



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 47/50 (2018.08); A61P 35/00 (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2018104266, 11.08.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.08.2016

Дата регистрации:
01.06.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
11.08.2015 CN 201510489556.6;
11.08.2015 CN 201510489560.2

(43) Дата публикации заявки: 12.09.2019 Бюл. № 26

(45) Опубликовано: 01.06.2020 Бюл. № 16

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 12.03.2018

(86) Заявка РСТ:
CN 2016/094704 (11.08.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2017/025057 (16.02.2017)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ХУАН Баохуа Роберт (CN),
ДАЙ Цзянь (CN),
ВАН Чжунбо (CN),
СЕ Сюэюань (CN),
ЛЮ Сяодун (CN),
ХУ Синьли (CN)

(73) Патентообладатель(и):

КОХЕРЕНТ БАЙОФАРМА (КУ)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: CN 104784699 A, 22.07.2015. CN
104667292 A, 03.06.2015. WO 2014009774 A1,
16.01.2014. WO 9959640 A2, 25.11.1999. AHMAD
A. et al. Daunorubicin coupled to monoclonal
antibodies via a cis-aconitic anhydride linker:
biochemical and cytotoxic properties revisited.
BADR M. et al. Methotrexate-gelonin conjugate
- an inhibitor of MCF-7 cells expressing (см.
прод.)

(54) ПОЛИЛИГАНДНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ КОНЬЮГАТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к медицине и касается конъюгированного соединения или его фармацевтически приемлемой соли для доставки полезной нагрузки пациенту, содержащих по меньшей мере одну полезную нагрузку и два или более видов взаимодействующих с клетками молекул, причем полезная нагрузка конъюгирована с по меньшей мере одной из взаимодействующих с клетками молекул, причем два или более видов взаимодействующих с клетками молекул включают а) первый лиганд,

способный специфично связываться с первым клеточным поверхностным рецептором, и второй лиганд, способный специфично связываться со вторым клеточным поверхностным рецептором, причем первый и второй клеточные поверхностные рецепторы отличаются друг от друга; или б) первый лиганд, способный специфично связываться с первым клеточным поверхностным рецептором, и молекулу эндоцитоза, способную опосредовать эндоцитоз. Группа изобретений также касается

фармацевтической композиции для доставки полезной нагрузки пациенту, содержащей указанное соединение; способа лечения заболевания у пациента, включающего введение пациенту терапевтически эффективного

количества указанного соединения. Группа изобретений обеспечивает эффективную доставку лекарственных средств в клетки пациента. 4 н. и 34 з.п. ф-лы, 3 пр., 4 ил., 17 табл.

(56) (продолжение):

the dihydrofolate receptor. *Biol Chem.* 2014 Dec;395(12):1461-6. doi: 10.1515/hsz-2013-0270. US 20080279868 A1, 13.11.2008. DOSIO F. et al. Immunotoxins and anticancer drug conjugate assemblies: the role of the linkage between components. *Toxins (Basel)*. 2011 Jul;3(7):848-83. doi: 10.3390/toxins3070848. Epub 2011 Jul 14.

RU 2 7 2 2 2 4 9 C 2

RU 2 7 2 2 2 4 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 47/50 (2018.08); **A61P 35/00** (2018.08)(21)(22) Application: **2018104266**, 11.08.2016(24) Effective date for property rights:
11.08.2016Registration date:
01.06.2020

Priority:

(30) Convention priority:
11.08.2015 CN 201510489556.6;
11.08.2015 CN 201510489560.2

(43) Application published: 12.09.2019 Bull. № 26

(45) Date of publication: 01.06.2020 Bull. № 16

(85) Commencement of national phase: 12.03.2018

(86) PCT application:
CN 2016/094704 (11.08.2016)(87) PCT publication:
WO 2017/025057 (16.02.2017)Mail address:
129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

HUANG, Baohua Robert (CN),
DAI, Jian (CN),
WANG, Zhongbo (CN),
XIE, Xueyuan (CN),
LIU, Xiaodong (CN),
HU, Xinli (CN)

(73) Proprietor(s):

COHERENT BIOPHARMA (KY)(54) **POLY-LIGAND MEDICINAL CONJUGATES AND USE THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: group of inventions concerns a conjugated compound or its pharmaceutically acceptable salt for delivering a payload to a patient, containing at least one payload and two or more types of molecules interacting with cells, wherein the payload is conjugated with at least one of the molecules interacting with the cells, wherein the two or more types of molecules interacting with the cells include a) a first ligand, capable of specifically binding to a first cell surface receptor, and a second ligand capable of specifically binding to a second cell surface receptor, wherein the

first and second cell surface receptors differ from each other; or b) a first ligand capable of specifically binding to a first cell surface receptor, and an endocytosis molecule, able to mediate endocytosis. Group of inventions also relates to a pharmaceutical composition for delivering a payload to a patient comprising said compound; method of treating a disease in a patient, comprising administering to a patient a therapeutically effective amount of said compound.

EFFECT: group of inventions provides effective drug delivery into patient's cells.

38 cl, 3 ex, 4 dwg, 17 tbl

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[001] По настоящей заявке испрашивается приоритет заявки на патент Китая № 201510489556.6, поданной 11-го августа 2015 года, озаглавленной «Конъюгаты лигандов и лекарственных средств, способные индуцировать эндоцитоз», и заявке на патент Китая № 201510489560.2, поданной 11-го августа 2015 года, озаглавленной «Полилигандные лекарственные конъюгаты, способные индуцировать эндоцитоз», каждая из которых полностью включена в настоящее описание путем ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[002] Настоящая заявка в целом относится к конъюгированным соединениям, фармацевтическим композициям и способам применения. Более конкретно, настоящая заявка относится к полилигандным лекарственным конъюгатам (mLDC), в особенности, к mLDC, способным вызывать эндоцитоз, а также к их фармацевтическим композициям, способам их применения для доставки полезной нагрузки пациентам и к способам их применения для лечения заболеваний.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[003] Как правило, патологические и физиологические характеристики больных и здоровых клеток существенно различаются, и одним из отличий является то, что на поверхности больных клеток имеются специфичные или сверхэкспрессированные вещества (такие как антигены, химические сигналы, рецепторы и т.п.), которые отсутствуют или экспрессируются на низком уровне в здоровых (нормальных) клетках. На основе этого принципа для лечения заболеваний были разработаны конъюгаты антител с лекарственными средствами (ADC) и конъюгаты полипептидов и лекарственных средств (PDC). В настоящее время, хотя некоторые препараты ADC и PDC находятся в продаже или проходят клинические испытания, существует множество ограничений клинического применения ADC и в PDC из-за принципов создания этих лекарственных средств.

[004] В последнее время получили признание ADC после одобрения препарата Adcetris от Seattle Genetics в 2011 году и препарата Kadcyla от Genentech в 2013 году, и они остаются популярным направлением в области создания и разработки лекарственных средств, где более чем 30 препаратов проходят клинические испытания. Однако при разработке ADC ученые сталкиваются с множеством трудностей, начиная от отсутствия подходящих мишеней, препятствий при производстве и низкой стабильности лекарственного средства вследствие комплексной природы и большой молекулярной массы ADC. В настоящее время ADC используется в основном при лечении рака. В некоторых случаях, сродство целевого антитела к антигену на поверхности раковых клеток может достигать 10^{-9} ~ 10^{-12} (Kd, моль/л). Поэтому, ADC, обладая высокой специфичностью к клеткам-мишеням, также являются высоко специфичными по отношению к нормальным клеткам с такими же рецепторами-мишенями, как и клетки-мишени. Кроме того, метаболизм ADC в живом организме может занимать длительное время (от одной до трех недель), в течение которого они могут непрерывно убивать нормальные клетки и, таким образом, значительно повышать токсические побочные эффекты ADC. Таким образом, более идеальными заболеваниями для применения ADC должны быть заболевания, характеризующееся значительными отличиями по количеству антигенов на клеточной поверхности у опухолевых и нормальных клеток. Однако такому весьма строгому требованию может удовлетворить только очень малое число заболеваний, известных в данной области.

[005] Другой группой конъюгированных лекарственных соединений являются конъюгаты лигандов с лекарственными средствами (лигандные лекарственные

конъюгаты, LDC), где лиганд представляет собой пептид или низкомолекулярное соединение. Однако при применении LDC возникают различные проблемы, включая биологическую доступность, стабильность, эффективность и токсичность. Например, многие лиганды не могут проникать в клетки вследствие своей большой молекулярной массы, липофильности или других характеристик, что ограничивает их терапевтическое применение. Кроме того, терапевтические эффекты, как правило, являются низкими, если лиганды конъюгированы с традиционными химиотерапевтическими средствами (например, доксорубицином, паклитакселом и т.д.), в то время как токсические являются высокими, если они конъюгированы с молекулами высокоэффективных лекарственных средств (такими, как MMAE, DM1), таким образом, приводя к смерти животного из-за отравления еще до достижения терапевтически эффективного количества для лечения опухоли.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[006] Настоящее изобретение относится к конъюгированным соединениям или их фармацевтически приемлемым солям, их фармацевтическим композициям и способам их применения. Настоящая заявка, более конкретно, относится к полилигандным лекарственным конъюгатам (mLDC), особенно к mLDC, способным вызывать эндоцитоз, а также к их фармацевтическим композициям, способам их применения для доставки полезной нагрузки пациентам и к способам их применения для лечения заболеваний, включающих, но не ограничивающихся этим, раковые заболевания, иммунологические заболевания, сердечно-сосудистые заболевания, метаболические заболевания и неврологические заболевания.

[007] В одном из аспектов настоящей заявки описано конъюгированное соединение или его фармацевтически приемлемая соль, содержащие полезную нагрузку и два или несколько видов взаимодействующих с клетками молекул, где полезная нагрузка конъюгирована по меньшей мере с одной из взаимодействующих с клетками молекул.

[008] В некоторых вариантах осуществления изобретения полезная нагрузка конъюгирована по меньшей мере с одной из взаимодействующих с клетками молекул напрямую. В некоторых вариантах осуществления изобретения полезная нагрузка конъюгирована по меньшей мере с одной из взаимодействующих с клетками молекул не напрямую. В некоторых вариантах осуществления изобретения полезная нагрузка конъюгирована по меньшей мере с одной из взаимодействующих с клетками молекул через линкер. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из взаимодействующих с клетками молекул представляет собой лиганд, способный связываться с клеточным поверхностным рецептором. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере две из взаимодействующих с клетками молекул представляют собой лиганды, способные связываться с клеточными поверхностными рецепторами.

[009] В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение или его фармацевтически приемлемая соль содержат первый лиганд, способный специфично связываться с первым клеточным поверхностным рецептором, и второй лиганд, способный специфично связываться со вторым клеточным поверхностным рецептором. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение или его фармацевтически приемлемая соль содержат первый лиганд, способный специфично связываться с первым клеточным поверхностным рецептором, и второй лиганд, способный специфично связываться со вторым клеточным поверхностным рецептором, где первый клеточный поверхностный рецептор и второй клеточный поверхностный рецептор отличаются друг от друга.

[010] В некоторых вариантах осуществления изобретения полезная нагрузка конъюгирована с первым лигандом, а первый лиганд конъюгирован со вторым лигандом. В некоторых вариантах осуществления первый лиганд конъюгирован со вторым лигандом напрямую. В некоторых вариантах осуществления первый лиганд конъюгирован со вторым лигандом не напрямую. В некоторых вариантах осуществления первый лиганд конъюгирован со вторым лигандом через спейсер.

[011] В некоторых вариантах осуществления изобретения полезная нагрузка конъюгирована напрямую с первым лигандом и вторым лигандом без какого-либо линкера. В некоторых вариантах осуществления изобретения полезная нагрузка конъюгирована с первым лигандом через первый линкер, и полезная нагрузка конъюгирована со вторым лигандом через второй линкер. В некоторых вариантах осуществления первый линкер и второй линкер являются одинаковыми. В некоторых других вариантах осуществления первый линкер и второй линкер отличаются. В некоторых вариантах осуществления изобретения полезная нагрузка конъюгирована с первым лигандом напрямую без какого-либо линкера, и полезная нагрузка конъюгирована со вторым лигандом через линкер.

