

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490378 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.07.11

(51) Int. Cl. *A61K 47/64* (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.09.30

(54) БЕЛКОВЫЕ КОНЬЮГАТЫ

(31) 202121044592

(32) 2021.10.01

(33) IN

(86) PCT/IB2022/059340

(87) WO 2023/053082 2023.04.06

(71) Заявитель:
ЮНИЧЕМ ЛАБОРАТОРИЕС
ЛИМИТЕД (IN)

(72) Изобретатель:
Сазе Джананжей, Ияппан
Сараванакумар, Бакши Гаутам,
Патил Ганеш (IN)

(74) Представитель:
Сагитов В.Р. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к конъюгатам белок-лекарственное средство. Настоящее изобретение конкретно относится к конъюгатам белок-лекарственное средство, где белок представляет собой белок лектин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1; или белок лектин, имеющий по меньшей мере 70% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 1. Настоящее изобретение также относится к способу и композиции конъюгатов белок-лекарственное средство и способу их применения.

A1

202490378

202490378

A1

БЕЛКОВЫЕ КОНЬЮГАТЫ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к конъюгатам белок-лекарственное вещество, а более конкретно, изобретение относится к конъюгатам лектиновых белков и цитотоксических агентов или терапевтических агентов, к процессу их получения и их использованию в лечении злокачественных опухолей.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Успехи в системной терапии злокачественной опухоли, включая химиотерапию, гормональную терапию, таргетную терапию и иммунотерапию, привели к улучшению показателей смертности, связанной со злокачественными опухолями. Хотя такие успехи пока привели к улучшениями не при всех типах злокачественных опухолей, варианты системной терапии улучшили общую выживаемость как при терапии в сочетании со вспомогательными веществами, так и при терапии метастатических форм многих злокачественных опухолей. Из-за давления как можно скорее сделать доступной терапию побочные эффекты системной терапии, особенно долгосрочные побочные эффекты, остаются не очень хорошо охарактеризованными и понятыми. Все чаще некоторые виды злокачественных опухолей требуют длительной и даже пожизненной системной терапии. Поскольку число случаев злокачественных опухолей в мире в следующие несколько десятилетий будет расти, и все больше людей будут жить со злокачественными образованиями, важно понимать потенциальные побочные эффекты новых вариантов системной терапии.

Стандартные препараты для химиотерапии были первыми препаратами в арсенале средств борьбы со злокачественными опухолями. Сегодня к ним относятся, в частности, такие категории, как алкилирующие препараты (например, темозоломид, цисплатин, оксалиплатин), антиметаболиты (например, метотрексат, цитарабин, фторурацил, капецитабин), противоопухолевые антибиотики (например, доксорубицин, эпирубицин, блеомицин), ингибиторы топоизомеразы (например, этопозид, иринотекан) и стабилизаторы микротрубочек (например, паклитаксел, доцетаксел). Как правило, эти препараты не являются опухолеспецифичными, а их применение часто приводит к значительным токсическим эффектам в отношении доброкачественных тканей. Успех этих препаратов в основном определяется их дифференциальной токсичностью в отношении злокачественных клеток, которые

обычно имеют высокую скорость митоза и повышенную зависимость от непрерывного поступления биологических молекул для роста в сравнении с нормальными доброкачественными тканями. К современным и будущим задачам относятся установление надлежащих доз цитотоксических агентов (а также других компонентов мультимодальных схем лечения злокачественных опухолей), чтобы добиться максимальной терапевтической эффективности и при этом ограничить острые и долговременные побочные эффекты.

Таргетная терапия или иммунотерапия предлагают значительные преимущества в обеспечении гораздо более клеточноспецифического ингибирования роста или цитотоксических эффектов. Более того, эти препараты не вызывают проявления острой токсичности в виде миелосупрессии, тошноты и рвоты, которыми сопровождается применение многих стандартных цитотоксических препаратов ненаправленного действия. Как описано ниже, некоторые новые таргетные препараты показали высокую эффективность в лечении злокачественных опухолей и уже позволили добиться впечатляющих улучшений выживаемости при определенных видах злокачественных опухолей. Примерами таргетных препаратов являются ингибитор тирозинкиназы (ИТК) иматиниб и моноклональные антитела, такие как трастузумаб, бевацизумаб, панитумумаб и цетуксимаб. К таргетной терапии также относятся конъюгаты антитело-лекарственное вещество, представляющие собой новых класс биологических препаратов, в которых противоопухолевый агент или другой терапевтический агент присоединяются к антителу с помощью линкера. К числу одобренных FDA конъюгатов антитело-лекарственное вещество относятся гемтузумаб озогамидин, брентуксимаб ведотин, трастузумаб эмтанзин, инотузумаб озогамидин, моксетумомаб пасудотокс, полатузумаб ведотин рiiq, энфортумаб ведотин, трастузумаб дерукстекан, сацитузумаб говитекан и белантамаб мафодотин.

На сегодняшний день антитела показали себя как эффективные терапевтические средства. Эти терапевтические средства на основе антител применяются во многом так же, как и низкомолекулярные химиотерапевтические препараты для инъекций.

Дополнительные примеры успешного применения антител в лечении злокачественных опухолей дает радиоиммунотерапия. К сожалению, несмотря на успешное применение препаратов на основе антител для доставки радиоактивных элементов, таких как зевалин и бексар, эти препараты на основе антител обладают серьезными недостатками. Например, оба они представляют собой целые молекулы IgG, которые продолжают циркулировать не один день; в течение всего этого периода

они проходят через очень чувствительный к радиации костный мозг, и токсичность в отношении костного мозга ограничивает дозу, которую могут переносить пациенты.

Лектины — это белки или гликопротеины, представляющие собой важную группу биологически-активных белков, встречающихся в природе. Лектины используют в качестве инструментов диагностики и в лечебных целях в разных областях здравоохранения. Лектины также используют при очистке гликопротеинов, анализе олигосахаридов и в процессах клеточного отбора. Лектины могут связываться с моно-, ди- и олигосахаридами сахарного компонента, присутствующего в полисахаридах, гликопротеинах или гликолипидах. Лектины являются специфичными к различным моносахаридам или гликанам и поэтому обладают огромным потенциалом в области медицинских анализов. Показано, что клетки злокачественных опухолей экспрессируют и/или секретируют различные гликолевые конъюгаты с aberrантной гликановой структурой. Благодаря своей специфичности к сахарам в отношении конкретной связи лектины способны дифференцировать изменения в гликановых структурах злокачественной клетки от их доброкачественных аналогов, что позволяет использовать их в диагностике и лечении злокачественных опухолей.

В области конъюгатов белок-лекарственное вещество имеется совсем немного исследований, посвященных конъюгатам лектин-лекарственное вещество для лечения злокачественных опухолей. В патентах US9504756 и US6214345 описаны конъюгаты антитело-лекарственное вещество, а лектин описан как альтернативная лигандная группа для направленной доставки цитотоксических агентов для лечения злокачественных опухолей.

В индийской заявке 1265/MUM/2004 явным образом описан конъюгат лекарственного средства или противоопухолевого соединения, в котором лектин, получаемый из грибковой культуры *Sclerotium rolfsii* (SR, *S. rolfsii*) и *Rhizoctonia bataticola* (RB), используется в качестве носителя или конъюгирующего белка для транспортировки противоопухолевого препарата к клетке-мишени.

Конъюгаты лектинов, в которых лектины выполняют функцию носителя или поиска мишени, для направленной доставки цитотоксических препаратов, а также методы их получения описаны в KR100638706B1, US7015313B2, US7045300B2 и US20060251580A1.

Изучается лектин растительного происхождения на предмет направленного действия в области конъюгатов лекарственного средства. Агглютинин из зародышей пшеницы — растительный лектин, — конъюгированный с доксорубицином через кислото-

неустойчивый цис-аконитильный линкер для доставки пролекарства доксорубицина к колоноцитам человека изучали Michael Wirth с соавт. (Michael Wirth *et al*, *Pharmaceutical research*, Vol 15, No. 7, 1998). Gunjan с соавт. изучали специфическое взаимодействие лектина из растений семейства бобовых, такого как арахисовый агглютинин и конканавалин с фикоцианином для применения в фотодинамической терапии. Арахисовый агглютинин и конканавалин, конъюгированные с фикоцианином посредством химического линкера, такого как SPDP, изучались в качестве эффективного средства доставки препарата. (Gunjan Pandey *et al*., *Photochemistry and Photobiology*, 85: 1126-1133, 2009). Daichi Kitaguchi с соавт. изучали аффинность связывания rBC2LCN, лектина, выделяемого из *Burkholderia*, который связывает гликаны на поверхности клеток при злокачественных новообразованиях толстой кишки, в качестве эффективного средства доставки экзотоксина синегнойной палочки (PE38) для лечения злокачественных опухолей. Это исследование также демонстрирует терапевтическую эффективность и токсичность конъюгата rBC2LCN-PE38 в мышинных моделях ксенотрансплантата злокачественных новообразований толстой кишки (Daichi Kitaguchi *et al* *Cancer Science*.;111:4548–4557.2020)

В случае конъюгатов антитело-лекарственное вещество лишь очень малая часть препарата проникает в клетку, так как на поверхности клеток число антигенов ниже, и только одно антитело взаимодействует с антигеном. Поэтому конъюгаты антитело-лекарственное вещество требуют приема нескольких доз для достижения хорошего терапевтического эффекта, что приводит к чрезмерному воздействию. Кроме того, хотя в приведенных выше работах описаны конъюгаты лектинов, коммерчески доступных конъюгатов подобного рода в настоящее время не существует. Лектины очень специфичны к гликанам, присутствующим на неопластических тканях, и являются потенциально лучшими терапевтическими лигандами в сравнении с моноклональными антителами ввиду их доступной стоимости, сниженной токсичности и менее выраженных побочных эффектов. Нужны усовершенствованные методы лечения злокачественных опухолей, доступные по цене.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В одном воплощении настоящее изобретение предлагает высокоэффективный продукт для лечения злокачественных опухолей. В одном воплощении предлагается

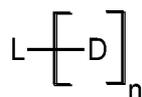
конъюгат рекомбинантный лектин-лекарственное вещество, в котором рекомбинантный лектин получают из лектина *Sclerotium rolfisii* (SRL).

Также предлагается метод лечения или профилактики злокачественных опухолей у субъекта, нуждающегося в таковых, при этом метод включает в себя использование терапевтически эффективного количества конъюгата рекомбинантный лектин-лекарственное вещество.

В одном воплощении предлагается использовать конъюгат рекомбинантный лектин-лекарственное вещество в качестве нового терапевтического агента для лечения или профилактики злокачественных опухолей, в котором рекомбинантный лектин получают из лектина *Sclerotium rolfisii*.

В одном воплощении предлагается состав, в который входит конъюгат рекомбинантный лектин-лекарственное вещество для лечения или профилактики злокачественных опухолей.

Согласно одному из аспектов настоящего изобретения предложено соединение по формуле I:



Формула I

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой n равно от 1 до 9;

L — рекомбинантный лектин, получаемый из *S. rolfisii*;

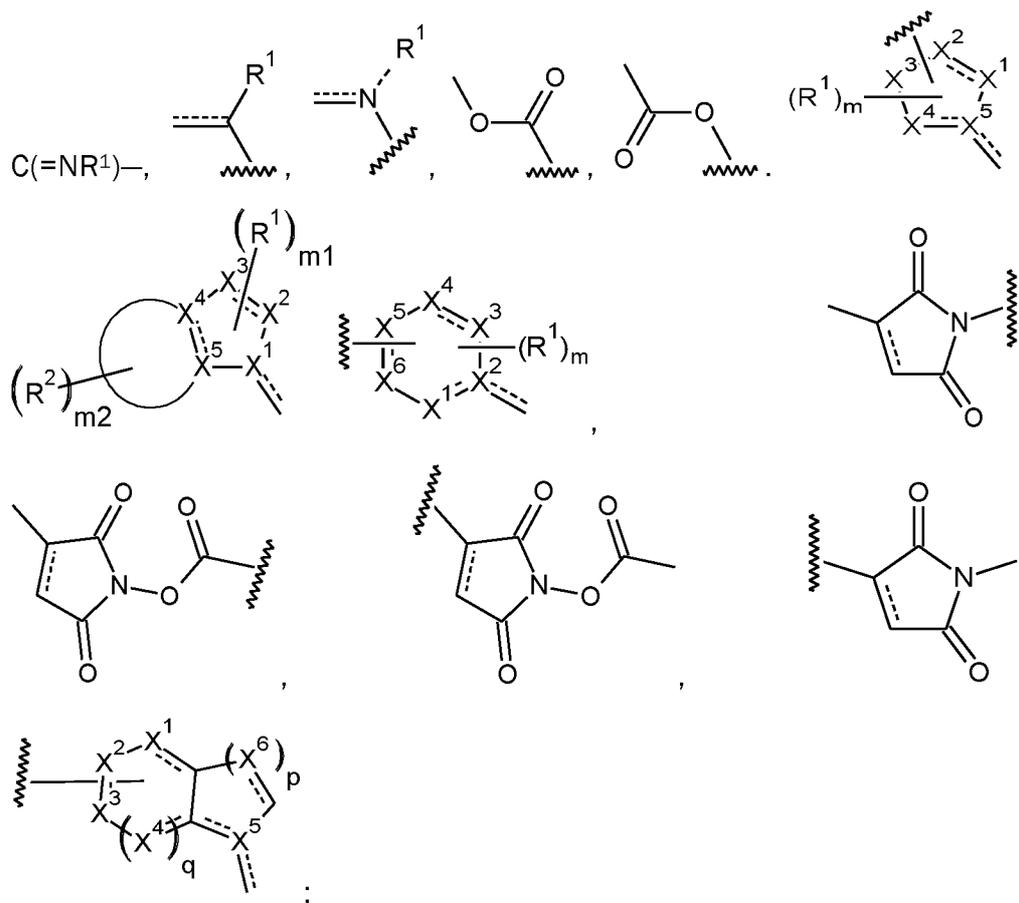
D выбирается из группы, состоящей из цитотоксического агента, терапевтического агента или соединения, содержащего цитотоксический агент или терапевтический агент;

в которой каждое D конъюгировано L через один из следующих элементов;

- a) ковалентную связь, или
- b) группу по формуле «—A¹-A²-A³—»;

в которой концевая связь A¹ и A³ соединена с L и D соответственно; и в которой A¹ и A³ независимо выбираются из:

—CR¹R²—, —C(O)—, —C(O)NR¹—, —NR¹C(O)—, —NR¹—, —O—, —S—, —S(O)—, —S(O)₂—, —R¹C=CR²—, —C≡C—, —R¹C=CR²-R³C=CR⁴—, —R¹C=C=CR²—, —



где

m , m_1 и m_2 независимо равны 0, 1, 2, 3 или 4; p – 1 или 2, а q – 0 или 1;

«» указывает место присоединения A^2 к A^1 или A^3 ;

«» указывает на одинарную или двойную связь;

«» указывает на 5–10-членное кольцо, включая атомы кольца, с которым оно сочленено, причем 5–10-членное кольцо представляет собой ароматическое, неароматическое или циклоалкильное кольцо или гетероароматическое или гетероциклоалкильное кольцо, причем гетероароматическое или гетероциклоалкильное кольцо содержит по меньшей мере один гетероатом, выбираемый из N, O или S;

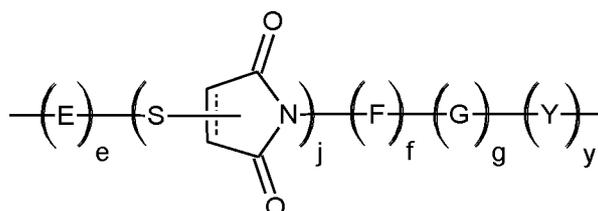
каждое из X^1 , X^2 , X^3 , X^4 , X^5 и X^6 независимо выбирается из C, CH, CH_2 , NH, O или S; и

R^1 , R^2 , R^3 и R^4 независимо выбираются из водорода, C_1 – C_5 -алкила, C_2 – C_5 -алкенила, C_2 – C_5 -алкинила, C_1 – C_5 -алкилена, C_3 – C_{10} -циклоалкила, C_2 –

C₉-гетероциклоалкила, C₆–C₁₀-арила, C₂–C₉-гетероарила, -OR⁵, -NR⁵ -SR⁵, галогена, которым может быть фтор, хлор, бром или йод, и -C(O)OR⁵, C₁–C₅-алкил, C₂–C₅-алкенил, C₂–C₅-алкинил, C₁–C₅-алкилен, C₃–C₁₀-циклоалкил, C₂–C₉-гетероциклоалкил, C₆–C₁₀-арил и C₂–C₉-гетероарил являются незамещенными, или каждый дополнительно имеет заместитель R⁶, и

R⁵ и R⁶ каждый независимо представляют собой водород, C₁–C₃-алкил, OH или галоген;

где A² соответствует формуле:



в которой

e, j, f, g и y независимо равны 0 или 1, при условии, что e, f и y не равны 0 одновременно,

S – атом серы,

E, F и Y – спейсер, а

G – аминокислота или пептидная цепь, содержащая 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислот;

и где A¹ образует связь с E или S или F, а A³ соединено с Y или G.

Согласно другому аспекту изобретения предложено соединение по формуле II:



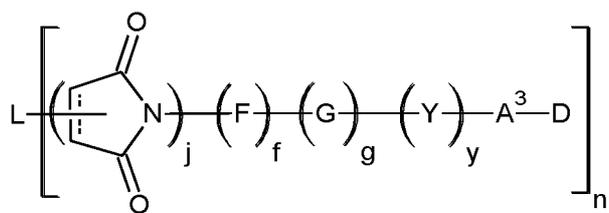
Формула II

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой

L – рекомбинантный лектин, получаемый из *S. rolfsii*;

D выбирается из группы, состоящей из цитотоксического агента, терапевтического агента или соединения, содержащего цитотоксический агент или терапевтический агент

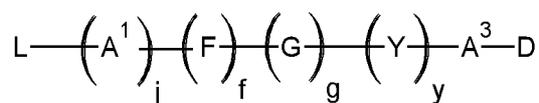
Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложено соединение по формуле III:



Формула III

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой L, F, G, Y, A³, D, n, j, f, g и y соответствуют приведенным выше определениям.

Согласно одному из аспектов настоящего изобретения предложено соединение по формуле IV:



Формула IV

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой L, A¹, F, G, Y, A³, D, j, f, g и y соответствуют приведенным выше определениям.

В соответствии с предыдущими аспектами, рекомбинантный лектин, получаемый из *S. rolfsii*, выбирается из следующего:

- i. лектиновый белок с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или
- ii. лектиновый белок с последовательностью, по меньшей мере на 70 % идентичной SEQ ID NO: 1.

Согласно одному из аспектов настоящего изобретения, рекомбинантный лектин, получаемый из *S. rolfsii*, выбирается из лектинов с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8; или модифицированных лектиновых белков в документе WO2020044296, который добавлен в настоящий документ посредством ссылки.

Согласно частному аспекту настоящего изобретения, рекомбинантный лектин, получаемый из *S. rolfsii*, выбирается из лектинов с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO.8.

В одном из аспектов настоящего изобретения D выбирается из группы, состоящей из ДНК-связывающего агента, ингибитора полимеризации тубулина, антиметаболита, алкилирующего или ему подобного противоопухолевого агента, ингибитора

топоизомеразы I, ингибитора топоизомеразы II, ингибитора киназы, бортезомиба, эстрамустина, иксабепилона, эверолимуса, темсиролимуса, неомицина, неамина, криптофицина, дискодермолида, аманитина или его пирролобензодиазепинового димера, или его фармацевтически приемлемой соли, полиморфной формы или сольвата.

Согласно любому из предыдущих аспектов настоящего изобретения спейсер E, F и Y независимо выбирается из группы, содержащей $-R^7-$, $-S-$, $-NH-$, $-R^7-NH-R^8-$, $-R^8-NC(O)-R^7-$, $-R^8-C(O)N-R^7-$, $-C(O)-$, $-C(O)-R^7-$, $-R^7-C(O)-$, $-R^8-C(O)-R^7-$, $-S-R^7-$, $-R^7-S-$, $-R^7-S-R^8-$, $-S(O)-$, $-S(O)-R^7-$, $-R^7-S(O)-$, $-R^7-S(O)-R^8-$, $-O-R^7-$, $-R^7-O-$, $-R^8-O-R^7-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-R^7-$, $-R^7-OC(O)-$, $-R^8-OC(O)-R^7-$, $-R^7-OC(O)O-$, $-OC(O)O-R^7-$, $-R^7-OC(O)O-R^8-$, $-NH-R^7-NH-C(O)R^8-$, $-(CH_2)S-NH-R^7-$, $-R^7-C(O)N(CH_2)_{1-3}O(CH_2)_{1-3}C(O)-$, $-R^7-NC(O)(CH_2)_{1-3}O(CH_2)_{1-3}C(O)-$, $-Si(R^7R^8)-$, полиалкиленгликоль, который может быть через кислород присоединен к $-R^7-$, $-S-$, $-NH-$, $-R^7-N-R^8-$, $-R^8-NC(O)-R^7-$, $-R^8-C(O)N-R^7-$, $-C(O)-$, $-C(O)-R^7-$, $-R^7-C(O)-$, $-R^8-C(O)-R^7-$, $-S-R^7-$, $-R^7-S-$, $-R^7-S-R^8-$, $-S(O)-$, $-S(O)-R^7-$, $-R^7-S(O)-$, $-R^7-S(O)-R^8-$, $-O-R^7-$, $-R^7-O-$, $-R^8-O-R^7-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-R^7-$, $-R^7-OC(O)-$, $-R^8-OC(O)-R^7-$, $-R^7-OC(O)O-$, $-OC(O)O-R^7-$, $-R^7-OC(O)O-R^8-$, $-NH-R^7-NH-C(O)R^8-$, $-(CH_2)S-NH-R^7-$, $-R^7-C(O)N(CH_2)_{1-3}O(CH_2)_{1-3}C(O)-$, $-R^7-NC(O)(CH_2)_{1-3}O(CH_2)_{1-3}C(O)-$, $-Si(R^7R^8)-$;

где R^7 и R^8 независимо выбирают из группы, содержащей водород, $-C_1-C_{10}$ -алкилен, $-C_1-C_{10}$ -алкенилен, насыщенный или ненасыщенный C_5-C_{10} -циклоалкилен, $-C_2-C_{10}$ -алкенилен-насыщенный или ненасыщенный C_5-C_{10} -циклоалкилен, C_6-C_{10} -арилен, $-C_2-C_{10}$ -алкенилен- C_6-C_{10} -арилен, гетероариленовое кольцо, содержащее по меньшей мере один гетероатом, выбираемый из N, O и S, $-C_2-C_{10}$ -алкенилен- C_2-C_9 -гетероарилен; и в котором $-C_1-C_{10}$ -алкилен, $-C_2-C_{10}$ -алкенилен, насыщенный или ненасыщенный C_5-C_{10} -циклоалкилен, $-C_2-C_{10}$ -алкенилен-насыщенный или ненасыщенный C_5-C_{10} -циклоалкилен, C_6-C_{10} -арилен, $-C_2-C_{10}$ -алкенилен- C_6-C_{10} -арилен, C_2-C_9 -гетероарилен и $-C_2-C_{10}$ -алкенилен- C_2-C_9 -гетероарилен могут дополнительно иметь заместители в виде $-OH$, $-C(O)$, $-SH$, $-NH_2$, галогена, C_1-C_5 -алкила, $-NO_2$ или $-CN$;

в котором полиалкиленгликоль представляет собой гомополимер или сополимер алкилена, в котором каждое алкиленовое звено имеет C_1-C_8 атомов углерода, а общее число алкиленовых звеньев равно от 1 до 20; и в котором, когда

полиалкиленгликоль представляет собой E, -CH₂-конец присоединен к A¹, а когда полиалкиленгликоль представляет собой F, -CH₂-конец присоединен к —R⁷—, —S—, —NH—, —R⁷-N-R⁸—, —R⁸-NC(O)-R⁷—, —R⁸-C(O)N-R⁷—, —C(O)—, —C(O)-R⁷—, —R⁷-C(O)—, —R⁸-C(O)-R⁷—, —S-R⁷—, —R⁷-S—, —R⁷-S-R⁸—, —S(O)—, —S(O)-R⁷—, —R⁷-S(O)—, —R⁷-S(O)-R⁸—, —O-R⁷—, —R⁷-O—, —R⁸-O-R⁷—, —C(O)O—, —OC(O)-R⁷—, —R⁷-OC(O)—, —R⁸-OC(O)-R⁷—, —R⁷-OC(O)O—, —OC(O)O-R⁷—, —R⁷-OC(O)O-R⁸—, —NH-R⁷-NH—C(O)R⁸— или —(CH₂)₃-NH-R⁷—, —R⁷-C(O)N(CH₂)₁₋₃O(CH₂)₁₋₃C(O)— или —R⁷-NC(O)(CH₂)₁₋₃O(CH₂)₁₋₃C(O)—.

Согласно предыдущему аспекту настоящего изобретения, Y и A³ независимо или в сочетании содержат саморасщепляющиеся группы.

В одном из аспектов настоящего изобретения предложен метод лечения или профилактики злокачественных опухолей с применением соединения по формуле I, или формуле II, или формуле III, или формуле IV.

В другом аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение по формуле I, или формуле II, или формуле III, или формуле IV.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложено соединение по формуле I, формуле II, формуле III или формуле IV или композиция, содержащая соединение по формуле I, формуле II, формуле III или формуле IV для использования в приготовлении препарата для лечения или профилактики злокачественных опухолей.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ:

Термин «алкил» сам по себе или в составе другого термина означает замещенный или незамещенный, насыщенный или ненасыщенный углеводород с прямой или разветвленной цепью с указанным числом атомов углерода (например, «—C₁—C₈-алкил» или «—C₁—C₁₀-алкил» означает алкильную группу с числом атомов углерода от 1 до 8 или от 1 до 10 соответственно). Когда число атомов углерода не указано, алкильная группа содержит от 1 до 8 атомов углерода. К типичным группам типа «—C₁—C₈-алкил» с прямой цепью относятся, помимо прочих, -метил, -этил, -*n*-пропил, -*n*-бутил, -*n*-пентил, -*n*-гексил, -*n*-гептил и -*n*-октил; а к разветвленным —C₁—C₈-алкилам относятся, помимо прочих, -изопропил, -втор-бутил, -изобутил, -трет-бутил, -изопентил и -2-метилбутил; к ненасыщенным —C₂—C₈-алкилам относятся, помимо прочих, -винил, -аллил, -1-бутенил, -2-бутенил, -изобутенил, -1-пентенил, -2-пентенил, -3-метил-1-бутенил, -2-метил-2-бутенил, -2,3-диметил-2-бутенил, -1-гексил, 2-гексил, -3-гексил, -ацетиленил, -пропинил, -1-бутинил, -2-бутинил, -1-пентинил, -2-пентинил и -3-метил-1-

бутинил. В некоторых вариантах осуществления алкильная группа не имеет заместителей. Алкильная группа может быть замещена одной или несколькими группами. В некоторых аспектах алкильная группа является насыщенной.

Термины «алкенил» и «алкинил» означают прямые или разветвленные углеродные цепи с указанным числом атомов углерода или от примерно 2 до примерно 20 атомов углерода (и все сочетания или подсочетания диапазонов и конкретных чисел атомов углерода), предпочтительно от примерно 2 до примерно 8 атомов углерода. Алкенильная цепь имеет по меньшей мере одну двойную связь, а алкинильная цепь — по меньшей мере одну тройную связь. Примерами алкенильных групп являются, помимо прочих, этилен или винил, аллил, -1-бутенил, -2-бутенил, -изобутенил, -1-пентенил, -2-пентенил, -3-метил-1-бутенил, -2-метил-2-бутенил и -2,3-диметил-2-бутенил. Примерами алкинильных групп являются, помимо прочих, ацетилен, пропаргил, ацетиленил, пропинил, -1-бутинил, -2-бутинил, -1-пентинил, -2-пентинил и -3-метил-1-бутинил.

Алкенильная и алкинильная группы, как сами по себе, так и в составе другой группы, могут быть дополнительно замещены одной или несколькими группами, предпочтительно 1–3 группами (и дополнительными заместителями из числа галогенов), которыми могут быть, помимо прочих, -галоген, $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_8\text{-алкил})$, $-\text{O}-(\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкенил})$, $-\text{O}-(\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкинил})$, -арил, $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{SR}'$, $-\text{SO}_3\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OH}$, $=\text{O}$, $-\text{N}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}(\text{R}')$, $-\text{N}(\text{R}')_2$ и $-\text{CN}$, где каждый R' независимо выбирается из группы, в которую входят $-\text{H}$, $-\text{C}_1-\text{C}_8\text{-алкил}$, $-\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкенил}$, $-\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкинил}$ или -арил и где указанные группы $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_8\text{-алкил})$, $-\text{O}-(\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкенил})$, $-\text{O}-(\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкинил})$, -арил, $\text{C}_1-\text{C}_8\text{-алкил}$, $\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкенил}$ и $\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкинил}$ могут дополнительно иметь один или несколько заместителей, включая, помимо прочих, $-\text{C}_1-\text{C}_8\text{-алкил}$, $-\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкенил}$, $-\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкинил}$, -галоген, $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_8\text{-алкил})$, $-\text{O}-(\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкенил})$, $-\text{O}-(\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкинил})$, -арил, $-\text{C}(\text{O})\text{R}''$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}''$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}''$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}''$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}'')_2$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}''$, $-\text{SR}''$, $-\text{SO}_3\text{R}''$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}''$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}''$, $-\text{OH}$, $-\text{N}_3$, $-\text{NH}(\text{R}'')$, $-\text{N}(\text{R}'')_2$ и $-\text{CN}$, где каждый R'' независимо выбирается из группы, в которую входят $-\text{H}$, $\text{C}_1-\text{C}_8\text{-алкил}$, $-\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкенил}$, $\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкинил}$ или -арил

В последующих вариантах осуществления изобретения термин «алкилен» означает насыщенный углеводородный радикал с разветвленной или прямой цепью с указанным числом атомов углерода или от примерно 1 до примерно 20 атомов углерода (включая все сочетания или подсочетания диапазонов и конкретных чисел

атомов углерода), предпочтительно от примерно 1 до примерно 8 атомов углерода, с двумя одновалентными радикальными центрами, образующимися при удалении двух атомов углерода у одного или двух разных атомов углерода исходного алкана. К типичным алкиленам относятся, помимо прочих, метилен, этилен, пропилен, бутилен, пентилен, гексилен, гептилен, октилен, нонилен, декален и тому подобное. Алкиленовые группы, как сами по себе, так и в составе другой группы, могут быть дополнительно замещены одной или несколькими группами, предпочтительно 1–3 группами (и дополнительными заместителями из числа галогенов), которыми могут быть, помимо прочих, -галоген, $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_8\text{-алкил})$, $-\text{O}-(\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкенилен})$, $-\text{O}-(\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкинил})$, -арил, $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{SR}'$, $-\text{SO}_3\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{OH}$, $=\text{O}$, $-\text{N}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}(\text{R}')$, $-\text{N}(\text{R}')_2$ и $-\text{CN}$, где каждый R' независимо выбирается из группы, в состав которой входят $-\text{H}$, $-\text{C}_1-\text{C}_8\text{-алкил}$, $-\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкенил}$, $-\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкинил}$ или -арил, и в котором указанные группы $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_8\text{-алкил})$, $-\text{O}-(\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкенилен})$, $-\text{O}-(\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкинил})$, -арил, $\text{C}_1-\text{C}_8\text{-алкил}$, $\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкенил}$ и $\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкинил}$ могут к тому же дополнительно иметь один или несколько заместителей, в том числе $\text{C}_1-\text{C}_8\text{-алкил}$, $\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкенил}$ и $\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкинил}$, -галоген, $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_8\text{-алкил})$, $-\text{O}-(\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкенилен})$, $-\text{O}-(\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкинил})$, -арил, $-\text{C}(\text{O})\text{R}''$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}''$, $-\text{C}(\text{O})\text{OR}''$, $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}''$, $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}'')_2$, $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}''$, $-\text{SR}''$, $-\text{SO}_3\text{R}''$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}''$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}''$, $-\text{OH}$, $-\text{N}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}(\text{R}'')$, $-\text{N}(\text{R}'')_2$ и $-\text{CN}$, где каждый R'' независимо выбирается из группы, в которую входят $-\text{H}$, $\text{C}_1-\text{C}_8\text{-алкил}$, $-\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкенил}$, $\text{C}_2-\text{C}_8\text{-алкинил}$ или -арил.

В последующих вариантах осуществления изобретения «арил» сам по себе или в составе другого термина означает замещенный или незамещенный одновалентный карбоциклический ароматический углеводородный радикал с указанным числом атомов углерода или с 6–20 атомами углерода, образующийся в результате удаления одного атома водорода у одного атома углерода исходной ароматической кольцевой системы.

Термин «арилен» означает арильную группу согласно данному выше определению, которая имеет два заместителя и может быть в орто-, мета- или пара-конфигурации по относительному положению двух заместителей, в которой заместители в положениях 1 и 2 образуют орто-конфигурацию, заместители в положениях 1 и 3 образуют мета-конфигурацию, а заместители в положениях 1 и 4 образуют пара-конфигурацию.

В последующих вариантах осуществления изобретения термин « $\text{C}_2-\text{C}_9\text{-гетероцикл}$ » сам по себе или в составе другого термина означает одновалентную замещенную или

незамещенную, ароматическую или неароматическую, моноциклическую или бициклическую кольцевую систему с 2–9 атомами углерода (также называемыми членами кольца) с гетероатомными членами кольца числом от одного до четырех, независимо выбираемыми из N, O или S, образующуюся при удалении одного атома водорода у кольцевого атома исходной кольцевой системы. Один или несколько атомов N, C или S в гетероцикле могут быть окисленными. Кольцо, имеющее в своем составе гетероатом, может быть ароматическим или неароматическим. Если не указано иное, гетероцикл присоединяется к пendantsкой группе по любому гетероатому или углеродному атому, позволяющему образовать стабильную структуру. Типичными примерами гетероциклов являются, помимо прочих, пирролидинил, азетидинил, пиперидинил, морфолинил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, бензофуранил, бензотиофен, индолил, бензопиразолил, пирролил, тиофенил (тиофен), фуранил, триазолил, имидазолил, пиразолил, пиримидинил, пиридинил, пиразинил, придазинил, изотиазолил и изоксазолил.

В последующих вариантах осуществления изобретения термин «циклоалкил или карбоцикл C₃–C₁₀», сам по себе или в составе другого термина, означает 5-, 6-, 7-, 8-, 9- или 10-членное одновалентное, замещенное или незамещенное, насыщенное или ненасыщенное неароматическое моноциклическое или бициклическое кольцо, образующееся при удалении одного атома водорода у кольцевого атома исходной кольцевой системы. Типичными циклоалкилами являются, помимо прочих, циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентадиенил, циклогексил, циклогексенил, 1,3-циклогексадиенил, 1,4-циклогексадиенил, циклогептил, 1,3-циклогептадиенил, 1,3,5-циклогептатриенил, циклооктил и циклооктадиенил.

В последующих вариантах осуществления изобретения термин «карбоцикло» сам по себе или в составе другого термина означает карбоциклическую группу согласно определению выше, в которой другой атом водорода карбоциклической группы замещен связью (то есть она является двухвалентной).

«Замещенный алкил» или «замещенный арил» означает алкил или арил соответственно, в котором один или несколько атомов водорода независимо заменены заместителем. Типичными заместителями, помимо прочих, являются –X, –R, –O₃₁, –OR, –SR, –S–, –NR₂, –NR₃, =NR, –CX₃, –CN, –OCN, –SCN, –N=C=O, –NCS, –NO, –NO₂, =N₂, –N₃, –NRC(=O)R, –C(=O)R, –C(=O)NR₂, –SO₃–, –SO₃H, –S(=O)₂R, –OS(=O)₂OR, –S(=O)₂NR, –S(=O)R, –OP(=O)(OR)₂, –P(=O)(OR)₂, –PO₃[–], –PO₃H₂, –C(=O)R, –C(=O)X, –C(=S)R, –CO₂R, –CO₂[–], –C(=S)OR, –C(=O)SR, –C(=S)SR, –

термином «рекомбинантный белок» или «рекомбинантный полипептид» понимают полипептидную молекулу, экспрессируемую по методу рекомбинантных ДНК.

В настоящем документе под термином «линкер», «связующее звено» или «сшивка» понимают химическую группу, имеющую ковалентную связь, или цепь атомов, ковалентно связывающих белок с лекарственной группой. Это бифункциональная химическая группа, которая ковалентно связывает группы «L» и «D». Линкер способствует стабильности конъюгата рекомбинантный лектин-лекарственное вещество в плазме, обеспечивая его неизменное состояние до его доставки к сайту-мишени. Линкеры также являются лабильными и восприимчивыми к внешним стимулам, присутствующим в микроокружении опухоли, которые отщепляют/восстанавливают лекарственное средство из конъюгата рекомбинантный лектин-лекарственное вещество в сайте-мишени. Линкеры широко классифицируются на расщепляемые и нерасщепляемые. Расщепляемые линкеры могут представлять собой дисульфид-содержащие линкеры, расщепляемые посредством дисульфидного обмена или протеазами, кислото-лабильные линкеры, расщепляемые при кислотном pH, и линкеры, расщепляемые такими ферментами, как гидролазы, пептидазы, эстеразы и глюкоронидазы.

В настоящем документе под термином «терапевтический агент» или терапевтически эффективный агент, которые употребляются наравне, понимают вещество, вводимое субъекту с целью облегчения или излечения одного или нескольких симптомов заболевания или нарушения.

Под термином «цитотоксический агент» понимают вещество, ингибирующее клетки или ингибирующее функцию клеток и/или вызывающее разрушение клеток. К этому термину относятся химиотерапевтические агенты, токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативноактивные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, включая их синтетические аналоги и производные.

В настоящем документе под термином «конъюгаты» понимают препараты, составляющие предмет настоящего изобретения. В целях настоящего изобретения конъюгат может содержать цитотоксический агент, присоединенный к рекомбинантному лектиновому белку с помощью линкера, или же он может содержать цитотоксический агент, непосредственно присоединенный к рекомбинантному лектиновому белку. Структура конъюгата и связь между

цитотоксическим агентом и рекомбинантным лектиновым белком является одним из аспектов настоящего изобретения и описана в настоящем документе.

«Спейсер», когда таковой имеется, расширяет конфигурацию связующего звена, чтобы обеспечить большее расстояние между лектиновым белком и цитотоксическим агентом. Спейсер также может менять физико-химические свойства готовых продуктов, составляющих предмет настоящего изобретения, в зависимости от компонентов спейсера.

Термин «соединение, содержащее цитотоксический агент» или «терапевтический агент» означает соединение, содержащее линкер или часть линкера вместе с цитотоксическим агентом или терапевтическим агентом. Ниже приведены примеры соединений, содержащих цитотоксический агент.

Термин «производное (производные)» может означать одно или несколько веществ из числа солей (например, фармацевтически приемлемые соли), простых эфиров, сложных эфиров, полиморфных форм, метаболитов, чистую форму, размер частиц, изомеры, смеси изомеров, комплексы, комбинации соединения (соединений).

Термин «ингибировать/ингибирование» или означает сокращать на измеряемую величину или полностью предотвращать.

Термин «терапевтически эффективное количество» означает количество цитотоксического агента или терапевтического агента, которое является эффективным для лечения заболевания или нарушения у млекопитающего. В случае злокачественной опухоли терапевтически эффективное количество цитотоксического агента или терапевтического агента может сокращать количество злокачественных клеток, уменьшать размер опухоли, ингибировать (то есть в некоторой степени замедлять, а предпочтительно — останавливать) проникновение злокачественных клеток в периферийные органы, ингибировать (то есть в некоторой степени замедлять, а предпочтительно — останавливать) метастазирование опухоли, в некоторой степени ингибировать рост опухоли и/или в некоторой степени снимать один или несколько симптомов, связанных со злокачественными опухолями. В той мере, в которой цитотоксический агент может ингибировать рост и/или убивать существующие злокачественные клетки, он может быть цитостатическим и/или цитотоксическим.

Термин «цитотоксическая активность» означает уничтожающее клетки, цитостатическое или антипролиферативное действие соединения или внутриклеточного метаболита соединения. Цитотоксическая активность может быть

выражена значением IC_{50} , представляющим собой концентрацию в молях или в единицах массы на единицу объема, при которой выживает половина клеток. Методы определения значения IC_{50} известны специалистам в данной области. Например, значение IC_{50} можно определить методом стандартного анализа цитотоксичности MTS-PMS.

Термины «злокачественная опухоль» и «злокачественный» означают или описывают физиологическое состояние или нарушение у млекопитающих, обычно характеризующее нерегулируемым ростом клеток. «Опухоль» состоит из одной или большего числа злокачественных клеток.

