



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **126595** (13) **C2**
(51) МПК

C07K 16/24 (2006.01)
A61K 31/58 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 19/02 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

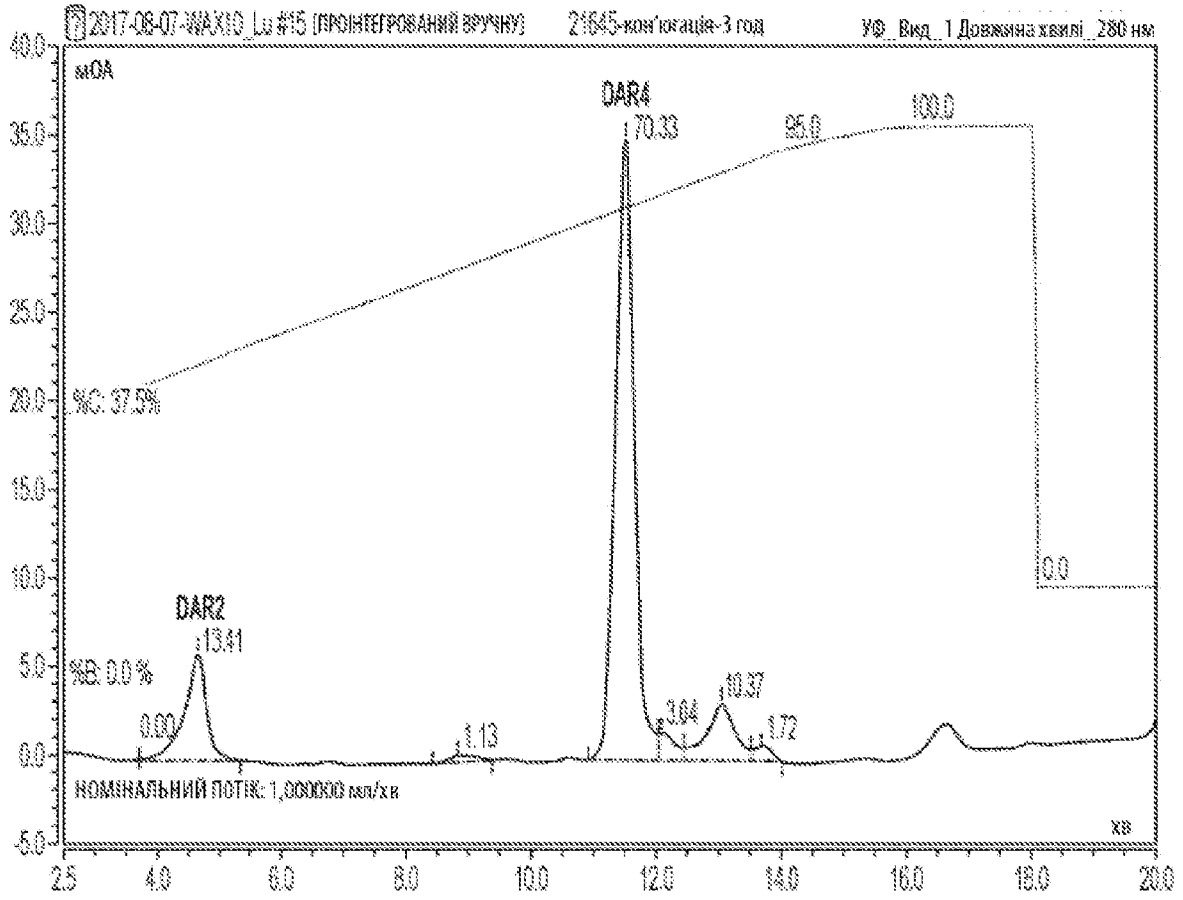
<p>(21) Номер заявки: a 2020 03245</p> <p>(22) Дата подання заявки: 29.11.2018</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 03.11.2022</p> <p>(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 62/593,776, 62/595,054</p> <p>(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 01.12.2017, 05.12.2017</p> <p>(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US, US</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 10.09.2020, Бюл.№ 17</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 02.11.2022, Бюл.№ 44</p> <p>(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: РСТ/IB2018/059482, 29.11.2018</p>	<p>(72) Винахідник(и): Гобсон Адріан Д. (US), МакФерсон Майкл Дж. (US), Вейджелл Венді (US), Гоесс Крістіан (US), Ернандес Аксель мол. (US), Ван Лу (US), Ван Лу (US), Марвін Крістофер С. (US), Сантора Лінг С. (US)</p> <p>(73) Володілець (володільці): ЕББВІ ІНК., 1 North Waukegan Road, North Chicago, Illinois 60064, United States of America (US)</p> <p>(74) Представник: Бочаров Максим Анатолійович, реєстр. №367</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: Patel T. Adalimumab: efficacy and safety in psoriasis and rheumatoid arthritis / T. Patel, K.B. Gordon // Dermatologic Therapy. 2004. - Vol. 17. - P. 427–431 WO 2015153401 A1, 08.10.2015 WO 2017210471 A1, 07.12.2017</p>
--	--

(54) КОН'ЮГАТ АНТИТІЛО-ЛІКАРСЬКИЙ ЗАСІБ

(57) Реферат:

Винахід стосується кон'югату антитіло-лікарський засіб, що містить антитіло до ФНПа та агоніст глюкокортикоїдного рецептора, та його застосування.

UA 126595 C2



Фіг. 1

Споріднені заявки

У цій заявці заявляється пріоритет за попередньою заявкою США № 62/593776, поданою 1 грудня 2017 р., та попередньою заявкою США № 62/595054, поданою 5 грудня 2017 р., кожна з яких включена шляхом посилання у повному обсязі.

5 Список послідовностей

Ця заявка містить Перелік послідовностей, який був поданий в електронному вигляді у форматі ASCII і включений до цього документу шляхом посилання у повному обсязі. Вказана копія ASCII, створена 28 листопада 2018 р., має назву A103017_1490WO_SL.txt та розмір 14758 байт.

10 Галузь техніки

Фактор некрозу пухлини α (ФНП α , TNF α) відіграє центральну роль у патофізіології декількох розладів людини, а агенти проти ФНП α мають клінічно підтверджену терапевтичну користь при лікуванні аутоімунних та запальних розладів, таких як ревматоїдний артрит, псоріаз та запальні захворювання кишечника. Незважаючи на успіх у клінічному застосуванні, високомолекулярні засоби проти ФНП α все ще обмежені в максимальній ефективності, якої вони можуть досягти у пацієнтів, що вимагає виявлення та розробки більш потужних та ефективних терапевтичних засобів. У пацієнтів, які отримують лікування високомолекулярними засобами проти ФНП α , також може розвинути імуногенна відповідь на терапевтичний засіб, обмежуючи таким чином його ефективність. Тому терапія проти ФНП α зі зниженою імуногенністю та високою ефективністю була б корисною для подальшого контролю захворювання.

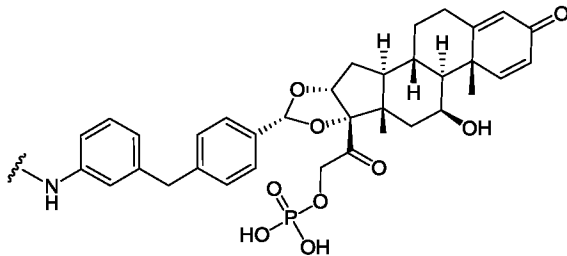
15 Синтетичні агоністи глюкокортикоїдних рецепторів являють собою потужний клас низькомолекулярних сполук, що застосовуються при лікуванні запальних розладів, але їх корисність при лікуванні хронічного захворювання обмежена через важкі побічні ефекти. Існує потреба у розробці терапевтичних засобів з підвищеною ефективністю та більшою тривалістю дії у порівнянні з антитілами проти ФНП та з мінімальними небажаними ефектами.

20 Сутність винаходу

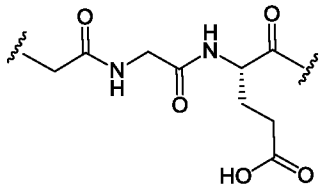
У цьому винаході запропоновані імунокон'югати агоністів глюкокортикоїдних рецепторів, ефективні для лікування аутоімунних захворювань.

30 В одному аспекті у цьому винаході запропонований кон'югат антитіло-лікарський засіб, що містить:

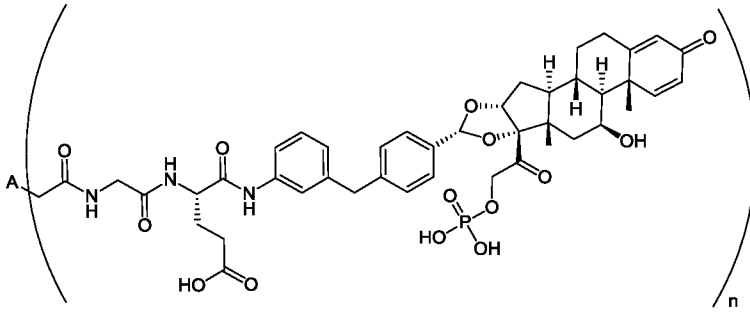
(а) антитіло проти ФНП α , що містить важкий ланцюг, зображений як SEQ ID № 3, і легкий ланцюг, зображений як SEQ ID № 4; і (b) агоніст глюкокортикоїдного рецептора, що містить радикал, зображений формулою:



35 і при цьому антитіло кон'югує з агоністом глюкокортикоїдного рецептора з допомогою лінкера, зображеного формулою:



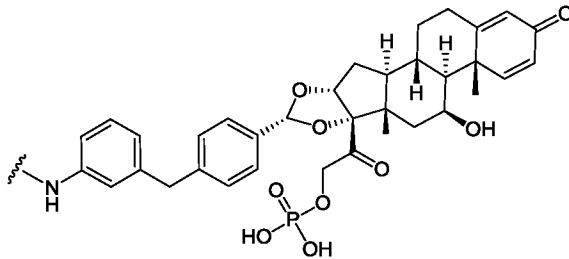
В одному варіанті здійснення у цьому винаході запропонований кон'югат антитіло-лікарський засіб відповідно до формули:



де А являє собою антитіло, і n дорівнює цілому числу від 1-10.

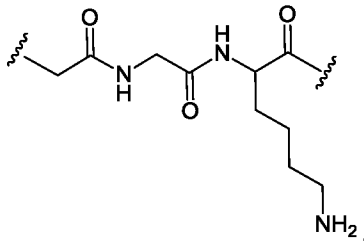
В одному аспекті у цьому винаході запропонований кон'югат антитіло-лікарський засіб, що містить:

- 5 (а) антитіло проти ФНПа, що містить важкий ланцюг, зображений як SEQ ID № 3, і легкий ланцюг, зображений як SEQ ID № 4; і (b) агоніст глюкокортикоїдного рецептора, що містить радикал, зображений формулою:

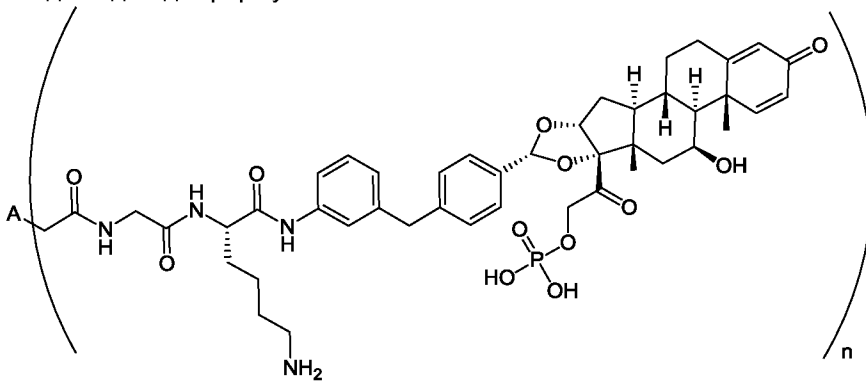


і при цьому антитіло кон'югують з агоністом глюкокортикоїдного рецептора з допомогою лінкера, зображеного формулою:

10



В одному варіанті здійснення у цьому винаході запропонований кон'югат антитіло-лікарський засіб відповідно до формули:



15

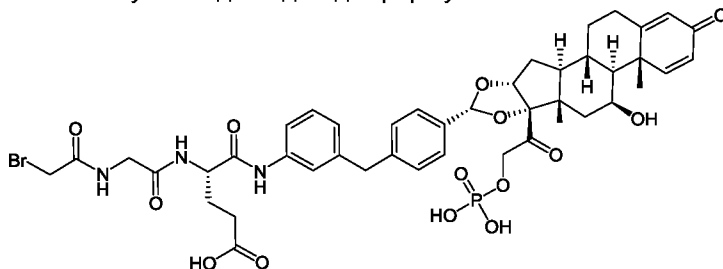
де А являє собою антитіло, і n дорівнює цілому числу від 1-10.

В одному варіанті здійснення у цьому винаході запропонований кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким попереднім варіантом здійснення, причому вміст лікарського засобу становить 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 або 10. В одному варіанті здійснення у цьому винаході запропонований кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким попереднім варіантом здійснення, причому вміст лікарського засобу становить 4, наприклад n у вищенаведеній формулі кон'югата антитіло-лікарський засіб дорівнює 4. В одному варіанті здійснення у цьому винаході запропонований кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким попереднім варіантом здійснення, причому вміст лікарського засобу становить 2, наприклад n у вищенаведеній формулі кон'югата антитіло-лікарський засіб дорівнює 2.

25

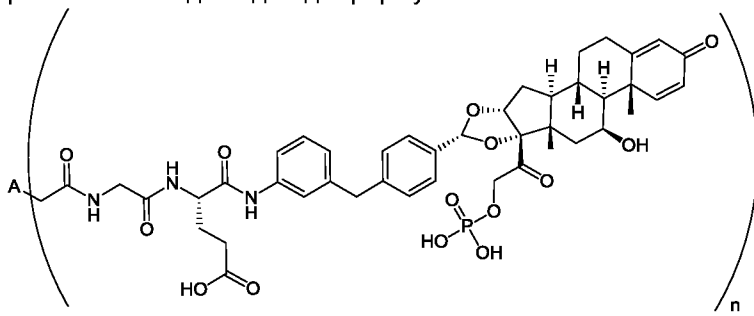
В одному варіанті здійснення у цьому винаході запропонований спосіб отримання кон'югата

антитіло-лікарський засіб за будь-яким попереднім варіантом здійснення, що включає стадію кон'югації антитіла з агоністом глюкокортикоїдного рецептора. В одному варіанті здійснення у цьому винаході запропонований спосіб за попереднім варіантом здійснення, що додатково включає стадію введення фрагмента PO₄ у агоніст глюкокортикоїдного рецептора перед кон'югацією антитіла з агоністом глюкокортикоїдного рецептора. В одному варіанті здійснення у цьому винаході запропонований спосіб за будь-яким попереднім варіантом здійснення, в якому кон'югування включає часткове відновлення антитіла та алкілювання частково відновленого антитіла сполукою відповідно до формули:



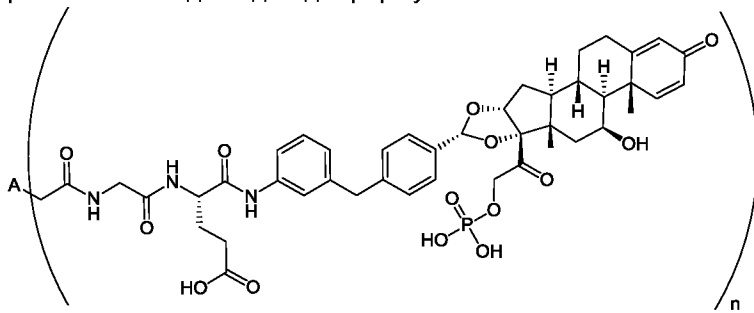
В одному варіанті здійснення у цьому винаході запропонована фармацевтична композиція, що містить кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким попереднім варіантом здійснення та фармацевтично прийнятний носій. В одному варіанті здійснення у цьому винаході запропонована фармацевтична композиція за будь-яким з попередніх варіантів здійснення, що характеризується відношенням лікарського засобу до антитіла (DAR) 1-10.

В одному кращому варіанті здійснення у цьому винаході запропонований кон'югат антитіло-лікарський засіб відповідно до формули:



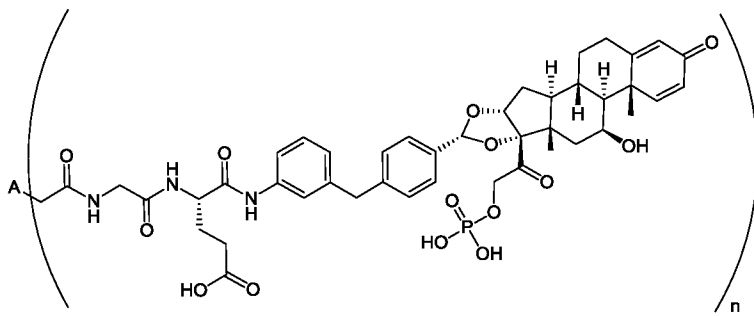
де А являє собою адалімумаб, і n дорівнює 4.

В одному кращому варіанті здійснення у цьому винаході запропонований кон'югат антитіло-лікарський засіб відповідно до формули:

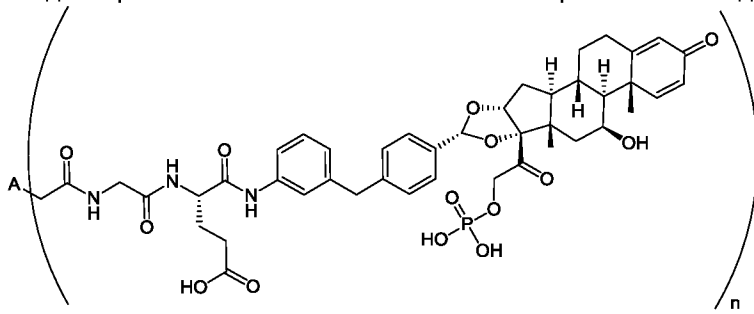


де А являє собою антитіло проти ФНПа, що містить важкий ланцюг, зображений як SEQ ID № 3, і легкий ланцюг, зображений як SEQ ID № 4, і n дорівнює 4.

В іншому кращому варіанті здійснення у цьому винаході запропонований кон'югат антитіло-лікарський засіб відповідно до формули:



де А являє собою адалімумаб, і n дорівнює 2. В іншому кращому варіанті здійснення у цьому винаході запропонований кон'югат антитіло-лікарський засіб відповідно до формули:



5 де А являє собою антитіло проти ФНПа, що містить важкий ланцюг, зображений як SEQ ID № 3, і легкий ланцюг, зображений як SEQ ID № 4, і n дорівнює 2.

В одному кращому варіанті здійснення у цьому винаході запропонована фармацевтична композиція за будь-яким попереднім варіантом здійснення, що характеризується відношенням лікарського засобу до антитіла (DAR) 2,0.

10 В одному кращому варіанті здійснення у цьому винаході запропонована фармацевтична композиція за будь-яким попереднім варіантом здійснення, що характеризується відношенням лікарського засобу до антитіла (DAR) 4,0.

В одному варіанті здійснення у цьому винаході запропонований спосіб лікування патологічного стану, обраного з ревматоїдного артриту, анкілозуючого спондиліту, псоріатичного артриту, бляшкоподібного псоріазу, виразкового коліту, хвороби Крона у дорослих, хвороби Крона у дітей, увеїту, гнійного гідраденіту та ювенільного ідіопатичного артриту, у суб'єкта, що включає введення суб'єкту ефективного кількості кон'югата антитіло-лікарський засіб за будь-яким попереднім варіантом здійснення або фармацевтичної композиції за будь-яким попереднім варіантом здійснення.

20 В одному варіанті здійснення у цьому винаході запропонований кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким попереднім варіантом здійснення або фармацевтична композиція за будь-яким попереднім варіантом здійснення для застосування при лікуванні патологічного стану, обраного з ревматоїдного артриту, анкілозуючого спондиліту, псоріатичного артриту, бляшкоподібного псоріазу, виразкового коліту, хвороби Крона у дорослих, хвороби Крона у дітей, увеїту, гнійного гідраденіту та ювенільного ідіопатичного артриту.

25 В одному варіанті здійснення у цьому винаході запропоновано застосування кон'югата антитіло-лікарський засіб за будь-яким попереднім варіантом здійснення або фармацевтичної композиції за будь-яким попереднім варіантом здійснення для виготовлення лікарського препарату для лікування патологічного стану, обраного з ревматоїдного артриту, анкілозуючого спондиліту, псоріатичного артриту, бляшкоподібного псоріазу, виразкового коліту, хвороби Крона у дорослих, хвороби Крона у дітей, увеїту, гнійного гідраденіту та ювенільного ідіопатичного артриту.

30 В одному варіанті здійснення у цьому винаході запропонований набір, що містить: (а) контейнер, що містить кон'югат антитіло-лікарський засіб за будь-яким попереднім варіантом здійснення або фармацевтичну композицію за будь-яким попереднім варіантом здійснення; та (b) етикетку або листівку-вкладку на один контейнер або у поєднанні з одним або більше контейнерами, причому етикетка або листівка-вкладка вказує, що кон'югат антитіло-лікарський засіб або фармацевтичну композицію застосовують для лікування патологічного стану, обраного з ревматоїдного артриту, анкілозуючого спондиліту, псоріатичного артриту, бляшкоподібного псоріазу, виразкового коліту, хвороби Крона у дорослих, хвороби Крона у дітей, увеїту, гнійного гідраденіту та ювенільного ідіопатичного артриту.

40 В одному варіанті здійснення у цьому винаході запропонований спосіб доставки агоніста

глюкокортикоїдних рецепторів до клітини, що експресує ФНП α , що включає стадію приведення клітини у контакт з кон'югатом антитіло-лікарський засіб за будь-яким попереднім варіантом здійснення. В одному варіанті здійснення у цьому винаході запропонований спосіб визначення протизапальної активності кон'югата антитіло-лікарський засіб, що включає: (а) приведення клітини, що експресує ФНП α , у контакт з кон'югатом антитіло-лікарський засіб за будь-яким попереднім варіантом здійснення; та (b) визначення вивільнення прозапальних цитокінів з клітини порівняно з контрольною клітиною.

Стислий опис графічних матеріалів

На Фіг. 1 наведене хроматографічне розділення модулятора BrAc-Gly-Glu-глюкокортикоїдного рецептора (GRM)-PO₄, як виконано та описано у Прикладі 7. Як показано, ADC являє собою гетерогенну суміш ADC, що містить ADC з двома приєднаними молекулами лікарський засіб-лінкер та ADC з чотирма приєднаними молекулами лікарський засіб-лінкер.

На Фіг. 2 наведені дані MC після деконволюції для адаліумабу, кон'югованого з BrAc-Gly-Glu-глюкокортикоїд-PO₄. Як показано, кон'югація була досягнута.

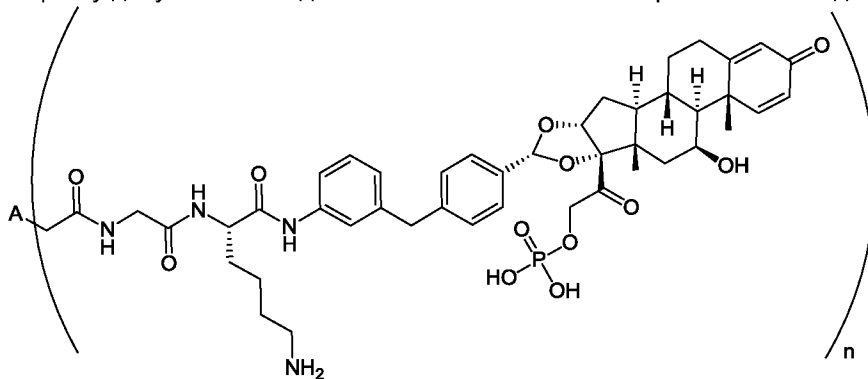
На Фіг. 3 наведений графік, що демонструє ефективність високої та низької дози ADC1 у порівнянні з mAb проти ФНП α (високою дозою) або носієм у мишачій моделі артриту, що являє собою артрит, викликаний колагеном, (CIA), як виконано та описано у Прикладі 7. Як показано, разова доза глюкокортикоїду ADC1 проти ФНП α продемонструвала збільшення тривалості дії шляхом зменшення набряку лапи протягом ~28 діб у порівнянні з mAb проти ФНП α або лише носієм.

Фіг. 4 являє собою графік концентрації (мкг/мл) для закритого та відкритого кільця ADC у крабодних макак з плином часу, як це виконано та описано у Прикладі 7. Як показано, закрита форма кільця сприйнятлива до зворотної реакції Міхаеля та подальшої втрати лінкер-лікарського засобу *in vivo*.

Детальний опис сутності винаходу

У цьому документі наведені імункон'югати агоністів глюкокортикоїдних рецепторів, агоністи глюкокортикоїдних рецепторів та способи їх виготовлення та використання.

У цьому документі наведений кон'югат антитіло-лікарський засіб відповідно до формули:



де А являє собою адаліумаб, і n дорівнює 4. Як показано в Прикладі 7 нижче, цей ADC (тобто ADC4 нижче) демонструє активність *in vitro*, стабільність у плазмі та мінімальне агрегування.

Також запропоновані способи виготовлення та способи використання ADC4.

I. Визначення

Для полегшення розуміння цього винаходу нижче визначені низка термінів і фраз.

Термін "білок проти ФНП α " стосується білків, які здатні (i) зв'язуватися з ФНП α та (ii) інгібувати зв'язування розчинного ФНП α з рецепторами ФНП α поверхні клітини (p55 та/або p75) та/або лізувати клітини, що експресують поверхневий ФНП α або рецептор ФНП α *in vitro* у присутності комплементу. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло до ФНП може зв'язуватися з ФНП альфа на поверхні клітини і ставати інтерналізованим. Наприклад, в US 2014/0294813, який включений до цього документу шляхом посилання у повному обсязі, розкриті антитіла проти ФНП, які проявляють клітинну інтерналізацію при зв'язуванні з ФНП людини на поверхні клітини. Білки проти ФНП α включають, наприклад, антитіла проти ФНП α (наприклад, адаліумаб, інфліксимаб та голіумаб). Антитіла проти ФНП α активно інтерналізуються при зв'язуванні з трансмембранним ФНП на DC, отриманих з моноцитів, і швидко надходять у лізосоми, де вони деградують. (Deora et.al. MABS, 2017, Vol. 9, No. 4, 680-694).