[012] В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение или его фармацевтически приемлемая соль дополнительно содержат третий лиганд, способный специфично связываться с третьим клеточным поверхностным рецептором. В некоторых вариантах осуществления первый клеточный поверхностный рецептор, второй клеточный поверхностный рецептор и третий клеточный поверхностный рецептор отличаются друг от друга. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере двое из первого клеточного поверхностного рецептора, второго клеточного поверхностного рецептора и третьего клеточного поверхностного рецептора отличаются друг от друга. В некоторых вариантах осуществления первый лиганд, второй лиганд и третий лиганд являются одинаковыми.

[013] В некоторых вариантах осуществления первый, второй и третий клеточные поверхностные рецепторы, предложенные в данном документе, независимо выбирают из группы, состоящей из трансферринового рецептора (TFR), рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLR), фолатного рецептора (FR), киназного рецептора мочевой кислоты, рецептор фактора некроза опухолей (TNFR), интегрина LFA-1, рецептора соматостатина SST-14, рецептора рилизинг-гормона лютеинизирующего гормона (LHRH), рецептора TRPV6 и рецептора поверхностного антигена протеазы.

[014] В некоторых вариантах осуществления первый лиганд, второй лиганд и третий лиганд независимо выбирают из группы, состоящей из пептида, фолата и их аналогов.

[015] В некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд содержит пептид, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из Cys-Lys-Glu-Phe-Leu-His-Pro-Ser-Lys-Val-Asp-Leu-Pro-Arg (SEQ ID NO: 15, названного P10), Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-Cys (SEQ ID NO: 16, названного P11), Ala-Gly-[Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys], (SEQ ID NO: 17, названного P12), Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Лиз-Leu Arg-Pro-Gly-Cys (SEQ ID NO: 18, названного P13), Arg-Gly-Asp (названного RGD), гомологичного пептида, имеющего по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% гомологии по аминокислотной последовательности с любой из последовательностей SEQ ID NO: 15-18, где гомологичные пептиды являются функциональными эквивалентами пептидов SEQ ID NO: 15-18, соответственно.

[016] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из взаимодействующих с клетками молекул, описанных в данном документе, представляет собой молекулу эндоцитоза, которая способна опосредовать эндоцитоз. В некоторых вариантах осуществления молекула эндоцитоза также способна специфично связываться с клеточным поверхностным рецептором.

[017] В некоторых вариантах осуществления молекулу эндоцитоза выбирают из группы, состоящей из фолата и его аналогов, пептида, способного опосредовать эндоцитоз, и проникающего в клетки пептида.

[018] В некоторых вариантах осуществления линкер, предложенный в рамках изобретения, представляет собой пептидный линкер, дисульфидный линкер или рН-зависимый линкер.

[019] В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер расщепляется в определенной физиологической среде посредством расщепления протеазой или восстановления. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер выбирают из группы, состоящей из валин-цитруллина, фенилаланин-лизина и валин-лизина.

[020] В некоторых вариантах осуществления дисульфидный линкер выбирают из группы, состоящей из DMDS, MDS, DSDM и NDMDs.

[021] В некоторых вариантах осуществления рН-зависимый линкер представляет собой *цис*-аконитовый ангидрид.

[022] В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение или его фармацевтически приемлемая соль содержат по меньшей мере одну полезную нагрузку. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение или его фармацевтически приемлемая соль содержат одну, две, три, четыре или большее количество полезных нагрузок.

[023] В некоторых вариантах осуществления изобретения полезную нагрузку выбирают из группы, состоящей из низкомолекулярного соединения, нуклеотида, пептида, белка и наночастицы. В некоторых вариантах осуществления изобретения полезная нагрузка представляет собой низкомолекулярное соединение. В некоторых вариантах осуществления изобретения, полезная нагрузка представляет собой терапевтический агент.

[0024] В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение представляет собой полилигандное конъюгированное соединение, которое содержит полезную нагрузку, два, три или несколько видов лигандов и, необязательно, линкер или спейсер. В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой билигандное конъюгированное соединение, которое содержит полезную нагрузку, два вида лигандов и, необязательно, линкер и/или спейсер. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение представляет собой трилигандное конъюгированное соединение, которое содержит полезную нагрузку, три вида лигандов и, необязательно, линкер и/или спейсер. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение выбирают из группы, состоящей из следующих соединений: LDC10B, LDC10BR, LDC10BX, LDC11B, LDC12B, LDC13B, LDC1013, LDC10H, LDC11H, LDC12H, показанных на фиг.1 в настоящем документе.

[0025] В другом аспекте настоящей заявки раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая конъюгированное соединение, описанное в настоящем изобретении, или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят внутривенно, подкожно, перорально, внутримышечно, парентерально или интравентрикулярно.

[0026] В другом аспекте настоящего заявки раскрыт способ доставки полезной нагрузки пациенту, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества конъюгированного соединения, описанного в настоящем изобретении, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции, предложенной в настоящем изобретении.

[0027] В другом аспекте настоящей заявки раскрыт способ лечения заболевания у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества конъюгированного соединения, описанного в настоящем изобретении, или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции, предложенной в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления заболевание выбрано из группы, состоящей из ракового заболевания, иммунологического заболевания, сердечно-сосудистого заболевания, метаболического заболевания и неврологического заболевания.

[028] В некоторых вариантах осуществления раковое заболевание выбирают из группы, состоящей из рака молочных желез, рака легких, рака предстательной железы, рака почек, рака яичников, рака желудка, рака матки, рака эндометрия, рака печени, рака щитовидной железы, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки, колоректального рака, рака пищевода, рака кожи, лимфомы, лейкемии и множественной миеломы.

[029] В некоторых вариантах осуществления иммунологическое заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание. В некоторых вариантах осуществления аутоиммунное заболевание выбирают из группы, состоящей из болезни соединительных тканей, системного склероза, ревматоидного артрита и системной красной волчанки.

[030] В некоторых вариантах осуществления сердечно-сосудистое заболевание выбирают из группы, состоящей из стенокардии, инфаркта миокарда, инсульта, сердечного приступа, гипертонической болезни сердца, ревматической болезни сердца, кардиомиопатии, сердечной аритмии и врожденного порока сердца.

[031] В некоторых вариантах осуществления метаболическое заболевание выбирают из группы, состоящей из диабета, подагры, ожирения, гипогликемии, гипергликемии и дислипидемии.

[032] В некоторых вариантах осуществления неврологическое заболевание выбирают из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, болезни Хантингтона, травмы головы, рассеянного склероза, головокружения, комы и эпилепсии.

[033] В некоторых вариантах осуществления способ, предложенный в настоящем описании, дополнительно включает введение одного или нескольких терапевтических агентов в комбинации с конъюгированным соединением, предложенным в настоящем описании, или с его фармацевтически приемлемой солью, или фармацевтической композицией, предложенной в данном описании. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент направлен на раковую терапевтическую мишень, индуцирует или усиливает противораковый иммунный ответ, или является химиотерапевтическим агентом.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

[034] На фиг.1 показаны структуры LDC10B, LDC10BR, LDC10BX, LDC11B, LDC12B, LDC13B, LDC10I3, LDC10H, LDC11H и LDC12H.

[035] На фиг.2 приведены результаты тестов на эндоцитоз для LDC10B. На панелях А и В показано, что фолат-FITC входит в клетки KB (положительные по фолатному рецептору клетки), но не в клетки A375 (отрицательные по фолатному рецептору клетки); на панелях С и D показано, что 10A-FITC не может войти ни в клетки KB, ни в клетки

A375; на панелях E и F показано, что билигандный конъюгат 10B-FITC входит клетки KB, но не в клетки A375.

[036] На фиг.3 показаны структуры фолат-FITC, 10A-FITC и 10B-FITC.

[037] На фиг.4 приведена визуализация на живых мышах, показывающая флуоресцентно меченный LDC10B-Cy5, концентрирующийся в местоположении опухоли.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[038] Хотя в рамках изобретения будут описаны различные аспекты и варианты осуществления, очевидно, что специалисты в данной области техники могут провести различные эквивалентные изменения и модификации аспектов и вариантов осуществления изобретения, не выходя за пределы сути и объема настоящего изобретения. Различные аспекты и варианты осуществления изобретения, раскрытые в рамках изобретения, предназначены только для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения изобретения, где истинный объем изобретения указан в прилагаемой формуле изобретения. Все публикации, патенты или заявки на патент, процитированные в рамках изобретения, полностью включены в него путем ссылки. Если не указано иное, то технические и научные термины, используемые в рамках изобретения, имеют такие же значения, которые обычно понятны специалисту в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение.

[039] Используемые в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Термины «один», «один или несколько» и «по меньшей мере один» могут использоваться в рамках изобретения взаимозаменяемо. Следует также отметить, что термины «содержащий», «включающий» и «имеющий» могут использоваться взаимозаменяемо.

[040] В одном из аспектов настоящей заявки описано конъюгированное соединение или его фармацевтически приемлемая соль, содержащие полезную нагрузку и два или несколько видов взаимодействующих с клетками молекул, где полезная нагрузка конъюгирована по меньшей мере с одной из взаимодействующих с клетками молекул.

[041] Термин «полезная нагрузка», используемый в данном описании, относится к молекуле или веществу, которые должны быть доставлены в клетки-мишени или ткани-мишени. Без каких-либо ограничений, полезная нагрузка может представлять собой любое фармацевтическое соединение, которое предназначено для использования в диагностике, лечении или профилактике заболевания у пациента.

[042] В некоторых вариантах осуществления изобретения полезная нагрузка представляет собой низкомолекулярное соединение, нуклеотид (например, ДНК, плазмидную ДНК, РНК, киРНК, антисмысловые олигонуклеотиды, аптамеры и т.д.), пептид, белок (например, ферменты) или наночастицу. В некоторых вариантах осуществления изобретения полезная нагрузка представляет собой низкомолекулярное соединение. В некоторых вариантах осуществления низкомолекулярное соединение выбирают из группы, состоящей из майтанзина и любых его производных, таксинола и любых его производных, ауристатинов и любых их производных, эпотилонов и любых их производных, блеомицина и любых его производных, дактиномицина и любых его производных, пликамицина и любых его производных, и миромидина C. В некоторых вариантах осуществления изобретения полезная нагрузка представляет собой ауристатины или любые их производные. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическое соединение представляет собой химиотерапевтический агент, который используется для подавления или лечения раковых заболеваний.

[0043] В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение или его

фармацевтически приемлемая соль, описанные в рамках изобретения, содержат одну полезную нагрузку. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение или его фармацевтически приемлемая соль, описанные в рамках изобретения, содержат по меньшей мере одну полезную нагрузку. Например, конъюгированное соединение
 5 или его фармацевтически приемлемая соль содержат одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать, двадцать или большее число полезных нагрузок. В конъюгированной молекуле, содержащей несколько полезных нагрузок, каждая из полезных нагрузок может быть одной и той же, или они могут отличаться друг от друга. В некоторых вариантах осуществления
 10 по меньшей мере две из полезных нагрузок отличаются друг от друга.

[044] Термин «взаимодействующая с клетками молекула», используемый в рамках изобретения, относится к любой молекуле или элементу, которые могут взаимодействовать с клеткой-мишенью или клеточным поверхностным рецептором
 15 клетки-мишени, чтобы индуцировать или облегчить специфичное связывание конъюгированной молекулы, содержащей такую взаимодействующую с клетками молекулу, с клеткой-мишенью, эндоцитоз конъюгированной молекулы клеткой-мишенью и/или иным образом вызвать специфичную ассоциацию и удержание конъюгированной молекулы на клетке-мишени.

[045] Взаимодействующими с клетками молекулами могут быть низкомолекулярные химические соединения или крупные биомолекулы. В некоторых вариантах осуществления взаимодействующие с клетками молекулы представляют собой антитела, лиганды или молекулы эндоцитоза. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из взаимодействующих с клетками молекул представляет собой лиганд,
 25 способный связываться с клеточным поверхностным рецептором. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из взаимодействующих с клетками молекул представляют собой молекулу эндоцитоза, способную опосредовать эндоцитоз.