Термины «лечить» или «лечение», если контекст не указывает на иное, означают терапевтическое лечение или профилактические меры с целью недопущения рецидива, направленные на ингибирование или замедление (уменьшение) нежелательного физиологического изменения или нарушения, такого как развитие или распространение злокачественной опухоли. Применительно к настоящему изобретению к полезным или желательным клиническим результатам относятся, помимо прочих, облегчение симптомов, уменьшение степени заболевания, стабилизация (то есть отсутствие ухудшения) заболевания, приостановка или замедление прогрессирования заболевания, смягчение или временное облегчение болезненного состояния и ремиссия (частичная или полная), которые могут как поддаваться, так и не поддаваться выявлению. Термин «лечение» также может означать продление выживаемости в сравнении с ожидаемой выживаемостью без лечения. К нуждающимся в лечении относятся как те, у кого уже имеется заболевание или нарушение, так и те, кто предрасположен к заболеванию или нарушению.

В настоящем документе под термином «профилактика» или «предотвращение» понимают уменьшение вероятности того, что у субъекта разовьется заболевание, в сравнении с субъектами, не получающими препарат.

В настоящем документе под термином «стабилизирующий элемент» понимают соединение, способствующее стабильности конъюгата, например, посредством усиления системного удержания лиганда при введении пациенту. Стабилизирующий элемент также может повышать растворимость конъюгата в воде. Примером стабилизирующего элемента является полиэтиленгликоль.

Под термином «вспомогательное вещество» в данном документе понимают неактивные или обычно инертные вещества, добавляемые в препарат и служащие

носителем или средой для активной фармацевтической субстанции, но не влияющие на терапевтическое действие активной фармацевтической субстанции. Его можно использовать для придания нужной консистенции, улучшения стабильности и/или регулирования осмоляльности препарата. Применительно к настоящему изобретению к используемым вспомогательным веществам относятся, помимо прочих, стабилизирующие белки агенты, буферы, полимеры, солюбилизаторы, криопротекторы, разбавители и их смеси.

Термин «фармацевтически приемлемая соль» указанного соединения означает соли, сохраняющие биологическую эффективность и свойства указанного соединения и не являющиеся нежелательными с биологической или иной точки зрения. К «фармацевтически приемлемым солям» или «физиологически приемлемым солям» относятся, например, соли неорганических кислот и соли органических кислот. Кроме того, если описанные в настоящем документе соединения получают в виде соли присоединения кислоты, свободное основание можно получить повышением основности раствора кислой соли. Наоборот, если продукт является свободным основанием, можно получить соль присоединения, в частности, фармацевтически приемлемую соль присоединения, путем растворения свободного основания в подходящем органическом растворителе и обработки раствора кислотой в соответствии со стандартными процедурами получения солей присоединения кислоты из основных соединений. Специалистам в данной области знакомы различные способы синтеза, которые можно использовать для получения нетоксичных фармацевтически приемлемых солей присоединения. Фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты можно получать из неорганических и органических кислот. К солям неорганических кислот относятся, например, соли хлороводородной кислоты, бромистоводородной кислоты, серной кислоты, азотной кислоты, фосфорной кислоты и тому подобное. К солям органических кислот относятся, например, соли уксусной кислоты, пропионовой кислоты, глюконовой кислоты, гликолевой кислоты, пировиноградной кислоты, щавелевой кислоты, яблочной кислоты, малоновой кислоты, янтарной кислоты, малеиновой кислоты, фумаровой кислоты, винной кислоты, лимонной кислоты, бензойной кислоты, коричной кислоты, миндальной кислоты, метансульфоновой кислоты, этансульфоновой кислоты, пара-толуолсульфоновой кислоты, салициловой кислоты и тому подобное. Аналогично, фармацевтически приемлемые соли присоединения основания можно получать из неорганических и органических оснований. К солям,

получаемым из неорганических оснований, можно отнести, только в качестве примера, соли натрия, калия, лития, алюминия, аммония, кальция и магния. К солям, получаемым из неорганических оснований, можно отнести, помимо прочих, соли первичных, вторичных и третичных аминов, такие как алкиламины (т. е. $\text{NH}_2(\text{алкил})$), диалкиламины (т. е. $\text{HN}(\text{алкил})_2$), триалкиламины (т. е. $\text{N}(\text{алкил})_3$), замещенные алкиламины (т. е. $\text{NH}_2(\text{замещенный алкил})$), ди(замещенный алкил)амины (т. е. $\text{HN}(\text{замещенный алкил})_2$), три(замещенный алкил)амины (т. е. $\text{N}(\text{замещенный алкил})_3$), алкениламины (т. е. $\text{NH}_2(\text{алкенил})$), диалкениламины (т. е. $\text{HN}(\text{алкенил})_2$), триалкениламины (т. е. $\text{N}(\text{алкенил})_3$), замещенные алкениламины (т. е. $\text{NH}_2(\text{замещенный алкенил})$), ди(замещенный алкенил)амины (т. е. $\text{HN}(\text{замещенный алкенил})_2$), три(замещенный алкенил)амины (т. е. $\text{N}(\text{замещенный алкенил})_3$), моно-, ди- или три-циклоалкиламины (т. е. $\text{NH}_2(\text{циклоалкил})$, $\text{HN}(\text{циклоалкил})_2$, $\text{N}(\text{циклоалкил})_3$), моно-, ди- или три-ариламины (т. е. $\text{NH}_2(\text{арил})$, $\text{HN}(\text{арил})_2$, $\text{N}(\text{арил})_3$) или смешанные амины и т. д. К конкретным примерам подходящих аминов можно отнести, только в качестве примера, изопропиламин, триметиламин, диэтиламин, триизопропиламин, три(*n*-пропил)амин, этаноламин, 2-диметиламиноэтанол, пиперазин, пиперидин, морфолин, *N*-этилпиперидин и тому подобное.

Конъюгат рекомбинантного лектинового белка, составляющий предмет настоящего изобретения, можно представить в фармацевтически приемлемой форме, такой как жидкость (например, в виде водного раствора или суспензии или в виде раствора или суспензии на масляной основе), твердая форма (например, в виде капсул или таблеток), лиофилизированный порошок, спрей, крем, лосьон или гель, везикулярные системы доставки лекарственного средства, такие как, среди прочего, билосомы, липосомы, ниосомы, трансферсомы, этосомы, сфингосомы, фармакосомы, многослойные везикулы, микросферы и тому подобное.

Термины «гомология» или «гомологичный», используемые в настоящем документе, относятся к двум или более указанным объектам, характеризующимся, по меньшей мере, частичной идентичностью в какой-либо области или части. Области, зоны или домены гомологии или идентичности означают части двух или более упомянутых объектов, которые имеют гомогенную или одинаковую форму. Таким образом, если две последовательности идентичны в одной или нескольких зонах последовательности, они имеют общую идентичность в этих зонах. Под существенной гомологией понимают структурно или функционально сохраненную молекулу, которая имеет или вероятно будет иметь, по меньшей мере, частичную структуру или функцию

одной или нескольких структур или функций (например, биологической функции или активности) эталонной молекулы, или значимую/соответствующую зону или часть эталонной молекулы, которой она гомологична.

В одном воплощении процент «гомологии» между двумя последовательностями определяют с помощью алгоритма BLASTP с параметрами по умолчанию (Altschul et al. Nucleic Acids Res. 1997 Sep 1;25(17):3389-402). В частности, алгоритм BLAST можно найти в интернете по следующему URL-адресу: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. В альтернативном варианте осуществления изобретения для глобального выравнивания последовательностей процент гомологии между двумя последовательностями определяют с помощью алгоритма EMBOSS Needle с параметрами по умолчанию. В частности, алгоритм EMBOSS Needle можно найти в интернете по следующему URL-адресу: https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/.

Термин «идентичность последовательности» в настоящем документе означает наличие в точности одинакового нуклеотида или аминокислоты в одинаковом положении в выровненных последовательностях. Если не указано иное, термин «гомология» используется в настоящем документе наравне с термином «идентичность последовательности» или «идентичность».

Термины «полиалкиленгликоль» и «полиоксиалкиленгликоль» используются наравне и означают полимеры алкиленоксида. Полимер может представлять собой гомополимер, содержащий один и тот же алкиленоксид, например, полимер, где все звенья являются этиленоксидом, представляет собой гомополимер, известный как полиэтиленгликоль. Полимер может представлять собой сополимер, содержащий разные алкиленоксиды, например, полимер, состоящий из трех звеньев этиленоксида и трех звеньев пропиленоксида, известен как сополимер. Полиалкиленгликоль можно получать с помощью процессов, известных специалистам, или приобретать на рынке.

В настоящем документе термин «субъект» означает животное, являющееся объектом действия препарата, наблюдения или эксперимента. К «животным» относятся холодно- и теплокровные позвоночные и беспозвоночные, такие как рыбы, моллюски, рептилии и, в частности, млекопитающие. К «млекопитающим» относятся, помимо прочих, мыши, крысы, кролики, морские свинки, собаки, кошки, овцы, козы, коровы, лошади, приматы, такие как обезьяны, шимпанзе и высшие обезьяны, а также люди.

Полиморфизмом называют существование разных кристаллических форм одного и того же соединения. Термин «полиморфная форма» в данном документе означает твердые формы с одинаковой молекулярной формулой, но с разными физическими свойствами, такими как профиль растворимости и/или температура плавления. Полиморфную форму соединения можно различить методом рентгеновской дифракционной спектроскопии или другими методами, такими как инфракрасная спектроскопия.

Термин «саморасщепляющийся» также может относиться к самоэлиминирующейся группе — это химические линкеры, вступающие в последовательность реакций саморасщепления, обычно происходящих после отделения одного или нескольких триггерных звеньев. Такие саморасщепляющиеся химические линкеры, предпочтительно, основаны на многофункциональном звене, которое может соединяться как с химической группой, так и с одним или несколькими триггерными звеньями или другими химическими линкерами и может далее подвергаться электронно-каскадной самоэлиминации. Саморасщепляющаяся группа может выбираться в соответствии с пониманием и знаниями специалиста или из ссылок, в том числе из заявки на патент США 20060269480 или из работы «Self-immolative linkers in polymeric delivery systems» (Blencowe et al., Polymer Chemistry 2, 773-790, 2011).

Когда кристалл соединения захватывает одну или несколько молекул растворителя, то говорят, что соединение сольватируется. Термин «сольват» можно определить как соединение, образованное путем сольватации. Сольваты можно получать с помощью растворителей, известных специалистам. Неограничивающими примерами растворителей являются вода, спирты, такие как метанол, этанол, *n*-пропанол, изопропанол, *n*-бутанол, изобутанол, *t*-бутанол, гликоли или полиалкиленгликоли (например, полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль), уксусная кислота, муравьиная кислота, ацетон, дихлорметан и/или их смеси. Самым известным и предпочтительным растворителем обычно является вода, а сольватные соединения, образующиеся при сольватации водой, называются гидратами.

ПРЕДСТАВЛЕНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

SEQ ID NO:1 представляет собой нативную аминокислотную последовательность лектина *S. rolfsii* (указывается как SEQ ID NO:1 в WO2010/095143) следующего вида:

TYKITVRVYQTNPNDAFFHPVEKTVWKYANGGTWTITDDQHVLTMGGSGTSGTLRFHADNGESFTAT
FGVHNYKRWCDIVTNLAADETGMVINQQYYSQKNREEARERQLSNYEVKNAKGRNFEIVYTEAEG
NDLHANLIIG

SEQ ID NO: 2 представляет собой вариант аминокислотной последовательности лектина *S. rolfsii* (указывается как Rec-2 в WO2010/095143) следующего вида:

TYKITVRVYQTNPDFAFFHPVEKTVWKYANGGTWTITDDQHVLTMGGSGTSGTLRFHADNGESFTAT
FGVHNYKRWCDIVTNLAADETGMVINQQYYSQKNREEARERQLSNYQVKNAGGRNFQIVYTEAEG
NDLHANLIIG

SEQ ID NO:3 представляет собой вариант аминокислотной последовательности лектина *S. rolfsii* (указывается как Rec-3 в WO 2010/095143) следующего вида:

VYKITVRVYQTNPDFAFFHPVEKTVWKYANGGTWSITDDQHVLTMGGSGTSGTLRFHADNGESFTAT
FGVHNYKRWCDIVTNLAADETGMVINQQYYSQKNREEARERQLSNYQVKNAGGRNFQIVYTEAEG
NDLHANLIIG

SEQ ID NO: 4 представляет собой вариант аминокислотной последовательности лектина *S. rolfsii* (указано в WO 2014/203261) следующего вида:

VYKITVRVYQTNPDFAFFHPVEKTVWKYADGGTWSITDDQHVLTMGGSGTSGTLRFHADNGESFTAT
FGVHDYKRWCDIVTDLAADETGMVINQEYYSEKDREEARERQNSNYEVKDAKGRNFEIVYTEAEG
NDLHADLIIG

SEQ ID NO: 5 представляет собой вариант аминокислотной последовательности лектина *S. rolfsii* следующего вида:

SYKITVRVYQTNPDFAFFHPVEKTVWKYANGGTWTITDDQHVLTMGGSGTSGTLRFHADNGESFTAT
FGVHNYKRWGDIVTNLAADETGMVINQQYYSQKNREEARERQLSNYQVKNAGGRNFQIVYTEAEG
NDLHANLIIGC

SEQ ID NO: 6 представляет собой последовательность нуклеотидов, кодирующую белок SEQ ID NO:2.

ATGACCTATAAAATTACCGTGCGCGTGTATCAGACCAACCCGGATGCCTTTTTCCATCCGGTGGAAA
AAACCGTGTGGAAATATGCGAATGGCGGTACCTGGACGATTACGGATGATCAGCATGTGCTGACGA
TGGGTGGTAGCGGTACCAGCGGCACCCTGCGTTTTACGCAGATAATGGCGAAAGCTTCACCGCC
ACCTTTGGTGTGCATAATTATAAACGCTGGTGTGATATTGTGACCAACCTGGCAGCGGATGAAACCG
GCATGGTTATTAATCAGCAGTATTATAGTCAGAAAAACCGCGAAGAAGCGCGTGAACGCCAGCTGA

GТААСТАТСАГГТГААААТГСГАААГГССГТААСТТССАГАТТГТТТАТАССГААГССГААГГСАА
ТГАТСТГАТГСГААССТГАТТАТССГГС

SEQ ID NO: 7 представляет собой последовательность нуклеотидов, кодирующую белок SEQ ID NO:5.

АГСТААААТТАССГТГСГСГТГАТСАГАССААСССГГАТГССТТТТТССАТСССГГТГГАААААА
ССГТГТГГАААТАТГСГААТГГСГГТАССТГГАСГАТТАССГГАТГАТСАГСАТГТГСТГАСГАТГ
ГГТГГТАСГГТАССАГСГГСАСССТГСГТТТТТАССАГСАТААТГГСГАААГСТТАСССГССАС
СТТТГГТГТГСАТААТТААААССГТГГГГСГАТАТТГТАССААССТГГСАГСГГАТГАААСССГГ
САТГГТТАТТААТСАГСАГАТТАТАГАТСАГАААААСССГГААГААГСГСГТГААСССГАСГАТГАГ
ТААСТАТСАГГТГААААТГСГАААГГССГТААСТТССАГАТТГТТТАТАССГААГССГААГГСААТ
ГАТСТГАТГСГААССТГАТТАТССГГСТГС

SEQ ID NO:8 представляет собой вариант аминокислотной последовательности лектина *S. rolfisii*.

SYKITVRVYQTNPDАFFHPVEKTVWKYANGGTWTITDDQHVLTMGGSGTSGTLRFHADNGESFTAT
FGVHNYKRWGDIVTNLAАДЕТГМВИNQYYSQKNREEARERQLSNYQVKNAGRNRFQIVYTEАEG
NDLHANLIIGSC

SEQ ID NO:9 представляет собой последовательность нуклеотидов, кодирующую белок SEQ ID NO:8.

АГСТААААТТАССГТГСГСГТГАТСАГАССААСССГГАТГССТТТТТССАТСССГГТГГАААААА
ССГТГТГГАААТАТГСГААТГГСГГТАССТГГАСГАТТАССГГАТГАТСАГСАТГТГСТГАСГАТГ
ГГТГГТАСГГТАССАГСГГСАСССТГСГТТТТТАССАГСАТААТГГСГАААГСТТАСССГССАС
СТТТГГТГТГСАТААТТААААССГТГГГГСГАТАТТГТАССААССТГГСАГСГГАТГАААСССГГ
САТГГТТАТТААТСАГСАГАТТАТАГАТСАГАААААСССГГААГААГСГСГТГААСССГАСГАТГАГ
ТААСТАТСАГГТГААААТГСГАААГГССГТААСТТССАГАТТГТТТАТАССГААГССГААГГСААТ
ГАТСТГАТГСГААССТГАТТАТССГГСАСГАТГС

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На **ФИГ. 1** представлен обращенно-фазовый масс-спектр конъюгата по формуле 16. Пик 17406 подтверждает образование конъюгата по формуле 16, а также соответствует массе готового продукта по формуле 16.

На **ФИГ. 2** представлен обращенно-фазовый масс-спектр конъюгата по формуле 18. Пик 17586 подтверждает образование конъюгата по формуле 18, а также соответствует массе готового продукта по формуле 18.

На **ФИГ. 3** представлены ЖХ/МС формулы С при $x = 8$. Пик на 16 041,5000 относится только к L, а пики на 16 553, 17 064,5 и 17 576 показывают образование формулы С при DAR 1, 2 и 3 соответственно. Среднее значение DAR равно 1,71.

На **ФИГ. 4** предствлены ЖХ/МС формулы С при $x = 12$. Пики на 16 729, 17 416,5 и 18 104,5 показывают образование формулы С при варьирующихся значениях DAR 1, 2 и 3 соответственно и среднем значении DAR 1,76

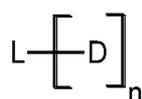
ФИГ. 5. Анализ экспрессии и растворимости рекомбинантного лектина SEQ ID NO: 5 в производственной среде. На фигуре показан анализ методом ДСН-ПААГ экспрессии SEQ ID NO.5 в разные точки контроля, как показано ниже:

Полоса	Образец	Полоса, %
1	Маркер стандартного белка	Н/А
2	Seq ID NO: 5 0 ч	-
3	Seq ID NO: 5 в течение ночи	56
4	Seq ID NO: 5 в течение ночи, осадок	49,6
5	Seq ID NO: 5 супернатант	47,2

ФИГ. 6. Колокализация рекомбинантного лектина с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2 (рекомбинантный белок) в разных органеллах, таких как митохондрии, аппараты Гольджи, плазматическая мембрана, оболочка ядра, эндоплазматический ретикулум в клеточной линии 1.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Согласно первому аспекту настоящего изобретения предложено соединение по формуле I:



Формула I

или его фармацевтически приемлемая соль.

Согласно одному из аспектов, L представляет собой рекомбинантный лектин, получаемый из лектина *Sclerotium rolfsii* (*S. rolfsii*). *S. rolfsii* — обитающий в почве

патогенный гриб, а лектин *Sclerotium rolfsii* (SRL) — лектин, выделяемый из *S. rolfsii*. Нативный SRL имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1.

В одном из аспектов L — рекомбинантный лектин с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 или рекомбинантный лектин с последовательностью, по меньшей мере на 70% идентичной SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантный лектиновый белок может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологию с SEQ ID NO: 1.

В одном из вариантов осуществления изобретения рекомбинантный лектин представляет собой вариант лектина *Sclerotium rolfsii* (SRL), представленный SEQ ID NO.1. В частном случае осуществления изобретения указанный рекомбинантный лектин сохраняет специфичность или аффинность связывания лектина *Sclerotium rolfsii* (SRL), представленный SEQ ID NO.1. Указанная специфичность связывания, предположительно, относится к одному или нескольким антигенам, выбираемым из группы, содержащей антиген Томсена-Фриденрайха (Gal β 1-3GalNAc α -O-Ser/Thr, TF или T), O-GalNAc Core1 (T-антиген), Core2, ' α 2,3/6-сиалил Core1' (сиалил-T-антиген), ' α 2,6/6-сиалил Core2' и его модифицированные формы, такие как экспрессия разветвленных и фукозилированных N- и O-гликанов после альтерации, включая изменения в антигенах Льюиса (S_{Lex} и S_{Lea}), которые экспрессируются в более чем 90% злокачественных опухолей у человека. Помимо изменений в коровых гликанах, каждый из этих углеводов может дополнительно модифицироваться таким образом, чтобы он генерировал уникальные терминальные гликановые мотивы, которые также могут подвергаться специфичным изменениям после неопластической трансформации. Например, высокофукозилированные гликаны, такие как антигены Льюиса [Льюис_{a/b} (Le_{a/b}) и Льюис_{x/y} (Le_{x/y})], могут обогащаться на поверхности клеток после неопластической трансформации. Аналогично, сиалилирование, распространенная терминальная модификация гликанов, также может подвергаться значительным изменениям во время опухолевой прогрессии.

В более частном случае осуществления настоящего изобретения варианты или модифицированные формы TF-антигена (или T-антигена) включают [3OSO3]Gal β 1-3GalNAc α ; Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3 [6OSO3] GalNAc α ; Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc α ; GlcNAc β 1-3Gal β 1-3GalNAc α ; Gal β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6) GalNAc α ; Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)GalNAc α ; Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc α ; Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc α ; Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3(Neu5Ac α 2-6)GalNAc α ; Gal β 1-4GlcNAc β 1-6(Gal β 1-3)

GalNAc α ; Gal β 1-3GalNAc α (TF-антиген); Neu5Ac α 2-6 (Gal β 1-3)GalNAc α ; Gal β 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-6)GalNAc; Gal β 1-3(GlcNAc β 1-6)GalNAc; GlcNAc β 1-6 (Gal β 1-3) GalNAc α ; Gal β 1-3 (Neu5Ac β 2-6)GalNAc α ; Fuc α 1-2Gal β 1-3GalNAc α ; Neu5Ac β 2-6 (Gal β 1-3)GalNAc α ; GlcNAc β 1-2Gal β 1-3GalNAc α .

В патентной заявке WO2010/095143 раскрыты рекомбинантные варианты лектина Rec-2 и Rec-3, полученные из нативной SRL-последовательности путем замещения 3 или 5 аминокислот соответственно. Кристаллическая структура этих вариантов описана (Peppas et al., Molecules. 2015 Jun 12;20(6):10848-65). В настоящем документе Rec-2 и Rec-3 упоминаются как SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 3 соответственно. В патентной заявке WO 2014/203261 раскрывается вариант рекомбинантного лектина (упомянутый как SEQ ID NO: 4), получаемый из нативной SRL-последовательности посредством замещения 12 аминокислот. В патентной заявке WO2020/044296 раскрываются несколько вариантов SRL с по меньшей мере одной модификацией аминокислоты, выбираемой из одного или нескольких из нижеперечисленного:

- a) по меньшей мере одна модификация аминокислоты в углеводсвязывающем сайте, выбираемом среди положений 27, 28, 47, 48, 70, 71, 72, 77, 78, 80, 101, 105, 112 или 114;
- b) по меньшей мере одна модификация аминокислоты на N-конце;
- c) по меньшей мере одна модификация аминокислоты в положении 76; или
- d) по меньшей мере одна модификация аминокислоты в положении 44 и 89.

В патентной заявке WO 2020/044296 дополнительно раскрываются варианты SRL с модификациями аминокислот, где модификация представляет собой добавление по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот в определенном положении в аминокислотной последовательности.

Патентная заявка WO 2020/044296 в полном объеме добавлена в настоящую заявку посредством ссылки. Аминокислотные последовательности от SEQ ID NO: ULLB-0005/001 до ULLB-0005/047 согласно патентной заявке WO 2020/044296 осуществляются в качестве одного из аспектов настоящего изобретения и для краткости не приводятся повторно. В последующем варианте осуществления изобретения SEQ ID NO: 5, раскрытая в настоящем изобретении, является вариантом SEQ ID NO: 1 с модификацией T1S в положении 1; C76G в положении 76 и с присоединением цистеина на C-конце, то есть в положении 142.

В последующем варианте осуществления изобретения SEQ ID NO.8, раскрытая в настоящем изобретении, представляет собой вариант SEQ ID NO.5 со вставкой аминокислоты серина в положении 142 между глицином (положение 141) и цистеином (С-конец).

SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5 и 8 имеют гомологию 97,9%, 96,5%, 91,5%, 96,45% и 96,45% к SEQ ID NO:1 соответственно (определяется по алгоритму EMBOSS Needle).

Согласно одному из аспектов, лектиновые белки, составляющие предмет настоящего изобретения, получают по рекомбинантной технологии. Термин «рекомбинантный» означает, что нуклеиновая кислота или полипептид подверглись искусственному или синтетическому (то есть не природному) изменению в результате вмешательства человека. Альтерацию можно выполнять на материале, как находящемся в естественных условиях или состоянии, так и вне таковых. Например, «рекомбинантная нуклеиновая кислота» — это кислота, получаемая в результате рекомбинации нуклеиновых кислот, например во время клонирования, перестановки в ДНК или других известных молекулярно-биологических процедур. «Рекомбинантная молекула ДНК» состоит из сегментов ДНК, соединенных посредством таких молекулярно-биологических методов. В настоящем документе под термином «рекомбинантный белок» или «рекомбинантный полипептид» понимают полипептидную молекулу, экспрессируемую по методу рекомбинантных ДНК.

В некоторых вариантах осуществления лектиновый белок, составляющий предмет настоящего изобретения, можно получать в результате процессов, раскрытых в патентной заявке WO 2010/095143, WO 2014/203261, WO 2020/044296 или ранее поданной заявителем заявке на технологический патент WO2020074977 или любым другим методом, известным специалистам.

Термин «рекомбинантный белок» в данном документе относится к любой фармацевтически приемлемой соли, сольвату, гидрату, пролекарству или любому другому соединению, способному обеспечивать (прямо или косвенно) наличие соединения, описанного в данном документе. Соли, сольваты, гидраты и пролекарства можно получить известными специалистами методами. Согласно частному аспекту настоящего изобретения, L представляет собой рекомбинантный белок, выбираемый из группы, содержащей SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 8. Согласно очень частному аспекту, L — рекомбинантный белок, выбираемый из SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 8.

В одном из аспектов настоящего изобретения D в формуле I представляет собой цитотоксический агент, терапевтический агент, диагностический агент или соединение, содержащее цитотоксический агент или терапевтический агент. Согласно одному из аспектов, D может выбираться из группы, состоящей из ДНК-связывающего агента, ингибитора полимеризации тубулина, антиметаболита, алкилирующего или ему подобного противоопухолевого агента, ингибитора топоизомеразы I, ингибитора топоизомеразы II, ингибитора киназы, бортезомиба, эстрамустина, иксабепилона, эверолимуса, темсиролимуса, неомицина, неамина, криптофицина, дискодермолида, аманитина, или его пирролобензодиазепинового димера, или фармацевтически приемлемой соли, полиморфной формы или сольвата. Согласно одному из аспектов, D выбирается из группы, состоящей из ДНК-связывающего агента, такого как блеомицин, нетропсин или дистамицин или их аналогов, таких как лекситропсины, ендиин, митомицин, дуокармицин. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения, блеомицин можно выбирать из числа веществ, неограничивающими примерами которых являются блеомицин A₂, блеомицин B₂, либлоницин, блеомицин, замещенный бутиламино-3-пропиламино-3-пропиламино (BAPP), таллусомицин S10b (TLM S10b) или их смеси, ендиин, например, можно выбирать из группы, в состав которой входит неокарциностафин, C-1027, гольфомицин A, калихимицины, такие как калихимицин гамма 1 или калихимицин омега 1; эсперамицины, такие как эсперамицин A1, эсперамицин A1b, эсперамицин A2, эсперамицин A3, эсперамицин A4, эсперамицин B1, эсперамицин B2 и эсперамицин X; динемидин или динемидин A или лидамицин; митомицин можно выбирать из группы, в состав которой входит митомицин A, митомицин B или митомицин C; неограничивающими примерами дуокармицина являются дуокармицин A, дуокармицин B1, дуокармицин B2, дуокармицин C1, дуокармицин C2, дуокармицин D, дуокармицин SA или CC-1065 и его синтетические аналоги, такие как адозелезин, карцезелезин или бизелезин; другими неограничивающими примерами ДНК-связывающих агентов являются дактиномицин, пептид, такой как эхиномицин, и другие подобные агенты, указанные в разделе «противоопухолевые препараты, действующие через химические радикалы» (C. A. Lopez et al. medicinal chemistry of anticancer drugs, chapter 4, pages 133 – 195, Dec 2015), или ионные жидкости, указанные в разделе «изучение синтеза, характеристик, связывания ДНК, противоопухолевого действия и молекулярной стыковки новых ионных жидкостей на

основе имидазола с фторированными фенилацетамидными привязками» (N Rezki et al. ACS Omega, volume 5, pages 4807 – 4815, 2020).

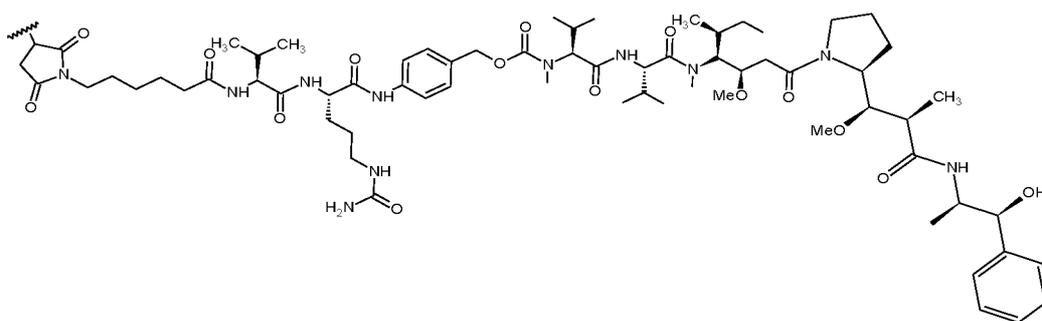
В одном из вариантов осуществления изобретения D можно выбирать из числа ингибиторов полимеризации тубулина, таких как ауристин, майтанзин или его производное майтанзиноид. Соединения этих классов являются хорошо известными нагрузками, используемыми в синтезе конъюгатов антитело-лекарственное вещество. Неограничивающими примерами соединений этого класса являются доластатин или его аналоги, в том числе доластатин 10, монометилауристин E (MMAE), монометилауристин F (MMAF) или PF-063801010 и любые другие производные ауристина, указанные в разделе «нагрузки конъюгатов антитело-лекарственное вещество – изучение производных ауристина» (M. Akaiwa et al. Chemical pharma bulletin, volume 68, page 201-211, 2020), майтанзиноиды, такие как DM1, DM4 или DM 21. Другими неограничивающими примерами ингибиторов полимеризации тубулина могут служить алкалоиды барвинка, такие как винбластин, винкристин, виндезин или винорелбин; колхицин или его производные, таксан, такой как паклитаксел, доцетаксел или кабазитаксел, комбретастатин, такой как комбретастатин A-4, комбретастатин A-4 фосфат (CA-4P), эпотилон, такой как эпотилоны A, эпотилоны B, эпотилоны C или эпотилоны D, эрибулин, плинабулин, демеколцин, нокодазол, элеутеробин, ризоксин, этидиум бромид или верубулин. В одном из вариантов осуществления изобретения D выбирают из числа неограничивающих примеров антиметаболитов, таких как капецитабин, гидроксимочевина, гемцитабин, метотрексат, меркаптопурин, капецитабин, гидроксимочевина, гемцитабин, метотрексат, меркаптопурин, кладрибин, пралатрексат, ралтитрексед флударабин, пеметрексед, тиогуанин, флоксурин, цитарабин, азациитидин, децитабин, клофарабин, неларабин, 5-флуороурацил или кармофур; или ингибитор топоизомеразы II, такой как даунорубицин, доксорубицин или его производные, такие как морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин и деоксидоксорубицин, эпирубицин, идарубицин, митоксантрон, валрубицин, этопозид, тенипозид или антрахиноны; или ингибитор топоизомеразы I, такой как иринотекан, SN-38, говитекан, камптотецин, экзатекан (Dxd 1), дерукстекан, топотекан; или алкилирующие и ему подобные ему противоопухолевые агенты, такие как мустарген, такой как азотистый иприт, циклофосфамид, хлорамбуцил, урамустин, мелфалан и бендамустин; производные этиленимина, такие как азиридин, диметиленимин, этиленимин; или производное

метиленимина или алкилсульфонат, такой как бусульфан, импросульфан или пипосульфан или нитрозомочевина, такая как арабинопиранозил-N-метил-N-нитрозомочевина, кармустин, хлорозотоцин, этилнитрозомочевина (ENU), фотемустин, ломустин, нимустин, N-нитрозо-N-метилмочевина (NMU), ранимустин, семустин, стрептозоцин (стрептозотоцин); платиносодержащий противоопухолевый агент, такой как цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, недаплатин и лобаплатин; ингибитор киназы, такой как сорафениб, кризотиниб, нилотиниб, gefitinib, регорафениб, афатиниб, лапатиниб, ваталаниб, афлиберцепт, акситиниб, понатиниб, сунитиниб, пазопаниб, бозутиниб, дазатиниб, эрлотиниб, иматиниб, руксолитиниб, лестауртиниб, AC-430, AC-480, AMG-458 или вандетаниб; пирролбензодиазепиновый димер, такой как тезирин, SG2202, SG3199, талирин, SG2000, SJG-136, SG2285 или SG3376 или его фармацевтически приемлемая соль, полиморфная форма или сольват.

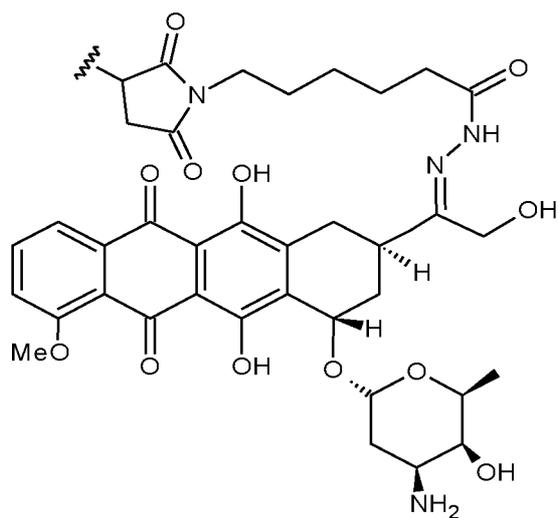
В одном из вариантов осуществления изобретения D можно далее выбирать из числа неограничивающих примеров, к которым относятся бортезомиб, сутент, летрозол, фулвестрант, лейковорин сиролимус, лонафарниб, камптотецин (в том числе синтетический аналог топотекан); криптофицины (в частности, криптофицин 1 и криптофицин 8); элеутеробин; панкреатистатин; спонгистатин; хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мелфалан, преднимустин, трофосфамид, хромофор (хромопротеин-ендиинные антибиотические хромофоры), аклациномицины, аутрамицин, азасерин, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромомицины, марцелломицин, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфирамицин, пурамицин, квелаамицин, стрептонигрин, туберцидин, убенимекс, циностатин; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепителиостан, тестолактон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; демеколцин; диазиквон; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; разоксан; сизофиран; спирогерманий; триазиквон; трихотецины (особенно токсин T-2, верракурин A, роридин A и ангвидин); митобронитол; митолактол; пипоброман; арабинозид (Ara-C) 6-тиогуанин; диформетилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как

ретиноевая кислота; дакарбазин. D можно использовать в исходном виде или в виде соли или производных. D может представлять собой наиболее активный изомер, в том числе стереоизомер или любой другой изомер с умеренной или высокой цитотоксичностью. D также можно выбирать из числа токсинов (рицин, абрин, экзотоксин *Pseudomonas* (PE) или пептидов (WT1, GV1001, PAP-114-128, Erbb-2, TCP-1, ANP, F56) или конструкций PROTAC-типа (BETd-260, MZ1ARV-771), имеющих цитотоксическое действие, которые хорошо известны специалистам.

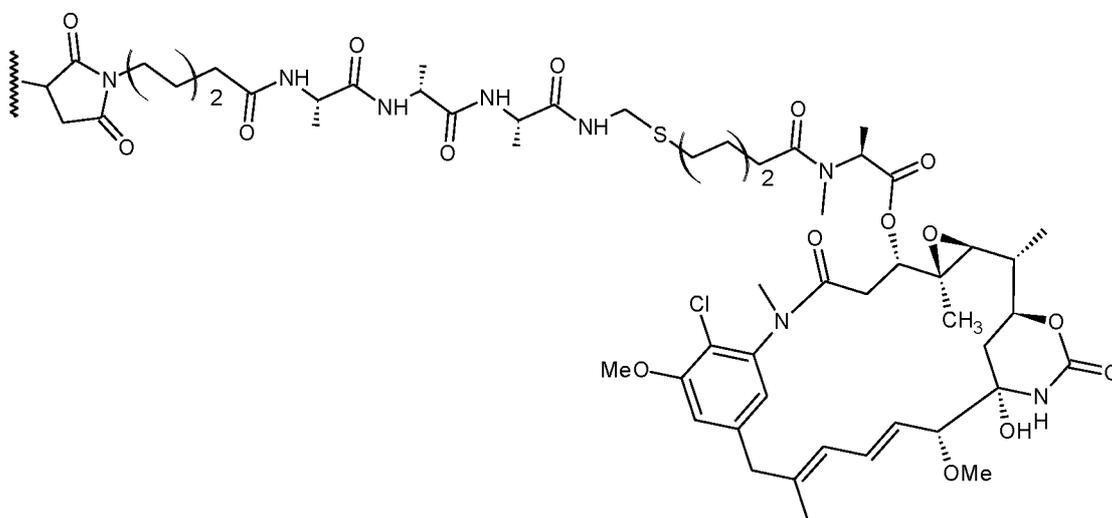
В одном из вариантов осуществления изобретения D можно выбирать из числа соединений, содержащее цитотоксический агент, терапевтический агент или диагностический агент. Подобные соединения могут содержать линкер или часть линкера наряду с цитотоксическим агентом или терапевтическим агентом. Такой линкер или часть линкера способствуют присоединению D к L. Ниже приведены некоторые неограничивающие примеры подобных соединений, содержащих цитотоксические агенты или терапевтические агенты, где M – малеимид, C – капроильная группа, V, S, A, G, F – аминокислоты валин, цитруллин, аланин, глицин, фенилаланин, а PAB – пара-аминобензилоксикарбонил. N-сукцинимидил-4-тиобуаноат-DM4 образуется при реакции DM4 с линкером, таким как N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)буаноат (SPDB), N-сукцинимидил 4-(малеимидометил)циклогексанкарбоксилат (SMCC).