Термін "антитіло", при використанні у цьому документі, призначений для позначення молекул імунoglobуліну, що складаються з чотирьох поліпептидних ланцюгів, двох важких (H)

ланцюгів і двох легких (L) ланцюгів, зв'язаних між собою дисульфідними зв'язками. Кожний важкий ланцюг складається з варіабельної ділянки важкого ланцюга (скорочено у цьому документі як HCVR або VH) та константної ділянки важкого ланцюга. Константна ділянка важкого ланцюга складається з трьох доменів, CH1, CH2 і CH3. Кожний легкий ланцюг складається з варіабельної ділянки легкого ланцюга (скорочено у цьому документі як LCVR або VL) та константної ділянки легкого ланцюга. Константна ділянка легкого ланцюга складається з одного домену, CL. Ділянки VH та VL можна додатково поділити на ділянки гіперваріабельності, які називають ділянками, що визначають комплементарність (CDR), які перемижуються з ділянками, що є більш консервативними і називаються каркасними ділянками (FR). Кожен VH і VL складається з трьох CDR і чотирьох FR, розташованих від аміно-кінця до карбокси-кінця у такому порядку: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Термін "антитіло проти ФНП α " або "антитіло, яке зв'язується з ФНП α " стосується антитіла, яке здатне зв'язувати ФНП α , наприклад, з достатньою афінністю, так що антитіло є корисним як терапевтичний агент при націлюванні на ФНП α . Ступінь зв'язування антитіла проти ФНП α з неспорідненим білком, що не є ФНП α , може бути меншим, ніж приблизно 10 % від зв'язування антитіла з ФНП α , що вимірюється, наприклад, радіоімунологічним аналізом (RIA). У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло, яке зв'язується з ФНП α , має константу дисоціації (Kd) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ або $\leq 0,1$ нМ.

Термін "імунокон'югат", "кон'югат", "кон'югат антитіло-лікарський засіб" або "ADC", при використанні у цьому документі, стосується сполуки або її похідного, що кон'югують з білком, таким як агент, що зв'язується з клітинами (наприклад, антитіло проти ФНП α). Такі імунокон'югати можна визначити загальною формулою: (SM-L-Q) $_n$ -A, де SM = радикал, отриманий з низькомолекулярного агоніста глюкокортикоїдних рецепторів, наприклад, глюкокортикостероїду, L = лінкер, Q = гетеробіфункціональна група або відсутній, і A = білок (наприклад, антитіло), і n=1-10. Імунокон'югати можна також визначити за загальною формулою у зворотному порядку: A-(Q-L-SM) $_n$.

У цьому винаході термін "лінкер" стосується хімічного фрагмента, здатного зв'язувати білок проти ФНП α (наприклад, антитіло) з глюкокортикостероїдом. Лінкери можуть бути сприйнятливими до розщеплення ("лінкер, що може розщеплюватися"), тим самим полегшуючи вивільнення глюкокортикостероїду. Наприклад, такі лінкери, що здатні розщеплюватися, можуть бути сприйнятливими до розщеплення, викликаного пептидазою, за умов, при яких глюкокортикостероїд та/або антитіло залишаються активними.

Зокрема, розкритий у цьому документі лінкерний компонент, що розщеплюється, включає пептид, що містить два-три залишки амінокислот (дипептид або трипептид), і конкретно дипептиди і трипептиди, вибрані з групи, що складається з аланін-аланіну (Ala-Ala), гліцин-глутамінової кислоти (Gly-Glu), глутамінова кислота-аланін-аланіну (Glu-Ala-Ala) та гліцин-лізину (Gly-Lys). Пептид дозволяє розщеплювати лінкер протеазою, тим самим полегшуючи вивільнення глюкокортикостероїду при впливі внутрішньоклітинних протеаз, таких як лізосомальні ферменти (Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784).

У цьому розкритті термін "глюкокортикостероїд" стосується природного або синтетичного стероїдного гормону, який взаємодіє з глюкокортикоїдними рецепторами, та у цьому документі докладно розкриті конкретні глюкокортикостероїди. "Радикал глюкокортикостероїду" утворюється при видаленні одного або більше атомів Гідрогену від вихідного глюкокортикостероїду. Видалення атома(-ів) Гідрогену полегшує приєднання вихідного глюкокортикостероїду до лінкера. У цьому розкритті атом Гідрогену видаляють з будь-якої придатної групи -NH $_2$ вихідного глюкокортикостероїду. Зокрема, "радикал глюкокортикостероїду" являє собою одновалентний радикал, отриманий при видаленні одного атома Гідрогену з вихідного глюкокортикостероїду.

У цьому розкритті термін "гетеробіфункціональна група" стосується хімічного фрагмента, який з'єднує лінкер і білок проти ФНП α (наприклад, антитіло). Гетеробіфункціональні групи характеризуються як такі, що мають різні реакційноздатні групи на обох кінцях хімічного фрагмента.

Термін "відношення лікарського засобу до антитіла" або "DAR" стосується кількості SM (наприклад, радикалу, отриманого з низькомолекулярного агоніста глюкокортикоїдного рецептора, наприклад глюкокортикостероїду), пов'язаних з A (наприклад, антитілом). Таким чином, в імунокон'югаті, що має загальну формулу (SM-L-Q) $_n$ -A, DAR визначається кількістю лікарського засобу на один кон'югат антитіло-лікарський засіб, наприклад "n".

При згадуванні сполуки, що має формулу (SM-L-Q) $_n$ -A, яка представляє індивідуальний імунокон'югат, термін "DAR сполуки" позначає кількість SM, пов'язаних з окремим A (наприклад, кількість лікарського засобу або n у вигляді цілого числа від 1 до 10).

При згадуванні сполуки, що має формулу $(SM-L-Q)_n-A$, що представляє сукупність імунокон'югатів, термін "DAR сукупності" стосується середньої кількості SM, пов'язаних з A (наприклад, кількість лікарських засобів або n у вигляді цілого числа або дробу від 1 до $10 \pm 0,5$, $\pm 0,4$, $\pm 0,3$, $\pm 0,2$, $\pm 0,1$).

5 Термін "суб'єкт" позначає людей, нижчих приматів тощо, які повинні бути реципієнтами певного лікування. Зазвичай терміни "суб'єкт" та "пацієнт" вживаються у цьому документі взаємозамінно по відношенню до людини.

Термін "фармацевтичний препарат" стосується препарату, який знаходиться в такій формі, яка дозволяє біологічній активності активного інгредієнта бути ефективною, і який не містить додаткових компонентів, неприйнятно токсичних для суб'єкта, якому будуть вводити препарат. Препарат може бути стерильним.

"Ефективна кількість" імунокон'югата, як описано у цьому документі, є кількістю, достатньою для здійснення конкретно зазначеної мети. "Ефективна кількість" може бути визначена по відношенню до заявленої мети.

15 Термін "терапевтично ефективна кількість" стосується кількості імунокон'югата, ефективною для "лікування" захворювання або розладу у суб'єкта або ссавця. "Профілактично ефективна кількість" означає кількість, ефективну для досягнення бажаного профілактичного результату.

20 Такі терміни, як "лікуючий", або "лікування", або "лікувати", або "полегшення", або "полегшувати" стосуються терапевтичних заходів, які виліковують, уповільнюють, зменшують один або більше симптомів та/або сповільнюють або зупиняють прогресування діагностованого патологічного стану або розладу ("терапевтичне лікування"). Таким чином, до тих, хто потребує терапевтичного лікування, належать ті, у кого вже встановлено діагноз або є підозра на наявність розладу. Профілактичні або попереджувальні заходи стосуються заходів, що запобігають розвитку цільового патологічного стану або розладу ("профілактичне лікування").
25 Таким чином, до тих, хто потребує профілактичного лікування, належать ті, хто має схильність до розладу, і ті, у яких це захворювання необхідно попередити.

II. Білки для зв'язування з агоністами глюкокортикоїдних рецепторів

У цьому розкритті наведені імунокон'югати, що містять агоністи глюкокортикоїдних рецепторів, пов'язані з білками, наприклад антитілами. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло є людським, гуманізованим, химерним або мишачим. У деяких варіантах здійснення винаходу білок, наприклад антитіло, може зв'язуватися з мішенню на поверхні клітини і ставати інтерналізованим.

У цьому розкритті також наведені імунокон'югати, що містять агоністи глюкокортикоїдних рецепторів, пов'язані з білками проти ФНПа. У деяких варіантах здійснення винаходу білки проти ФНПа є антитілами. У деяких варіантах здійснення винаходу білки проти ФНПа являють собою антитіла, які зв'язуються з ФНПа (наприклад, розчинний ФНПа та/або мембранозв'язаний ФНПа). У деяких варіантах здійснення винаходу білки проти ФНПа є розчинними білками-рецепторами ФНП, наприклад розчинними білками-рецепторами ФНП, злитими з константною ділянкою важкого ланцюга. У деяких варіантах здійснення винаходу білок проти ФНПа, наприклад антитіло проти ФНПа, зв'язується з ФНПа на поверхні клітини і стає інтерналізованим. Наприклад, у публікації заявки на патент США № 2014/0294813, включеної до цього документу шляхом посилання, описані білки проти ФНПа, які демонструють клітинну інтерналізацію при зв'язуванні з людським ФНПа поверхні клітини.

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіла зв'язуються з людським та/або мишачим ФНПа.

Послідовність амінокислот повної довжини для мембранозв'язаного ФНПа людини являє собою:

MSTESMIRDVELAEEALPKKTGGPQGSRRCLFSLFSFLIVAGATTLFCLLHFGVIGPQREEFPRD
LSLISPLAQAVRSSSRTPSDKPVAVHVVANPQAEGLQWLNRRANALLANGVELRDNQLVVPSEGLYLI
50 YSQVLFKGGQCPSTHVLLTHTISRIAVSYQTKVNLLSAIKSPCQRETPEGAEAKPWYEPIYLGGVFQLE
KGDRLSAEINRPDYLDFAESGQVYFGIIL (SEQ ID № 1). Розчинний ФНПа людини містить амінокислоти 77-233 з SEQ ID № 1. Послідовність амінокислот повної довжини для мембранозв'язаного ФНПа миші являє собою:

MSTESMIRDVELAEEALPQKMGGFQNSRRCLCLSLFSFLLVAGATTLFCLLNFGVIGPQRDEKFP
55 NGLPLISSMAQTLTLRSSSQNSSDKPVAVHVVANHQVEEQLEWLSQRANALLANGMDLKDNLVVP
DGLYLVSQVLFKGGQCPDYVLLTHTVSRFAISYQEKVNLLSAVKSPCKDTPEGAELKPWYEPIYLG
GVFQLEKGDQLSAEVLNPKYLDFAESGQVYFGVIAL (SEQ ID № 2). Розчинний мишачий ФНПа містить амінокислоти 80-235 з SEQ ID № 2.

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло проти ФНПа зв'язується з ФНПа людини.

60 У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло проти ФНПа зв'язується з ФНПа миші.

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло проти ФНПа виявляє один або більше з наступних ефектів: нейтралізує цитотоксичність ФНПа людини в *in vitro* аналізі L929 з IC50 1×10^{-7} М або менше; блокує взаємодію ФНПа з рецепторами клітинної поверхні p55 і p75; та/або лізує клітини, що експресують ФНП, *in vitro* у присутності комплементу.

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло проти ФНПа не зв'язується з ФНП-бета. Антитіла проти ФНПа включають, наприклад, адалімумаб, який є рекомбінантним антитілом людини. Послідовності амінокислот, що відповідають CDR та варіабельним ділянкам адалімумабу, описані в патенті США № 6258562 стосовно антитіла D2E7, тобто SEQ ID № 1-8. Міжнародна непатентована назва (МНН) адалімумабу міститься на сайті переліку МНН ВООЗ: рік 2000, список 44 (WHO Drug Information (2000) Vol. 14(3)). У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло проти ФНПа включає послідовності адалімумабу, наприклад, ділянки, що визначають комплементарність (CDR), варіабельний домен важкого ланцюга (VH) та/або варіабельний домен легкого ланцюга (VL). Ілюстративні послідовності наведені у Таблиці 1.

Таблиця 1

Ілюстративні послідовності ділянок антитіла адалімумабу

Ділянка антитіла	Послідовність амінокислот
Важкий ланцюг	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMH WVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYADSV EGRFTISRDN AKNSLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSS GGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK (SEQ ID № 3)
Легкий ланцюг	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLI YAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQRYNRAPY TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPR VQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID № 4)
Варіабельна ділянка важкого ланцюга	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEW VSAITWNSGHIDYADSV EGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KVSYLSTASSLDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID № 5)
Варіабельна ділянка легкого ланцюга	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLI YAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIK (SEQ ID № 6)
VH-CDR1	DYAMH (SEQ ID № 7) або GFTFDDYAMH (SEQ ID № 8)
VH-CDR2	AITWNSGHIDYADSV E (SEQ ID № 9)
VH-CDR3	VSYLSTASS (SEQ ID № 10) або VSYLSTASSLDY (SEQ ID № 11)
VL-CDR1	RASQGIRNYLA (SEQ ID № 12)
VL-CDR2	AASTLQS (SEQ ID № 13)
VL-CDR3	QRYNRAPYT (SEQ ID № 14)

У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло проти ФНПа включає CDR з SEQ ID № 3 і 4. У деяких варіантах CDR містять SEQ ID № 7 або 8, 9, 10 або 11, 12, 13 і 14. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло проти ФНПа включає важкий ланцюг SEQ ID № 3 та/або легкий ланцюг SEQ ID № 4.

Це розкриття додатково охоплює варіанти та їх еквіваленти, які по суті є гомологічними антитілами проти ФНПа, наведеним у цьому документі. Вони можуть містити, наприклад, консервативні мутації заміни, тобто заміна однієї або більше амінокислот аналогічними амінокислотами. Наприклад, консервативна заміна стосується заміни амінокислоти іншою в межах того ж загального класу, як, наприклад, однієї кислотної амінокислоти іншою кислотною амінокислотою, однієї основної амінокислоти іншою основною амінокислотою або однієї нейтральної амінокислоти іншою нейтральною амінокислотою. У цій галузі техніки добре відомо, що розуміють під консервативною заміною амінокислот.

Описані у цьому документі окремі антитіла проти ФНПа можуть бути отримані будь-яким

придатним способом, відомим у цій галузі техніки. Такі способи варіюються від прямих способів синтезу білку до конструювання послідовності ДНК, що кодує окремі поліпептидні послідовності, та експресії цих послідовностей у відповідному трансформованому хазяїні. У деяких варіантах здійснення винаходу послідовність ДНК побудована за допомогою рекомбінантної технології шляхом виділення або синтезу послідовності ДНК, що кодує цільовий білок дикого типу. Необов'язково, у послідовність можуть бути введені мутації за допомогою сайт-специфічного мутагенезу для отримання їх функціональних аналогів. Див., наприклад, Zoeller et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:5662-5066 (1984) та патент США № 4588585.

У деяких варіантах здійснення винаходу послідовність ДНК, що кодує цільове антитіло, сконструйована хімічним синтезом з використанням олігонуклеотидного синтезатора. Такі олігонуклеотиди можуть бути сконструйовані на основі амінокислотної послідовності бажаного поліпептиду та вибору тих кодонів, які є бажаними у клітині-хазяїні, в якій буде вироблятися цільовий рекомбінантний поліпептид. Для синтезу окремої поліпептидної послідовності, що кодує окремий цільовий поліпептид, можна застосовувати стандартні способи.

У деяких варіантах здійснення винаходу для ампліфікації та експресії ДНК, що кодує антитіла проти ФНПа, використовуються рекомбінантні вектори експресії. Можна використовувати широке різноманіття комбінацій хазяїн/вектор експресії. Корисні вектори експресії для еукаріотичних хазяїв включають, наприклад, вектори, що містять послідовності контролю експресії від SV40, вірус папіломи великої рогатої худоби, аденовірус та цитомегаловірус. Корисні вектори експресії для бактеріальних хазяїв включають відомі бактеріальні плазміди, такі як плазміди з *Escherichia coli*, включаючи pCR 1, pBR322, pMB9 та їх похідні, плазміди з більш широким діапазоном хазяїв, такі як M13 та нитчасті фаги з одноланцюговою ДНК.

Відповідні клітини-хазяї для експресії антитіл проти ФНПа включають прокариоти, дріжджі, комах або вищі еукаріотичні клітини під контролем відповідних промоторів. До прокариотів відносяться грамнегативні або грампозитивні організми, наприклад *E. coli* або паличкоподібні бактерії. Вищі еукаріотичні клітини включають встановлені клітинні лінії від ссавців. Також можуть бути використані безклітинні системи трансляції. Відповідні вектори клонування та експресії для використання з клітинами-хазяями бактерій, грибів, дріжджів та ссавців описані Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985). Додаткову інформацію щодо способів отримання білка, включаючи отримання антитіл, можна знайти, наприклад, у патентній публікації США № 2008/0187954, патентах США № 6413746 та 6660501 та міжнародній патентній публікації № WO 04009823.

III. Імунокон'югати, що містять агоністи глюкокортикоїдних рецепторів

Також запропоновані імунокон'югати, що містять агоністи глюкокортикоїдних рецепторів. У деяких варіантах здійснення винаходу імунокон'югат зв'язується з Fc-гамма-рецептором. У деяких варіантах здійснення винаходу імунокон'югат є активним у аналізі трансмембранного ФНПа з репортером GRE (як використовується у цьому документі "аналіз трансмембранного ФНПа з репортером GRE" стосується аналізу, що використовується нижче у Прикладі 7). В деяких варіантах здійснення винаходу імунокон'югат демонструє знижену імуногенність (знижену імунну реакцію проти лікарського засобу (ADA)) порівняно з білком в імунокон'югаті (наприклад, антитілом) окремо.

В одному варіанті здійснення винаходу у цьому документі розкрита сполука Формули I-a:

$(SM-L-Q)_n-A$ I-a,

де:

A являє собою антитіло проти фактору некрозу пухлини (ФНП) α , моноклональне антитіло проти ФНПа або адалімумаб;

L являє собою лінкер;

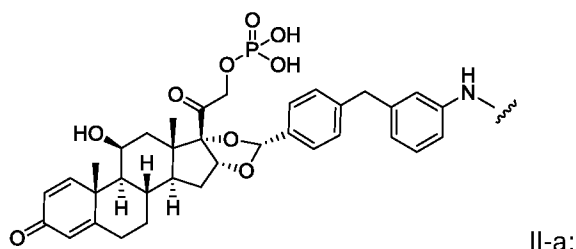
Q являє собою гетеробіфункціональну групу; або

Q відсутній;

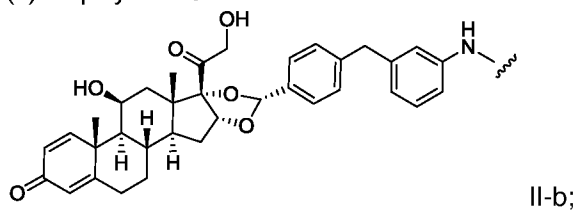
n дорівнює 1-10; і

SM являє собою одновалентний радикал глюкокортикостероїду, що має будь-яку з:

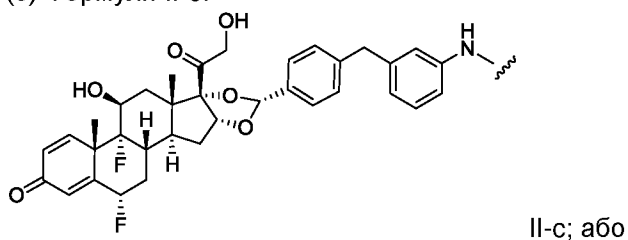
(1) Формули II-a:



(2) Формули II-b:

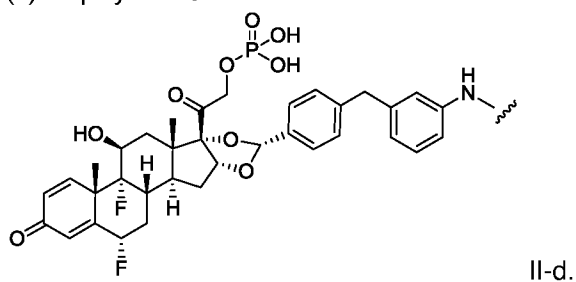


(3) Формули II-c:



5

(4) Формули II-d:

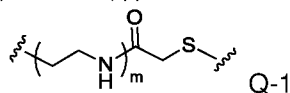


В іншому варіанті здійснення винаходу у цьому документі розкрита сполука Формули I-a, де SM являє собою одновалентний радикал глюкокортикостероїду, що має будь-яку з Формул II-a, II-b, II-c або II-d, де L являє собою лінкер, що здатний розщеплюватися, який містить дипептид або трипептид, Q являє собою гетеробіфункціональну групу, або Q відсутній, і n дорівнює 1-10. Зокрема, L містить дипептид або трипептид, обраний з групи, що складається з аланін-аланіну (Ala-Ala), гліцин-глутамінової кислоти (Gly-Glu), глутамінова кислота-аланін-аланіну (Glu-Ala-Ala) та гліцин-лізину (Gly-Lys).

10

15

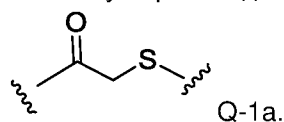
В іншому варіанті здійснення винаходу у цьому документі розкрита сполука Формули I-a, де SM являє собою одновалентний радикал глюкокортикостероїду, що має будь-яку з Формул II-a, II-b, II-c і II-d, де Q являє собою гетеробіфункціональну групу, зображену як:



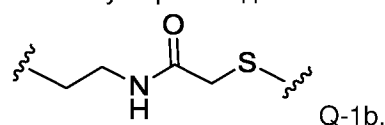
де m дорівнює 0 або 1.

20

В іншому варіанті здійснення винаходу m дорівнює 0, а Q зображений як:



В іншому варіанті здійснення винаходу m дорівнює 1, а Q зображений як:

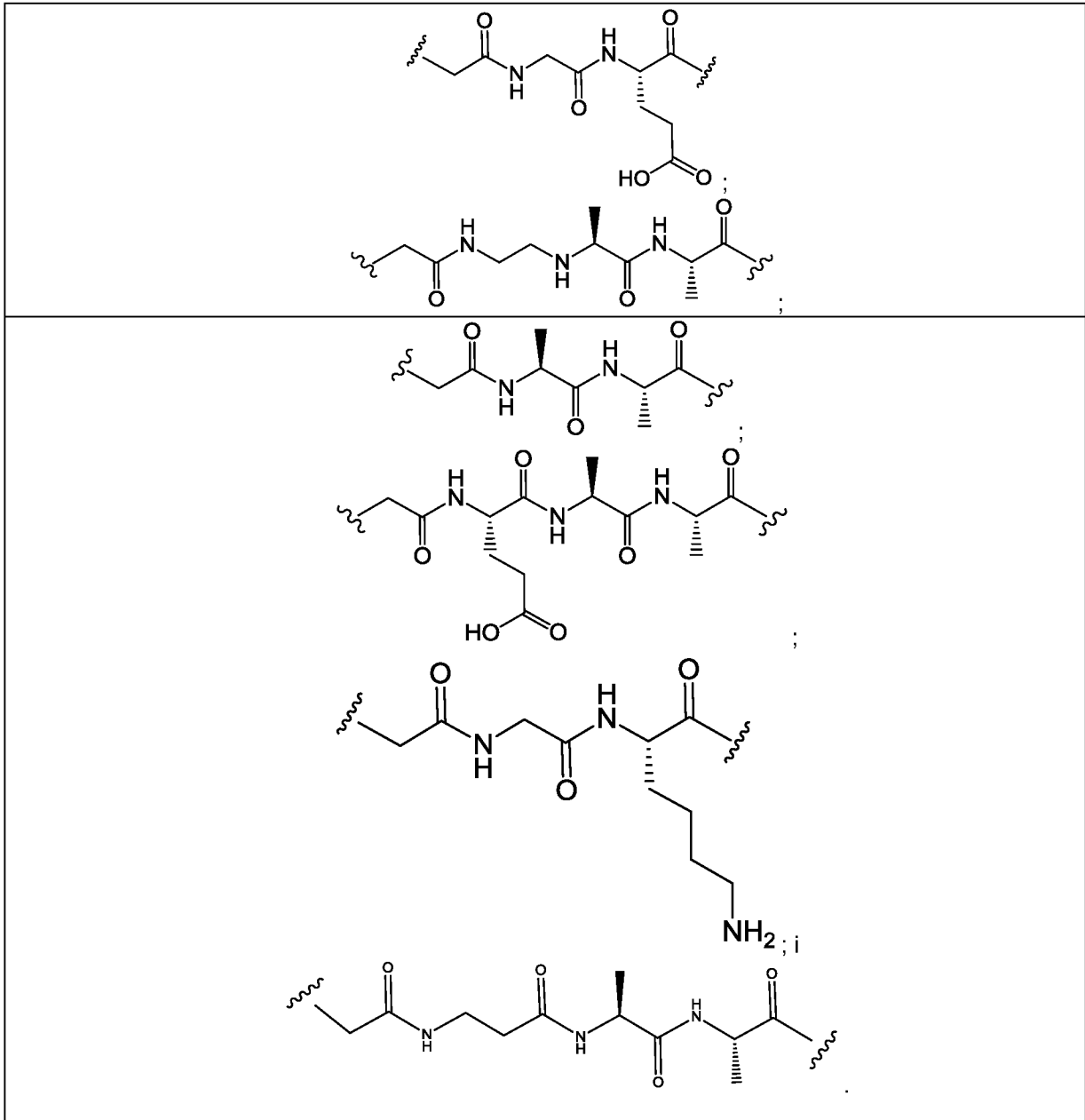


25

В іншому варіанті здійснення винаходу у цьому документі розкрита сполука Формули I-a, де SM являє собою одновалентний радикал глюкокортикостероїду, що має будь-яку з Формул II-a,

II-b, II-c і II-d, де -L-Q- являє собою будь-яку хімічну структуру з Таблиці 2:

Таблиця 2



5 В іншому варіанті здійснення винаходу у цьому документі розкрита сполука Формули I-a, наприклад сполука Формули I-a, де SM являє собою одновалентний радикал глюкокортикостероїду, що має будь-яку з Формул II-a, II-b, II-c і II-d, де n дорівнює 2-8. В іншому варіанті здійснення винаходу n дорівнює 1-5. В іншому варіанті здійснення винаходу n дорівнює 2-5. В іншому варіанті здійснення винаходу n дорівнює 1. В іншому варіанті здійснення винаходу n дорівнює 2. В іншому варіанті здійснення винаходу n дорівнює 3. В іншому варіанті здійснення винаходу n дорівнює 4. В іншому варіанті здійснення винаходу n дорівнює 5. В іншому варіанті здійснення винаходу n дорівнює 6. В іншому варіанті здійснення винаходу n дорівнює 7. В іншому варіанті здійснення винаходу n дорівнює 8.

