имеет структуру из четырех пептидных цепей, образованную посредством соединения двух
30 идентичных тяжелых цепей и двух идентичных легких цепей межцепочечными дисульфидными связями. Константные области тяжелой цепи иммуноглобулина различаются по своему составу и расположению аминокислот, и, таким образом, по своей антигенности. Соответственно, иммуноглобулины могут быть разделены на пять классов, иначе называемых изотипами иммуноглобулинов, а именно IgM, IgD,
35 IgG, IgA и IgE, причем их соответствующие тяжелые цепи представляют собой цепь μ , цепь δ , цепь γ , цепь α и цепь ϵ , соответственно. Ig одного и того же класса может

быть подразделен на разные подклассы в соответствии с различиями в аминокислотном составе шарнирных областей и числом и положениями дисульфидных связей тяжелых цепей; например, IgG может быть подразделен на IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи подразделены на цепи κ или λ в соответствии с различиями в константных областях. Каждый из пяти классов IgG может иметь цепь κ или цепь λ . В тяжелых и легких цепях антитела последовательности, примерно из 110 аминокислот, рядом с N-концом значимо варьируют и, таким образом, называются переменными областями (области Fv); остальные аминокислотные последовательности рядом с C-концом являются относительно стабильными, и, таким образом, называются константными областями. Переменные области содержат 3 гиперпеременные области (HVR - от англ. hypervariable region) и 4 каркасные области (FR - от англ. framework region) с относительно консервативными последовательностями. Данные 3 гиперпеременные области определяют специфичность антитела, и, таким образом, также известны как области, определяющие комплементарность (CDR – от англ. complementarity determining region). Каждая переменная область легкой цепи (LCVR) или переменная область тяжелой цепи (HCVR) состоит из 3 CDR и 4 FR, расположенных от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Данные 3 CDR легкой цепи относятся к LCDR1, LCDR2 и LCDR3; и данные 3 CDR тяжелой цепи относятся к HCDR1, HCDR2 и HCDR3.

Антитело по настоящему раскрытию включает мышинное антитело, химерное антитело, гуманизированное антитело и полностью человеческое антитело, предпочтительно гуманизированное антитело и полностью человеческое антитело.

В контексте данного документа термин «мышинное антитело» относится к антителу, полученному из мышей в соответствии со знанием и умениями в данной области. Во время получения анализируемому субъекту инъецируют конкретный антиген и затем выделяют гибридому, экспрессирующую антитела с желаемыми последовательностями или функциональными свойствами.

Термин «химерное антитело» относится к антителу, полученному в результате слияния переменной области мышинного антитела с константной областью человеческого антитела, которое может смягчать иммунный ответ, вызываемый мышинным антителом. Для создания химерного антитела сначала создают гибридому, секретирующую специфичное мышинное моноклональное антитело, затем клонируют ген переменной области из клеток мышинной гибридомы, клонируют ген константной области человеческого антитела при необходимости, ген переменной области мыши соединяют с геном константной

области человека с образованием химерного гена, данный химерный ген вставляют в экспрессионный вектор, и, наконец, молекулы химерного антитела экспрессируют в эукариотической системе или прокариотической системе.

5 Термин «гуманизированное антитело», также известное как антитело с прививкой CDR, относится к антителу, полученному посредством прививания мышиных последовательностей CDR в каркас переменных областей человеческого антитела, а именно, отличному типу последовательности каркаса антитела зародышевой линии человека. Такое антитело может преодолевать гетерогенную реакцию, вызываемую химерным антителом, из-за того, что он несет
10 большое количество мышиных белковых компонентов. Такие последовательности каркасов могут быть получены из общедоступных баз данных по ДНК или опубликованных ссылок, которые включают последовательности генов антитела зародышевой линии. Например, ДНК-последовательности зародышевой линии генов переменных областей тяжелой и легкой цепей человека могут быть
15 найдены в базе данных последовательностей зародышевой линии человека «VBase» (доступной по адресу в интернете www.mrccsre.com.ac.uk/vbase), а также в Kabat, EA, et al. 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edition. Для того, чтобы избежать снижения активности, вызываемого снижением иммуногенности, последовательность FR в переменной области человеческого
20 антитела может подвергаться минимальной обратной мутации или обратной мутации с сохранением активности. Гуманизированное антитело по настоящему раскрытию также включает гуманизированное антитело, образованное после дальнейшего созревания аффинности на CDR посредством фагового дисплея. Литература, дополнительно описывающая способы, используемые в гуманизации
25 доступных мышиных антител, включает, например, Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 2869, 1991, и литература, описывающая гуманизацию с использованием способа, предложенного Winter со своими соавторами, включает Jones et al., *Nature*, 321, 522 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332, 323-327 (1988), Verhoeyen et al., *Science*, 239, 1534 (1988).

30 Термин «антитело полностью человеческого происхождения», «полностью человеческое антитело» или «антитело в полной мере человеческого происхождения», также известное как «моноклональное антитело полностью человеческого происхождения», может иметь как гуманизированные переменные области, так и константные области, таким образом, исключая иммуногенность и
35 токсичные и побочные эффекты. Разработка моноклональных антител имеет четыре стадии, а именно, мышиные моноклональные антитела, химерные

мноклональные антитела, гуманизированные моноклональные антитела и моноклональные антитела полностью человеческого происхождения. Антитело по настоящему раскрытию представляет собой моноклональное антитело полностью человеческого происхождения. Главные релевантные технологии получения полностью человеческого антитела включают технологию на основе гибридомы человека, технологию на основе EBV-трансформированных В-лимфоцитов, технологию фагового дисплея, технологию получения антител трансгенных мышей, технологию получения антитела из одиночных В-клеток и т.п.

Термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфично связываться с антигеном. Показано, что фрагмент полноразмерного антитела может использоваться для выполнения антителом функции связывания с антигеном. Примеры связывающего фрагмента, включенного в термин «антигенсвязывающий фрагмент», включают: (i) фрагменты Fab, моновалентные фрагменты, состоящие из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагменты F(ab')₂, бивалентные фрагменты, содержащие два фрагмента Fab, соединенных дисульфидными мостиками в шарнирных областях, (iii) фрагменты Fd, состоящие из доменов VH и CH1; (iv) фрагменты Fv, состоящие из доменов VH и VL одного плеча антитела; (v) одиночные домены или фрагменты dAb (Ward et al., (1989) *Nature* 341: 544-546), состоящие из доменов VH; и (vi) выделенные области, определяющие комплементарность (CDR), или (vii) комбинации двух или более выделенных CDR, которые могут, возможно, быть связаны синтетическими линкерами. Кроме того, несмотря на то, что данные два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются отдельными генами, они могут быть связаны синтетическим линкером посредством использования метода генной инженерии с образованием, таким образом, одной белковой цепи, в которой области VL и VH объединяются с образованием одновалентной молекулы (называемой одноцепочечным Fv (scFv); см., например, Bird et al. (1988) *Science* 242: 423-426; и Huston et al (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85:5879-5883). Подразумевается, что такие одноцепочечные антитела также включены в термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела. Такие фрагменты антител получают, используя общепринятые методики, известные специалистам в данной области, и подвергаются скринингу в отношении полезности таким же образом, как и в случае интактных антител. Антигенсвязывающие группировки могут быть получены посредством технологии генной инженерии или посредством ферментативного катализа или химического расщепления интактных иммуноглобулинов. Антитело может принадлежать к разным изотипам, например,

антителу IgG (например, подтип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE или IgM.

Fab представляет собой фрагмент антитела, имеющий молекулярную массу примерно 50000 и обладающий антигенсвязывающей активностью, среди 5 фрагментов, полученных посредством обработки молекулы антитела IgG протеазой - папаином (расщепляющей аминокислотный остаток в положении 224 цепи H), в котором примерно половина N-концевой стороны цепи H и вся цепь L связаны вместе дисульфидными связями.

«F(ab')₂» представляет собой фрагмент антитела, имеющий молекулярную 10 массу примерно 100000 и обладающий антигенсвязывающей активностью, и содержащий две области Fab, связанные в шарнирной области, который получен в результате расщепления ферментом пепсином части, расположенной ниже двух дисульфидных связей в шарнирной области IgG.

Fab' представляет собой фрагмент антитела, имеющий молекулярную массу 15 примерно 50000 и обладающий антигенсвязывающей активностью, который получается в результате расщепления дисульфидной связи в шарнирной области описанного выше F(ab')₂.

Кроме того, Fab' может быть получен посредством вставки ДНК, кодирующей Fab' фрагмент антитела, в прокариотический экспрессионный вектор или 20 эукариотический экспрессионный вектор и введения данного вектора в прокариота или эукариота для экспрессии Fab'.

Термин «одноцепочечное антитело», «одноцепочечный Fv» или «scFv» относится к молекуле, содержащей вариабельный домен тяжелой цепи антитела (или область; VH) и вариабельный домен легкой цепи антитела (или область; VL), 25 связанные посредством линкера. Такие молекулы scFv могут иметь общую структуру: NH₂-VL-линкер-VH-COOH или NH₂-VH-линкер-VL-COOH. Подходящие линкеры в предшествующем уровне техники состоят из повторяющихся аминокислотных последовательностей GGGGS или их вариантов, например, вариантов с 1-4 повторами (Holliger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-30 6448). Другие линкеры, которые могут быть использованы в настоящем раскрытии, описаны в Alfthan et al. (1995), *Protein Eng.* 8:725-731; Choi et al. (2001), *Eur. J. Immunol.* 31:94-106; Hu et al. (1996), *Cancer Res.* 56:3055-3061; Kipriyanov et al. (1999), *J. Mol. Biol.* 293:41-56 и Roovers et al. (2001), *Cancer Immunol.*

Термин «CDR» относится к одной из 6 гипервариабельных областей в 35 вариабельном домене антитела, которые главным образом содействуют связыванию с антигеном. Одно из наиболее широко используемых определений

данных 6 CDR предложено Kabat E.A. et al, ((1991) *Sequences of proteins of immunological interest*. NIH Publication 91-3242. В контексте данного документа определение CDR по Kabat может только применяться к CDR1, CDR2 и CDR3

5 CDR2 и CDR3 варибельного домена легкой цепи (CDR L1, CDR L2, CDR L3 или L1, L2, L3) и к CDR2 и CDR3 варибельного домена тяжелой цепи (CDR H2, CDR H3 или H2, H3). Обычно, имеется три CDR (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) в каждой варибельной области тяжелой цепи и три CDR (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) в каждой варибельной области легкой цепи. Границы аминокислотной последовательности CDR могут

10 быть определены, используя любую из множества хорошо известных схем, включая схему нумерации «Kabat» (см. Kabat et al. (1991), «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 5th edition, Public Health Service, Национальный институт здоровья, Bethesda, MD), схему нумерации «Chothia» (см. Al-Lazikani et al. (1997), JMB 273: 927-948) и схему нумерации ImMunoGenTics (IMGT) (см. Lefranc M.P., Immunologist, 7, 132-136(1999); Lefranc, M.P. et al., *Dev. Comp. Immunol.*, 27, 55-

15 77(2003)) и т.п. Например, в случае классического формата, в соответствии со схемой Kabat, аминокислотные остатки CDR в варибельном домене тяжелой цепи (VH) пронумерованы 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); аминокислотные остатки CDR в варибельном домене легкой цепи (VL) пронумерованы 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3). В соответствии со

20 схемой Chothia, аминокислоты CDR в VH пронумерованы 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и аминокислотные остатки в VL пронумерованы 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 91-96 (LCDR3). В соответствии с комбинацией определений CDR, предоставленных в схеме Kabat и схеме Chothia, CDR состоит из аминокислотных остатков 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в

25 человеческом VH и аминокислотных остатков 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в человеческом VL. В соответствии со схемой IMGT, аминокислотные остатки CDR в VH приблизительно пронумерованы 26-35 (CDR1), 51-57 (CDR2) и 93-102 (CDR3), и аминокислотные остатки CDR в VL приблизительно пронумерованы 27-32 (CDR1), 50-52 (CDR2) и 89-97 (CDR3). В соответствии со схемой IMGT, CDR

30 антитела могут быть определены, используя программу IMGT/DomainGap Align.

Термин «каркас антитела» относится к части варибельного домена VL или VH, которая служит каркасом для антигенсвязывающих петель (CDR) данного варибельного домена. По существу, он представляет собой варибельный домен без CDR.

35 Термин «эпитоп» или «антигенная детерминанта» относится к сайту на антигене, с которым специфично связывается иммуноглобулин или антитело.

Эпитопы обычно содержат по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 последовательных или непоследовательных аминокислот в уникальной пространственной конформации (см., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, ed. G. E. Morris, Ed. (1996)).

5 Термин «специфичное связывание», «селективное связывание», «селективно связываются с» и «специфично связываются с» относится к связыванию антитела с эпитопом на заданном антигене. Обычно антитело связывается с аффинностью (KD) меньше чем примерно 10^{-7} М, например, меньше чем примерно 10^{-8} М, 10^{-9} М или 10^{-10} М или меньше.

10 Термин «молекула нуклеиновой кислоты» относится к молекуле ДНК и молекуле РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной, и предпочтительно является двухцепочечной ДНК. Нуклеиновая кислота является «функционально связанной», когда она находится в функциональной взаимосвязи с другой последовательностью нуклеиновой кислоты.
15 Например, промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию кодирующей последовательности.

Термин «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. В одном
20 воплощении вектор представляет собой «плазмиду», которая относится к петле кольцевой двухцепочечной ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. В еще одном воплощении вектор представляет собой вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Векторы, раскрытые в данном документе, способны к
25 саморепликации в клетке-хозяине, в которую их вводят (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальный репликатор, и эписомальные векторы млекопитающего), или могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина после введения в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина (например, векторы млекопитающего, не являющиеся эписомальными).

30 Способы получения и очистки антител и антигенсвязывающих фрагментов хорошо известны в данной области, например, способы, описанные в главах 5-8 и 15 «Antibodies: A Laboratory Manual», Cold Spring Harbor. Аналогично, антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены традиционными способами. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем
35 изобретении, генетически конструируют содержащими одну или более дополнительных FR человеческого происхождения в CDR, происходящих не от

человека. Последовательности FR зародышевой линии человека могут быть получены на веб-сайте <http://imgt.cines.fr> ImMunoGeneTics (IMGT) или из журнала об иммуноглобулинах 2001 ISBN 012441351, посредством сравнения последовательностей базы данных генов переменных областей антител зародышевой линии человека IMGT с помощью программного обеспечения MOE.

Термин «клетка-хозяин» относится к клетке, в которую был введен экспрессионный вектор. Клетки-хозяева могут включать клетки бактерий, микроорганизмов, растений или животных. Бактерии, подверженные трансформации, включают члены семейства *Enterobacteriaceae*, такие как штаммы *Escherichia coli* или *Salmonella*; члены семейства *Bacillaceae*, как например *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* и *Haemophilus influenzae*. Подходящие микроорганизмы включают *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*. Подходящие линии животных клеток-хозяев включают CHO (от англ. Chinese Hamster Ovary – яичник китайского хомячка) и клетки NS0.

Сконструированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему раскрытию может быть получен и очищен общепринятыми способами. Например, последовательности кДНК, кодирующие тяжелую и легкую цепи, можно клонировать и рекомбинировать в экспрессионный вектор GS. Векторами, экспрессирующими рекомбинантный иммуноглобулин, можно стабильно трансфицировать клетки CHO. В качестве более рекомендованного способа предшествующего уровня техники, экспрессионные системы млекопитающих будут приводить к гликозилированию антител, в частности, на высоко консервативном N-концевом участке области Fc. Позитивные клоны могут быть размножены в бессывороточной среде в биореакторе для получения антител. Культуральную среду с секретлируемым антителом можно очищать традиционными методиками. Например, очистку проводят, используя колонку с сефарозой FF с белком A или G, содержащую отрегулированный буфер. Неспецифично связанные фракции вымывают. Связанное антитело элюируют методом градиента pH, и фрагменты антитела выявляют посредством SDS-PAGE (от англ. sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis - электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) и собирают. Антитела можно фильтровать и концентрировать общепринятыми способами. Растворимые смеси и полимеры можно также удалять общепринятыми способами, такими как молекулярные сита или ионный обмен. Полученный продукт нужно сразу же заморозить, например, при -70°C, или лиофилизировать.