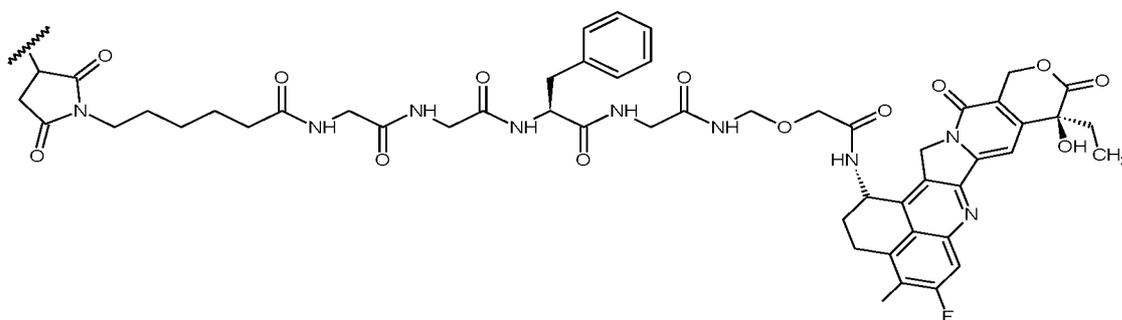
MC-VC-PAB-MMAE;



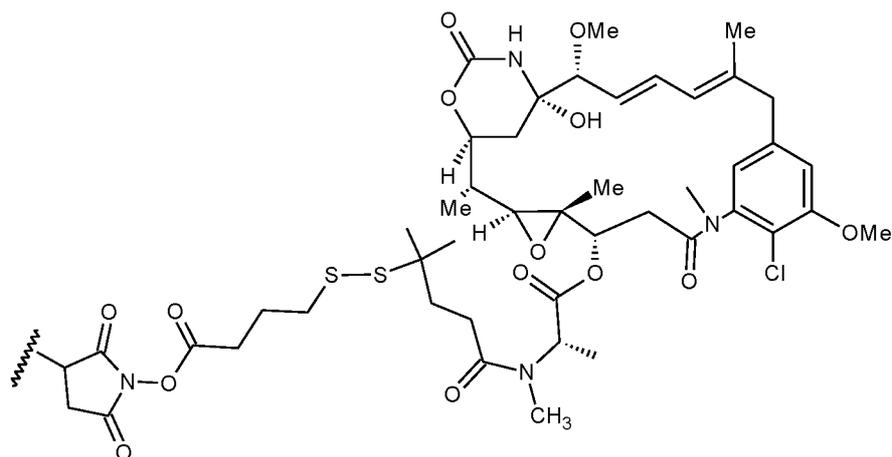
mC-Гидразон-доксорубицин;



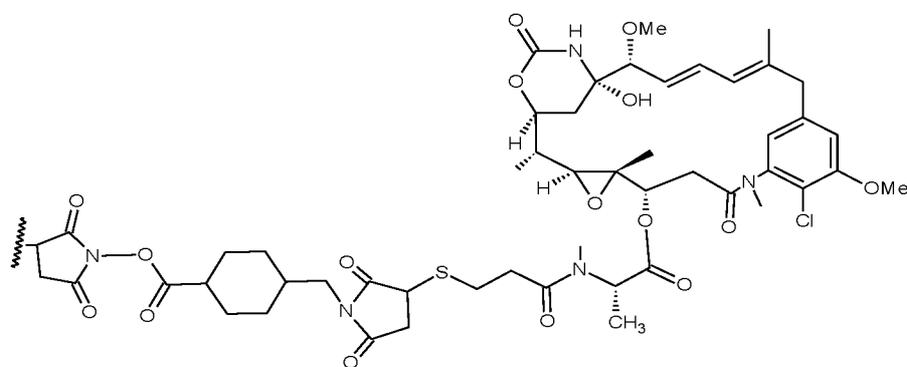
SC-AA'A-DM21-C (где A' – D-аланин, а A – L-аланин);



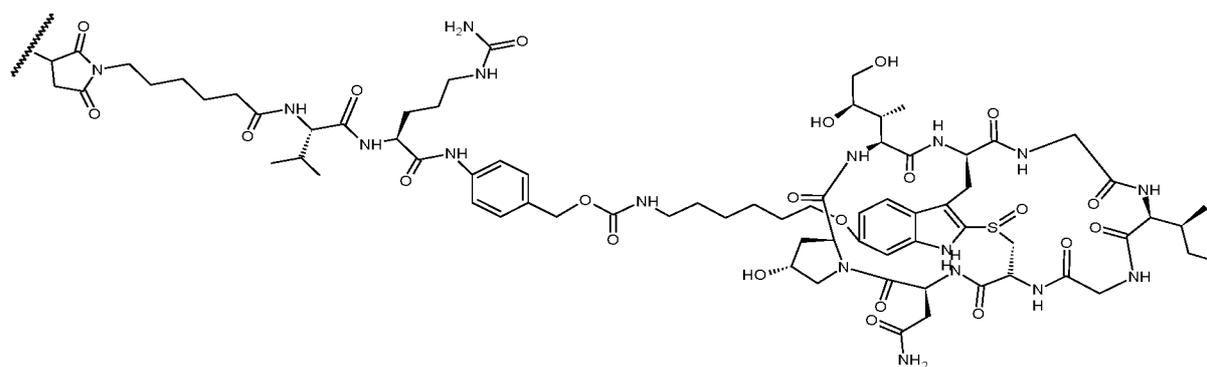
mC-GGFG-NH-CH₂-экзатекан;



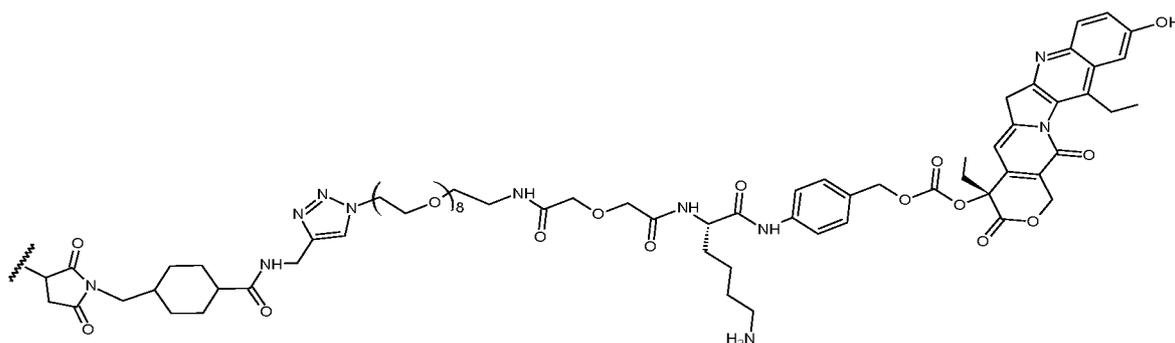
N-Сукцинимидил-4-тиобутаноат-DM4;



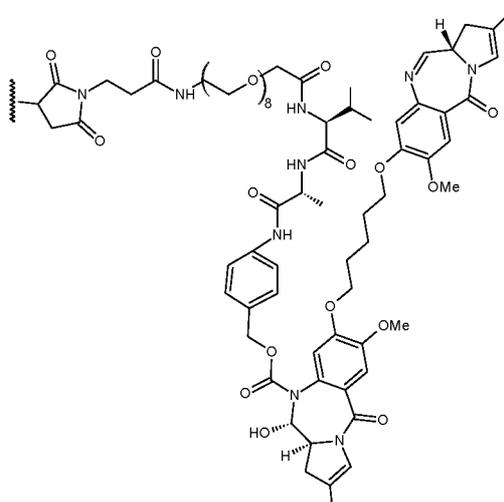
SMCC-DM1;



mc-vc-PAV-C6-α-Аманитин;



Линкер – SN38 или говитекан;



Линкер – SG3249 или теziрин

В частном варианте осуществления изобретения цитотоксические агенты выбирают из группы, состоящей, в частности, из MMAE (мометилауристин E), доксорубина, DM1, DM4, DM21, альфа-аманитина, DXd1, SG3249, SN38, связанных с линкером, выбираемым из, в частности, mс-vc-PAB (малеимидокапроил-валин-цитруллин-парааминобензоат), SMCC (сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат, SPDB (N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио) бутаноат), mс-vc-PAB-C6 (малеимидокапроил-валин-цитруллин-парааминобензоат-C6), mс-гидразона.

Согласно одному из аспектов настоящего изобретения, соединение D можно получить в соответствии с любым процессом, известным специалистам. Применительно к настоящему изобретению D приобретали на рынке.

Лектиновый белок L может быть присоединен к D или к A¹ или к A² в отсутствие A¹ через его свободную аминогруппу (-NH- или -NH₂) таких аминокислот, как лизин, аргинин, или через его свободную тиольную группу (-SH) аминокислоты, такой как цистеин, или его свободную кислотную группу (-COOH) аминокислоты, такой как аспарагиновая кислота, или его свободную OH-группу, присутствующую в аминокислотах, таких как серин. Специалисту следует понимать, что все эти группы лектина могут образовывать связь с реактивными встречными группами в D или A¹ или A² в отсутствие A¹, в результате чего более одного звена D или -A¹-A²-A³-D будет присоединяться к одному звену L.

В одном из аспектов настоящего изобретения одно звено лектинового белка L может присоединяться к по меньшей мере одному звену D. В одном из вариантов осуществления изобретения одно звено лектинового белка может присоединяться к более чем одному звену D. В другом воплощении одно звено лектинового белка может присоединяться к по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 звеньям D. В конъюгатах антитело-лекарственное вещество такое отношение называется отношением лекарственного средства к антителу (DAR). В настоящем изобретении отношение лекарственного средства к лектину известно как DAR, а в одном из вариантов осуществления изобретения DAR может лежать в пределах от примерно 1 до примерно 9, при этом DAR может быть как целым, так и нецелым числом. Например, значение DAR может быть равным 2 или 2,5, что может указывать на то, что некоторые звенья лектина могут присоединяться к более чем 2 единицам цитотоксического агента или терапевтического агента. В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения DAR может предпочтительно лежать в диапазоне от примерно 1 до примерно 5.

Согласно одному аспекту, значение DAR можно определять методами, известными специалистам. Одним из методов определения DAR может быть определение массы образующегося продукта. Специалисту в данной области знаний следует понимать, что массу продукта можно определить с помощью химического анализа или масс-спектрометрии или другими подобными методами, такими как жидкостная хромато-масс-спектрометрия (ЖХМС). Если рассчитывается масса продукта (путем сложения масс всех атомов в продукте) с переменным числом единиц цитотоксического агента или терапевтического агента, и полученная в результате анализа масса указывает на определенный продукт с определенным числом единиц цитотоксического агента или терапевтического агента, то соответствующее значение принимается за DAR.

Например, если масс-спектрометрия показывает пик при значении массы, соответствующем массе лектинового белка с 2 единицами цитотоксического агента, то значение DAR равно 2. Специалисту очевидно, что в масс-спектре может быть более одного пика, который соответствует разным DAR, и в этом случае DAR определяют по относительному процентному содержанию разных лекарственных соединений и получают среднее значение.

В одном из аспектов настоящего изобретения связь «—» между L и D может быть ковалентной связью или ковалентно-координационной связью. Специалисту очевидно, что «ковалентная связь» — это связь, образующаяся между двумя атомами в виде общей электронной пары. «Ковалентно-координационная связь» — это ковалентная связь, образующаяся между двумя атомами, в которой общая пара электронов принадлежит одному из атомов. Тип образующейся связи зависит как от лектинового белка L, так и от D. В предпочтительном варианте осуществления изобретения связь «—» между L и D является ковалентной.

Согласно другому аспекту, количество «—» зависит от значения DAR n в формуле I. В некоторых вариантах осуществления изобретения значение n для D будет тем же, что и значение n для «—»

Согласно другому аспекту настоящего изобретения, связь «—» между L и D может представлять собой группу по формуле «—A¹-A²-A³—», в которой формула «A¹-A²-A³» представляет собой линкер между L и D и в которой L образует связь с A¹, а D образует связь с A³. Связь между L и A¹ и между D и A³ может быть ковалентной или ковалентно-координационной. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения связь между L и A¹ и между D и A³ является ковалентной.

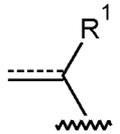
Группа с формулой «—A¹-A²-A³—» считается линкером между L и D. Специалисту очевидно, что линкер может входить в состав продуктов, составляющих предмет настоящего изобретения, по нескольким причинам. Например, линкер добавляют, чтобы снизить стерическую изоляцию между лектином и агентом D или чтобы повысить стабильность или растворимость продуктов либо обеспечить их безопасность для терапевтического применения, чтобы они не разрушались в организме до достижения мишени, а также для достижения этих целей в совокупности.

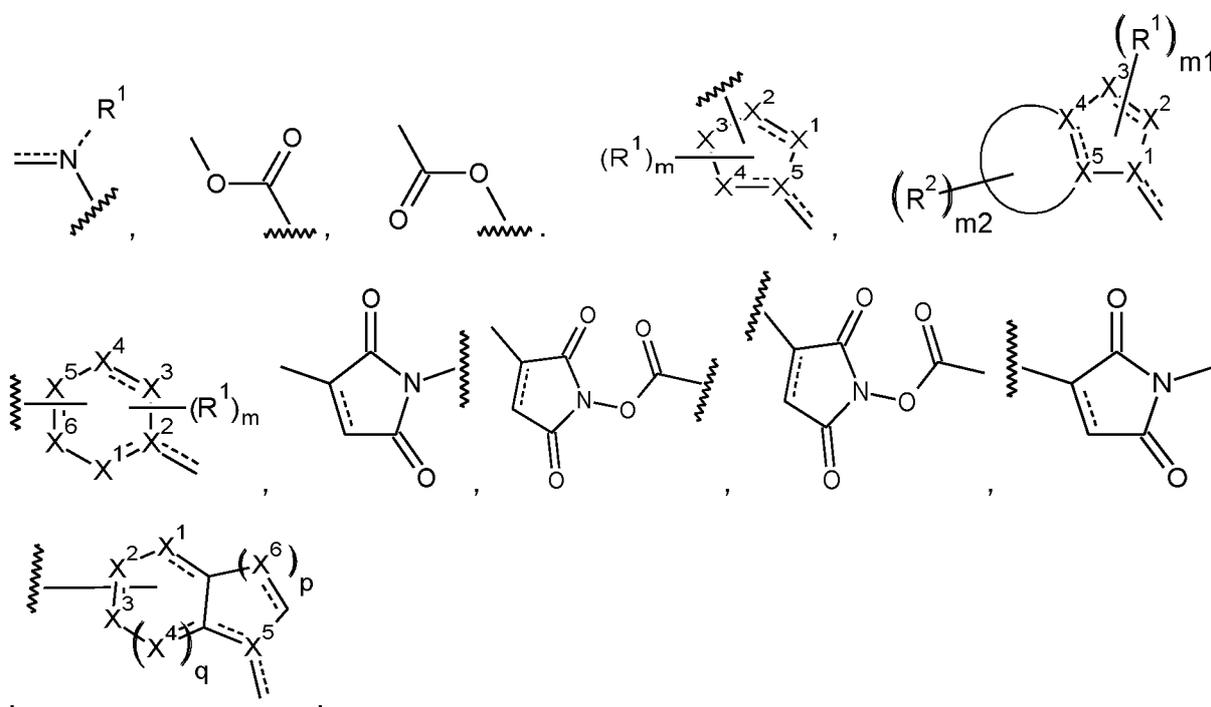
Применительно к настоящему изобретению линкер можно выбирать или получать на усмотрение специалиста или по ссылкам, таким как Linkers having crucial role in antibody drug conjugate (Jun Lu et al., Int. J. Mol. Sci 17, 561, 2016.); Current ADC linker

chemistry (NareshkumarJain et al., Pharm Res 32: 3526-3540, 2015,); Perspectives about self-immolative drug delivery systems (Rodrigo et al., Journal of Pharmaceutical Sciences 109, , 3263-3281, 2020); Self hydrolysing maleimides improve the stability and pharmacological properties of anti-body drug conjugates (Robert et al., Nature Biotechnology, 32, Number 10, 2004).

В одном из аспектов настоящего изобретения A^1 и A^3 независимо выбирают из:

$-CR^1R^2-$, $-C(O)-$, $-C(O)NR^1-$, $-NR^1C(O)-$, $-NR^1-$, $-O-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-$

$R^1C=CR^2-$, $-C\equiv C-$, $-R^1C=CR^2-R^3C=CR^4-$, $-R^1C=C=CR^2-$, $-C(=NR^1)-$, 



Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, A^1 и A^3 могут быть одинаковыми или разными.

Согласно другому варианту осуществления изобретения, m , m_1 и m_2 независимо друг от друга равны 0, 1, 2, 3 или 4, где m , m_1 или $m_2 = 0$ указывает на отсутствие заместителя R^1 или R^2 , а m , m_1 или $m_2 = 1$ указывает на присутствие одного R^1 или R^2 в качестве заместителя в кольце и так далее для m , m_1 или $m_2 = 2, 3$ или 4. Специалисту следует понимать, что значения m , m_1 и m_2 не зависят друг от друга.

Согласно еще одному варианту осуществления изобретения, p равно 1 или 2, а q равно 0 или 1. Когда p равно 1, ароматическое, циклическое или неароматическое кольцо является 5-членным, а когда p равно 2, кольцо является 6-членным.

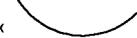
Аналогично, когда q равно 0, ароматическое, циклическое или неароматическое кольцо является 5-членным, а когда оно равно 1, кольцо является 6-членным.

Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, «» указывает точку присоединения A^2 к A^1 или A^3 . Для специалиста будет очевидно, что другой конец A^1 и A^3 соединяется с L и D соответственно.

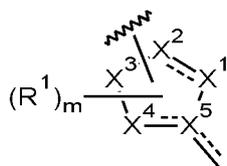
Согласно другому аспекту, «» указывает на одиночную или двойную связь.

Специалисту следует понимать, что, если не указано иное, валентность атома будет соблюдена путем присоединения к нему или удаления водорода.



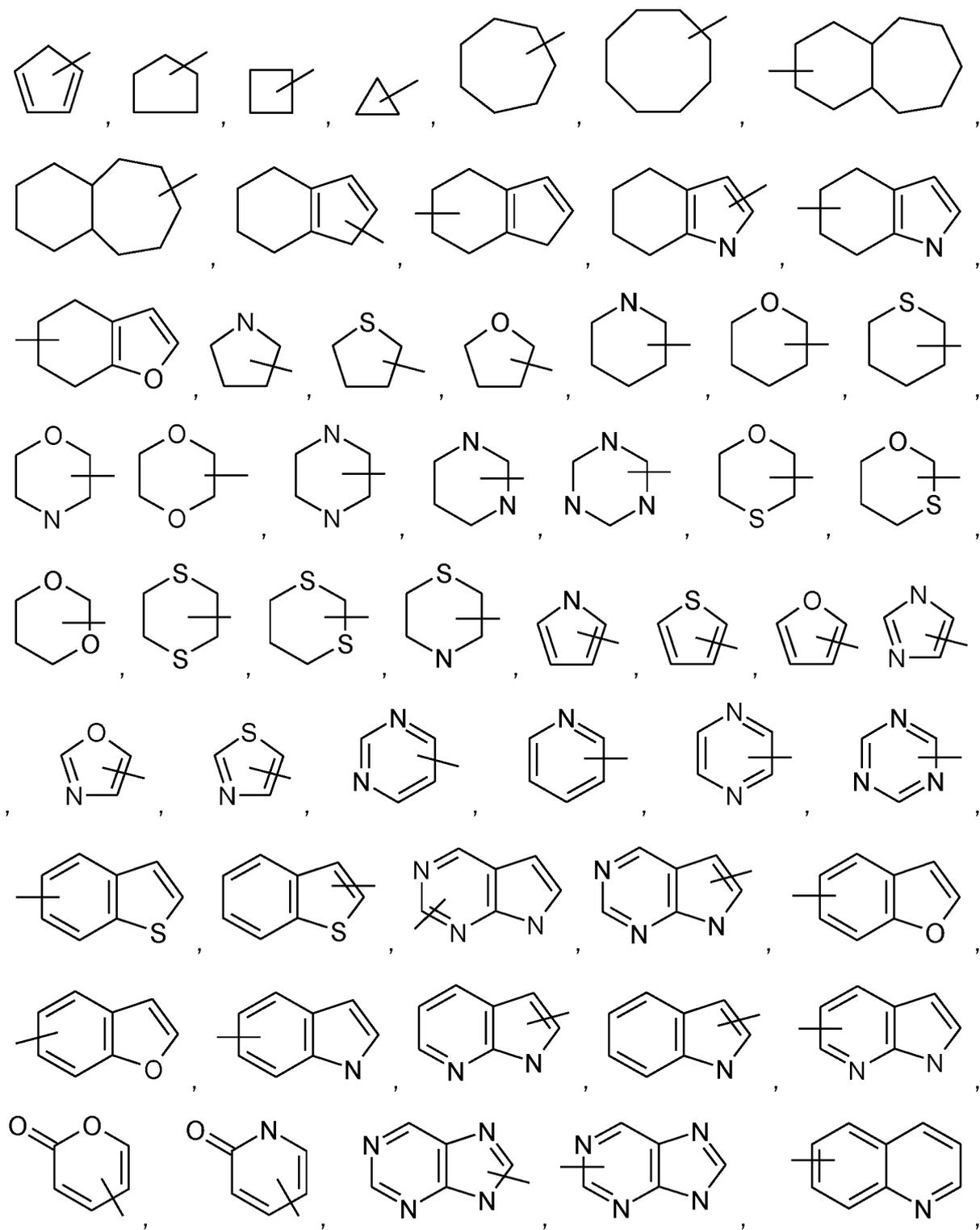
«» указывает на 5–10-членное кольцо, включая атомы кольца, с которым оно сочленено, причем 5–10-членное кольцо представляет собой ароматическое, неароматическое или циклоалкильное кольцо или гетероароматическое или гетероциклоалкильное кольцо, причем гетероароматическое или гетероциклоалкильное кольцо содержит по меньшей мере один гетероатом, выбираемый из N, O или S.

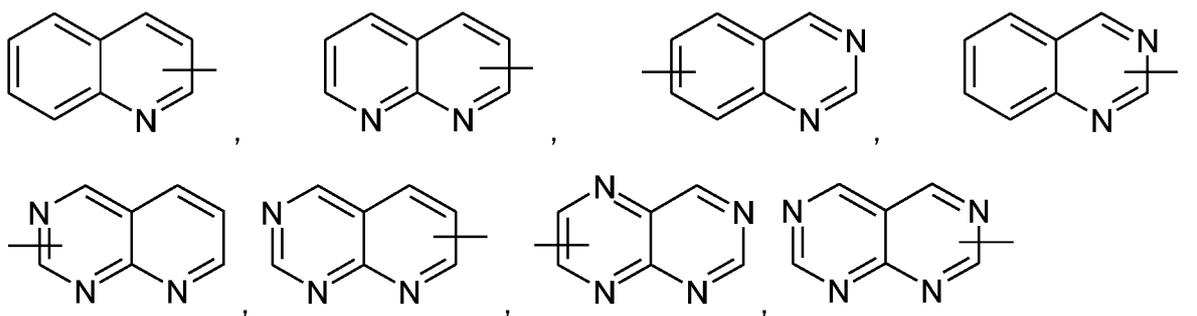
Эти атомы обозначают как X^1 , X^2 , X^3 , X^4 , X^5 и X^6 и независимо выбирают из числа C, CH, CH_2 , N, NH, O или S. Специалисту следует понимать, что все X могут быть как одинаковыми, так и разными, а количество атомов водорода при X подбирается согласно валентности и числу образованных им связей.



Например, в соединении по данной формуле 2 из 5 X могут быть N или NH, а 3 могут быть C, CH или CH_2 . Специалисту хорошо знакомы и понятны такие интерпретации, и ему следует считать подобные переменные применительно в качестве варианта осуществления настоящего изобретения.

В A^1 и A^3 в соответствии с представлениями и пониманием специалиста можно выбирать циклические, гетероциклические, ароматические и гетероароматические соединения. К примерам таких соединений относятся фенил, бензил, толуол, нафтил, циклогексил,

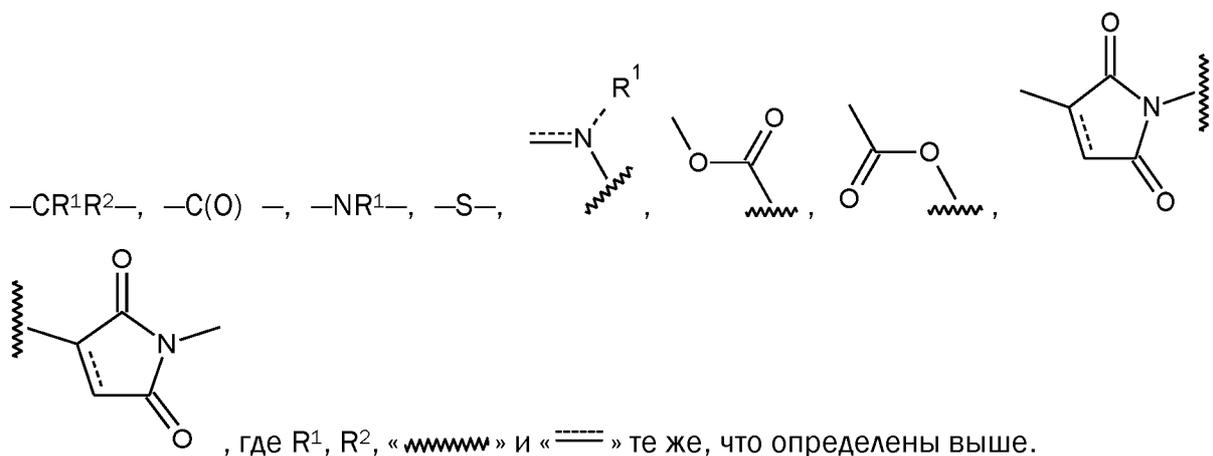




Специалисту следует понимать, что показанная в приведенной выше структуре связь является связью между D и структурой. Связь с D может быть с любым атомом углерода или гетероатомом в указанных выше структурах. Валентность углерода и гетероатома соблюдается за счет присоединенного к нему водорода.

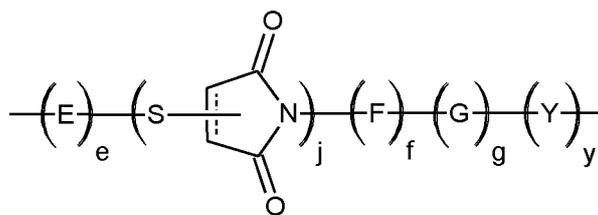
В одном из аспектов настоящего изобретения R^1 , R^2 , R^3 и R^4 в A^1 и A^3 независимо выбирают из водорода, C_1 - C_5 -алкила, C_2 - C_5 -алкенила, C_2 - C_5 -алкинила, C_1 - C_5 -алкилена, C_3 - C_{10} -циклоалкила, C_6 - C_{10} -арила, C_2 - C_9 -гетероарила, $-OR^5$, $-NR^5$, $-SR^5$, галогена, который может можно выбрать из фтора, хлора, брома или йода, $-C(O)OR^5$, в котором C_1 - C_5 -алкил, C_2 - C_5 -алкенил, C_2 - C_5 -алкинил, C_1 - C_5 -алкилен, C_3 - C_{10} -циклоалкил, C_2 - C_9 -гетероциклоалкил, C_6 - C_{10} -арил и C_2 - C_9 -гетероарил дополнительно имеет заместитель R^6 , а R^5 и R^6 являются водородом, C_1 - C_3 -алкилом, OH или галогеном.

Согласно одному из аспектов, A^1 и A^3 можно выбирать из



Согласно другому, более предпочтительному аспекту, A^1 может представлять собой $-C(O)-$.

Согласно одному из аспектов настоящего изобретения, A^2 в группе « $-A^1-A^2-A^3-$ » имеет формулу:



В одном из аспектов e , j , f , g и y независимо друг от друга равны 0 или 1. Специалисту следует понимать, что если e , j , f , g и y равны 0, то соответствующие группы в A^2 отсутствуют. Согласно частному аспекту настоящего изобретения, e , f и y не могут быть одновременно равны 0, и поэтому группы E, F и Y не могут отсутствовать у одного и того же продукта, образованного согласно данному аспекту. В настоящем изобретении A^1 образует связь с E или S или F, а A^3 соединено с Y или G.

Согласно одному из аспектов, S в A^2 — атом серы, а E, F и Y— спейсер. Когда присутствует спейсер, он расширяет конфигурацию связующего звена, чтобы обеспечить большее расстояние между лектиновым белком и агентом D. Спейсер также может менять физико-химические свойства готовых продуктов, составляющих предмет настоящего изобретения, в зависимости от компонентов спейсера. Спейсер может быть добавлен с целью повышения растворимости продукта и может содержать одну или несколько повышающих растворимость групп, таких как ионные группы или водорастворимые полимеры. Водорастворимые полимеры обычно содержат какой-либо сегмент или полимер, растворимый в воде при комнатной температуре, в том числе полиэтиленгликолевые группы, а также другие полимеры, такие как полиэтиленимины.

В одном из аспектов настоящего изобретения E, F и Y независимо выбирают из $-R^7-$, $-S-$, $-NH-$, $-R^7-N-R^8-$, $-R^8-NC(O)-R^7-$, $-R^8-C(O)N-R^7-$, $-C(O)-$, $-C(O)-R^7-$, $-R^7-C(O)-$, $-R^8-C(O)-R^7-$, $-S-R^7-$, $-R^7-S-$, $-R^7-S-R^8-$, $-S(O)-$, $-S(O)-R^7-$, $-R^7-S(O)-$, $-R^7-S(O)-R^8-$, $-O-R^7-$, $-R^7-O-$, $-R^8-O-R^7-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-R^7-$, $-R^7-OC(O)-$, $-R^8-OC(O)-R^7-$, $-R^7-OC(O)O-$, $-OC(O)O-R^7-$, $-R^7-OC(O)O-R^8-$, $-NH-R^7-NH-C(O)R^8-$, $-(CH_2)S-NH-R^7-$, $-R^7-C(O)N(CH_2)_{1-3}O(CH_2)_{1-3}C(O)-$, $-R^7-NC(O)(CH_2)_{1-3}O(CH_2)_{1-3}C(O)-$, $-Si(R^7R^8)-$, полиалкиленгликоля, который может быть через кислород присоединен к $-R^7-$, $-S-$, $-NH-$, $-R^7-N-R^8-$, $-R^8-NC(O)-R^7-$, $-R^8-C(O)N-R^7-$, $-C(O)-$, $-C(O)-R^7-$, $-R^7-C(O)-$, $-R^8-C(O)-R^7-$, $-S-R^7-$, $-R^7-S-$, $-R^7-S-R^8-$, $-S(O)-$, $-S(O)-R^7-$, $-R^7-S(O)-$, $-R^7-S(O)-R^8-$, $-O-R^7-$, $-R^7-O-$, $-R^8-O-R^7-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-R^7-$, $-R^7-OC(O)-$, $-R^8-OC(O)-R^7-$, $-R^7-OC(O)O-$, $-OC(O)O-R^7-$, $-R^7-OC(O)O-R^8-$, $-NH-R^7-NH-C(O)R^8-$, $-(CH_2)S-NH-R^7-$, $-R^7-C(O)N(CH_2)_{1-3}O(CH_2)_{1-3}C(O)-$, $-R^7-NC(O)(CH_2)_{1-3}O(CH_2)_{1-3}C(O)-$, $-Si(R^7R^8)-$.

Согласно одному предпочтительному варианту осуществления изобретения, E можно выбирать из $-R^7-N-R^8-$, $-R^8-NC(O)-R^7-$, $-R^8-C(O)N-R^7-$, $-C(O)-R^7-$, $-R^7-C(O)-$, $-R^8-C(O)-R^7-$, полиалкиленгликоля, который может быть через кислород присоединен к $-R^7-N-R^8-$, $-R^8-NC(O)-R^7-$, $-R^8-C(O)N-R^7-$, $-C(O)-R^7-$, $-R^7-C(O)-$, $-R^8-C(O)-R^7-$.

В одном из вариантов осуществления изобретения R^7 и R^8 в E, F или Y независимо выбирают из группы, содержащей водород, $-C_1-C_{10}$ -алкилен, $-C_1-C_{10}$ -алкенилен, насыщенный или ненасыщенный C_5-C_{10} -циклоалкилен, $-C_1-C_{10}$ -алкенилен-насыщенный или ненасыщенный C_5-C_{10} -циклоалкилен, C_5-C_{10} -арилен, $-C_1-C_{10}$ -алкенилен- C_6-C_{10} -арилен, C_2-C_9 -гетероарилен, $-C_1-C_{10}$ -алкенилен- C_2-C_9 -гетероарилен; и в которой $-C_1-C_{10}$ -алкилен, $-C_1-C_{10}$ -алкенилен, насыщенный или ненасыщенный C_5-C_{10} -циклоалкенилен, $-C_1-C_{10}$ -алкенилен-насыщенный или ненасыщенный C_5-C_{10} -циклоалкилен, C_5-C_{10} -арилен, $-C_1-C_{10}$ -алкенилен- C_6-C_{10} -арилен, C_2-C_9 -гетероарилен и $-C_1-C_{10}$ -алкенилен- C_2-C_9 -гетероарилен могут иметь дополнительные заместители в виде -OH, -C(O), -SH, -NH₂, галогена, C_1-C_5 -алкила, -NO₂, -CN. Определения и значения терминов алкилен, алкенилен, циклоалкилен, гетероарилен известны специалистам или могут толковаться в соответствии с данными выше определениями.

В другом воплощении полиалкиленгликоль в E, F или Y может представлять собой гомополимер или сополимер алкена, где каждое алкеновое звено имеет C_1-C_8 атомов углерода, а общее количество алкеновых звеньев лежит в диапазоне от 1 до 20. В предпочтительном варианте осуществления изобретения каждое алкиленовое звено может иметь длину от C_2 до C_5 , а число алкиленовых звеньев может лежать в пределах от 1 до 15.

Согласно одному из аспектов, когда полиалкиленгликоль — это E, конец $-CH_2-$ присоединен к A^1 , а когда полиалкиленгликоль — это F, конец $-CH_2-$ присоединен к $-R^7-$, $-S-$, $-NH-$, $-R^7-N-R^8-$, $-R^8-NC(O)-R^7-$, $-R^8-C(O)N-R^7-$, $-C(O)-$, $-C(O)-R^7-$, $-R^7-C(O)-$, $-R^8-C(O)-R^7-$, $-S-R^7-$, $-R^7-S-$, $-R^7-S-R^8-$, $-S(O)-$, $-S(O)-R^7-$, $-R^7-S(O)-$, $-R^7-S(O)-R^8-$, $-O-R^7-$, $-R^7-O-$, $-R^8-O-R^7-$, $-C(O)O-$, $-OC(O)-R^7-$, $-R^7-OC(O)-$, $-R^8-OC(O)-R^7-$, $-R^7-OC(O)O-$, $-OC(O)O-R^7-$, $-R^7-OC(O)O-R^8-$, $-NH-R^7-NH-C(O)R^8-$ или $-(CH_2)S-NH-R^7-$, $-R^7-C(O)N(CH_2)_{1-3}O(CH_2)_{1-3}C(O)-$ или $-R^7-NC(O)(CH_2)_{1-3}O(CH_2)_{1-3}C(O)-$.

В некоторых аспектах настоящего изобретения A^1 и E или A^3 и Y могут сочетаться и образовывать единое звено. В такой ситуации может быть сложно указать и

дифференцировать A¹ и E или A³ и Y. Такие ситуации вполне в пределах понимания и знаний специалистов.

В некоторых аспектах настоящего изобретения звено спейсера F и Y может иметь в своем составе расщепляемое звено. В другом аспекте F и Y могут быть соединены расщепляемым звеном, таким как G. Расщепляемое звено способно образовывать расщепляемую связь в линкере. Такая связь может быть образована со спейсером Y или с A³. В одном варианте осуществления изобретения, где отсутствует Y или A³, расщепляемая связь образуется непосредственно с агентом D.

К реакционно-способным группам для образования расщепляемых связей могут относиться, например, сульфгидрильные группы для образования дисульфидных связей, альдегидные, кетонные или гидразидные группы для образования гидразонных связей, карбоксильные или аминокислотные группы для образования пептидных связей и карбоксильные или гидроксильные группы для образования сложноэфирных связей. Природа расщепляемого звена может широко варьироваться. Например, расщепляемые линкеры могут иметь в своем составе дисульфид-содержащие линкеры, расщепляемые посредством дисульфидного обмена кислото-лабильные линкеры, расщепляемые при кислотном pH, и линкеры, расщепляемые такими ферментами, как гидролазы, пептидазы, эстеразы и глюкокоронидазы. Расщепляемое звено может содержать один или несколько сайтов расщепления.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения расщепляемым звеном является G. G может иметь в своем составе одну аминокислоту или одну или несколько аминокислотных последовательностей. В частном варианте осуществления изобретения G представляет собой пептидную цепь, содержащую 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислот. Таким образом, G может представлять собой монопептидное, дипептидное, трипептидное, тетрапептидное, пентапептидное, гексапептидное, гептапептидное, октапептидное, нонапептидное, декапептидное, ундекапептидное или додекапептидное звено. Каждая аминокислота может быть природной или синтетической и/или D- или L-изомером, конечно, при условии наличия расщепляемой связи. В некоторых вариантах осуществления G может иметь в своем составе только природные аминокислоты. В некоторых аспектах G может иметь в своем составе от 1 до 12 аминокислот в непрерывной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления каждую аминокислоту независимо выбирают из группы, в которую входят аланин, аргинин, аспарагиновая кислота, аспарагин, гистидин, глицин, глутаминовая кислота, глутамин, фенилаланин, лизин, лейцин,

серин, тирозин, треонин, изолейцин, пролин, триптофан, валин, цистеин, метионин, селеноцистеин, орнитин, пеницилламин, β -аланин, аминоканановая кислота, аминоканановая кислота, аминокандикарбановая кислота, аминоканановая кислота, аминоканановая кислота, гетероциклокарбановая кислота, цитруллин, статин, диаминоканановая кислота и их производные.

В другом воплощении каждую аминокислоту независимо выбирают из группы, в которую входят следующие L-(природные) аминокислоты: аланин, аргинин, аспарагиновая кислота, аспарагин, гистидин, глицин, глутаминовая кислота, глутамин, фенилаланин, лизин, лейцин, серин, тирозин, треонин, изолейцин, триптофан и валин.

В другом воплощении каждую аминокислоту независимо выбирают из группы, в которую входят следующие D-изомеры этих природных аминокислот: аланин, аргинин, аспарагиновая кислота, аспарагин, гистидин, глицин, глутаминовая кислота, глутамин, фенилаланин, лизин, лейцин, серин, тирозин, треонин, изолейцин, триптофан и валин.

В некоторых вариантах осуществления изобретения G может иметь в своем составе только природные аминокислоты. В других вариантах осуществления изобретения G может иметь в своем составе только не встречающиеся в природе аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления G может иметь в своем составе природную аминокислоту, соединенную с не встречающейся в природе аминокислотой. В некоторых вариантах осуществления G может иметь в своем составе природную аминокислоту, соединенную с D-изомером природной аминокислоты.

В некоторых вариантах осуществления Y и A³ независимо или в сочетании могут иметь в своем составе несколько саморасщепляющихся или не саморасщепляющихся групп. В данном контексте термин «саморасщепляющаяся группа» относится к бифункциональной химической группе, способной ковалентно связывать две пространственно разделенные химические группы в трипартитную молекулу, стабильную при нормальных условиях. В случае разрыва ее связи с первой группой она в произвольный момент отделяется от второй химической группы.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения E и F могут представлять собой нерасщепляемое звено, способное связывать цитотоксический агент или терапевтический агент с рекомбинантным лектиновым белком в целом стабильным и ковалентным образом и при этом обладающее существенной стойкостью к расщеплению, индуцированному действием кислот, света, пептидазы или эстеразы, либо отщеплению дисульфидной связи. Цитотоксический агент или терапевтический агент высвобождается из продуктов, составляющих предмет

настоящего изобретения, содержащих нерасщепляемое звено, через альтернативные механизмы, такие как протеолитический распад лигандов.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения нерасщепляемое звено может иметь в своем составе малеимидогруппу или группу, выбираемую, в частности, из следующего: N-сукцинимидил 4-(малеимидометил)циклогексанкарбоксилат (SMCC), N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбокси-(6-амидокапронат), представляющий собой «длинноцепочечный» аналог SMCC (LC-SMCC), к-малеимидоундекановой кислоты N-сукцинимидиловый эфир (KMUA), γ-малеимидобутановой кислоты N-сукцинимидиловый эфир (GMBS), с-малеимидокапроновой кислоты N-гидроксисукцинимидный эфир (EMCS), m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный эфир (MBS), N-(альфа-малеимидоацетокси)-сукцинимидный эфир [AMAS], сукцинимидил-6-(β-малеимидопропионамидо)гексаноат (SMPH), N-сукцинимидил 4-(пара-малеимидофенил)-бутират (SMPB) и N-(пара-малеимидофенил)изоцианат (PMPI), N-сукцинимидил-4-(йодацетил)-аминобензоат (STAB), N-сукцинимидила йодацетат (SIA), N-сукцинимидил бромацетат (SBA) и N-сукцинимидил 3-(бромацетамидо)пропионат (SBAP).

Во втором аспекте настоящего изобретения предложено соединение по формуле II:

L-D

Формула II

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой

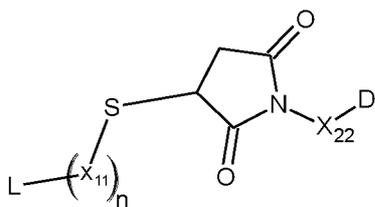
L и D соответствуют приведенным выше определениям.

Согласно частному аспекту настоящего изобретения, L представляет собой рекомбинантный белок, выбираемый из SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5. В одном из более частных аспектов L — рекомбинантный белок с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5.

Согласно одному из аспектов, связь «—» между L и D является ковалентной или ковалентно-координационной. Согласно другому аспекту, связь «-» между L и D представляет собой группу по формуле «—A¹-A²-A³—», где A¹, A² и A³ определены выше.

Согласно одному из аспектов, значение DAR в формуле II равно 1. Таким образом, каждое звено в формуле II имеет в своем составе один лектиновый белок и одно звено цитотоксического агента или терапевтического агента.

В одном воплощении соединение по формуле II представляет собой:



Формула II

в которой

L — рекомбинантный лектин, получаемый из *S. rolfsii*;

D — лекарство или терапевтический агент.

S — атом серы;

X₁₁ — группа, в состав которой входят:

- группа, выбираемая из числа реакционно-способной аминовой или сульфгидрильной группы;
- гидрофильный полимер (опционально);
- поводок, в котором S в формуле III присоединяется к поводку;

X₂₂ — группа, в состав которой входят:

- реакционно-способная аминовая группа, реакционно-способная сульфгидрильная группа, реакционно-способная гидроксильная группа или реакционно-способная карбонильная группа;
- пептид с последовательностью от 2 до 10 аминокислот (опционально);
- гидрофильный полимер (опционально);
- поводок;

в котором реакционно-способная аминовая группа, реакционно-способная сульфгидрильная группа, реакционно-способная гидроксильная группа или реакционно-способная карбонильная группа, гидрофильный полимер и пептид соответствуют таковым в любом из предыдущих пунктов формулы изобретения; и

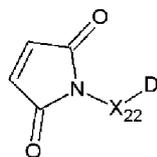
в котором поводок имеет в своем составе одну или несколько групп из числа R³, -NR³R⁴, -NHR³C(O)R⁴-, -NH-R³C(O)-NHR⁴, -NH-(CH₂CH₂O)S-, -NH-(CH₂CH₂O)S-CH₂-, -NH-(CH₂CH₂NH)S-(CH₂)S-NH-(CH₂CH₂NH)S-(CH₂)S-NH-C(O)-(CH₂)S-NH-(C₃-C₈карбоцикло)-, -NH-(арил)-, -NH-(C₃-C₈гетероцикло)-, -R³C(O)-, -O(CO)R³-, -O(CO)R³NH-, -O(CO)R³SR⁴-, -O(CO)R³-SR⁴CO-NR³R⁴-, C₃-C₈карбоцикло-, -C₃-C₈карбоцикло-CO-NHR³-, -C₃-C₈карбоцикло-CO-NHR³C₃-C₈гетероцикло-, -OCO(C₃-C₈карбоцикло)-, -OCO(C₃-C₈карбоцикло)-R³-, -OCO(C₃-C₈карбоцикло)-R³-CO-NR³R⁴.