15 В іншому варіанті здійснення винаходу у цьому документі розкрита сполука Формули I-a, наприклад сполука Формули I-a, де SM являє собою одновалентний радикал глюкокортикостероїду, що має будь-яку з Формул II-a, II-b, II-c і II-d, де n А являє собою антитіло.

В іншому варіанті здійснення винаходу у цьому документі розкрита сполука Формули I-a, наприклад сполука Формули I-a, де SM являє собою одновалентний радикал

глюкокортикостероїду, що має будь-яку з Формул II-a, II-b, II-c і II-d, причому антитіло є мишачим, химерним, гуманізованим або людським.

В іншому варіанті здійснення винаходу у цьому документі розкрита сполука Формули I-a, наприклад сполука Формули I-a, де SM являє собою одновалентний радикал глюкокортикостероїду, що має будь-яку з Формул II-a, II-b, II-c і II-d, причому A конкурентно інгібує зв'язування антитіла, вибраного з групи, що складається з адаліумабу, інфліксімабу, цертоліумабу пеголу та голіумабу, з ФНП α .

В іншому варіанті здійснення винаходу у цьому документі розкрита сполука Формули I-a, наприклад сполука Формули I-a, де SM являє собою одновалентний радикал глюкокортикостероїду, що має будь-яку з Формул II-a, II-b, II-c і II-d, причому A зв'язується з тим же епітопом ФНП α , що й антитіло, вибране з групи, що складається з адаліумабу, інфліксімабу, цертоліумабу пеголу, афелімомабу, нерелімомабу, озораліумабу, плакулумабу та голіумабу.

В іншому варіанті здійснення винаходу у цьому документі розкрита сполука Формули I-a, наприклад сполука Формули I-a, де SM являє собою одновалентний радикал глюкокортикостероїду, що має будь-яку з Формул II-a, II-b, II-c і II-d, причому A містить варіабельні послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 важкого ланцюга SEQ ID № 7 або 8, SEQ ID № 9 і SEQ ID № 10 або 11, відповідно, та варіабельні послідовності CDR1, CDR2 і CDR3 легкого ланцюга SEQ ID № 12, SEQ ID № 13 та SEQ ID № 14, відповідно.

В іншому варіанті здійснення винаходу у цьому документі розкрита сполука Формули I-a, наприклад сполука Формули I-a, де SM являє собою одновалентний радикал глюкокортикостероїду, що має будь-яку з Формул II-a, II-b, II-c і II-d, причому A являє собою антитіло проти ФНП α , що містить варіабельну ділянку важкого ланцюга, зображену як SEQ ID № 5, та варіабельну ділянку легкого ланцюга, зображену як SEQ ID № 6.

В іншому варіанті здійснення винаходу у цьому документі розкрита сполука Формули I-a, наприклад сполука Формули I-a, де SM являє собою одновалентний радикал глюкокортикостероїду, що має будь-яку з Формул II-a, II-b, II-c і II-d, причому A являє собою антитіло проти ФНП α , що містить важкий ланцюг, зображений як SEQ ID № 3, та легкий ланцюг, зображений як SEQ ID № 4.

В іншому варіанті здійснення винаходу у цьому документі розкрита сполука Формули I-a, наприклад сполука Формули I-a, де SM являє собою одновалентний радикал глюкокортикостероїду, що має будь-яку з Формул II-a, II-b, II-c і II-d, причому A блокує взаємодію ФНП α з рецепторами поверхні клітини p55 та p75.

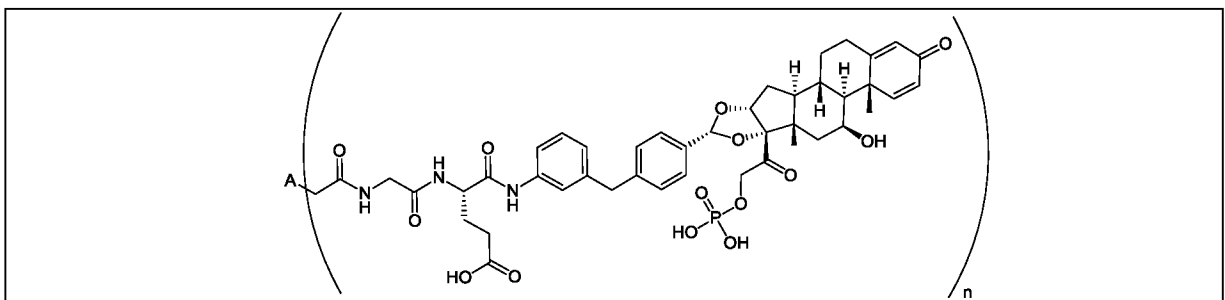
В іншому варіанті здійснення винаходу у цьому документі розкрита сполука Формули I-a, наприклад сполука Формули I-a, де SM являє собою одновалентний радикал глюкокортикостероїду, що має будь-яку з Формул II-a, II-b, II-c і II-d, причому A лізує клітини, що експресують поверхневий ФНП, *in vitro* у присутності комплекменту.

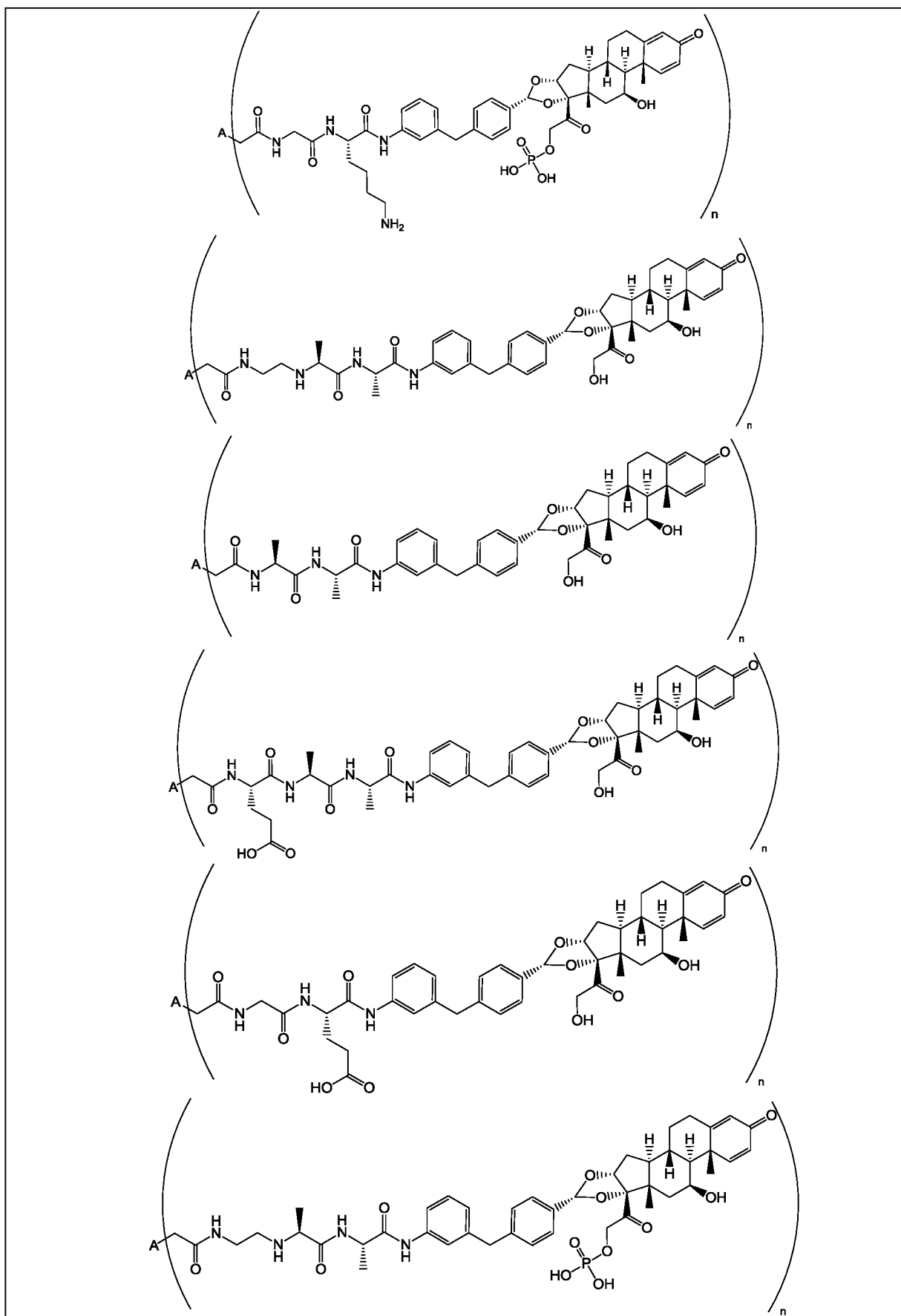
В іншому варіанті здійснення винаходу у цьому документі розкрита сполука Формули I-a, наприклад сполука Формули I-a, де SM являє собою одновалентний радикал глюкокортикостероїду, що має будь-яку з Формул II-a, II-b, II-c і II-d, де A являє собою етанерцепт.

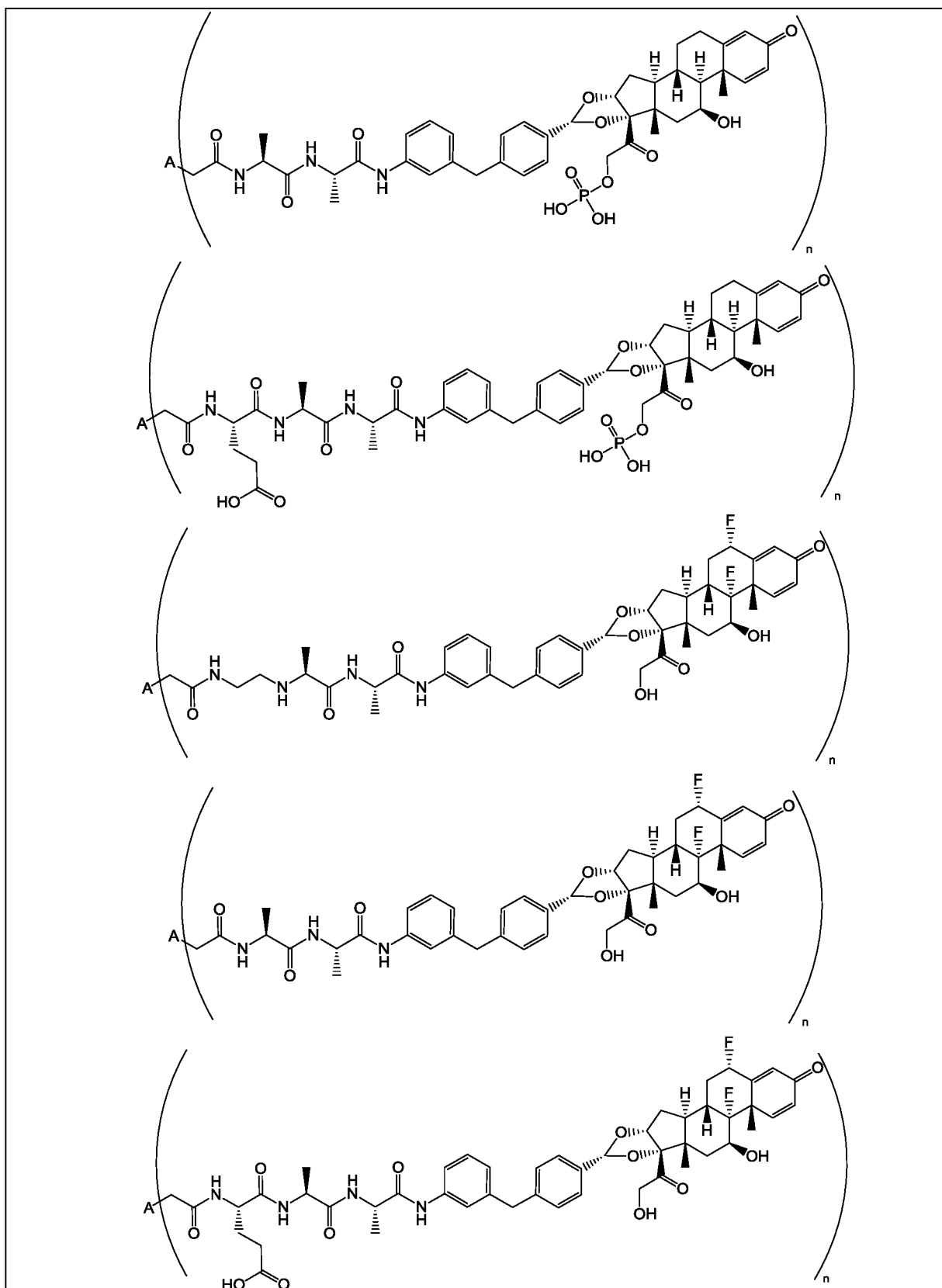
В іншому варіанті здійснення винаходу у цьому документі розкрита сполука Формули I-a, наприклад сполука Формули I-a, де SM являє собою одновалентний радикал глюкокортикостероїду, що має будь-яку з Формул II-a, II-b, II-c і II-d, де A являє собою адаліумаб.

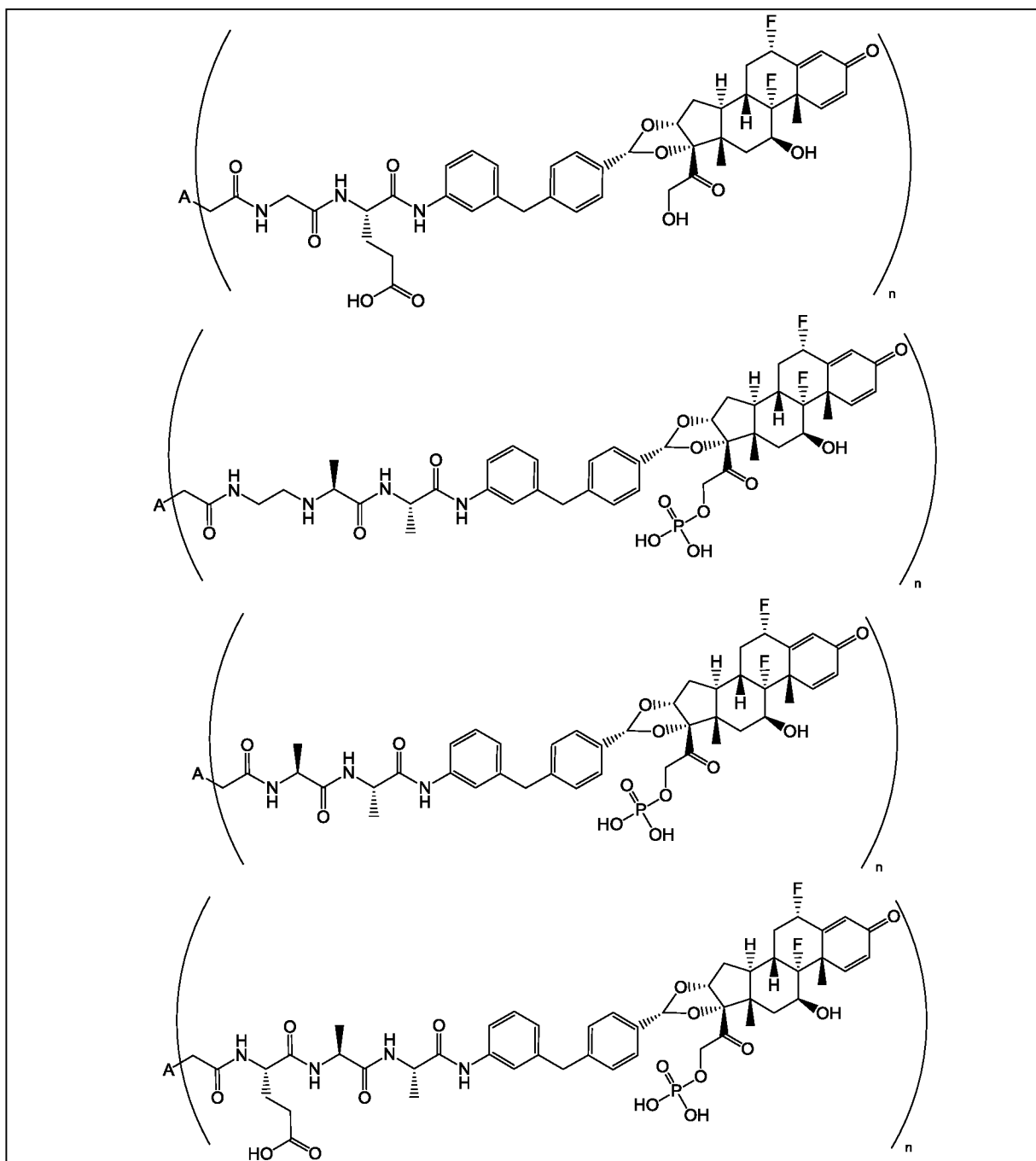
В іншому варіанті здійснення винаходу у цьому документі розкрита сполука Формули I-a, яка має будь-яку з хімічних структур з Таблиці 3:

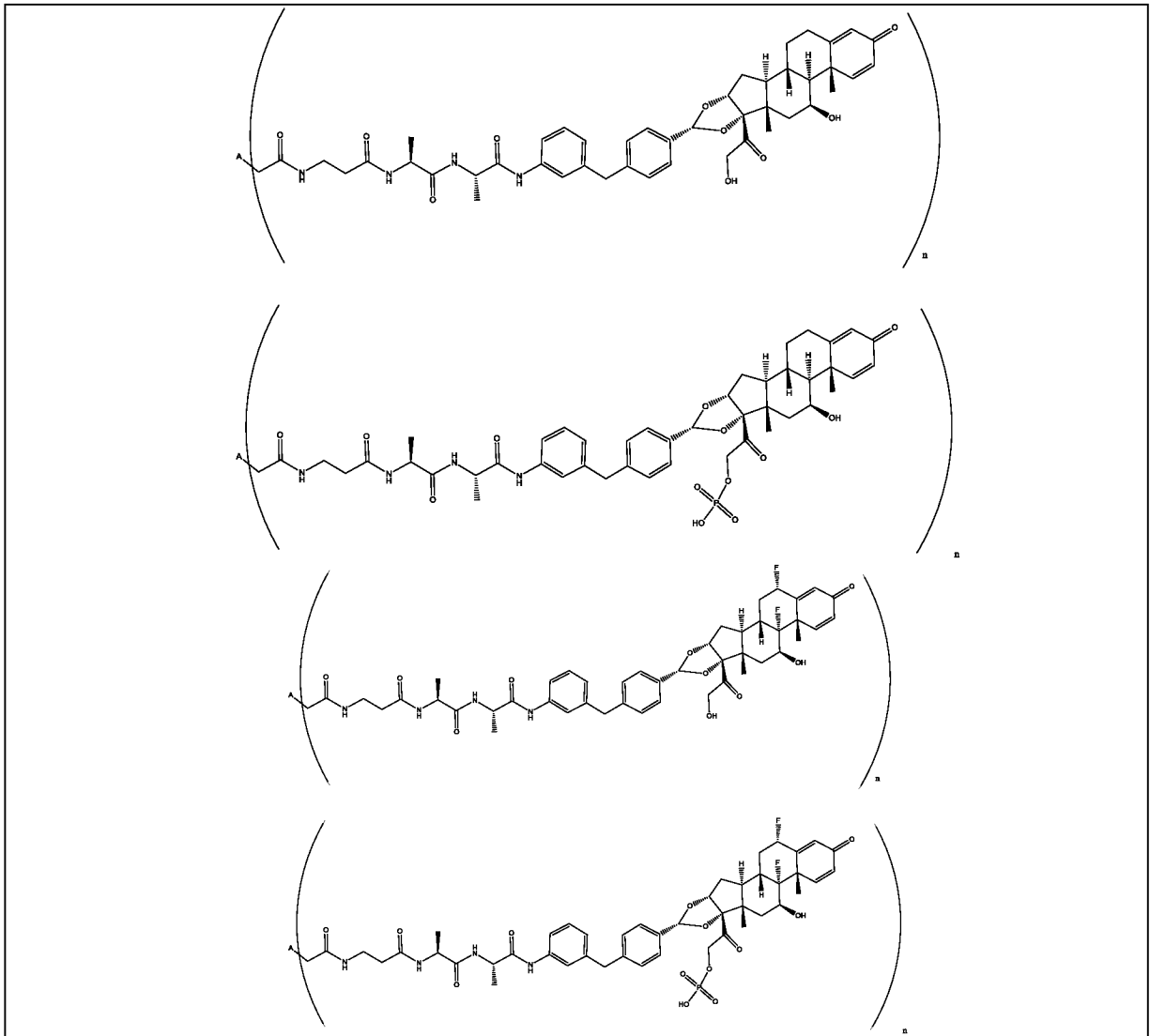
Таблиця 3



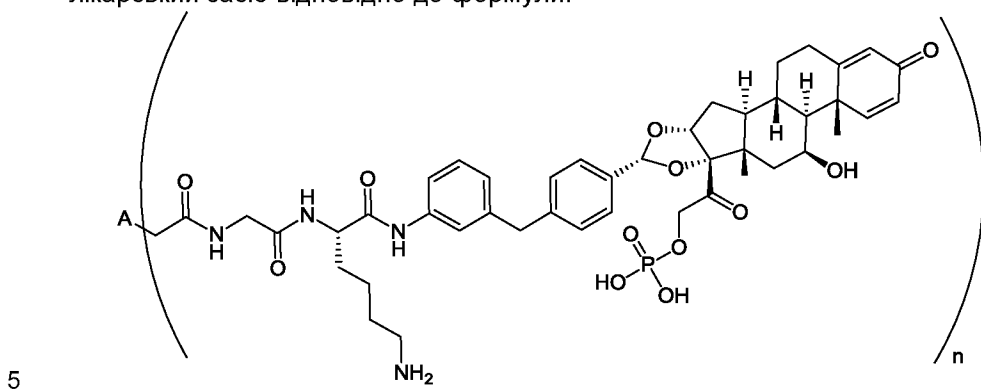








де n дорівнює 1-5, а А являє собою адалімуаб.
 В іншому варіанті здійснення винаходу у цьому документі розкритий кон'югат антитіло-лікарський засіб відповідно до формули:

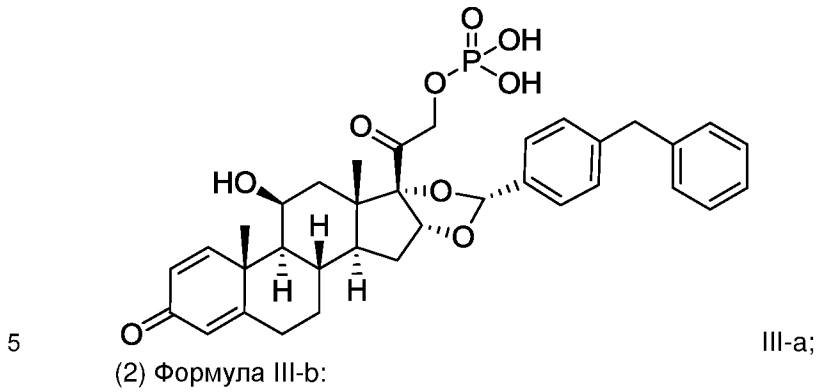


де А являє собою адалімуаб, і n дорівнює 4. Як показано в Прикладі 7 нижче, цей ADC (тобто ADC4 нижче) демонструє активність *in vitro*, стабільність у плазмі та мінімальне агрегування.

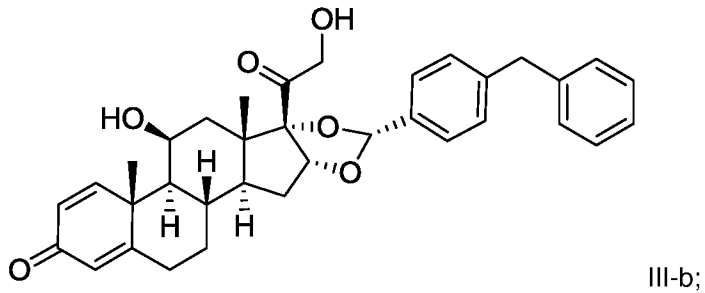
IV. Способи отримання імунокон'югатів та синтетичних проміжних продуктів
 10 Загальний синтез різних імунокон'югатів за винаходом передбачає приведення низькомолекулярної сполуки, функціоналізованої NH₂, (SM) будь-якої з Формул III-a, III-b, III-c або III-d нижче у контакт з лінкерною частиною та функціоналізація отриманої сполуки, що дає проміжний продукт, функціоналізований бромацетамідом. Потім проміжний продукт,

функціоналізований бромоацетамідом, приводять у контакт з HS-A, де HS-A являє собою антитіло, наприклад адалімумаб, що має обмежену кількість відновлених міжланцюгових дисульфідних зв'язків.