[0046] Лиганды, раскрытые в настоящем изобретении, могут включать широкий спектр химических или биологических объектов, которые могут иметь специфичную
 30 аффинность связывания с выбранной мишенью, например, с клеточным поверхностным рецептором, клеткой, тканью, органом и т.д. В некоторых вариантах осуществления изобретения лиганд может специфично связываться с белком или маркером, экспрессируемым на поверхности клеток-мишеней. В некоторых вариантах осуществления лиганды по настоящему изобретению связываются с клеточными
 35 поверхностными рецепторами с аффинностью 10^{-6} ~ 10^{-9} (значение K_d). В некоторых вариантах осуществления лиганды связываются с клеточными поверхностными рецепторами с аффинностью по меньшей мере 10^{-7} , по меньшей мере 10^{-8} , по меньшей мере 10^{-9} М (значение K_d). В некоторых вариантах осуществления лиганды по
 40 настоящему изобретению связываются с клеточными поверхностными рецепторами с аффинностью, которая по меньшей мере в два, три, четыре или большее число раз выше в отношении рецептора на поверхности клетки-мишени, чем в отношении других не являющихся мишенями белков или маркеров на клеточной поверхности.

[047] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения два или
 45 несколько видов взаимодействующих с клетками молекул по настоящему изобретению представляют собой два или несколько видов лигандов, которые способны специфично связываться с различными клеточными поверхностными рецепторами. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение или его фармацевтически

приемлемая соль по настоящему изобретению содержат два лиганда, где первый лиганд способен специфично связываться с первым клеточным поверхностным рецептором, и второй лиганд способен специфично связываться с вторым клеточным поверхностным рецептором. В некоторых вариантах осуществления конъюгированная молекула
 5 содержит два лиганда, где первый лиганд способен специфично связываться с фолатным рецептором, второй лиганд способен специфично связываться с рецептором рилизинг-гормона лютеинизирующего гормона (LHRH-рецептором). В некоторых вариантах осуществления конъюгированная молекула содержит три лиганда, где первый лиганд способен специфично связываться с фолатным рецептором, второй лиганд способен
 10 специфично связываться с LHRH-рецептором, и третий лиганд способен специфично связываться с рецептором SST-14.

[048] В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение или его фармацевтически приемлемая соль, раскрытые в настоящем изобретении, содержат две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать,
 15 тринадцать, четырнадцать, пятнадцать, шестнадцать, семнадцать, восемнадцать, девятнадцать, двадцать или большее число взаимодействующих с клетками молекул. В конъюгированной молекуле, каждая из взаимодействующих с клетками молекул может быть одинаковой, или они могут отличаться друг от друга. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере две из взаимодействующих с клетками
 20 молекул отличаются друг от друга. В некоторых вариантах осуществления изобретения все из взаимодействующих с клетками молекул отличаются друг от друга.

[049] В некоторых вариантах осуществления конъюгированная молекула, предложенная в настоящем изобретении, содержит только одну полезную нагрузку, конъюгированную с несколькими взаимодействующими с клетками молекулами. В
 25 некоторых вариантах осуществления конъюгированная молекула, предложенная в настоящем изобретении, содержит несколько полезных нагрузок, конъюгированных с несколькими взаимодействующими с клетками молекулами.

[050] Термин «конъюгированный», используемый в настоящем описании, относится к связыванию ковалентной связью двух химических групп либо напрямую с
 30 образованием ковалентной связи между двумя химическими группами, либо непрямым образом со связыванием двух химических групп через линкер.

[051] В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение или его фармацевтически приемлемая соль содержат полезную нагрузку и два или несколько видов взаимодействующих с клетками молекул, где полезная нагрузка ковалентно
 35 связана по меньшей мере с одной из взаимодействующих с клетками молекул напрямую. В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка ковалентно связана с каждой из взаимодействующих с клетками молекул напрямую.

[052] В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение или его фармацевтически приемлемая соль содержат полезную нагрузку и два или несколько видов взаимодействующих с клетками молекул, где полезная нагрузка ковалентно
 40 связана по меньшей мере с одной из взаимодействующих с клетками молекул через линкер. В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка ковалентно связана с каждой из взаимодействующих с клетками молекул через линкер.

[053] Термин «линкер», используемый в настоящем описании, относится к молекуле
 45 или группе, которая ковалентно связывает полезную нагрузку с взаимодействующей с клетками молекулой. Линкер включает функциональные группы для связывания с полезной нагрузкой и по меньшей мере с одной из взаимодействующих с клетками молекул. В некоторых вариантах осуществления функциональные группы могут

включать две реакционноспособные группы - одну для связывания с полезной нагрузкой, а другую для связывания с взаимодействующей с клетками молекулой. В некоторых вариантах осуществления функциональные группы отличаются друг от друга. В некоторых вариантах осуществления функциональные группы включают группу, содержащую тиольную реакционноспособную группу и аминокислотную группу. В некоторых вариантах осуществления функциональные группы идентичны друг другу. В некоторых вариантах осуществления функциональными группами являются малеимидные группы.

[054] В некоторых вариантах осуществления линкерами по настоящему изобретению являются поливалентные линкеры, которые могут связывать по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или большее число) полезную нагрузку и по меньшей мере две (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или большее число) взаимодействующих с клетками молекулы. Полезные нагрузки, связанные с поливалентными линкерами, могут быть одинаковыми или различными, взаимодействующие с клетками молекулы, связанные с поливалентными линкерами, могут быть одинаковыми или различными.

[055] В одном аспекте, линкеры должны быть достаточно стабильными, чтобы избежать от непреднамеренного высвобождения полезной нагрузки во время циркуляции в крови для увеличения эффективного количества полезной нагрузки в клетках-мишенях или ткани-мишени, и для того, чтобы избежать токсичности. В другом аспекте линкеры должны быть в состоянии высвобождать полезную нагрузку около или внутри клеток-мишеней, чтобы эффективно убивать клетки-мишени или блокировать функции клеток-мишеней. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит по меньшей мере одну расщепляемую функциональную группу. Предпочтительно, чтобы расщепляемая функциональная группа была достаточно стабильной вне клетки-мишени, но расщеплялась при входе в клетку-мишень, высвобождая полезную нагрузку. В некоторых вариантах осуществления расщепляемые функциональные группы расщепляются по меньшей мере в 10, 20, 30, 50, 100 раз или более эффективно в клетках-мишенях, чем в крови или в сыворотке крови пациента.

[056] Расщепляемые линкеры могут расщепляться путем гидролиза, ферментативной реакции или реакции восстановления, или путем изменения pH. В некоторых вариантах осуществления линкер расщепляется в определенной физиологической среде, например, при соответствующем pH среды. В некоторых вариантах осуществления линкер расщепляется в кислой среде с pH около 6,5 или ниже, или с помощью агентов, таких как ферменты, которые могут действовать как обычная кислота. В некоторых вариантах осуществления, линкер чувствителен к расщепляющим агентам, например, pH, окислительно-восстановительному потенциалу или присутствию разрушающих молекул.

[057] В некоторых вариантах осуществления линкер является нерасщепляемым. Нерасщепляемые линкеры в контексте настоящего изобретения относятся к линкерам, которые не изменяются (остаются интактными) в ходе внутриклеточного метаболизма.

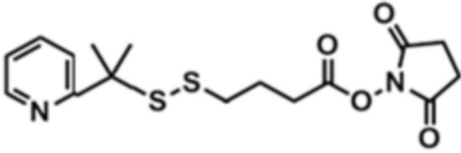
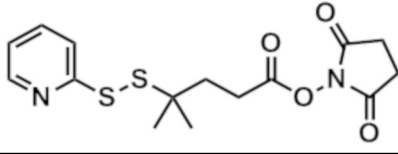
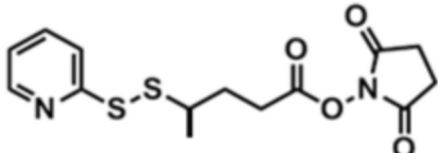
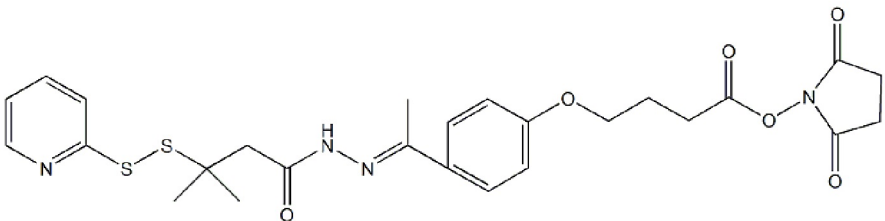
[058] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой пептидный линкер, состоящий из прямой или разветвленной аминокислотной цепи, соединенной пептидными связями. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер расщепляется протеазой, которая на высоком уровне или специфично экспрессируется около или внутри клеток-мишеней, например, катепсином В в лизосомах или эндосомах. Пептидные линкеры, используемые в настоящем изобретении, могут быть различной длины. Как правило, пептидный линкер по настоящему изобретению имеет от 1 до 50 аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер имеет

от 2 до 45, от 2 до 40, от 2 до 35, от 2 до 30, от 2 до 25, от 2 до 20, от 2 до 15, от 2 до 10, от 2 до 9, от 2 до 8, от 2 до 7, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4, от 2 до 3 аминокислот в длину. Количество аминокислот пептидного линкера, описанного в рамках изобретения, может быть равно любому целому значению в пределах указанного выше диапазона

числовых значений, включая конечные точки диапазона. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер предпочтительно имеет два, три, четыре, или пять аминокислот в длину. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер представляет собой валин-цитруллин (Val-Cit), фенилаланин-лизин или валин-лизин.

[059] В некоторых вариантах осуществления, линкер представляет собой дисульфидный линкер, содержащий дисульфидную связь. Дисульфидная связь может расщепляться внутриклеточной восстановительной окружающей средой, при этом оставаясь стабильной в кровотоке. Дисульфидный линкер по настоящему изобретению может представлять собой DSDM, DMDS, MDS или NDMDS. Структуры этих дисульфидных линкеров приведены в таблице 1 ниже.

Таблица 1: структуры DSDM, DMDS, MDS и NDMDS

Название	Структура
DSDM	
DMDS	
MDS	
NDMDS	

[060] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой pH-зависимый линкер. pH-зависимый линкер, описанный в рамках изобретения, может расщепляться в среде с определенным pH. В некоторых вариантах осуществления pH-зависимый линкер может быть стабильным в щелочных условиях, при этом расщепляясь в кислых условиях, например, при значениях pH, равных 6,5 или ниже. В некоторых вариантах осуществления pH-зависимый линкер представляет собой *цис*-аконитовый ангидрид.

[061] В некоторых вариантах осуществления линкер по настоящему изобретению содержит любой один или комбинацию линкеров из описанных выше. В некоторых вариантах осуществления линкер по настоящему изобретению может содержать спейсер

в качестве части линкера.

[062] В некоторых вариантах осуществления изобретения полезная нагрузка конъюгирована с первой взаимодействующей с клетками молекулой прямо или непрямо, а первая взаимодействующая с клетками молекула конъюгирована со второй взаимодействующей с клетками молекулой прямо или непрямо. В некоторых вариантах осуществления изобретения полезная нагрузка конъюгирована с каждой из первой и второй взаимодействующей с клетками молекулой напрямую. В некоторых вариантах осуществления изобретения полезная нагрузка конъюгирована с каждой из первой и второй взаимодействующей с клетками молекулой не напрямую. В некоторых вариантах осуществления изобретения полезная нагрузка конъюгирована с первой взаимодействующей с клетками молекулой не напрямую, например, через линкер, а первая взаимодействующая с клетками молекула конъюгирована со второй взаимодействующей с клетками молекулой прямо или непрямо. В некоторых вариантах осуществления изобретения полезная нагрузка конъюгирована с первой взаимодействующей с клетками молекулой через первый линкер, и полезная нагрузка конъюгирована со второй взаимодействующей с клетками молекулой через второй линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой поливалентный линкер, который связывает по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или большее число) полезную нагрузку и по меньшей мере два (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять или большее число) лиганда. Поливалентный линкер также может быть использован для получения конъюгированной молекулы, содержащей нескольких полезных нагрузок и множество взаимодействующих с клетками молекул.