R³ и R⁴ выбирают из группы, в состав которой входит водород, C₁-C₁₀-алкил, C₁-C₁₀-алкелен, C₁-C₁₀-алкилен, C₆-C₁₀-арил, C₃-C₈-гетероарил, C₃-C₈-карбоциклил, в которой алкил, алкелен и алкилен имеют линейную или разветвленную цепь, и

в которой C₁-C₁₀-алкил, C₁-C₁₀-алкелен, C₁-C₁₀-алкилен, арил C₆-C₁₀-арил, C₃-C₈-гетероарил, C₃-C₈-карбоциклил дополнительно имеют заместитель R⁶, где R⁶ представляет собой оксогруппу.

В одном из вариантов осуществления изобретения соединение по формуле II получают посредством указанных ниже стадий:

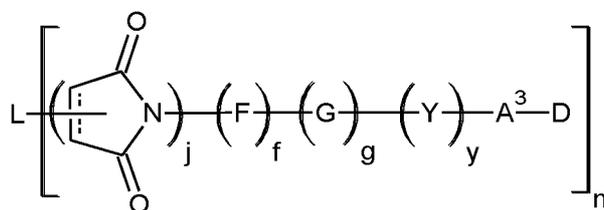
- реакция рекомбинантного лектинового белка (L) с прекурсором линкера X₁₁-S-A при комнатной температуре в течение 60 минут с образованием L-X₁₁-S-A, A — хорошая уходящая группа;
- реакция L-X₁₁-S-A, полученного в предыдущей стадии а), с соединением по приведенной ниже формуле IIIA с образованием конъюгата рекомбинантный лектин-лекарственным средство по формуле II



Формула IIIA;

- очистка соединения по формуле II.

Согласно третьему аспекту настоящего изобретения предложено соединение по формуле III:



Формула III

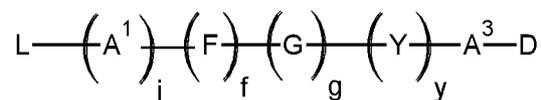
или его фармацевтически приемлемая соль, в которой

L, F, G, Y, A³, D, n, j, f, g и y соответствуют приведенным выше определениям.

Согласно одному из аспектов, лектиновый белок L непосредственно соединен с сукцинимидной или малеимидной группой через его свободную аминую, тиольную,

кислотную или гидроксильную группу. Более предпочтительно, L соединяется с сукцинимидной или малеимидной группой через атом серы тиольной группы, присутствующей в цистеине.

Согласно четвертому аспекту настоящего изобретения, предложено соединение по формуле IV:



Формула IV

или его фармацевтически приемлемая соль, в которой

L, A¹, F, G, Y, A³, D, j, f, g и y соответствуют приведенным выше определениям.

Согласно одному из аспектов, A¹ в формуле IV может присутствовать, когда j равно 1, или отсутствовать, когда j равно 0. L непосредственно соединяется с F в отсутствие A¹. Как указывалось выше, j, f, g и y могут быть равны 0 или 1. В одном из вариантов осуществления s, f и y не могут быть равны 0 в одном и том же соединении по формуле IV. В другом воплощении j и f не могут быть одновременно равны 0, а также f и y не могут быть одновременно равны 0. В отсутствие Y A³ может непосредственно соединяться с G или F, а в отсутствие F A¹ может непосредственно соединяться с G или Y.

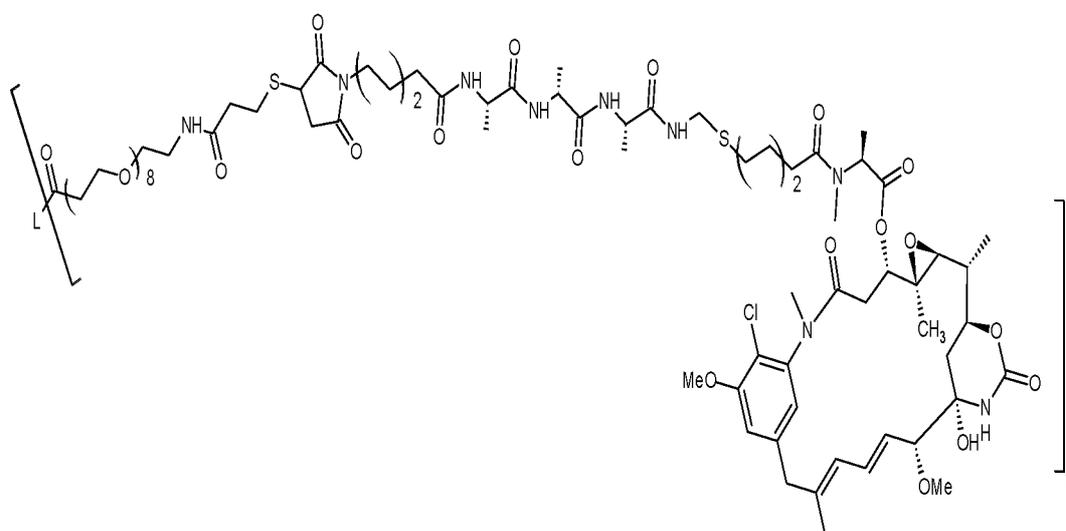
В некоторых аспектах соединения по формуле I, II, III, IV имеют DAR от примерно 1 до примерно 2. В некоторых аспектах соединения по формуле I, II, III, IV имеют DAR от примерно 1 до примерно 1,5. В некоторых аспектах соединения по формуле I, II, III, IV имеют DAR примерно 1. В некоторых аспектах соединения по формуле I, II, III, IV имеют DAR примерно 2.

Соединения, составляющие предмет настоящего изобретения, могут иметь один или несколько асимметричных центров. Если не указано иное, все хиральные (энантиомерные и диастереоизомерные) и рацемические формы соединений, составляющих предмет настоящего изобретения, относятся к предмету настоящего изобретения. В соединениях также могут присутствовать многие геометрические изомеры олефинов, двойных связей C=N и подобных структур, и все подобные стабильные изомеры считаются относящимися к предмету настоящего изобретения. Геометрические цис- и транс-изомеры соединений, составляющих предмет настоящего изобретения, описаны и могут быть выделены в виде смеси изомеров или в виде разделенных изомерных форм. Настоящие соединения могут быть выделены в виде оптически активных или рацемических форм.

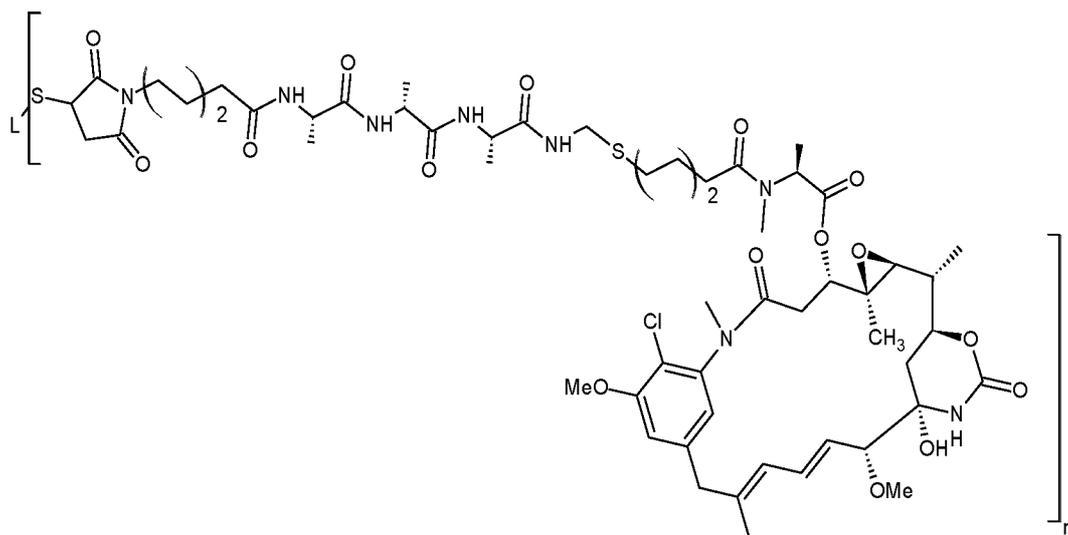
Соединения, составляющие предмет настоящего изобретения, включают все конформационные изомеры (например, цис- и транс-изомеры). Соединения, составляющие предмет настоящего изобретения, имеют асимметричные центры и поэтому существуют в разных энантиомерных и диастереоизомерных формах. Настоящее изобретение относится к получению и использованию всех оптических изомеров и стереоизомеров соединений, составляющих предмет настоящего изобретения, а также ко всем фармацевтическим композициям и методам лечения, в которых могут использоваться или содержаться такие изомеры. В этой связи предмет изобретения включает в себя конфигурации как E, так и Z. Соединения, составляющие предмет настоящего изобретения, также могут существовать в виде таутомера. Предмет настоящего изобретения включает в себя все подобные таутомеры.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения предполагается использование соединения, представленного формулой I-IV, для лечения или профилактики или излечения рака или опухоли.

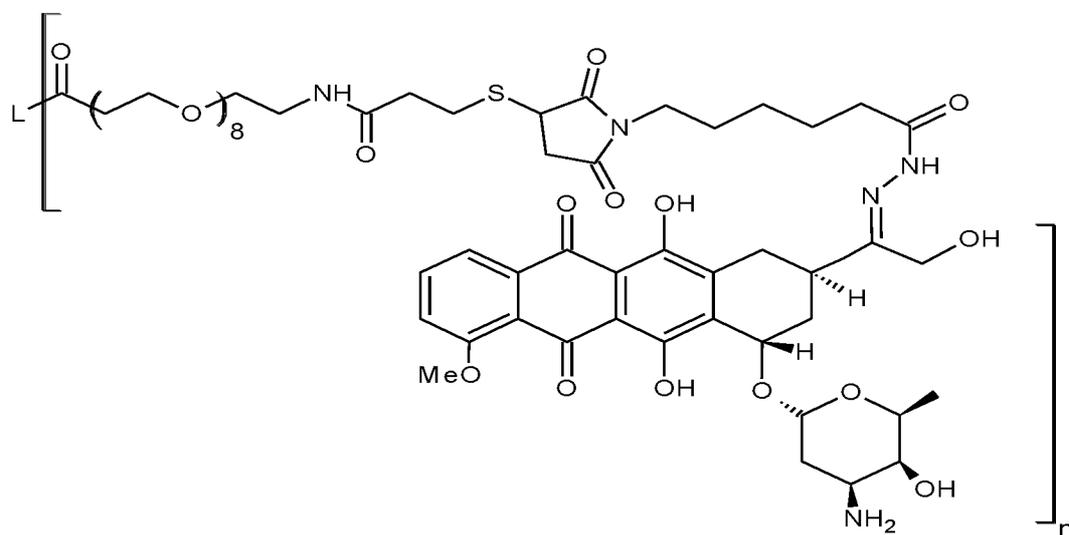
Например, некоторые соединения, составляющие предмет настоящего изобретения, представляют собой соединения по формулам 1-43.



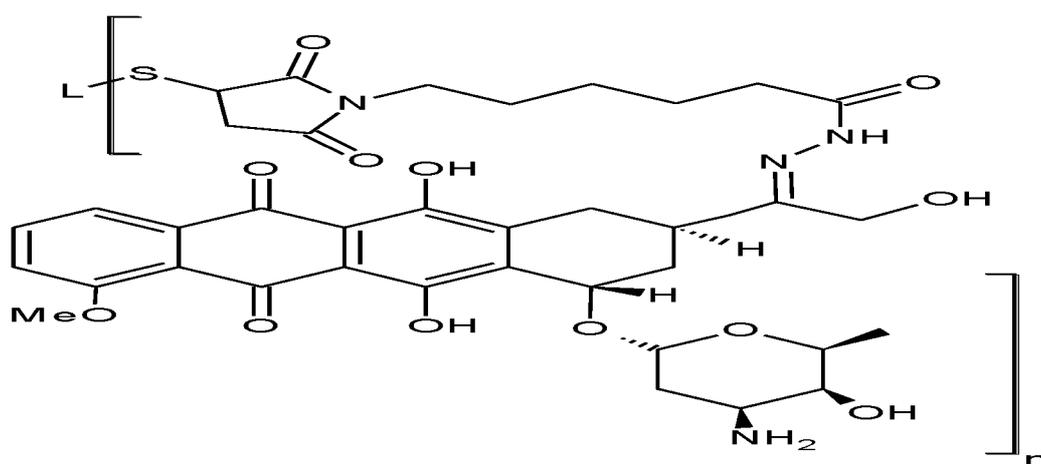
Формула 1;



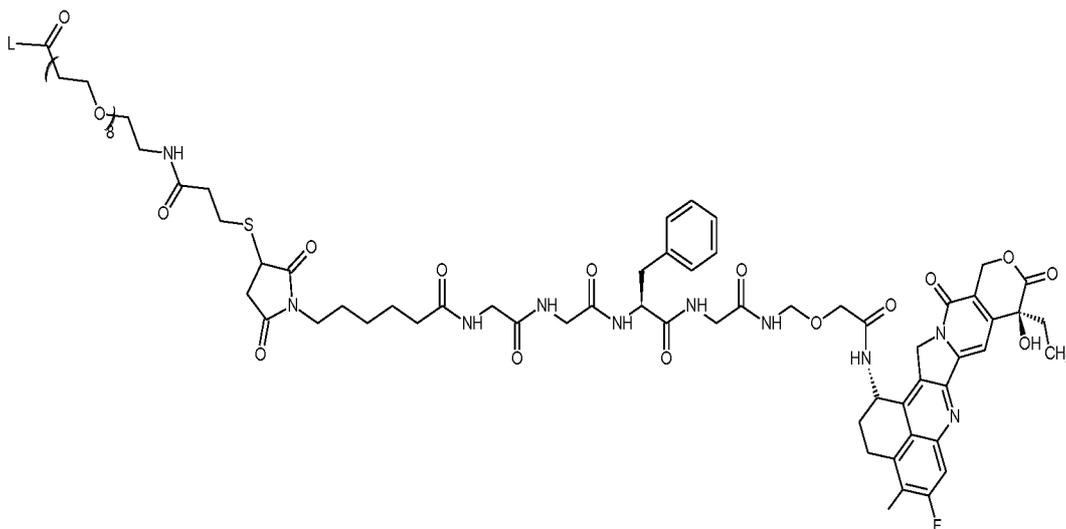
Формула 2;



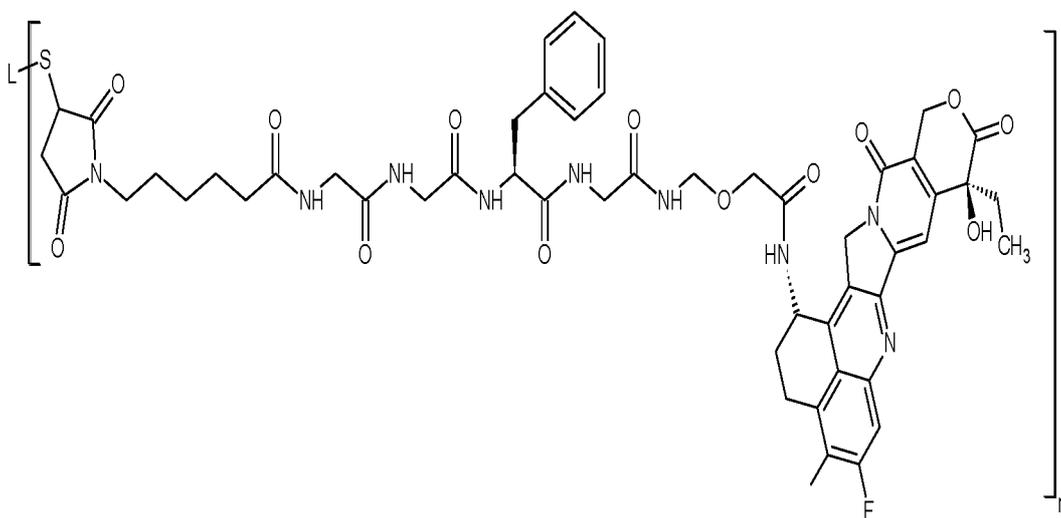
Формула 3;



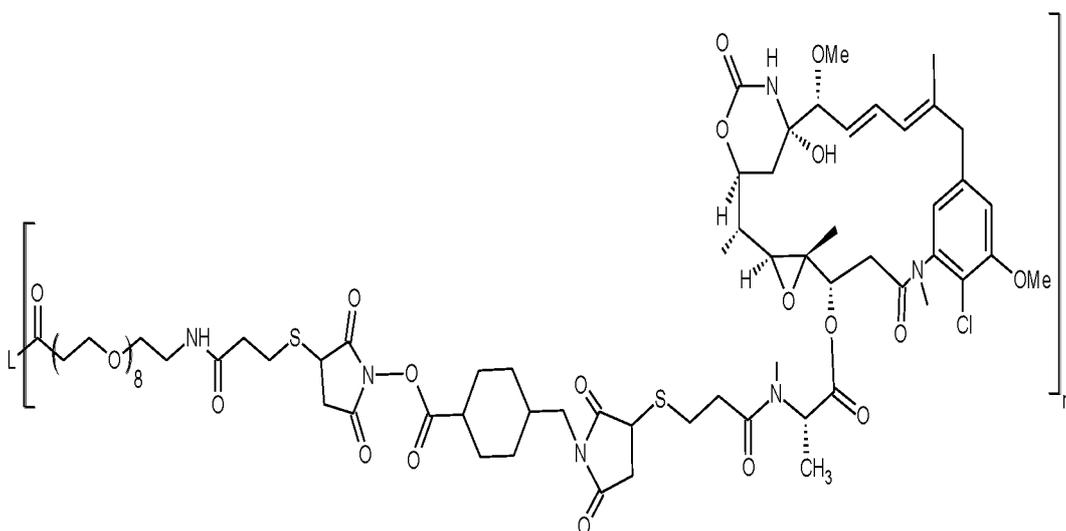
Формула 4;



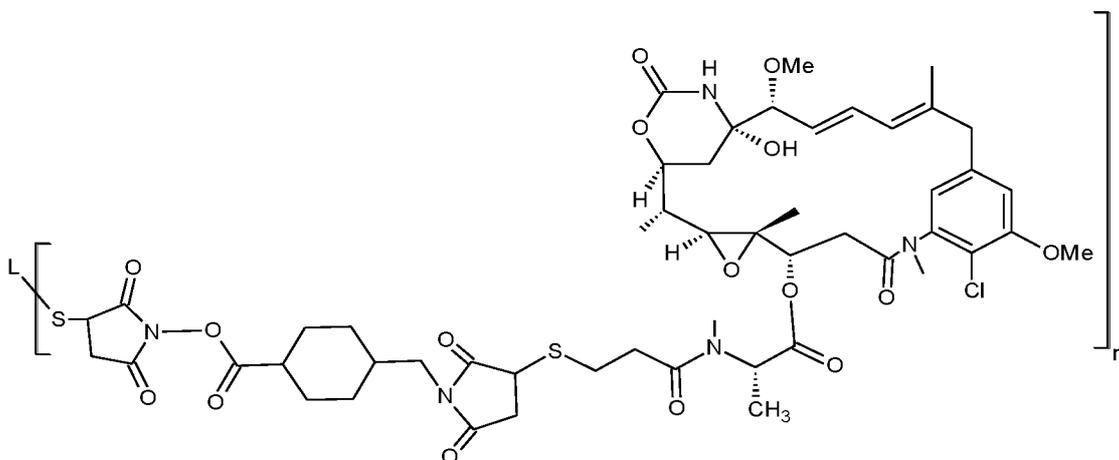
Формула 5;



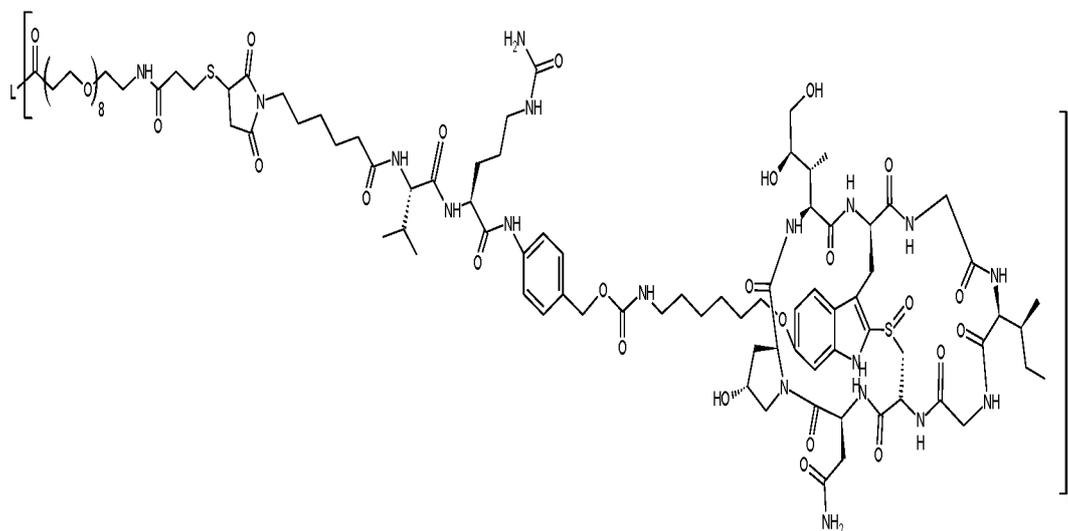
Формула 6;



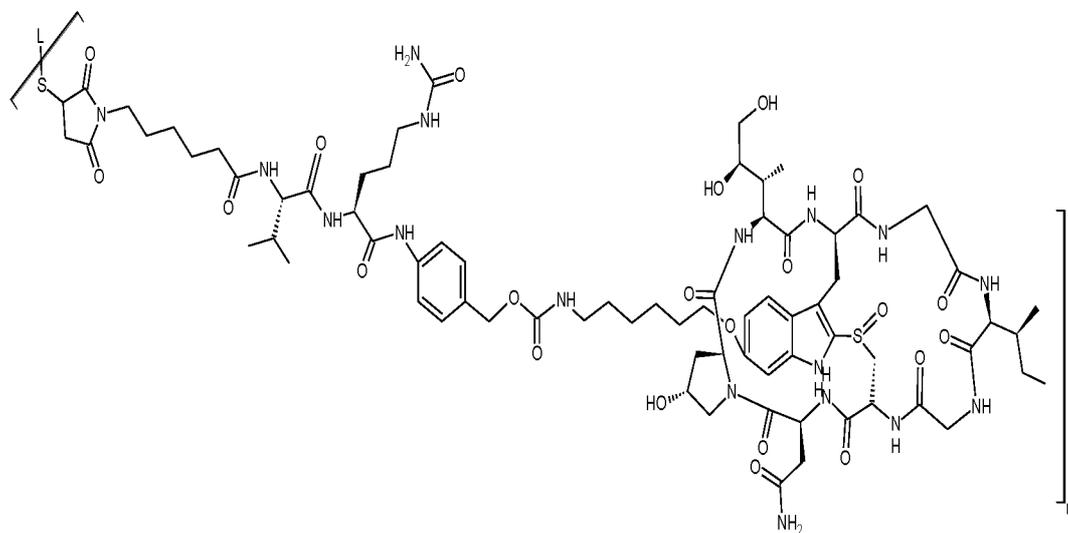
Формула 7;



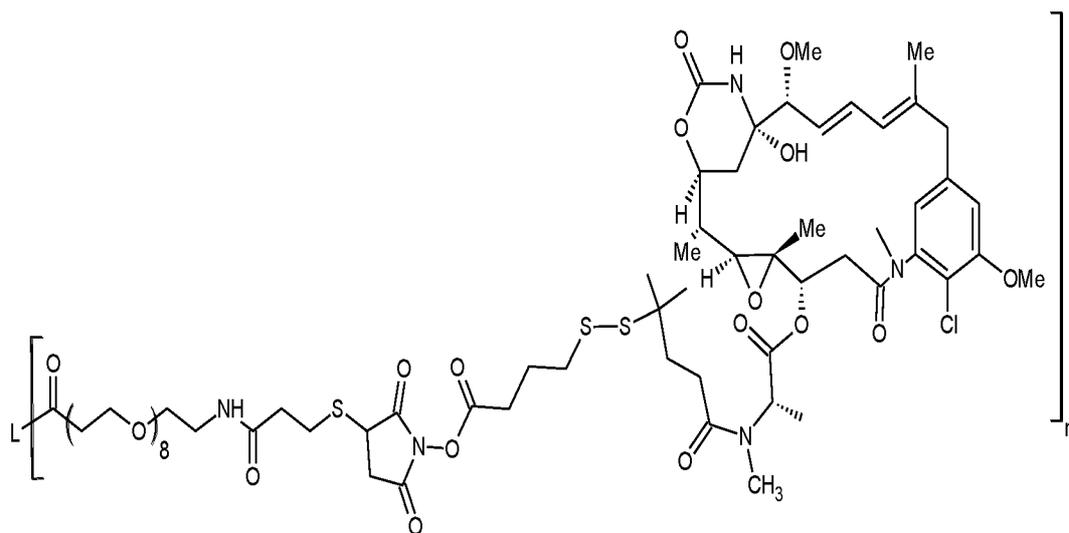
Формула 8;



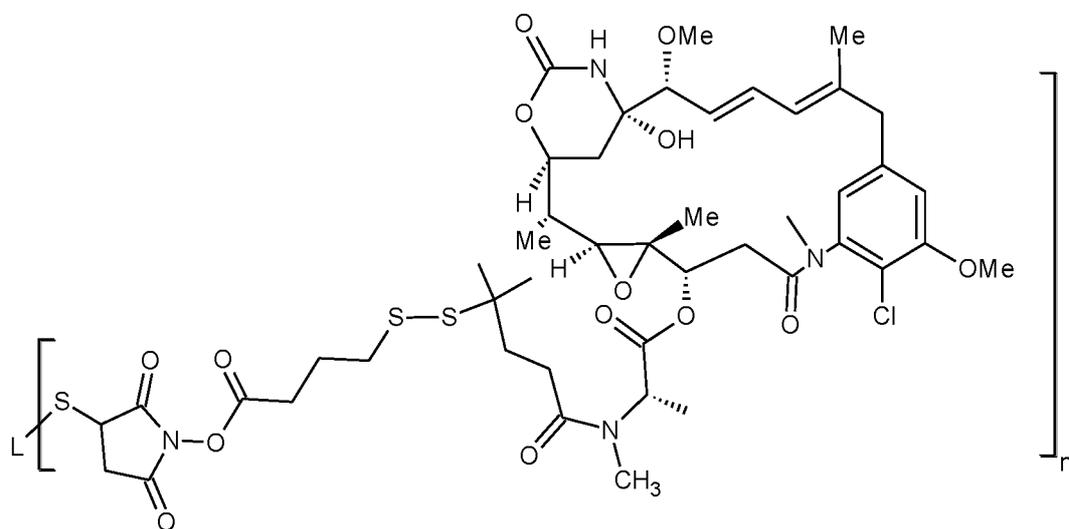
Формула 9;



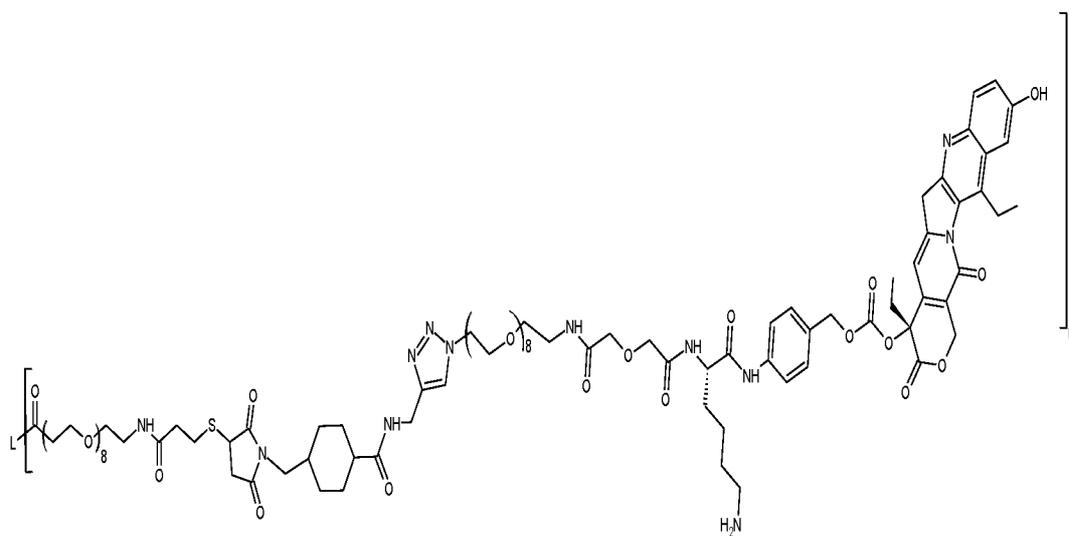
Формула 10;



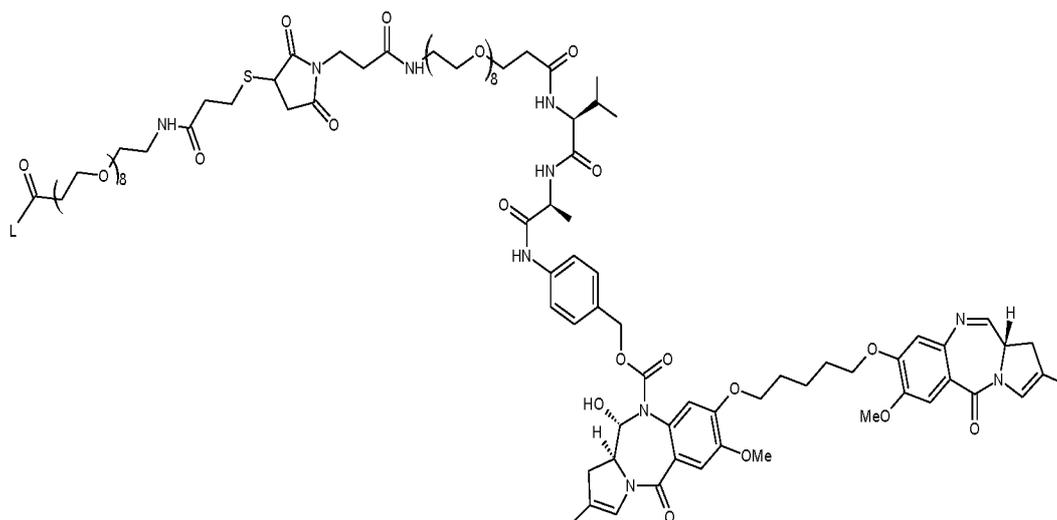
Формула 11;



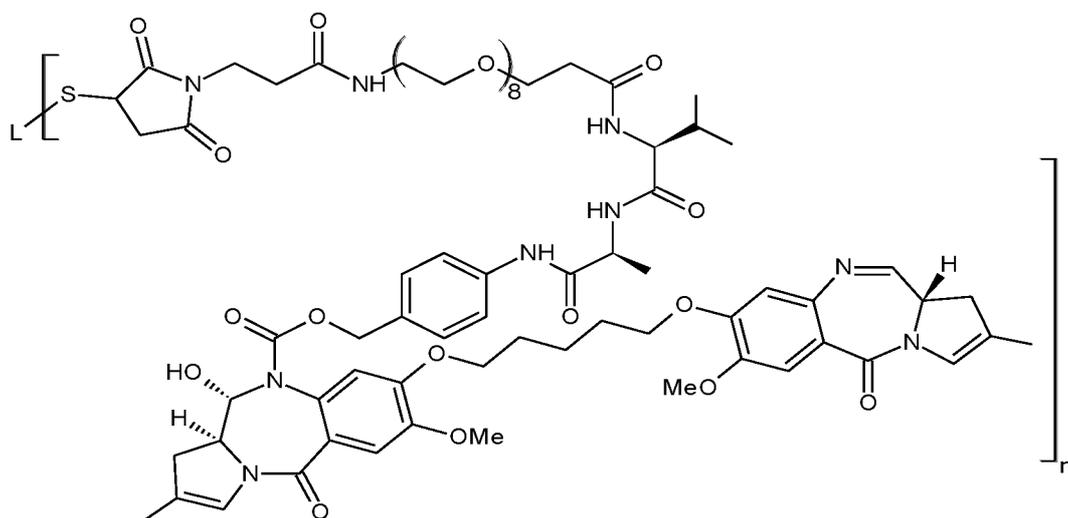
Формула 12;



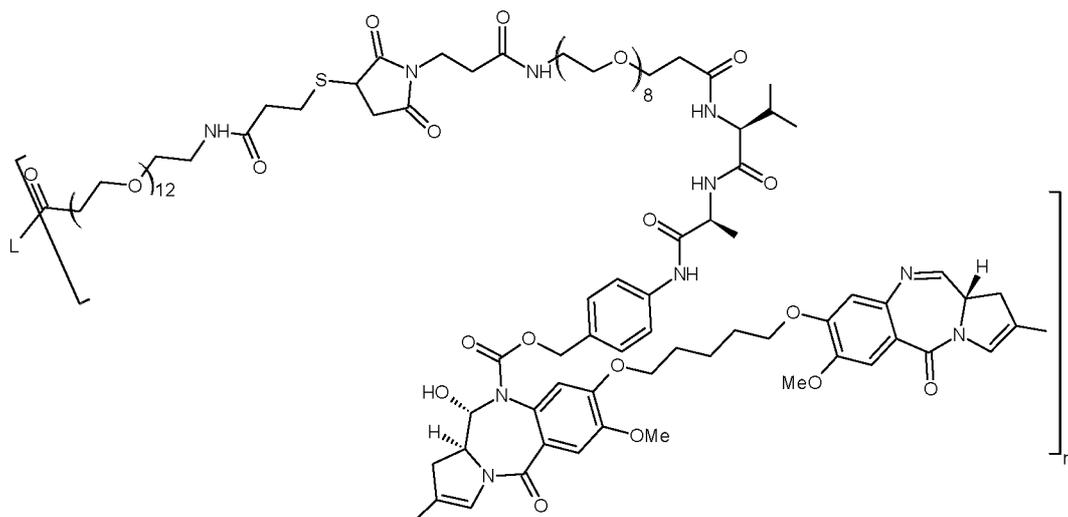
Формула 13;



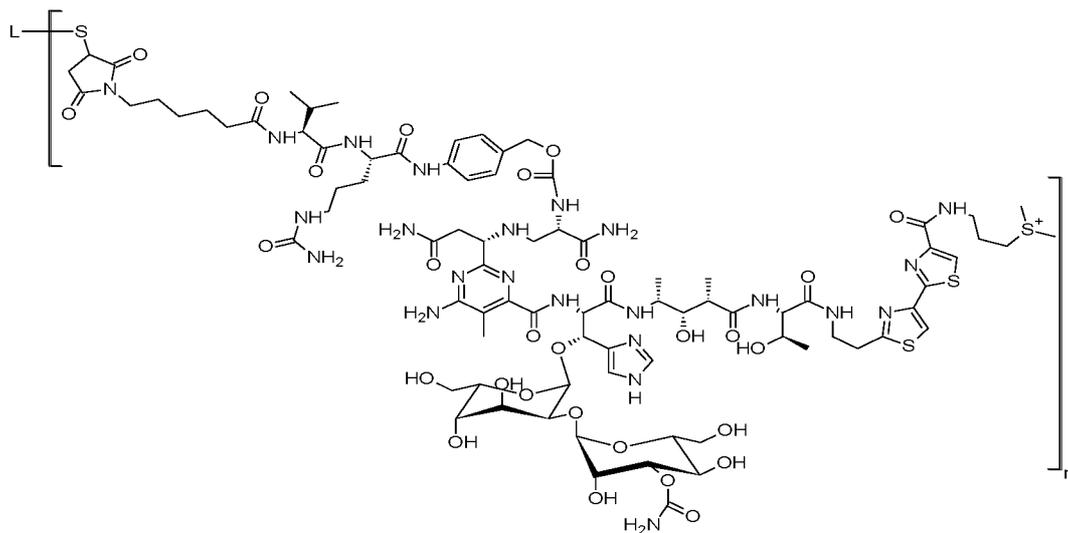
Формула 17;



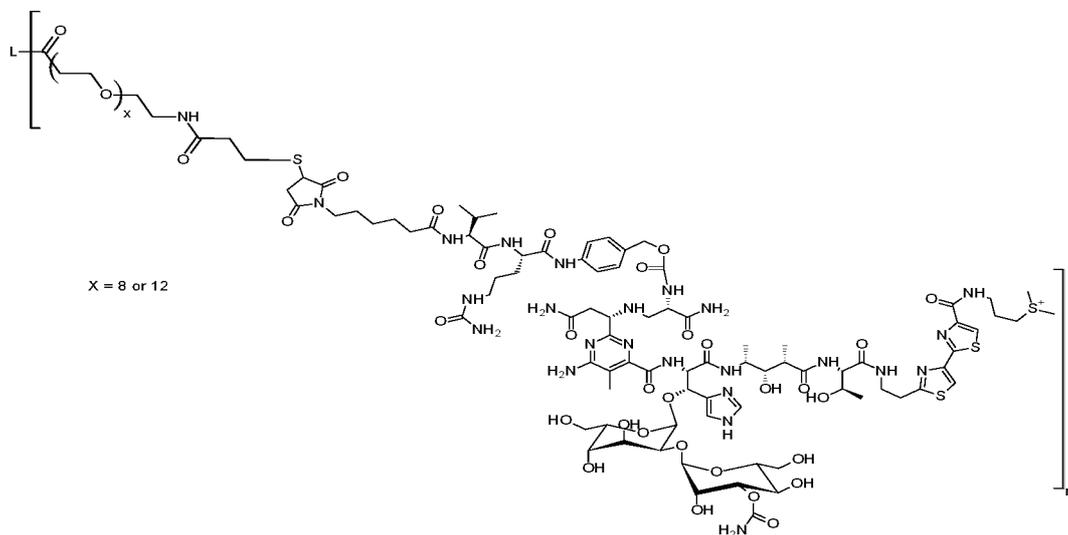
Формула 18;



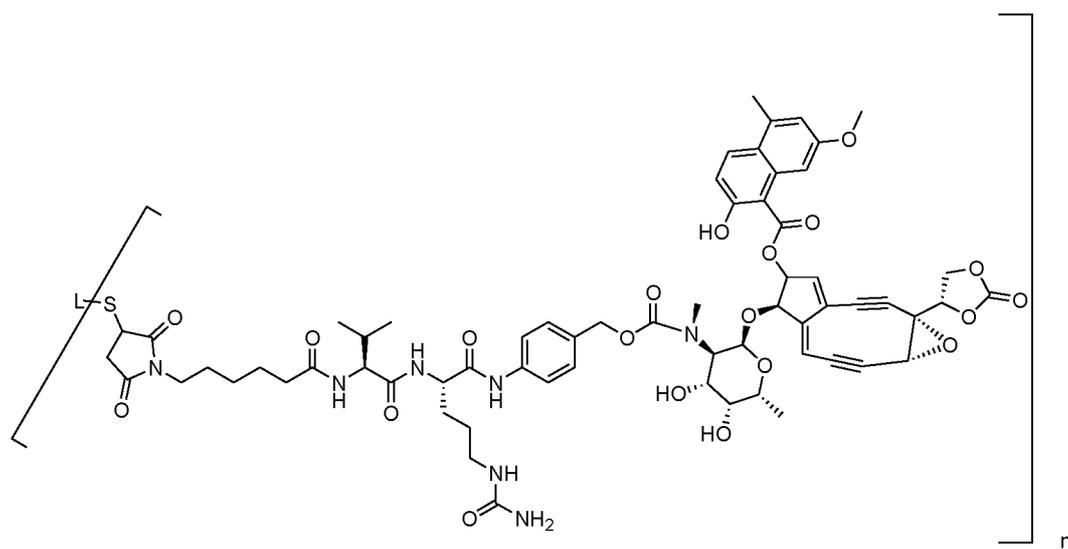
Формула 19;