Термин «идентичность» аминокислотных последовательностей относится к проценту аминокислотных остатков, которые идентичны у первой последовательности и второй последовательности при выравнивании аминокислотных последовательностей и, при необходимости, вводят гэпы для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и любая консервативная замена не считается частью идентичности последовательностей. С целью определения процента идентичности аминокислотных последовательностей, выравнивания могут быть достигнуты множеством путей, которые попадают в объем специальных знаний данной области, например, используя имеющееся в открытом доступе программное обеспечение, такое как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определять параметры, подходящие для измерения выравнивания, включая любой алгоритм, требуемый для достижения максимального выравнивания по всей длине выравниваемых последовательностей.

Термин «пептид» относится к фрагменту соединений между аминокислотой и белком. Фрагмент соединения образуется посредством соединения 2 или более молекул аминокислот пептидными связями, и представляет собой структурный и функциональный фрагмент белка, такого как гормоны и ферменты, которые являются по существу пептидами.

Термин «сахар» относится к биомолекулам, состоящим из элементов С, Н и О. Они могут быть подразделены на моносахариды, дисахариды, полисахариды и т.п.

Термин «флуоресцентный зонд» относится к классу флуоресцентных молекул, которые имеют характерную флуоресценцию в ультрафиолетовой-видимой-ближней инфракрасной области и чьи флуоресцентные свойства (длины волн возбуждения и испускания, интенсивность, продолжительность жизни, поляризация и т.д.) могут чувствительным образом меняться, когда меняются свойства окружающей среды, в которой они находятся, такие как полярность, коэффициент преломления и вязкость. Данные флуоресцентные молекулы нековалентно взаимодействуют с нуклеиновыми кислотами (ДНК или РНК), белками или другими макромолекулярными структурами, изменяя одно или более флуоресцентных свойств, и, таким образом, могут быть использованы для исследования свойств и поведения макромолекулярных веществ.

Термин «алкил» относится к насыщенной алифатической углеводородной группе, которая является линейной или разветвленной группой, содержащей от 1 до 20 атомов углерода, предпочтительно алкил, содержащий от 1 до 12 атомов

углерода, более предпочтительно алкил, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, и наиболее предпочтительно, алкил, содержащий от 1 до 6 атомов углерода. Неограничивающие примеры включают метил, этил, *n*-пропил, изопропил, *n*-бутил, изобутил, *трет*-бутил, *n*-гексил, 1-этил-2-метилпропил и их разные разветвленные изомеры и т.п. Более предпочтительным является низший алкил, имеющий от 1 до 6 атомов углерода, и неограничивающие примеры включают метил, этил, этил, *n*-пропил, изопропил, *n*-бутил, изобутил, *трет*-бутил, *втор*-бутил, *n*-пентил, 1,1-диметилпропил, 1,2-диметилпропил, 2,2-диметилпропил, 1-этилпропил, 2-метилбутил и т.п. Алкил может быть замещенным или незамещенным, и когда он замещен, заместитель может быть замещен в любом доступном участке соединения, и данный заместитель предпочтительно представляет собой одну или более групп, независимо выбранных из группы, состоящей из алкила, алкокси, галогена, amino, циано, нитро, гидроксид, гидроксидалкила, циклоалкил, гетероциклила, арила и гетероарила.

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

Термин «одновалентная группа» относится к атому или группе, полученной «формально» посредством удаления одновалентного атома или группы из соединения. Термин «илен» относится к атому или атомной группе, образованной «формально» посредством удаления двух одновалентных атомов или одного двухвалентного атома из соединения. Типичный «алкил» относится к группировке молекулы алкана, остающейся после удаления 1 атома водорода, и включает линейную или разветвленную одновалентную группу из 1-20 атомов углерода. Неограничивающие примеры алкила, содержащего от 1 до 6 атомов углерода, включают метил, этил, *n*-пропил, изопропил, *n*-бутил, изобутил, *трет*-бутил, *втор*-бутил, *n*-пентил, 1,1-диметилпропил, 1,2-диметилпропил, 2,2-диметилпропил, их разные разветвленные изомеры и т.п.

30 Термин «алкилен» относится к насыщенной линейной или разветвленной алифатической углеводородной группе, имеющей 2 остатка, происходящих от исходного алкана в результате удаления двух атомов водорода от одного и того же атома углерода или двух разных атомов углерода. Он представляет собой линейную или разветвленную группу, содержащую от 1 до 20 атомов углерода, предпочтительно алкилен, содержащий от 1 до 12 атомов углерода, и более предпочтительно алкилен, содержащий от 1 до 6 атомов углерода. Неограничивающие примеры алкилена включают метилен(-CH₂-), 1,1-этилиден (-

CH(CH₃-), 1,2-этилиден(-CH₂CH₂-), 1,1-пропилиден(-CH(CH₂CH₃-)), 1,2-пропилиден(-CH₂CH(CH₃-)), 1,3-пропилиден(-CH₂CH₂CH₂-), 1,4-бутилиден(-CH₂CH₂CH₂CH₂-), 1,5-бутилиден(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-), и.т.д., но не ограничиваются ими. Алкилен может быть замещен или незамещен, и будучи замещенным, заместитель может быть замещен в любом доступном участке соединения, и данный заместитель предпочтительно независимо возможно выбран из одного или более из нижеследующих: галоген, гидроксид, циано, амина, алкил, хлоралкил, алкокси и циклоалкил. Аналогично, «алкенилен» представляет собой такой, как определено выше.

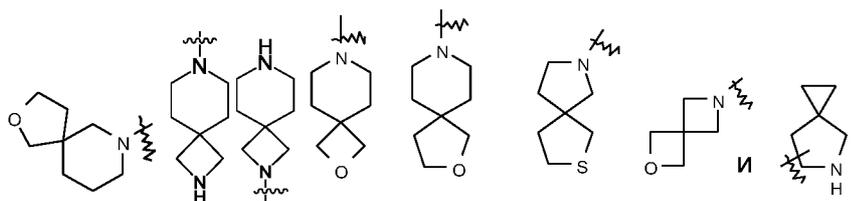
10 Термин «алкокси» относится к -O-(алкилу) и -O-(незамещенному циклоалкилу), где алкил или циклоалкил представляет собой такой, как определено выше. Неограничивающие примеры алкокси включают: метокси, этокси, пропокси, бутокси, циклопропилокси, циклобутокси, циклопентилокси и циклогексилокси. Алкокси может быть возможно замещенным или незамещенным, и когда он замещен, заместитель предпочтительно представляет собой одну или более групп, независимо выбранных из группы, состоящей из алкила, алкенила, алкинила, алкокси, алкилтио, алкиламино, галогена, сульфгидрида, гидроксид, нитро, циано, циклоалкила, гетероциклила, арила, гетероарила, циклоалкокси, гетероциклоалкокси, циклоалкилтио и гетероциклоалкилтио.

20 Термин «циклоалкил» относится к насыщенному или частично ненасыщенному моноциклическому или полициклическому углеводородному заместителю. Циклоалкильное кольцо содержит от 3 до 20 атомов углерода, предпочтительно от 3 до 12 атомов углерода, более предпочтительно от 3 до 10 атомов углерода и наиболее предпочтительно от 3 до 8 атомов углерода. Неограничивающие примеры моноциклического циклоалкила включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентенил, циклогексил, циклогексенил, циклогексадиенил, циклогептил, циклогептатриенил, циклооктил и т.п. Полициклический циклоалкил включает спироциклоалкил, конденсированный циклоалкил и мостиковый циклоалкил.

30 Термин «гетероциклоалкил» относится к насыщенному или частично ненасыщенному моноциклическому или полициклическому углеводородному заместителю, содержащему от 3 до 20 кольцевых атомов, где один или более кольцевых атомов представляют собой гетероатомы, выбранные из группы, состоящей из азота, кислорода и S(O)_m (где m представляет собой целое число от 0 до 2), исключая циклическую часть -O-O-, -O-S- или -S-S-, и оставшиеся кольцевые атомы представляют собой атомы углерода. Гетероциклоалкил предпочтительно

содержит от 3 до 12 кольцевых атомов, из которых от 1 до 4 представляют собой гетероатомы; и более предпочтительно содержит от 3 до 10 кольцевых атомов. Неограничивающие примеры моноциклического гетероциклоалкила включают пирролидинил, пиперидинил, пиперазинил, морфолинил, тиоморфолинил, гомопиперазинил и т.д. Полициклический гетероциклоалкил включает спиро-гетероциклил, конденсированный гетероциклил и мостиковый гетероциклоалкил.

Термин «спиро-гетероциклоалкил» относится к 5-20-членной полициклической гетероциклоалкильной группе, в которой моноциклические кольца имеют один общий атом (называемый спиро-атомом), где один или более кольцевых атомов представляют собой гетероатомы, выбранные из группы, состоящей из азота, кислорода и $S(O)_m$ (где m представляет собой целое число от 0 до 2), и оставшиеся кольцевые атомы представляют собой атомы углерода. Он может содержать одну или более двойных связей, но ни одно из колец не имеет полностью сопряженной системы π -электронов. Он является предпочтительно 6-14-членным или является более предпочтительно 7-10-членным. В соответствии с числом спиро-атомов, являющихся общими у данных колец, спиро-гетероциклоалкил может представлять собой моноспиро-гетероциклоалкил, биспиро-гетероциклоалкил или полиспиро-гетероциклоалкил, предпочтительно моноспиро-гетероциклоалкил и биспиро-гетероциклоалкил, и более предпочтительно 4-членный-4-членный, 4-членный/5-членный, 4-членный/6-членный, 5-членный/5-членный или 5-членный/6-членный моноспиро-гетероциклоалкил. Неограничивающие примеры спиро-гетероциклоалкила включают:

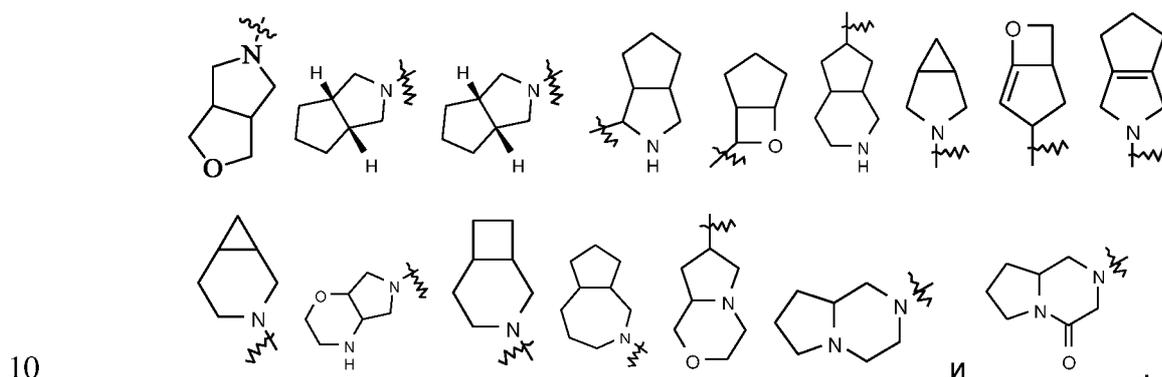


25

Термин «конденсированный гетероциклоалкил» относится к 5-20-членной полициклической гетероциклоалкильной группе, в которой каждое кольцо имеет общую пару смежных атомов с другими кольцами в данной системе, где одно или более колец могут содержать одну или более двойных связей, но ни одно из них не имеет полностью сопряженной системы π -электронов, где один или более кольцевых атомов представляют собой гетероатомы, выбранные из группы, состоящей из азота, кислорода и $S(O)_m$ (где m представляет собой целое число от 0

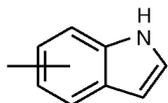
30

до 2), и оставшиеся кольцевые атомы представляют собой атомы углерода. Он является предпочтительно 6-14-членным и более предпочтительно является 7-10-членным. В соответствии с числом конденсированных колец, конденсированный гетероциклоалкил может быть бициклическим, трициклическим, тетрациклическим или полициклическим, предпочтительно бициклическим или трициклическим, и более предпочтительно 5-членным/5-членным или 5-членным/6-членным бициклическим конденсированным гетероциклоалкилом. Неограничивающие примеры конденсированного гетероциклоалкила включают:



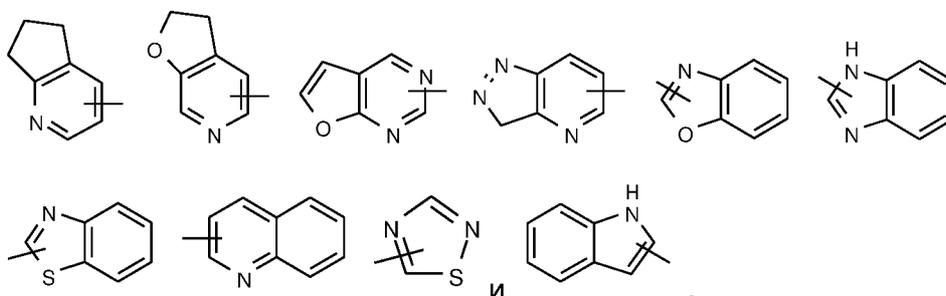
Термин «мостиковый гетероциклоалкил» относится к 5-14-членной полициклической гетероциклоалкильной группе, в которой любые два кольца имеют два общих атома углерода, которые не прямо присоединены друг к другу, где данные кольца могут содержать одну или более двойных связей, но ни одно из них не имеет полностью сопряженной системы π -электронов, где один или более кольцевых атомов представляют собой гетероатомы, выбранные из группы, состоящей из азота, кислорода и $S(O)_m$ (где m представляет собой целое число от 0 до 2), и оставшиеся кольцевые атомы представляют собой атомы углерода. Он является предпочтительно 6-14-членным и более предпочтительно является 7-10-членным. В соответствии с числом образованных колец мостиковый гетероциклоалкил может быть бициклическим, трициклическим, тетрациклическим или полициклическим, предпочтительно бициклическим, трициклическим или тетрациклическим, и более предпочтительно бициклическим или трициклическим. Неограничивающие примеры мостикового гетероциклоалкила включают:

25



Арил может быть замещен или незамещен, и когда он замещен, заместитель предпочтительно представляет собой одну или более групп, независимо выбранных из группы, состоящей из: алкила, алкенила, алкинила, алкокси, алкилтио, алкиламино, галогена, меркапто, гидроксид, нитро, циано, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила, гетероарила, циклоалкокси, гетероциклоалкокси, циклоалкилтио и гетероциклоалкилтио.

Термин «гетероарил» относится к гетероароматической системе, содержащей от 1 до 4 гетероатомов и от 5 до 14 кольцевых атомов, где гетероатомы выбраны из группы, состоящей из кислорода, серы и азота. Гетероарил предпочтительно представляет собой 5-10-членный, более предпочтительно 5-6-членный, например, фуранил, тиенил, пиридил, пирролил, *N*-алкилпирролил, пиримидинил, пиазинил, имидазолил и тетразолил. Гетероарильное кольцо может быть конденсировано с арильным, гетероциклоалкильным или циклоалкильным кольцом, когда кольцо, присоединенное к исходной структуре, представляет собой гетероарил; его неограничивающие примеры включают:

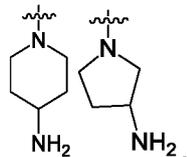


20

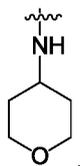
Гетероарил может быть, возможно, замещен или незамещен, и когда он замещен, заместитель предпочтительно представляет собой одну или более групп, независимо выбранных из группы, состоящей из: алкила, алкенила, алкинила, алкокси, алкилтио, алкиламино, галогена, меркапто, гидроксид, нитро, циано, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила, гетероарила, циклоалкокси, гетероциклоалкокси, циклоалкилтио и гетероциклоалкилтио.