[063] В некоторых вариантах осуществления две взаимодействующие с клетками молекулы могут быть связаны друг с другом через спейсер. В некоторых вариантах осуществления один или несколько спейсеров используются для связи двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти, десяти или большего числа взаимодействующих с клетками молекул. В некоторых вариантах осуществления изобретения спейсер расщепляется протеазами, которые специфично экспрессируются клетками-мишенями, или экспрессия которых запускается в клетках-мишенях. Такие протеазы включают, например, протеазы, которые перечислены в таблице 2 ниже. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения спейсер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей, перечисленных в таблице 2 ниже.

Таблица 2: список ферментативно расщепляемых последовательностей

Протеаза	Аминокислотная последовательность сайта узнавания	SEQ ID NO.
Катепсин В	RR	-
Легумаин	ASN	-
Матрипаза	KSRAEDE	SEQ ID NO: 1
MMP-2	PLGLAG	SEQ ID NO: 2
Простат-специфический антиген	SSLY	SEQ ID NO: 3
Стромелизин-3	AAA	-
TMPRSS2	LLRSLIG	SEQ ID NO: 4
Активатор плазминогена урокиназного типа	SSR	-
Активированный белок C	IVKR	SEQ ID NO: 5
Фактор Ixa	IVVR	SEQ ID NO: 6
Фактор VIIa	QLTR	SEQ ID NO: 7
Фактор Ха	LEGR	SEQ ID NO: 8

Тромбин	PR	-
Калпаин-а	PLFAEP	SEQ ID NO: 9
Калпаин-2	GLGSEP	SEQ ID NO: 10
Энтеропептидаза	DDDDK	SEQ ID NO: 11
ММР-8	GPSG	SEQ ID NO: 12
Катепсин L	PLG	-
Конвертаза пробелка 5	RSKR	SEQ ID NO: 13
Калпаин-3	VGVF	SEQ ID NO: 14

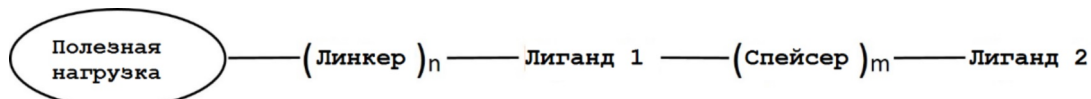
[064] Термины «расщепляемый» или «расщепленный», используемые в настоящем описании, относятся к метаболическому процессу или реакционному процессу с участием конъюгированного соединения, предложенного в настоящем описании, посредством чего линкер между полезной нагрузкой и взаимодействующей с клетками молекулой, или спейсер между взаимодействующими с клетками молекулами разрушается, высвобождая свободную полезную нагрузку или взаимодействующую с клетками молекулу. Линкер и спейсер расщепляются протеазами или расщепляются в определенном физиологическом окружении, например, при определенном pH.

[065] В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение или его фармацевтически приемлемая соль, описанные в рамках изобретения, содержат полезную нагрузку, конъюгированную с тремя лигандами, где первый лиганд способен специфично связываться с первым клеточным рецептором, второй лиганд способен специфично связываться со вторым клеточным рецептором, и третий лиганд способен специфично связываться с третьим клеточным поверхностным рецептором.

[066] В некоторых вариантах осуществления третий лиганд конъюгирован с первым лигандом прямо или непрямо, например, через спейсер. В некоторых вариантах осуществления третий лиганд конъюгирован с полезной нагрузкой прямо или непрямо, например, через линкер. В некоторых вариантах осуществления первый лиганд конъюгирован со вторым лигандом прямо или непрямо, например, через спейсер, а второй лиганд конъюгирован с третьим лигандом, прямо или непрямо, например, через спейсер.

[067] В некоторых вариантах осуществления первый клеточный поверхностный рецептор, второй клеточный поверхностный рецептор и третий клеточный поверхностный рецептор отличаются друг от друга либо по структуре, либо по функциям. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере два из первого клеточного поверхностного рецептора, второго клеточного поверхностного рецептора и третьего клеточного поверхностного рецептора отличаются друг от друга, либо по структуре, либо по функциям. В некоторых вариантах осуществления первый лиганд, второй лиганд и третий лиганд являются одинаковыми.

[068] В некоторых вариантах осуществления конъюгированная молекула имеет структуры по формулам I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX или X, показанным ниже, где n, m, p, q, r и s, независимо, равны 0 или 1, что соответствует тому, что линкер и спейсер могут присутствовать или отсутствовать независимо друг от друга.



(Формула I)

5

10

15

20

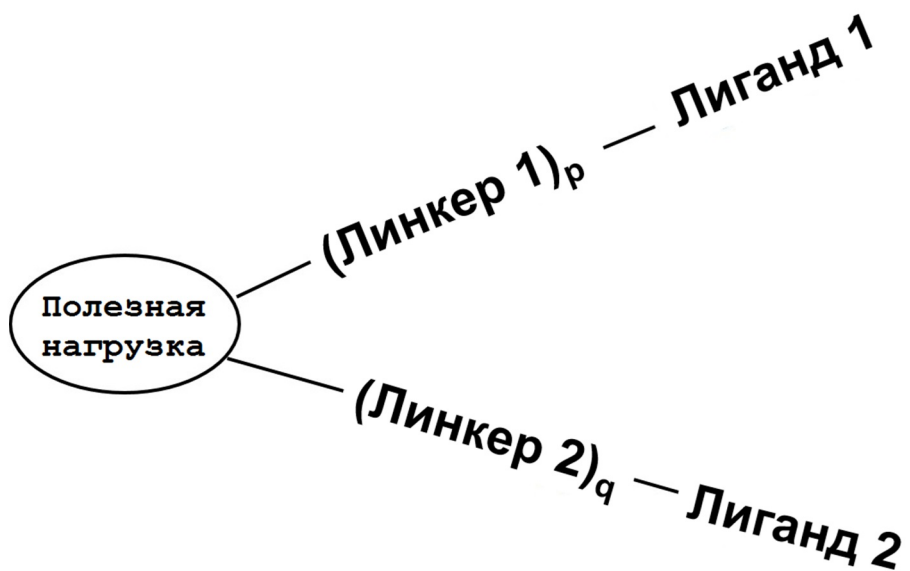
25

30

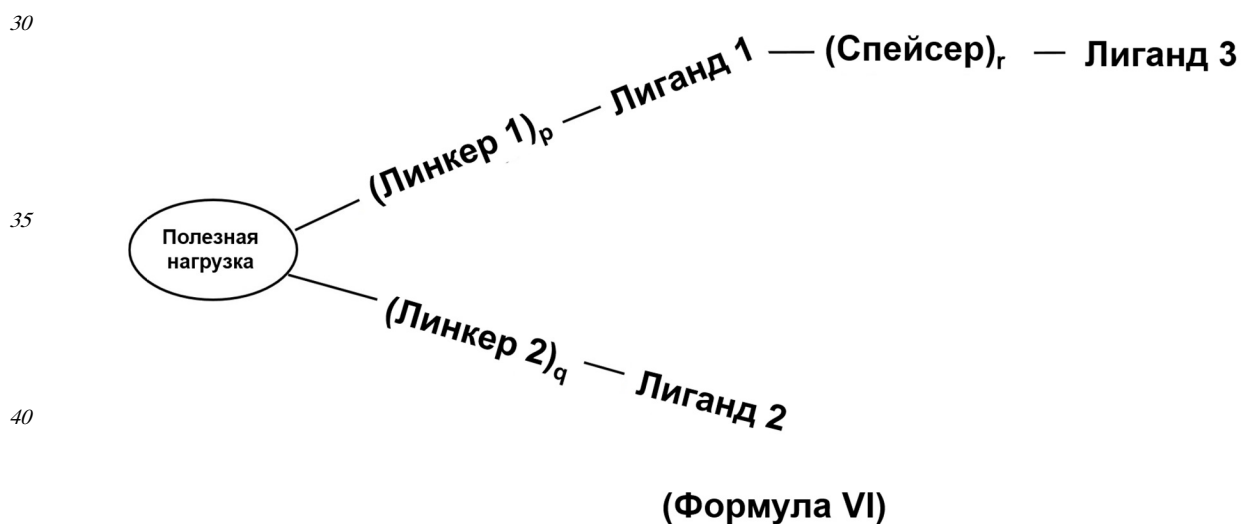
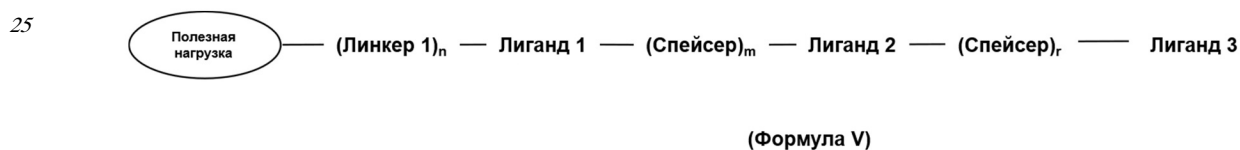
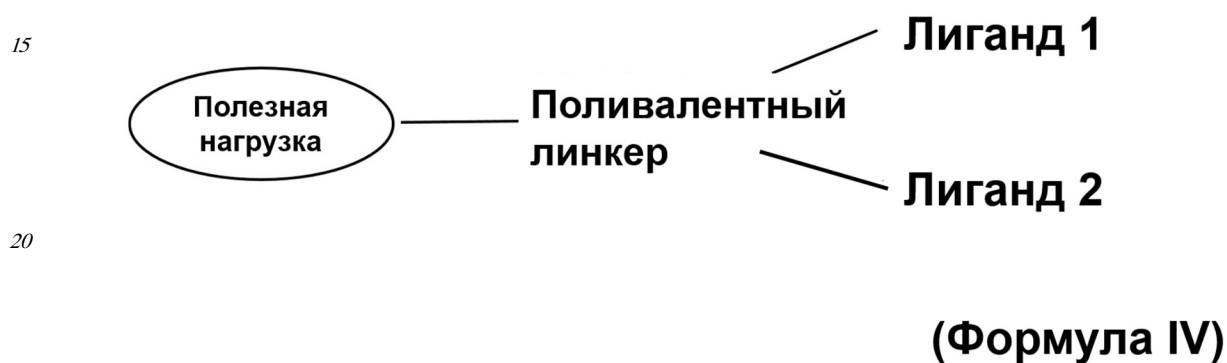
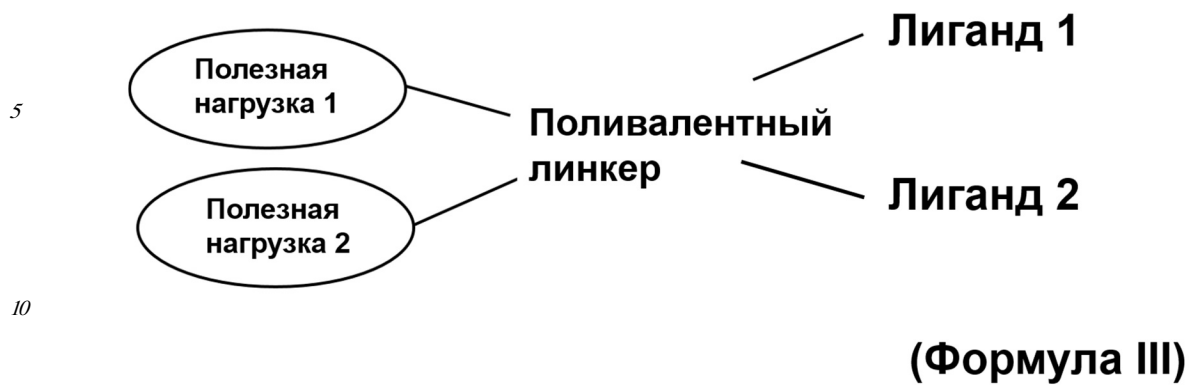
35