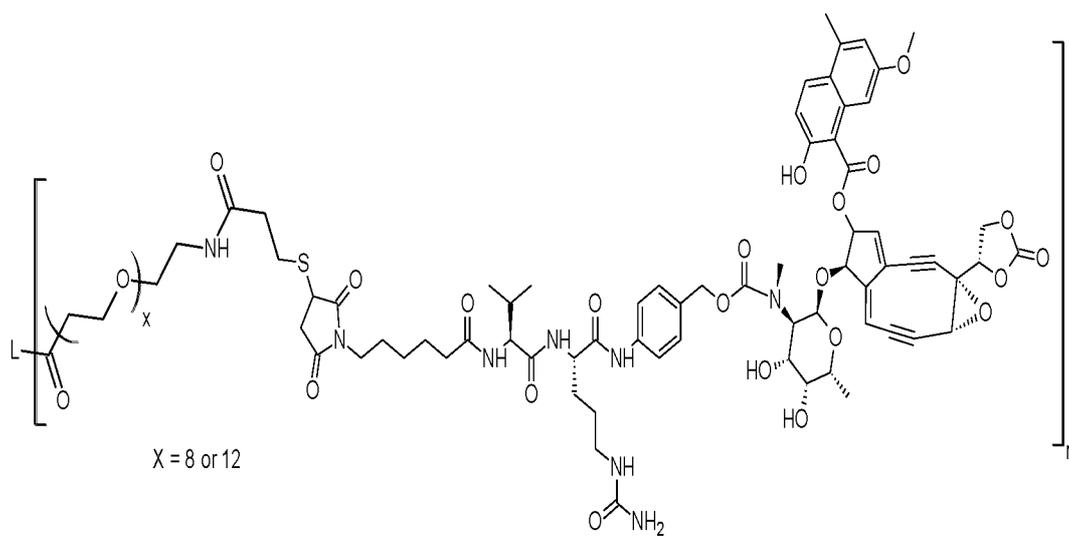
Формула 20;



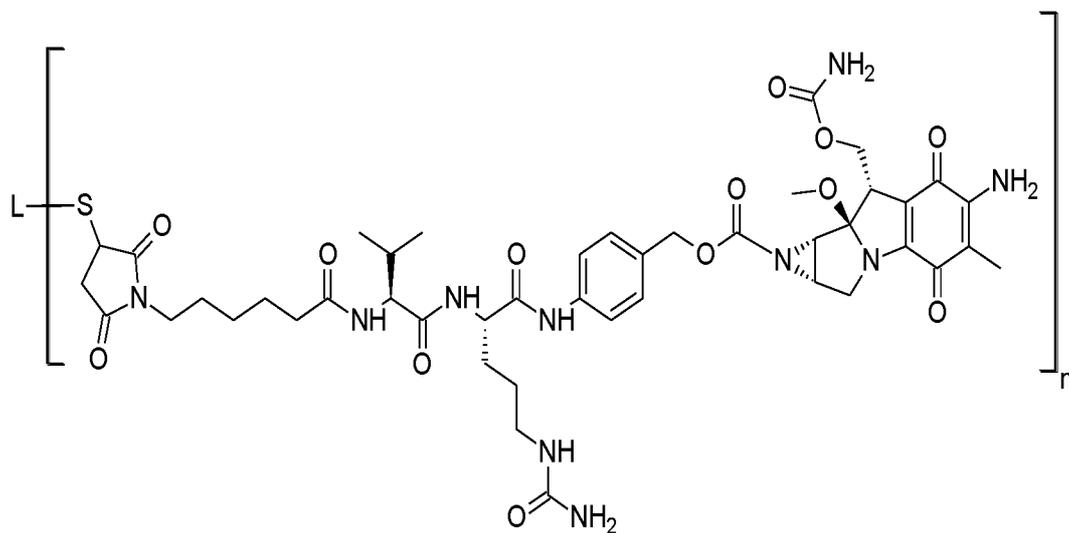
Формула 21;



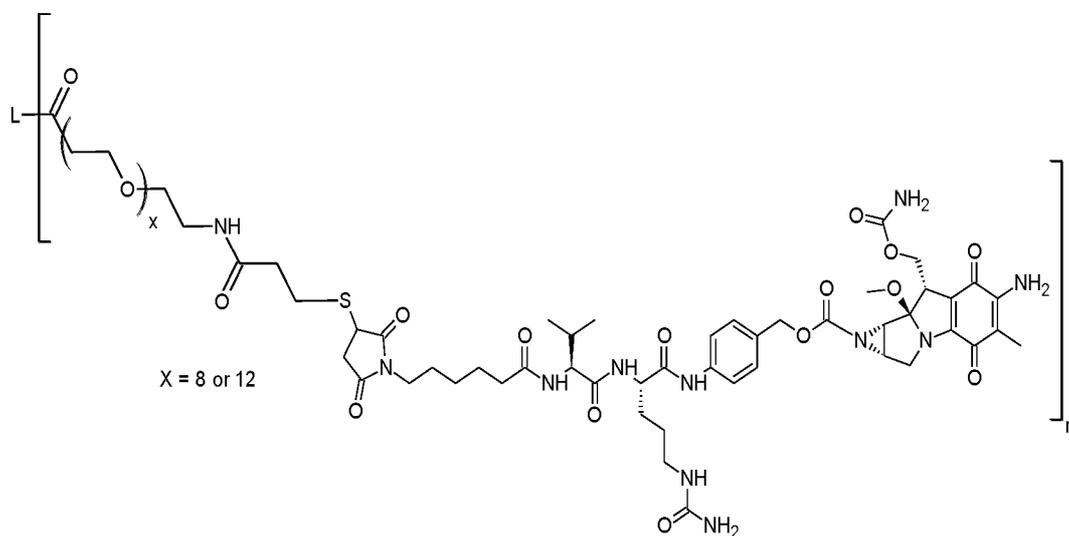
Формула 22;



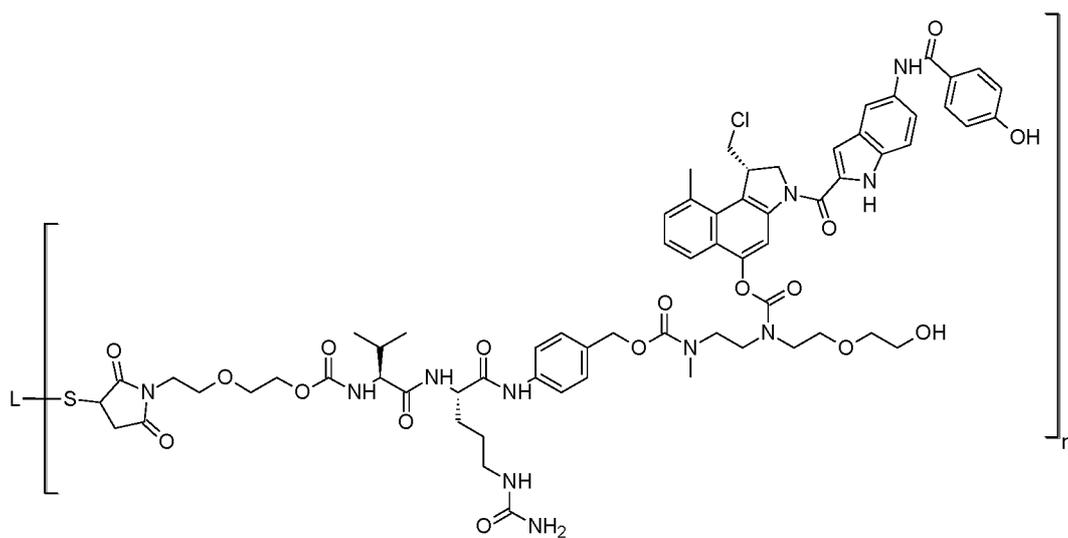
Формула 23;



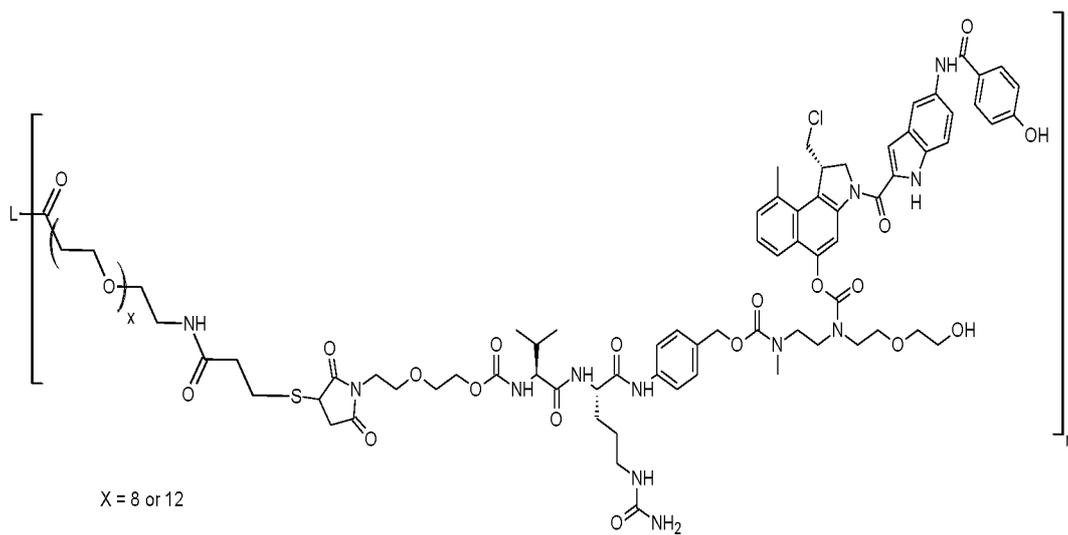
Формула 24;



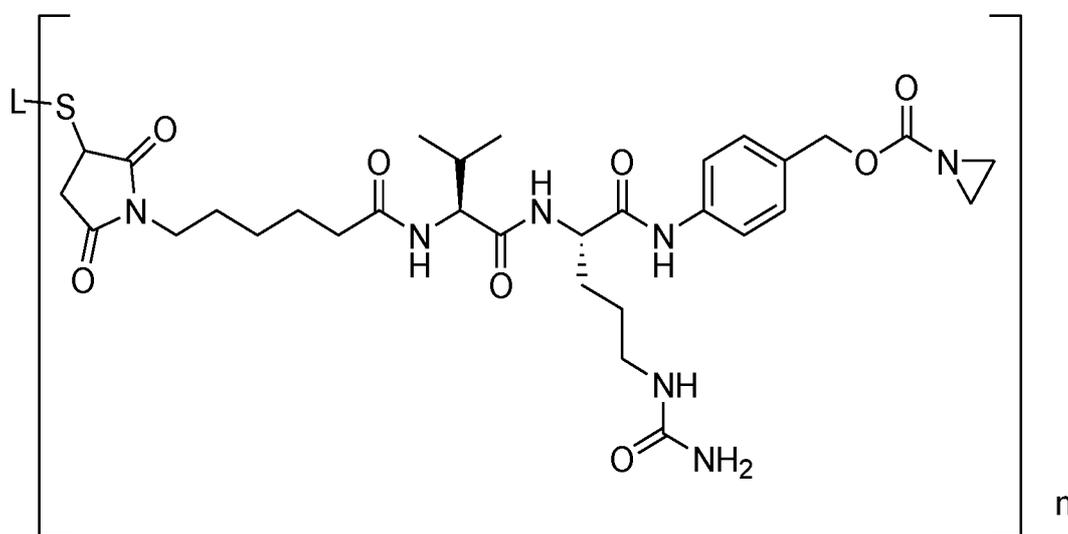
Формула 25;



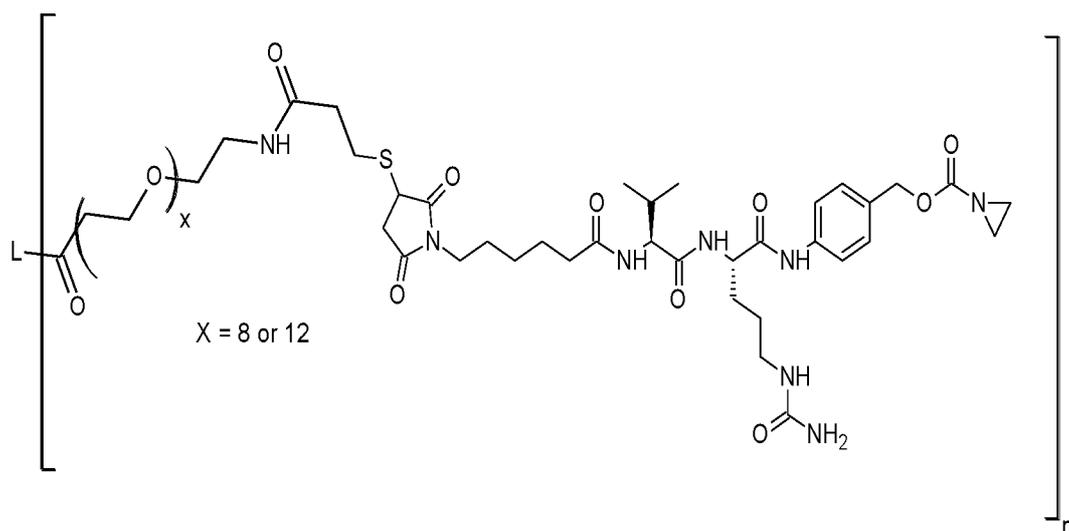
Формула 26;



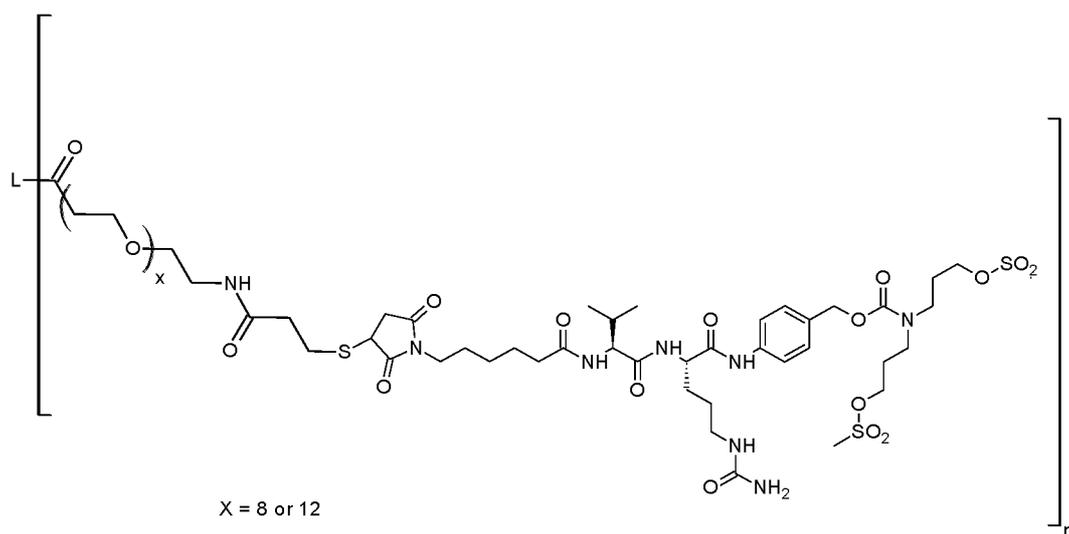
Формула 27;



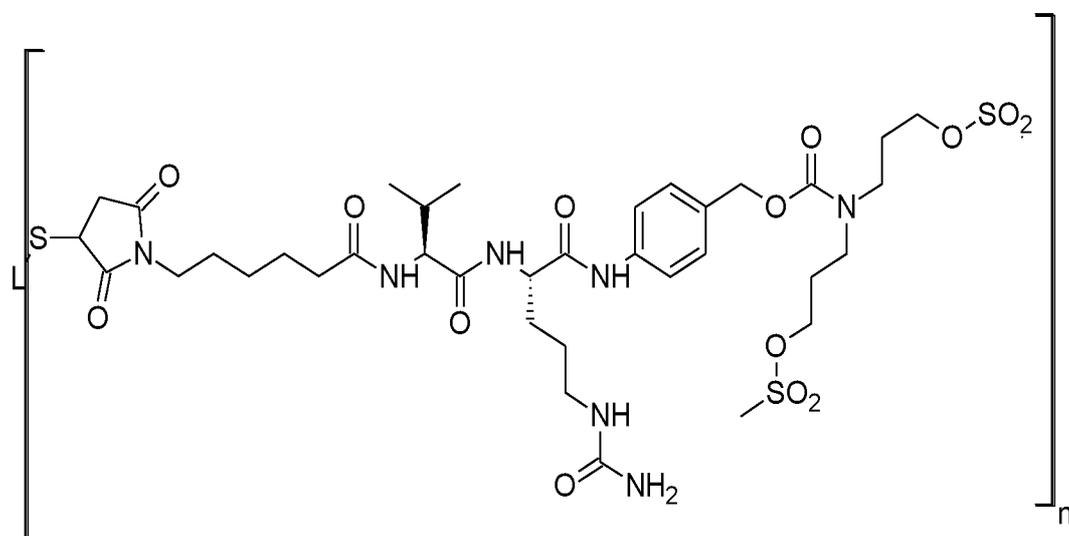
Формула 28;



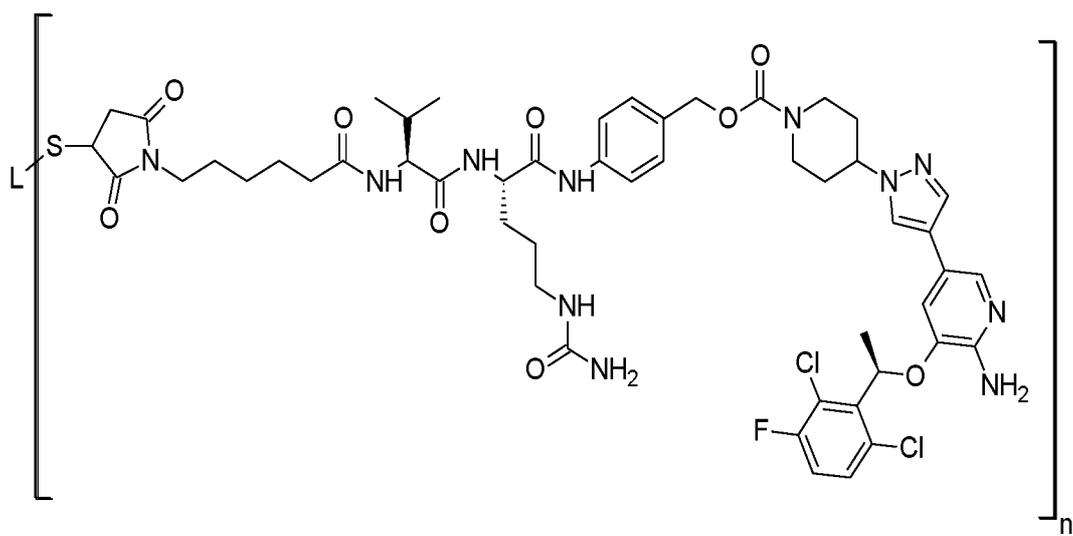
Формула 29;



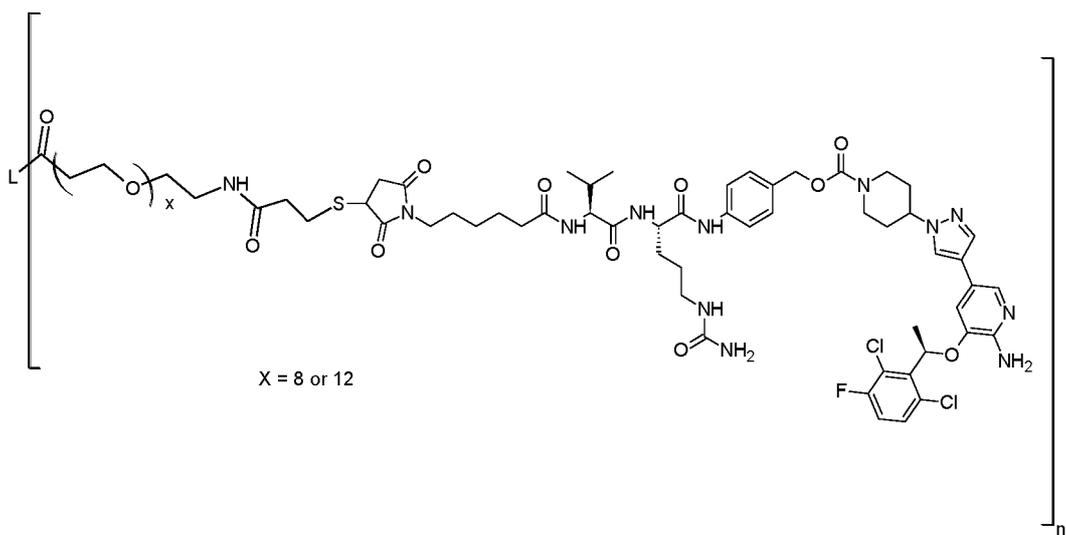
Формула 30;



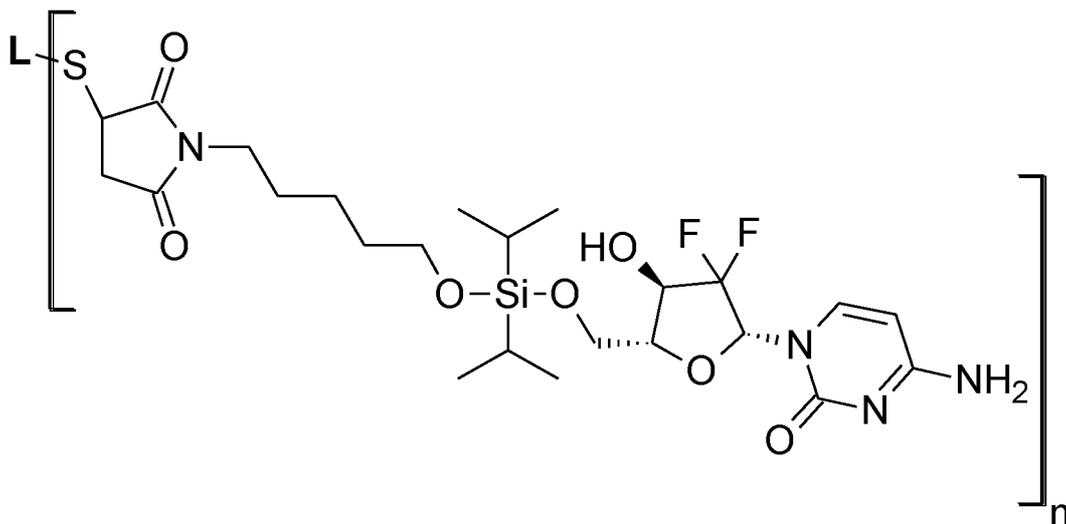
Формула 31;



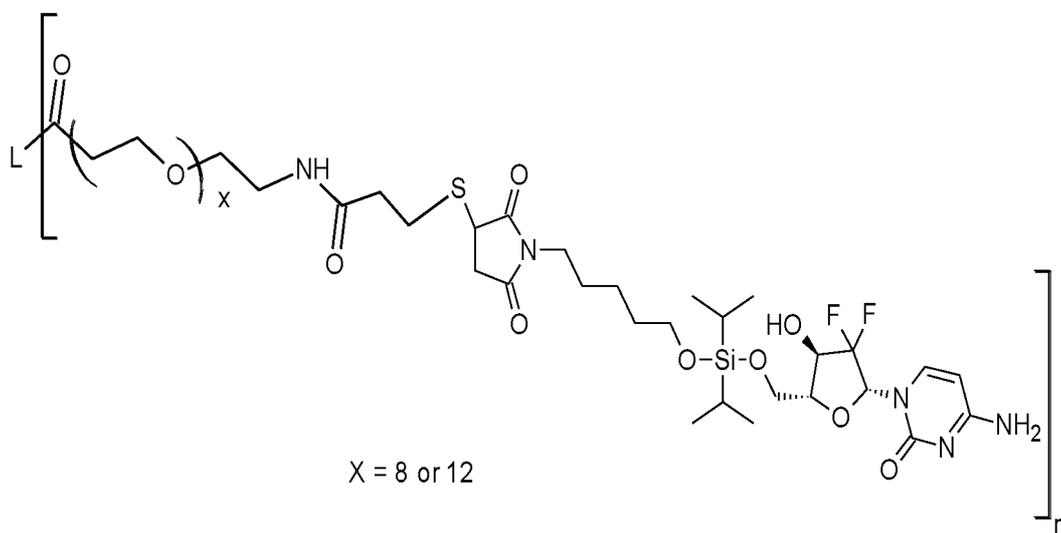
Формула 32;



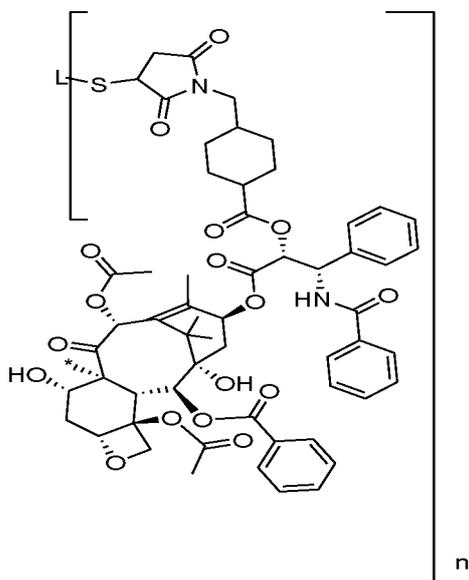
Формула 33;



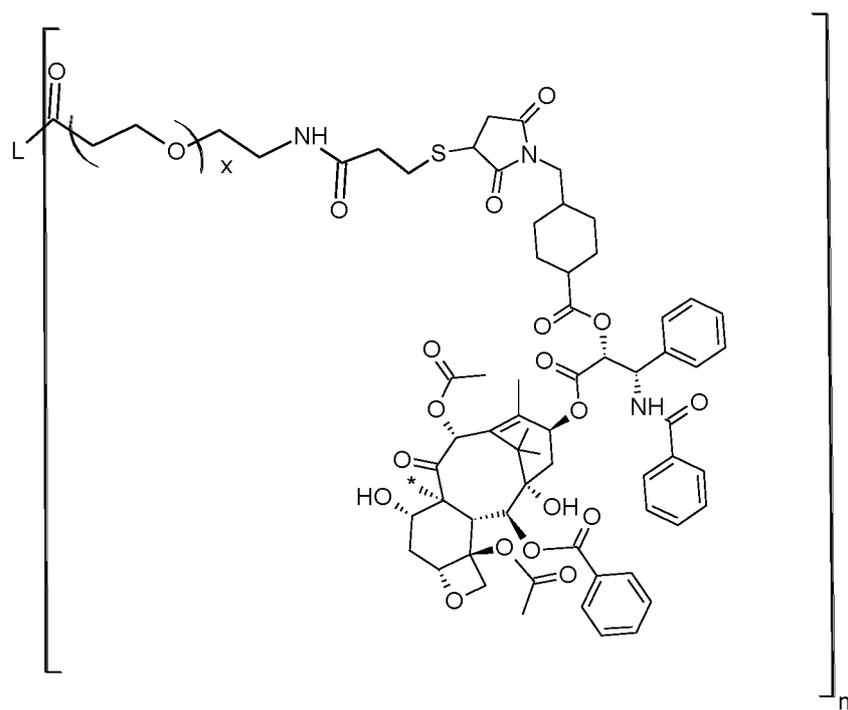
Формула 34;



Формула 35;

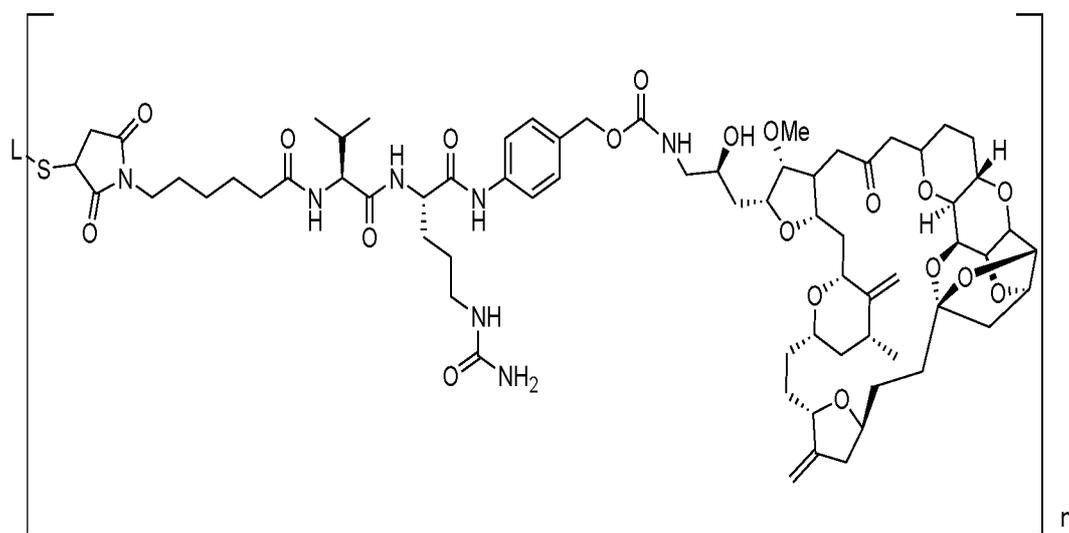


Формула 36;

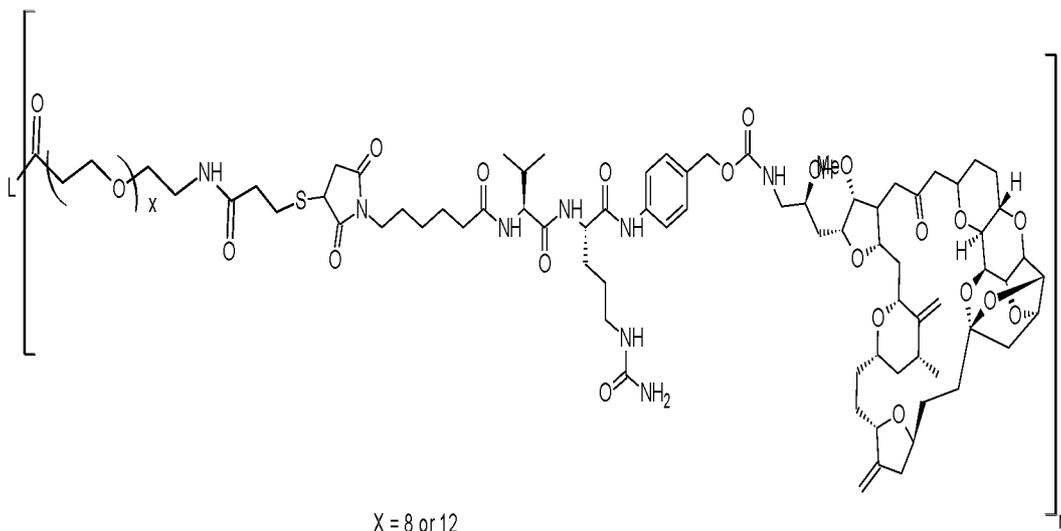


X = 8 or 12

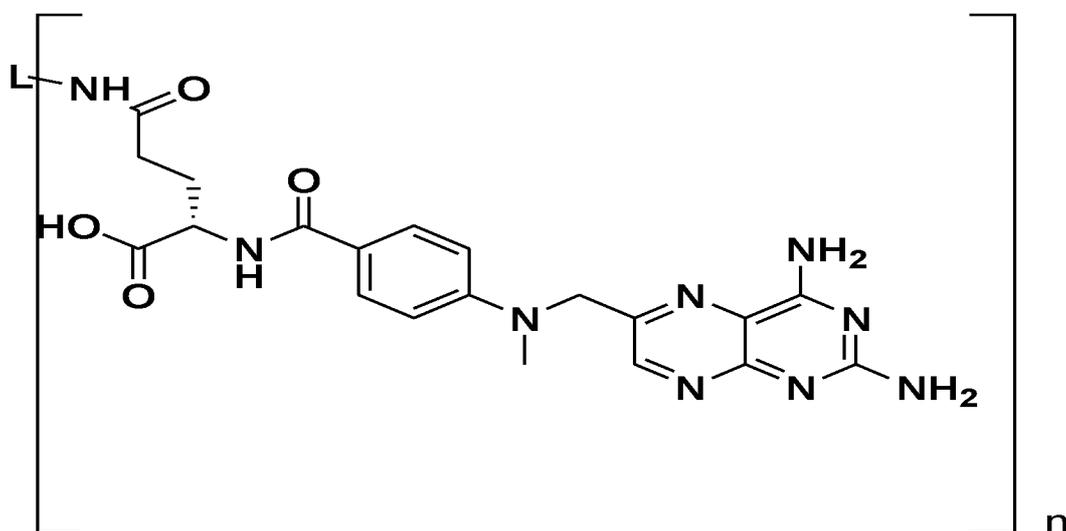
Формула 37;



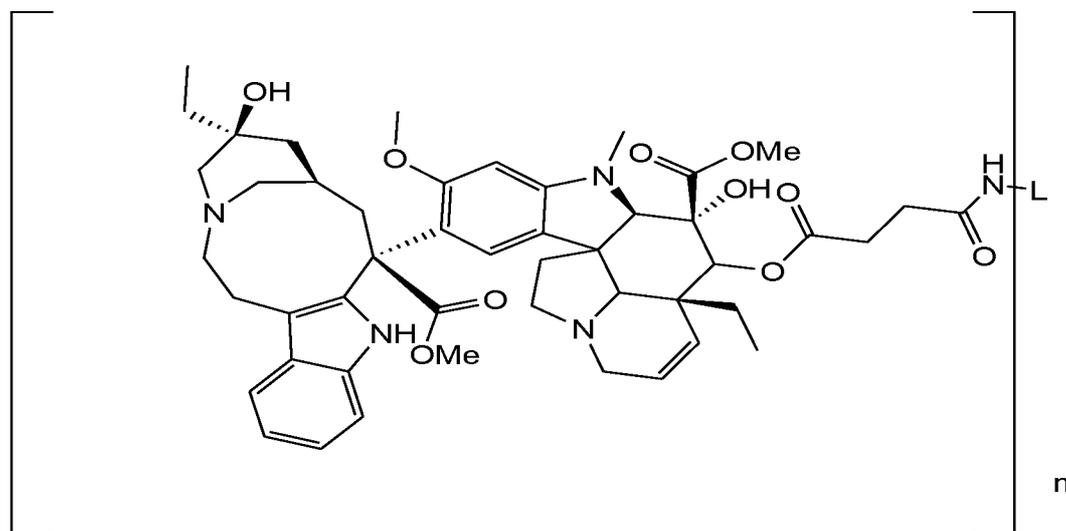
Формула 38;



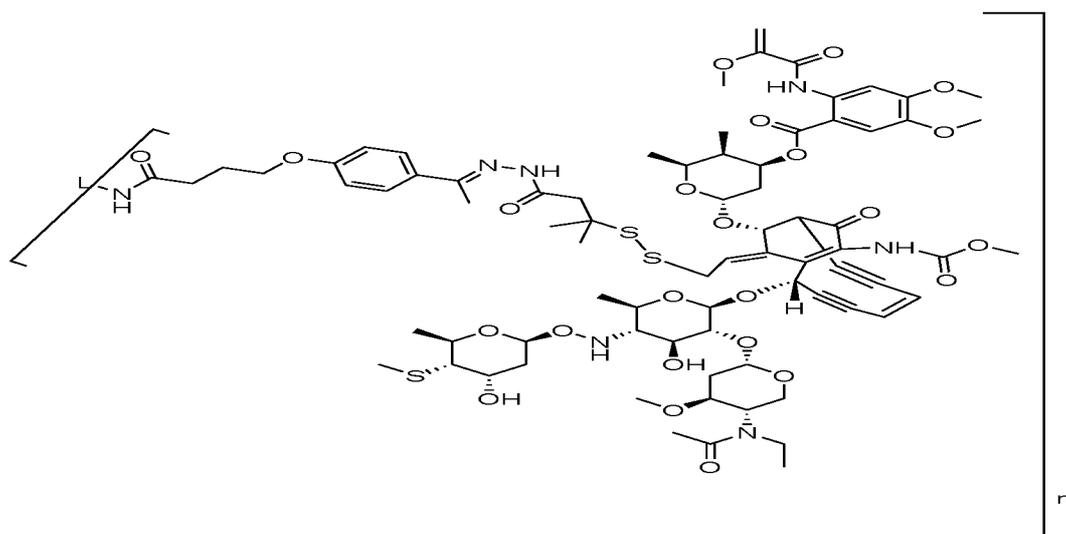
Формула 39;



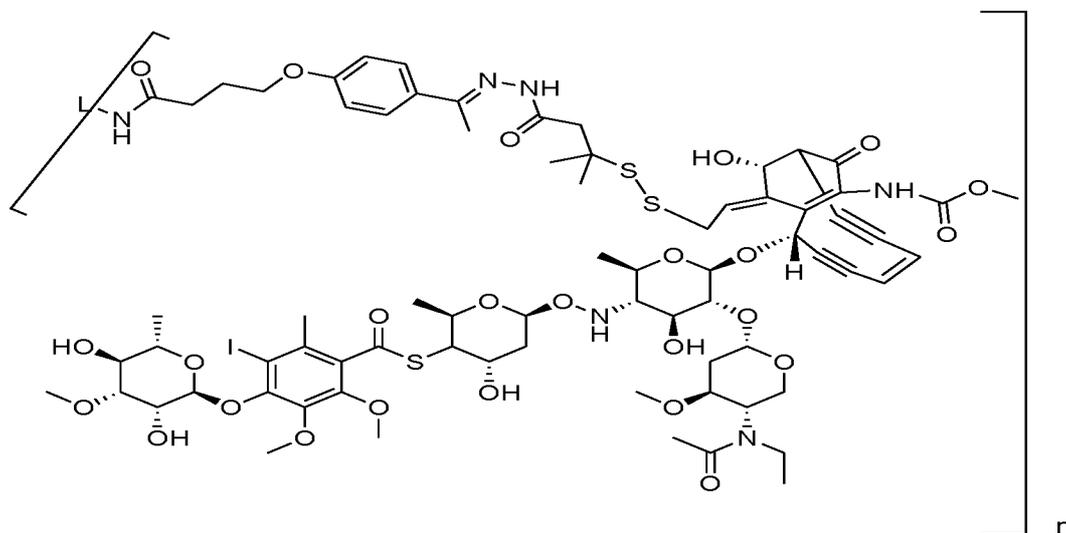
Формула 40;



Формула 41;



Формула 42;



Формула 43;

Изобретательский аспект настоящего изобретения заключается в конъюгатах рекомбинантного лектина по формуле I, II, III и IV. Хотя линкер, рекомбинантные лектины и лекарственные средства, используемые в настоящем изобретении, хорошо известны, сама конъюгация рекомбинантного лектина либо непосредственно с лекарственным веществом, либо с помощью произвольного линкера приводила к получению конъюгата белок-лекарственное вещество, у которого отсутствовала растворимость или желаемое терапевтическое действие. Описанные в данной заявке конъюгаты разработаны с целью обеспечить такую конфигурацию и расположение нескольких компонентов, присутствующих в формуле I, II, III, IV, чтобы в ходе их

разработки преодолеть сразу обе проблемы — и с растворимостью, и терапевтическим действием, а не одну из них. Внезапно оказалось, что конъюгат белок-лекарственное вещество, описанный в данной заявке, наряду с улучшенной растворимостью и терапевтическим действием также обеспечивает более высокую стабильность в сравнении с лекарственным веществом или лектиновым белком по отдельности. Подобное проектирование, выбор конфигурации и расположения нескольких компонентов, входящих в состав соединений по формуле I, II, III или IV, с образованием конъюгата белок-лекарственное вещество с повышенной эффективностью, стабильностью и растворимостью требуют изобретательского шага, который не был продиктован или мотивирован идеями из процитированных выше ссылок. Кроме того, указанные ссылки не содержат указаний относительно выбора какого-либо конкретного лектина, лекарственного средства или линкера, которые при конъюгации дали бы соединения, составляющие предмет настоящего изобретения, и желаемые терапевтические эффекты.

В одном из вариантов осуществления изобретения соединения, составляющие предмет настоящего изобретения, можно получать известными специалистам методами или методами, указанными в публикациях 'Methods to design and synthesize antibody-drug conjugates (ADCs). International journal of molecular sciences' (by Yao H et al. volume 17, issue 2, page 194, 2016) или 'Preparation and characterization of antibody-drug conjugates acting on HER2-positive cancer cells' (by Chiang Z-C et al, PLoS ONE, volume 15, issue 9, e02398132020). Например, соединения можно получать в результате реакции лектинового белка с агентом D посредством реакций присоединения в присутствии металлического катализатора или при нагреве до разумной температуры либо под давлением. Специалистам следует иметь в виду, что реакцию белка следует проводить в контролируемых условиях, чтобы белок или продукт, содержащий белок, не подвергся дестабилизации и денатурации.