Термин «аминогетероциклоалкил» относится к гетероциклоалкилу, замещенному одной или более аминогруппами, предпочтительно одной аминогруппой, где гетероциклоалкил представляет собой такой, как определено

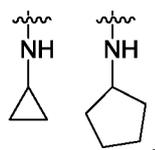
выше, и «аминогруппа» означает -NH_2 . Репрезентативные примеры настоящего раскрытия выглядят следующим образом:



- 5 Термин «гетероциклоалкиламино» относится к аминам, замещенным одной или более гетероциклоалкильными группами, предпочтительно одной гетероциклоалкильной группой, где амин представляет собой такой, как определено выше, и данный гетероциклоалкил представляет собой такой, как определено выше. Репрезентативные примеры настоящего раскрытия выглядят
- 10 следующим образом:



- Термин «циклоалкиламино» относится к аминам, замещенным одной или более циклоалкильными группами, предпочтительно, одной циклоалкильной группой, где амин представляет собой такой, как определено выше, и циклоалкил представляет собой такой, как определено выше. Репрезентативные примеры
- 15 настоящего раскрытия выглядят следующим образом:



- Термин «циклоалкилалкил» относится к алкильной группе, замещенной одной или более циклоалкильными группами, предпочтительно одной
- 20 циклоалкильной группой, где алкил представляет собой такой, как определено выше, и циклоалкил представляет собой такой, как определено выше.

Термин «галогеналкил» относится к алкилу, замещенному одним или более галогенами, где алкил представляет собой такой, как определено выше.

- Термин «дейтерированный алкил» относится к алкилу, замещенному одним
- 25 или более атомами дейтерия, где алкил представляет собой такой, как определено выше.

Термин «гидрокси» относится к группе -OH .

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

Термин «амино» относится к $-NH_2$.

Термин «нитро» относится к $-NO_2$.

В химической формуле сокращение «Me» относится к метилу.

Термин «возможный» или «возможно» означает, что событие или ситуация, описанная впоследствии, может происходить, но не обязательно происходит, и что описание включает примеры, в которых событие или ситуация происходит или не происходит. Например, фраза «гетероциклоалкильная группа, возможно замещенная алкилом» означает, что алкил может существовать, но не обязательно существует, и что в данное описание включены примеры, в которых гетероциклоалкильная группа замещена или не замещена алкилом.

«Замещенный» означает, что один или более, предпочтительно вплоть до 5, более предпочтительно от 1 до 3 атомов водорода в группе независимо замещены соответствующим числом заместителей. Само собой разумеется, что заместитель находится только в своем возможном химическом положении, и специалисты в данной области будут способны определять (экспериментально или теоретически) возможное или невозможное замещение без чрезмерных усилий. Например, может быть нестабильным, когда амино- или гидроксид-, имеющие свободный водород, связаны с атомом углерода, имеющим ненасыщенную (например, олефиновую) связь.

Термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к соли конъюгатов антитело-лекарственное средство по настоящему раскрытию или соли соединения, описанного в настоящем раскрытии. Такие соли являются безопасными и эффективными при использовании в организме млекопитающего и обладают требуемой биологической активностью. Конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему раскрытию содержит по меньшей мере одну аминокислотную группу и, таким образом, может образовывать соли с кислотами, и неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых солей включают гидрохлорид.

Термин «сольват» относится к фармацевтически приемлемому сольвату, образованному соединением конъюгата лиганд-лекарственное средство по настоящему раскрытию и одной или более молекулами растворителя, и неограничивающие примеры молекул растворителя включают воду, этанол, ацетонитрил, изопропанол, ДМСО (диметилсульфоксид) и этилацетат.

Термин «носитель лекарственного средства» для лекарственного средства по настоящему раскрытию относится к системе, которая может изменять то, как лекарственное средство поступает в организм человека, и распределение лекарственного средства в организме человека, контроль над скоростью

высвобождения лекарственного средства и доставку лекарственного средства к органу-мишени. Высвобождение носителя лекарственного средства и система направленной доставки могут уменьшать деградацию и потерю лекарственного средства, уменьшать побочные эффекты и улучшать биодоступность. Например, полимерные поверхностно-активные вещества, которые могут быть использованы в качестве носителей, могут подвергаться самосборке за счет своих уникальных амфифильных структур с образованием разных форм агрегатов, таких как мицеллы, микроэмульсии, гели, жидкие кристаллы, везикулы и т.п., в качестве предпочтительных примеров. Агрегаты обладают способностью инкапсулировать молекулы лекарственных средств и обладают хорошей проницаемостью в отношении мембран и, таким образом, могут быть использованы в качестве превосходных носителей лекарственных средств.

Термин «вспомогательное вещество» представляет собой добавку, помимо основного лекарственного средства, к фармацевтическому препарату. Оно может также называться вспомогательным материалом. Например, все связующие вещества, наполнители, дезинтеграторы и смазывающие средства в таблетках; матриксная часть полутвердых препаратов на основе мази или крема; консерванты, антиоксиданты, корригенты, ароматизаторы, соразтворители, эмульгаторы, солюбилизаторы, регуляторы осмотического давления, красители и т.п. в жидких препаратах могут называться вспомогательными веществами.

Термин «разбавитель», также называемый наполнителем, используют главным образом для увеличения массы и объема таблетки. Добавление разбавителя не только обеспечивает определенный объем, но также уменьшает отклонение дозы основных ингредиентов и улучшает способность лекарственного средства к компрессионному формованию и т.п. Когда лекарственное средство в форме таблетки содержит масляные компоненты, поглощающее вещество необходимо добавлять для поглощения масляных компонентов таким образом, чтобы сохранять «сухое» состояние и, таким образом, облегчать изготовление таблетки.

Антитело против HER2, которое «связывается с гетеродимер-связывающим сайтом HER2», связывается с остатками в домене II (и возможно также связывается с другими доменами, помимо внеклеточного домена HER2, например, остатками в доменах I и III), и способно стерически затруднять, по меньшей мере до некоторой степени, образование гетеродимера HER2-EGFR, HER2-HER3 или HER2-HER4. Franklin et al., *Cancer Cell* 5: 317-328(2004) показали кристаллическую структуру HER2-пертузумаба, хранящуюся в базе данных по белкам RCSB (ID код IS78) и

проиллюстрировали типичное антитело, которое связывается с гетеродимер-связывающим сайтом HER2.

Антитело, которое «связывается с доменом II HER2», связывается с остатками в домене II и возможно других доменах HER2, как например, в доменах I и III. Предпочтительно, антитело, которое связывается с доменом II, связывается с соединением доменов I, II и III HER2.

В данном документе «пертузумаб» относится к антителу, содержащему переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотные последовательности, изложенные в SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно. Если пертузумаб представляет собой полноразмерное антитело, оно предпочтительно содержит легкую цепь и тяжелую цепь, имеющую аминокислотные последовательности, изложенные в SEQ ID NO: 3 и 4, соответственно. «Пертузумаб» относится к антителу, содержащему переменную область легкой цепи и переменную область тяжелой цепи, имеющие аминокислотные последовательности, изложенные в SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно. «Трастузумаб» по настоящему раскрытию содержит легкую цепь и тяжелую цепь, имеющие аминокислотные последовательности, изложенные в SEQ ID NO: 5 и 6, соответственно. Для способа получения дана ссылка на WO2006033700, и релевантное содержание включено в данный документ в целях иллюстрации.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фиг. 1 представляет собой график, на котором показано изменение в объеме опухоли модели мышины подкожной ксенотрансплантатной опухоли N87/16-8.

Фиг. 2 представляет собой график, на котором показано изменение в массе тела модели мышины подкожной ксенотрансплантатной опухоли N87/16-8.

Фиг. 3 представляет собой график, на котором показано изменение в объеме опухоли модели мышины подкожной ксенотрансплантатной опухоли JIMIT-1.

Фиг. 4 представляет собой график, на котором показано изменение в массе тела модели мышины подкожной ксенотрансплантатной опухоли JIMIT-1.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее раскрытие дополнительно описано ниже со ссылкой на примеры, которые не предназначены для ограничения объема настоящего раскрытия.

Экспериментальные способы без указанных условий в примерах настоящего раскрытия обычно проводят в соответствии с общепринятыми условиями или в

соответствии с условиями, рекомендуемыми производителями исходного сырья или коммерческих продуктов. Реагенты без конкретных указанных источников представляют собой имеющиеся в продаже общепринятые реагенты.

Структуры соединений определяли посредством ЯМР-спектроскопии (спектроскопия ядерного магнитного резонанса) и/или масс-спектрометрии (МС). ЯМР-сдвиги (δ) даны в 10^{-6} (млн⁻¹). ЯМР-анализ проводили на приборе для ядерного магнитного резонанса Bruker AVANCE-400, с диметилсульфоксидом-D6 (ДМСО-*d*6), хлороформом-D (CDCl_3) и метанолом-D4 (CD_3OD) в качестве растворителей и тетраметилсиланом (TMS – от англ. tetramethylsilane) в качестве внутреннего стандарта. МС-анализ проводили в системе жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии, на квадрупольном масс-спектрометре Agilent 1200/1290 DAD-6110/6120 (производитель: Agilent; модель МС: квадрупольный масс-спектрометр 6110/6120),

Waters ACQuity UPLC-QD/SQD (производитель: waters; модель МС: waters ACQuity Qda Detector/waters SQ Detector) и THERMO Ultimate 3000-Q Exactive (производитель: THERMO; модель МС: THERMO Q Exactive).

Анализ на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) проводили, используя следующие приборы для ВЭЖХ: Agilent HPLC 1200DAD, Agilent HPLC 1200VWD и Waters HPLC e2695-2489.

Анализы на основе хиральной ВЭЖХ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1260 DAD.

Препаративную высокоэффективную жидкостную хроматографию проводили на препаративных хроматографах Waters 2545-2767, Waters 2767-SQ Detecor2, Shimadzu LC-20AP и Gilson GX-281.

Препаративную хиральную хроматографию проводили на препаративном хроматографе Shimadzu LC-20AP.

Используемый препаративный флэш-хроматограф CombiFlash представлял собой CombiFlash Rf200 (TELEDYNE ISCO).

Пластины из силикагеля Yantai Huanghai HSGF254 или Qingdao GF254, с толщиной слоя 0,15-0,2 мм, использовали для анализа на основе тонкослойной хроматографии (ТСХ) и с толщиной слоя 0,4-0,5 мм для ТСХ-разделения и очистки.

Силикагель Yantai Huanghai 200-300 меш обычно используют в качестве носителя в хроматографии на колонке с силикагелем.

Известное исходное сырье, описанное в данном документе, можно синтезировать посредством использования или в соответствии со способами, известными в данной области, или можно приобрести у ABCR GmbH & Co. KG,

Acros Organics, Aldrich Chemical Company, Accela ChemBio Inc., Chembee Chemicals и других компаний.

В данных примерах все реакции можно проводить в атмосфере аргона или атмосфере азота, если не указано иное.

5 Атмосфера аргона или атмосфера азота подразумевает, что реакционная колба соединена с баллоном, содержащим примерно 1 л аргона или азота.

Атмосфера водорода подразумевает, что реакционная колба соединена с баллоном, содержащим примерно 1 л водорода.

10 Реакции гидрогенизации под давлением проводили, используя гидрогенизационную установку Parr 3916EKX и гидрогенизационную установку Qinglan QL-500 или гидрогенизационную установку HC2-SS.

Реакции гидрогенизации обычно включали 3 цикла вакуумирования и продувки водородом.

15 Микроволновые реакции проводили на микроволновом реакторе CEM Discover-S 908860.

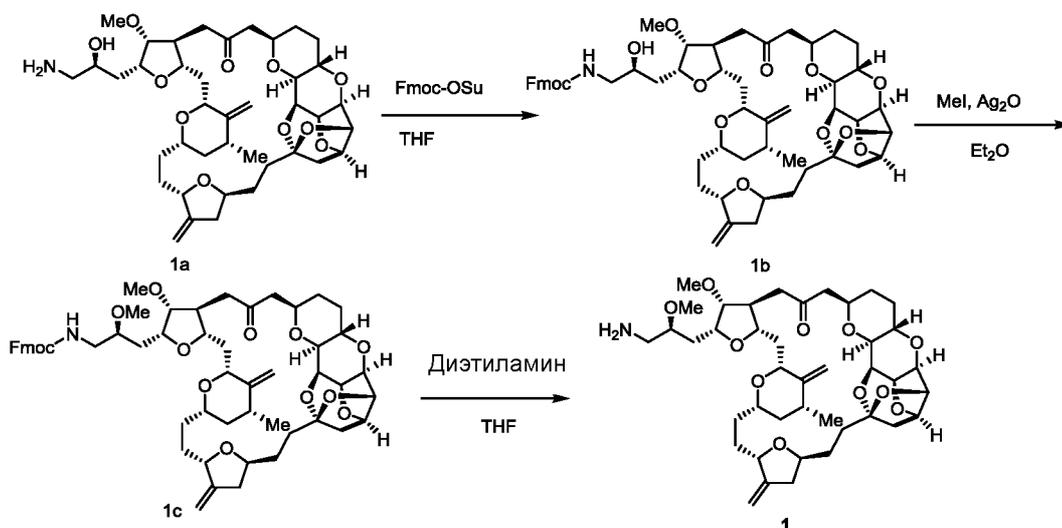
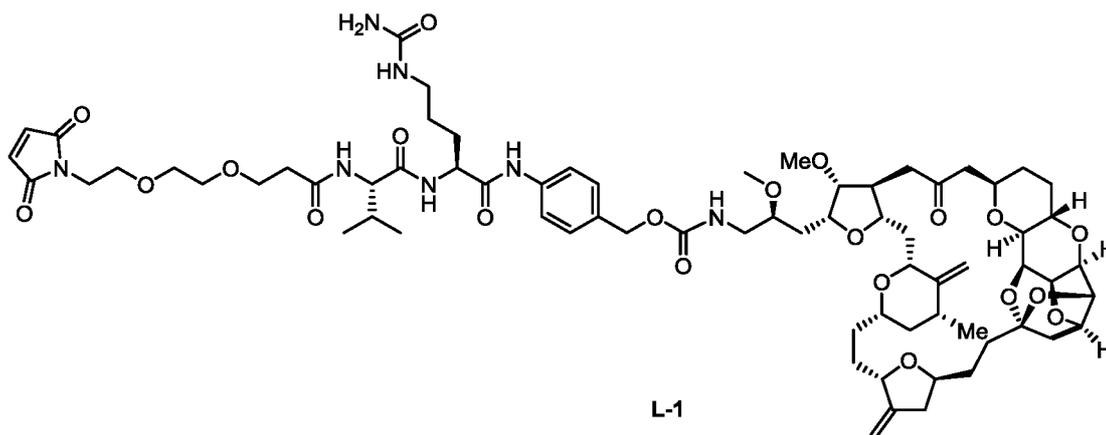
В примерах раствор представлял собой водный раствор, если не указано иное.

В примерах реакции проводили при комнатной температуре, а именно, при 20°C - 30°C, если не указано иное.

20 Система элюентов для колоночной хроматографии и система проявляющих растворителей для тонкослойной хроматографии, используемые для очистки соединений, включали: А: систему дихлорметана и изопропанола, В: систему дихлорметана и метанола, и С: систему петролейного эфира и этилацетата. Объемное соотношение растворителей регулировали в соответствии с полярностью соединения или посредством добавления маленького количества триэтиламина и кислотного или основного реагента.