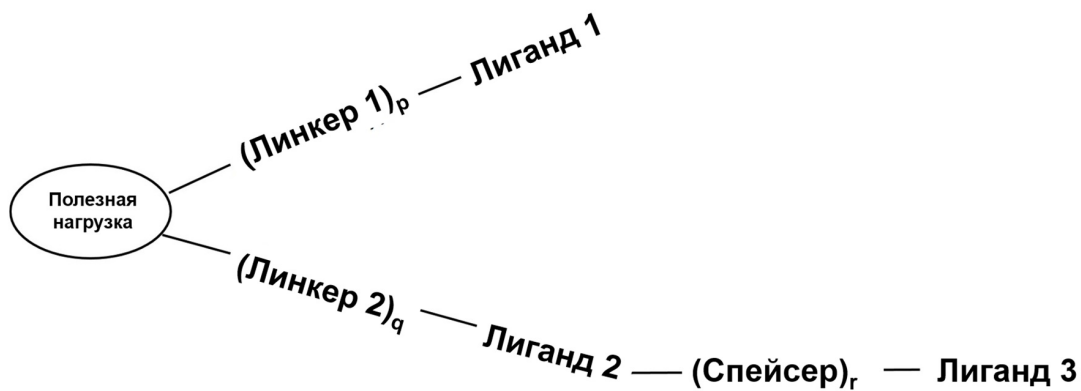
40

45



(Формула II)





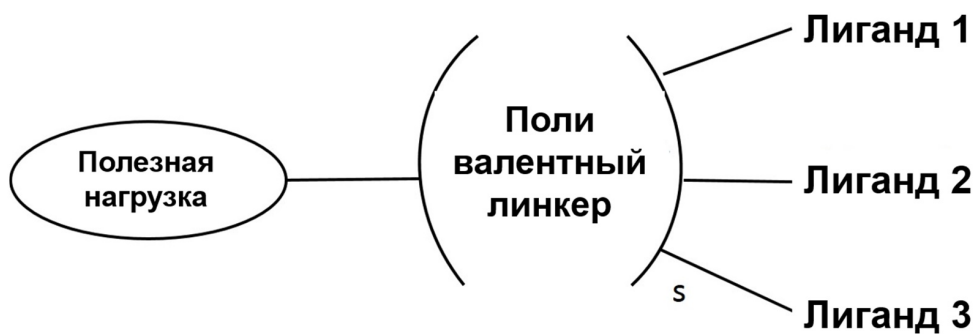
(Формула VII)



(Формула VIII)



(Формула IX)



(Формула X)

[069] В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения

экспрессия клеточных поверхностных рецепторов в клетках-мишенях (например, в раковых клетках) значительно выше, чем в нормальных клетках. Термин «существенно», используемый в рамках изобретения, относится к статистически значимым различиям или существенным различиям, которые могут признаваться специалистом в данной области техники.

[070] В некоторых вариантах осуществления уровни экспрессии рецепторов на клеточных поверхности в 2-1000000 раз выше в клетках-мишенях (например, в раковых клетках), чем в нормальных клетках, например, в 2-10, 2-100, 2-1000, 2-10000, 2-100000, 2-1000000 раз (может быть равно любому значению в пределах вышеуказанных диапазонов числовых значений, включая конечные точки диапазона) выше в клетках-мишенях (например, в раковых клетках), чем в нормальных клетках. В некоторых вариантах осуществления уровни экспрессии клеточных поверхностных рецепторов по меньшей мере в 10 раз выше или 100 раз выше, или в 1000 раз выше, или в 10000 раз выше, или в 100000 раз выше в клетках-мишенях (например, в раковых клетках), чем в нормальных клетках. В некоторых вариантах осуществления уровень клеточного поверхностного рецептора на нормальных клетках снижен по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% по сравнению с уровнем клеточного поверхностного рецептора на клетках-мишенях (например, на раковых клетках). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения клеточные поверхностные рецепторы, описанные в рамках изобретения, не обнаруживаются на нормальных клетках.

[071] В некоторых вариантах осуществления первый, второй и третий клеточные поверхностные рецепторы независимо выбирают из группы, состоящей из трансферринового рецептора (TFR), рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLR), фолатного рецептора (FR), киназного рецептора мочевой кислоты, рецептора фактора некроза опухолей (TNFR), интегринового рецептора LFA-1, рецептора SST-14, рецептора LHRH, рецептора TRPV6 и рецептора поверхностного антигена протеазы.

[072] В некоторых вариантах осуществления первый лиганд, второй лиганд и третий лиганд являются одинаковыми. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере двое из первого лиганда, второго лиганда и третьего лиганда отличаются друг от друга. В некоторых вариантах осуществления первый лиганд, второй лиганд и третий лиганд способны специфично связываться с одним рецептором на поверхности клетки. В некоторых вариантах осуществления первый лиганд, второй лиганд и третий лиганд способны специфично связываться с различными клеточными поверхностными рецепторами. В некоторых вариантах осуществления каждый из первого лиганда, второго лиганда и третьего лиганда способен связываться с двумя или несколькими различными клеточными поверхностными рецепторами.

[073] В некоторых вариантах осуществления первый лиганд, второй лиганд и третий лиганд независимо выбирают из группы, состоящей из фолата и его аналогов, и пептида. В некоторых вариантах осуществления первый лиганд, второй лиганд и третий лиганд независимо представляют собой фолат или его аналоги, и по меньшей мере двое лигандов отличаются друг от друга. В некоторых вариантах осуществления аналоги фолата выбирают из группы, состоящей из 5-метилтетрагидрофолата, 5-формилтетрагидрофолата, сульфаниламида, метотрексата и 5,10-метилентетрагидрофолата.

[074] В некоторых вариантах осуществления первый лиганд, второй лиганд и третий лиганд, независимо, представляют собой пептиды. В некоторых вариантах осуществления пептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18,

RGD, гомологичного пептида, имеющего по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% гомологии по аминокислотной последовательности с любой из SEQ ID NO: 15-18, где гомологичные пептиды являются функциональными эквивалентами пептидов SEQ ID NO: 15-18, соответственно.

[075] Термин «процент (%) гомологии с», используемый в рамках изобретения, в случае аминокислотных последовательностей относится к проценту идентичности между двумя аминокислотными последовательностями после выравнивания исследуемой и эталонной последовательностей и при необходимости введения разрывов, чтобы достичь максимального количества идентичных аминокислот, а в случае нуклеотидных последовательностей относится к проценту идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями после выравнивания исследуемой и эталонной последовательностей и при необходимости введения разрывов, чтобы достичь максимального количества идентичных нуклеотидов.

[076] Процент гомологии может быть определен с помощью различных хорошо известных методов в данной области техники. Например, сравнение последовательностей может быть осуществлено с помощью следующих общедоступных инструментов: программного обеспечения BLASTP (доступного на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации (NCBI) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, также см. Altschul S.F. et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990); Stephen F. et al, Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402 (1997)), ClustalW2 (доступного на веб-сайте Европейского института биоинформатики: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>, также см. Higgins D.G. et al., Methods in Enzymology, 266:383-402 (1996); Larkin M.A. et al., Bioinformatics (Oxford, England), 23(21): 2947-8 (2007)) и Tcoffee (доступного на веб-сайте Шведского института биоинформатики, также см. Poirot O. et al., Nucleic Acids Res., 31(13): 3503-6 (2003); Notredame C. et al., J. Mol. Biol., 302(1): 205-17 (2000)). Если выравнивание последовательностей осуществляется с помощью программного обеспечения, могут быть использованы параметры по умолчанию, которые доступны в программном обеспечении, или в ином случае параметры могут быть настроены в соответствии с целью выравнивания. Все это входит в пределы объема знаний специалиста в данной области техники.

[077] Термин «функциональный эквивалент», используемый в настоящем описании, относится к производному пептида, которое сохраняет биологическую активность, по существу аналогичную активности исходной пептидной последовательности, от которой происходит производное пептида. Функциональный эквивалент может представлять собой природное производное или может быть получен синтетически. Примеры функциональных эквивалентов включают аминокислотные последовательности, имеющие замены, делеции или добавления одной или нескольких аминокислот, при условии, что сохраняется биологическая активность пептида. Желательно, чтобы замещающая аминокислота имела физико-химические свойства, подобные физико-химическим свойствам замещаемой аминокислоты. Желательные подобные физико-химические свойства включают сходство по заряду, объемности, гидрофобности, гидрофильности и т.п.

[078] В некоторых вариантах осуществления функциональные эквиваленты включают консервативную замену аминокислотных остатков. Консервативная замена аминокислотных остатков относится к замене между аминокислотами с аналогичными

свойствами, например, замене между полярными аминокислотами (например, замене между глутамином и аспарагином), замене между гидрофобными аминокислотами (например, замене между лейцином, изолейцином, метионином и валином), а также к замене между аминокислотами с одинаковыми зарядами (например, замене между аргинином, лизином и гистидином, или замене между глутаминовой кислотой и аспарагиновой кислотой), и т.д.

[079] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из взаимодействующих с клетками молекул в конъюгированном соединении или в его фармацевтически приемлемой соли представляет собой молекулу эндоцитоза, способную опосредовать эндоцитоз.

[080] Термин «молекула эндоцитоза», используемый в настоящем описании, относится к молекуле, которая может опосредовать эндоцитоз, интернализацию или поглощение клетками-мишенями конъюгированного соединения, раскрытого в рамках изобретения, или его фармацевтически приемлемой соли после взаимодействия такой молекулы с клетками-мишенями.

[081] В некоторых вариантах осуществления молекулу эндоцитоза выбирают из группы, состоящей из фолата и его аналогов, пептида, способного опосредовать эндоцитоз, и проникающего в клетки пептида.

[082] В некоторых вариантах осуществления молекула эндоцитоза также способна специфично связываться с клеточным поверхностным рецептором. В некоторых вариантах осуществления молекула эндоцитоза, предложенная в настоящем описании, является фолатом или его аналогами. В некоторых вариантах осуществления, аналоги фолата выбирают из группы, состоящей из 5-метилтетрагидрофолата, 5-формилтетрагидрофолата, сульфаниламида, метотрексата и 5,10-метилентетрагидрофолата.

[083] Фолат удобен для формирования химической связи с другими группами благодаря своему небольшому молекулярному весу, отсутствию иммуногенности и хорошей стабильности. Фолат может связываться с высоким сродством с фолатными рецепторами, экспрессирующимися на поверхности клетки, опосредуя поглощение фолата клеткой. Несмотря на очень низкую экспрессию в большинстве нормальных клеток, фолатные рецепторы экспрессируются на высоком уровне во множестве раковых клеток, чтобы удовлетворить высокий спрос на фолат быстро делящихся клеток в условиях низкого содержания фолата (см. Kelemen LE, *Int J Cancer*, 2006; 119: 243-50; Kane MA, et al., *J Clin Invest.* 1988; 81: 1398-406; Matsue H, et al., *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89: 6006-9; Zhao R, et al., *Annu Rev Nutr*. 2011; 31: 177-201). Фолат способен специфично связываться с фолатными рецепторами на поверхности клеток, и также представляет собой молекулу эндоцитоза, способную опосредовать эндоцитоз конъюгированного соединения или его фармацевтически приемлемой соли клетками-мишенями.

[084] В некоторых вариантах осуществления молекула эндоцитоза представляет собой пептид, способный опосредовать эндоцитоз. В некоторых вариантах осуществления молекула эндоцитоза дополнительно способна специфично связываться с клеточным поверхностным рецептором. В некоторых вариантах осуществления пептид, способный опосредовать эндоцитоз, включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, RGD, гомологичного пептида, имеющего по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере

95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% гомологии по аминокислотной последовательности с любой из SEQ ID NO: 16-18, где гомологичные пептиды представляют собой функциональные эквиваленты пептидов SEQ ID NO: 16-18, соответственно.