В одном из вариантов осуществления изобретения соединения, составляющие предмет настоящего изобретения, можно получать, как вариант, в результате реакции лектинового белка с группой, являющейся частью линкера, которая способна легко образовывать связь с D или его прекурсором или другой частью линкера, связанной с D. Подобные реакции могут проводиться при pH от 7 до 9 или иногда выше или ниже, в фосфатном или карбонатно-бикарбонатном буфере, или в 4-(2-гидроксиэтил)-1-

пиперазинэтансульфоновой кислоте (HEPES), в боратном буфере, в трис-буфере или в глициновом буфере. Такие реакции также могут проводиться при pH ниже 6 в таких буферах, как 4-морфолинэтансульфоновая кислота (MES) или реакционно-способный карбодиимидный буфер. В одном из примеров лектиновый белок может реагировать с малеимидной группой при pH от 5 до 8, — в отсутствие соединений или буферов, содержащих тиольные группы. В одном частном варианте осуществления настоящего изобретения рекомбинантный лектин для получения соединений, составляющих предмет настоящего изобретения, можно смешивать с соединением по формуле A при комнатной температуре. Образующееся соединение по формуле B после восстановления дает соединение по формуле C (схема I, в которой L — рекомбинантный лектин, выбираемый из числа SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:5, а X лежит в пределах от 0 до 20).

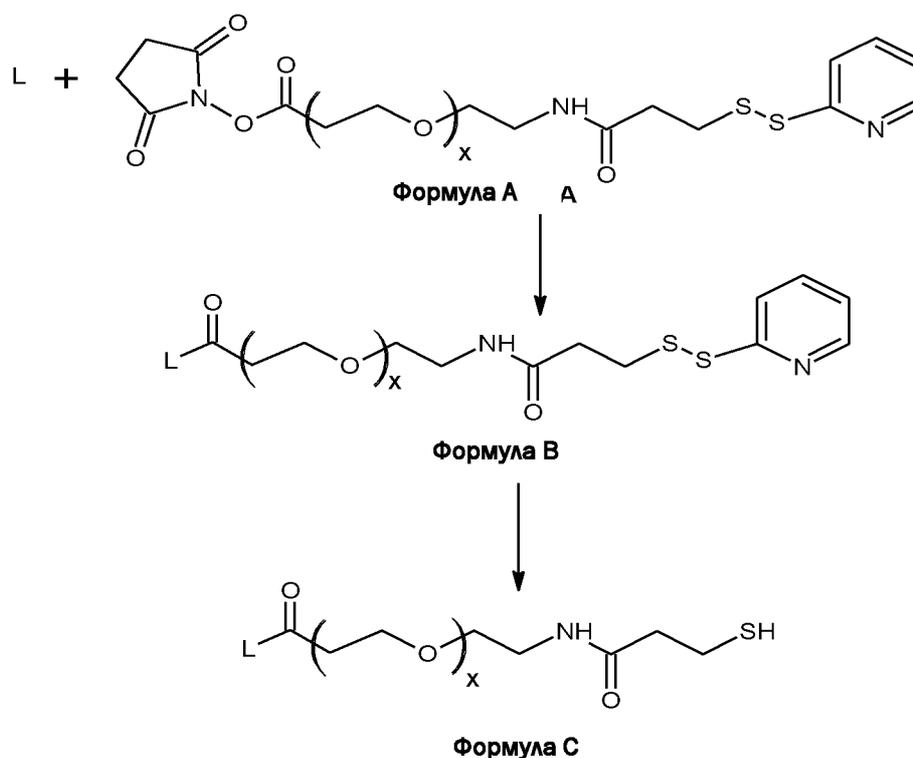


Схема I

Лектиновый белок иногда может быть модифицирован определенными нестандартными способами, известными специалистам. Например, добавлением к белку не встречающейся в природе аминокислоты или его модификацией в результате реакции Пикте-Шпенглера или гидразиновой реакции Пикте-Шпенглера или других подобных вариантов либо с помощью катализируемой медью клик-

реакции или переменной клик-реакции, такой как клик-реакции в отсутствие меди или в присутствии или отсутствии металлического катализатора.

В одном из вариантов осуществления изобретения лектиновый белок или модифицированный лектиновый белок далее вступают в реакцию с цитотоксическим агентом или терапевтическим агентом или его прекурсором или другой частью линкера, соединенного с цитотоксическим агентом или терапевтическим агентом, в условиях, известных специалистам. В одном из примеров такая реакция может проводиться путем восстановительного аминирования, или амидирования, или тиолмалеимидной реакции. Подобные реакции можно проводить в буферах при pH в диапазоне от примерно 5 до примерно 9.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения, готовое соединение можно очищать известными методами, такими как химическая очистка или хроматографическая очистка, например, эксклюзионная хроматография (SEC), хроматография с гидрофобным взаимодействием (HIC) или другими вариантами высокоэффективной жидкостной хроматографии. Характеристики промежуточных продуктов и готовых продуктов можно определить такими методами, как масс-спектрометрия, ядерный магнитный резонанс (ЯМР) или любыми другими методами, известными специалистам. Количественное распределение цитотоксического агента или терапевтического агента по отношению к лектиновому белку можно определять методом электрофореза наряду с другими методами, описанными ранее в данной заявке.

Согласно одному из вариантов осуществления настоящего изобретения, соединения, составляющие предмет настоящего изобретения, имеют высокую степень очистки. Термин «соединение высокой степени очистки» можно понимать как соединение, состоящее не менее чем на 80% из одного соединения, составляющего предмет настоящего изобретения, или не менее чем на 85%, или не менее чем на 90% из соединения, составляющего предмет настоящего изобретения. Термин «одно соединение» означает, что присутствует только одно из соединений по формуле I, или II, или II,I или IV, при этом присутствует только одно из них в виде одного изомера, или одного стереоизомера, или одной полиморфной формы, или сольвата.

В одном из вариантов осуществления изобретения под термином «одно соединение» понимают смесь соединений с разными значениями DAR с одинаковыми L, D и линкером. Например, соединение по формуле 15 со значениями DAR 1, 2 или 3

может присутствовать в виде смеси и применительно к настоящему изобретению считается одним соединением. Соединение, составляющее предмет настоящего изобретения, считается имеющим высокую степень очистки, если оно состоит по меньшей мере на 80% из смеси продуктов с одинаковой формулой с разными значениями DAR.

В другом воплощении одно соединение — это соединение, составляющее предмет настоящего изобретения, с одним значением DAR. Соединение считается имеющим высокую степень очистки, если оно состоит по меньшей мере на 80% из соединения с одним значением DAR и менее чем на 20% из соединения с другими значениями DAR. Например, соединение по формуле 15 считается имеющим высокую степень очистки, если оно состоит по меньшей мере на 80% из соединения со значением DAR, равным 1, а соединение по формуле 15 со значением DAR, равным 2, составляет менее 20%. Такие соединения с одинаковой формулой и разными значениями DAR можно разделять в помощью известных специалистам методов. Например, такие соединения можно разделять методом эксклюзионной хроматографии.

Специалистам следует понимать, что степень очистки соединений, составляющих предмет настоящего изобретения, относится как к их растворенной форме, так и к выделенной форме. Соединения, составляющие предмет настоящего изобретения, могут образовывать агрегаты в растворе. Чистое соединение, составляющее предмет настоящего изобретения, в растворе состоит по меньшей мере на 80% из агрегатов соединений с одной и той же формулой.

В пятом аспекте настоящего изобретения предложен состав, содержащий соединение по формуле I, или формуле II, или формуле III, или формуле IV. Состав, составляющий предмет настоящего изобретения, может иметь форму жидкости на водной основе или твердого вещества. В частном варианте осуществления состав может представлять собой жидкость, суспензию, порошок, стерильный порошок или лиофилизат для приготовления раствора. Лиофилизированный состав можно восстанавливать в воде для инъекций (ВДИ) и/или в любом подходящем фармацевтически приемлемом разбавителе или их смеси с получением требуемой концентрации, как известно специалистам. Состав подходит для применения в виде однократной или многократных доз. Как известно специалистам, способ дозирования зависит от различных факторов, таких как рост и вес, площадь поверхности тела,

возраст, пол или общее состояние здоровья пациента, от конкретного препарата, который предполагается применять, от продолжительности и типа введения и от других препаратов, которые могут применяться параллельно.

Композиции, составляющие предмет настоящего изобретения, можно вводить пациенту в подходящей дозе. Введение может быть местным, энтеральным или парентеральным, например, внутривенным, внутривенным, внутривенным, подкожным, внутримышечным, местным, интраназальным, внутривенным или внутривенным либо через катетер в какой-либо точке артерии. В частном варианте осуществления изобретения композиции, составляющие предмет настоящего изобретения, можно вводить парентерально.

Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, эффективная концентрация соединения по формуле I, или формуле II, или формуле III, или формуле IV лежит в диапазоне от 0,05 мкг/мл до 100 мкг/мл. В одном из частных вариантов осуществления изобретения эффективная концентрация лежит в диапазоне от 0,05 мкг/мл до 50 мкг/мл. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, эффективная концентрация цитотоксического агента или терапевтического агента лежит в диапазоне от 0,001 нМ до 1 мкМ.

В одном из аспектов композиция, составляющая предмет настоящего изобретения, может также содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, такие как буфер, стабилизатор, полимеры, слюбилизаторы, криопротекторы, лиопротекторы, объемобразующие агенты, разбавители, эмульгаторы и консерванты.

Согласно одному из аспектов, в числе вспомогательных веществ может быть полимер, такой как полиэтиленгликоли (ПЭГ), декстран, гидроксипропилкрахмал (ГЭК) или их комбинация; и белок, такой как сывороточный альбумин человека или желатин или их комбинация.

Согласно другому аспекту, стабилизатор можно выбирать из числа поверхностно-активных веществ, детергентов, аминокислот, фармацевтически приемлемых солей аминокислот, углеводов или стабилизаторов на основе сахара, аминов, многоатомных спиртов или их комбинации.

Жидкая композиция, составляющая предмет настоящего изобретения, может предпочтительно содержать буфер. Буфер можно выбирать, например, из числа фосфатных буферов, таких как динатрия гидрофосфат дигидрат, натрия дигидрофосфат

дигидрат, фосфатный буфер, такой как гидроортофосфат калия, дигидроортокалия фосфат, цитратный буфер, ацетатный, буфер, буфер трис-натрия хлорид или гистидин. Концентрация буфера может находиться в пределах от 1 мМ до 300 мМ. Специалисту очевидно, что рН препарата можно регулировать в пределах от 5 до 9.

Согласно частному аспекту настоящего изобретения предложена композиция, содержащая соединение по формуле I или формуле II, или формуле III, или формуле IV и буфер трис-натрия хлорид.

Композиция, составляющая предмет настоящего изобретения, может быть приготовлена с стандартных помощью методов, известных специалистам, или методов, изложенных в публикации «Protein formulation and Delivery» E. J. McNally с соавт. или «Rational Design of Stable Protein Formulations Theory and Practice» J. F. Carpenter с соавт.

В одном воплощении соединения, составляющие предмет настоящего изобретения, имеют применение в профилактике роста метастазов опухоли, лечении или излечении злокачественных образований. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, соединение по формуле I, или формуле II, или формуле III, или формуле IV можно использовать для профилактики или лечения аденокарциномы, плоскоклеточной карциномы, переходно-клеточной карциномы, базальноклеточной карциномы, сарком, лимфом, эпителиальных карцином или неэпителиальных карцином. Согласно частному варианту осуществления изобретения, терапевтически эффективное соединение по формуле I, или формуле II, или формуле III, или формуле IV, составляющее предмет настоящего изобретения, можно использовать для профилактики или лечения злокачественных опухолей поджелудочной железы, злокачественных опухолей брюшной полости, злокачественных опухолей печени, злокачественных опухолей простаты, злокачественных опухолей ротовой полости, злокачественных опухолей кишечника, злокачественных опухолей яичника, злокачественных опухолей мочевого пузыря, злокачественных опухолей почки, злокачественных опухолей желудка, злокачественных опухолей молочной железы, злокачественных опухолей костного мозга, меланомы, лейкемии или злокачественных новообразований центральной нервной системы у субъекта.

В шестом аспекте настоящего изобретения предложен метод лечения или профилактики злокачественных опухолей с применением соединения по формуле I

или формуле II, или формуле III, или формуле IV. Метод лечения или профилактики может включать в себя введение терапевтически эффективного количества указанного соединения субъекту. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение, составляющее предмет настоящего изобретения, вводится в дозе от 0,01 до 1000 мг/кг, от 0,05 до 100 мг/кг или от 0,1 до 50 мг/кг. Специалист в данной области сможет определить количество соединения по формуле I или формуле II, или формуле III, или формуле IV, которое следует вводить в зависимости от характера состояния, подлежащего лечению, и субъекта.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения соединения, составляющие предмет настоящего изобретения, такие как соединения по формулам 15–19 подвергались анализу на цитотоксичность в отношении клеточных линий злокачественных опухолей мочевого пузыря T24 посредством определения значений IC₅₀. Соединение по формуле 15 показало значение IC₅₀, равное 41,13 нМ, тогда как соединение по формуле 17 показало значение IC₅₀, равное 4,216 нМ, соединение по формуле 16 показало 325,4 нМ, соединение по формуле 18 показало значение IC₅₀, равное 19,93 нМ, а соединение по формуле 19 показало значение IC₅₀, равное 70,64 нМ. Аналогично, в анализе на цитотоксичность в отношении клеточных линий злокачественных опухолей яичника PA-1 соединение по формуле 15 показало значение IC₅₀, равное 40,9 нМ, соединение по формуле 16 показало значение IC₅₀, равное 17,7 нМ, соединение по формуле 17 – 2,61 нМ, соединение по формуле 18 – 1,04 нМ, а соединение по формуле 19 – 5,22 нМ.

ММАЕ отдельно показал значение IC₅₀, равное 3,23 нМ, а тс-vc-РАВ-ММАЕ показал 646,9 нМ, тогда как теzipин показал 13,42 нМ против клеточной линии PA-1. С другой стороны, ММАЕ отдельно показал значение IC₅₀, равное 0,24 нМ, тогда как теzipин показал 144,8 нМ против клеточной линии T24.

Сокращения:

DMA	Диметилацетамид
DMSO	Диметилсульфоксид
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
РК	Растворенный кислород
ДТПА	Диэтилентриаминпентаацетат
ДТТ	Дитиотрейтол

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ЭДТК	Этилендиаминтетрауксусная кислота
ЕМЕМ	Минимальная эссенциальная среда Игла
ФБС	ФБС
FDA	Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США
HCl	Хлороводородная кислота
HIC	Хроматография с гидрофобным взаимодействием
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
IgG	Иммуноглобулин G
ИПТГ	Изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид
K ₂ HPO ₄	Гидроортофосфат калия
кДа	Килодальтон
ЖХМС	Жидкостная хромато-масс-спектрометрия
MgSO ₄ ·7H ₂ O	Гептагидрат сульфата магния
MTS-PMS	MTS – [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2H-тетразол внутренняя соль, а PMS – реагент электронной связи (феназинметасульфат).
Na ₂ HPO ₄	Натрия гидрофосфат
NaCl	Натрия хлорид
NEM	N-этилмалеимид
(NH ₄) ₂ SO ₄	Аммония сульфат
ОП	Оптическая плотность
ФСБ	Фосфатно-солевой буфер
SEC	Эксклюзионная хроматография
TBS	Трис-буферный физиологический раствор
TFF	Тангенциальная поточная фильтрация
об/об	Объем/объем
vvm	Объем жидкости в минуту
масс/об	Масса/объем
PDC	Конъюгат белок-лекарственное вещество

ПРИМЕРЫ

Различные аспекты настоящего изобретения далее раскрываются посредством приведенных ниже примеров. Примеры хорошо известны, и специалисты хорошо знают и информированы об их очевидных вариациях. Поэтому примеры никоим образом не ограничивают объем настоящего изобретения.

Пример 1. Клон и процесс производства рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2

Нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 6), кодирующая рекомбинантный лектин с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2, клонированная в вектор pET27b (получено от Novagen) с помощью *Nde*I и *Bam*HI с образованием конструкции pET27b-Lec. Далее конструкцию pET27b-Lec трансформировали в хозяина для распространения компетентных клеток Top10 *E. coli*. Плазмиду изолировали из трансформированных клеток, подтверждали целостность вставок с помощью анализа расщепления рестриктазами и подтверждали последовательность генов методом секвенирования ДНК. Верифицированную плазмиду pET27b-Lec далее трансформировали в хозяина для экспрессии BL21 DE3 (Gold) *E. coli*. Трансформированные клоны тестировали на экспрессию рекомбинантного белка, и клоны, показывающие высокую экспрессию, верифицировали методом секвенирования ДНК и далее использовали для приготовления банка клеток. Банк клеток с установленными характеристиками используется в процессе ферментации.

Для ферментации посевную культуру готовили путем инокуляции культуры из глицеринового раствора в среде, содержащей 2% бульона Hivveg Luria, 0,75% Na_2HPO_4 , 0,5% декстрозы и канамицин (20 мкг/мл). Культуру выращивали при температуре 30 ± 2 °C и 110 об/мин в течение 16 часов. Приблизительно 300 мл культуры инокулировали в 2,3 л производственной среды, содержащей 1% дрожжевого экстракта (масс/об), 1,2% декстрозы (масс/об), 0,3% KH_2PO_4 (масс/об), 1,25% K_2HPO_4 (масс/об), 0,5% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (масс/об), 0,05% NaCl (масс/об), 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (масс/об), 0,1% (об./об.) микропримеси металла, канамицин (20 мкг/мл). Ферментацию проводили в 5-литровом ферментаторе (BIOSTAT B, Sartorius Stedim) с аэрацией 1–2 об/об/мин, уровень растворенного кислорода поддерживали равным 50–60%, а pH поддерживали равным 6,6–7,0 с помощью щелочи. Первичный рост проводили при температуре 37 °C. Температуру постепенно понижали и поддерживали на уровне 22 °C во время фазы индукции. Подачу

источника углерода (глицерина) и азота (дрожжевого экстракта) начинали через 5 часов логарифмического роста при заданной скорости подачи, при этом отношение C:N поддерживали в диапазоне 4:1. Культуру индуцировали при плотности клеток ~45 (ОП 600) с помощью 1 мМ ИПТГ. Ферментация продолжалась 24 часа, и бульонную культуру собирали центрифугированием на скорости 9000 об/мин в течение 15 минут. Сырая масса получаемой из бульонной культуры клеточной массы составляла приблизительно 350 г.

Клеточный осадок суспендировали в лизирующем буфере (25 мМ трис, 1 мМ ЭДТК, рН 8,5) в пропорции 1:10 (масс/об) и перемешивали в течение по меньшей мере 2 ч на мешалке с верхним приводом с получением гомогенной суспензии. Суспензию лизировали посредством гомогенизации при высоком давлении ~18 000 фунтов/кв. дюйм. Клеточный лизат центрифугировали на скорости 9000 об/мин в течение 15 мин при температуре 15 °С. Полученный супернатант удерживали и обрабатывали для дальнейшего осветления с использованием 0,025% полиэтилиммина и при перемешивании в течение 15–30 минут. Обработанный клеточный лизат осветляли через 0,1 мкм систему мембранной фильтрации площадью 3600 см², предварительно уравновешенной 25 мМ трис-буфером, содержащим 1 мМ ЭДТК, рН 8,0±0,5. В течение всего процесса осветления поддерживалось трансмембранное давление 5–10 фунтов/кв. дюйм.

Рекомбинантный лектин очищали с помощью четырехстадийной хроматографии. На первой стадии лизат клеток загружали в смолу Cellufine Max Q-r, предварительно уравновешенную 25 мМ трис-буфером, содержащим 1 мМ ЭДТК, рН 8,0±0,5, и промывали уравновешивающим буфером, содержащим 1–3 г/л NaCl. Белок чистотой 77,4% элюировали 25 мМ трис-буфером, содержащим 1 мМ ЭДТК, 11–15 г/л NaCl, рН 8±0,5. На второй стадии рН элюата колонки 1 довели до 4,5 уксусной кислотой с последующим осаждением аммония сульфатом. После центрифугирования прозрачный супернатант обрабатывали на смоле для НС (Cellufine Max Butyl), уравновешенной 25 мМ натрий-ацетатным буфером, содержащим 1 мМ ЭДТК, 0,5–2 М аммония сульфата, рН 4,5. После промывания уравновешивающим буфером белок чистотой 90,3% элюировали 25 мМ натрия ацетата, 1 мМ ЭДТК, 15 г/л аммония сульфата, рН 4,5. На третьей стадии белок очищали методом катионообменной хроматографии, во время которого элюат колонки 2 довели до электропроводности приблизительно 20 мСм/см очищенной водой и загружали в

смолю SP Sepharose FF, предварительно уравновешенную 25 mM натрий-ацетатным буфером, содержащим 1 mM ЭДТК, pH 4,5. После промывания уравнивающим буфером белок чистотой 93,0% элюировали способом ступенчатого градиента 70% элюирующим буфером, содержащим 25 mM натрия ацетата, 1 mM ЭДТК, 0,5 M раствор NaCl, pH 4,5. На четвертой стадии в элюате колонки 3 заменяли буфер на 25 mM трис-буфер, pH 8,0, с помощью мембраны 3 кДа и обрабатывали на анионообменной смоле Source 30Q, предварительно уравновешенной 25 mM трис-буфером, pH 8,0. После промывания проводили элюирование с линейным градиентом с использованием элюирующего буфера, содержащего 25 mM трис, 0,5 M раствор NaCl, pH 8,0 в 15 объемах колонки. Фракции с чистотой >99,0% по данным анализа ВЭЖХ объединяли и получали в общей сложности 9,0 граммов белка, по данным измерения оптической плотности на длине волны 280 нм, исходя из того, что 1 ОП на длине волны 280 нм соответствует 1 мг. В конечных фракциях элюата заменяли буфер на TBS (50 mM трис-буфера, 150 mM NaCl, pH 7,8).

Пример 2. Клон и процесс производства рекомбинантного лектина, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5

Нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 7, кодирующая рекомбинантный лектин с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO 5 клонировали в вектор pET27b с помощью *NdeI* и *BamHI* с получением конструкции pET27b. Далее конструкцию pET27b трансформировали в хозяина для распространения компетентных клеток Top10 *E. coli*. Плазмиду изолировали из трансформированных клеток, подтверждали целостность вставок с помощью анализа расщепления рестриктазами и подтверждали последовательность генов методом секвенирования ДНК. Верифицированную плазмиду pET27b далее трансформировали в хозяина для экспрессии BL21 DE3 (Gold) *E. coli*. Трансформированные клоны тестировали на экспрессию рекомбинантного белка, и клоны, показывающие высокую экспрессию, верифицировали методом секвенирования ДНК и далее использовали для приготовления банка клеток. Банк клеток с установленными характеристиками используется в процессе ферментации.

Для ферментации посевную культуру готовили путем инокуляции культуры из раствора глицерина в среде, содержащей дрожжевой экстракт (10 г/л), калия дигидрофосфат (3 г/л), калия гидроортофосфат (12,54 г/л), аммония сульфат (5 г/л), натрия хлорид (0,5 г/л), декстрозу (12 г/л), магния сульфата гептагидрат (1 г/л), канамицина сульфат

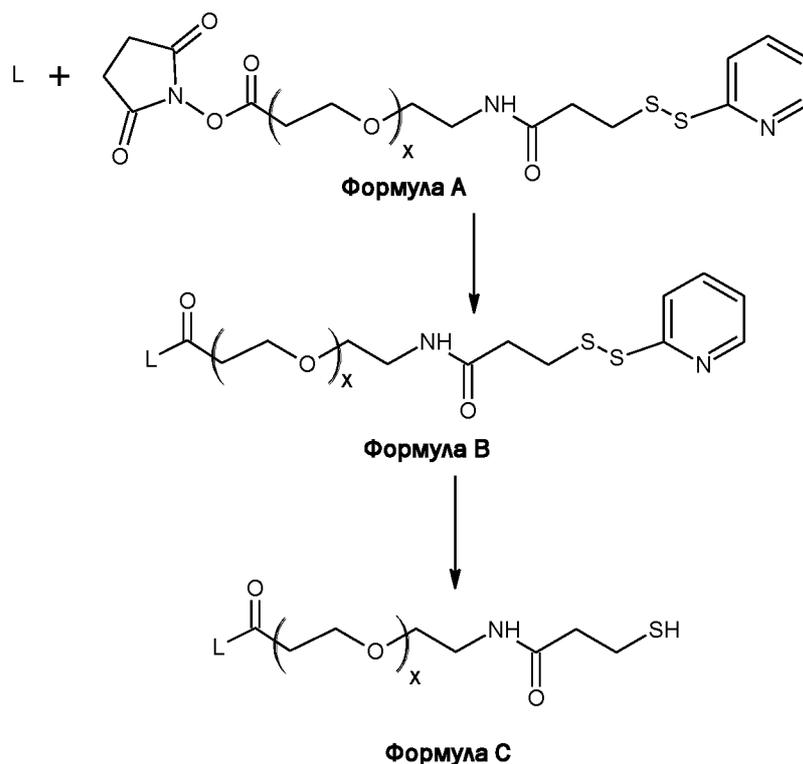
(20 мг/л) и раствор микропримеси металла (1 мл/л). Ферментацию начинали при температуре 30 °С, а затем температуру постепенно понижали до 18 °С. Уровень РК поддерживали равным 60%, а pH поддерживали равным $6,80 \pm 0,05$ с помощью щелочного раствора, за исключением стадии перехода на другой источник углерода. Применялся процесс ферментации с периодическим добавлением субстрата с использованием глицерина (50%) и дрожжевого экстракта (40%) в качестве, соответственно, источника углерода и азота в питательной среде. Индукцию выполняли с помощью 0,15 мМ ИПТГ при оптической плотности (ОП) при длине волны 600 нм около 60. Общее время обработки серии составляло от 48 до 72 часов, при этом максимальную ОП 600 достигали в диапазоне 107 через 52 часа логарифмического роста. Экспрессия рекомбинантного белка с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:5 составляла около 6,3 г/л. Ферментативный бульон собирали из ферментатора. Затем его центрифугировали на скорости 9000 об/мин в течение 10–15 минут при температуре 10 °С и получали компактный осадок клеток. Полученный осадок затем суспендировали в пропорции 1:10 (масс/об) в лизирующем буфере, содержащем 25 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТК, pH 8,5, и суспензию перемешивали в течение 1–2 часов механической мешалкой с поддержанием температуры 10 ± 4 °С. Лизис выполняли с помощью гомогенизатора высокого давления при давлении 1100 ± 200 бар за 1–2 прохода. Достигалась эффективность лизиса клеток >90–95% (при определении при ОП 600), и лизат собирали при низкой температуре.

Лизат клеток осветляли на колонке с использованием тонкопленочного фильтра с размером пор 0,1 мкм, и собирали пермеат. Чтобы извлечь максимальное количество белка, ретентат промывали 4–6 раз буфером 25 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТК, pH 8,0, в ступенчатом режиме до тех пор, пока поглощение белка при длине волны 280 нм не падало до уровня ниже 4–6. Затем раствор осветляли через систему мембранной фильтрации с размером пор 0,1 мкм при трансмембранном давлении 2–10 фунтов/кв. дюйм. Промывочные растворы, содержащие белок, объединяли с основным пермеатом. Температуру поддерживали ниже 25 °С во время всего процесса осветления.

Рекомбинантный лектин SEQ ID NO:5 очищали с помощью трехстадийной хроматографии. На первой стадии клеточный лизат загружали в смолу Cellufine Max Q-r, предварительно уравновешенную 25 мМ трис-буфером, содержащим 1 мМ ЭДТК,

pH $8,0 \pm 0,5$, и промывали 25 мМ трис-HCl, 1 мМ ЭДТК, 50 мМ NaCl при pH 8,0. Белок элюировали 25 мМ трис-HCl, 1 мМ ЭДТКА, 200 мМ NaCl при pH 8,0. Весь пик собирали одной фракцией. На второй стадии рекомбинантный лектин SEQ ID NO:5, элюированный на первой стадии, связывали с колонкой CM Sepharose, предварительно уравновешенной уравнивающим буфером при емкости связывания 20 мг/мл. После полной загрузки колонку промывали уравнивающим буфером 25 мМ ацетата натрия, 5 мМ β -меркаптоэтанола, pH 5,1, чтобы удалить несвязанный белок. Элюирование проводили с линейным градиентом 0–50% 25 мМ натрия ацетата, 1,0 М раствора NaCl, 5 мМ β -меркаптоэтанола, pH 5,1, за 15 объемов колонки с последующим промыванием 100% буфером 25 мМ натрия ацетата, 1,0 М раствора NaCl, 5 мМ β -меркаптоэтанола, pH 5,1. Затем с помощью трис-буфера доводили pH полученного из колонки CM Sepharose элюата до 8,0 и заменяли буфер на 25 мМ трис, 5 мМ бета-меркаптоэтанол, pH 8,0, до получения электропроводности менее 2,0 мСм/см с помощью мембраны 5 кДа. Рекомбинантный лектин SEQ ID NO: 5 загружали в третью колонку Source 30Q, предварительно уравновешенную уравнивающим буфером: 25 мМ трис, 5 мМ бета-меркаптоэтанол, pH 8,0. Рекомбинантный лектин SEQ ID NO: 5 затем элюировали элюирующим буфером 25 мМ трис, 5 мМ бета-меркаптоэтанол, 500 мМ NaCl, pH 8,0. Получали рекомбинантный лектин SEQ ID NO: 5 с чистотой выше 95%.

Пример 3. Общий порядок получения соединения по формуле С



В которой

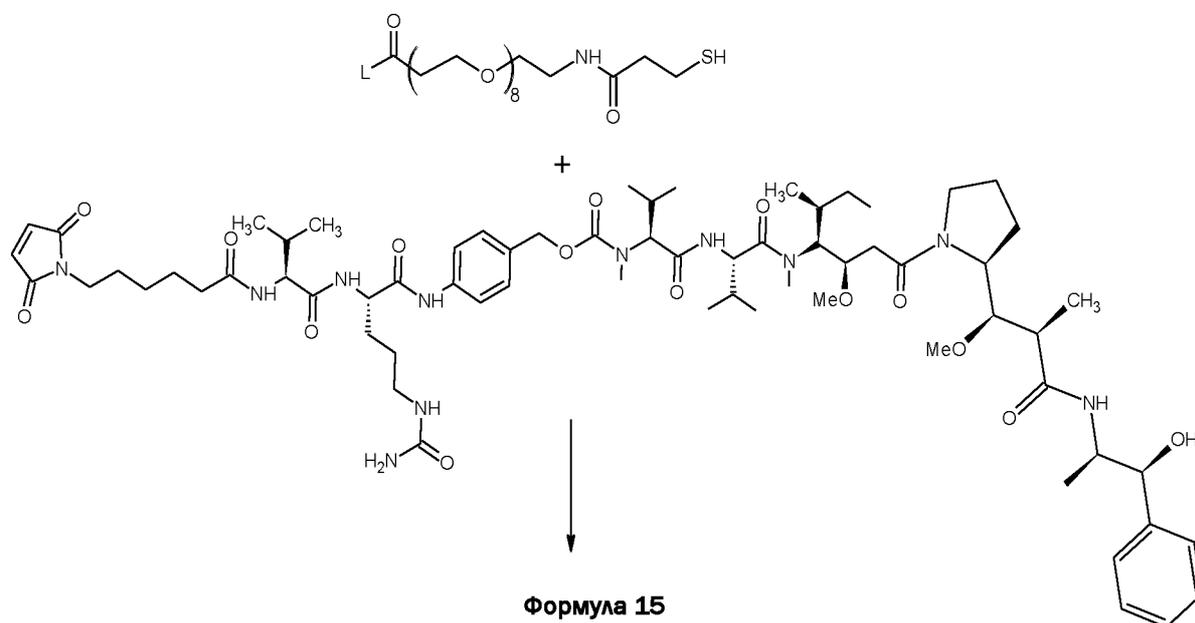
L — рекомбинантный лектин SEQ ID NO: 2

X — 8 или 12

Раствор рекомбинантного лектина SEQ ID NO: 2 концентрацией 12,2 мг/л в 1X ФСБ разбавляли в объеме 1:1 100 мМ двухосновного фосфата натрия, 150 мМ NaCl и 10 мМ ДТФА, pH 8,0. К нему добавляли 2,4 эквивалента (относительно SEQ ID NO: 2) доступного в продаже соединения по формуле А (10 мМ ДМСО), приобретенного в компании Quanta Biodesign Limited. Реакцию инкубировали при плавном перемешивании в течение 2 часов и определяли степень конъюгации методом ЖХМС. Если отношение лекарственного средства к белку (DAR) было менее 2, прибавляли дополнительный эквивалент 10 мМ соединения по формуле А и инкубировали еще час при комнатной температуре. После инкубации и подтверждения образования соединения по формуле В с DAR выше 2 методом ЖХМС в реакционную смесь прибавляли ДТТ, чтобы получить конечную концентрацию 50 мМ, и инкубировали при температуре 37 °С в течение 30 минут, чтобы получить соединение по формуле С, которое затем очищали на колонке SEC Superdex 75 в 1x

ФСБ, 10 мМ ЭДТК с получением очищенного соединения по формуле С с конечной концентрацией 4,8 мг/мл в 1х ФСБ, 10 мА ЭДТК.

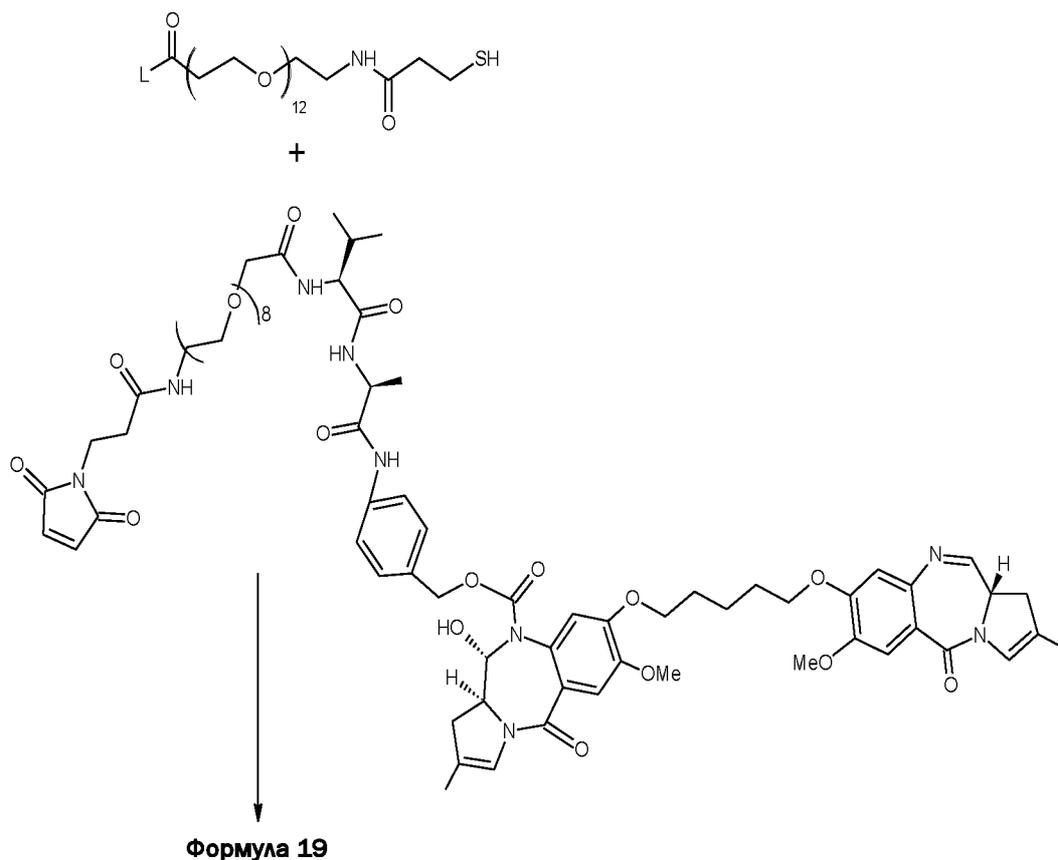
Пример 4. Получение конъюгата по формуле 15



L — рекомбинантный лектин SEQ ID NO:2

45 мг раствора (4,8 мг/мл) соединения по формуле С в 1Х ФСБ и 10 мМ ЭДТК далее довели до конечной концентрации 2,5 мг/мл с помощью 1Х ФСБ с 10 мМ ЭДТК, ДМСО и 1,5 экв. 10 мМ MC-VC-PAВ-ММАЕ в ДМСО, содержащем 6% циклодекстрина, что давало конечную концентрацию ДМСО 35% (об/об). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 60 минут с последующим кэппингом избыточным количеством 10 экв. NEM. Отношение лекарственного средства к белку (DAR) в конъюгате по формуле 15 определяли методом ЖХМС. Далее конъюгат по формуле 15 обрабатывали методом SEC на колонке GE10-300 Superdex 75) с заменой буфера на 50 мМ трис, 150 мМ NaCl с доведением pH до 8,0 ТРИС-буферным физиологическим раствором TBS. После очистки методом SEC определяли значение DAR конъюгата по формуле 15 методом ЖХМС. Значение DAR оказалось равным 1,09.

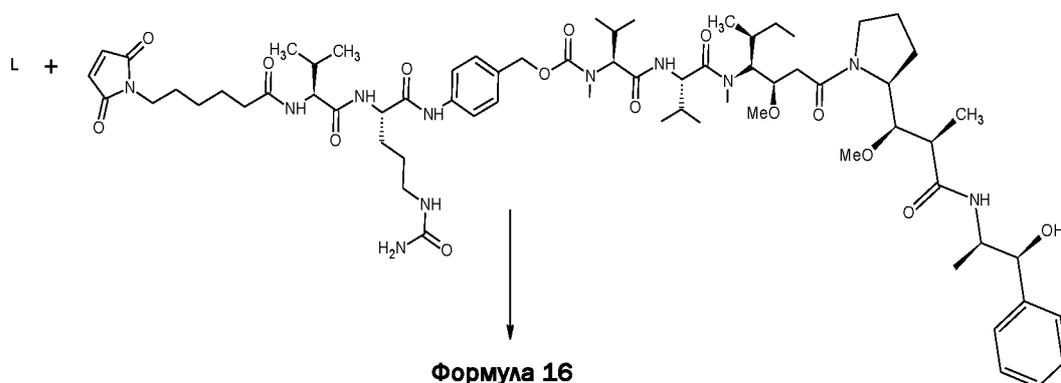
Пример 6. Получение конъюгата по формуле 19



L – рекомбинантный лектин SEQ ID NO:2

10,3 мг раствора соединения по формуле С 10 мМ ЭДТК далее довели до конечной концентрации 2,5 мг/мл с помощью 1X ФСБ с 10 мМ ЭДТК, ДМСО и 2,5 экв. 10 мМ тезирина в ДМСО, что давало конечную концентрацию ДМСО 35% (об/об). Раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 60 минут с последующим кэппингом избыточным количеством 10 экв. NEM. Затем отношение лекарственного средства к белку (DAR) в конъюгате по формуле 19 определяли методом ЖХМС. Конъюгат по формуле 19 обрабатывали методом SEC на колонке GE10-300 Superdex 75 с заменой буфера на 50 мМ трис, 150 мМ NaCl с доведением pH до 8,0 с помощью TBS. После очистки методом SEC определяли значение DAR конъюгата по формуле 19, которое оказалось равным 1,32.

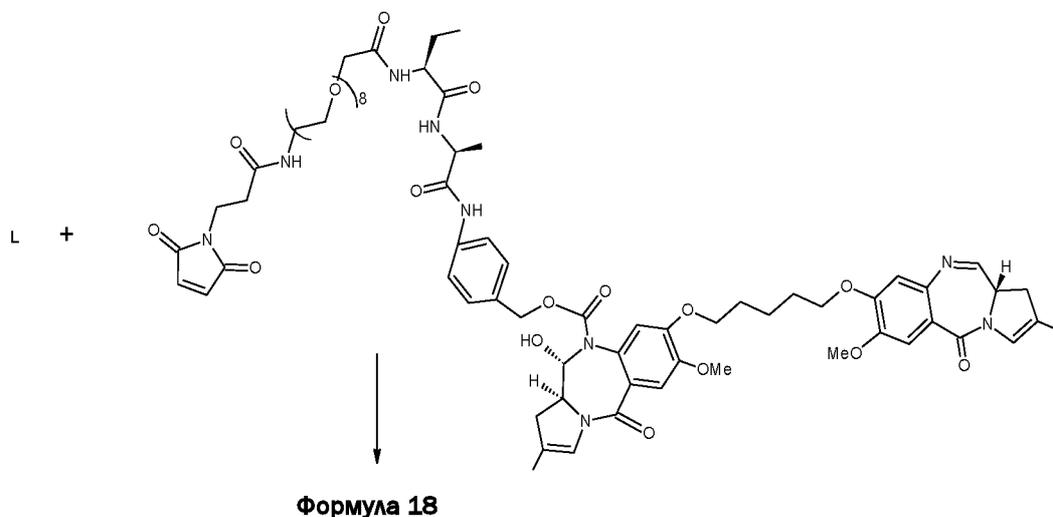
Пример 7. Получение конъюгата по формуле 16, в которой L соединяется через цистеин (SH) с комплексом линкера и лекарственного средства с прямой связью с цистеином SH белка.