25

Пример 1



Стадия 1: Получение соединения **1b**

- 5 Соединение **1a** (эрибулин, полученный, ссылаясь на способ, описанный в ZL201010236637.2) (72,91 мг, 0,1 ммоль), растворяли в 10 мл тетрагидрофурана на ледяной бане с последующим добавлением Fmoc-OSu (*N*-(9-флуоренилметоксикарбонилокси)сукцинимид, 41 мг, 0,12 ммоль). Реакционную систему перемешивали при комнатной температуре до завершения реакции.
- 10 Реакционную систему концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который использовали непосредственно на следующей стадии.

Стадия 2: Получение соединения **1c**

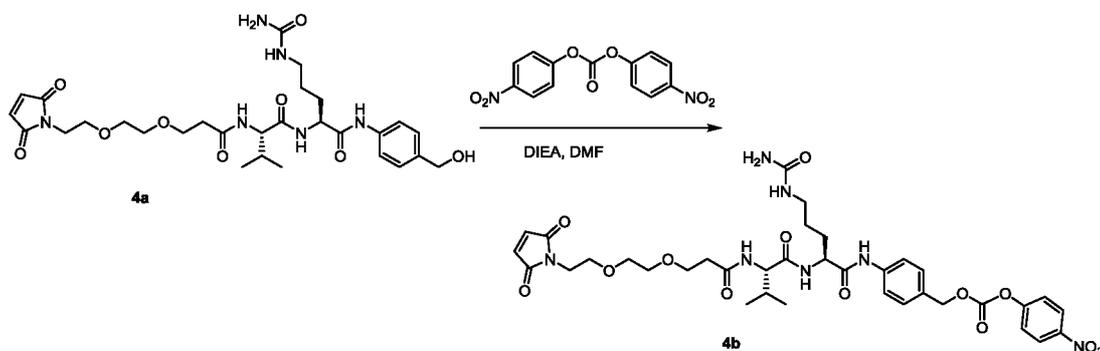
- 15 Неочищенный продукт соединения **1b**, полученный на предыдущей стадии, растворяли в 10 мл безводного простого эфира с последующим добавлением оксида серебра (34,8 мг, 0,15 ммоль) и йодметана (28,4 мг, 0,2 ммоль). Реакционную систему помешивали при комнатной температуре до завершения реакции. Реакционную систему фильтровали и концентрировали при пониженном давлении с

получением неочищенного продукта, который использовали непосредственно на следующей стадии.

Стадия 3: Получение соединения 1

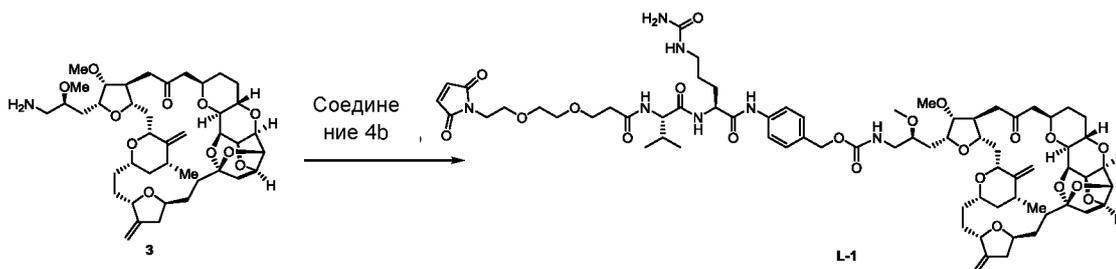
Неочищенный продукт соединения **1с**, полученный на предыдущей стадии, растворяли в 10 мл тетрагидрофурана с последующим добавлением 2 мл диэтиламина. Реакционную систему перемешивали при комнатной температуре до окончания реакции. Реакционную систему концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали посредством хроматографии на колонке с силикагелем (элюент: дихлорметан/этилацетат/петролейный эфир) с получением 3 мг целевого соединения **1**.

ЖХ/МС (ИЭР (ионизация электрораспылением)): m/z 744.2 $[M+H]^+$.



4a (50 мг, 0,08 ммоль, полученное посредством ссылки на способ, описанный в WO2017151979) растворяли в 1,5 мл *N,N*-диметилформамида на ледяной бане с последующим добавлением DIPEA (от англ. diisopropylethylamine - *N,N*-диизопропилэтиламин, 18 мг, 0,14 ммоль) и бис(*p*-нитрофенил)карбоната (49 мг, 0,16 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 10 мин, и добавляли 20 мл метил-*трет*-бутилового эфира. Затем реакционную смесь перемешивали в течение 20 мин, фильтровали и сушили с получением 36 мг твердого вещества.

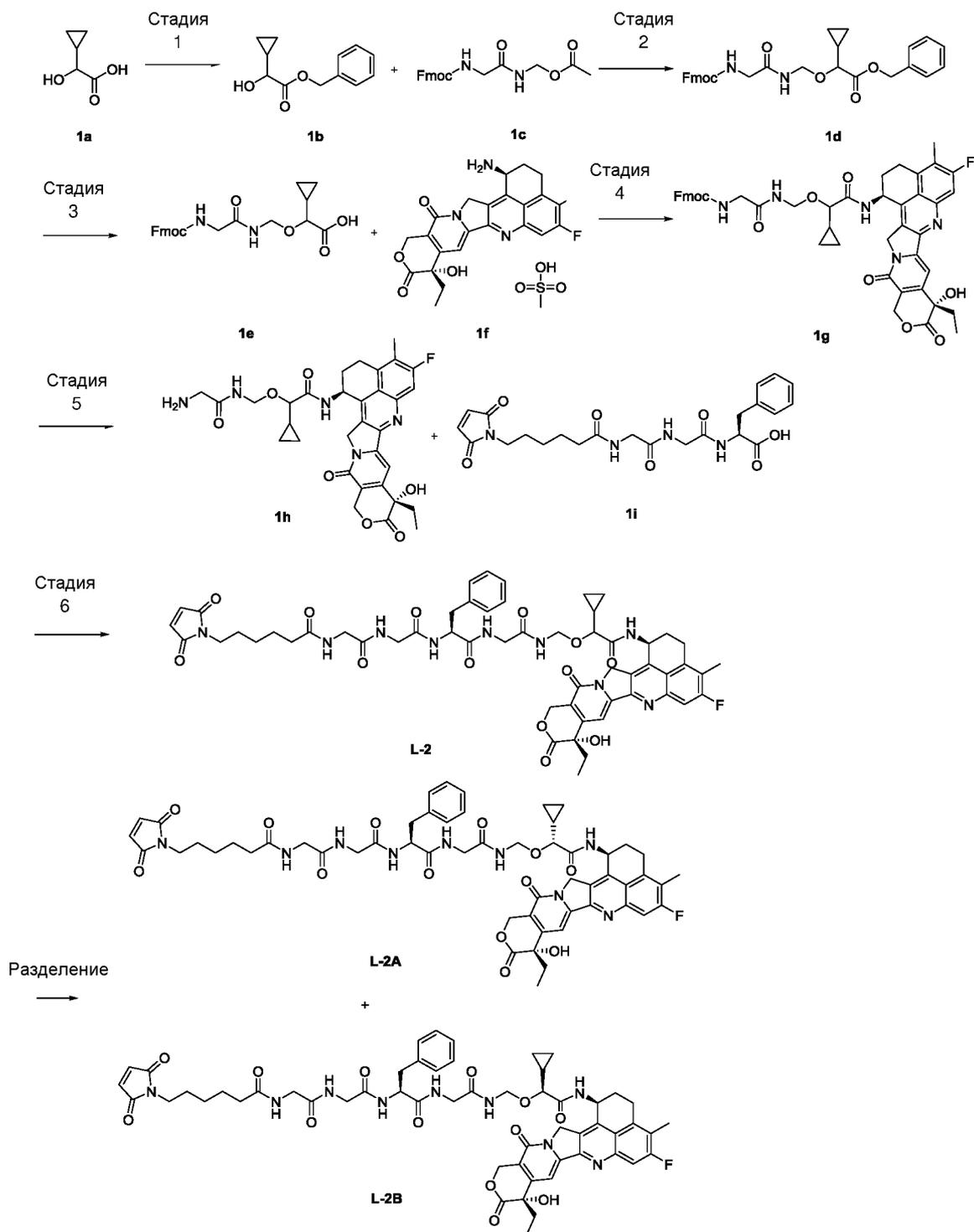
ЖХ/МС (ИЭР): m/z 784.1 $[M+H]^+$.



Соединение **1** (13,5 мг, 0,018 ммоль) растворяли в 1,5 мл DMF (от англ. dimethyl formamide – диметилформамид) с последующим добавлением DIPEA (7 мг, 0,054 ммоль) и добавлением соединения **4b** (18 мг, 1,3 ммоль) порциями. Реакционную систему перемешивали до по существу завершения реакции и затем концентрировали с получением неочищенного продукта, который разделяли посредством препаративной ВЭЖХ с получением 6,5 мг соединения L-1 (чистота 96,95%). ЖХ/МС (ИЭР): m/z 1388.3 [M+H]⁺.

Пример 2. ADC-001

- 10 *N*-((2R,10S)-10-бензил-2-циклопропил-1-(((1S,9S)-9-этил-5-фтор-9-гидрокси-4-метил-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-*b*]хинолин-1-ил)амино)-1,6,9,12,15-пентаоксо-3-окса-5,8,11,14-тетраазагексадец-16-ил)-6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексанамид **L-2A**
- 15 *N*-((2S,10S)-10-бензил-2-циклопропил-1-(((1S,9S)-9-этил-5-фтор-9-гидрокси-4-метил-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-*b*]хинолин-1-ил)амино)-1,6,9,12,15-пентаоксо-3-окса-5,8,11,14-тетраазагексадец-16-ил)-6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексанамид **L-2B**



Стадия 1

Бензил 2-циклопропил-2-гидроксиацетат **1b**

1a (1,3 г, 11,2 ммоль; полученный в соответствии со способом, раскрытым в патентной заявке «WO2013/106717») растворяли в 50 мл ацетонитрила, и последовательно добавляли карбонат калия (6,18 г, 44,8 ммоль), бензибромид (1,33 мл, 11,2 ммоль) и тетрабутиламмония йодид (413 мг, 1,1 ммоль). Реакционную систему перемешивали при комнатной температуре в течение 48 ч и фильтровали

5 через целит, и осадок на фильтре промывали этилацетатом (10 мл). Фильтраты объединяли и концентрировали при пониженном давлении, и полученный осадок очищали посредством хроматографии на колонке с силикагелем с системой проявляющих растворителей С с получением указанного в заголовке продукта **1b** (2 г, выход 86,9%).

Стадия 2

Бензил

10-циклопропил-1-(9*H*-флуорен-9-ил)-3,6-диоксо-2,9-диокса-4,7- диазаундекан-11-оат **1d**

10 В реакционную колбу добавляли **1b** (120,9 мг, 0,586 ммоль) и **1c** (180 мг, 0,489 ммоль) с последующим добавлением 4 мл тетрагидрофурана. Реакционную систему продували аргоном три раза и охлаждали до 0-5°C на ледяной бане с последующим добавлением *трет*-бутоксидка калия (109 мг, 0,98 ммоль). Ледяную баню удаляли, и полученную смесь нагревали до комнатной температуры и
15 перемешивали в течение 40 мин с последующим добавлением 10 мл ледяной воды. Смесь экстрагировали этилацетатом (20 мл × 2) и хлороформом (10 мл × 5), и органические фазы объединяли и концентрировали. Полученный осадок растворяли в 4 мл диоксана с последующим добавлением 2 мл воды, бикарбоната натрия (49,2 мг, 0,586 ммоль) и 9-флуоренилметилхлорформиата (126 мг, 0,49 ммоль).
20 Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. 20 мл воды добавляли, и смесь экстрагировали этилацетатом (10 мл × 3). Органическую фазу промывали насыщенным раствором хлорида натрия (20 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали.

25 Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Полученный остаток очищали посредством хроматографии на колонке с силикагелем с системой проявляющих растворителей С с получением указанного в заголовке продукта **1d** (48 мг, выход 19%).

МС *m/z* (ИЭР): 515.0 [M+1].

Стадия 3

30 10-Циклопропил-1-(9*H*-флуорен-9-ил)-3,6-диоксо-2,9-диокса-4,7-
диазаундекан-11-овая кислота **1e**

1d (20 мг, 0,038 ммоль) растворяли в 4,5 мл смеси растворителей тетрагидрофурана и этилацетата (об./об. составляет 2:1), и добавляли палладий на углеводе (12 мг, 10% загрузка, сухой). Реакционную смесь продували водородом три
35 раза и перемешивали при комнатной температуре в течение 1 ч. Реакционную систему фильтровали через целит, и осадок на фильтре промывали этилацетатом.

Фильтрат концентрировали с получением неочищенного продукта указанного в заголовке продукта **1e** (13 мг), который непосредственно использовали на следующей стадии без очистки.

МС m/z (ИЭР): 424.9 [M+1].

5

Стадия 4

(9*H*-флуорен-9-ил)метил (2-(((1-циклопропил-2-(((1*S*,9*S*)-9-этил-5-фтор-9-гидрокси-4-метил-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1*H*,12*H*-бензо[*де*]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-*b*]хинолин-1-ил)амино)-2-оксоэтокси)метил)амино)-2-оксоэтил)карбамат **1g**

10

В реакционную колбу добавляли **1f** (10 мг, 18,8 мкмоль) с последующим добавлением 1 мл *N,N*-диметилформамида. Реакционную систему продували аргоном три раза и охлаждали до 0-5°C на ледяной бане с последующим добавлением капли триэтиламина, неочищенного продукта **9c** (13 мг, 30,6 мкмоль) и 4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилморфолина гидрохлорида (16,9 мг, 61,2 мкмоль). Полученную реакционную смесь перемешивали на ледяной бане в течение 40 мин. Добавляли 10 мл воды, и смесь экстрагировали этилацетатом (10 мл × 3). Органические фазы объединяли, промывали насыщенным раствором хлорида натрия (10 мл × 2), сушили над безводным сульфатом натрия и фильтровали. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении. Полученный осадок очищали посредством тонкослойной хроматографии с системой проявляющих растворителей В с получением указанного в заголовке продукта **1g** (19 мг, выход 73,6%).

15

20

МС m/z (ИЭР): 842.1 [M+1].

Стадия 5

2-((2-Аминоацетиламино)метокси)-2-циклопропил-*N*-(((1*S*,9*S*)-9-этил-5-фтор-9-гидрокси-4-метил-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1*H*,12*H*-бензо[*де*]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-*b*]хинолин-1-ил)ацетамид **1h**

25

1g (19 мг, 22,6 мкмоль) растворяли в 2 мл дихлорметана, и добавляли 1 мл диэтиламина. Реакционную систему перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч и концентрировали при пониженном давлении. Добавляли 1 мл толуола, и полученную реакционную систему концентрировали при пониженном давлении, и данные процедуры повторяли два раза. Остаток суспендировали с помощью 3 мл *n*-гексана и оставляли постоять. Затем супернатант удаляли, и оставляли твердое вещество. Твердый осадок концентрировали при пониженном давлении и сушили, используя масляный насос с получением неочищенного продукта указанного в заголовке продукта **1 h** (17 мг), который использовали непосредственно на следующей стадии без очистки.

30

35

МС m/z (ИЭР): 638.0 [M+18].