5 [085] В некоторых вариантах осуществления молекула эндоцитоза представляет собой проникающий в клетки пептид. Проникающие в клетки пептиды (CPP), также известные как трансдукционные белковые домены (PTD), представляют собой короткие пептиды (как правило, короче 40 аминокислот), способные получить доступ во
10 внутреннюю часть клеток независимо от рецептора. Проникающие в клетки пептиды при конъюгации с полезной нагрузкой способны опосредовать трансмембранный перенос полезной нагрузки и способны трансдуцировать белки. В некоторых вариантах осуществления проникающие в клетки пептиды, описанные в настоящем изобретении, выбирают из группы, состоящей из связывающегося с опухолевыми клетками пептида, митохондриального проникающего пептида, активируемого проникающего в клетки
15 пептида и антибактериального пептида. В некоторых вариантах осуществления проникающий в клетки пептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 19 (RRRRRRRRR, именуемым R9) и SEQ ID NO: 20 (GRKKRRQRRRPPQ, который является Tat-пептидом, а именно проникающим в клетки пептидом из белка-трансактиватора транскрипции ВИЧ).

20 [086] В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении пептид, способный опосредовать эндоцитоз, имеет консервативную аминокислотную замену только в одном аминокислотном сайте по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 16-20, RGD. В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении пептид, способный опосредовать эндоцитоз, имеет консервативные
25 аминокислотные замены в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 аминокислотных сайтах по сравнению с последовательностями SEQ ID NO: 16-20.

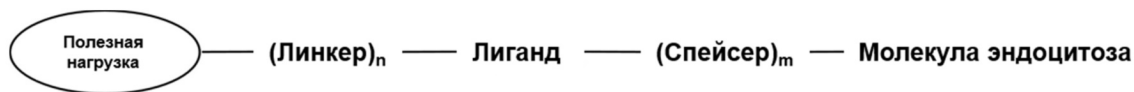
[087] При условии того, что это не повлияет на его биологическую активность, описанный в настоящем изобретении пептид, способный опосредовать эндоцитоз, может также содержать не встречающиеся в природе аминокислоты, включая, например,
30 β-фтор-аланин, 1-метил-гистидин, γ-метил-глутаминовую кислоту, α-метил-лейцин, 4,5-дегидро-лизин, гидроксипролин, 3-фтор-фенилаланин, 3-амино-тирозин, 4-метил-триптофан и т.п.

[088] В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение, предложенное в настоящем изобретении, или его фармацевтически приемлемая соль,
35 содержат по меньшей мере одну (например, одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять и большее количество) полезную нагрузку, предложенную в настоящем изобретении, по меньшей мере один (например, один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять и большее число) лиганд, предложенный в настоящем изобретении, по меньшей мере одну (например, один, два, три, четыре, пять, шесть,
40 семь, восемь, девять, десять и большее число) молекулу эндоцитоза, предложенную в настоящем изобретении, и, необязательно, линкер или спейсер, предложенные в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение, предложенное в настоящем изобретении, или его фармацевтически приемлемая соль, содержат одну полезную нагрузку, предложенную в настоящем изобретении, один лиганд, предложенный в настоящем изобретении, одну молекулу
45 эндоцитоза, предложенную в настоящем изобретении, и, необязательно, линкер или спейсер, предложенные в настоящем изобретении.

[089] В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение имеет

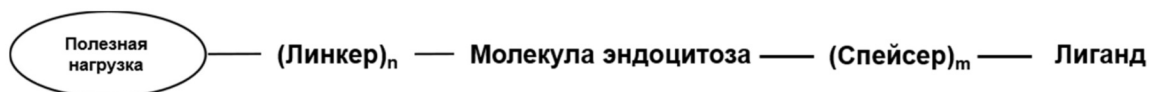
структуры по формулам XI, XII, XIII, XIII или XV, показанным ниже, где n, m, p, q, r и s, независимо, равны 0 или 1, что соответствует тому, что линкер и спейсер могут присутствовать или отсутствовать независимо друг от друга.

5



(Формула XI)

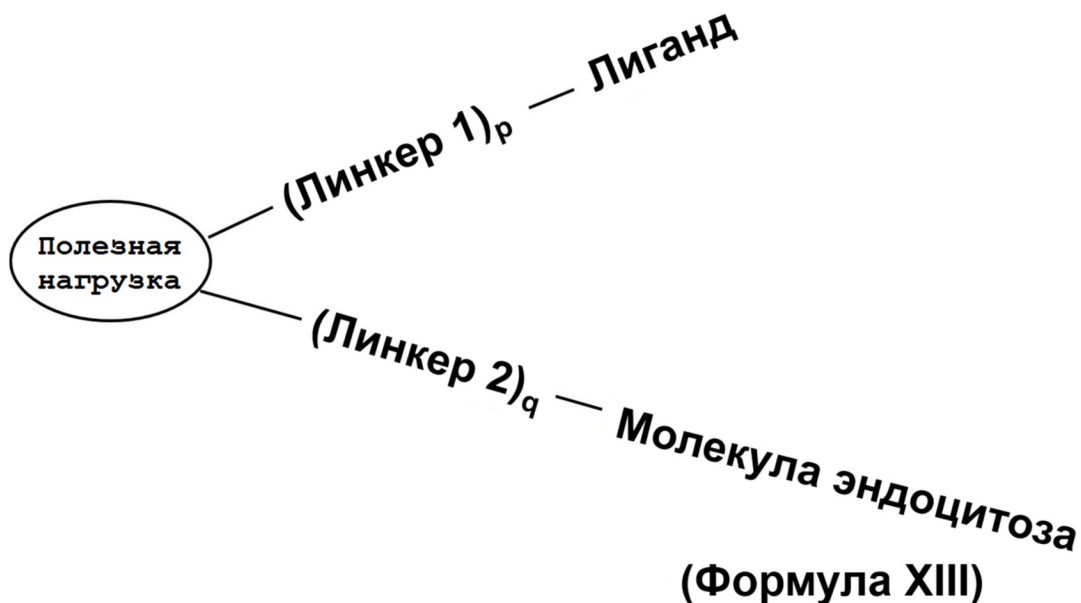
10



15

(Формула XII)

20



25

30

35



40

(Формула XIV)

45

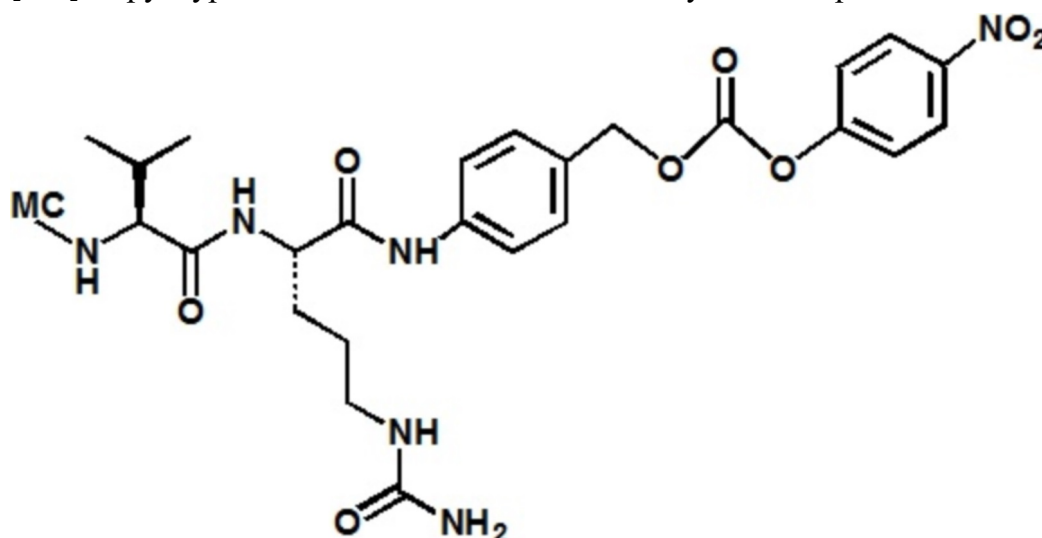
[090] В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение по настоящему изобретению выбирают из группы, состоящей из следующих соединений: LDC10B, LDC10BR, LDC10BX, LDC11B, LDC12B, LDC13B, LDC1013, LDC10H, LDC11H, LDC12H, LDC13H. Компоненты LDC10B, LDC10BR, LDC10BX, LDC11B, LDC12B,

LDC13B, LDC1013, LDC10H, LDC11H и LDC12H приведены в таблице 3 ниже.

Таблица 3: Компоненты конъюгированных соединений

Название конъюгированного соединения	Взаимодействующие с клетками молекулы	Линкер	Полезная нагрузка
LDC10B	Фолат; P10	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC10BR	Фолат; P10; RGD	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC10BX	Фолат; P10	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC11B	Фолат; P11	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC12B	Фолат; P12	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC13B	Фолат; P13	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC1013	P10; P13	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC10H	R9; P10	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC11H	R9; P11	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC12H	R9; P12	MC-Val-Cit-PAB	MMAE
LDC13H	R9; P13	MC-Val-Cit-PAB	MMAE

[091] Структура MC-Val-Cit-PAB выглядит следующим образом:



[092] Конкретные структуры LDC10B, LDC10BR, LDC10BX, LDC11B, LDC12B, LDC13B, LDC1013, LDC10H, LDC11H и LDC12H показаны на фиг.1.

[093] В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение, предложенное в настоящем изобретении, или его фармацевтически приемлемые соли содержат полезную нагрузку и две взаимодействующие с клетками молекулы, где одна представляет собой лиганд, способный специфично связываться с клеточным поверхностным рецептором, а другая представляет собой молекулу эндоцитоза, например, LDC10H, LDC10B, LDC1013. В некоторых вариантах осуществления молекула эндоцитоза также способна связываться с клеточным поверхностным рецептором, например, LDC10B, LDC1013. В некоторых вариантах осуществления молекула эндоцитоза представляет собой проникающую в клетки молекулу, например, LDC10H.

[094] В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение, предложенное в настоящем описании, или его фармацевтически приемлемые соли содержат полезную нагрузку и две взаимодействующих с клетками молекулы, которые обе являются молекулами эндоцитоза, например, LDC11B, LDC12B, LDC13B. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение, предложенное в настоящем описании, или его фармацевтически приемлемые соли содержат первую молекулу эндоцитоза и вторую молекулу эндоцитоза, где первая молекула эндоцитоза является одинаковой с второй молекулой эндоцитоза. В некоторых вариантах

осуществления конъюгированное соединение, предложенное в настоящем описании, или его фармацевтически приемлемые соли содержат первую молекулу эндоцитоза и вторую молекулу эндоцитоза, где первая молекула эндоцитоза отличается от второй молекулы эндоцитоза, например, LDC11B, LDC12B, LDC13B. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение, предложенное в настоящем описании, или его фармацевтически приемлемые соли содержат полезную нагрузку и две взаимодействующие с клетками молекулы, где обе молекулы эндоцитоза также способны специфично связываться с клеточными поверхностными рецепторами, например, LDC11B, LDC12B, LDC13B. В некоторых вариантах осуществления первая молекула эндоцитоза также способна специфично связываться с клеточным поверхностным рецептором, а вторая молекула эндоцитоза представляет собой проникающую в клетки молекулу, например, LDC11H, LDC12H, LDC13H.

[095] В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение, предложенное в настоящем описании, или его фармацевтически приемлемые соли содержат полезную нагрузку и две взаимодействующих с клетками молекулы, которые обе являются лигандами, способными специфично связываться с клеточными поверхностными рецепторами. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение, предложенное в настоящем описании, или его фармацевтически приемлемые соли, содержат первую взаимодействующую с клетками молекулу, способную связываться с первым клеточным поверхностным рецептором, и вторую взаимодействующую с клетками молекулу, способную связываться со вторым клеточным поверхностным рецептором, где первая взаимодействующая с клетками молекула является одинаковой с второй взаимодействующей с клетками молекулой. В некоторых вариантах осуществления конъюгированное соединение, предложенное в настоящем описании, или его фармацевтически приемлемые соли содержат первую взаимодействующую с клетками молекулу, способную связываться с первым клеточным поверхностным рецептором, и вторую взаимодействующую с клетками молекулу, способную связываться со вторым клеточным поверхностным рецептором, где первая взаимодействующая с клетками молекула отличается от второй взаимодействующей с клетками молекулы, например, LDC10B, LDC11B, LDC12B, LDC13B, LDC1013

[096] mLDC по настоящему изобретению может использоваться специально для доставки любой полезной нагрузки в клетки-мишени в среде ткани-мишени. В общем, присутствие нескольких лигандов в mLDC обеспечивает трехкратное преимущество. Во-первых, несколько лигандов могут действовать в нескольких направлениях, часто синергично, что приводит к повышению лечебного эффекта при одновременном снижении побочных эффектов. Во-вторых, связывание с несколькими лигандами повышает сродство и авидность mLDC к рецепторам-мишеням или клеткам-мишеням, тем самым повышая его специфичность и исключая его неспецифичную токсичность. И, наконец, при правильном проектировании сочетание нескольких лигандов может отвечать требованию полифункциональности, часто необходимому для конъюгата лекарственного средства.