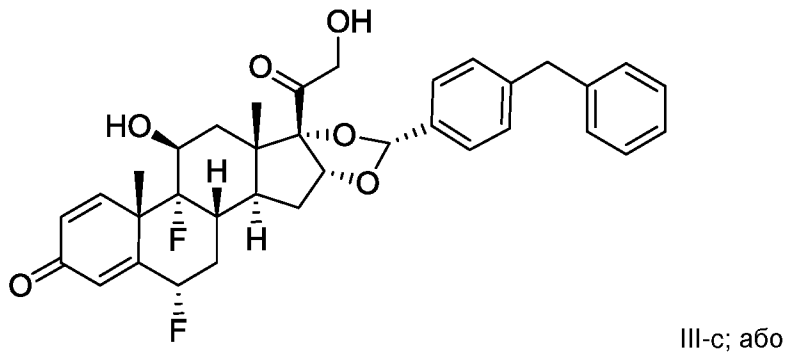
(1) Формула III-a:



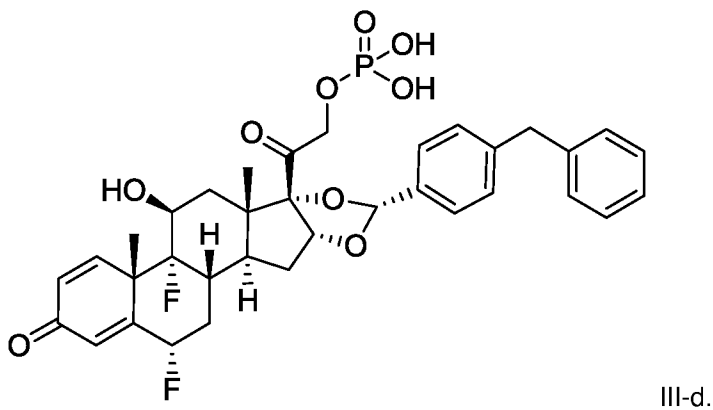
(2) Формула III-b:



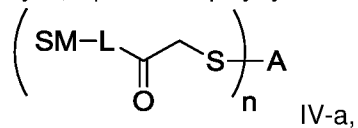
(3) Формула III-c:



(4) Формула III-d:



В іншому варіанті здійснення винаходу у цьому документі розкритий спосіб отримання сполуки, що має Формулу IV-a:



де:

15

A являє собою адалімумаб;

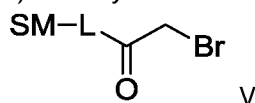
L являє собою лінкер;

n дорівнює 1-10; i

SM являє собою радикал глюкокортикостероїду, що має будь-яку з Формул III-a-III-d;

5 причому спосіб включає:

a) кон'югування сполуки Формули V:



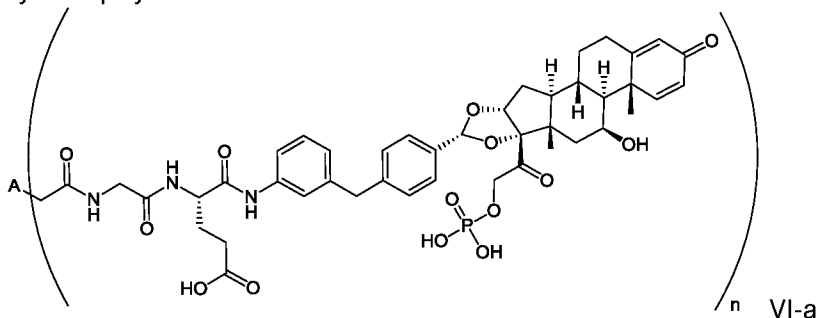
з білком проти фактору некрозу пухлини (ФНП) α або білком; i

b) виділення сполуки Формули IV-a.

10 У деяких варіантах здійснення винаходу розкритий спосіб додатково включає очищення сполуки Формули IV-a. У деяких варіантах здійснення винаходу використовується аніонообмінна хроматографія (АЕС), яка (за рахунок заряджених фрагментів пептидної частини лінкера у деяких варіантах здійснення та/або фосфатної групи на SM у деяких варіантах здійснення) може забезпечити ефективне розділення молекул з різним DAR.

15 У деяких варіантах здійснення винаходу розкритий спосіб потребує менше синтетичних стадій, ніж способи, що спираються на стандартну хімію лінкерів на основі малеїміду. Зокрема, способи, що спираються на стандартну хімію лінкерів на основі малеїміду, можуть вимагати подальшої стадії гідролізу для розкриття сукцинімідного кільця, яку здійснюють після очищення молекул з придатним DAR. Отже, у деяких варіантах здійснення винаходу розкритий спосіб значно скорочує протокол кон'югації у порівнянні зі стандартною хімією лінкера на основі малеїміду.

В іншому варіанті здійснення винаходу у цьому документі розкритий спосіб отримання сполуки Формули VI-a:



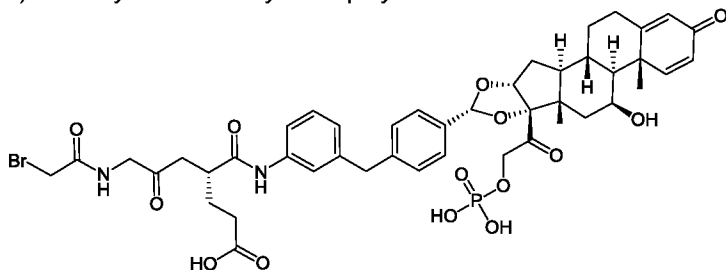
25 де:

A являє собою адалімумаб; i

n дорівнює 1-10,

причому спосіб включає:

a) кон'югування сполуки Формули VII-a:



30

з частково відновленим адалімумабом; i

b) виділення, наприклад, за допомогою хроматографії, сполуки, що має Формулу VI-a.

В іншому варіанті здійснення у цьому документі розкритий спосіб отримання сполуки Формули IV-a або Формули VI-a, де n дорівнює 1-7. В іншому варіанті здійснення винаходу n дорівнює 1-5. В іншому варіанті здійснення винаходу n дорівнює 2-4. В іншому варіанті здійснення винаходу n дорівнює 1. В іншому варіанті здійснення винаходу n дорівнює 2. В іншому варіанті здійснення винаходу n дорівнює 3. В іншому варіанті здійснення винаходу n дорівнює 4. В іншому варіанті здійснення винаходу n дорівнює 5. В іншому варіанті здійснення винаходу n дорівнює 6. В іншому варіанті здійснення винаходу n дорівнює 7. В іншому варіанті здійснення винаходу n дорівнює 8.

40

В іншому варіанті здійснення винаходу у цьому документі розкрита сполука Формули IV-а або VI-а, де:

А являє собою адаліумаб; і
п дорівнює 1-10.

5 В іншому варіанті здійснення у цьому документі розкрита сполука Формули IV-а або VI-а, де п дорівнює 1-7. В іншому варіанті здійснення винаходу п дорівнює 1-5. В іншому варіанті здійснення винаходу п дорівнює 2-4. В іншому варіанті здійснення винаходу п дорівнює 1. В іншому варіанті здійснення винаходу п дорівнює 2. В іншому варіанті здійснення винаходу п дорівнює 3. В іншому варіанті здійснення винаходу п дорівнює 4. В іншому варіанті здійснення винаходу п дорівнює 5. В іншому варіанті здійснення винаходу п дорівнює 6. В іншому варіанті здійснення винаходу п дорівнює 7. В іншому варіанті здійснення винаходу п дорівнює 8.

10 Також у цьому документі передбачені синтетичні проміжні продукти, які придатні для отримання імунокон'югатів.

В одному варіанті здійснення винаходу описаний у цьому документі синтетичний проміжний продукт являє собою сполуку, що має будь-яку з Формул V або VII-а.

VI. Способи застосування та фармацевтичні композиції

У цьому документі наведені кон'югати Формули I-а (наприклад, мають формули, зображені у Таблиці 3), які можна використовувати *in vitro* або *in vivo*. Відповідно, також запропоновані композиції, наприклад фармацевтичні композиції для певного застосування *in vivo*, що містять кон'югат або агоніст глюкокортикоїдного рецептора з бажаним ступенем чистоти у фізіологічно прийнятному носії, допоміжній речовині або стабілізаторі (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA). Прийнятні носії, допоміжні речовини або стабілізатори є не токсичними для реципієнтів у дозуваннях і концентраціях, що застосовуються.

20 Композиції (наприклад, фармацевтичні композиції), які використовуються для введення *in vivo*, можуть бути стерильними, що може бути здійснено шляхом фільтрування через, наприклад, стерильні фільтраційні мембрани. Композиції (наприклад, фармацевтичні композиції), що використовуються для введення *in vivo*, можуть містити консервант.

25 Кон'югати антитіло-лікарський засіб та/або фармацевтичні композиції, що містять описані у цьому документі кон'югати антитіло-лікарський засіб, можуть бути ефективними для лізису клітини, що експресує поверхневий ФНП α (*in vitro* або *in vivo*), та/або для лікування захворювань або розладів, що характеризуються підвищеним ФНП α (наприклад, підвищеним ФНП α в синовіальній рідині). У деяких варіантах здійснення винаходу кон'югати антитіло-лікарський засіб та/або композиції є ефективними при інгібуванні вивільнення цитокінів (*in vitro* або *in vivo*) та/або для лікуванні аутоімунних або запальних захворювань. У деяких варіантах здійснення винаходу кон'югати антитіло-лікарський засіб та/або композиції використовуються для лікування хвороби Крона (наприклад, хвороби Крона від помірного до тяжкого ступеня, що зачіпає клубову кишку та/або висхідну ободову кишку, і/або підтримання клінічної ремісії хвороби Крона від помірного до тяжкого ступеня, що зачіпає клубову кишку та/або висхідну ободову кишку, до 3 місяців). У деяких варіантах здійснення винаходу кон'югати антитіло-лікарський засіб та/або композиції застосовуються для лікування виразкового коліту (наприклад, для індукції ремісії у пацієнтів з активним виразковим колітом від помірного до тяжкого ступеня). У деяких варіантах здійснення винаходу кон'югати антитіло-лікарський засіб та/або композиції використовуються для лікування ревматоїдного артриту (РА, RA). У деяких варіантах здійснення винаходу кон'югати антитіло-лікарський засіб та/або композиції використовуються для лікування ювенільного ідіопатичного артриту (ЮА, JA). У деяких варіантах здійснення винаходу кон'югати антитіло-лікарський засіб та/або композиції використовуються для лікування псоріатичного артриту (ПсА, PsA). У деяких варіантах здійснення винаходу кон'югати антитіло-лікарський засіб та/або композиції використовуються для лікування спондилоартропатії, такої як анкілозуючий спондиліт (АС, AS) або аксіальний спондилоартрит (аксСпА, axSpA). У деяких варіантах здійснення винаходу кон'югати антитіло-лікарський засіб та/або композиції використовуються для лікування хвороби Крона (ХК, CD) у дорослих. У деяких варіантах здійснення винаходу кон'югати антитіло-лікарський засіб та/або композиції використовуються для лікування хвороби Крона у дітей. У деяких варіантах здійснення винаходу кон'югати антитіло-лікарський засіб та/або композиції використовуються для лікування виразкового коліту (ВК, UC). У деяких варіантах здійснення винаходу кон'югати антитіло-лікарський засіб та/або композиції використовуються для лікування бляшкоподібного псоріазу (БП, Ps). У деяких варіантах здійснення винаходу кон'югати антитіло-лікарський засіб та/або композиції використовуються для лікування гнійного гідраденіту (ГГ, HS). У деяких варіантах здійснення винаходу кон'югати антитіло-лікарський засіб та/або композиції використовуються для лікування увеїту. У деяких варіантах здійснення винаходу кон'югати антитіло-лікарський засіб та/або композиції

використовуються для лікування хвороби Бехчета. У деяких варіантах здійснення винаходу кон'югати антитіло-лікарський засіб та/або композиції використовуються для лікування псоріазу, включаючи бляшкоподібний псоріаз. Деякі варіанти здійснення винаходу включають використання кон'югатів лікарського засобу та/або фармацевтичних композицій для виготовлення лікарського препарату для лікування захворювань або розладів, описаних у цьому документі.

Деякі варіанти здійснення винаходу включають способи доставки агоніста глюкокортикоїдного рецептора до клітини, що експресує ФНП α . Такі способи можуть включати стадію приведення клітини, що експресує ФНП α , у контакт з кон'югатом антитіло-лікарський засіб, як описано у цьому документі. Деякі варіанти здійснення винаходу включають *in vitro* спосіб доставки агоніста глюкокортикоїдного рецептора до клітини, що експресує ФНП α .

Також наведені способи визначення протизапальної активності кон'югата антитіло-лікарський засіб. Такі способи можуть включати стадію приведення клітини, що експресує ФНП α , у контакт з кон'югатом антитіло-лікарський засіб, як описано у цьому документі. Деякі варіанти здійснення винаходу включають приведення клітини, що експресує ФНП α , у контакт з кон'югатом антитіло-лікарський засіб, як описано у цьому документі, та визначення зменшення вивільнення прозапальних цитокінів з клітини порівняно з контрольною клітиною. Деякі варіанти здійснення винаходу включають спосіб визначення протизапальної активності кон'югата антитіло-лікарський засіб *in vitro*.

Деякі варіанти здійснення винаходу включають способи відбору (наприклад, способи *in vitro*), які включають приведення у контакт, безпосередньо чи опосередковано, клітин (наприклад, клітин, що експресують ФНП α) з кон'югатом антитіло-лікарський засіб та визначення, чи модулює кон'югат антитіло-лікарський засіб активність або функцію клітин, що відображається, наприклад, змінами у морфології та життєздатності клітин, експресією маркера, диференціацією або дедиференціацією, клітинним диханням, мітохондріальною активністю, цілісністю мембрани, дозріванням, проліферацією, життєздатністю, апоптозом або загибеллю клітин. Одним прикладом безпосередньої взаємодії є фізична взаємодія, тоді як опосередкована взаємодія включає, наприклад, дію композиції на проміжну молекулу, яка, в свою чергу, діє на згадуваний об'єкт (наприклад, клітину або клітинну культуру).

VII. Готові вироби

Винахід також включає фармацевтичні упаковки та набори, що містять один або більше контейнерів, причому контейнер може містити одну або більше доз кон'югата антитіло-лікарський засіб або композиції, як описано у цьому документі. У деяких варіантах здійснення винаходу упаковка або комплект містить одиничне дозування, що означає заздалегідь визначену кількість композиції або кон'югата антитіло-лікарський засіб з одним або більше додатковими агентами або без них.

Набір може містити один або декілька контейнерів та етикетку або листівку-вкладку у, на або у поєднанні з контейнером(-ами), що вказує на те, що композиція, що міститься у ньому, використовується для лікування вибраного захворювання. Придатні контейнери включають, наприклад, пляшки, флакони, шприци тощо. Контейнери можуть бути виготовлені з різних матеріалів, таких як скло або пластик. Контейнер(-и) можуть містити стерильний вхідний отвір, наприклад контейнер може являти собою пакет для внутрішньовенного розчину або флакон, що має пробку, яку можна проткнути голкою для підшкірних ін'єкцій.

У деяких варіантах здійснення винаходу набір може містити засоби для введення пацієнту антитіла та будь-яких необов'язкових компонентів, наприклад одну або більше голок або шприців (попередньо наповнених або порожніх), очну крапельницю, піпетку або інший подібний пристрій, з якого препарат може бути ін'єктований або введений суб'єкту або нанесений на уражену ділянку тіла. Набори за винаходом також зазвичай включають засоби для зберігання флаконів тощо та інші компоненти у захисній упаковці для комерційного продажу, такі як, наприклад, виготовлені видувним формуванням пластикові контейнери, у які поміщають та у яких зберігають бажані флакони та інші пристрої.

Приклади

Зрозуміло, що приклади та варіанти здійснення, описані у цьому документі, наведені лише з ілюстративними цілями, і що в їх світлі фахівцям у цій галузі будуть запропоновані різні модифікації або зміни, які повинні бути включені у сутність та межі цього винаходу.

Вихідні речовини є комерційно доступними, можуть бути отримані за описаними у цьому документі методиками, літературними методиками або методиками, які добре відомі фахівцю в галузі органічної хімії. Назви реагентів/реактивів є такими, як вони наведені на покупній пляшці або згенеровані відповідно до конвенцій IUPAC за допомогою ChemDraw Ultra 12.0, CambridgeSoft®, Chemistry E-Notebook 11, CambridgeSoft® або AutoNom 2000. Зрозуміло, що

приклади та варіанти здійснення, описані у цьому документі, наведені лише з ілюстративними цілями, і що в їх світлі фахівцям у цій галузі будуть запропоновані різні модифікації або зміни, які повинні бути включені у сутність та межі цього винаходу.

Аналітичні методики синтезу та характеристика сполук

5 Аналітичні дані включені до наведених нижче методик, до ілюстрацій загальних методик або до таблиць прикладів. Якщо не вказано інше, всі ¹H та ¹³C ЯМР дані були отримані на приладі Varian Mercury Plus 400 МГц або Bruker AVIII 300 МГц; хімічні зсуви наведені у мільйонних долях (м. д.). Аналітичні дані ВЕРХ або деталізуються в межах експерименту, або наведені у таблиці умов РХ/МС та ВЕРХ з використанням методики, зображеної у Таблиці 4.

10

Таблиця 4

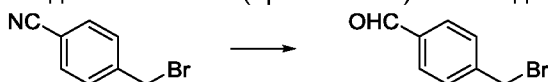
Методика	Умови
a	Гradient являв собою 1-90 % В за 3,4 хв., 90-100 % В за 0,45 хв., 100-1 % В за 0,01 хв., а потім витримування при 1 % В протягом 0,65 хв. (швидкість потоку 0,8 мл/хв.). Рухомі фази А являла собою 0,0375 % ТФК у Н ₂ O, рухомі фази В являла собою 0,018 % ТФК в MeCN. Колонка, яку використовували для хроматографії, являла собою колонку Phenomenex Luna-C18, 2,0 × 50 мм (частинки 5 мкм). Методи виявлення являють собою DAD та ELSD, а також іонізація електроспреем у режимі позитивних йонів.

У нижче наведених прикладах використовуються наступні скорочення:

АКТГ	Адренокортикотропний гормон	НІС	Хроматографія з гідрофобними взаємодіями
BrAc	Бромацетамід	ВЕРХ	Високоєфективна рідинна хроматографія
CV	Об'єми колонок	РХМС	Рідинна хроматографія з мас-спектрометричним детектуванням
DAD	Діодна матриця	MeCN	Ацетонітрил
DAR	Відношення лікарського засобу до антитіла	MEM	Мінімальне живильне середовище
ДФФ	Дибутилфталат	MeOH	Метанол
ДХМ	Дихлорометан	МС	Мас-спектрометрія
DMA	Диметилацетамід	NEAA	Замінні амінокислоти
ДМФА	Диметилформаїд	ЯМР	Ядерний магнітний резонанс
ДМСО	Диметилсульфоксид	ФСБ	Фосфатно-сольовий буферний розчин
ДТТ	Дітіотреїтол	ПЕ	Петролейний етер
EEDQ	2-Етоксид-1-етоксикарбоніл-1,2-дигідрохінолін	P1NP	Амінокінцевий пропептид проколагену 1 типу
ELSD	Випарювальний детектор розсіювання світла	к.т.	Кімнатна температура
Екв.	Еквіваленти	RPMI	Меморіальний інститут Розуелл-Парк
EtOAc	Етилацетат	SEC	Ексклюзивна хроматографія
ФБС	Фетальна бичача сироватка	ТСЕР	(трис(2-карбоксіетил)фосфін)
Fmoc	9-флуоренілметилоксикарбоніл	ТФК	Трифлуороцтова кислота

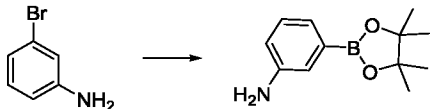
15 Приклад 1: Синтез (2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10S, 11aR, 12aS, 12bS)-10-(4-(3-амінобензил)феніл)-2,6b-дифлуоро-7-гідрокси-8b-(2-гідроксиацетил)-6a, 8a-диметил-1,2,6a, 6b, 7,8,8a, 8b, 11a, 12,12a, 12b-додекагідро-4H-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-4-ону

Стадія 1: Синтез 4-(бромометил)бензальдегіду



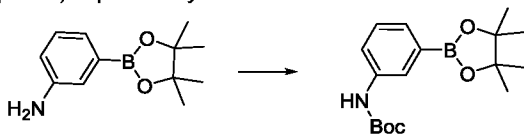
Гідрид діізобутилалюмінію (153 мл, 153 ммоль, 1 М у толуені) додавали по краплях до розчину 4-(бромометил)бензонітрилу (20 г, 102 ммоль) у толуені (400 мл) протягом 1 години при 0 °С. Були підготовлені два додаткові флакони, як описано вище. Всі три реакційні суміші об'єднували. До суміші додавали 10 % водну HCl (1,5 л). Суміш екстрагували ДХМ (3 × 500 мл).
 5 Органічний шар сушили над Na₂SO₄, фільтрували і концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали колонковою хроматографією на силікагелі (елюювали ПЕ:EtOAc=10:1), щоб отримати цільову сполуку (50 г, вихід 82 %) у вигляді білої твердої речовини. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 10,02 (с, 1H), 7,91-7,82 (м, 2H), 7,56 (д, J=7,9 Гц, 2H), 4,55-4,45 (м, 2H).

Стадія 2: Синтез 3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан-2-іл)аніліну



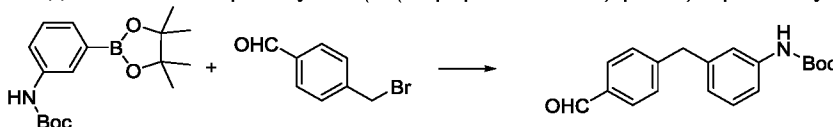
До розчину 3-броманіліну (40 г, 233 ммоль) в 1,4-діоксані (480 мл) додавали 4,4,4',4',5,5,5',5'-тетраметил-2,2'-бі(1,3,2-діоксаборолан) (94 г, 372 ммоль), ацетат калію (45,6 г, 465 ммоль), 2-дициклогексилфосфіно-2',4',6'-триізопропіл-1,1'-біфеніл (8,07 г, 13,95 ммоль) та трис(добензиліденацетон)дипаладій (0) (8,52 г, 9,30 ммоль). Отриману суміш нагрівали при 80 °С протягом 4 годин під азотом. Додатковий флакон був підготовлений, як описано вище. Дві реакційні суміші об'єднували і концентрували, а залишок очищали колонковою хроматографією на силікагелі (елюювали ПЕ:EtOAc=10:1), щоб отримати цільову сполуку (60 г, вихід 55,4 %) у вигляді світло-жовтої твердої речовини. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,23-7,13 (м, 3H), 6,80 (д, J=7,5 Гц, 1H), 3,82-3,38 (м, 2H), 1,34 (с, 12H).

20 Стадія 3: Синтез трет-бутил-(3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан-2-іл)феніл)карбамату



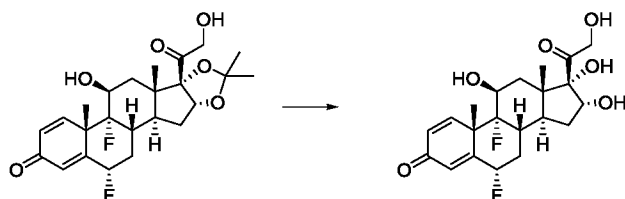
3-(4,4,5,5-Тетраметил-1,3,2-діоксаборолан-2-іл)анілін (Приклад 1, Стадія 2) (30 г, 137 ммоль) та ди-трет-бутилдикарбонат (38,9 г, 178 ммоль) перемішували в толуені (600 мл) при 100 °С протягом 24 годин. Інший флакон був підготовлений, як описано вище. Дві реакційні суміші об'єднували, і суміш випарювали, розчиняли в EtOAc (1,5 л), промивали 0,1 н. HCl (3 × 2 л) і насиченим водним розчином хлориду натрію (3 л), сушили над Na₂SO₄, фільтрували і концентрували при зниженому тиску, що давало цільову сполуку (50 г, вихід 57 %) у вигляді червоної твердої речовини. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 7,63 (ш. м, 2H), 7,48 (д, J=7,1 Гц, 1H), 7,37-7,28 (м, 1H), 1,52 (с, 9H), 1,34 (с, 12H).

30 Стадія 4: Синтез трет-бутил-(3-(4-формілбензил)феніл)карбамату



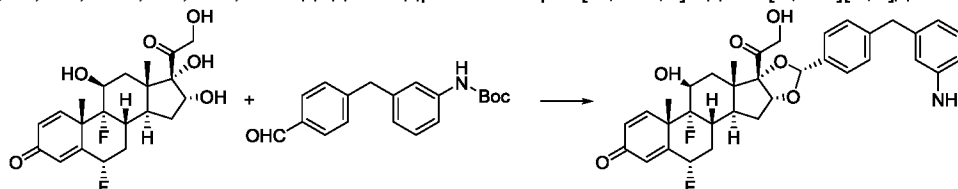
Суміш 4-(бромометил)бензальдегіду (Приклад 1, Стадія 1) (24,94 г, 125 ммоль), комплексу 1,1'-біс(дифенілфосфіно)фероцендіхлоропаладій (II) з ДХМ (13,75 г, 18,80 ммоль), трет-бутил-(3-(4,4,5,5-тетраметил-1,3,2-діоксаборолан-2-іл)феніл)карбамату (з Прикладу 1, Стадія 3) (20 г, 62,7 ммоль) і карбонату калію (43,3 г, 313 ммоль) у тетрагідрофурані (400 мл) нагрівали до 80 °С протягом 12 годин. Інший флакон був підготовлений, як описано вище. Дві реакційні суміші об'єднували і розбавляли водою (500 мл). Водну суміш екстрагували EtOAc (3 × 500 мл). Органічні шари об'єднували і сушили над Na₂SO₄, фільтрували і концентрували при зниженому тиску. Залишок очищали колонковою хроматографією на силікагелі (елюювали ПЕ:EtOAc=10:1), щоб отримати цільову сполуку (15 г, вихід 38,4 %) у вигляді білої твердої речовини. ¹H ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 9,95 (с, 1H), 7,78 (д, J=7,9 Гц, 2H), 7,33 (д, J=7,9 Гц, 2H), 7,27-7,13 (м, 3H), 6,82 (д, J=7,1 Гц, 1H), 6,47 (ш. с, 1H), 4,00 (с, 2H), 1,48 (с, 9H).