Стадия 6

N-((2R,10S)-10-бензил-2-циклопропил-1-(((1S,9S)-9-этил-5-фтор-9-гидрокси-4-метил-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-*b*]хинолин-1-ил)амино)-1,6,9,12,15-пентаоксо-3-окса-5,8,11,14-тетраазагексадец-16-ил)-6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексанамид **9-A**

N-((2S,10S)-10-бензил-2-циклопропил-1-(((1S,9S)-9-этил-5-фтор-9-гидрокси-4-метил-10,13-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-*b*]хинолин-1-ил)амино)-1,6,9,12,15-пентаоксо-3-окса-5,8,11,14-тетраазагексадец-16-ил)-6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)гексанамид **9-B**

Неочищенный продукт **1h** (13,9 мг, 22,4 мкмоль) растворяли в 0,6 мл *N,N*-диметилформамида. Реакционную систему три раза продували аргоном и охлаждали до 0-5°C на ледяной бане с последующим добавлением раствора **1l** (21,2 мг, 44,8 мкмоль) в 0,3 мл *N,N*-диметилформамида и 4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилморфолина хлорида (18,5 мг, 67,3 мкмоль). Полученную реакционную систему перемешивали на ледяной бане в течение 10 мин. Затем ледяную баню удаляли, и реакционную систему нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 1 ч с получением соединения **L-2**. Реакционную систему очищали посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии (условия разделения: хроматографическая колонка: XBridge Prep C18 OBD 5 мкм 19 × 250 мм; подвижная фаза: А-вода (10 ммоль NH₄OAc), В-ацетонитрил, градиентное элюирование, скорость потока: 18 мл/мин). Соответствующие фракции собирали и концентрировали при пониженном давлении с получением указанных в заголовке продуктов (L-2A: 2,4 мг, L-2B: 1,7 мг).

МС m/z (ИЭР): 1074.4 [M+1].

То в соединениях L-2A и L-2B, которое имело более короткое время удерживания:

анализ СЭЖХ: время удерживания: 1,14 мин; чистота: 85% (хроматографическая колонка: ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 мкм 2,1 × 50 мм; подвижная фаза: А-вода (5 ммоль NH₄OAc), В-ацетонитрил).

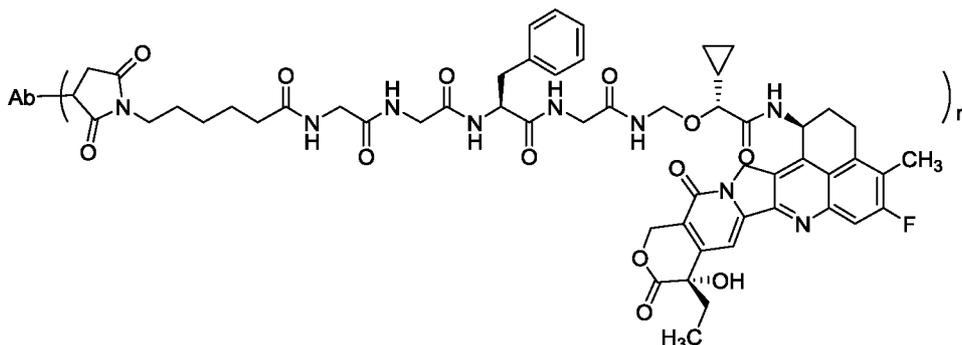
¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆): δ 8.60 (t, 1H), 8.51-8.49 (d, 1H), 8.32-8.24 (m, 1H), 8.13-8.02 (m, 2H), 8.02-7.96 (m, 1H), 7.82-7.75 (m, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.26-7.15 (m, 4H), 6.99 (s, 1H), 6.55-6.48 (m, 1H), 5.65-5.54 (m, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.35-5.15 (m, 3H), 4.74-4.62 (m, 1H), 4.54-4.40 (m, 2H), 3.76-3.64 (m, 4H), 3.62-3.48 (m, 2H), 3.20-3.07 (m, 2H),

3.04-2.94 (m, 1H), 2.80-2.62 (m, 1H), 2.45-2.30 (m, 3H), 2.25-2.15 (m, 2H), 2.15-2.04 (m, 2H), 1.93-1.78 (m, 2H), 1.52-1.39 (m, 3H), 1.34-1.12 (m, 5H), 0.87 (t, 3H), 0.64-0.38 (m, 4H).

5 То самое в соединениях L-2A и L-2B, которое имело более продолжительное время удерживания:

анализ СЭЖХ: время удерживания: 1,16 мин; чистота: 89% (хроматографическая колонка: ACQUITY UPLC BEH C18 1,7 мкм 2,1 × 50 мм; подвижная фаза: А-вода (5 ммоль NH₄OAc), В-ацетонитрил).

10 ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-*d*₆): δ 8.68-8.60 (m, 1H), 8.58-8.50 (m, 1H), 8.32-8.24 (m, 1H), 8.13-8.02 (m, 2H), 8.02-7.94 (m, 1H), 7.82-7.75 (m, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.26-7.13 (m, 3H), 6.99 (s, 1H), 6.55-6.48 (m, 1H), 5.60-5.50 (m, 1H), 5.41 (s, 2H), 5.35-5.15 (m, 2H), 4.78-4.68 (m, 1H), 4.60-4.40 (m, 2H), 3.76-3.58 (m, 4H), 3.58-3.48 (m, 1H), 3.20-3.10 (m, 2H), 3.08-2.97 (m, 2H), 2.80-2.72 (m, 2H), 2.45-2.30 (m, 3H), 2.25-2.13 (m, 2H), 2.13-2.04 (m, 2H), 2.03-1.94 (m, 2H), 1.91-1.78 (m, 2H), 1.52-1.39 (m, 3H), 1.34-1.12 (m, 15 4H), 0.91-0.79 (m, 3H), 0.53-0.34 (m, 4H).



20 К водному буферному раствору антитела пертузумаб в PBS (0,05 М водный буферный раствор PBS при pH 6,5; 10,0 мг/мл, 1,50 мл, 101 нмоль) добавляли полученный водный раствор трис(2-карбоксииэтил)фосфина гидрохлорида (ТСЕР-НCl) (10 мМ, 16,2 мкл, 162 нмоль) при 37°C. Реакционную смесь встряхивали на качалке-водяной бане при 37°C в течение 3 ч, и затем реакцию останавливали. Реакционную систему охлаждали до 25°C на водяной бане.

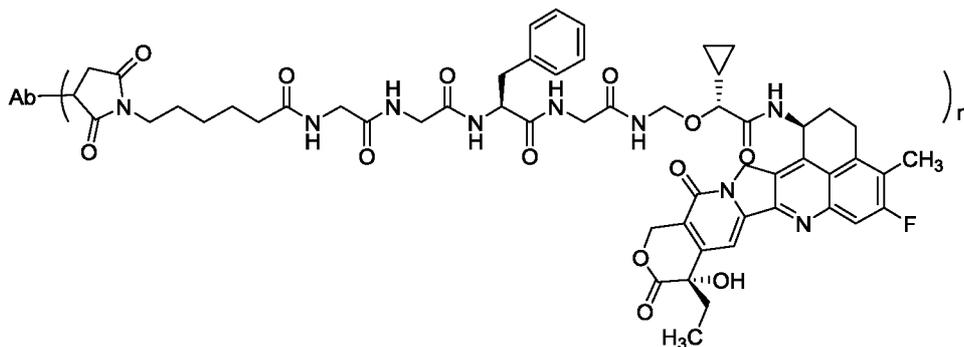
25 То самое в соединениях L-2A и L-2B, которое имело менее продолжительное время удерживания (0,87 мг, 810 нмоль) растворяли в 66 мкл диметилсульфоксида, и смесь добавляли к реакционной смеси, описанной выше. Полученную реакционную систему встряхивали на качалке-водяной бане при 25°C в течение 3 ч, и затем реакцию останавливали. Реакционную смесь обессоливали и очищали через колонку с гелем Sephadex G25 (фаза элюирования: 0,05 М водный буферный раствор PBS при pH 6,5, содержащий 0,001 М ЭДТА (Этилендиаминтетрауксусная

кислота)) с получением указанного в заголовке продукта в буфере PBS (1,16 мг/мл, 12,0 мл), который помещали в холодильник при 4°C.

Среднее, рассчитанное посредством ОФ-ВЭЖХ (обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография): $n = 2,67$.

5

Пример 3. ADC-002



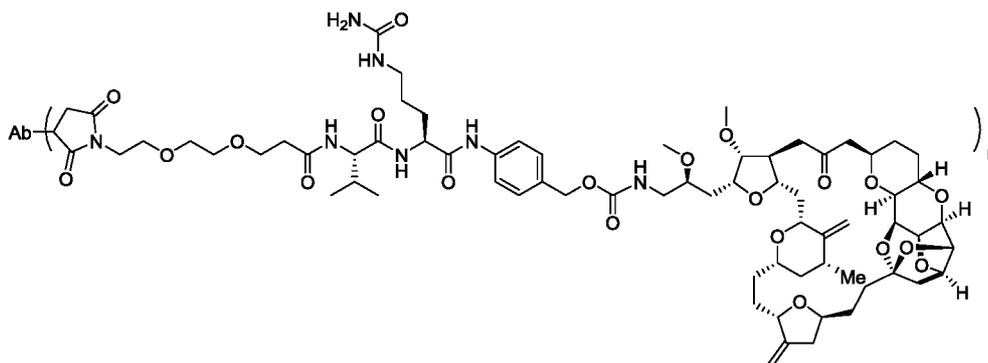
К водному буферному раствору антитела пертузумаб в PBS (0,05 М водный буферный раствор PBS при pH 6,5; 10,0 мг/мл, 1,50 мл, 101 нмоль) добавляли полученный водный раствор трис(2-карбок시에тил)фосфина гидрохлорида (ТСЕР-НCl) (10 мМ, 28,4 мкл, 284 нмоль) при 37°C. Реакционную смесь встряхивали на качалке-водяной бане при 37°C в течение 3 ч, и затем реакцию останавливали. Реакционную систему охлаждали до 25°C на водяной бане.

То самое в соединениях L-2A и L-2B, которое имело менее продолжительное время удерживания (1,09 мг, 1015 нмоль) растворяли в 84 мкл диметилсульфоксида, и смесь добавляли к реакционной системе, описанной выше. Полученную реакционную систему встряхивали на качалке-водяной бане при 25°C в течение 3 ч, и затем реакцию останавливали. Реакционную систему обессоливали и очищали посредством колонки с гелем Sephadex G25 (фаза элюирования: 0,05 М водный буферный раствор PBS при pH 6,5, содержащий 0,001 М ЭДТА) с получением указанного в заголовке продукта в буфере PBS (1,06 мг/мл, 12,0 мл), который помещали в холодильник при 4°C.

Среднее, рассчитанное посредством ОФ-ВЭЖХ: $n = 4,51$.

25

Пример 4. ADC-003

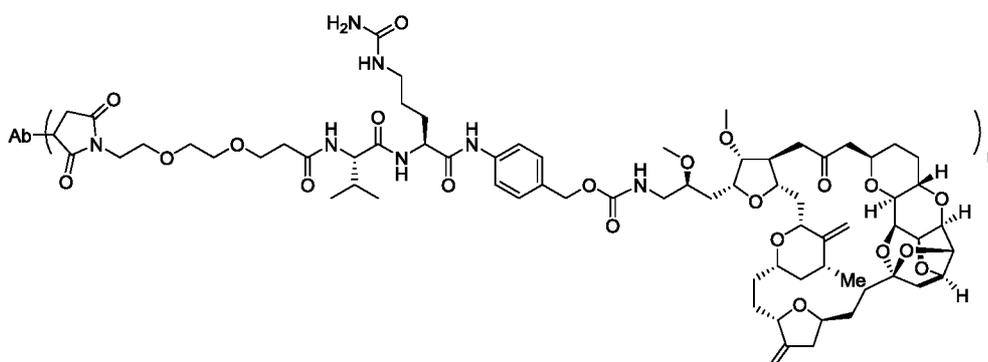


К водному буферному раствору антитела пертузумаб в PBS (0,05 М водный буферный раствор PBS при pH 6,5; 10,0 мг/мл, 1,43 мл, 97 нмоль) добавляли полученный водный раствор трис(2-карбоксиэтил)фосфина гидрохлорида (ТСЕР-НCl) (10 мМ, 15,5 мкл, 155 нмоль) при 37°C. Реакционную смесь встряхивали на качалке-водяной бане при 37°C в течение 3 ч, и затем реакцию останавливали. Реакционную систему охлаждали до 25°C на водяной бане.

Соединение **L-1** (1,07 мг, 771 нмоль) растворяли в 50 мкл диметилсульфоксида, и смесь добавляли к реакционной системе, описанной выше. Реакционную систему встряхивали на качалке-водяной бане при 25°C в течение 3 ч, и затем реакцию останавливали. Реакционную систему обессоливали и очищали посредством колонки с гелем Sephadex G25 (фаза элюирования: 0,05 М водный буферный раствор PBS при pH 6,5, содержащий 0,001 М ЭДТА) с получением указанного в заголовке продукта в буфере PBS (1,21 мг/мл, 10,8 мл), который помещали в холодильник при 4°C.

Среднее, рассчитываемое посредством CE-SDS: $n = 2,04$.

Пример 5. ADC-004



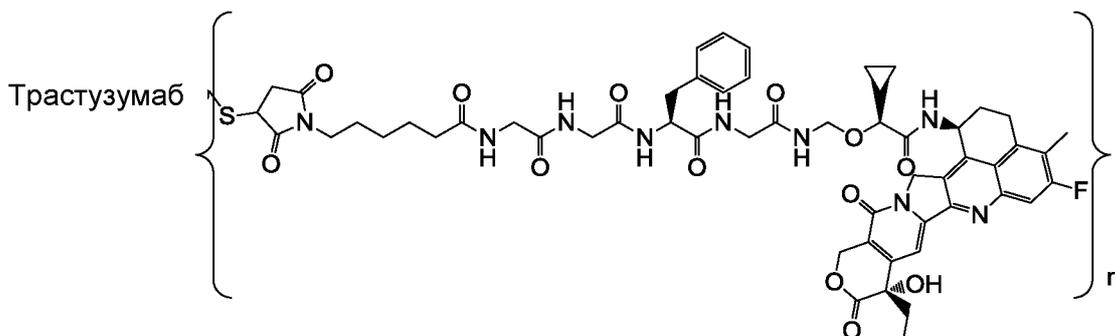
К водному буферному раствору антитела пертузумаб в PBS (0,05 М водный буферный раствор PBS при pH 6,5; 10,0 мг/мл, 1,43 мл, 97 нмоль) добавляли полученный водный раствор трис(2-карбоксиэтил)фосфина гидрохлорида (ТСЕР-НCl) (10 мМ, 24,2 мкл, 242 нмоль) при 37°C. Реакционную смесь встряхивали на

качалке-водяной бане при 37°C в течение 3 ч, и затем реакцию останавливали. Реакционную систему охлаждали до 25°C на водяной бане.

Соединение L-1 (1,34 мг, 965 нмоль) растворяли в 60 мкл диметилсульфоксида, и смесь добавляли к реакционной системе, описанной выше. Полученную реакционную систему встряхивали на качалке-водяной бане при 25°C в течение 3 ч, и затем реакцию останавливали. Реакционную систему обессоливали и очищали посредством колонки с гелем Sephadex G25 (фаза элюирования: 0,05 М водный буферный раствор PBS при pH 6,5, содержащий 0,001 М ЭДТА) с получением указанного в заголовке продукта в буфере PBS (1,24 мг/мл, 9,8 мл), который помещали в холодильник при 4°C.

Среднее, рассчитываемое посредством CE-SDS: $n = 3,17$.

Пример 6. ADC-005



15

Посредством ссылки на способ в Примере 3, то самое в соединениях L-2A и L-2B, которое имело более длительное время удерживания, и трастузумаб (полученный посредством ссылки на способ, описанный в WO2006033700) использовали в качестве исходного сырья для получения целевого продукта в буфере PBS (1,24 мг/мл, 9,8 мл), который помещали в холодильник при 4°C.

Среднее, рассчитываемое посредством CE-SDS: $n = 6$.