L — рекомбинантный лектин SEQ ID NO:5

30 мг рекомбинантного лектина SEQ ID NO:5 в 1X ФСБ (7,0 мг/мл) далее довели до конечной концентрации 2,5 мг/мл с помощью 1X ФСБ с 10 мМ ЭДТК, ДМА и 3,0 экв. 10 мМ MC-Val-Cit-PAB-MMAE в ДМА, что давало конечную концентрацию ДМА 20% (об/об). Через 2 часа реакция была не завершена, и добавляли еще 3,0 экв. MC-Val-Cit-PAB-MMAE и инкубировали в течение 2 ч. Затем конъюгат по формуле 16 анализировали методом ЖХМС, чтобы определить значение DAR. Полученный продукт обрабатывали методом эксклюзионной хроматографии (SEC) на колонке GE10-300 Superdex 75 с заменой буфера на 50 мМ трис, 150 мМ NaCl и довели pH до 8,0 с помощью TBS. После очистки методом SEC определяли значение DAR конъюгата по формуле 16, которое оказалось равным 1,0.

Пример 8. Получение конъюгата по формуле 18



L — рекомбинантный лектин SEQ ID NO:5

5 мг рекомбинантного лектина SEQ ID NO: 5 в 1X ФСБ (7,0 мг/мл) далее доводили до конечной концентрации 2,5 мг/мл с помощью 1X ФСБ с 10 мМ ЭДТК, ДМА и 3,0 экв. 10 мМ тезирин в ДМА, что давало конечную концентрацию ДМА 20% (об/об). Через 2 часа реакция была не завершена, и прибавляли еще 3,0 экв. тезирин и инкубировали в течение 2 ч. Затем конъюгат по формуле 18 анализировали методом ЖХМС, чтобы определить значение DAR. Полученный продукт обрабатывали методом SEC на колонке GE10-300 Superdex 75 с заменой буфера на 50 мМ трис, 150 мМ NaCl и доводили pH до 8,0 с помощью TBS. После очистки методом SEC определяли значение DAR конъюгата по формуле 18, которое оказалось равным 1,05.

Пример 9. Биологический анализ – цитотоксическое действие конъюгата по формуле 15, 17 и 19 на клеточную линию злокачественной опухоли яичника (PA-1) и клеточную линию злокачественной опухоли мочевого пузыря человека (T-24).

Клеточную линию T-24 культивировали в модифицированной среде Маккоя 5a с добавлением 10% ФБС, а линию клеток PA-1 культивировали в среде EMEM с добавлением 10% ФБС. Анализ проводили путем посева 5000 клеток/лунка и инкубировали при температуре 37 °C в течение ночи. Конъюгаты рекомбинантного лектина SEQ ID NO: 2 по формуле 15, 17 и 19 получали в соответствующей среде, а разведение выполняли 10 раз, начиная с 10-микромольной концентрации и до 11 точек концентрации. Каждую концентрацию готовили в трех повторностях, при этом в качестве контроля использовались лунки только со средой. После инкубации в течение 72 ч в каждую лунку добавляли реактив CellTiter-Glo (Promega) (50 мкл), и планшеты встряхивали в течение 5 минут, записывая люминесценцию. Процент выживаемости определяли делением уровня люминесценции в обработанной лунке на таковой в необработанной лунке и умножением на 100. Данные анализировали методом нелинейной регрессии с использованием логарифмической шкалы.

Таблица 1. Цитотоксическое действие конъюгата по формуле 15, 17 и 19 на клеточную линию злокачественной опухоли яичника (PA-1) и клеточную линию злокачественной опухоли мочевого пузыря человека (T-24).

Соединение	Значения IC ₅₀	
	Клеточная линия PA-1	Клеточная линия T-24
Формула 15	40,9 нМ	41,13 нМ
Формула 17	2,61 нМ	4,216 нМ

Формула 19	5,225 нМ	70,64 нМ
SEQ ID No:2	20,3 мкг/мл	10,4 мкг/мл

Заключение:

SEQ ID NO.2 не проявляет значительных цитотоксических эффектов при концентрации ниже 10 мкМ в отношении обеих клеточных линий. Значения IC50 лежат в диапазоне 15–25 мкМ для SEQ ID NO.2, в то время как для формулы 15, 17 и 19 значения IC50 лежат в наномолярном диапазоне, то есть конъюгаты проявляют выраженное действие против клеточной линии PA-1 и клеточной линии T-24.

Пример 10. Биологический анализ — цитотоксическое действие конъюгата по формуле 16 и 18 на клеточную линию злокачественной опухоли яичника (PA-1) и клеточную линию злокачественной опухоли мочевого пузыря человека (T-24).

Высевали 5000 клеток на лунку и инкубировали при температуре 37 °С в течение ночи. В соответствующей среде готовили разведения растворов конъюгатов и контрольного растворителя и добавляли их к клеткам. Добавляемый объем: 50 мкл в каждую лунку. Начальная концентрация обработки составляла 1 мкМ для конъюгата по формуле 16 и 18 и только контроля в виде SEQ ID NO: 5 и 10% для контрольного растворителя (1X ФСБ с 20% ДМА), затем выполняли разведения 10 раз с получением в общей сложности 11 разбавленных растворов. Каждую концентрацию анализировали в трех повторностях. Лунки только со средой использовали в качестве контрольных для расчета процента выживаемости. В каждую лунку добавляли реактив CellTiter-Glo (объем: 50 мкл), планшет встряхивали в течение 5 минут, и записывали люминесценцию. Продолжительность обработки лекарственным средством: 72 часа. Процент выживаемости рассчитывали путем деления сигнала люминесценции, получаемого в каждой обработанной лунке, на таковой в необработанной лунке (контроль только со средой) и умножения на 100.

Затем данные преобразовывали по формуле $X = \text{Log}(x)$ и анализировали методом нелинейной регрессии (подгонкой кривой), ингибирование дозозависимого ответа – \log (ингибитор) как функцию ответа (3 параметра) с помощью программного обеспечения PRISM, чтобы определить значение IC50.

Таблица 2. Цитотоксическое действие конъюгата по формуле 16 и 18 на клеточную линию злокачественной опухоли яичника (РА-1) и клеточную линию злокачественной опухоли мочевого пузыря человека (Т-24).

Соединение	Значения IC ₅₀	
	Клеточная линия РА-1	Клеточная линия Т-24
Формула 16	17,7 нМ	325,4 нМ
Формула 18	1,04 нМ	19,93 нМ
SEQ ID NO:5	16 мкг/мл	-

Заключение:

SEQ ID NO.5 не проявляет значительных цитотоксических эффектов при концентрации ниже 10 мкМ в отношении обеих клеточных линий.

Значения IC₅₀ для SEQ ID NO.5 лежат в диапазоне 15–25 мкМ, в то время как для формулы 16 и 18 значения IC₅₀ лежат в наномолярном диапазоне, то есть конъюгаты проявляют выраженное действие против клеточной линии РА-1 и клеточной линии Т-24.

Пример 11. Изучение связывания гликанов и изучение колокализации

а. Изучение связывания гликанов проводилось с целью понять присутствие и специфичность лектина с SEQ ID NO 2 в отношении гликанов, экспрессируемых на злокачественных клетках.

Лектин с Seq ID No 2 анализировали с использованием следующих массивов гликанов с целью определения специфичных связывающих мотивов:

- массив О-гликанов, содержащий 94 гликана; и
- массив N-гликанов, содержащий 100 гликанов

Наблюдения:

- Указанный лектин с Seq ID No 2 показал специфичное связывание с N-гликанами, содержащими GlcNac на невосстанавливаемом конце; расчетное значение Kd с терминальными мотивами N-гликана GlcNac было в диапазоне от 0,238 до 0,460 Kd (мкг/мл).
- Лектин с Seq ID No 2 показал сильный и широкий профиль связывания с О-гликанами, а конкретно с Т-антигеном и его расширенными коровыми структурами. Было установлено, что основными связывающими мотивами являются О-GalNac Core1 (Т-антиген); расширенные структуры Core1; Core2; α2,3/6-сиалил Core1 и α2,6/6-сиалил Core2. Расчетное

значение Kd для Т-антигена равно 0,319, для сиалильного Т-антигена — от 0,670 до 1,756, а для Core2 — 0,212 Kd (мкг/мл).

в. Изучение колокализации SEQ ID NO 2

Изучение проводилось с целью проанализировать локализацию SEQ ID NO 2 (исследуемого образца) в клеточных органеллах методом конфокальной микроскопии.

Исследуемый образец в виде водного раствора помечали ФИТЦ-меткой в Bioklone Biotech Pvt Ltd. Полученная в результате концентрация ФИТЦ-меченого исследуемого образца составляла 1 мг/мл.

Исходный раствор исследуемого образца доводили в бессывороточной среде до одной концентрации — 100 мкг/мл.

Клетки высевали на покровное стекло с плотностью посева $0,1 \times 10^6$ клеток/лунка. После завершения адгезии клеток на покровном стекле клетки обрабатывали 100 мкг/мл ФИТЦ-меченого рекомбинантного лектина с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 в течение 2 часов при температуре 37 °С.

После инкубации клетки промывали ФСБ (3 промывки) и фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 10 минут при комнатной температуре. После фиксации клетки выполняли пермеабиллизацию с помощью 0,5% IGEPAL в течение 10 минут при комнатной температуре (пермеабиллизация не выполнялась для клеток, окрашенных Pan-Cadherin). После пермеабиллизации клетки блокировали 5% нормальной козьей сывороткой в течение 1 часа при комнатной температуре. После блокировки клетки обрабатывали специфическими маркерами органелл в течение 1,5 часов при комнатной температуре, а затем — вторичным антителом в течение 2 часов при комнатной температуре.

Для разных органелл использовались следующие антитела:

Таблица 3. Антитела, использовавшиеся для органелл

Органелла	Специфический маркер органелл	Разведение	Вторичное антитело	Разведение
Митохондрия	MTCO2	1: 50	Козье антитело к IgG мыши, конъюгированное	1:500

			с Texas Red	
Эндоплазматический ретикулум	Калнексин	1: 50	Антитело к IgG мыши, конъюгированное с Texas Red	1:500
Аппарат Гольджи	GM130	1: 50	Антитело к IgG мыши, конъюгированное с Texas Red	1:500
Оболочка ядра	Ламин	1: 50	Антитело к IgG мыши, конъюгированное с Texas Red	1:500
Плазматическая мембрана	Pan Cadherin	1: 50	Антитела anti- rabbit, меченные Alexa Fluor красным	1:500

После инкубации клетки промывали ФСБ-Т (3 промывки) и ФСБ (3 промывки) и окрашивали ДАФИ (ядерный краситель) в течение 3 минут при комнатной температуре.

Клетки промывали (3 промывки) и помещали на предметное стекло с помощью среды для заключения, препятствующей выгоранию флуоресценции Prolong Glass. Получали изображения на конфокальном флуоресцентном микроскопе (производитель: Olympus FV1000) в AIRF, JNU. Изображения получали с помощью программного обеспечения FluoView.

Для определения колокализации рекомбинантного лектина с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2 (рекомбинантного белка) клетки злокачественной опухоли мочевого пузыря (T24) инкубировали с рекомбинантным лектином с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2, меченным ФИТЦ, в течение 2 ч. Затем следовало окрашивание специфическими маркерами органелл МТСО2 (митохондрия), калнексином (эндоплазматический ретикулум), GM130 (аппарат Гольджи), Pan Cadherin (плазматическая мембрана) и ламином А/С (ядерная мембрана). Визуализация клеток выполнялась с помощью конфокального микроскопа.

Результаты продемонстрировали, что рекомбинантный лектин с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:2 (рекомбинантный белок) колокализовался в митохондриях, эндоплазматическом ретикулуме, аппарате Гольджи и плазматической мембране (красная флуоресценция). В то же время, локализация в оболочке ядра не наблюдалась [см. фиг. 6].

Пример 12. Цитотоксические эффекты конъюгатов оценивались на панели клеточных линий злокачественной опухоли и линии нормальных клеток методом МТТ-анализа

Клетки обрабатывали исследуемыми образцами при разных концентрациях (0,0001 мкМ – 10 мкМ) в течение 48 ч. Клетки, соответствующие группе положительного контроля, обрабатывали доксорубицином в концентрации от 0,1 мкМ до 100 мкМ. Необработанные клетки использовали в качестве контроля. После 48 ч инкубации влияние исследуемых образцов на цитотоксичность клеток определяли методом МТТ-анализа, планшеты вынимали и во все лунки прибавляли 20 мкл раствора 5 мг/мл МТТ 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид. Клетки инкубировали в течение 3 ч при температуре 37 °С. Супернатант аспирировали. В каждую лунку прибавляли 150 мкл ДМСО для растворения кристаллов формазана. Поглощение каждой лункой записывали на длине волны 540 нм с помощью микропланшетного ридера Synergy HT.

Цитотоксичность в % рассчитывали по формуле:

$$\text{Цитотоксичность, \%} = [(R-X)/R] * 100$$

где, X – поглощение клеток, обработанных исследуемым образцом; R – поглощение контрольных клеток (не обработанных клеток, содержащихся только в питательной среде).

Значение IC50 рассчитывали как концентрацию, приводящую к 50% ингибированию роста клеток в сравнении с не обработанными клетками, с помощью программы Graphpad Prism версии 4.01.

Индекс селективности рассчитывали по формуле:

$$SI = IC50 \text{ в нормальных клетках} / IC50 \text{ в злокачественных клетках.}$$

Показатели активности значения селективного индекса классифицировали следующим образом:

- Неселективный (значение $SI \leq 1$)
- Умеренно селективный ($1 < \text{значение } SI < 5$)
- Селективный (значение $SI \geq 5$)

Были получены следующие результаты:

Таблица 4а. ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ SEQ ID NO.2, ММАЕ И ФОРМУЛЫ 15 (КОНЪЮГАТА С ЛЕКАРСТВЕННЫМ ВЕЩЕСТВОМ) ПОСЛЕ 48 ЧАСОВ ВОЗДЕЙСТВИЯ								
Клеточные линии	Доксорубицин (мкм) Положительный контроль (мкм)		SEQ ID NO.2 (мкм)		ММАЕ (мкм)		ФОРМУЛА 15 (КОНЪЮГАТА С ЛЕКАРСТВЕННЫМ ВЕЩЕСТВОМ) (мкм)	
	Концентрация	Процент цитотоксичности относительно контроля	Концентрация	Процент цитотоксичности относительно контроля	Концентрация	Процент цитотоксичности относительно контроля	Концентрация	Процент цитотоксичности относительно контроля
MG-63 кости	0,1	35,3	0,0001	27	0,0001	81,7	0,0001	33,2
	1	60,7	0,001	38,7	0,001	85,5	0,001	16,7
	10	82	0,01	50,4	0,01	86,2	0,01	58,5
	50	85,5	0,1	59,1	0,1	87,4	0,1	77,1
	100	75,5	1	72,3	1	85,3	1	82,5
	-	-	10	74	10	82,3	10	85,6
РА-1 яичника	0,1	19,6	0,0001	0,9	0,0001	13,4	0,0001	25,3
	1	62,6	0,001	-5,6	0,001	57,5	0,001	20,7
	10	73,2	0,01	7,4	0,01	50	0,01	49,3
	50	79	0,1	4,5	0,1	57,5	0,1	45,9
	100	71,5	1	51	1	61,7	1	50,3
	-	-	10	72,2	10	58,3	10	73,9
КВ шейки матки	0,1	28,7	0,0001	-1,5	0,0001	90,5	0,0001	-7
	1	53,1	0,001	-2,6	0,001	95,8	0,001	-10,8
	10	95,7	0,01	-3,9	0,01	96,1	0,01	9,4
	50	91,7	0,1	20,4	0,1	96,3	0,1	48,2
	100	84,2	1	51,2	1	96,2	1	84,3
	-	-	10	54,9	10	96,3	10	90,4
T24 мочевого пузыря	0,1	21	0,0001	9,7	0,0001	51,8	0,0001	11,8
	1	34,8	0,001	11,1	0,001	51,1	0,001	6,3
	10	72,8	0,01	9,1	0,01	46,1	0,01	5,5
	50	66,6	0,1	10,5	0,1	44,4	0,1	41,6
	100	52,7	1	43,1	1	44,4	1	47,9
	-	-	10	68,7	10	53,2	10	55
MDA-MB-231 молочной железы	0,1	3,4	0,0001	13,7	0,0001	11,3	0,0001	9,1
	1	68	0,001	15,1	0,001	13,3	0,001	6,9
	10	74,3	0,01	16,2	0,01	28,9	0,01	19,4
	50	71,3	0,1	28,1	0,1	23,8	0,1	-3,4
	100	58	1	48,5	1	16,8	1	53,1
	-	-	10	66,4	10	26,4	10	57,7

U251MG Головного мозга	0,1	-13,5	0,0001	-9,9	0,0001	77,8	0,0001	-14,8
	1	41,7	0,001	-13,2	0,001	52,5	0,001	-16,8
	10	57,9	0,01	-14,5	0,01	58,6	0,01	15,2
	50	71	0,1	-5,3	0,1	63,1	0,1	14
	100	65,6	1	15,9	1	64,7	1	28,4
	-	-	10	62,5	10	71	10	72,6
HT29 кишечника	0,1	3,2	0,0001	14	0,0001	44,1	0,0001	5,4
	1	1,7	0,001	16,6	0,001	44,6	0,001	2,4
	10	32,7	0,01	22,5	0,01	50,6	0,01	37,2
	50	61,9	0,1	24,7	0,1	50,4	0,1	52,8
	100	59,8	1	35,4	1	51,9	1	63,9
	-	-	10	54,1	10	55,9	10	68,2
AGS желудка	0,1	15,6	0,0001	7,8	0,0001	30,9	0,0001	1,6
	1	72,4	0,001	8,5	0,001	31,7	0,001	39,2
	10	74,5	0,01	15,9	0,01	32,6	0,01	42,4
	50	74,8	0,1	37	0,1	48,2	0,1	49,2
	100	79	1	49,9	1	48,4	1	56,8
	-	-	10	57,2	10	54,4	10	67,6
PANC-1 поджелудочной железы	0,1	-3,4	0,0001	9,5	0,0001	38,1	0,0001	50,2
	1	18,6	0,001	17	0,001	41	0,001	53,1
	10	67,3	0,01	20,5	0,01	64,1	0,01	56,2
	50	71,6	0,1	22,5	0,1	67,7	0,1	65,5
	100	70,1	1	34,4	1	77,1	1	70,6
	-	-	10	36,4	10	69,7	10	72,5
A549 легкого	0,1	3,3	0,0001	-0,5	0,0001	27,9	0,0001	-8,8
	1	10,2	0,001	-15,5	0,001	39,3	0,001	-8,9
	10	54,2	0,01	-1,1	0,01	43,5	0,01	12,8
	50	75,4	0,1	-6,9	0,1	58,8	0,1	39,1
	100	76,2	1	31,9	1	83,6	1	60,2
	-	-	10	48,2	10	75,8	10	76,7
МКПК в норме	0,1	5,3	0,0001	-7,4	0,0001	-2,7	0,0001	-7,6
	1	29,3	0,001	19,9	0,001	29,8	0,001	24,7
	10	37,4	0,01	24	0,01	34,3	0,01	28,1
	50	40,5	0,1	44,9	0,1	34,1	0,1	40,7
	100	37,1	1	49,5	1	26,6	1	57,2
	-	-	10	43,4	10	32,5	10	53,7

Заключение:

Соединение по ФОРМУЛЕ 15 (КОНЬЮГАТ С ЛЕКАРСТВЕННЫМ ВЕЩЕСТВОМ) показало цитотоксичность в отношении тестируемой панели клеточных линий.

Таблица 4в. ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ТЕЗИРИНА ФОРМУЛЫ 17 (КОНЬЮГАТЫ С ЛЕКАРСТВЕННЫМ ВЕЩЕСТВОМ) ПОСЛЕ 48 ЧАСОВ ВОЗДЕЙСТВИЯ								
Клеточные линии	ТЕЗИРИН (мкм)		ФОРМУЛА 17 (КОНЬЮГАТЫ С ВЕЩЕСТВОМ) 2А (мкм)		ФОРМУЛА 17 (КОНЬЮГАТЫ С ЛЕКАРСТВЕННЫМ ВЕЩЕСТВОМ) 2В (мкм)		ФОРМУЛА 17 (КОНЬЮГАТЫ С ЛЕКАРСТВЕННЫМ ВЕЩЕСТВОМ) 2С (мкм)	
	Концентрация	Процент цитотоксичности относительно контроля	Концентрация	Процент цитотоксичности относительно контроля	Концентрация	Процент цитотоксичности относительно контроля	Концентрация	Процент цитотоксичности относительно контроля
MG-63 кости	0,0001	46,6	0,0001	56,8	0,0001	28,6	0,0001	42,7
	0,001	69,4	0,001	50,5	0,001	33,3	0,001	45,9
	0,01	81,2	0,01	53,4	0,01	31,3	0,01	28
	0,1	79,9	0,1	88,8	0,1	72,4	0,1	46,1
	1	82,3	1	91,7	1	89,6	1	90,7
	10	81,8	10	91,6	10	86	10	90,4
РА-1 яичника	0,0001	53,1	0,0001	26,1	0,0001	10,2	0,0001	17,8
	0,001	66,8	0,001	36,4	0,001	18,4	0,001	25,2
	0,01	79,1	0,01	75,1	0,01	56,2	0,01	61,2
	0,1	79,9	0,1	80	0,1	80,3	0,1	80,6
	1	78,1	1	79,9	1	78,9	1	79,6
	10	80,5	10	80,7	10	80,2	10	80,3
КВ шейки матки	0,0001	-9,5	0,0001	15,3	0,0001	15,7	0,0001	-2
	0,001	1	0,001	27,1	0,001	17,6	0,001	11,5
	0,01	76,2	0,01	57,6	0,01	36,5	0,01	30,1
	0,1	93,8	0,1	95,5	0,1	91,2	0,1	90,2
	1	89,1	1	95,7	1	95,8	1	95,9
	10	92,7	10	95,9	10	94,2	10	93
T24 мочевого пузыря	0,0001	57,5	0,0001	21,6	0,0001	21,8	0,0001	24,3
	0,001	60,6	0,001	28,7	0,001	26,7	0,001	22,4
	0,01	57,5	0,01	33,7	0,01	26,3	0,01	23,3
	0,1	61,4	0,1	51	0,1	44,8	0,1	40,2
	1	62,7	1	57,7	1	55,4	1	59,6
	10	80,4	10	59,4	10	66,2	10	74,4
MDA-MB-231 молочной железы	0,0001	45,9	0,0001	14,5	0,0001	58,5	0,0001	65,4
	0,001	41,9	0,001	-0,6	0,001	62,9	0,001	67,8
	0,01	58,9	0,01	1,7	0,01	62,8	0,01	63,8
	0,1	68,6	0,1	44,7	0,1	68,3	0,1	69,8
	1	69,2	1	55,3	1	75,4	1	74,3

	10	80,7	10	77,6	10	73,7	10	81,8
U251MG головного мозга	0,0001	-10,3	0,0001	-1	0,0001	10,2	0,0001	11,5
	0,001	26,5	0,001	16,4	0,001	9,7	0,001	6,8
	0,01	23,1	0,01	75,5	0,01	18,1	0,01	18,5
	0,1	19,2	0,1	62,6	0,1	77,9	0,1	77,4
	1	27,2	1	54,7	1	65,8	1	67,1
	10	60,5	10	70,3	10	77,3	10	78,6
HT29 кишечника	0,0001	37,4	0,0001	17,5	0,0001	5,7	0,0001	12,8
	0,001	44,5	0,001	20,9	0,001	6,9	0,001	11,6
	0,01	47,7	0,01	22,9	0,01	15,8	0,01	10,7
	0,1	48,3	0,1	30,1	0,1	15,6	0,1	26,2
	1	49	1	53,2	1	39,2	1	43,5
	10	80,7	10	63,9	10	59,5	10	68,6
AGS желудка	0,0001	66,4	0,0001	7,6	0,0001	27,7	0,0001	22,6
	0,001	77,5	0,001	3,2	0,001	25,3	0,001	19,9
	0,01	77,8	0,01	59,2	0,01	28,1	0,01	38,3
	0,1	81,3	0,1	69,6	0,1	73,3	0,1	71,7
	1	81,3	1	72,1	1	75	1	75,1
	10	81,6	10	78,8	10	71,6	10	78,4
PANC-1 поджелудочной железы	0,0001	46,6	0,0001	13,5	0,0001	-2	0,0001	9,3
	0,001	51,1	0,001	11,4	0,001	24	0,001	6,5
	0,01	58,3	0,01	17,1	0,01	18,1	0,01	6,4
	0,1	55	0,1	35,7	0,1	21,6	0,1	18,7
	1	59,2	1	67,8	1	13,2	1	14,6
	10	71	10	77,5	10	58,9	10	68,6
A549 легкого	0,0001	13,7	0,0001	-6,3	0,0001	-10,3	0,0001	-3,8
	0,001	15,2	0,001	-3,1	0,001	-15,4	0,001	-19,1
	0,01	34,4	0,01	12	0,01	-2	0,01	1
	0,1	45,2	0,1	84,3	0,1	11,6	0,1	9,1
	1	53,3	1	75,2	1	38,4	1	68,6
	10	66,7	10	79,7	10	78,5	10	70,8
МКПК в норме	0,0001	16,9	0,0001	-4,4	0,0001	9,1	0,0001	29,1
	0,001	36,5	0,001	22,9	0,001	14	0,001	25,5
	0,01	40,3	0,01	18,8	0,01	30,2	0,01	18,2
	0,1	38,7	0,1	45,9	0,1	34,4	0,1	33,1
	1	38,2	1	42,7	1	68,8	1	65,9
	10	55,3	10	65,7	10	68,5	10	70,4

Заключение:

Соединение по формуле 17 показало цитотоксичность в отношении тестируемой панели клеточных линий.

ТАБЛИЦА 5. ЗНАЧЕНИЯ IC50 формулы 15 И формулы 17 (КОНЬЮГАТОВ РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК-ЛЕКАРСТВЕННОЕ ВЕЩЕСТВО) ПОСЛЕ 48 Ч ОБРАБОТКИ									
Значения IC50	Клеточные линии	Доксорубицин РС (мкм)	SEQ ID NO.2 (мкм)	ММАЕ (мкм)	Конъюгат по формуле 15 (мкм)	ТЕЗИРИН (мкм)	Конъюгат по формуле 17 2А (мкм)	Конъюгат по формуле 17 2В (мкм)	Конъюгат по формуле 17 2С (мкм)
	MG-63 кости	0,4	0,0127	0,0001	0,0067	0,00003	0,00021	0,012	0,009
	РА-1 яичника	1	1,535	0,03011	0,1422	5,99E-06	0,002	0,011	0,007
	КВ шейки матки	0,6	0,88	0,0001	0,12	0,006	0,005	0,014	0,019
	T24 мочевого пузыря	5,5	2,13	0,00001	2,19	0,002	0,27	0,43	0,34
	MDA-MB-231 молочной железы	2,1	1,35	>10	1,58	0,0014	0,87	7,7DE-07	7,96E-09
	U251MG головного мозга	8,1	5,95	0,0002	2,82	6,82	0,04	0,07	0,07
	HT29 кишечника	35,3	9,39	0,05	0,18	0,02	1,09	3,87	1,63
	AGS желудка	4,3	1,72	1,54	0,14	4,33E-10	0,03	0,03	0,02
	PANC-1 поджелудочной железы	8,2	>10	0,0015	0,001	0,0007	0,31	1	0,44
	A549 легкого	11	10	0,01	0,45	0,39	0,04	1,83	0,78
	МКПК в норме	>100	>10	>10	0,94	5,09	0,96	0,21	0,49

Заключение: Конъюгаты белок-лекарственное вещество показали более высокую цитотоксичность в отношении всех исследуемых типов злокачественной опухоли по сравнению с Seq. ID. 2. Значения IC 50 конъюгатов белок-лекарственное вещество очень низкие для клеток злокачественной опухоли в сравнении с нормальными клетками.

ТАБЛИЦА 6. ИНДЕКС СЕЛЕКТИВНОСТИ формулы 15 И формулы 17 (КОНЬЮГАТОВ РЕКОМБИНАНТНЫЙ БЕЛОК-ЛЕКАРСТВЕННО СРЕДСТВО) ПОСЛЕ 48 Ч ОБРАБОТКИ МКПК								
Селективность относительно МКПК	Клеточные линии	SEQ ID NO.2 (мкм)	ММАЕ (мкм)	Конъюгат по формуле 15 1А (мкм)	ТЕЗИРИН (мкм)	Конъюгат по формуле 17 2А (мкм)	Конъюгат по формуле 17 2В (мкм)	Конъюгат по формуле 17 2С (мкм)

MG-63 кости	786,78	100000	140,3	169666,7	4541,2	18,26	56,4
PA-1 яичника	6,51	332,1	6,6	849182,5	449,9	19,14	73,2
KB шейки матки	11,33	100000	7,9	844,8	193	14,89	26,1
T24 мочевого пузыря	4,69	1062837	0,4	2412,3	3,6	0,49	1,4
MDA-MB- 231 молочной железы	7,39	1	0,6	3707,2	1,1	272762,7	61573259 ,6
U251MG головного мозга	1,68	49019,6	0,3	0,7	23,4	2,93	7,1
HT29 кишечника	1,07	208,4	5,1	236,1	0,9	0,05	0,3
AGS желудка	5,81	1	6,7	1,18E+10	37,7	7,04	20,7
PANC-1 поджелу- дочной железы	1	6662,2	987,8	7829,6	3,1	0,21	1,1
A549 легкого	1	887,3	2,1	13	26,8	0,11	0,6

Индекс селективности (ИС) интерпретируется следующим образом:

Значение СИ <1 = неселективный; 1 < значение СИ <5 = умеренно селективный; значение СИ >5 = селективный;

Заключение:

Конъюгаты белок-лекарственное вещество показали высокий индекс селективности в исследуемых типах злокачественной опухоли в сравнении с нормальными клетками.

Пример 13.

Противоопухолевый потенциал *in vivo* соединения по формуле 16 оценивали на ксенотрансплантатной модели T24 карциномы мочевого пузыря человека

Противоопухолевый потенциал *in vivo* соединения по формуле 16 оценивали на ксенотрансплантатной модели T24 карциномы мочевого пузыря человека у мышей посредством оценки биологических конечных точек, таких как рост опухоли и ингибирование роста опухоли.

Были отобраны тридцать пять здоровых самок голых мышей с опухолью T24 объемом ~100 мм³, которые были рандомизированы и разделены на пять групп (G1-G5, n=7 животных/группа). Массу тела каждой мыши записывали в день рандомизации и ежедневно до конца исследования. Размер опухоли измеряли дважды в неделю со

дня введения исследуемого образца/контрольного лекарственного средства/растворителя до конца эксперимента. Размер опухоли измеряли цифровым штангенциркулем (MITUTOYO, Япония), измеряя длину и ширину. Данные о массе тела и объеме опухоли статистически анализировали методом двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA, тест Бонферрони). Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения PRISM, версия 5.01, при этом статистически значимыми считались значения $p < 0,05$. Пропорции процентной выживаемости анализировали по методу Каплана-Мейера.

РЕЗУЛЬТАТЫ:

Таблица 7.

Группа и препарат	Процентное изменение массы тела в день 22	Объем опухоли в день 22 (куб. мм)	Процент ИРО, день 22	Процент Т/К, день 22	Задержка роста опухоли (дни)	Процент выживаемости
G1, контрольный растворитель (5 мл/кг)	5,67	1052,0	0,00	100,00	Н/д	100
G2, цисплатин (5 мг/кг), раз в неделю	6,3	622,6	40,82	59,18	10,5	100
G3, формула 16 (0,5 мг/кг), через день	4,73	540,6	48,62	51,38	7,5	100
G4, формула 16 (1 мг/кг), раз в три дня	1,53	705,2	32,96	67,04	6	100
G5, формула 16 (2 мг/кг), раз в шесть дней	5,84	859,8	18,27	81,73	3	100
Сокращения ИРО – ингибирование роста опухоли Т/К – тест/контроль						

Заключение:

Биологические конечные точки, такие как средний объем опухоли, ингибирование роста опухоли (ИРО) и % тест/контроль (Т/К) показали, что соединение по формуле 16 при указанных дозах и режиме показало уменьшение объема опухоли на ксенотрансплантатной модели T24 без потери массы тела. Статистически значимая противоопухолевая активность наблюдалась при дозах 0,5 мг/кг через день ($p < 0,001$; ИРО: 48,62 %) в день 22 в сравнении с группой контрольного

растворителя G1. Таким образом, на основании проведенного исследования можно заключить, что конъюгат белка с лекарственным веществом по формуле 16 показал противоопухолевую эффективность *in vivo* на ксенотрансплантатной модели карциномы мочевого пузыря человека.

Пример 14. Гистопатологическое исследование опухолевой ткани

Эффект соединения по формуле 16 оценивали на ксенотрансплантатной модели T24 карциномы мочевого пузыря человека

Таблица 8.

Группа и препарат	Апоптоз	Степень	
G1, контрольный растворитель (5 мл/кг)	Слабый	3	Умеренно дифференцированная
G2, цисплатин (5 мг/кг), раз в неделю	Слабый	2	Умеренно дифференцированная
G3, формула 16 (0,5 мг/кг), через день	Умеренный	2	Умеренно дифференцированная
G4, формула 16 (1 мг/кг), раз в три дня	Умеренный	2	Умеренно дифференцированная
G5, формула 16 (2 мг/кг), раз в шесть дней	Заметный	1	Высокодифференцированная
Примечание. Низкая степень соответствует лучшему апоптозу. Степень 1 (высокодифференцированная) – < 25% клеток анапластические; степень 2 (умеренно дифференцированная) – < 25-50% клеток анапластические; степень 3 (умеренно дифференцированная) – < 50-75% клеток анапластические; степень 4 (низкодифференцированная) – > 75% клеток анапластические			

Заключение:

Группа препарата (G3, G4, G5) показала

- улучшенный апоптоз, ангиогенез, низкое количество митоза и
- более низкую степень в сравнении с группой растворителя, что указывает на противоопухолевое действие соединения по формуле 16 на ксенотрансплантатной модели T24 карциномы мочевого пузыря человека.

Пример 15. Эффект соединения по формуле 16 в отношении иммунной системы

Эффект соединения по формуле 16 оценивали на ксенотрансплантатной модели T24 карциномы мочевого пузыря человека

Результаты:

Таблица 9:

Эффект соединения по формуле 16 в отношении иммунной системы						
Группа и препарат	Цитокины Th1		Цитокины Th2		Иммуноглобулины	
	ИФН-гамма (пг/мл)	IL-2 (пг/мл)	IL-10 (пг/мл)	IL-4 (пг/мл)	IgG (нг/мл)	IgM (нг/мл)
G1, контрольный растворитель, 5 мл/кг	50,4	148,4	Ниже ПКО	68,7	54,6	39,5
G2, цисплатин (5 мг/кг), и/п (q7dX2)	80,8	259,3	Ниже ПКО	60	54	18
G3, формула 16, 0,5 мг/кг, в/в (q2dX7)	54,8	182,5	652,9	63,4	56,7	24,6
G4, формула 16, 1 мг/кг, в/в (q3dX5)	104,4	229,5	219,1	61,1	59,1	29,5
G5, формула 16, 2 мг/кг, (q6dX3)	73,3	220,8	331,7	Н/А	55,6	26,5

Заключение:

- Наблюдалось повышение цитокинов Th1, что демонстрирует активацию иммунных клеток для опосредованного NK-клетками подавления роста опухоли.
- Группа цисплатина показала снижение IgM, что указывает на подавление иммунитета.
- Группа препарата (G3, G4, G5) показала умеренные изменения уровня IgM.

Пример 16. Оценка острой токсичности соединения по формуле 16 у мышей BALB/c

В исследовании использовали двадцать пять здоровых самок мыши BALB/c. Животных акклиматизировали в течение пяти дней. По завершении акклиматизации животных рандомизировали по массе тела и разделили на пять групп (G1–G5) по пять животных в каждой группе. Животные из групп G1, G2, G3, G4 и G5 получали соединение по формуле 16 внутривенно однократно в дозе 0,5 мг/кг, 2,5 мг/кг, 5 мг/кг, 7,5 мг/кг и 10 мг/кг соответственно при объеме дозы 5 мл/кг. Животных

наблюдали на предмет клинических признаков токсичности и смертности раз в день в течение 14 дней. Массу тела измеряли в дни 1, 2, 3, 7 и 14. В день 15 выполняли вскрытие животных для проведения общего патологоанатомического исследования жизненно важных органов.

У животных в группах G1 и G2 клинических признаков токсичности не наблюдалось. В группе G3 у 3 животных наблюдались слабые симптомы (сонливость), а у 2 животных наблюдались тяжелые симптомы (сонливость, тремор, конвульсии), однако состояние животных восстанавливалось через ~15–20 минут после введения препарата. В группе G4 1 животное погибло сразу после введения препарата, и было выполнено его вскрытие для проведения общего патологоанатомического исследования, которое выявило красноватое окрашивание всех долей легких. При этом у 4 животных наблюдались тяжелые симптомы (сонливость, тремор, конвульсии, агональное дыхание), однако впоследствии состояние животных восстанавливалось. В группе G5 все животные погибли сразу после введения препарата, и было выполнено его вскрытие для проведения общего патологоанатомического исследования, которое выявило красноватое окрашивание всех долей легких. Выполняли вскрытие всех выживших животных из групп G1–G4 в день 15, при этом общее гистопатологическое исследование жизненно важных органов не выявило видимых изменений.

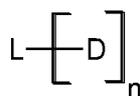
На основании этого исследования было установлено, что однократная в/в доза соединения по формуле 16 в концентрациях 0,5 мг/кг, 2,5 мг/кг, 5 мг/кг хорошо переносится и является безопасной.

Формула изобретения:

1. Конъюгат белок-лекарственное вещество содержащий:
 - а) лектин,; илекарственное средство; в котором лектин конъюгирован с лекарственным веществом;
в котором лектин является рекомбинантным лектином с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1; или лектином, обладающим по меньшей мере 70% идентичностью с SEQ ID NO: 1.
2. Конъюгат белок-лекарственное вещество по пункту 1, в котором лектин обладает аффинностью связывания с одним или несколькими антигенами, выбираемыми из группы, состоящей из антигена Томсена-Фриденрайха (антиген O-GalNAc Core1), его расширенных коровых структур (Core2, α 2,3/6-сиалил Core1 (сиалил-T-антиген), α 2,6/6-сиалил Core2) и его модифицированных форм.
3. Конъюгат белок-лекарственное вещество по пункту 1, в котором лектин, имеющий по меньшей мере 70% идентичность с SEQ ID NO: 1, выбирают из группы, содержащей SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5 и 8.
4. Конъюгат белок-лекарственное вещество по пункту 1, в котором лектин конъюгирован с лекарственным веществом посредством ковалентной связи или ковалентно-координационной связи.
5. Конъюгат белок-лекарственное вещество по пункту 1, в котором лектин присоединен к лекарственному веществу через свободную аминогруппу (группу -NH- или -NH₂) или свободную тиольную группу (группу -SH) или свободную кислоту (группу -COOH) или свободную гидроксильную группу (ОН-группу), присутствующую в аминокислоте.
6. Конъюгат белок-лекарственное вещество по пункту 1, в котором лектин связан с лекарственным веществом ковалентной связью ковалентно-координационной связью через линкер.
7. Конъюгат белок-лекарственное вещество по пункту 1, в котором лектин используется для доставки лекарственного вещества к клетке-мишени.
8. Конъюгат белок-лекарственное вещество по пункту 1, в котором лекарственное вещество выбирают из группы, содержащей терапевтический

агент, цитотоксический агент, противоопухолевый агент, диагностический агент и их комбинации.