45 Стадія 5: Синтез (6S, 8S, 9R, 10S, 11S, 13S, 14S, 16R, 17S)-6,9-дифлуоро-11,16,17-тригідрокси-17-(2-гідроксиацетил)-10,13-диметил-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-додекагідро-3H-циклопента[а]фенантрен-3-ону



(2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 11aR, 12aS, 12bS)-2,6b-Дифлуоро-7-гідрокси-8b-(2-гідроксиацетил)-6а, 8а, 10,10-тетраметил-1,2,6а, 6b, 7,8,8а, 8b, 11а, 12,12а, 12b-додекагідро-4Н-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-4-он (20 г, 44,2 ммоль) суспендували в 40 %-ому водному HBF_4 (440 мл), і суміш перемішували при 25 °С протягом 48 годин. Після завершення реакції додавали 2 л води, і тверду речовину збирали фільтруванням. Цю тверду речовину промивали водою (1 л), а потім MeOH (200 мл), що давало цільову сполуку (11 г, вихід 60,3 %) у вигляді білої твердої речовини. ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 7,25 (д, $J=10,1$ Гц, 1H), 6,28 (д, $J=10,1$ Гц, 1H), 6,10 (с, 1H), 5,73-5,50 (м, 1H), 5,39 (ш. с, 1H), 4,85-4,60 (м, 2H), 4,50 (д, $J=19,4$ Гц, 1H), 4,20-4,04 (м, 2H), 2,46-2,06 (м, 6H), 1,87-1,75 (м, 1H), 1,56-1,30 (м, 6H), 0,83 (с, 3H).

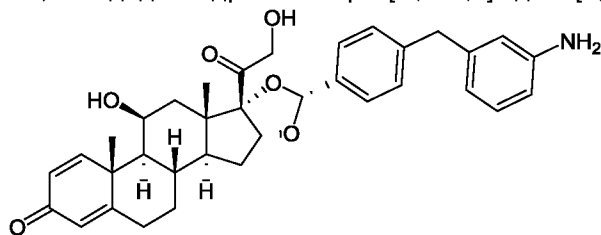
Стадія 6: Синтез (2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-10-(4-(3-амінобензил)феніл)-2,6b-дифлуоро-7-гідрокси-8b-(2-гідроксиацетил)-6а, 8а-диметил-1,2,6а, 6b, 7,8,8а, 8b, 11а, 12,12а, 12b-додекагідро-4Н-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-4-ону.



Суспензію (6S, 8S, 9R, 10S, 11S, 13S, 14S, 16R, 17S)-6,9-дифлуоро-11,16,17-тригідрокси-17-(2-гідроксиацетил)-10,13-диметил-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-додекагідро-3Н-циклопента[а]фенантрен-3-ону (Приклад 1, Стадія 5) (4,4 г, 10,67 ммоль) і MgSO_4 (6,42 г, 53,3 ммоль) у MeCN (100 мл) перемішували при 20 °С протягом 1 години. Однією порцією додавали розчин трет-бутил-(3-(4-формілбензил)феніл)карбамату (Приклад 1, Стадія 4) (3,65 г, 11,74 ммоль) в MeCN (100 мл). По краплях додавали трифлуорометансульфонову кислоту (9,01 мл, 53,3 ммоль), підтримуючи внутрішню температуру нижче 25 °С, використовуючи льодяну баню. Після додавання суміш перемішували при 20 °С протягом 2 годин. Три додаткові флакони були підготовлені, як описано вище. Всі чотири реакційні суміші об'єднували і концентрували, а залишок очищали препаративною ВЕРХ, що давало цільову сполуку (4,5 г, вихід 14,2 %) у вигляді жовтої твердої речовини. РХМС (методика а, Таблиця 4) $R_t=2,65$ хв.; МС $m/z=606,2$ ($M+H$) $^+$; ^1H ЯМР (400 МГц, DMSO-d_6) δ 7,44-7,17 (м, 5H), 6,89 (т, $J=7,7$ Гц, 1H), 6,44-6,25 (м, 4H), 6,13 (ш. с, 1H), 5,79-5,52 (м, 2H), 5,44 (с, 1H), 5,17-4,89 (м, 3H), 4,51 (д, $J=19,4$ Гц, 1H), 4,25-4,05 (м, 2H), 3,73 (с, 2H), 3,17 (ш. с, 1H), 2,75-2,55 (м, 1H), 2,36-1,97 (м, 3H), 1,76-1,64 (м, 3H), 1,59-1,39 (м, 4H), 0,94-0,78 (м, 3H). Методика препаративної ВЕРХ: прилад: система для напівпрепаративної ВЕРХ Gilson 281; рухома фаза: А: мурашина кислота/ $\text{H}_2\text{O}=0,01$ % об/об; В: MeCN ; колонка: Luna C18, 150*25, 5 мкм; швидкість потоку: 25 мл/хв.; довжина хвили детектування: 220 і 254 нм.

Час	0,0	10,5	10,6	10,7	13,7	13,8	15,0
В, %	15	35	35	100	100	10	10

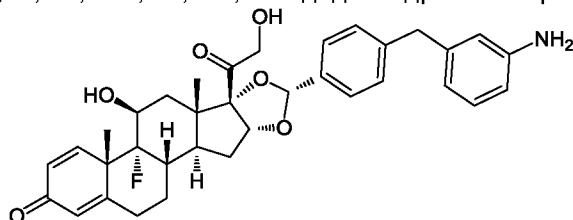
Приклад 2: Синтез (6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-10-(4-(3-амінобензил)феніл)-7-гідрокси-8b-(2-гідроксиацетил)-6а, 8а-диметил-1,2,6а, 6b, 7,8,8а, 8b, 11а, 12,12а, 12b-додекагідро-4Н-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-4-ону.



Приклад 2 був синтезований за методикою, аналогічною Прикладу 1, використовуючи (8S, 9S, 10R, 11S, 13S, 14S, 16R, 17S)-11,16,17-тригідрокси-17-(2-гідроксиацетил)-10,13-диметил-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-додекагідро-3Н-циклопента[а]фенантрен-3-он.

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,36 (д, J=7,9 Гц, 2H), 7,31 (д, J=10,1 Гц, 1H), 7,20 (д, J=7,9 Гц, 2H), 6,89 (т, J=7,9 Гц, 1H), 6,39-6,28 (м, 3H), 6,16 (дд, J=1,5, 9,9 Гц, 1H), 5,93 (с, 1H), 5,39 (с, 1H), 5,08 (т, J=5,7 Гц, 1H), 4,98-4,87 (м, 3H), 4,78 (д, J=3,1 Гц, 1H), 4,49 (дд, J=6,2, 19,4 Гц, 1H), 4,29 (ш. с, 1H), 4,17 (дд, J=5,5, 19,6 Гц, 1H), 3,74 (с, 2H), 2,61-2,53 (м, 1H), 2,36-2,26 (м, 1H), 2,11 (д, J=11,0 Гц, 1H), 2,07 (с, 1H), 2,02 (д, J=12,8 Гц, 1H), 1,83-1,54 (м, 5H), 1,39 (с, 3H), 1,16-0,96 (м, 2H), 0,85 (с, 3H). РХМС (Методика а, Таблиця 4) R_t=2,365 хв.; m/z=570,2 (M+H)⁺.

Приклад 3: Синтез (6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-10-(4-(3-амінобензил)феніл)-6b-флуоро-7-гідрокси-8b-(2-гідроксиацетил)-6a, 8a-диметил-1,2,6a, 6b, 7,8,8a, 8b, 11a, 12,12a, 12b-додекагідро-4H-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-4-ону.

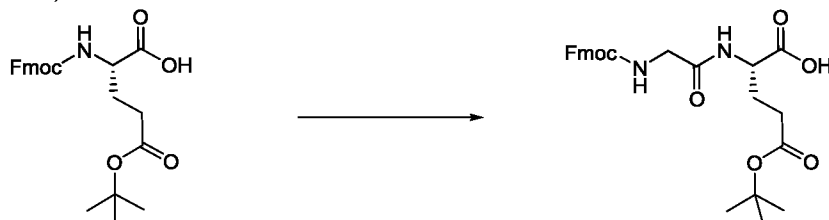


Приклад 3 був синтезований за методикою, аналогічною Прикладу 1, використовуючи (8S, 9R, 10S, 11S, 13S, 14S, 16R, 17S)-9-флуоро-11,16,17-тригідрокси-17-(2-гідроксиацетил)-10,13-диметил-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-додекагідро-3H-циклопента[а]фенантрен-3-он.

¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆) δ 7,37-7,26 (м, 3H), 7,21 (д, J=7,9 Гц, 2H), 6,89 (т, J=7,7 Гц, 1H), 6,43-6,30 (м, 3H), 6,23 (д, J=10,1 Гц, 1H), 6,04 (с, 1H), 5,75 (с, 1H), 5,44 (с, 2H), 5,09 (т, J=5,7 Гц, 1H), 4,93 (ш. с, 3H), 4,50 (дд, J=6,2, 19,4 Гц, 1H), 4,28-4,09 (м, 2H), 3,74 (с, 2H), 2,73-2,54 (м, 2H), 2,35 (д, J=13,2 Гц, 1H), 2,25-2,12 (м, 1H), 2,05 (д, J=15,0 Гц, 1H), 1,92-1,77 (м, 1H), 1,74-1,58 (м, 3H), 1,50 (с, 3H), 1,45-1,30 (м, 1H), 0,87 (с, 3H). РХМС (Методика а, Таблиця 4) R_t=2,68 хв.; m/z=588,1 (M+H)⁺.

Приклад 4: Синтез (S)-4-(2-(2-бромацетамідо)ацетамідо)-5-((3-(4-((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-7-гідрокси-6a, 8a-диметил-4-оксо-8b-(2-(фосфонокси)ацетил)-2,4,6a, 6b, 7,8,8a, 8b, 11a, 12,12a, 12b-додекагідро-1H-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-10-іл)бензил)феніл)аміно)-5-оксопентанової кислоти

Стадія 1: Синтез (S)-2-(2-(((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)аміно)ацетамідо)-5-(трет-бутоксид)-5-оксопентанової кислоти.

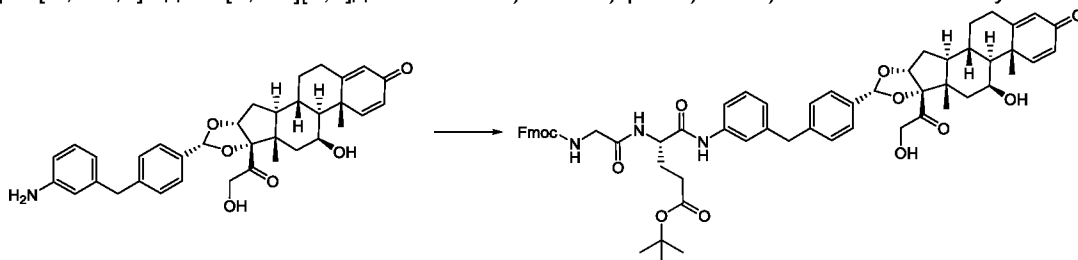


Суміш 2-хлоротритилхлоридної смоли (30 г, 92 ммоль), триетиламіну (46,4 г, 458 ммоль) та (S)-2-(((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)аміно)-5-(трет-бутоксид)-5-оксопентанової кислоти (25,5 г, 60 ммоль) у сухому ДХМ (200 мл) продували N₂ при 20 °С протягом 8 годин. Суміш фільтрували, і смолу промивали ДХМ (2 × 200 мл), MeOH (2 × 200 мл) і ДМФА (2 × 200 мл). До смоли додавали розчин піперидин:ДМФА (1:4, 400 мл), і суміш продували N₂ протягом 8 хвилин, а потім фільтрували. Цю операцію повторювали п'ять разів для повного видалення захисної групи Fmoc. Вказану смолу промивали ДМФА (5 × 500 мл), щоб отримати зв'язану зі смолою (S)-2-аміно-5-(трет-бутоксид)-5-оксопентанову кислоту. Суміш 2-(((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)аміно)оцтової кислоти (13,38 г, 45,0 ммоль), N, N-діізопропілетиламіну (7,86 мл, 45 ммоль), гідроксибензотриазолу (6,89 г, 45 ммоль), 2-(6-хлоро-1H-бензо[d][1,2,3]триазол-1-іл)-1,1,3,3-тетраметилізоуронію гексафлуорофосфату (V) (18,62 г, 45,0 ммоль) у ДМФА (200 мл) перемішували при 20 °С протягом 30 хв. До суміші додавали зв'язану зі смолою (S)-2-аміно-5-(трет-бутоксид)-5-оксопентанову кислоту, і отриману суміш продували N₂ при 25 °С протягом 1,5 годин. Суміш фільтрували, і смолу промивали ДМФА (4 × 500 мл) і ДХМ (2 × 500 мл). До суміші додавали 1% ТФК/ДХМ (5 × 500 мл) і продували N₂ протягом 5 хвилин. Суміш фільтрували, і фільтрат безпосередньо додавали до насиченого розчину NaHCO₃ (200 мл). Об'єднану суміш відокремлювали, та органічну фазу промивали насиченим водним розчином лимонної кислоти (4 × 400 мл) та насиченим водним розчином хлориду натрію (2 × 300 мл). Фінальний органічний розчин сушили над Na₂SO₄ (20 г), фільтрували, концентрували при зниженому тиску, щоб отримати цільову сполуку (10 г, вихід 20%) у вигляді світло-жовтої твердої речовини.

¹H ЯМР: (CDCl₃, 400 МГц) δ = 7,75 (д, J=7,5 Гц, 2H), 7,59 (ш. д, J=7,5 Гц, 2H), 7,41-7,36 (м,

2H), 7,30 (т, J=7,0 Гц, 2H), 5,82 (ш. с, 1H), 4,57 (ш. д, J=4,8 Гц, 1H), 4,38 (ш. д, J=7,5 Гц, 2H), 4,27-4,15 (м, 1H), 4,06-3,83 (м, 2H), 2,50-2,29 (м, 2H), 2,26-2,13 (м, 1H), 2,06-2,02 (м, 1H), 1,43 (с, 9H).

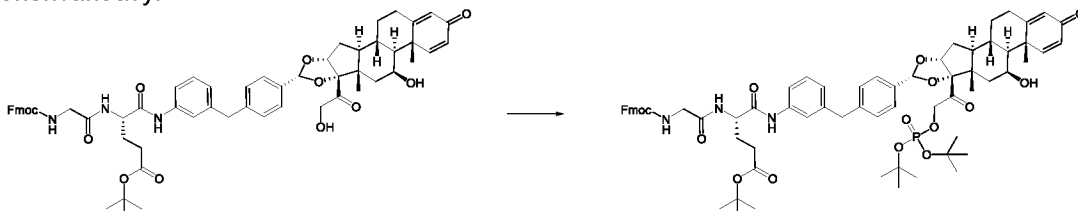
5 Стадія 2: Синтез трет-бутил-(S)-4-(2-(((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)аміно)ацетамідо)-5-((3-(4-(((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-7-гідрокси-8b-(2-гідроксиацетил)-6a, 8a-диметил-4-оксо-2,4,6a, 6b, 7,8,8a, 8b, 11a, 12,12a, 12b-додекагідро-1H-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-10-іл)бензил)феніл)аміно)-5-оксопентаноату



10 До розчину (S)-2-(2-(((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)аміно)ацетамідо)-5-(трет-бутоксі)-5-оксопентанової кислоти (Приклад 4, стадія 1) (424 мг, 0,878 ммоль) у ДМФА (3,5 мл) додавали (6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-10-(4-(3-амінобензил)феніл)-7-гідрокси-8b-(2-гідроксиацетил)-6a, 8a-диметил-1,2,6a, 6b, 7,8,8a, 8b, 11a, 12,12a, 12b-додекагідро-4H-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-4-он (Приклад 2) (500 мг, 0,878 ммоль) і триетиламін (0,3 мл, 2,63 ммоль) при 25 °С. Розчин охолоджували до 0 °С, а потім додавали 2,4,6-трипропіл-1,3,5,2,4,6-триоксатрифосфінан-2,4,6-триоксид (1,12 г, 1,755 ммоль). Реакційну суміш перемішували протягом 12 годин при 25 °С. РХМС показала, що реакція завершена. Чотирнадцять додаткових флаконів були підготовлені, як описано вище. Всі п'ятнадцять реакційних сумішей об'єднували. Суміш очищали на колонці з оберненою фазою, щоб отримати цільову сполуку (5 г, вихід 38,4 %) у вигляді жовтої твердої речовини. Методика для колонки з оберненою фазою: прилад: Shimadzu LC-8A для препаративної ВЕРХ; колонка: Phenomenex Luna C18, 200*40 мм*10 мкм; рухома фаза: А позначає Н₂О (0,05 % ТФК), і В позначає MeCN; градієнт: В від 30 % до 100 % за 30 хв.; швидкість потоку: 60 мл/хв.; довжина хвилі: 220 та 254 нм.

РХМС (Методика а, Таблиця 4) R_t=1,34 хв.; m/z 1016,6 (M+H)⁺.

25 Стадія 3: Синтез трет-бутил-(S)-4-(2-(((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)аміно)ацетамідо)-5-((3-(4-(((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-8b-(2-((ди-трет-бутоксифосфорил)окси)ацетил)-7-гідрокси-6a, 8a-диметил-4-оксо-2,4,6a, 6b, 7,8,8a, 8b, 11a, 12,12a, 12b-додекагідро-1H-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-10-іл)бензил)феніл)аміно)-5-оксопентаноату.

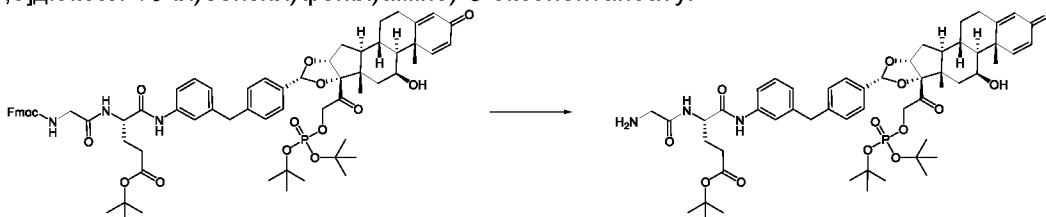


30 До розчину трет-бутил-(S)-4-(2-(((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)аміно)ацетамідо)-5-((3-(4-(((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-7-гідрокси-8b-(2-гідроксиацетил)-6a, 8a-диметил-4-оксо-2,4,6a, 6b, 7,8,8a, 8b, 11a, 12,12a, 12b-додекагідро-1H-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-10-іл)бензил)феніл)аміно)-5-оксопентаноату (Приклад 4, стадія 2) (400 мг, 0,387 ммоль) у ДМФА (2,5 мл) додавали 1H-тетразол (271 мг, 3,87 ммоль) і ди-трет-бутилдіетилфосфорамідит (1,16 г, 4,64 ммоль). Реакційну суміш перемішували при к.т. протягом 2,5 годин, потім охолоджували до 0 °С. До отриманої суміші додавали перексид гідрогену (241 мг, 2,127 ммоль), давали нагрітися до к.т. та перемішували протягом 1 години, після чого РХМС показала, що реакція завершена. Одинадцять додаткових флаконів були підготовлені, як описано вище. Усі дванадцять реакційних сумішей об'єднували. Суміш очищали на колонці з оберненою фазою, щоб отримати цільову сполуку (4,4 г, вихід 64,2 %) у вигляді жовтої твердої речовини. Методика для колонки з оберненою фазою: прилад: Shimadzu LC-8A для препаративної ВЕРХ; колонка: Phenomenex Luna C18, 200*40 мм*10 мкм; рухома фаза: А позначає Н₂О, і В позначає MeCN; градієнт: В від 50 % до 100 % за 30 хв.; швидкість потоку: 60 мл/хв.; довжина хвилі: 220 та 254 нм.

45 РХМС (Методика а, Таблиця 4) R_t=1,41 хв.; m/z 1226,7 (M+H)⁺.

Стадія 4: Синтез трет-бутил-(S)-4-(2-аміноацетамідо)-5-((3-(4-(((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-8b-(2-((ди-трет-бутоксифосфорил)окси)ацетил)-7-гідрокси-6a, 8a-диметил-4-

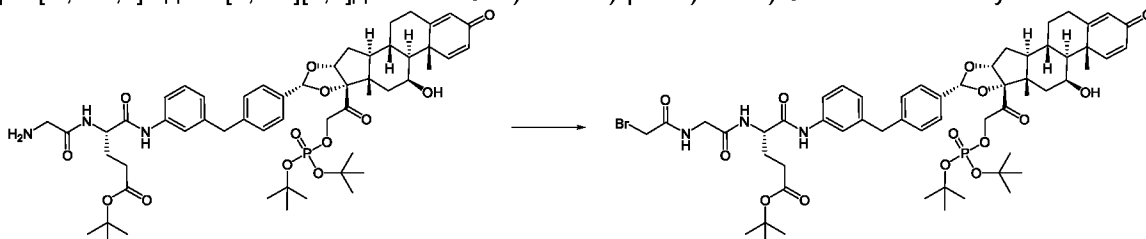
оксо-2,4,6а, 6b, 7,8,8а, 8b, 11а, 12,12а, 12b-додекагідро-1H-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-10-іл)бензил)феніл)аміно)-5-оксопентаноату.



5 До розчину трет-бутил-(S)-4-(2-(((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)аміно)ацетамідо)-5-((3-(4-((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-8b-(2-((ди-трет-бутоксифосфорил)окси)ацетил)-7-гідрокси-6а, 8а-диметил-4-оксо-2,4,6а, 6b, 7,8,8а, 8b, 11а, 12,12а, 12b-додекагідро-1H-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-10-іл)бензил)феніл)аміно)-5-оксопентаноату (Приклад 4, Стадія 3) (1,1 г, 0,897 ммоль) у MeCN (6 мл) додавали піперидин (0,75 мл, 7,58 ммоль) при 25 °С. Реакційну суміш перемішували при к.т. протягом 20 хвилин, після чого РХМС показала, що реакція завершена. Три додаткові флакони були підготовлені, як описано вище. Всі чотири реакційні суміші об'єднували. Суміш концентрували, щоб отримати залишок, який обробляли ПЕ (10 мл) при перемішуванні протягом 2 годин. Отриману тверду речовину збирали фільтруванням і сушили при зниженому тиску, щоб отримати цільову сполуку (3,8 г, вихід 90 %) у вигляді жовтої твердої речовини.

15 РХМС (Методика а, Таблиця 4) $R_t=1,16$ хв.; m/z 1004,6 (M+H)⁺.

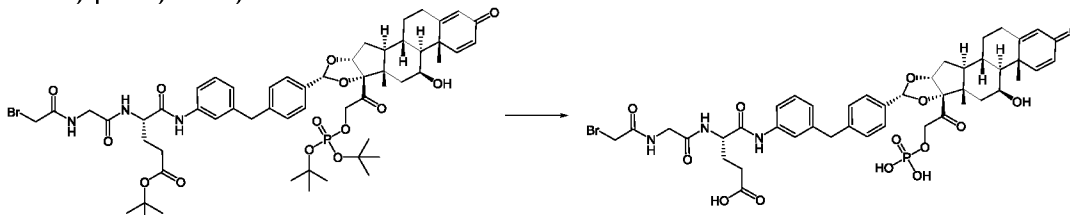
Стадія 5: Синтез трет-бутил-(S)-4-(2-(2-бромацетамідо)ацетамідо)-5-((3-(4-((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-8b-(2-((ди-трет-бутоксифосфорил)окси)ацетил)-7-гідрокси-6а, 8а-диметил-4-оксо-2,4,6а, 6b, 7,8,8а, 8b, 11а, 12,12а, 12b-додекагідро-1H-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-10-іл)бензил)феніл)аміно)-5-оксопентаноату.



20 До розчину 2-бromoцтової кислоти (97 мг, 0,697 ммоль) у ДМФА (2,5 мл) додавали EEDQ (172 мг, 0,697 ммоль) при к.т. Суміш перемішували при кімнатній температурі протягом 1 години. Додавали трет-бутил-(S)-4-(2-аміноацетамідо)-5-((3-(4-((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-8b-(2-((ди-трет-бутоксифосфорил)окси)ацетил)-7-гідрокси-6а, 8а-диметил-4-оксо-2,4,6а, 6b, 7,8,8а, 8b, 11а, 12,12а, 12b-додекагідро-1H-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-10-іл)бензил)феніл)аміно)-5-оксопентаноат (Приклад 4, Стадія 4) (350 мг, 0,349 ммоль), та отриманий розчин перемішували протягом 2,5 годин, після чого РХМС показала, що реакція завершена. Сім додаткових флаконів були підготовлені, як описано вище. Всі вісім реакційних сумішей об'єднували. Реакційну суміш розбавляли ДХМ (100 мл), промивали водним розчином HBr (1 M, 2 × 80 мл), водним розчином NaHCO₃ (60 мл) і насиченим водним розчином хлориду натрію (60 мл). Органічний шар сушили над Na₂SO₄, фільтрували і концентрували при зниженому тиску, щоб отримати цільову сполуку (2 г, вихід 63,7 %) у вигляді жовтого масла.

30 РХМС (Методика а, Таблиця 4) $R_t=1,30$ хв.; m/z 1124,2, 1125,9 (M+H)⁺.