Пример тестирования 1. Ингибирование пролиферации клеток рака молочной железы человека BT-474 и рака желудка человека NCI-N87, NCI-N87/16-8 и NCI-N87/8-2, культивируемых *in vitro*

1.1 Информация о лекарственных средствах

Последовательность	Код лекарственного средства	Концентрация (%)	Чистота (%)
1	ADC-001	1,16	96,06
2	ADC002	1,06	95,13

25

3	ADC-003	1,21	98,18
4	ADC-004	1,24	97,57
5	ADC-005	5	/
6	kadcyla	10	/

Примечание: указанные выше образцы были предоставлены Shanghai Hengrui Pharmaceutical Co., Ltd., где пертузумаб получали способом, похожим на способ в WO2006033700; kadcyla: конъюгат трастузумаб- майтансин.

1.2 Тестируемые клетки

5 Клетки NCI-N87 и BT-474 приобретали у Американской коллекции типовых культур (ATCC – от англ. American Type Culture Collection). T-DM1-устойчивые клетки NCI-N87/16-8 и NCI-N87/8-2, индуцируемые продолжительным воздействием T-DM1 на NCI-N87, конструировали в данной лаборатории. Клетки культивировали в среде RPMI 1640/DMEM (1:1), содержащей 10% фетальную телячью сыворотку (FBS – от
10 англ. fetal bovine serum).

1.3 Приборы и реагенты

RPMI 1640 и DMEM приобретали у Gibco BRL; FBS приобретали у Gibco; сульфородамин В (SRB) приобретали у Sigma.

Микропланшет-ридер Synergy H4 приобретали у BioTek.

15 1.4 Порядок проведения эксперимента

Определенное число клеток в логарифмическую фазу роста высевали в 96-луночный культуральный планшет. После того, как данные клетки подвергались адгезионному культивированию в течение 24 ч, добавляли лекарственное средство в разных концентрациях (10000 нг/мл, 3000 нг/мл, 1000 нг/мл, 300 нг/мл, 100 нг/мл,
20 30 нг/мл, 10 нг/мл, 3 нг/мл и 1 нг/мл). После 120 ч обработки лекарственным средством клетки подвергали иммобилизации трихлоруксусной кислотой. Затем, клетки окрашивали раствором SRB; в конечном итоге, раствор Tris добавляли для растворения SRB. Значения OD (от англ. optical density – оптическая плотность) при
25 длине волны 510 нм считывали, используя микропланшет-ридер, и степень ингибирования роста клеток рассчитывали в соответствии со следующей формулой:

Степень ингибирования = (значение OD контрольной лунки – значение OD лунки с дозой)/значение OD контрольной лунки × 100%

Концентрации полумаксимального ингибирования (значения IC₅₀) рассчитывали на основе степеней ингибирования при каждой концентрации,
30 используя программное обеспечение GraphPad Prism 7.

Таблица 1. Ингибирование (IC₅₀) пролиферации HER2-позитивных опухолевых клеток (нг/мл)

	NCI-N87	NCI-N87/16-8	NCI-N87/8-2	BT-474
ADC-001	≈10000	≈10000	≈10000	>1000 0
ADC-001	1186	832,4	1257	>1000 0
ADC-003	13,0	104,5	55,4	8,7
ADC-004	8,1	33,6	13,0	5,6
ADC-005	391,3	235,7	96,5	>1000 0
ADC-005	26,3	≈10000	≈10000	77,3

Пример тестирования 2. Осуществление скрининга цитотоксической активности *in vitro* Соединения 1

1.1. Принцип и способ

5 В данном эксперименте содержание АТФ определяли, используя СТГ, для того, чтобы отразить состояние опухолевых клеток при выживании. Сначала, клетки высевали при разных плотностях и культивировали в течение 3 суток и 5 суток, и затем состояние конечной культуры определяли на основе IC_{50} и максимальной степени ингибирования. Затем анализировали уничтожающее действие молекулы

10 токсина в соответствии с данным состоянием.

1.2. Отбор клеточных линий

В соответствии с целью эксперимента, выбирали две модели заболевания рака молочной железы и NSCLC, и затем три клеточных линии опухолевых клеток SKBR3 (HER2+, ATCC, кат. № HTB-30), MDA-MB-468 (HER2-, ATCC, кат. № HTB-132)

15 и A549 (клетки немелкоклеточного рака легкого человека, ATCC, кат. № CCL-185) отбирали для осуществления скрининга.

1.3. Определение состояний клеточных культур

1) Культивирование клеток: клетки A549, SK-BR-3 и MDA-MB-468 культивировали в среде Ham F-12K (Kaighn's) (Gibco, 21127030), среде McCoy 5A

20 (ThermoFisher, кат. № 16600108) и среде Leibovitz L-15 (ThermoFisher, кат. № 11415-114), содержащей 10% FBS (Gibco, 10099-141), соответственно.

2) Посев клеток: клетки A549 расщепляли панкреатином, затем расщепление заканчивали с помощью указанной выше среды. Клетки подсчитывали, и каждую из $4,3 \times 10^5$, $7,2 \times 10^5$ и $11,5 \times 10^5$ клеток добавляли к культуральному раствору с

25 получением конечного объема 26 мл. 180 мкл клеток клеточной суспензии добавляли в каждую лунку вертикальных рядов 2-11 96-луночного планшета (Corning, кат. № 3903) с получением плотностей клеток 3000, 5000 и 8000 на лунку.

Каждую из лунок в вертикальном ряду 12 наполняли 200 мкл культурального раствора, и каждую из оставшихся лунок наполняли PBS. Клетки SKBR3 и MDA-MB-468 подвергали тем же операциям, описанным выше. Каждый образец прогоняли в двухкратной повторности.

5 2) Получение лекарственного средства: маточные растворы положительного контроля – эрибулина и соединения по настоящему раскрытию готовили в ДМСО в 96-луночном круглодонном планшете (Corning, кат.№ 3788). 2 мМ маточный раствор (маточный раствор, разведенный в 10 раз в ДМСО) получали в вертикальном ряду 1 планшета для получения лекарственного средства 1, и затем 10-кратное
10 градиентное разведение в ДМСО проводили в вертикальном ряду 10, и лунки в вертикальном ряду 11 наполняли ДМСО. 95 мкл соответствующего культурального раствора добавляли в каждую лунку вертикального ряда 2 – вертикального ряда 11 планшета для получения лекарственного средства 2, и 5 мкл раствора отбирали пипеткой из вертикального ряда 2 – вертикального ряда 11 планшета для получения
15 лекарственного средства 1 в планшет для получения лекарственного средства 2. Раствор хорошо перемешивали, и 20 мкл раствора отбирали пипеткой и добавляли в высеянные клетки. Затем клетки культивировали в течение 3 суток и 5 суток.

 3) СТГ-анализу (Cell Titer-Glo™, люминесцентный анализ жизнеспособности клеток, Promega): планшеты с клетками вынимали на сутки 3 и сутки 5 и
20 уравнивали до комнатной температуры. 90 мкл СТГ добавляли в каждую лунку, и в смеси реакция протекала при комнатной температуре в течение 10 мин в темноте. Значение поглощения считывали, используя микропланшет-ридер, и рассчитывали IC₅₀.

1.4. Результаты по данным

25

Таблица 2

Соединение	SKBR3		MDA-MB-468		A549	
	IC ₅₀ (нМ)	Максимальная степень ингибирования (%)	IC ₅₀ (нМ)	Максимальная степень ингибирования (%)	IC ₅₀ (нМ)	Максимальная степень ингибирования (%)
Эрибулин	0,7147	94,90	0,4819	87,47	0,6609	81,50
Соединение 1	0,2052	96,87	0,1827	88,01	0,5151	81,34

Пример тестирования 3. Фармакокинетическое исследование Соединения 1

30

1. Обзор

Ненаивных биглей брали в качестве подопытных животных, и концентрации в плазме в разные моменты времени после внутривенного введения биглям соединения D-1 и эрибулина измеряли посредством использования ЖХ/МС/МС. Фармакокинетическую эффективность соединения по настоящему раскрытию у биглей исследовали, и оценивали его фармакокинетический профиль.

2. Протокол тестирования

2.1. Тестируемые соединения

Соединение D-1 и эрибулин

2.2. Подопытные животные

10 Шесть самцов биглей, приобретенных у Shanghai Medicilon Inc., делили на 2 группы, по 3, и подвергали тестированию введения.

2.3. Получение соединения

15 Соединение D-1 взвешивали и растворяли в 5% (об./об.) ДМСО, 20% (об./об.) PG и 20% (об./об.) PEG400, и затем добавляли 55% (об./об.) физиологического раствора с получением 0,25 мг/мл бесцветного и прозрачного раствора.

Эрибулин взвешивали и растворяли в 5% (об./об.) ДМСО, 20% (об./об.) PG и 20% (об./об.) PEG400, и затем добавляли 55% (об./об.) физиологического раствора с получением 0,25 мг/мл бесцветного и прозрачного раствора.

2.4. Введение

20 Биглям в одной группе внутривенно инъецировали соединение D-1 в дозе 0,5 мг/кг и при объеме 2 мл/кг.

Биглям в еще одной группе внутривенно инъецировали эрибулин в дозе 0,5 мг/кг и при объеме 2 мл/кг.

3. Процедуры

25 Биглям инъецировали соединение D-1, и 1 мл крови отбирали перед введением и через 5 мин, 0,25 ч, 0,5 ч, 1,0 ч, 2,0 ч, 4,0 ч, 8,0 ч, 12,0 ч и 24,0 ч после введения. Каждый из отобранных образцов крови помещали в пробирки с антикоагулянтом для забора крови EDTA-K2, и отобранную цельную кровь помещали на лед и центрифугировали в пределах 1 ч для выделения плазмы
30 (центробежная сила: 2200 g, время центрифугирования: 10 мин, 2-8°C). Образцы плазмы хранили в холодильнике при -80°C до тестирования.

Биглям инъецировали эрибулин, и 1 мл крови отбирали перед введением и через 5 мин, 0,25 ч, 0,5 ч, 1,0 ч, 2,0 ч, 4,0 ч, 8,0 ч, 12,0 ч и 24,0 ч после введения. Каждый из отобранных образцов крови помещали в пробирки с антикоагулянтом для
35 забора крови EDTA-K2, и отобранную цельную кровь помещали на лед и центрифугировали в пределах 1 ч для выделения плазмы (центробежная сила: 2200

g, время центрифугирования: 10 мин, 2-8°C). Образцы плазмы хранили в холодильнике при -80°C до тестирования.

Определяли содержание тестируемых соединений в плазме биглей после инъекции: 25 мкл плазмы бигля в каждый момент времени после введения смешивали с 50 мкл (100 нг/мл) раствора внутреннего стандарта – камптотецина (Институт биологических продуктов, Национальные институты по контролю продуктов питания и лекарственных средств) и 200 мкл ацетонитрила. Смесь встряхивали на вортексе в течение 5 мин и центрифугировали в течение 10 мин (3700 об./мин.), и 3-4 мкл супернатанта образца плазмы отбирали для анализа ЖХ/МС/МС (трехкврупольный тандемный масс-спектрометр API4000 (№ 2), Applied Biosystems, США; Shimadzu, система ультравысокоэффективной жидкостной хроматографии LC-30AD, Shimadzu, Япония).

4. Фармакокинетические параметры

Фармакокинетические параметры для соединения по настоящему раскрытию показаны ниже в Таблице 3.

Таблица 3

№	Фармакокинетический эксперимент для биглей					
	Концентрация в плазме	Площадь под кривой	Период полувыведения	Время удерживания	Клиренс	Кажущийся объем распределения
	C5мин (нг/мл)	AUC0-t (нг/мл*ч)	T1/2 (ч)	MRT (ч)	CL (мл/мин/кг)	Vz (мл/кг)
Соединение 1	82,1	433	29,3	41,1	8,9	22039
Эрибулин	217	106	3,5	3,7	78	15556

Пример тестирования 4: Терапевтическое действие ADC-004 на подкожную ксенотрансплантатную опухоль голый мыши, полученную из NCI-N87/16-8 рака желудка человека

1. Цель

Цель заключается в оценке терапевтического действия ADC-004 на подкожную ксенотрансплантатную опухоль голый мыши, полученную из NCI-N87/16-8 рака желудка человека.

2. Тестируемое соединение

ADC-004, разведенный до желательной концентрации физиологическим раствором.

3. Клетки

Клетки рака желудка человека NCI-N87 приобретали у Американской коллекции типовых культур. NCI-N87 подвергали длительной индукции T-DM1 для развития устойчивости к T-DM1 и называли NCI-N87/16-8. Клетки культивировали в чашке Петри, 10 см, со средой RPMI 1640 (Gibco), содержащей 10% фетальную телячью сыворотку, пенициллин и стрептомицин в инкубаторе при 37°C с 5% CO₂. Субкультивирование проводили 2-3 раза в неделю. Когда клетки находились в экспоненциальной фазе роста, их обрабатывали панкреатином, собирали, подсчитывали и инокулировали.

4. Подопытные животные

Мыши BALB/cJGpt-Foxn1^{nu}/Gpt, в возрасте 4х недель, самки, приобретенные у Jiangsu GemPharmatech Co., Ltd. Лицензия на разведение №: SCXK (Jiangsu) 2019-0009; паспортизация животного №.: 202004958. Среда содержания: SPF (от англ. Specific pathogen free - свободные от специфической патогенной микрофлоры).

5. Процедуры тестирования

Каждой голой мыши подкожно инокулировали 1×10^7 клеток NCI-N87/16-8, и после того, как опухоли вырастали до 100-150 мм³, животных разбивали на группы в соответствии с объемом опухоли и массой тела (D0). Мышам внутривенно инъецировали 0,3 мг/мл и 0,6 мг/мл ADC-004 при объеме 10 мл/кг. Объем опухоли и массу тела измеряли два раза в неделю, и результаты записывали.

6. Коэффициенты тестирования

Коэффициент эксперимента предполагал исследование воздействия лекарственного средства на рост опухоли, и удельный коэффициент представлял собой T/C% или ингибирование роста опухоли (TGI%).

Диаметры опухоли измеряли два раза в неделю с помощью штангенциркуля, и объем опухоли (V) рассчитывали в соответствии со следующей формулой:

$V = 1/2 \times a \times b^2$, где a и b представляют длину и ширину, соответственно.

$T/C (\%) = (T - T_0)/(C - C_0) \times 100$, где T и C представляют объемы опухоли животных в конце эксперимента; T₀ и C₀ представляют объемы опухолей животных в начале эксперимента.

Ингибирование роста опухоли, % (TGI%) = 100 – T/C (%).

Когда опухоль начинала регрессировать, ингибирование роста опухоли, % (TGI%) = 100 – (T – T₀)/T₀ × 100.

Если объем опухоли сокращается, по сравнению с исходным объемом, то есть $T < T_0$ или $C < C_0$, это определяют как частичный регресс (PR – от англ. partial regression) опухоли; если опухоль полностью исчезает, это определяется как полный регресс (CR – от англ. complete regression) опухоли.

5 В конце эксперимента, в конечной точке эксперимента, или когда средний объем опухоли в группе растворителя достигал 1500 мм^3 , животных умерщвляли посредством CO_2 -анестезии и вскрывали с получением опухолей. Опухоли фотографировали.

7. Статистический анализ

10 Если не указано иное, сравнение объемов опухолей двух групп проводили посредством двустороннего t-критерия Стьюдента, с $P < 0,05$, определяемым как статистически значимое различие.

8. Результаты

15 В сутки 22 после однократного введения доз 3 мг/кг и 6 мг/кг, ADC-004 мог ингибировать рост клеток NCI-N87/16-8 в модели подкожной ксенотрансплантатной опухоли голый мыши, и степени ингибирования опухоли составляли 46,77% и 90,18%, соответственно ($P < 0,01$, в сравнении с контролем PBS). Мыши, несущие опухоль, могли хорошо выдерживать ADC-004, и симптомы, такие как потеря массы, не были обнаружены.