- 9.** Конъюгат белок-лекарственное вещество по пункту 1, в котором лекарственное вещество выбирают из группы, содержащей монометилауристин Е (ММАЕ), тезирин, DM1, DM4, DM 21, доксорубицин, говитекан, Dxd 1 и амантин.
- 10.** Конъюгат белок-лекарственное вещество по пункту 1, в котором лектин конъюгирован с лекарственным веществом, выбираемым из группы, содержащей MC-VC-PAB-MMAE, mc-гидразон-доксорубицин, DM21-C, DXd(1), SMCC-DM1, говитекан (линкер — SN38), SPDB-DM4, mc-vc-PAB-C6-α-амантин, MC-GGFG-NH-CH2-экзатекан, тезирин (линкер — SG3249).
- 11.** Конъюгат белок-лекарственное вещество по пункту 1, в котором конъюгат используют в лечении или профилактике злокачественных опухолей.
- 12.** Фармацевтическая композиция, содержащая:
- а) конъюгат белок-лекарственное вещество по пункту 1; и
 - б) одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ
- 13.** Фармацевтическая композиция по пункту 12, в которой указанная композиция используется в лечении и профилактике злокачественных опухолей.
- 14.** Конъюгат белок-лекарственное вещество по формуле I;



Формула I

или его фармацевтически приемлемая соль; в которой

L — лектин;

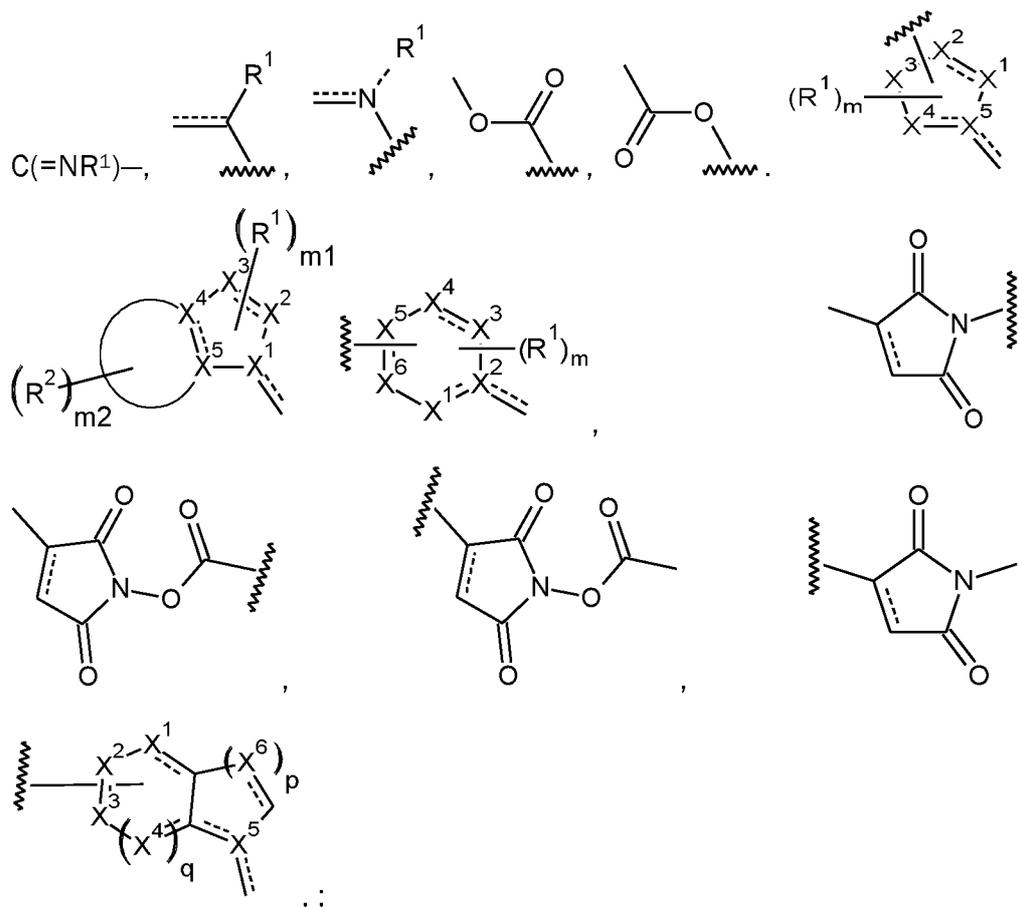
D — лекарственное вещество;

«—» между L и D — связь; и

n принимает значения от 1 до 9.

- 15.** Конъюгат белок-лекарственное вещество по пункту 14, в котором лектин — это рекомбинантный лектин с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1; или лектин, обладающий по меньшей мере 70% идентичностью с SEQ ID NO: 1.

- 16.** Конъюгат белок-лекарственное вещество по пункту 14, в котором лекарственное вещество выбирают из группы, содержащей терапевтический агент, цитотоксический агент, противоопухолевый агент, диагностический агент и их комбинации.
- 17.** Конъюгат белок-лекарственное вещество по пункту 16, в котором цитотоксический или терапевтический агент выбирают из группы, содержащей монометилауристин E (MMAE), тезилин, DM1, DM4, DM 21, доксорубин, говитекан, Dxd 1 и амантин.
- 18.** Конъюгат белок-лекарственное вещество по пункту 14, в котором лекарственное вещество выбирают из группы, содержащей ДНК-связывающий агент, ингибитор полимеризации тубулина, антиметаболит, алкилирующий или подобный ему противоопухолевый агент, ингибитор топоизомеразы I, ингибитор топоизомеразы II, ингибитор киназы, бортезомиб, эстрамустин, иксабепилон, эверолимус, темсиролимус, неомицин, неамин, криптофицин, дискодермолид, аманитин или его пирролобензодиазепиновый димер, или его фармацевтически приемлемую соль, полиморфную форму или сольват.
- 19.** Конъюгат белок-лекарственное вещество по пункту 18, в котором ДНК-связывающий агент выбирают из группы, содержащей блеомицин, нетропсин, дистамицин или их аналоги, включая лекситропсины, ендиин, митомицин и дуокармицин.
- 20.** Конъюгат белок-лекарственное вещество по пункту 18, в котором ингибитор полимеризации тубулина выбирают из группы, содержащей ауристин, майтанзин и майтанзиноид.
- 21.** Конъюгат белок-лекарственное вещество по пункту 14, в котором каждое лекарственное вещество конъюгировано с L через:
- а) ковалентную связь, или
 - б) группу по формуле «—A¹-A²-A³—»;
в которой вторая связь A¹ и A³ соединена с L и D соответственно; и где A¹ и A³ независимо выбирают из группы, содержащей:
—CR¹R²—, —C(O)—, —C(O)NR¹—, —NR¹C(O)—, —NR¹—, —O—, —S—, —S(O)—, —S(O)₂—, —R¹C=CR²—, —C≡C—, —R¹C=CR²-R³C=CR⁴—, —R¹C=C=CR²—, —

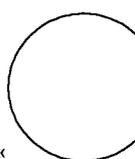


где

m , m_1 и m_2 независимо равны 0, 1, 2, 3 или 4; p — 1 или 2, а q — 0 или 1;

«» указывает место присоединения A^2 к A^1 или A^3 ;

«» указывает на одинарную или двойную связь;

«» указывает на 5–10-членное кольцо, включая атомы кольца, с которым оно сочленено, причем 5–10-членное кольцо представляет собой ароматическое, неароматическое или циклоалкильное кольцо или гетероароматическое или гетероциклоалкильное кольцо, причем гетероароматическое или гетероциклоалкильное кольцо содержит по меньшей мере один гетероатом, выбираемый из N, O или S.;

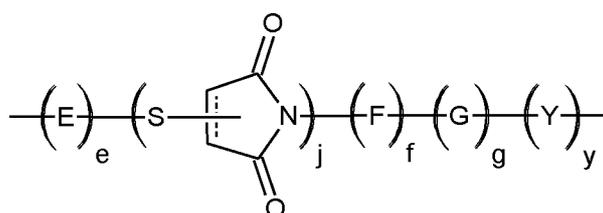
каждое из X^1 , X^2 , X^3 , X^4 , X^5 и X^6 независимо выбирается из C, CH, CH_2 , NH, O или S; и

R^1 , R^2 , R^3 и R^4 независимо выбирают из водорода, C_1 – C_5 -алкила, C_2 – C_5 -алкенила, C_2 – C_5 -алкинила, C_1 – C_5 -алкилена, C_3 – C_{10} -циклоалкила, C_2 – C_9 -

гетероциклоалкила, C₆-C₁₀-арила, C₂-C₉-гетероарила, -OR⁵, -NR⁵ -SR⁵, галогена, который можно выбрать из фтора, хлора, брома или йода, и -C(O)OR⁵, где C₁-C₅-алкил, C₂-C₅-алкенил, C₂-C₅-алкинил, C₁-C₅-алкилен, C₃-C₁₀-циклоалкил, C₂-C₉-гетероциклоалкил, C₆-C₁₀-арил, C₂-C₉-гетероарил являются незамещенными или каждый дополнительно имеет заместитель R⁶, а

R⁵ и R⁶ каждый независимо представляет собой водород, C₁-C₃-алкил, OH или галоген;

где A² соответствует формуле:



в которой

e, j, f, g и y независимо равны 0 или 1, при условии, что e, f и y не равны 0 одновременно,

S — атом серы,

E, F и Y — спейсер, и

G — аминокислота или пептидная цепь, содержащая 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 аминокислот;

и где A¹ образует связь с E или S или F, а A³ соединено с Y или G.

- 22.** Конъюгат белок-лекарственное вещество по пункту 21, в котором каждый из спейсеров E, F и Y независимо выбирают из —R⁷—, —S—, —NH—, —R⁷-N-R⁸—, —R⁸-NC(O)-R⁷—, —R⁸-C(O)N-R⁷—, —C(O)—, —C(O)-R⁷—, —R⁷-C(O)—, —R⁸-C(O)-R⁷—, —S-R⁷—, —R⁷-S—, —R⁷-S-R⁸—, —S(O)—, —S(O)-R⁷—, —R⁷-S(O)—, —R⁷-S(O)-R⁸—, —O-R⁷—, —R⁷-O—, —R⁸-O-R⁷—, —C(O)O—, —OC(O)-R⁷—, —R⁷-OC(O)—, —R⁸-OC(O)-R⁷—, —R⁷-OC(O)O—, —OC(O)O-R⁷—, —R⁷-OC(O)O-R⁸—, —NH-R⁷-NH-C(O)R⁸—, —(CH₂)S-NH-R⁷—, —R⁷-C(O)N(CH₂)₁₋₃O(CH₂)₁₋₃C(O)—, —R⁷-NC(O)(CH₂)₁₋₃O(CH₂)₁₋₃C(O)—, —Si(R⁷R⁸)—, полиалкиленгликоля, который может быть через кислород присоединен к —R⁷—, —S—, —NH—, —R⁷-N-R⁸—, —R⁸-NC(O)-R⁷—, —R⁸-C(O)N-R⁷—, —C(O)—, —C(O)-R⁷—, —R⁷-C(O)—, —R⁸-C(O)-R⁷—, —S-R⁷—, —R⁷-S—, —R⁷-S-R⁸—, —S(O)—, —S(O)-R⁷—, —R⁷-S(O)—, —R⁷-S(O)-R⁸—, —O-R⁷—, —R⁷-O—, —R⁸-O-R⁷—, —C(O)O—, —OC(O)-R⁷—, —R⁷-OC(O)—, —R⁸-OC(O)-R⁷—, —R⁷-OC(O)O—, —OC(O)O-R⁷—, —R⁷-

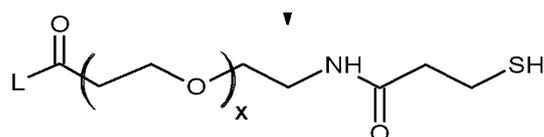
OC(O)O-R⁸—, —NH-R⁷-NH—C(O)R⁸—, —(CH₂)S-NH-R⁷—, —R⁷-C(O)N(CH₂)₁₋₃₀(CH₂)₁₋₃₀C(O)—, —R⁷-NC(O)(CH₂)₁₋₃₀(CH₂)₁₋₃₀C(O)—, —Si(R⁷R⁸)—;

где R⁷ и R⁸ независимо выбирают из группы, содержащей водород, —C₁–C₁₀-алкилен, —C₁–C₁₀-алкенилен, насыщенный или ненасыщенный C₅–C₁₀-циклоалкилен, —C₂–C₁₀-алкенилен – насыщенный или ненасыщенный C₅–C₁₀-циклоалкенилен, C₆–C₁₀-арилен, —C₂–C₁₀-алкенилен – C₆–C₁₀-арилен, C₂–C₉-гетероарилен, —C₂–C₁₀-алкенилен – C₂–C₉-гетероарилен; и где —C₁–C₁₀-алкилен, —C₂–C₁₀-алкенилен, насыщенный или ненасыщенный C₅–C₁₀-циклоалкилен, —C₂–C₁₀-алкилен – насыщенный или ненасыщенный C₅–C₁₀-циклоалкилен, C₆–C₁₀-арилен, —C₂–C₁₀-алкенилен – C₆–C₁₀-арилен, C₂–C₉-гетероарилен и —C₂–C₁₀-алкенилен – C₂–C₉-гетероарилен могут дополнительно иметь заместители в виде -OH, -C(O), -SH, -NH₂, галогена, C₁–C₅-алкила, -NO₂, или -CN;

в которой полиалкиленгликоль представляет собой гомополимер или сополимер алкилена, в котором каждое алкиленовое звено имеет C₁ – C₈ атомов углерода, а общее число алкиленовых звеньев равно от 1 до 20; и в котором, когда полиалкиленгликоль представляет собой E, —CH₂-конец присоединен к A1, а когда полиалкиленгликоль представляет собой F, —CH₂-конец присоединен к

—R⁷—, —S—, —NH—, —R⁷-N-R⁸—, —R⁸-NC(O)-R⁷—, —R⁸-C(O)N-R⁷—, —C(O)—, —C(O)-R⁷—, —R⁷-C(O)—, —R⁸-C(O)-R⁷—, —S-R⁷—, —R⁷-S—, —R⁷-S-R⁸—, —S(O)—, —S(O)-R⁷—, —R⁷-S(O)—, —R⁷-S(O)-R⁸—, —O-R⁷—, —R⁷-O—, —R⁸-O-R⁷—, —C(O)O—, —OC(O)-R⁷—, —R⁷-OC(O)—, —R⁸-OC(O)-R⁷—, —R⁷-OC(O)O—, —OC(O)O-R⁷—, —R⁷-OC(O)O-R⁸—, —NH-R⁷-NH—C(O)R⁸— или —(CH₂)S-NH-R⁷—, —R⁷-C(O)N(CH₂)₁₋₃₀(CH₂)₁₋₃₀C(O)— или —R⁷-NC(O)(CH₂)₁₋₃₀(CH₂)₁₋₃₀C(O)—.

23. Соединение по формуле С, представленное в виде



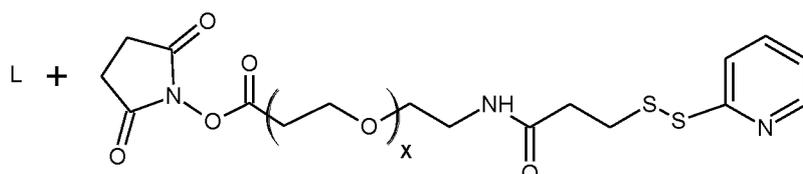
Формула С

где

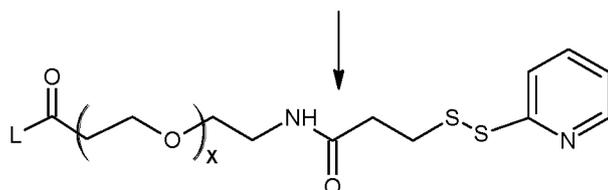
x — 8 или 12; и

L — лектин с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1; или лектин, обладающий по меньшей мере 70% идентичностью с SEQ ID NO: 1.

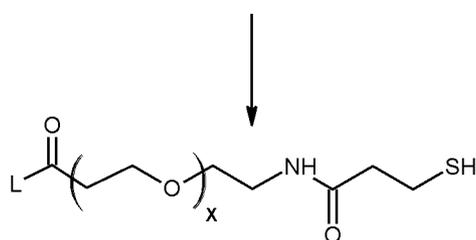
24. Соединение по формуле С по пункту 23, в котором соединение по формуле С получают в результате процесса, состоящего из:



Формула А



Формула В

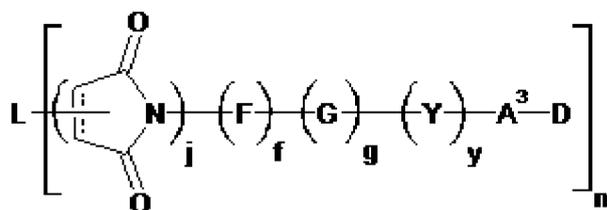


Формула С

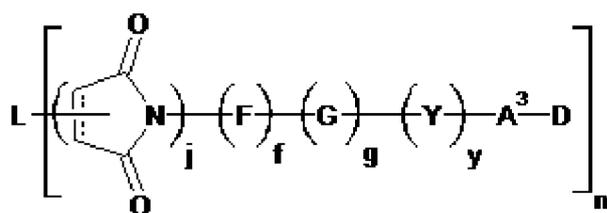
25. Конъюгат белок-лекарственное вещество по пункту 14, в котором соединение выбирают из формулы II, формулы III и формулы IV:



Формула II;



Формула III;

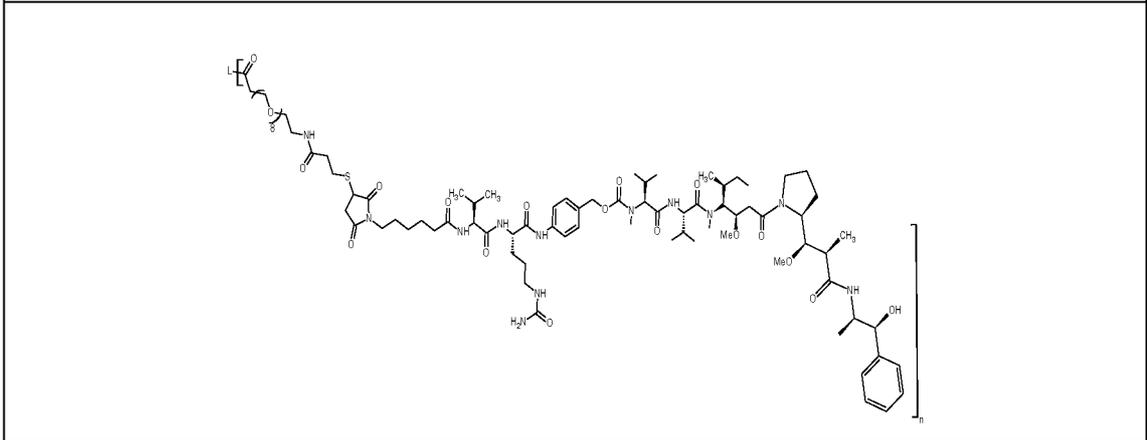


Формула IV

или их фармацевтически приемлемой соли, в которой L, F, G, Y, A¹, A³, D, n, j, f, g и y были определены выше.

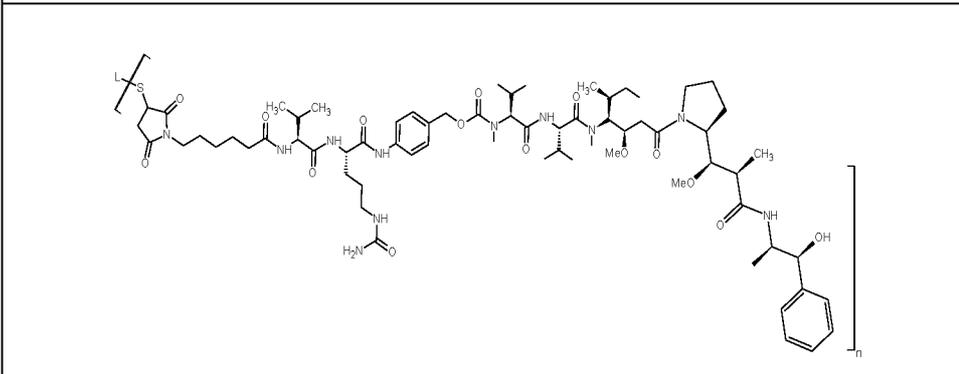
- 26.** Конъюгат белок-лекарственное вещество, выбираемый из группы, состоящей из формулы 15, 16, 17, 18 и 19;

Формула 15



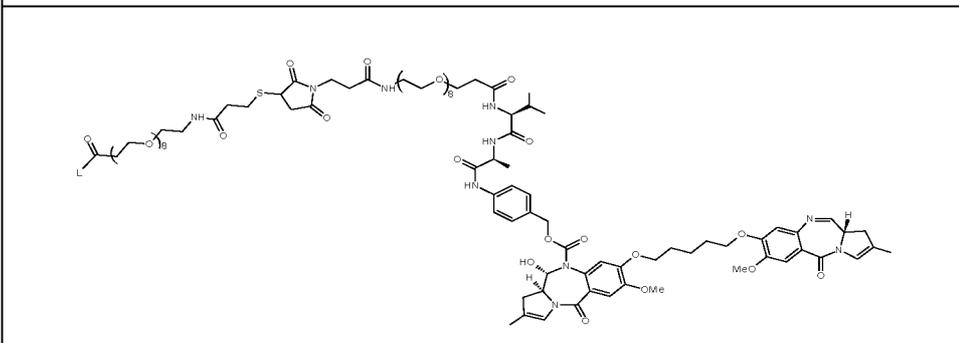
;

Формула 16



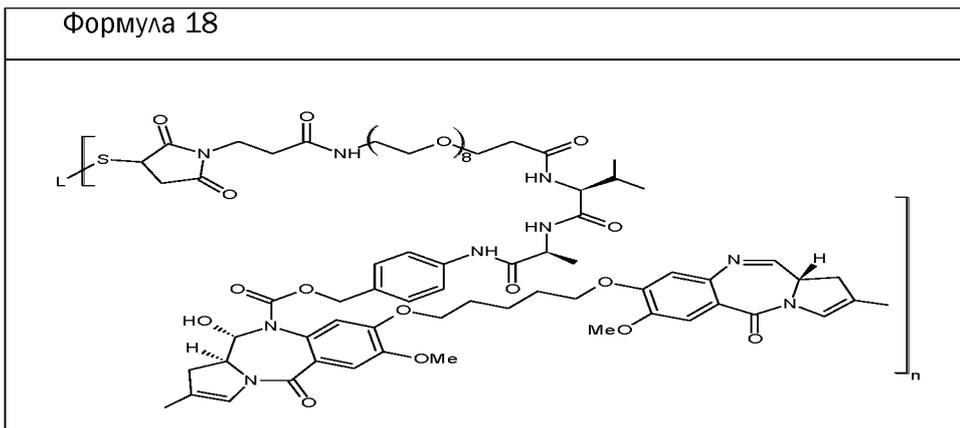
;

Формула 17



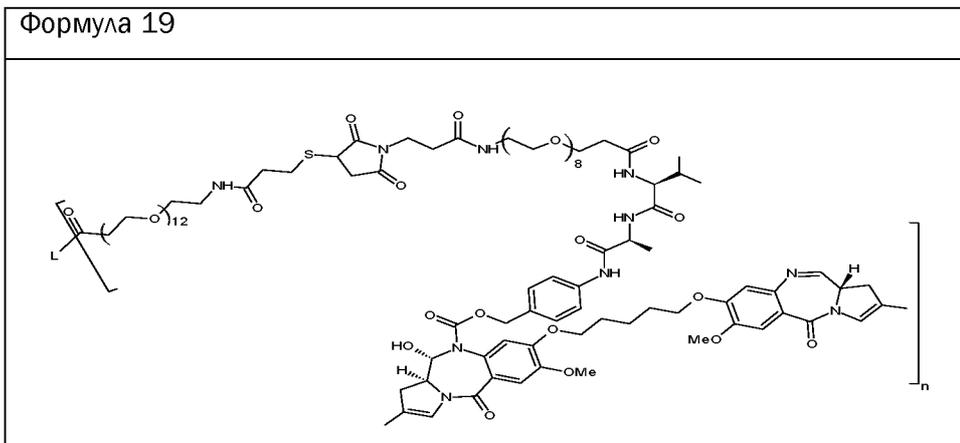
;

Формула 18



;

Формула 19



;

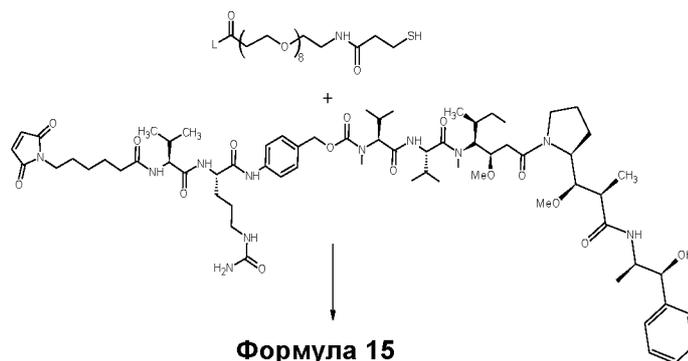
или его фармацевтически приемлемая соль или их производные;

L — лектин с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1; или лектин, обладающий по меньшей мере 70% идентичностью с SEQ ID NO: 1.

- 27.** Конъюгат белок-лекарственное вещество по пункту 25; в котором конъюгат по формуле 15, 17 и 19 содержит лектин SEQ ID NO.2, конъюгированный с лекарственным веществом через промежуточное соединение, представленное формулой С; и конъюгат по формуле 16 и 18 содержит лектин SEQ ID NO.5, конъюгированный с лекарственным веществом через цистеин (SH-связь) по карбоксильному концу лектина SEQ ID NO.5.

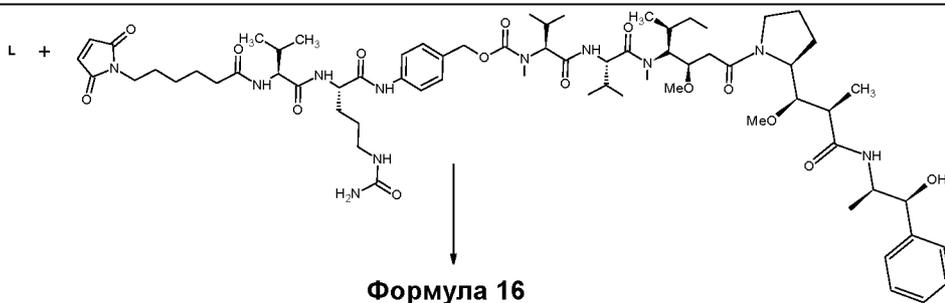
28. Конъюгат белок-лекарственное вещество по пункту 25; в котором

процесс получения препарата по формуле 15 включает в себя:

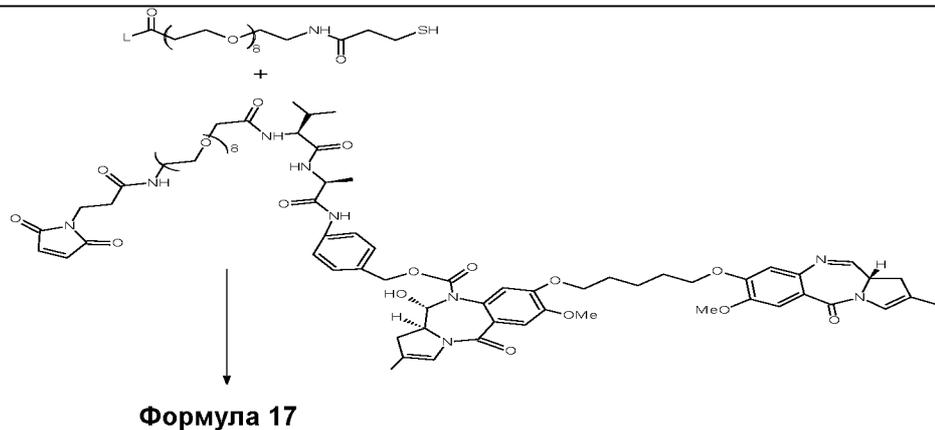


1

процесс получения препарата по формуле 16 включает в себя:

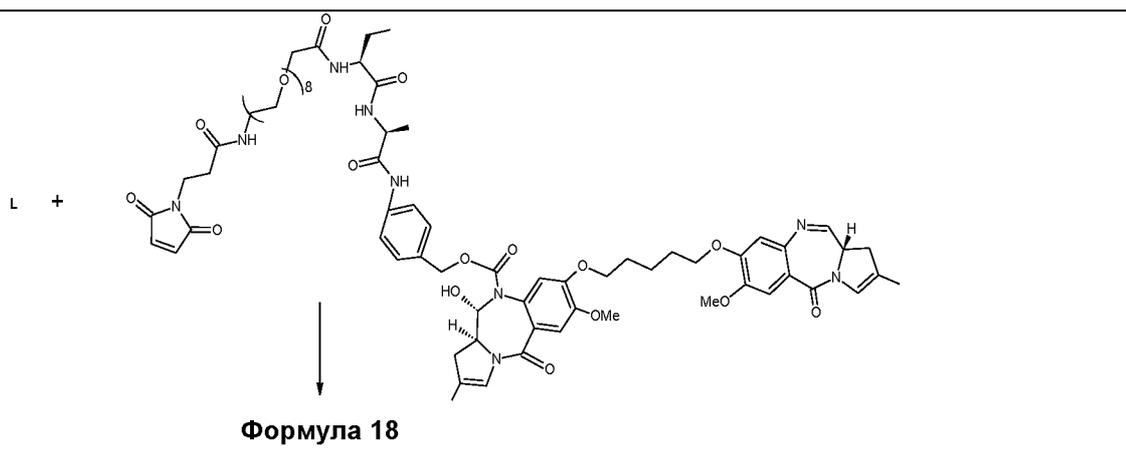


процесс получения препарата по формуле 17 включает в себя:



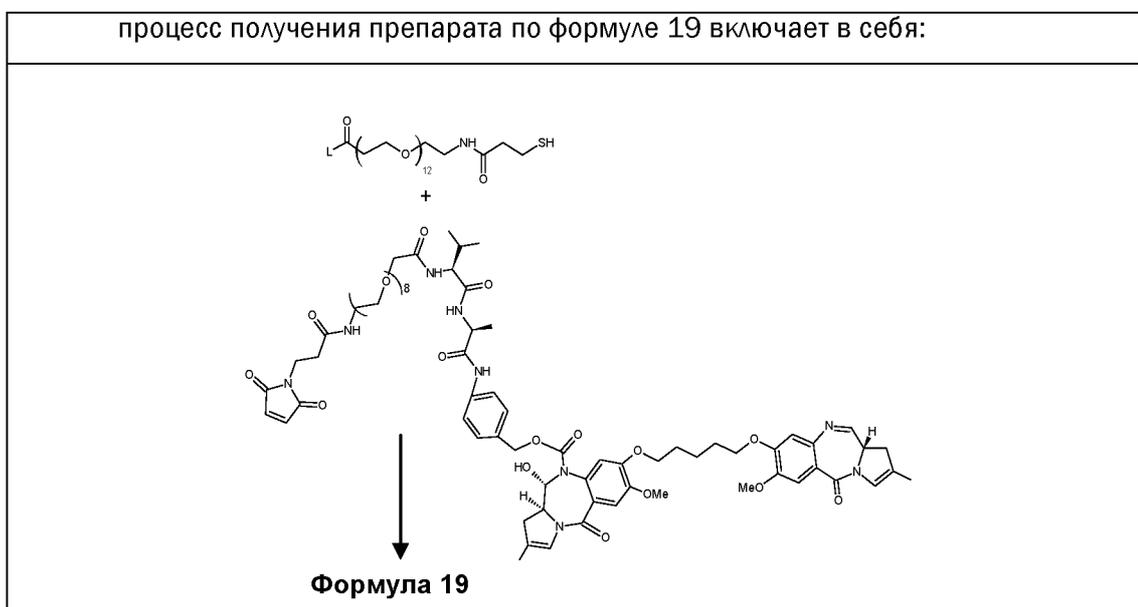
1

процесс получения препарата по формуле 18 включает в себя:

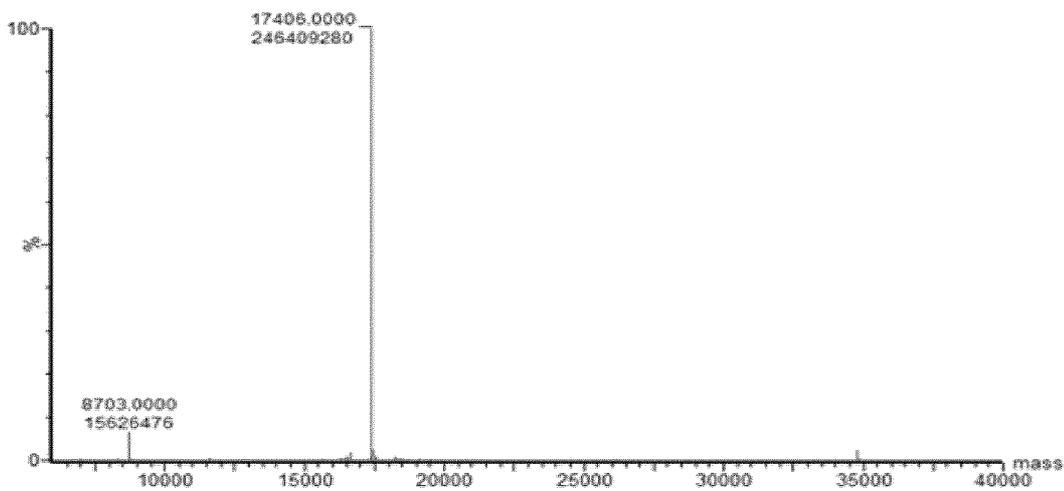


,

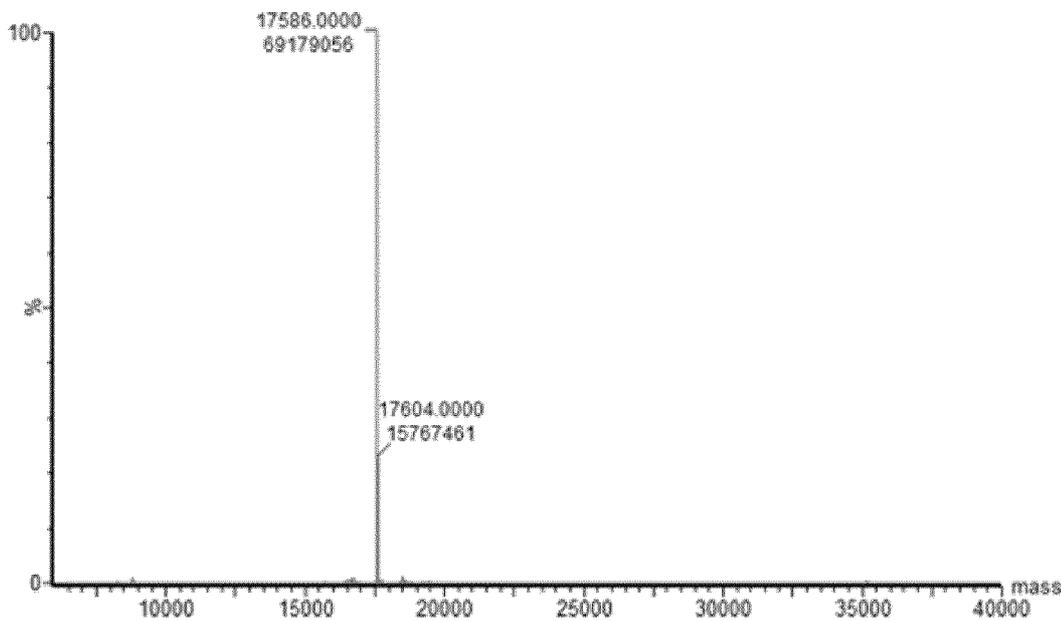
процесс получения препарата по формуле 19 включает в себя:



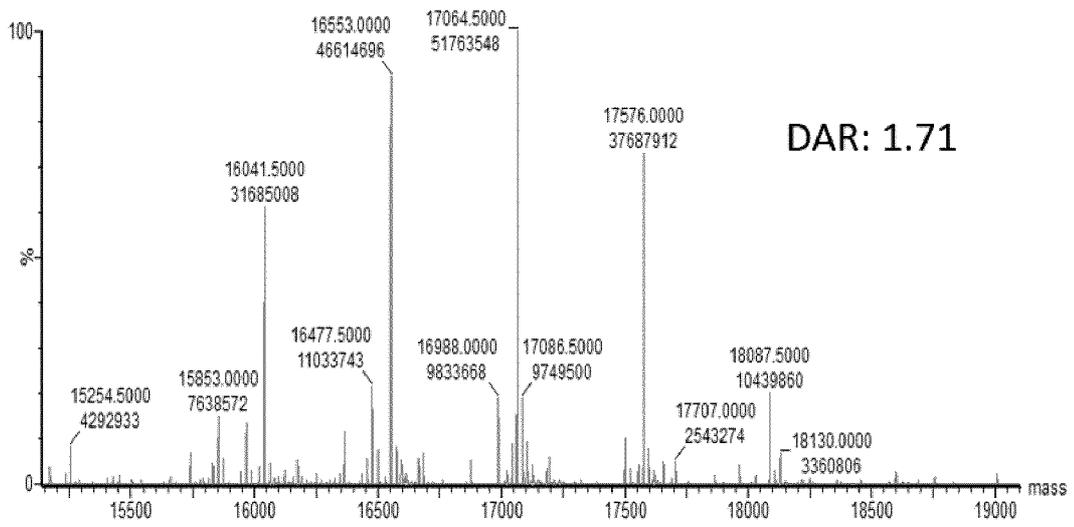
.



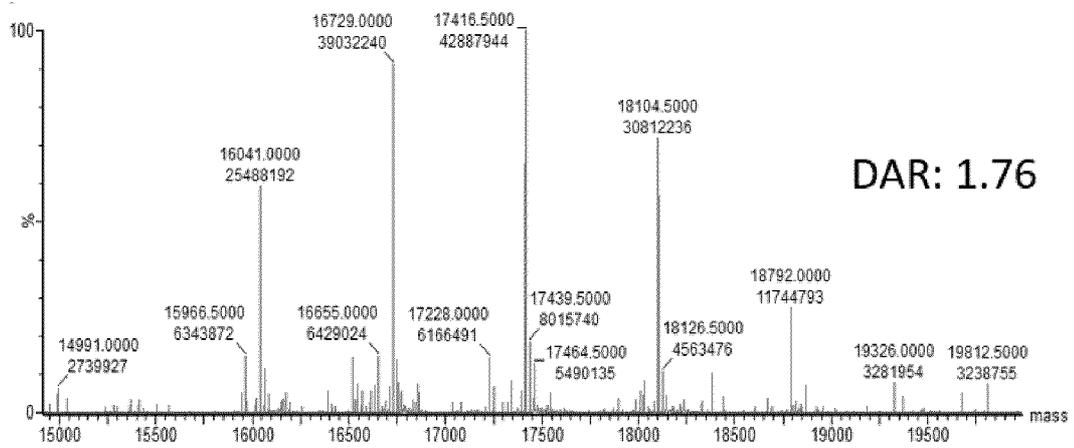
Фиг. 1



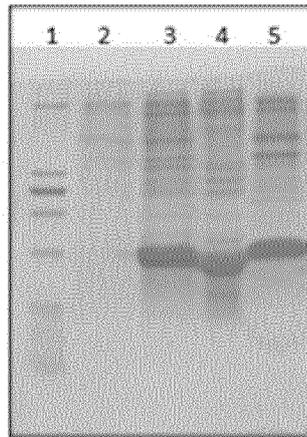
Фиг. 2



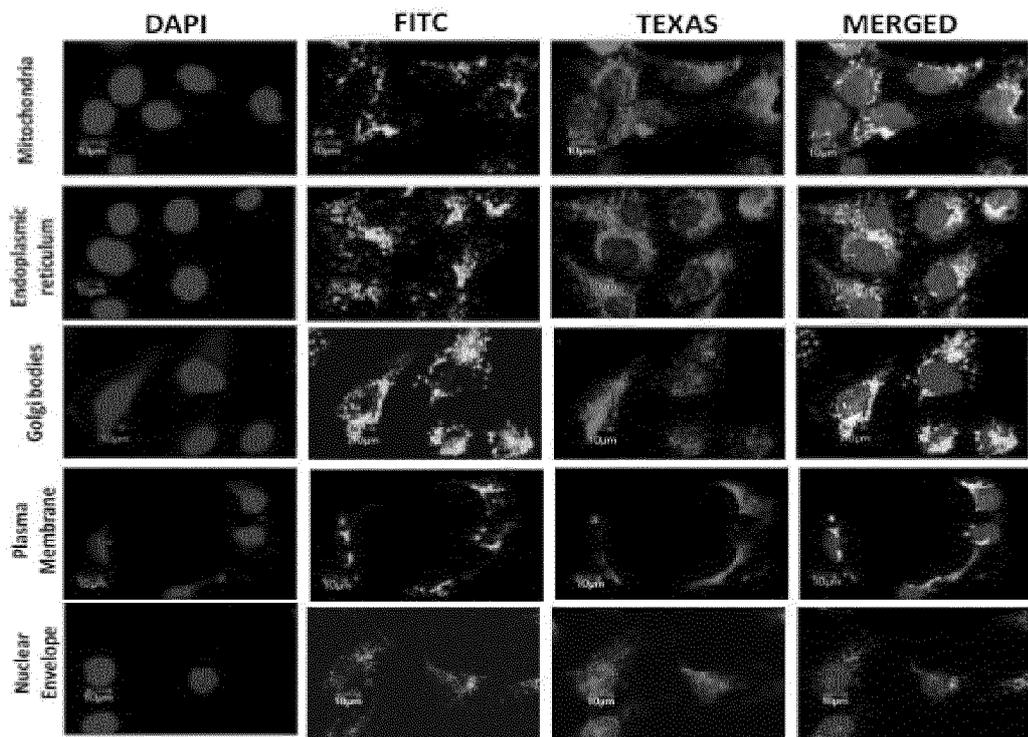
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6