35 Стадія 6: Синтез (S)-4-(2-(2-бромацетамідо)ацетамідо)-5-((3-(4-((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-7-гідрокси-6а, 8а-диметил-4-оксо-8b-(2-(фосфонокси)ацетил)-2,4,6а, 6b, 7,8,8а, 8b, 11а, 12,12а, 12b-додекагідро-1H-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-10-іл)бензил)феніл)аміно)-5-оксопентанової кислоти



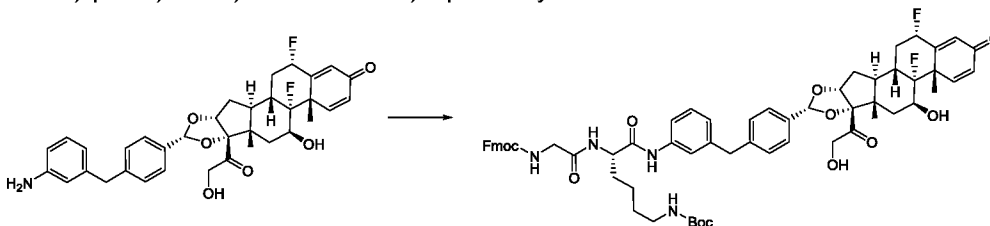
40 До розчину трет-бутил-(S)-4-(2-(2-бромацетамідо)ацетамідо)-5-((3-(4-((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-8b-(2-((ди-трет-бутоксифосфорил)окси)ацетил)-7-гідрокси-6а, 8а-диметил-4-оксо-2,4,6а, 6b, 7,8,8а, 8b, 11а, 12,12а, 12b-додекагідро-1H-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-

d][1,3]діоксол-10-іл)бензил)феніл)аміно)-5-оксопентаноату (Приклад 4, Стадія 5) (2 г, 1,778 ммоль) у ДХМ (16 мл) додавали ТФК (8 мл, 104 ммоль), та отриману суміш перемішували при к.т. протягом 40 хвилин, після чого РХМС показала, що реакція завершена. Розчинник видаляли при зниженому тиску. Отриманий залишок очищали за допомогою препаративної ВЕРХ. Рухому фазу безпосередньо ліофілізували, щоб отримати цільову сполуку (640 мг, вихід 35,3 %) у вигляді жовтої твердої речовини. Методика препаративної ВЕРХ: прилад: Shimadzu LC-8A для препаративної ВЕРХ; колонка: Phenomenex Luna C18, 200*40 мм*10 мкм; рухома фаза: А позначає H₂O (0,09 % ТФК), і В позначає MeCN; градієнт: В від 30 % до 40 % за 20 хв.; швидкість потоку: 60 мл/хв.; довжина хвилі: 220 та 254 нм.

¹H ЯМР (ДМСО-d₆, 400 МГц) δ = 9,88 (с, 1H), 8,52 (с, 1H), 8,24 (ш. д, J=8,4 Гц, 1H), 7,46 (ш. д, J=7,9 Гц, 1H), 7,42 (с, 1H), 7,36 (ш. д, J=7,9 Гц, 2H), 7,30 (ш. д, J=9,7 Гц, 1H), 7,23-7,17 (м, 3H), 6,90 (ш. д, J=6,8 Гц, 1H), 6,16 (ш. д, J=10,4 Гц, 1H), 5,93 (с, 1H), 5,47 (с, 1H), 4,96-4,85 (м, 3H), 4,58 (ш. дд, J=7,9, 18,7 Гц, 1H), 4,38 (ш. д, J=5,3 Гц, 1H), 4,29 (ш. с, 1H), 3,93 (с, 2H), 3,89 (с, 2H), 3,80 (ш. с, 2H), 2,30-2,22 (м, 2H), 2,16-1,91 (м, 4H), 1,85-1,62 (м, 6H), 1,39 (с, 3H), 1,00 (ш. с, 2H), 0,87 (с, 3H). РХМС (Методика а, Таблиця 4) R_t=2,86 хв.; m/z 956,0, 958,0 (M+H)⁺.

Приклад 5: Синтез 2-((2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-10-(4-(3-((S)-6-аміно-2-(2-(2-бромацетамідо)ацетамідо)гексанамідо)бензил)феніл)-2,6b-дифлуоро-7-гідрокси-6a, 8a-диметил-4-оксо-1,2,4,6a, 6b, 7,8,8a, 11a, 12,12a, 12b-додекагідро-8bH-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-8b-іл)-2-оксоетилдигідрогену фосфату.

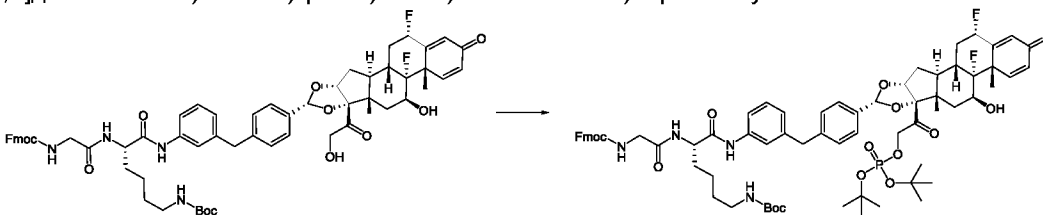
Стадія 1: Синтез трет-бутил-((S)-5-(2-(((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)аміно)ацетамідо)-6-((3-(4-((2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-2,6b-дифлуоро-7-гідрокси-8b-(2-гідроксиацетил)-6a, 8a-диметил-4-оксо-2,4,6a, 6b, 7,8,8a, 8b, 11a, 12,12a, 12b-додекагідро-1H-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-10-іл)бензил)феніл)аміно)-6-оксогексил)карбамату.



До розчину N²-(((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)гліцил)-N6-(трет-бутоксикарбоніл)-L-лізину (5,58 г, 8,26 ммоль) у ДМФА (60 мл) при 0 °С додавали 2,4,6-трипропіл-1,3,5,2,4,6-триоксатрифосфінан-2,4,6-триоксид (10,51 г, 16,51 ммоль) і триетиламін (3,45 мл, 24,77 ммоль). Отриману суміш перемішували при к.т. протягом 1 години, додавали (2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-10-(4-(3-амінобензил)феніл)-2,6b-дифлуоро-7-гідрокси-8b-(2-гідроксиацетил)-6a, 8a-диметил-1,2,6a, 6b, 7,8,8a, 8b, 11a, 12,12a, 12b-додекагідро-4H-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-4-он (Приклад 1, Стадія 6) (5 г, 8,26 ммоль). Отриману суміш перемішували протягом 5 годин при к.т., після чого РХМС показала, що реакція завершена. Було підготовлено шість додаткових флаконів, як описано вище. Всі сім реакційних сумішей об'єднували. Реакційну суміш очищали на колонці з оберненою фазою, щоб отримати цільову сполуку (24 г, вихід 24,62 %) у вигляді білої твердої речовини. Методика для колонки з оберненою фазою: прилад: Shimadzu LC-8A для препаративної ВЕРХ; колонка: Phenomenex Luna C18, 200*40 мм*10 мкм; рухома фаза: А позначає H₂O (0,05 % ТФК), і В позначає MeCN; градієнт: В від 30 % до 100 % за 30 хв.; швидкість потоку: 60 мл/хв.; довжина хвилі: 220 та 254 нм.

РХМС (Методика а, Таблиця 4) R_t=1,29 хв.; m/z 1095,6 (M+H-18)⁺.

Стадія 2: Синтез трет-бутил-((S)-5-(2-(((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)аміно)ацетамідо)-6-((3-(4-((2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-8b-(2-((ді-трет-бутоксифосфорил)окси)ацетил)-2,6b-дифлуоро-7-гідрокси-6a, 8a-диметил-4-оксо-2,4,6a, 6b, 7,8,8a, 8b, 11a, 12,12a, 12b-додекагідро-1H-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-10-іл)бензил)феніл)аміно)-6-оксогексил)карбамату.

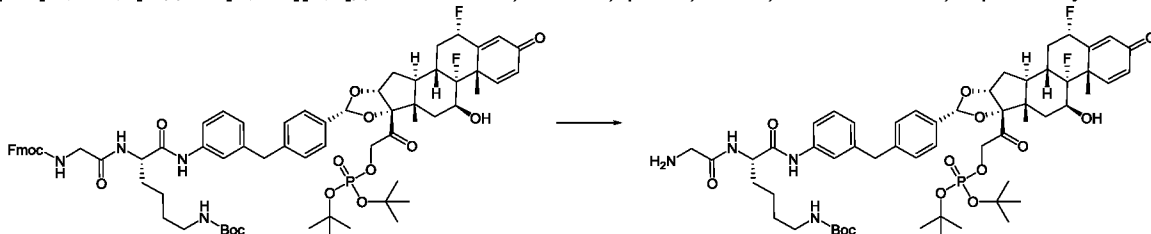


До розчину трет-бутил-((S)-5-(2-(((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)аміно)ацетамідо)-6-

((3-(4-((2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-2,6b-дифлуоро-7-гідрокси-8b-(2-гідроксиацетил)-6а, 8а-диметил-4-оксо-2,4,6а, 6b, 7,8,8а, 8b, 11а, 12,12а, 12b-додекагідро-1H-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-10-іл)бензил)феніл)аміно)-6-оксогексил)карбамату (Приклад 5, Стадія 1) (3 г, 2,69 ммоль) у ДМФА (30 мл) додавали 1H-тетразол (1,888 г, 26,9 ммоль) і ди-трет-бутилдіетилфосфорамідит (8,06 г, 32,3 ммоль), та реакційну суміш перемішували при к.т. протягом 3,5 годин. До реакційної суміші додавали пероксид гідрогену (224 мг, 1,97 ммоль) і перемішували 0,5 години, після чого РХМС показала, що реакція завершена. Було підготовлено шість додаткових флаконів, як описано вище. Всі сім реакційних сумішей об'єднували. Реакційну суміш очищали на колонці з оберненою фазою, щоб отримати цільову сполуку (10 г, чистота: 78 %, вихід 37,1 %) у вигляді білої твердої речовини. Методика для колонки з оберненою фазою: прилад: Shimadzu LC-8A для препаративної ВЕРХ; колонка: Phenomenex Luna C18, 200*40 мм*10 мкм; рухома фаза: А позначає H₂O, і В позначає MeCN; градієнт: В від 50 % до 100 % за 30 хв.; швидкість потоку: 60 мл/хв.; довжина хвилі: 220 та 254 нм.

РХМС (Методика а, Таблиця 4) R_t=1,42 хв.; m/z 1305,7 (M+H)⁺.

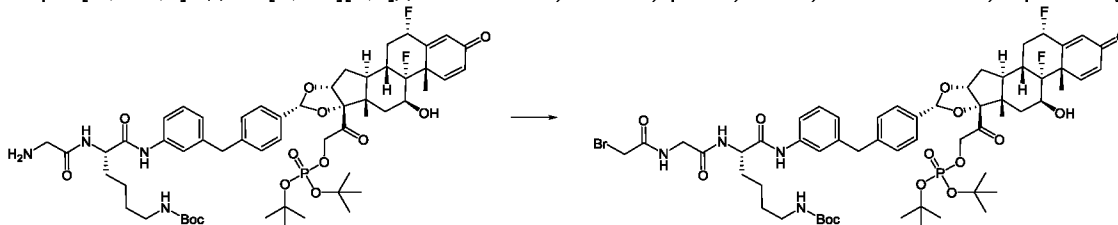
Стадія 3: Синтез трет-бутил-((S)-5-(2-аміноацетамідо)-6-((3-(4-((2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-8b-(2-((ди-трет-бутоксифосфорил)окси)ацетил)-2,6b-дифлуоро-7-гідрокси-6а, 8а-диметил-4-оксо-2,4,6а, 6b, 7,8,8а, 8b, 11а, 12,12а, 12b-додекагідро-1H-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-10-іл)бензил)феніл)аміно)-6-оксогексил)карбамату.



До розчину трет-бутил-((S)-5-(2-(((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)аміно)ацетамідо)-6-((3-(4-((2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-8b-(2-((ди-трет-бутоксифосфорил)окси)ацетил)-2,6b-дифлуоро-7-гідрокси-6а, 8а-диметил-4-оксо-2,4,6а, 6b, 7,8,8а, 8b, 11а, 12,12а, 12b-додекагідро-1H-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-10-іл)бензил)феніл)аміно)-6-оксогексил)карбамату (Приклад 5, Стадія 2) (2,5 г, 1,969 ммоль) в MeCN (10 мл) додавали піперидин (2 мл, 1,969 ммоль), і реакційну суміш перемішували при к. т. протягом 1 години, після чого РХМС показала, що реакція завершена. Три додаткові флакони були підготовлені, як описано вище. Всі чотири реакційні суміші об'єднували. Реакційну суміш концентрували, щоб отримати неочищений продукт, який перемішували у ПЕ (30 мл) протягом 2 годин. Отриману тверду речовину збирали фільтруванням і сушили при зниженому тиску, щоб отримати цільову сполуку (7 г, чистота: 83 %, вихід 70,4 %) у вигляді жовтої твердої речовини.

РХМС (Методика а, Таблиця 4) R_t=1,17 хв.; m/z 1083,5 (M+H)⁺.

Стадія 4: Синтез трет-бутил-((S)-5-(2-(2-бромацетамідо)ацетамідо)-6-((3-(4-((2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-8b-(2-((ди-трет-бутоксифосфорил)окси)ацетил)-2,6b-дифлуоро-7-гідрокси-6а, 8а-диметил-4-оксо-2,4,6а, 6b, 7,8,8а, 8b, 11а, 12,12а, 12b-додекагідро-1H-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-10-іл)бензил)феніл)аміно)-6-оксогексил)карбамату.

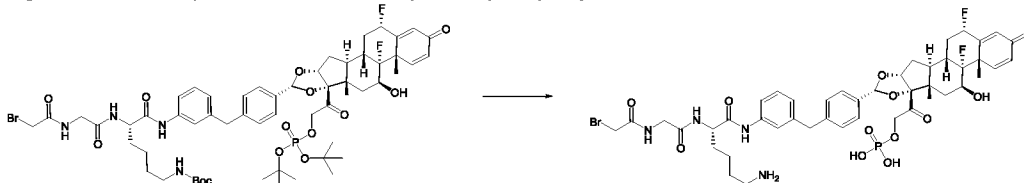


До розчину 2-бromoцтової кислоти (0,929 г, 6,68 ммоль) у ДМФА (35 мл) додавали 2-етокси-1-етоксикарбоніл-1,2-дигідрохінолін (1,653 г, 6,68 ммоль), і отриману суміш перемішували при к.т. протягом 1 години. Додавали продукт з Прикладу 5, Стадія 3 (3,5 г, 3,34 ммоль), і отриману суміш перемішували при к. т. протягом 2 годин. РХМС показала, що реакція завершена. Реакційну суміш розбавляли ДХМ (100 мл), промивали водним розчином HBr (1 M, 2 × 80 мл), водним розчином NaHCO₃ (60 мл) і насиченим водним розчином хлориду натрію (60 мл). Органічний шар сушили над Na₂SO₄, фільтрували і концентрували при зниженому тиску, щоб отримати цільову сполуку (2 г, вихід 51,2 %) у вигляді жовтого масла.

РХМС (Методика а, Таблиця 4) R_t=1,32 хв.; m/z 1205,5 (M+H)⁺.

Стадія 5: Синтез 2-((2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-10-(4-(3-((S)-6-аміно-

2-(2-(2-бромацетамідо)ацетамідо)гексанамідо)бензил)феніл)-2,6b-дифлуоро-7-гідрокси-6a, 8a-диметил-4-оксо-1,2,4,6a, 6b, 7,8,8a, 11a, 12,12a, 12b-додекагідро-8bH-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-8b-іл)-2-оксоетилдигідрогенфосфату.

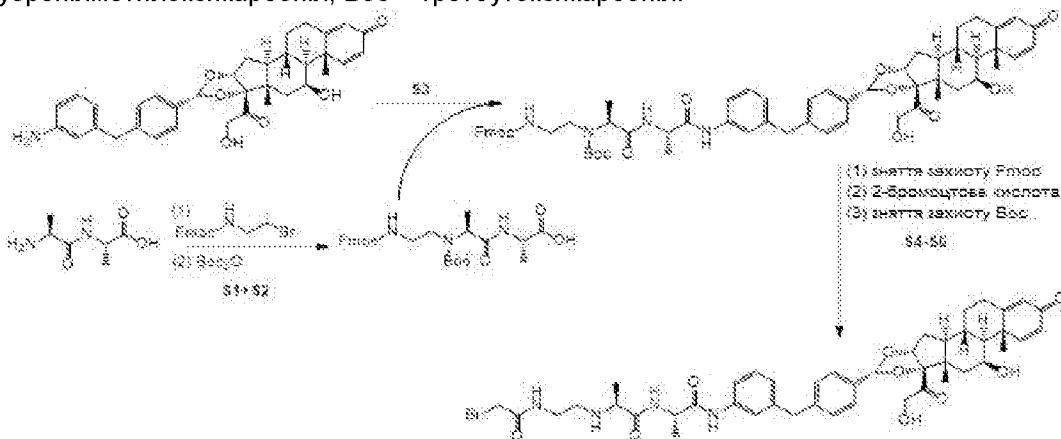


5 До розчину трет-бутил-((S)-5-(2-аміноацетамідо)-6-((3-(4-((2S, 6aS, 6bR, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-8b-(2-((ди-трет-бутоксифосфорил)окси)ацетил)-2,6b-дифлуоро-7-гідрокси-6a, 8a-диметил-4-оксо-2,4,6a, 6b, 7,8,8a, 8b, 11a, 12,12a, 12b-додекагідро-1H-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-10-іл)бензил)феніл)аміно)-6-оксогексил)карбамату (Приклад 5, Стадія 3) (2 г, 1,661 ммоль) у ДХМ (10 мл) додавали ТФК (5 мл, 64,9 ммоль), і
10 реакційну суміш перемішували при к.т. протягом 40 хв., після чого РХМС показала, що реакція завершена. Розчинник видаляли при зниженому тиску, і неочищений продукт очищали за допомогою препаративної ВЕРХ. Рухому фазу безпосередньо ліофілізували, щоб отримати цільову сполучу (550 мг, чистота: 96,9 %, вихід 32,3 %) у вигляді жовтувато-білої твердої речовини. Методика препаративної ВЕРХ: прилад: Shimadzu LC-8A для препаративної ВЕРХ;
15 колонка: Phenomenex Luna C18, 200*40 мм*10 мкм; рухома фаза: А позначає H₂O (0,09 % ТФК), і В позначає MeCN; градієнт: В від 30 % до 40 % за 20 хв.; швидкість потоку: 60 мл/хв.; довжина хвилі: 220 та 254 нм.

¹H ЯМР: (DMCO-d₆, 400 МГц) δ м.д. 0,90 (с, 3H) 1,19-1,41 (м, 2H) 1,43-1,62 (м, 7 H) 1,64-1,77 (м, 3 H) 1,84 (ш. д, J=14,55 Гц, 1 H) 1,95-2,07 (м, 1 H) 2,18-2,36 (м, 3 H) 2,65-2,78 (м, 3 H) 3,71-3,86 (м, 3 H) 3,89 (с, 2 H) 3,93 (с, 2 H) 4,20 (ш. д, J=9,48 Гц, 1 H) 4,33-4,41 (м, 1 H) 4,59 (ш. дд, J=18,41, 8,05 Гц, 1 H) 4,81 (ш. дд, J=18,52, 8,60 Гц, 1 H) 4,94 (д, J=4,63 Гц, 1 H) 5,50 (с, 1 H) 5,54-5,76 (м, 1 H) 6,13 (с, 1 H) 6,29 (дд, J=10,14, 1,32 Гц, 1 H) 6,95 (д, J=7,72 Гц, 1 H) 7,15-7,28 (м, 4 H) 7,30-7,41 (м, 3 H) 7,51 (ш. д, J=7,94 Гц, 1 H) 7,72 (ш. с, 3 H) 8,21 (ш. д, J=7,72 Гц, 1 H) 8,54 (т, J=5,62 Гц, 1 H) 9,93 (ш. д, J=2,65 Гц, 1 H). РХМС (методика а, Таблиця 4) R_t=2,31 хв.

25 Приклад 6: Синтез (S)-2-((2-(2-бромацетамідо)етил)аміно)-N-((S)-1-((3-(4-((6aR, 6bS, 7S, 8aS, 8bS, 10R, 11aR, 12aS, 12bS)-7-гідрокси-8b-(2-гідроксиацетил)-6a, 8a-диметил-4-оксо-2,4,6a, 6b, 7,8,8a, 8b, 11a, 12,12a, 12b-додекагідро-1H-нафто[2',1':4,5]індено[1,2-d][1,3]діоксол-10-іл)бензил)феніл)аміно)-1-оксопропан-2-іл)пропанаміду.

30 Продукт Прикладу 6 може бути синтезований за допомогою сполучення N-(2-(((9H-флуорен-9-іл)метокси)карбоніл)аміно)етил)-N-(трет-бутоксикарбоніл)-L-аланіл-L-аланіну (продукт стадій S1 і S2 нижче) з амінопродуктом Прикладу 2 з наступними стадіями S4-S6: (1) зняття захисту Fmoc, (2) сполучення з 2-бромцетовою кислотою і (3) зняття захисту Boc. Fmoc = флуоренілметилоксикарбоніл; Boc = третбутоксикарбоніл.



35 Загальний протокол кон'югації цистеїну

40 Розчину бажаного антитіла з концентрацією приблизно 5-20 мг/мл готували у буферному розчині ФСБ, pH 6-7,4. Вибраний відновлювальний агент, такий як ТСЕР, розбавляли або розчиняли у таких розчинниках, як H₂O, ДМСО, ДМА або ДМФА, отримуючи розчин з діапазоном концентрацій від 1 до 25 мМ. Потім антитіла (hlgG1 проти hФНП (D2E7) або mlgG2a проти mФНП (8C11; McRae BL et al. J Crohns Colitis 10 (1): 69-76 (2016))) частково відновлювали, додаючи приблизно 2-3,5 еквіваленти відновлюючого агента, недовго перемішуючи та інкубуючи протягом ночі при 0 – 4 °С. Потім додавали буферний розчин Трис, pH 8-8,5 (20-50

мМ), після чого лінкер-лікарський засіб у ДМСО або ДМА (менше 15 % загалом), і суміш інкубували протягом 2-3 годин при к.т. Потім надлишок лінкер-лікарського засобу та органічного розчиннику видаляли очищенням. Очищені зразки ADC потім аналізували за допомогою SEC, НІС та мас-спектрометрії зі зменшенням заряду.

5 Аналітичні методики для ADC

ADC піддавали або аніонообмінній хроматографії (АЕС), або хроматографії з гідрофобними взаємодіями (НІС) для визначення ступеня кон'югації та чистоти ADC.

10 АЕС. Приблизно 20 мкг ADC було завантажено у систему для PX Ultimate 3000 Dual (Thermo Scientific), оснащену колонкою ProPac™ WAX-10, 4 × 250 мм (Tosoh Bioscience, № кат. 054999). Колонку врівноважували 100 % буферним розчином А та елюювали за допомогою лінійного градієнта від 100 % буферного розчину А до 100 % буферного розчину В протягом 18 хв. при 1,0 мл/хв., при цьому буферний розчин А являє собою 20 мМ MES, рН 6,7, та буферний розчин В являє собою 20 мМ MES, 500 хлориду натрію, рН 6,7.

15 НІС. Приблизно 20 мкг ADC завантажували у систему для PX Ultimate 3000 Dual (Thermo Scientific), оснащену колонкою бутіл-NPR, 4,6 × 35 мм (Tosoh Bioscience, № у кат. 14947). Колонку врівноважували у 100 % буферному розчині А та елюювали за допомогою лінійного градієнта від 100 % буферного розчину А до 100 % буферного розчину В протягом 12 хв. при 0,8 мл/хв., при цьому буферний розчин А являє собою 25 мМ фосфату натрію, 1,5 М сульфату амонію, рН 7,0, та буферний розчин В являє собою 25 мМ фосфату натрію, 25 % ізопропанолу, рН 7,0.

20 SEC. Розподіл ADC за розмірами був встановлений з використанням ексклюзивної SEC за допомогою системи для PX Ultimate 3000 Dual (Thermo Scientific), оснащеної колоною TSK-gel 3000SW_{XL}, 7,8 × 300 мм (Tosoh Bioscience, № у кат. 08541). Приблизно 20 мкг ADC завантажували у колонку та елюювали протягом 17 хв., використовуючи ізократичний градієнт 100 мМ сульфату натрію, 100 мМ фосфату натрію, рН 6,8 при швидкості потоку 1,0 мл/хв.

25 МС. Відновлені зразки (10 мкл) вводили в систему PX/МС Agilent 6550 QToF за допомогою автоматичного пробовідбирача з контрольованою температурою (5 °С) СТС. Елювання зразка здійснювали на колонці для ВЕРХ Waters С-4, 3,5 мкм, 300 Å, 2,1 × 50 мм внутрішній діаметр. Рухомі фази являли собою: А: 0,1 % мурашиної кислоти у воді, та В: 0,1 % мурашиної кислоти в MeCN; швидкість потоку становила 0,45 мл/хв., а відсік для колонок підтримували при 40 °С.

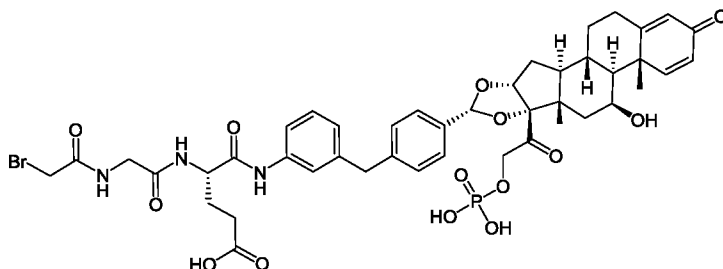
30 Градієнт ВЕРХ наведений у Таблиці 5:

Таблиця 5

Час (хв.)	А, %	В, %
0	95	5
0,6	95	5
1,1	10	90
2,2	10	90
2,4	95	5
3,5	95	5

35 Приклад 7: Отримання адаліумабу, кон'югованого з глюкокортикостероїдом, щоб забезпечити кон'югат антитіло-лікарський засіб

ADC адаліумабу та BrAc-Gly-Glu-стероїд-PO₄, що має популяцію DAR 4,0, отримували за двоступеневим хімічним процесом: відновлення дисульфідів адаліумабу з подальшим алкілюванням (кон'югацією) з бромацетамідо-гліцин-глутамінова кислота-стероїдом з Прикладу 4.