20 9. Заключение

ADC-004 может эффективно ингибировать рост клеток рака желудка человека NCI-N87/16-8 в модели подкожной ксенотрансплантатной опухоли голый мыши, и мыши, несущие опухоль, могли хорошо переносить ADC-004.

25 **Пример тестирования 5: Терапевтическое действие ADC-004 на подкожную ксенотрансплантатную опухоль голый мыши JIMT-1**

1. Тестируемое соединение

ADC-004, разведенный до желательной концентрации посредством PBS.

2. Клетки

30 Клетки рака молочной железы человека JIMT-1.

4. Подопытные животные

Самки голых мышей Balb/c

5. Процедуры тестирования

35 Каждой голый мыши BALB/c в правую часть спины подкожно инокулировали клетки JIMT1, 5×10^5 клеток JIMT1. Когда объем опухоли достигал $80\text{-}100 \text{ мм}^3$,

мышей случайным образом делили на группы из 6 в соответствии с объемом опухоли и массой тела, и введение начинали в сутки распределения по группам.

HRA00092-C063-004 разводили до 0,6 мг/мл PBS и внутривенно инъецировали в объеме 10 мл/кг, и мышам в контрольной группе внутривенно
5 инъецировали PBS в том же объеме.

Размеры опухолей по длинной оси и по короткой оси измеряли два раза в неделю посредством штангенциркуля, и также измеряли массу тела мышей.

Объем опухоли (V) рассчитывали в соответствии со следующей формулой:

$V = 1/2 \times a \times b^2$, где a и b представляют длину и ширину, соответственно.

10 $T/C (\%) = (T - T_0)/(C - C_0) \times 100$, где T и C представляют объемы опухоли животных в конце эксперимента; T_0 и C_0 представляют объемы опухоли животных в начале эксперимента.

Ингибирование роста опухоли, % (TGI%) = $100 - T/C (\%)$.

15 Если не указано иное, сравнение объемов опухоли двух данных групп проводили посредством двустороннего t-критерия Стьюдента, с $P < 0,05$, определяемым как статистически значимое различие.

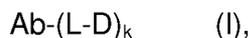
6. Результаты

20 В сутки 24 после однократного введения ADC-004 мог значимо ингибировать рост клеток JIMIT-1 в модели внутриклеточной ксенотрансплантатной опухоли голый мыши, и степень ингибирования опухоли составляла 121,3%, и регресс опухоли обнаруживали у 5 мышей ($< 50 \text{ мм}^3$). Мыши, несущие опухоль, могли хорошо переносить ADC-004, и симптомы, такие как потеря массы, не были обнаружены.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат антитело-лекарственное средство, имеющий структуру формулы (I):

5

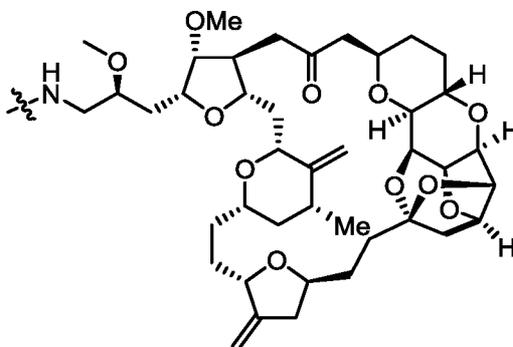


или его фармацевтически приемлемая соль или сольват;

где Ab представляет собой антитело против HER2 или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающийся с доменом II HER2,

10 L представляет собой линкер, ковалентно связывающий Ab с D, и k равно от 1 до 20;

- D показано ниже в виде следующей формулы:



15 2. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 1, в котором k выбран из группы, состоящей из 1-10 и может представлять собой целое число или десятичное число.

3. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 1 или п. 2, в котором линкер содержит расщепляемую пептидную группировку.

20

4. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 3, в котором расщепляемая пептидная группировка может расщепляться ферментом, предпочтительно может расщепляться катепсином, и, кроме того, катепсин предпочтительно представляет собой катепсин В.

25

5. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 3 или п. 4, в котором линкер содержит аминокислотное звено, при этом указанное аминокислотное звено предпочтительно содержит пептидный остаток, состоящий из 2-7 аминокислот, выбранных из группы, состоящей из фенилаланина, глицина, валина, лизина, цитруллина, серина, глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты, и более

30

предпочтительно валина-цитруллина (Val-Cit), аланина-алинина-аспарагина (Ala-Ala-Asn), глицина-глицина-лизина (Gly-Gly-lys), валина-лизина (Val-lys), валина-аланина (Val-Ala), валина-фенилаланина (Val-Phe) и глицина-глицина-фенилаланина-глицина (Gly-Gly-Phe-Gly) (SEQ ID NO: 7).

5

6. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 1 или п. 2, в котором линкер содержит расщепляемую сульфонамидную группировку.

7. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из п.п. 1-3, в котором линкер содержит расщепляемую дисульфидную группировку.

10

8. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 6 или п. 7, в котором линкер может расщепляться в восстанавливающих условиях.

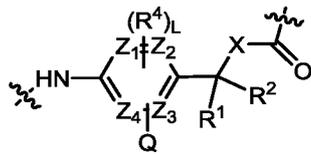
9. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из п.п. 1-8, в котором линкер содержит спейсерное звено, связывающееся с D.

15

10. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 9, в котором спейсерное звено содержит пара-аминобензилоксикарбонил (pAB).

20

11. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 9, в котором спейсерное



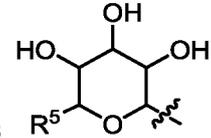
звено содержит

где Z_1 - Z_4 возможно выбраны из группы, состоящей из атома углерода и атома азота; R^4 выбран из группы, состоящей из алкила, циклоалкила, арила и гетероарила, при этом каждый из алкила, циклоалкила, арила и гетероарила независимо возможно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из алкила, алкокси, галогена, амино, циано, нитро, гидроксигидроксиалкила, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила и гетероарила; каждый из R^1 и R^2 независимо выбран из группы, состоящей из атома водорода, C_{1-6} алкила, галогеналкила и C_{3-6} циклоалкила, предпочтительно, атома водорода; или R^1 и R^2 , вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют C_{3-6} циклоалкил; X выбран из группы, состоящей из -O- и -NH-; L выбран из группы, состоящей из целых чисел от 1 до 4;

25

30

Q представляет собой V-E, при этом V-E дает гликозидную связь, расщепляемую под действием внутриклеточно расположенной гликозидазы, и E выбран из группы, состоящей из -O-, -S- и -NR³-, где R³ выбран из группы,



состоящей из атома водорода и метила; кроме того, V выбран из R⁵ выбран из группы, состоящей из -COOH и CH₂OH.

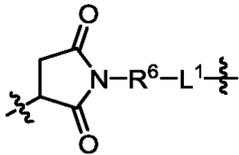
12. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из п.п. 1-11, где L-D представляет собой химическую группировку, представленную формулой ниже:

-Str- (Per)-Sp-D, где Str представляет собой вставочное звено, ковалентно связывающееся с Ab,

Sp представляет собой спейсерное звено, и

Per выбран из группы, состоящей из аминокислотных звеньев.

13. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 12, в котором Str выбран из химической группировки, представленной следующей указанной ниже формулой:



, где R⁶ выбран из группы, состоящей из -W-C(O)-, -C(O)-W-C(O)-, -(CH₂CH₂O)_{p1}C(O)-, -(CH₂CH₂O)_{p1}CH₂C(O)-, и -(CH₂CH₂O)_{p1}CH₂CH₂C(O)-, где W выбран из группы, состоящей из C₁₋₈ алкилена, C₁₋₈ алкилен-циклоалкила и линейного гетероалкилена с 1 - 8 атомами, при этом указанный гетероалкилен содержит от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из N, O и S, где каждый из C₁₋₈ алкилена, C₁₋₈ алкилен-циклоалкила и линейного гетероалкилена независимо возможно дополнительно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксигруппы, циано, амина, алкила, хлоралкила, алкокси и циклоалкила;

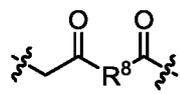
L¹ выбран из группы, состоящей из -NR⁷(CH₂CH₂O)_{p1}CH₂CH₂C(O)-, -NR⁷(CH₂CH₂O)_{p1}CH₂C(O)-, -S(CH₂)_{p1}C(O)-, -(CH₂)_{p1}C(O)- и химической связи, где p1 представляет собой целое число от 1 до 20, и L¹ предпочтительно представляет собой химическую связь; p1 представляет собой целое число от 1 до 20, и R⁷ выбран из группы, состоящей из атома водорода, алкила, галогеналкила и гидроксилалкила.

14. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 13, в котором R⁶ выбран из группы, состоящей из C₁₋₆ алкиленC(O)-, -(CH₂-CH₂O)₂C(O)-, -(CH₂-CH₂O)₂CH₂C(O)-, -(CH₂-CH₂O)₂CH₂CH₂C(O)-, -(CH₂-CH₂O)₃C(O)-, и -(CH₂-CH₂O)₄C(O)-.

5

15. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 13 или п. 14, в котором линкер L содержит: малеимид-(PEG)₂-Val-Cit, малеимид-(PEG)₆-Val-Cit, малеимид-(PEG)₈-Val-Cit, малеимид-(PEG)₄-CH₂CH₂C(O)-Val-lys, малеимид-(CH₂)₅-Val-Cit, малеимид-(CH₂)₅-Val-lys, малеимид-(CH₂)₅-Gly-Gly-Phe-Gly, малеимид-(PEG)₂-Ala-Ala-Asn, малеимид-(PEG)₆-Ala-Ala-Asn, малеимид-(PEG)₈-Ala-Ala-Asn, малеимид-(PEG)₄-триазол-(PEG)₃-сульфонамид, малеимид-(PEG)₂-CH₂CH₂C(O)-Val-lys, малеимид-(PEG)₄-триазол-(PEG)₃-сульфонамид, или Mal-(PEG)₄-триазол-(PEG)₃-disulfide.

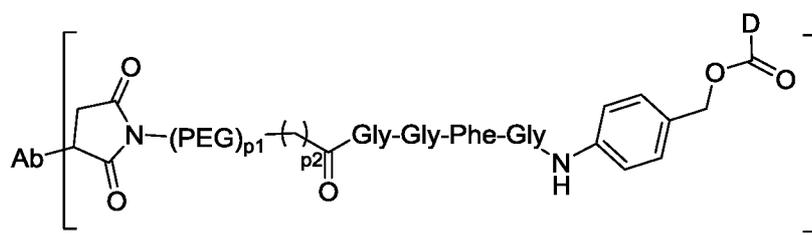
16. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 12, в котором Str выбран из химической группировки, представленной указанной ниже формулой:



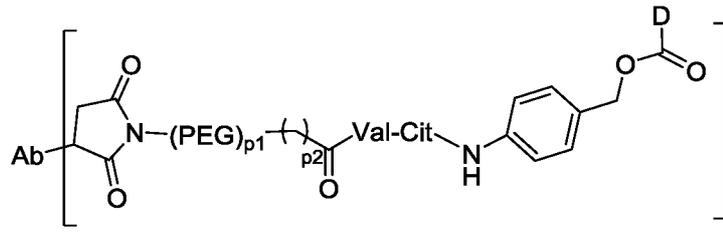
, где R⁸ выбран из группы, состоящей из C₁₋₁₀ алкилена, C₂₋₁₀ алкенилена, (C₁₋₁₀ алкилен)O-, N(R^d)-(C₂₋₆ алкилен)-N(R^d), и N(R^d)-(C₂₋₆ алкилен); где каждый R^d независимо представляет собой H или C₁₋₆ алкил.

20

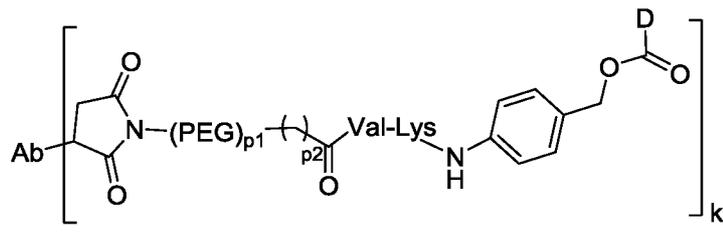
17. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из п.п. 1-15, где указанный конъюгат антитело-лекарственное средство представлен указанными ниже формулами:



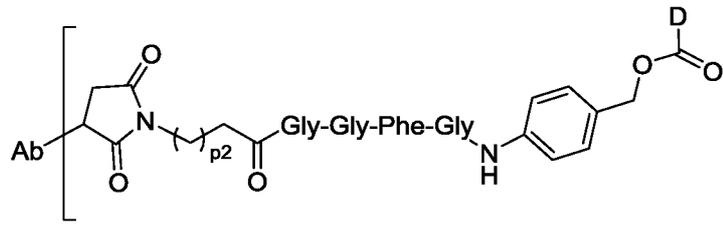
25 группы, состоящей из 1 - 10, и может представлять собой целое число или десятичное число; p₁ выбран из группы, состоящей из 2, 4, 6 и 8; p₂ выбран из группы, состоящей из 0, 1 и 2;



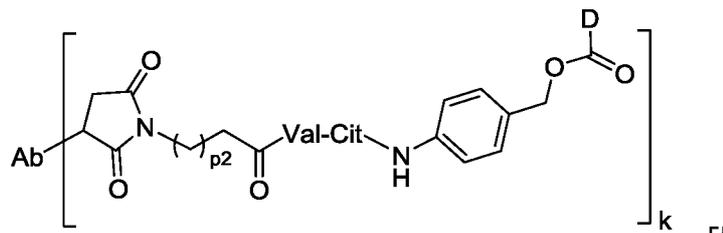
где k выбран из группы, состоящей из 1 - 10, и может представлять собой целое число или десятичное число; p_1 выбран из группы, состоящей из 2, 4, 6 и 8; p_2 выбран из группы, состоящей из 0, 1 и 2;



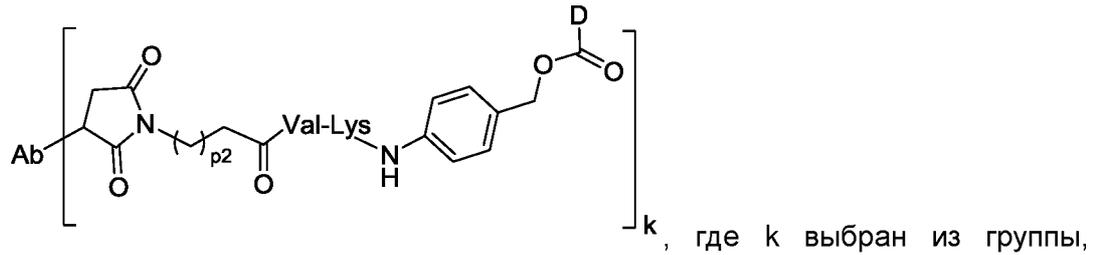
5 где k выбран из группы, состоящей из 1 - 10, и может представлять собой целое число или десятичное число; p_1 выбран из группы, состоящей из 2, 4, 6 и 8; p_2 выбран из группы, состоящей из 0, 1 и 2;



10 где k выбран из группы, состоящей из 1 - 10, и может представлять собой целое число или десятичное число; p_2 выбран из группы, состоящей из целых чисел от 1 до 6;



где k выбран из группы, состоящей из 1 - 10, и может представлять собой целое число или десятичное число; p_2 выбран из группы, состоящей из целых чисел от 1 до 6;



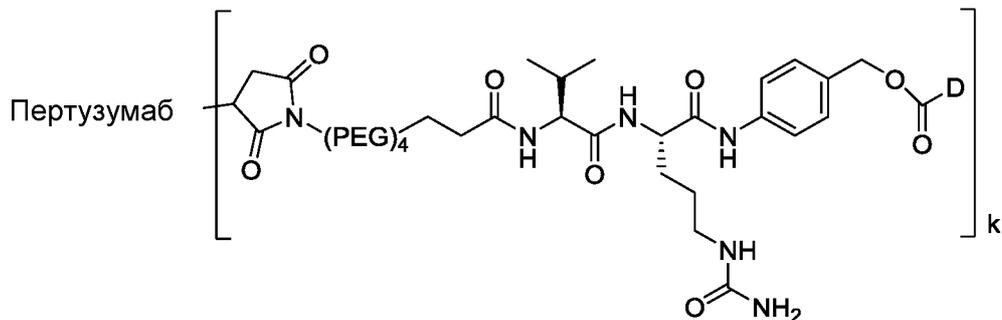
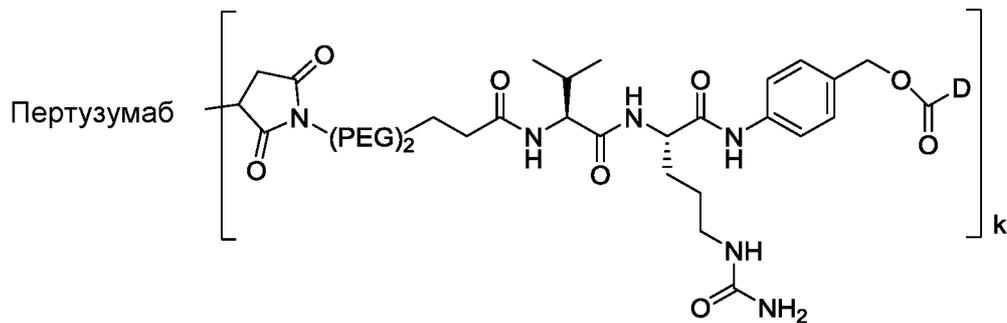
состоящей из 1 – 10, и может представлять собой целое число или десятичное число; p2 выбран из группы, состоящей из целых чисел от 1 до 6.