[097] mLDC по настоящему изобретению обеспечивает неожиданную выгоду в данной области, включая, но не ограничиваясь этим: (1) комбинация лиганда, способного связываться с клеточными поверхностными рецепторами, и молекулы эндоцитоза дает возможность конъюгированному соединению специфично входить в клетки-мишени; (2) mLDC увеличивает аффинность и направленную специфичность лекарственных соединений, так что при доставке пациенту высокоэффективных химиотерапевтических агентов, таких как MMAE, mLDC расширяет терапевтическое окно для таких агентов

и позволяет избежать побочных эффектов; (3) линкер может предотвратить высвобождение полезной нагрузки за пределами клетки-мишени (например, в кровотоке, в межклеточном веществе и т.д.), что обеспечивает стабильность конъюгированного соединения в циркулирующей крови, а также снижает токсичность препарата. После
 5 ввода в клетки-мишени линкер расщепляется, высвобождая полезную нагрузку, чтобы проявился эффект препарата. В то же время можно избежать множественной лекарственной устойчивости (MDR); (4) широкий спектр лекарственных средств может быть доставлен в виде конъюгированных соединений по настоящему изобретению, что, соответственно, расширяет сферу применения важных препаратов. Таким образом,
 10 mLDC по настоящему изобретению не только расширяет сферу применения и терапевтическое окно лекарственных средств LDC, но и снижает токсичность и побочные эффекты некоторых лекарственных препаратов.

[098] Например, в конъюгате могут быть использованы двойные лиганды, где один лиганд специфично связывается с рецептором на поверхности раковых клеток, тогда
 15 как другой лиганд экспонируется только внутри солидной опухоли в результате действия раковых специфичных протеаз, запуская эндоцитоз, что позволяет конъюгату специфично доставить полезную лекарственную нагрузку только в раковые клетки, избегая токсичности в отношении нормальных клеток, экспрессирующих один или оба рецептора.

[099] Например, LDC10B, содержащий два лиганда, пептид P10 и фолат, может работать в двойном и даже в тройной режиме. В фазе I клинических испытаний было показано, что сам пептид P10 является эффективным противораковым средством, функционируя, возможно, в качестве антагониста TRPV6, а для фолиевой кислоты было
 25 показано, что она способствует эффективной доставке цитотоксичной полезной нагрузки посредством эндоцитоза, убивая раковые клетки. В качестве конъюгированного лекарственного средства с двумя лигандами, LDC10B потенциально может функционировать синергетически тремя способами, убивая раковые клетки, экспрессирующие оба рецептора - TRPV6 и фолатный. Во-первых, пептид P10 частично функционирует как антагонист TRPV6. Во-вторых, пептид P10 может потенциально
 30 доставлять конъюгированный цитотоксин посредством интернализации, хотя и не очень эффективно, а фолат может связываться с фолатным рецептором, чтобы доставить цитотоксины эффективно путем эндоцитоза. И, наконец, два лиганда, пептид P10 и фолат могут связываться синергетически с их соответствующими рецепторами и доставлять цитотоксическую полезную нагрузку внутрь клеток-мишеней,
 35 экспрессирующих оба рецептора.

[0100] Термины «полипептид», «белок» и «пептид», используемые в настоящем описании, могут использоваться взаимозаменяемо и относятся к полимеру аминокислот. Полипептид, белок или пептид, описанные в рамках изобретения, могут содержать природные аминокислоты, а также не встречающиеся в природе аминокислоты, или
 40 аналоги и имитации аминокислот. Полипептид, белок или пептид могут быть получены любым способом, хорошо известным в данной области техники, например, но не ограничиваясь этим, выделением и очисткой из природных материалов, рекомбинантной экспрессией, химическим синтезом и т.д.

[0101] В другом аспекте настоящей заявки раскрыты фармацевтические композиции, содержащие конъюгированные соединения, предложенные в настоящем описании, или их фармацевтически приемлемые соли, и фармацевтически приемлемые носители.

[0102] Термин «фармацевтический приемлемый», используемый в настоящем описании, означает, что объект в медицинском смысле подходит для использования в

контакте с клетками человека и других животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и т.п., и соотносится с разумным соотношением «польза/риск».

[0103] Термин «фармацевтически приемлемые соли», используемый в настоящем описании, относится к относительно нетоксичным, неорганическим и органическим солям присоединения кислот и оснований конъюгированных соединений по настоящему изобретению. Примеры солей присоединения кислот включают гидробромид, гидрохлорид, сульфат, бисульфат, фосфат, нитрат, ацетат, оксалат, валерат, олеат, пальмитат, стеарат, лаурат, борат, бензоат, лактат, фосфат, тозилат, цитрат, малеат, фумарат, сукцинат, тартрат, нафтилат, мезилат, глюкогептонат, лактиобионат, сульфаматы, малонаты, салицилаты, пропионаты, метилен-бис-*b*-гидроксинафтоаты, гентизаты, изетионаты, ди-*l*-толуилтартраты, метансульфонаты, этансульфонаты, бензолсульфонаты, *l*-толуолсульфонаты, циклогексилсульфоматы, хинаты, лаурилсульфонаты и т.п. Соли присоединения оснований включают фармацевтически приемлемые соли металлов и аминов. Подходящие соли металлов включают натриевую, калиевую, кальциевую, бариевую, цинковую, магниевую и алюминиевую соли. В некоторых вариантах осуществления изобретения предпочтительными являются соли натрия и калия. Подходящие соли присоединения неорганических оснований получают из оснований металлов, которые включают, например, гидрид натрия, гидроксид натрия, гидроксид калия, гидроксид кальция, гидроксид алюминия, гидроксид лития, гидроксид магния и гидроксид цинка. Подходящие соли присоединения аминооснований получают из аминов, которые имеют достаточную основность для образования стабильной соли, и, предпочтительно, включают следующие амины, которые часто используются в медицинской химии по причине их низкой токсичности и приемлемости для медицинского применения: аммиака, этилендиамина, N-метилглюкамина, лизина, аргинина, орнитина, холина, N,N'-дибензилэтилендиамина, хлоропрокаина, диэтанолamina, прокаина, N-бензилфенэтиламина, диэтиламина, пиперазина, трис(гидроксиметил)аминометана, тетраметиламмония гидроксида, триэтиламина, дибензиламина, эфенамина, дегидроабиетиламина, N-этилпиперидина, бензиламина, тетраметиламмония, тетраэтиламмония, метиламина, диметиламина, триметиламина, этиламина, основных аминокислот, например, лизина и аргинина, и дициклогексиламина, и т.п.

[0104] Термин «фармацевтически приемлемые носители», используемый в настоящем описании, относится к фармацевтически приемлемыми растворителями, суспендирующим агентам или любым другим фармакологически инертным носителям для доставки пациентам конъюгированных соединений, предложенных в настоящем описании, которые не нарушают структуру и свойства конъюгированных соединений. Некоторые из таких носителей позволяют изготавливать конъюгированные соединения в виде, например, таблеток, пилюль, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, взвесей, суспензий и пастилок для перорального приема пациентами. Некоторые из таких носителей могут позволить изготовление конъюгированных соединений в виде инъекций, инфузий или для местного введения.

[0105] Фармацевтически приемлемые носители для использования в предлагаемых в настоящем изобретении фармацевтических композициях могут включать, но не ограничиваются ими, фармацевтически приемлемые жидкости, гели или твердые носители, водные носители (такие как инъекционный хлорид натрия, инъекционный раствор Рингера, изотоническая инъекционная декстроза, инъекционная стерильная вода или инъекционный раствор Рингера с декстрозой и лактатом), неводные носители (такие как нелетучие масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное

масло, кунжутное масло или арахисовое масло), противомикробные агенты, изотонические агенты (такие как хлорид натрия или декстроза), буферы (такие как фосфатные или цитратные буферы), антиоксиданты (такие как бисульфат натрия), анестетики (такие как прокаина гидрохлорид), суспендирующие/диспергирующие агенты (такие как карбоксиметилцеллюлоза натрия, гидроксипропилметилцеллюлоза или поливинилпирролидон), хелатирующие агенты (такие как EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота) или EGTA (этиленгликольтетрауксусная кислота)), эмульгирующие агенты (например, полисорбат 80 (TWEEN-80)), разбавители, адъюванты, наполнители или нетоксичные вспомогательные вещества, другие компоненты, известные в данной области техники, или их различные комбинации. Подходящие компоненты могут включать, например, наполнители, связующие вещества, буферы, консерванты, смазывающие вещества, ароматизаторы, загустители, красители или эмульгаторы.

[0106] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции представляют собой составы для инъекций. Составы для инъекций включают стерильные водные растворы или дисперсии, суспензии или эмульсии. Во всех случаях препараты для инъекций должны быть стерильными и должны быть жидкими для легкого введения. Они должны быть стабильными в условиях производства и хранения и должны быть защищены от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носителями могут быть растворители или дисперсионная среда, содержащие, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, и/или растительные масла. Составы для инъекций должны иметь соответствующую текучесть. Соответствующая текучесть может поддерживаться, например, за счет использования покрытий, таких как лецитин, за счет использования поверхностно-активных веществ и т.п. Предупреждение действия микроорганизмов может быть достигнуто с помощью различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, сорбиновой кислоты, тимерозала и т.п.

[0107] В некоторых вариантах осуществления, фармацевтические композиции представляют собой пероральные составы. Пероральные составы включают, но не ограничиваются ими, капсулы, облатки, пилюли, таблетки, леденцы (с использованием ароматизированной основы, обычно сахарозы и гуммиарабика или трагаканта), порошки, гранулы, или растворы или суспензии в водных или неводных жидкостях, или жидкие эмульсии масло-в-воде или вода-в-масле, или эликсиры или сиропы, или пастилки (с использованием инертного основания, такого как желатин и глицерин, или сахароза и гуммиарабик) и/или ополаскиватели для рта и т.п.

[0108] В твердых лекарственных формах для перорального введения (например, капсулах, таблетках, пилюлях, драже, порошках, гранулах и т.п.) конъюгированные соединения смешивают с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями, такими как цитрат натрия или дикальцийфосфат, и/или любым из перечисленного: (1) наполнителями или увеличивающими объем веществами, такими как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; (2) связующими веществами, такими как карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или гуммиарабик; (3) увлажнителями, такими как глицерин; (4) дезинтегрирующими агентами, такими как агар-агар, карбонат кальция, картофельный крахмал или крахмал из тапиоки, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия; (5) замедляющими растворение агентами, такими как парафин; (6) ускорителями абсорбции, такими как соединения четвертичного аммония;

(7) смачивающими агентами, такими как ацетиловый спирт и моностеарат глицерина; (8) абсорбентами, такими как каолин и бентонитовая глина; (9) смазывающими веществами, такими как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси; и 10) красителями.

5 [0109] В жидких лекарственных формах для перорального введения конъюгированные соединения смешивают с любым из перечисленного: фармацевтически приемлемыми эмульсиями, микроэмульсиями, растворами, суспензиями, сиропами и эликсирами. В дополнении к конъюгированным соединениям жидкие лекарственные формы могут
10 содержать инертные разбавители, обычно используемые в данной области, такие как вода или другие растворители, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот
15 и сорбитана и их смеси. Кроме инертных разбавителей, пероральные композиции могут также включать адъюванты, такие как смачивающие агенты, эмульгирующие и суспендирующие агенты, подсластители, ароматизаторы, красители, отдушки и консерванты.