40

100 мг адаліумабу у концентрації 20 мг/мл відновлювали дифенілфосфіноцтовою кислотою (2,9-3,0 екв.) при 0 °С протягом ночі. Частково відновлений адаліумаб потім кон'югували з Прикладом 4 (10 екв.) у ДМСО протягом 3 годин при к.т. У суміші для кон'югації

перший буферний розчин замінювали на 20 мМ буферний розчин Трис, 50 мМ NaCl, рН 7,8 за допомогою декількох колонок для знесолення NAP 25. Знесолений розчин ADC очищали за допомогою АЕС, отримуючи компоненти ADC з DAR4. Методика для хроматографії АЕС: прилад: Akta pure; колонка: 2X Hitrap Q HP 5 мл; рухома фаза: А позначає 20 мМ буферний розчин Трис, рН 7,8; В позначає 20 мМ буферний розчин Трис, 1 М NaCl, рН 7,8; градієнт: В від 0 % до 25 % за 60 хв.; швидкість потоку: 5 мл/хв.; довжина хвилі: 280 та 214 нм.

Посилаючись на Фіг. 1, на якій показано хроматографічне розділення одержаного препарату ADC, ADC є гетерогенною сумішшю, що містить антитіла, до яких приєднані дві молекули лікарський засіб-лінкер (пік "DAR2"), приєднані чотири молекули лікарський засіб-лінкер (пік "DAR4") залежно від кількості відновлених міжланцюгових дисульфідних зв'язків. Умови АЕС, що використані на Фіг. 1, були наступними:

колонка являла собою Porac™ WAX-10, 4 × 250 мм (Thermo Fisher Scientific, № у кат. 054999), а температура колонки становила 37°C. Довжина хвилі становила 280 нм, час циклу становив 18 хвилин, введена кількість становила 20 мкг, а швидкість потоку становила 1,0 мл/хвилину. Рухома фаза А: 20 мМ MES, рН 6,7, рухома фаза В: 20 мМ MES, 500 мМ NaCl, рН 6,7. Градієнтний профіль (Таблиця 6).

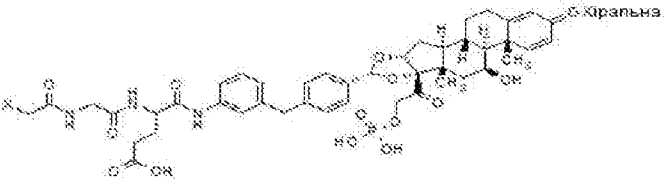
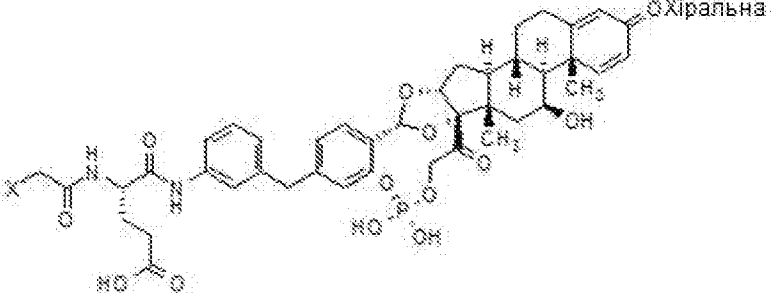
Таблиця 6

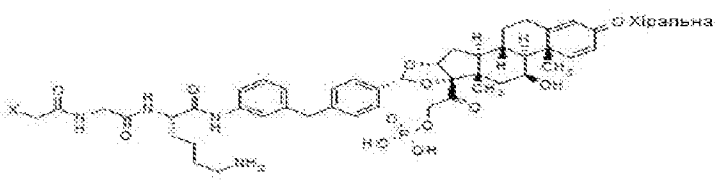
Час (хв)	Рухома фаза А (%)	Рухома фаза В (%)
0	75	25
14	5	95
16	0	100
18	0	100

На Фіг. 2 показаний мас-спектр очищеного ADC після деконволюції. Цей ADC має 4 молекули лікарський засіб-лінкер, кон'юговані з кожним антитілом. Пік зліва має молекулярну масу 24284,74 Да, що є результатом приєднання одного лікарський засіб-лінкера до одного легкого ланцюга. Пік справа має молекулярну масу 51513,96 Да, що є результатом приєднання одного лікарський засіб-лінкера до одного важкого ланцюга. ADC у 7 та 8 отримували відповідно до описаної вище методики.

Таблиця 7

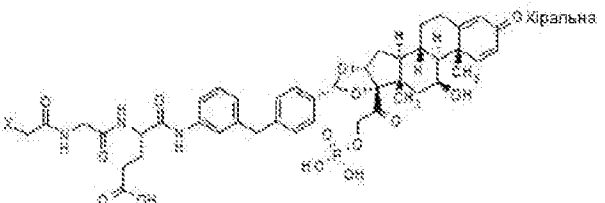
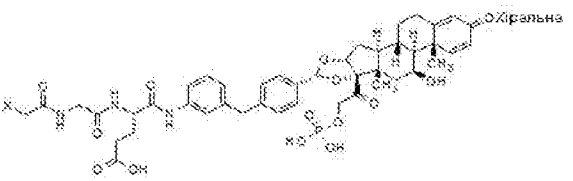
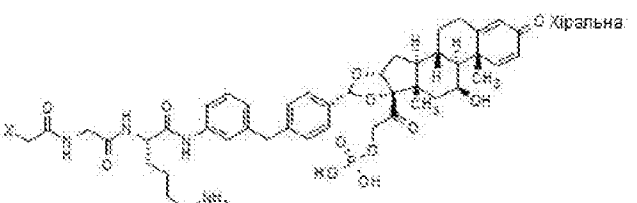
Кон'югати антитіло-лікарський засіб проти ФНПа миші. X стосується антитіла 8С11 проти ФНПа миші

Ідентифікаційний №	Структура	DAR
ADC1		4
ADC2		4

ADC3	 <p>The structure shows a complex molecule with a central steroid-like core (estrane skeleton) labeled 'Хіральна' (Chiral). It is linked via a linker to a chain of amino acid residues, which is further connected to a phenyl ring and another linker system.</p>	4
------	---	---

Таблиця 8

Кон'югати антитіло-лікарський засіб проти ФНПа людини.
X стосується адалімумабу проти ФНПа людини

Внутрішньоорганізаційний ідентифікаційний №	Структура	DAR
ADC4	 <p>The structure is similar to ADC3, featuring a chiral steroid core linked to a peptide chain and a phenyl group.</p>	4
ADC5	 <p>The structure is similar to ADC3, featuring a chiral steroid core linked to a peptide chain and a phenyl group.</p>	2
ADC6	 <p>The structure is similar to ADC3, featuring a chiral steroid core linked to a peptide chain and a phenyl group.</p>	4

Отримання клітинних ліній з репортером GRE, що містить трансмембранний ФНП-альфа людини та миші

- 5 Для того, щоб створити батьківську клітинну лінію, клітини K562 висівали на 6-лунковий планшет (Costar: 3516) з 2 мл повного живильного середовища (RPMI, 10 % ФБС, 1 % L-глутаміну, 1 % Na пірувату та 1 % MEM NEAA) у кількості 500000 клітин на лунку протягом 24 годин при 37°, 5 % CO₂. На наступний день 1,5 мкг рGL4.36 [Luc2P/MMTV/Hygro] (Promega: E316), 1,5 мкг рGI4.75 [hRLuc/CMV] (Promega: E639A) і 3 мкл реagentу PLUS (Invitrogen: 10964-021) розводили до 244 мкл з використанням Opti-MEM (Gibco: 31985-070) та інкубували при к.т. протягом 15 хвилин. Вектор рGL4.36 [Luc2P/MMTV/Hygro] містить MMTV LTR (довгий кінцевий

повтор вірусу пухлини молочної залози мишей), що запускає транскрипцію гена-репортера люциферази luc2P у відповідь на активацію кількох ядерних рецепторів, таких як рецептор глюкокортикоїдів та рецептор андрогенів. Вектор PGL4.75[hRLuc/CMV] кодує ген-репортер люциферази hRLuc (*Renilla reniformis*) і розроблений для високої експресії та зменшення аномальної транскрипції.

Після інкубації розведений розчин ДНК попередньо інкубували з використанням 1:1 розчину ліпофектаміну LTX (Invitrogen: 94756) (13,2 мкл + 256,8 мкл Opti-MEM) та інкубували при кімнатній температурі протягом 25 хвилин для утворення комплексів ДНК-ліпофектамін LTX. Після інкубації 500 мкл комплексів ДНК-ліпофектамін безпосередньо додавали у лунку, що містить клітини. Клітини K562 трансфікували протягом 24 годин при 37 °C, 5 % CO₂. Після інкубації клітини промивали 3 мл ФСБ і збирали з повним живильним середовищем, що містить 125 мкг/мл гіроміцину В (Invitrogen: 10687-010), протягом двох тижнів. Були отримані клітини "K562 pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro]_pGL4.75[hRLuc/CMV]».

Для того, щоб створити клітинну лінію з репортером GRE, що містить трансмембранний ФНП-альфа миші, батьківські клітини, K562 pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro]_pGL4.75[hRLuc/CMV], висівали на 6-лунковому планшеті (Costar: 3516) з 2 мл повного живильного середовища (RPMI, 10 % ФБС, 1 % L-глутаміну, 1 % Na пірувату та 1 % MEM NEAA) у кількості 500000 клітин на лунку протягом 24 год. при 37°, 5 % CO₂. На наступний день 3 мкг ДНК mFL_ФНПа (Origene: MC208048), яка кодує немічений ФНП миші, і 3 мкл реагенту PLUS (Invitrogen: 10964-021) розводили у 244 мкл Opti-MEM (Gibco: 31985-070) та інкубували при к.т. протягом 15 хвилин. Після інкубації розведений розчин ДНК попередньо інкубували з використанням 1:1 розчину ліпофектаміну LTX (Invitrogen: 94756) (13,2 мкл + 256,8 мкл Opti-MEM) та інкубували при к.т. протягом 25 хвилин для утворення комплексів ДНК-ліпофектамін LTX. Після інкубації 500 мкл комплексів ДНК-ліпофектамін безпосередньо додавали у лунку, що містить клітини. Батьківські клітини K562 pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro]_pGL4.75[hRLuc/CMV] трансфікували протягом 24 годин при 37 °C, 5 % CO₂. Після інкубації клітини промивали 3 мл ФСБ і збирали з повним живильним середовищем, що містить 125 мкг/мл гіроміцину В (Invitrogen: 10687-010) і 250 мкг/мл G418 (Gibco: 10131-027), протягом двох тижнів. Були отримані клітини "K562 мишачий FL-ФНПа GRE (pGL4.36[luc2P/MMTV/Hygro]»).

Для створення клітинної лінії з репортером GRE, що містить трансмембранний ФНП-альфа людини, батьківські клітини, K562 pGL4.36[Luc2P/MMTV/Hygro]_pGL4.75[hRLuc/CMV], були трансфіковані плазмідною hФНП-дельта, плазмідною конструкцією 1-12 С-Мус pcDNA3.1(-). Ця плазміда являє собою pcDNA 3.1 (ThermoFisher, № у кат. V79020), що кодує стійкий до дії TACE трансмембранний ФНП (тобто SEQ ID № 1, в якій відсутні амінокислоти 77-88). (Див. Perez C et al. Cell 63 (2): 251-8 (1990), у якій обговорюються стійкий до TACE трансмембранний ФНП.) Ці клітинні лінії потім використовували у репортерних аналізах ФНП-альфа, описаних у наступних прикладах.

Активність імунокон'югатів проти ФНП-альфа в аналізах трансмембранного ФНП-альфа з репортером GRE

Батьківські клітини K562 GRE (pGL4.36[luc2P/MMTV/Hygro]) та клітини K562 mFL-ФНП-а або hФНП-дельта 1-12 GRE (pGL4.36[luc2P/MMTV/Hygro]) висівали у 96-лункові оброблені білі планшети для тканинних культур (Costar: 3917) при 50000 клітин на лунку у 50 мкл середовища для аналізу (RPMI, 1 % CSFBS, 1 % L-глутаміну, 1 % Na пірувату і 1 % MEAA). Клітини обробляли 25 мкл послідовно розведених 3X кон'югатів антитіло-лікарський засіб проти ФНП-а миші або людини у середовищі для аналізу, стероїдної сполуки або лише середовища та інкубували протягом 48 годин при 37 °C, 5 % CO₂. Після 48 годин інкубації клітини обробляли 75 мкл системи для аналізу люциферази Dual-Glo (Promega-E2920) протягом 10 хв. та визначали люмінесценцію за допомогою Microbeta (PerkinElmer). Дані аналізували, використовуючи чотирипараметричну апроксимацію кривої, щоб отримати значення EC₅₀.% максимальної активації нормалізували до 100 нМ дексаметазону. Результати з використанням клітинної лінії з мишачим ФНП-альфа наведені в Таблиці 9 нижче, а результати з використанням клітинної лінії з ФНП-альфа людини наведені у Таблиці 10 нижче. У Таблиці 9 нижче антитіло в ADC являє собою антитіло проти ФНПа миші 8C11. У Таблиці 10 нижче антитіло в ADC являє собою антитіло проти ФНПа людини адаліумаб. Відсоток (%) мономеру визначали за допомогою SEC, як описано раніше (див. Аналітичні методики для ADC).

Таблиця 9

In vitro активність кон'югата антитіло-лікарський засіб проти ФНПа миші в аналізі трансмембранного ФНПа миші з репортером GRE

ADC	Мономер, %	EC ₅₀ мФНПа GRE (мкг/мл)	мФНПа GRE (% макс.)	EC ₅₀ K562 GRE (мкг/мл)	K562 GRE (% макс.)
ADC1	99,9	0,06	150	>50	63
ADC2	99,3	0,39	164	>50	72
ADC3	100	0,04	104	3,9	84

Таблиця 10

In vitro активність кон'югата антитіло-лікарський засіб проти ФНПа людини в аналізі трансмембранного ФНПа людини з репортером GRE

ADC	Мономер, %	EC ₅₀ hФНПа GRE (мкг/мл)	hФНПа GRE (% макс.)	EC ₅₀ K562 GRE (мкг/мл)	K562 GRE (% макс.)
ADC4	99,9	0,03	118	>50	63
ADC5	100	0,03	126	>50	28
ADC6	100	0,05	97	>50	83

Активність імункон'югатів проти hФНП-альфа в аналізі вивільнення цитокінів МКПК людини, стимульованими ліпополісахаридом

Первинні мононуклеарні клітини периферичної крові людини (МКПК) були придбані в корпорації Biological Specialty (№ у кат. 214-00-10), їх промивали 50 мл ФБС, повторно суспендували в ФБС з 5 % ДМСО, розподіляли аліквотами та заморожували у рідкому азоті до використання. МКПК розморожували, повторно суспендували в середовищі RPMI, доповненому 2 % ФБС та 1 % пеніциліну-стрептоміцину і поміщали у планшет для аналізу клітин (Costar № 3799). Потім клітини інкубували з різною концентрацією ADC проти ФНП при 37 °C та 5 % CO₂ протягом 4 годин. Потім клітини стимулювали протягом ночі з використанням 100 нг/мл LPS. На наступний день планшет обертали протягом п'яти хвилин при 1000 об/хв, і 100 мкл середовища над осадом переносили безпосередньо на додатковий 96-лунковий планшет та визначали концентрації ІЛ-6 (MSD, № K151AKB) та ІЛ-1-бета (MSD, № K151AGB). Дані відповіді на дозу були апроксимовані сигмоїдальною кривою за допомогою нелінійної регресії, а значення IC₅₀ обчислені за допомогою GraphPad 5.0 (GraphPad Software). Результати, показані в Таблиці 11, демонструють, що ADC проти ФНП має потужну активність при інгібуванні вивільнення прозапальних цитокінів ІЛ-6 та ІЛ-1-бета з активованих первинних імунних клітин.

Таблиця 11.

Активність in vitro стероїдного ADC проти ФНП в аналізі вивільнення цитокінів стимульованими МКПК

ADC	IC ₅₀ ІЛ-1 бета (нг/мл)	IC ₅₀ ІЛ-6 (нг/мл)
ADC4	44	265

Активність імункон'югата проти мФНП-альфа в моделі контактної гіперчутливості

Стероїдний ADC проти ФНПа оцінювали у моделі гострої контактної гіперчутливості, виникнення гострого запалення шкіри із застосуванням реакції гіперчутливості уповільненого типу (DTH) (керованої Т-клітинами) шляхом нанесення сенсibiliзуючого агента (флуоресцеїн-ізоціанат (FITC)). Ефективність стероїдних ADC проти ФНПа вимірювали за здатністю зменшувати набряк вуха. Стероїдні біомаркери кортикостерон та N-кінцевий пропептид проколагену 1 типу (P1NP) були включені як показники для оцінки можливого впливу лікування стероїдним ADC проти ФНПа на вісь гіпоталамус-гіпофіз-надниркова залоза (HPA) та ремоделювання кістки, відповідно.

Набряк вуха

У день 0 мишей поміщали під загальний наркоз та голили животи. За допомогою мікропіпетки мишей сенсibiliзували шляхом нашкірного нанесення 400 мкл розчину FITC (1,5 %

розчин в 1:1 ацетон:ДБФ) на живіт. Через шість днів мишам вводили носій або терапевтичний агент за 1 годину до стимулювання вуха за допомогою FITC. Для стимулювання вуха мишей поміщали під загальну анестезію та стимулювали, наносячи 20 мкл FITC на праве вухо. Через двадцять чотири години після стимулювання мишей поміщали під загальний наркоз, а товщину їх вух вимірювали штангенциркулем. Розраховували різницю між стимульованим та нестимульованим вухами. Через сімдесят дві години після стимулювання вуха мишам вводили АКТГ при 1 мг/кг в/б та через 30 хв. після АКТГ умертвляли і збирали кров. Збирали плазму та визначали рівень P1NP, кортикостерону, вільного стероїду та високомолекулярних сполук.

Кількісне визначення вивільненого вільного стероїду та ендогенного кортикостерону

Калібрувальну криву стероїду готували у мишачій плазмі з кінцевими концентраціями від 0,03 нМ до 0,1 мкМ при 8 різних концентраційних рівнях. Калібрувальну криву кортикостерону в межах кінцевих концентрацій кортикостерону від 0,3 нМ до 1 мкМ готували у розчині бичачого сироваткового альбуміну в буферному розчині ФСБ з концентрацією 70 мг/мл. До 40 мкл досліджуваних зразків плазми або калібрувальних стандартів додавали 160 мкл розчину MeCN з 0,1 % мурашиної кислоти. Надосадкову рідину розбавляли дистильованою водою та 30 мкл кінцевого розчину зразка вводили для аналізу РХ/МС.

Кількісне визначення вивільнених вільного стероїду та кортикостерону проводили на потрібному квадрупольному мас-спектрометрі AB Sciex 5500, під'єднаному до системи ВЕРХ Shimadzu AC20, зв'язаної із джерелом іонізації електроспреєм, що працює в режимі позитивних йонів. Для хроматографічного розділення використовували колонку Waters XBridge ВЕН С18, 2,1 × 30 мм, 3,5 мкм. Рухома фаза А являла собою 0,1 % мурашиної кислоти у воді Milli Q для ВЕРХ, а рухома фаза В являла собою 0,1 % мурашиної кислоти в MeCN. Лінійний градієнт від 2 % рухомої фази В до 98 % рухомої фази В застосовували від 0,6 до 1,2 хв. Загальний час циклу становив 2,6 хв. при швидкості потоку 0,8 мл/хв. Мас-спектрометр працював у режимі MRM з реєстрацією позитивних йонів при температурі джерела 700 °С.

Кількісне визначення P1NP у плазмі

Кількісне визначення P1NP у плазмі проводили на платформі РХМС на основі розщеплення білка трипсином. Зразки плазми частково осаджували та повністю відновлювали додаванням суміші MeCN/0,1 М гідрокарбонат амонію/ДТТ. Надосадкову рідину збирали та алкілювали додаванням йодоцтової кислоти. Алкільовані білки розщеплювали трипсином, а отримані триптичні пептиди аналізували за допомогою РХМС. Калібрувальну криву отримували за допомогою синтетичного триптичного пептиду, що вводили у сироватку коня (сурогатна матриця, що не чинить заважаючого впливу). Мічений стабільним ізотопом фланкуючий пептид (подовження на 3-6 амінокислот на обох кінцях триптичного пептиду) був використаний як внутрішній стандарт, що додавали у суміш для осадження білка MeCN/ДТТ для нормалізації ефективності розщеплення та введення у РХМС.

Для хроматографічного розділення використовували колонку Columnex Chromenta ВВ-С18, 2,1 × 150 мм, 5 мкм. Рухома фаза А являла собою 0,1 % мурашиної кислоти у воді Milli Q для ВЕРХ, а рухома фаза В являла собою 0,1 % мурашиної кислоти в MeCN. Лінійний градієнт від 2 % рухомої фази В до 65 % рухомої фази В застосовували від 0,6 до 3 хв. Загальний час циклу становив 8 хв. при швидкості потоку 0,45 мл/хв. Мас-спектрометр з пасткою AB Sciex 4000Q використовували у режимі MRM з реєстрацією позитивних йонів, щоб кількісно визначити пептиди P1NP, при температурі джерела 700 °С.

Результати

Результати наведені у Таблиці 12 нижче.

Таблиця 12

Порівняння активності стероїдного ADC проти тФНП альфа щодо набряку вуха та біомаркерів стероїдів у моделі запалення CHS

ADC	Набряк вуха (% інгібування при 10 мг/кг ± SEM)	P1NP (% інгібування при 10 мг/кг ± SEM)	Кортикостерон (% інгібування при 10 мг/кг ± SEM)
ADC1	82,8±2,3	32,6±3,8	4,7±10,5

Активність імунокон'югатів проти тФНП-альфа при індукованому колагеном артриті

Здатність стероїдного ADC (ADC1) проти тФНПа впливати на хворобу оцінювали в моделі артриту, що являє собою викликаний колагеном артрит (CIA).

У цих експериментах самців мишей DBA/1J отримували в Jackson Labs (Бар-Харбор, Мен). Мишей використовували у віці від 6 до 8 тижнів. Усіх тварин тримали при постійній температурі та вологості протягом 12-годинного циклу освітлення/темрява та годували їжею для гризунів (Lab Diet 5010 PharmaServ, Фрамінгем, Массачусетс) та водою у необмеженій кількості. AbbVie має акредитацію AAALAC (Асоціація з оцінки та акредитації догляду за лабораторними тваринами), та всі процедури були затверджені Інституційним комітетом з догляду та використання тварин (IACUC) і контролювалися супроводжуючим ветеринаром. Контролювали масу тіла та загальний стан, і тварин умертвляли, якщо вони демонстрували > 20 % втрату маси.

Самців мишей DBA/J імунізували внутрішньошкірно (в/ш) в основі хвоста з використанням 100 мкл емульсії, що містить 100 мкг бичачого колагену типу II (MD Biosciences), розчиненого в 0,1 н. оцтовій кислоті, та 200 мкг інактивованої нагріванням *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (повний ад'ювант Фрейнда, Difco, Лоуренс, Канзас). Через двадцять один день після імунізації колагеном мишей стимулювали в/ч 1 мг зимозану А (Sigma, Сент-Луїс, Міссурі) у ФСБ. Після стимулювання за мишами спостерігали від 3 до 5 разів на тиждень щодо артриту. Для задніх лап оцінювали набряк лапи за допомогою пружинного штангенциркуля Dyer (Dyer 310-115).

Мишей включали між 24 та 28 днями при перших клінічних ознаках хвороби та розподяли в групи з еквівалентною тяжкістю артриту. Раннє терапевтичне лікування починалося в момент зарахування.

Тваринам вводили одноразово внутрішньочеревно (в/ч) mAb проти тФНП (висока доза) або стероїдний ADC проти тФНП (висока та низька доза - мг/кг) у 0,9 % фізіологічному розчині. Кров відбирали для визначення впливу антитіл через надріз на хвості через 24 та 72 години після введення дози. Лапи збирали в момент умертвіння для гістопатології. Кров відбирали в момент умертвіння пункцією серця для повного аналізу крові (Sysmex XT-2000iV). Статистичну значимість визначали за допомогою ANOVA.

Результати наведені на Фіг. 3 та демонструють, що разова доза стероїдного ADC проти ФНПа може мати більшу тривалість дії через зменшення набряку лапи протягом ~28 днів порівняно з mAb проти ФНПа або лише носієм.

Стабільність ADC у плазмі

Хоча гідроліз застосовують для підвищення *in vivo* стабільності лінкерів на основі малеїміду, він зазвичай вимагає дії основного рН, що може призвести до модифікацій антитіла (наприклад, дезамідування), збільшення гетерогенності, зниження виходу тощо. (Shen et al., *Nature Biotechnology* 30:184–189 (2012) (гідроліз малеїмідів дозволяє уникнути передчасного вивільнення лікарського засобу та системного впливу лікарського засобу); Strop et al., *Chemistry & Biology* 20(2):161-167 (2013) (аналогічне дослідження); Tumeu et al., *Bioconjugate Chem* 25(10):1871-1880 (2014) (використання проксимального ланцюга ПЕГ для забезпечення гідролізу кільця в основних умовах); Lyon et al., *Nature Biotechnology* 32:1059-1062 (2014) (способи полегшення отримання гідролізованого сукциніміду); Christie et al., *J Control Release* 220(PtB):660-70 (28 Dec 2015) (використання малеїмідів N-арилу для полегшення гідролізу сукцинімідного кільця в основних умовах); Dovgan et al., *Scientific Reports* 6:1 (2016) (використання 2-(малеїмідометил)-1,3-діоксану для полегшення гідролізу кільця у м'яких основних умовах протягом тривалого періоду часу); і *J Pharm Sci* 2013: 102 (6) 1712-1723 (залежність дезамідування аспарагіну від типу буферного розчину, рН та температури). Навпаки, у типових умовах кон'югація з використанням бромацетаміду закінчується протягом декількох годин у порівнянні з декількома днями для малеїміду (кон'югація та подальший гідроліз кільця при основному рН). Крім того, 2-меркаптоацетамід, що утворюється під час реакції цистеїну з бромацетамідом, не сприйнятливий до зворотної реакції Міхаеля і забезпечує стабільне приєднання лінкера до антитіла, як показано в Таблиці 13 нижче для ADC4.