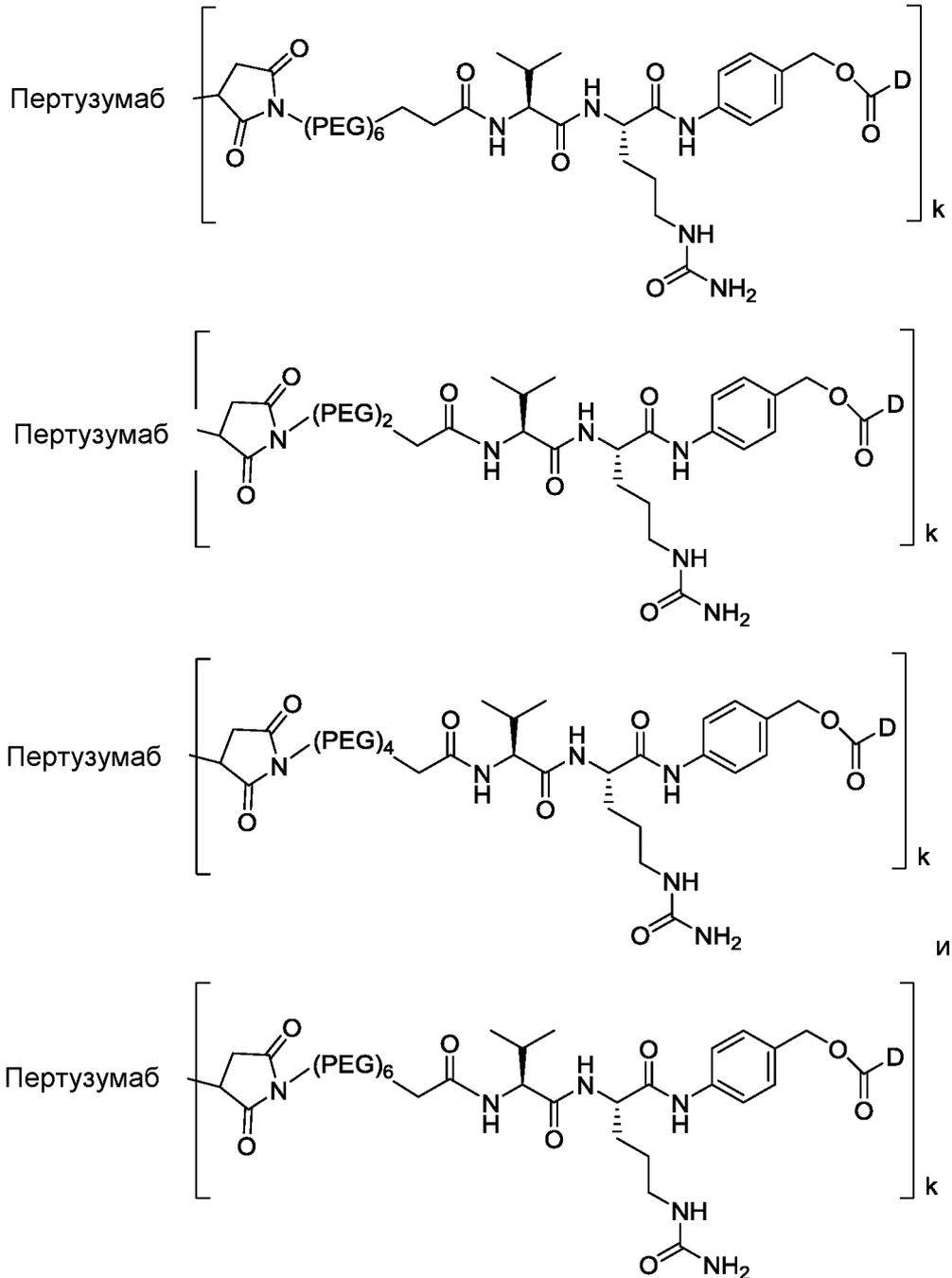
Ab и D являются такими, как определено в п. 1.

5

18. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из п.п. 1-17, в котором антитело против HER2 содержит вариабельную область легкой цепи и вариабельную область тяжелой цепи, имеющие аминокислотные последовательности, изложенные в SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно, и предпочтительно антитело против HER2 содержит легкую цепь и тяжелую цепь, имеющие аминокислотные последовательности, изложенные в SEQ ID NO: 3 и 4, соответственно.

19. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из п.п. 1-18, где конъюгат антитело-лекарственное средство представлен следующими указанными ниже формулами:





5 где k выбран из группы, состоящей из 1 – 10, и может представлять собой целое число или десятичное число.

20. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из п.п. 1-19, в котором k выбран из группы, состоящей из 2,0 - 2,5, 2,5-3,5 и 3,5-5,0.

10

21. Изотопно замещенная форма конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из п.п. 1-20, где предпочтительно изотопное замещение представляет собой замещение атомом дейтерия.

22. Фармацевтическая композиция, содержащая:

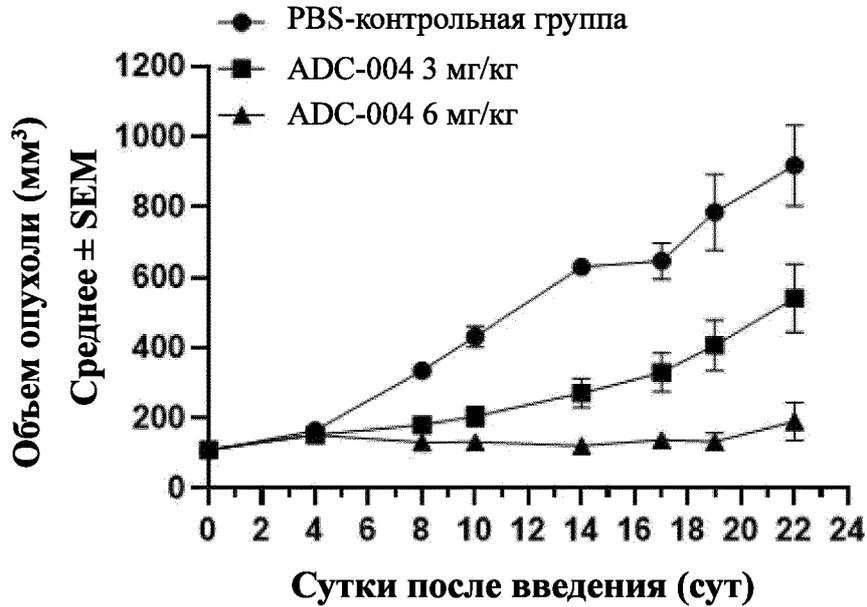
терапевтически эффективное количество конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из п.п. 1-20 или изотопно замещенной формы по п. 21, и

5 фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

23. Применение конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из п.п. 1-20 или изотопно замещенной формы по п. 21 или фармацевтической композиции по п. 22 в получении лекарственного средства для лечения или предупреждения опухоли.

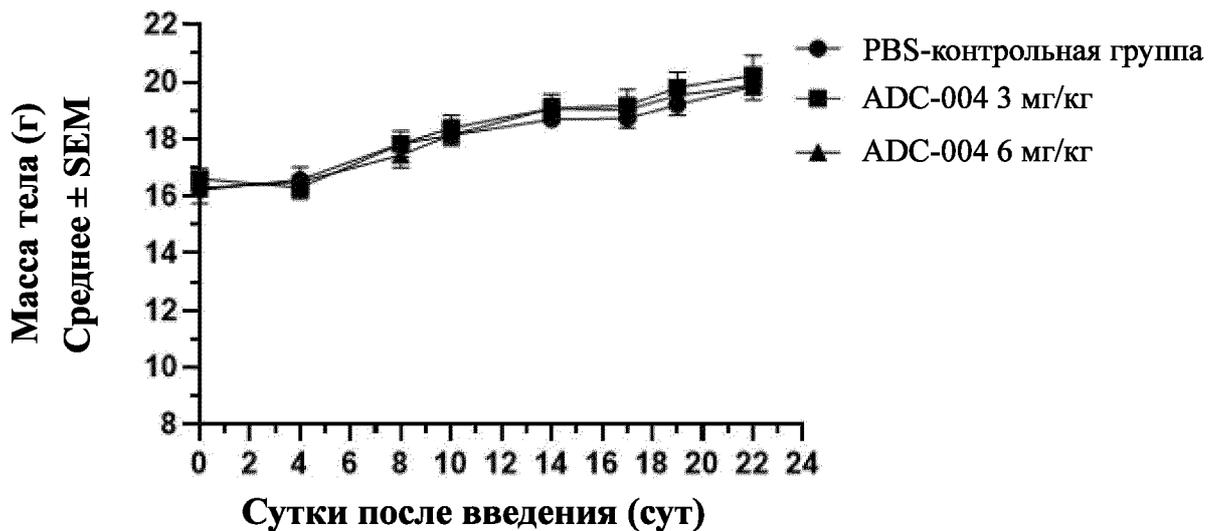
24. Применение по п. 23, в котором опухоль представляет собой рак, ассоциированный с экспрессией домена II HER2, и данный рак предпочтительно представляет собой рак молочной железы, рак яичника, рак шейки матки, рак матки, рак предстательной железы, рак почки, рак мочевыводящих путей, рак мочевого пузыря, рак печени, рак желудка, рак эндометрия, карциному слюнной железы, рак пищевода, меланому, нейроглиому, нейробластому, саркому, рак легкого, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак толстой и прямой кишки, лейкоз, рак кости, рак кожи, рак щитовидной железы, рак поджелудочной железы и лимфому.

**Модель подкожной ксенотрансплантатной
опухоли N87/16-8 – объем опухоли**



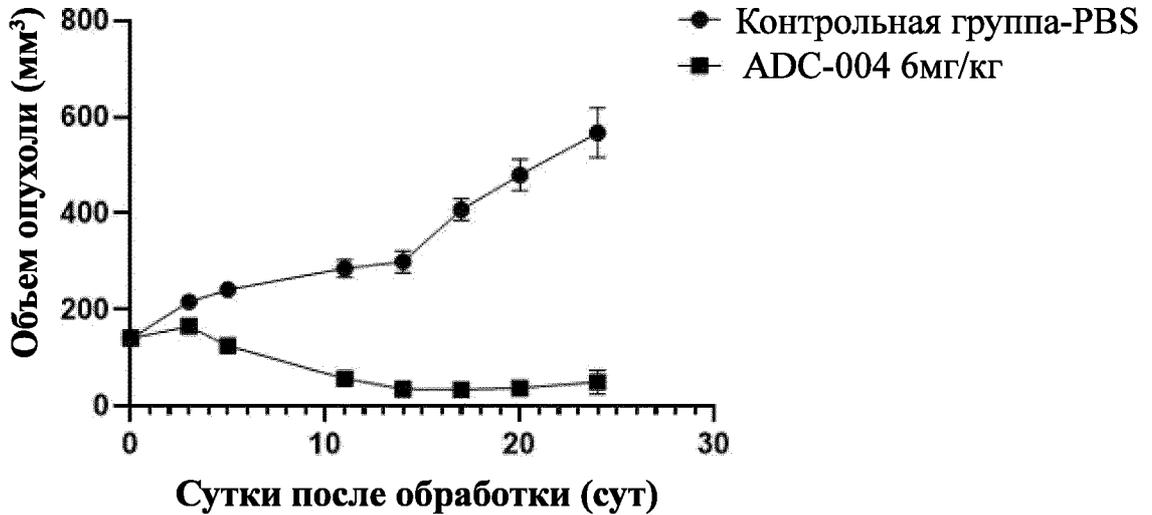
ФИГ. 1

**Модель подкожной ксенотрансплантатной
опухоли N87/16-8 – масса тела мыши**



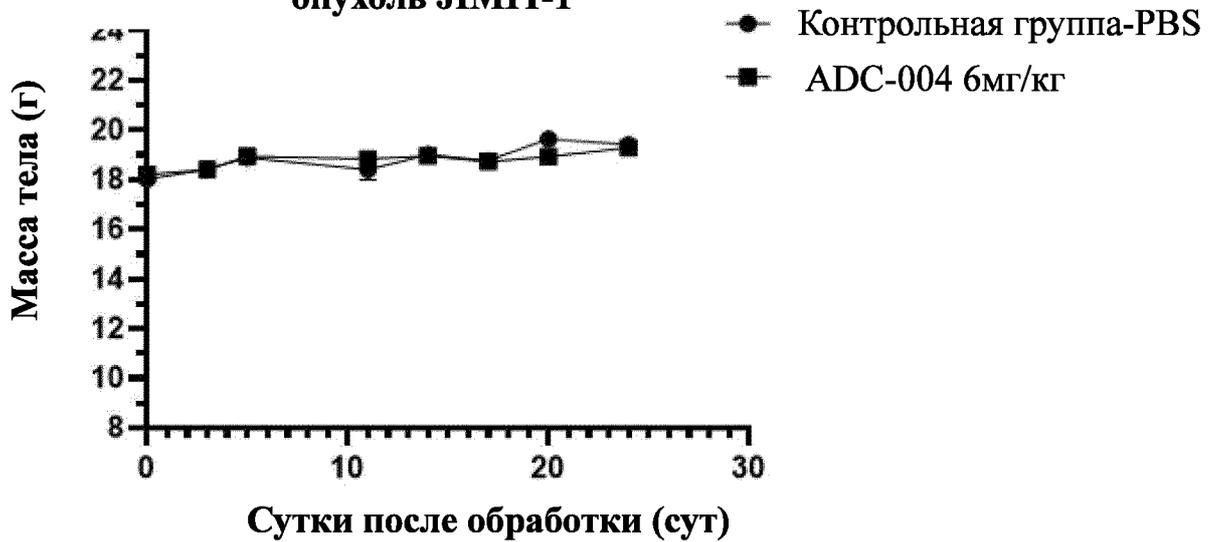
ФИГ. 2

**Объем опухоли подкожной ксенотрансплантатной
опухоль JIMT-1**



ФИГ. 3

**Масса тела мыши, несущей подкожную
ксенотрансплантатную
опухоль JIMT-1**



ФИГ. 4