Таблиця 13

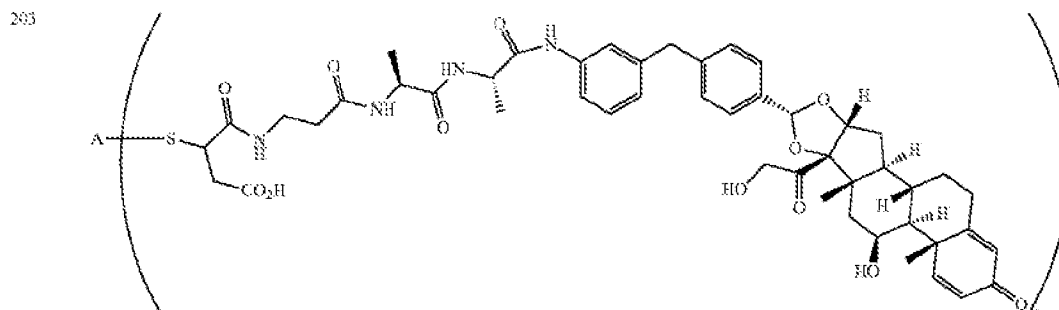
% SM, що вивільнюється з ADC у плазму через 4 дні при 37 °C

Буферний розчин ФСБ, 1X	Миша	Пацюк	Макака крабодійний	Людина
BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
BLQ - нижче рівня кількісного визначення (<1,0 nM)				

Стабільність ADC у розчині

Для оцінки довготривалої стабільності високомолекулярну сполуку піддають стрес-дослідженню методом "прискореного старіння". Протокол цього дослідження являє собою 100

5 мг/мл високомолекулярної сполуки у 15 mM гістидину при 40 °C протягом 21 дня. Коли ADC4 піддали цьому дослідженню, відсотковий приріст агрегатів становив <5 % порівняно з ADC203 з публікації заявки на патент США № 2018/012600, опублікованої 10 травня 2018 р., в якій спостерігали збільшення агрегації на 18 % (Таблиця 14). Це демонструє покращені властивості, що надані ADC4 лінкером Gly-Glu з проліками з фосфатними групами як корисна частина. ADC203 з US2018/0126000 являє собою:



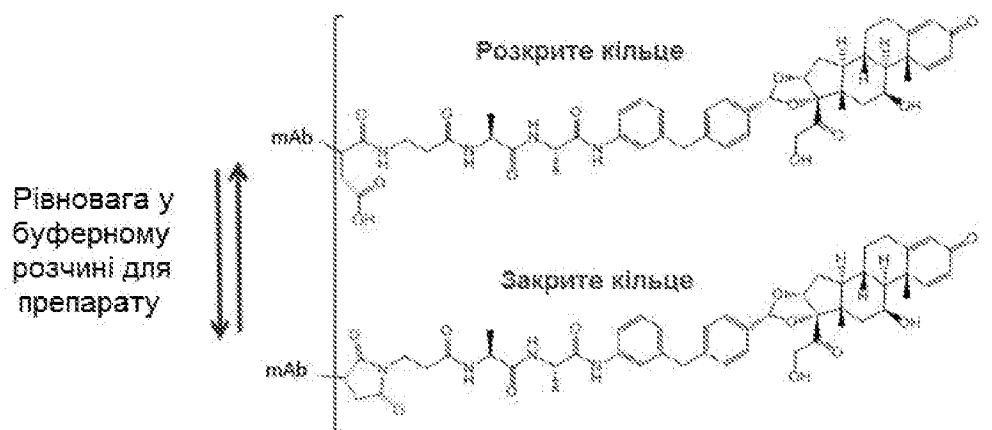
де n=4, і А стосується антитіла адалімумабу проти ФНПа людини.

Таблиця 14

ADC	Втрата мономерів при 5 °C протягом 21 дня	Втрата мономерів при 25 °C протягом 21 дня	Втрата мономерів при 40 °C протягом 21 дня
ADC203	1,43 %	2,26 %	17,56 %
ADC4	<0,5 %	<0,5 %	3,46 %

10 Додатковою перевагою проліків з фосфатними групами є можливість використання аніонообмінної хроматографії для очищення DAR. Це викликає покращення розділення піків порівняно з хроматографією з гідрофобними взаємодіями, що дає більш високі виходи очищеного ADC з певним DAR.

15 У буферному розчині для препарату гідролізоване сукцинімідне кільце ADC203 знаходиться у рівновазі із закритою формою кільця. Закрита форма кільця сприйнятлива до зворотної реакції Міхаеля та подальшої втрати лінкер-лікарського засобу *in vivo* у крабодіних макак (Фіг. 4).



20 За номінальних умов зберігання рідини при приєднанні сукциніміда у відкритій конформації вона перетвориться на закрити конформацію на більше ніж 5 % при 5 °C і більше ніж 15 % при 25 °C через 6 місяців (Таблиця 15).

Таблиця 15

Час/Темп.	Закрите сукцинімідне кільце, %	
	Легкий ланцюг	Важкий ланцюг
3 місяці/5 °С	2,2	4,6
6 місяців/5 °С	3,2	6,9
3 місяці/25 °С	10,1	13,3
6 місяців/25 °С	16,6	24,1
3 місяці/40 °С	26,2	33,7
3 місяці/40 °С	26,8	39,0

Слід розуміти, що для інтерпретації формули винаходу призначений розділ "Детальний опис сутності винаходу", а не розділи "Сутність винаходу" та "Реферат". У розділах "Сутність винаходу" та "Реферат" викладені один чи більше, але не всі ілюстративні варіанти здійснення цього винаходу, як передбачається автором(-ами) винаходу, і, таким чином, вони не призначені для обмеження цього розкриття та доданої формули винаходу жодним чином.

Це розкриття було описано вище за допомогою функціональних структурних елементів, що ілюструють реалізацію зазначених функцій та взаємозв'язків між ними. Межі цих функціональних структурних елементів були доволі визначені у цьому документі для зручності опису. Можна визначити альтернативні межі доти, поки зазначені функції та взаємозв'язки між ними виконуються належним чином.

Вищенаведений опис конкретних варіантів здійснення винаходу настільки повно розкриває загальний характер винаходу, що інші можуть, застосовуючи знання у цій галузі техніки, легко модифікувати і/або адаптувати для різних застосувань такі конкретні варіанти здійснення винаходу без зайвого експериментування, не відступаючи від загальної концепції цього розкриття. Отже, передбачається, що такі адаптації та модифікації знаходяться у межах змісту та діапазону еквівалентів розкритих варіантів здійснення, виходячи з викладених у цьому документі ідей та принципів. Потрібно розуміти, що формулювання або термінологія у цьому документі призначена для опису, а не для обмеження, так що термінологія або формулювання цього опису повинні тлумачитися фахівцем у цій галузі техніки з огляду на ідеї та принципи.

Широта і обсяг цього розкриття не повинні обмежуватися жодним з описаних вище ілюстративних варіантів здійснення, а повинні визначатися лише відповідно до наступної формули винаходу та її еквівалентів.

Включення шляхом посилання

Всі публікації, включаючи патенти та опубліковані заявки, про які згадується в "Детальному описі сутності винаходу", включені до цього документу шляхом посилання у повному обсязі.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> ABBVIE INC.

<120> АГОНІСТ ГЛЮКОКОРТИКОЇДНОГО РЕЦЕПТОРА ТА ЙОГО ІМУНОКОН'ЮГАТИ

<130> A103017 1490WO

<140>

<141>

<150> 62/595054

<151> 2017-12-05

<150> 62/593776

<151> 2017-12-01

<160> 14

<170> PatentIn версії 3.5

<210> 1

<211> 233
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

5 <400> 1
 Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
 1 5 10 15

10 Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe
 20 25 30

15 Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe
 35 40 45

20 Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro
 50 55 60

25 Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser
 65 70 75 80

30 Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro
 85 90 95

35 Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu
 100 105 110

40 Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser
 115 120 125

45 Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly
 130 135 140

50 Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala
 145 150 155 160

55 Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro
 165 170 175

60 Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu
 180 185 190

65 Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu
 195 200 205

70 Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly
 210 215 220

Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
225 230

5

<210> 2
<211> 235
<212> Білок
<213> рід Mus

10

<400> 2
Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
1 5 10 15

15

Leu Pro Gln Lys Met Gly Gly Phe Gln Asn Ser Arg Arg Cys Leu Cys
20 25 30

20

Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Leu Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe
35 40 45

25

Cys Leu Leu Asn Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Asp Glu Lys Phe
50 55 60

30

Pro Asn Gly Leu Pro Leu Ile Ser Ser Met Ala Gln Thr Leu Thr Leu
65 70 75 80

Arg Ser Ser Ser Gln Asn Ser Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val
85 90 95

35

Ala Asn His Gln Val Glu Glu Gln Leu Glu Trp Leu Ser Gln Arg Ala
100 105 110

40

Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Met Asp Leu Lys Asp Asn Gln Leu Val
115 120 125

45

Val Pro Ala Asp Gly Leu Tyr Leu Val Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys
130 135 140

50

Gly Gln Gly Cys Pro Asp Tyr Val Leu Leu Thr His Thr Val Ser Arg
145 150 155 160

Phe Ala Ile Ser Tyr Gln Glu Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Val Lys
165 170 175

55

Ser Pro Cys Pro Lys Asp Thr Pro Glu Gly Ala Glu Leu Lys Pro Trp
180 185 190

60

Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp

195 200 205

5 Gln Leu Ser Ala Glu Val Asn Leu Pro Lys Tyr Leu Asp Phe Ala Glu
 210 215 220

10 Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Val Ile Ala Leu
 225 230 235

15 <210> 3
 <211> 451
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

20 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний
 поліпептид"

25 <400> 3
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

30 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

35 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

40 Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

45 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

50 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

55 Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

60 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125

65 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140

70 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 5

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 10

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 15

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 20

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240
 25

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 35

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 40

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 45

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 50

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335
 55

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 60

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 65

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 70

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 5

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 10

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 15 Pro Gly Lys
 450

<210> 4
 20 <211> 214
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 25 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний
 поліпептид"

<400> 4
 30 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 35 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 40

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 45

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
 85 90 95
 50

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 55

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 60

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

5

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

10

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

15

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

20

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

25

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 5
 <211> 121
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

30

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний
 поліпептид"

35

<400> 5
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

40

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

45

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

50

Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

55

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

60

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

5 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 6
 10 <211> 107
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 15 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний
 поліпептид"

<400> 6
 20 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

25 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
 20 25 30

30 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

35 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

40 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
 85 90 95

45 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 7
 <211> 5
 50 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <221> джерело
 55 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний
 поліпептид"

<400> 7
 60 Asp Tyr Ala Met His
 1 5

<210> 8
 <211> 10
 5 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <221> джерело
 10 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний
 поліпептид"

 <400> 8
 Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala Met His
 15 1 5 10

 <210> 9
 <211> 17
 20 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <221> джерело
 25 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний
 поліпептид"

 <400> 9
 Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu
 30 1 5 10 15

 Gly
 35

 <210> 10
 <211> 9
 <212> Білок
 40 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний
 45 поліпептид"

 <400> 10
 Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser
 1 5
 50

 <210> 11
 <211> 12
 <212> Білок
 55 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний
 60 поліпептид"

<400> 11
Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

5

<210> 12
<211> 11
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

10

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний
поліпептид"

15

<400> 12
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

20

<210> 13
<211> 7
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

25

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний
поліпептид"

30

<400> 13
Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

35

<210> 14
<211> 9
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

40

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис штучної послідовності: Синтетичний
поліпептид"

45

<400> 14
Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr
1 5

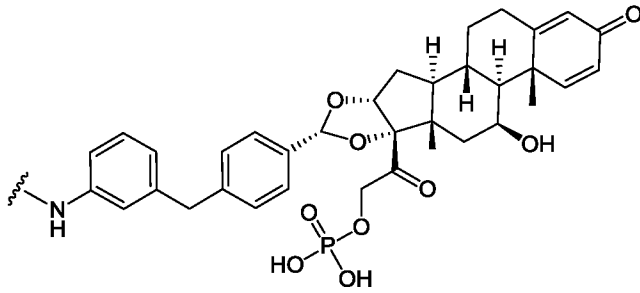
50

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

55

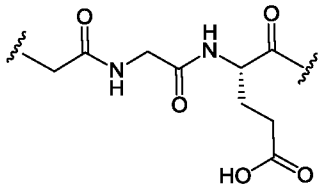
1. Кон'югат антитіло-лікарський засіб, що містить:
 - (а) антитіло проти ФНП α , що містить важкий ланцюг, зображений як SEQ ID NO: 3, і легкий ланцюг, зображений як SEQ ID NO: 4; і
 - (б) агоніст глюкокортикоїдного рецептора, що містить радикал, зображений формулою:

60

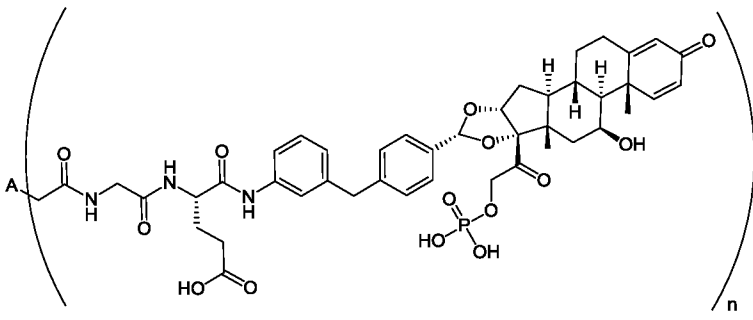


при цьому антитіло кон'югують з агоністом глюкокортикоїдного рецептора за допомогою лінкера, зображеного формулою:

5



2. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 1 відповідно до формули:



10

де А являє собою антитіло, і n дорівнює цілому числу від 1-10.

3. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 2, який відрізняється тим, що n дорівнює 4.

4. Кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 2, який відрізняється тим, що n дорівнює 2.

15

5. Фармацевтична композиція, що містить кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 3 та фармацевтично прийнятний носій.

20

6. Спосіб лікування патологічного стану, вибраного з ревматоїдного артриту, анкілозуючого спондиліту, псоріатичного артриту, бляшкоподібного псоріазу, виразкового коліту, хвороби Крона у дорослих, хвороби Крона у дітей, увеїту, гнійного гідраденіту та ювенільного ідіопатичного артриту, у суб'єкта, що включає введення суб'єкту ефективної кількості кон'югата антитіло-лікарський засіб за п. 3.

25

7. Набір, що містить:

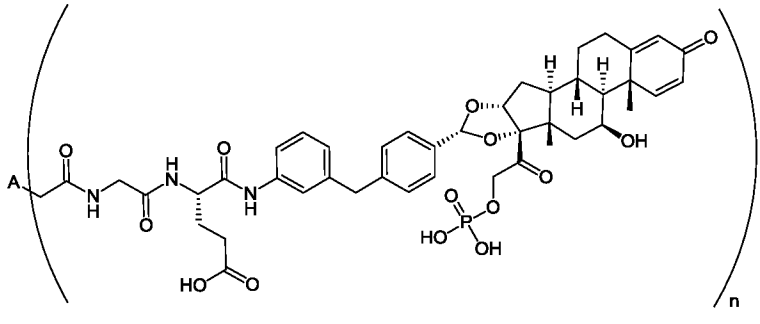
(a) контейнер, що містить кон'югат антитіло-лікарський засіб за п. 3 або фармацевтичну композицію за п. 5; і

30

(b) етикетку або листівку-вкладку на один контейнер або у поєднанні з одним або більше контейнерами, причому етикетка або листівка-вкладка вказує, що кон'югат антитіло-лікарський засіб або фармацевтичну композицію застосовують для лікування патологічного стану, вибраного з ревматоїдного артриту, анкілозуючого спондиліту, псоріатичного артриту, бляшкоподібного псоріазу, виразкового коліту, хвороби Крона у дорослих, хвороби Крона у дітей, увеїту, гнійного гідраденіту та ювенільного ідіопатичного артриту.

8. Спосіб доставки агоніста глюкокортикоїдного рецептора до клітини, що експресує ФНП α , що включає стадію приведення клітини у контакт з кон'югатом антитіло-лікарський засіб за п. 3.

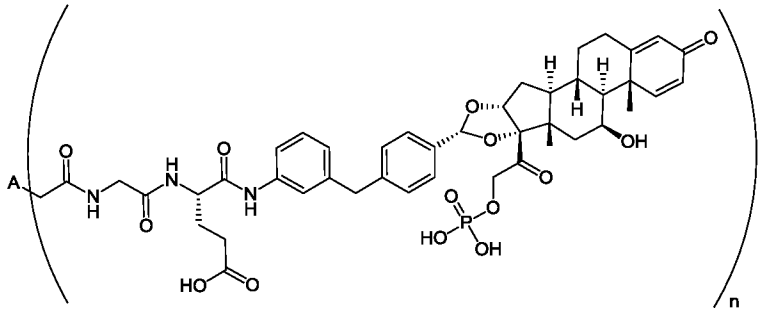
9. Кон'югат антитіло-лікарський засіб відповідно до формули:



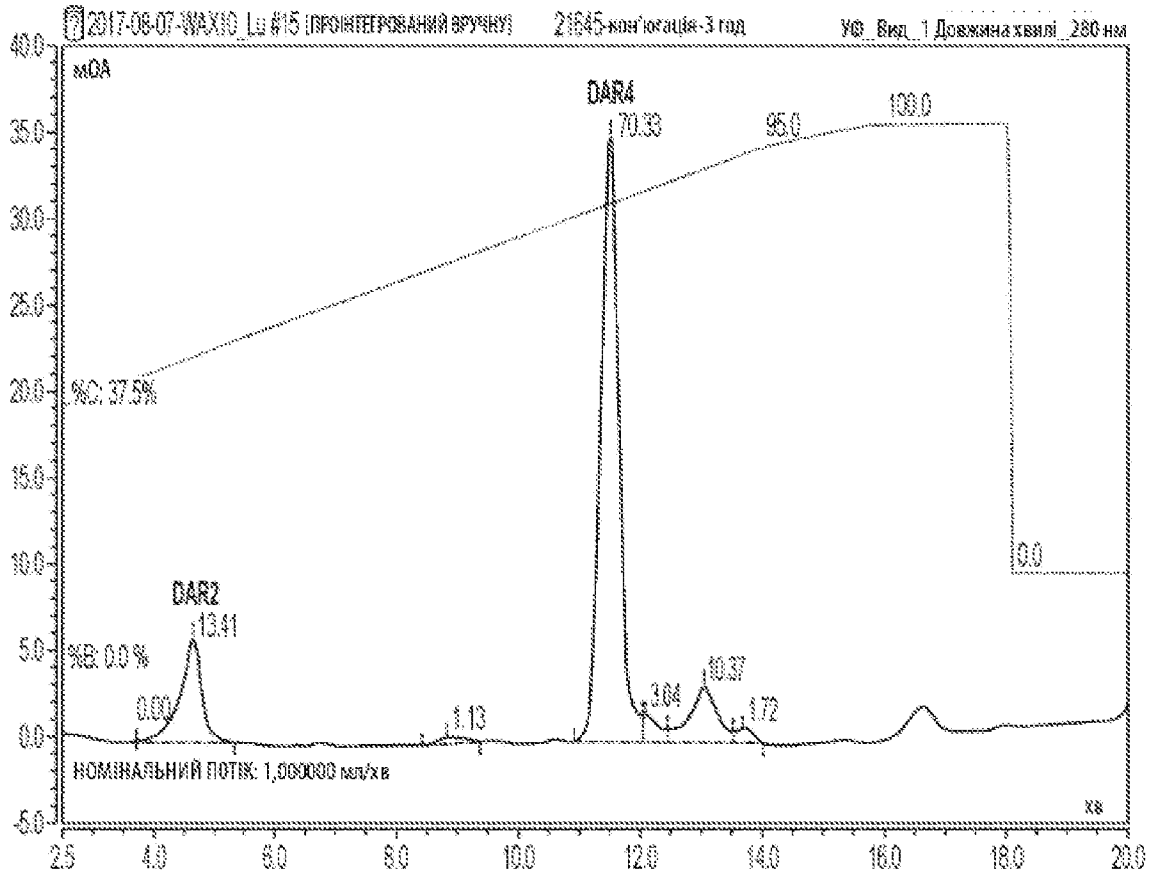
де А являє собою адалімумаб, і n дорівнює 4.

10. Кон'югат антитіло-лікарський засіб відповідно до формули:

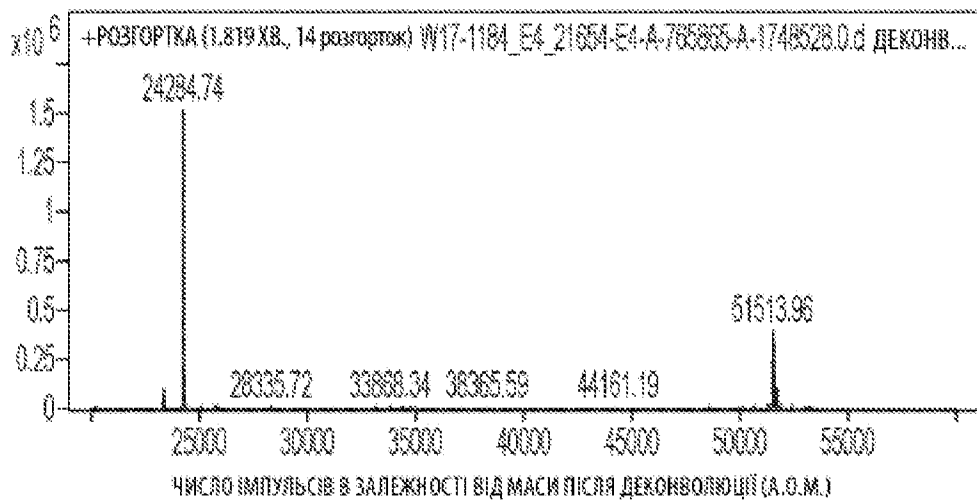
5



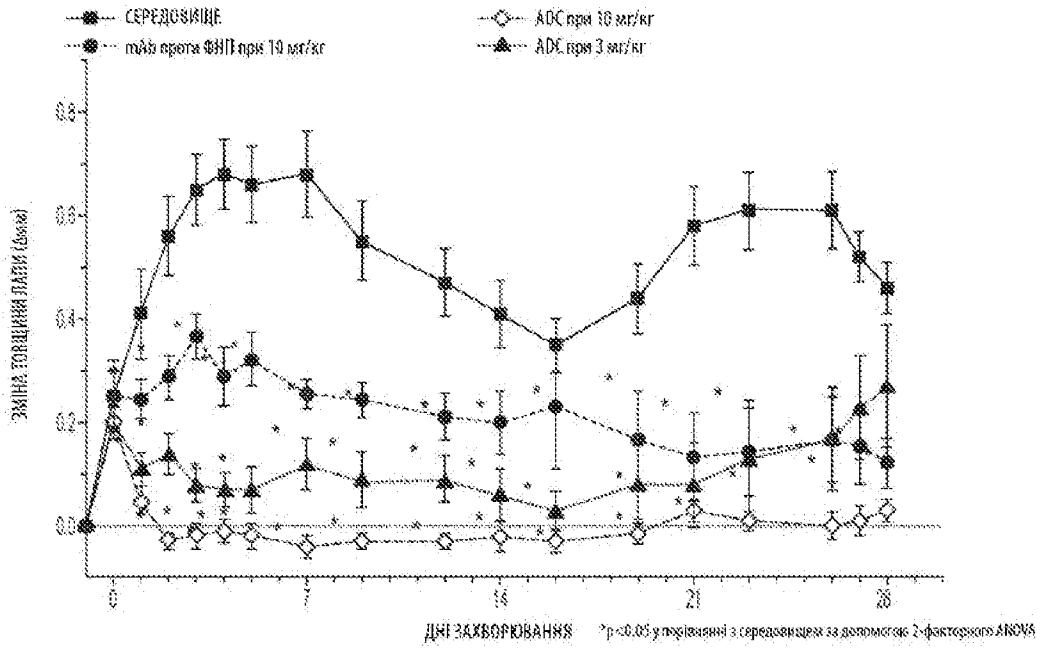
де А являє собою адалімумаб, і n дорівнює 2.



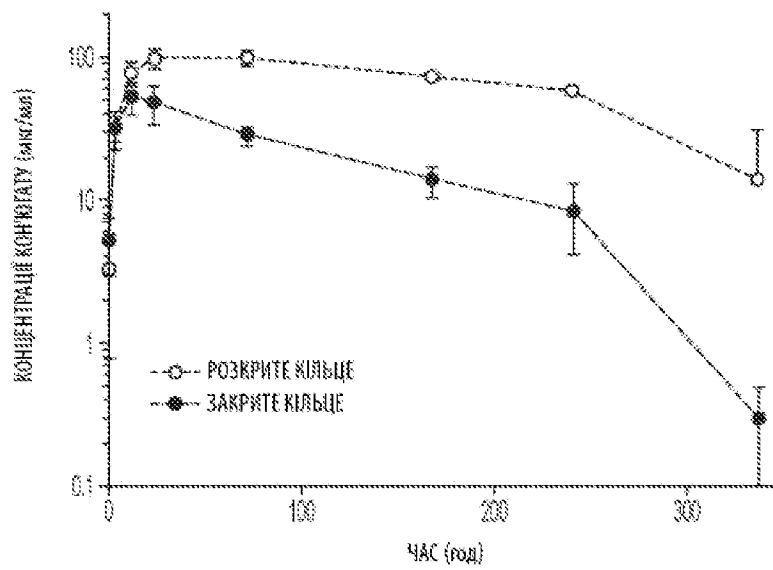
Фиг. 1



Фиг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4