[0110] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции
20 представляют собой составы спрея для полости рта или назального спрея. Аэрозольные составы включают, но не ограничиваются ими, водные аэрозоли, неводные суспензии, липидосомные составы или твердые гранулированные препараты, и т.п. Водные аэрозоли получают путем смешивания водных растворов или суспензий агентов и обычных фармацевтически приемлемых носителей и стабилизаторов. Носители и
25 стабилизаторы выбираются в соответствии с конкретными соединениями, но в целом, они включают неионные поверхностно-активные вещества (Tween или полиэтиленгликоль), олеиновую кислоту, лецитин, аминокислоты, такие как глицин, буферный раствор, соли, сахар или сахарный спирт. Аэрозоли, как правило, получают в виде изотонических растворов, и они могут доставляться с помощью распылителей.

30 [0111] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может быть использована в смеси с одним или несколькими другими лекарственными средствами. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит по меньшей мере одно другое лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления другие лекарственные средства представляют собой противоопухолевые
35 средства, сердечно-сосудистые средства, противовоспалительные средства, противовирусные средства, пищеварительные средства, неврологические средства, лекарственные средства для дыхательной системы, иммунологические средства, дерматологические средства, метаболические препараты и т.п.

[0112] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции можно
40 вводить нуждающимся в этом пациентам соответствующими способами, включая, без ограничения, пероральное, инъекционное (например, с помощью внутривенной, внутримышечной, подкожной, внутрикожной, внутрисердечной, интратекальной, внутривенной, внутрибрюшинной инъекций и т.п.), через слизистую оболочку (например, с помощью назального, буккального введения и т.п.), сублингвальное,
45 ректальное, чрескожное, внутриглазное и легочное введение. В некоторых вариантах осуществления композиции лекарственного средства могут быть введены внутривенно, подкожно, перорально, внутримышечно или интравентрикулярно.

[0113] Из-за свойств некоторых полезных нагрузок, например, высокой токсичности,

высокой гидрофильности, желательно доставлять полезную нагрузку нуждающимся в этом пациентам более направлено и более эффективно. Например, при лечении рака желательно доставлять химиотерапевтические средства направленно в раковые клетки, избегая токсичности в отношении нормальных клеток. Таким образом, еще один аспект настоящего изобретения раскрывает способы доставки полезной нагрузки пациенту, включающие введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества конъюгированных соединений, предложенных в настоящем описании, или их фармацевтически приемлемых солей, или фармацевтических композиций, предложенных в настоящем описании. Полезная нагрузка, описанная в настоящем изобретении, может представлять собой любой фармацевтический агент, который вызывает биологический или медицинский ответ в ткани, системе, у животного, индивидуума или человека, который ожидается исследователем, ветеринаром, медицинским специалистом или другим клиницистом для предупреждения, остановки, ослабления или лечения заболевания.

[0114] Термин «пациент», используемый в настоящем описании, относится к человеку и к животному. Животные включают всех позвоночных, например, млекопитающих и немлекопитающих. Пациентом может также являться домашний скот, такой как, крупный рогатый скот, свиньи, овцы, птицы и лошади, или домашнее животное, такое как собаки и кошки. Пациентом может быть мужчина или женщина, может быть пожилой человек, и может быть взрослый, подросток, ребенок или младенец. Человек может принадлежать к белой, азиатской, африканской, семитской или другой расе, или иметь смешанное происхождение.

[0115] Термин «терапевтически эффективное количество», используемый в настоящем описании, относится к количеству конъюгированных соединений, или их фармацевтически приемлемых солей, или фармацевтических композиций, которое снимает в некоторой степени один или несколько симптомов заболевания или расстройства у пациента, возвращает в нормальное состояние частично или полностью один или несколько физиологических или биохимических параметров, связанных с или являющихся причиной заболевания или расстройства, и/или уменьшает вероятность возникновения заболевания или расстройства. Такие количества как правило, варьируют в зависимости от ряда факторов, которые входят в пределы компетенции обычных специалистов, с учетом предложенного описания, чтобы их определить и принять во внимание. Они включают, без ограничения: самого пациента, а также его возраст, вес, рост, общее физическое состояние и историю болезни; конкретное используемое соединение, а также носитель, в котором оно находится, и выбранный для него путь введения; и природу и тяжесть подлежащего лечению состояния.

[0116] В некоторых вариантах осуществления количество конъюгированных соединений или их фармацевтически приемлемых солей или фармацевтических композиций является достаточным для ингибирования заболевания или расстройства у пациента, или профилактического ингибирования или предупреждения начала заболевания или расстройства. Хотя терапевтически эффективное количество может варьировать у различных пациентов, как правило, оно находится в диапазоне от 0,01 до 100 мг/кг, например, от 0,01 до 90 мг/кг, от 0,01 до 80 мг/кг, от 0,01 до 70 мг/кг, от 0,01 до 60 мг/кг, от 0,01 до 50 мг/кг, от 0,01 до 40 мг/кг, от 0,01 до 30 мг/кг, от 0,01 до 20 мг/кг, от 0,01 до 10 мг/кг, от 0,01 до 5 мг/кг, от 0,01 до 4 мг/кг, от 0,01 до 3 мг/кг, от 0,01 до 2 мг/кг, от 0,01 до 1 мг/кг, от 0,01 до 0,1 мг/кг. Терапевтически эффективное количество, описанное в рамках изобретения, может быть равно любому значению в пределах указанного выше диапазона числовых значений, включая конечные точки

диапазона.

[0117] В другом аспекте настоящей заявки раскрыт способ доставки полезной нагрузки пациенту, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества конъюгированных соединений, предложенных в настоящем описании, или их фармацевтически приемлемой соли или фармацевтической композиции, предложенной в настоящем описании.

[0118] В другом аспекте настоящей заявки раскрыты способы лечения заболевания у пациента, включающие введение пациенту терапевтически эффективного количества конъюгированных соединений, предложенных в настоящем описании, или их фармацевтически приемлемых солей или фармацевтических композиций, предложенных в настоящем описании.

[0119] В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой рак, включая, но не ограничиваясь этим, рак молочной железы, рак легких, рак предстательной железы, рак почки, рак яичников, рак желудка, рак матки, рак эндометрия, рак печени, рак щитовидной железы, рак поджелудочной железы, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак пищевода, рак кожи, лимфому, лейкемию и множественную миелому.

[0120] В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой иммунологическое заболевание, например, аутоиммунное заболевание, включая, но не ограничиваясь ими, заболевание соединительной ткани, системный склероз, ревматоидный артрит и системную красную волчанку.

[0121] В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой сердечно-сосудистое заболевание, включая, но не ограничиваясь этим, стенокардию, инфаркт миокарда, инсульт, гипертоническую болезнь сердца, в том числе, но не ограничиваясь ими, стенокардию, инфаркт миокарда, инсульт, сердечный приступ, гипертоническую болезнь сердца, ревматическую болезнь сердца, кардиомиопатию, сердечную аритмию и врожденный порок сердца.

[0122] В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой метаболическое заболевание, включая, но не ограничиваясь этим, сахарный диабет, подагру, ожирение, гипогликемию, гипергликемию и дислипидемию.

[0123] В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой неврологическое заболевание, включая, но не ограничиваясь этим, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Хантингтона, травму головы, рассеянный склероз, головокружение, кому и эпилепсию.

[0124] В некоторых вариантах осуществления способ, предложенный в настоящем описании, дополнительно включает введение одного или нескольких терапевтических агентов в комбинации с конъюгированным соединением, или его фармацевтически приемлемой солью, или фармацевтической композицией. В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент направлен на раковую терапевтическую мишень, индуцирует или усиливает противораковый иммунный ответ или является химиотерапевтическим агентом.

[0125] Настоящая заявка будет описана более подробно с помощью конкретных примеров. Следующие ниже примеры приведены только для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения настоящего изобретения каких-либо образом. Специалисты в данной области техники легко обнаружат множество некритических параметров, которые могут быть изменены или модифицированы, давая по существу такие же результаты.

ПРИМЕРЫ

[0126] Нижеследующие примеры предназначены для дополнительной иллюстрации настоящей заявки. Преимущества и признаки настоящего изобретения станут ясными из описания. Однако эти иллюстрации являются просто примерами и не должны истолковываться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

5 [0127] **ПРИМЕР I: получение конъюгированных молекул**

[0128] **Стадия I: синтез фолат-NHS**

[0129] Фолат (44,1 г, 100 ммоль) растворяли в DMSO (2 л), а затем смешивали с N,N-дициклогексилкарбодиимидом (DCC) (24,8 г, 120 ммоль) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) (23 г, 200 ммоль). Смесь перемешивали в течение 18 ч при комнатной температуре
10 в темноте. Нерастворимое вещество отфильтровывали и сушили в вакууме, получая коллоидные твердые вещества. Коллоидное твердое вещество промывали ледяным эфиром три раза и сушили, получая желтый порошок (53,8 г), который может быть использован в следующей реакции без дополнительной очистки.

[0130] **Стадия II: синтез смолы с защищенным пептидом P10**

[0131] Смолу Wang (приобретенную от Sigma-Aldrich, 100 г, степень замещения: 1,1 ммоль/г) отмеряли и добавляли в колонку для твердофазных реакций, затем добавляли DMF с последующим набуханием путем пропускания газообразного азота в течение 30 мин. В отдельной колбе Эрленмейера отмеряли Fmoc-Arg (pbf)-OH (142,7 г, 220 ммоль), HOBT (35,6 г, 264 ммоль) и DMAP (2,7 г, 22 ммоль), растворяли в DMF и
20 охлаждали до 0°C в водяной бане со льдом. Затем добавляли DIC (40,8 мл, 264 ммоль) и оставляли реагировать в течение 5 мин. Раствор добавляли в реакционную колонку и оставляли взаимодействовать в течение трех часов, а затем высушивали с помощью вакуума и три раза промывали DMF.

[0132] Уксусный ангидрид (104 мл) и пиридин (88,5 мл) растворяли в DMF (500 мл),
25 полученную смесь добавляли в промытую смолу, полученную как описано выше, герметично закрывали и оставляли при комнатной температуре на 5 ч, три раза промывали DMF, сжимали метанолом, и затем смолу сушили, чтобы получить Fmoc-Arg (pbf)-Wang смолу. Степень замещения была определена как 0,53 ммоль/г.

[0133] 37,7 г (20 ммоль) Fmoc-Arg (pbf)-Wang смолы (степень замещения: 0,53 ммоль/г) отмеряли и добавляли в реакционную колонку, три раза промывали DMF и оставляли
30 набухать в DMF в течение 30 мин. Защитную группу Fmoc удаляли с помощью DBLK, а затем промывали DMF шесть раз. Fmoc-Pro-OH (20,2 г, 60 ммоль) и HOBT (9,7 г, 72 ммоль) отмеряли и растворяли в DMF и охлаждали до 0°C в водяной бане со льдом. Затем добавляли DIC (11,1 мл, 72 ммоль) и оставляли реагировать в течение 5 мин.

35 Раствор добавляли в реакционную колонку и оставляли взаимодействовать в течение двух часов, а затем добавляли DBLK, чтобы удалить защитную группу Fmoc.

[0134] Вышеуказанные процедуры повторяли для добавления каждой из аминокислот от C-конца к N-концу в пептидной последовательности. Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-Val-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH и Fmoc-Cys(Trt)-OH конъюгировали один за другим в соответствии с пептидной последовательностью,
40 а затем добавляли DBLK, чтобы удалить защитную группу Fmoc. Раствор промывали DMF шести раз, два раза сжимали метанолом и сушили, чтобы получить смолу с защищенным пептидом P10 (85,8 г).

45 [0135] **Стадия III: синтез промежуточного соединения фолат-P10 (фолат-Cys-Lys-Glu-Phe-Leu-His-Pro-Ser-Lys-Val-Asp-Leu-Pro-Arg-OH)**

[0136] Фолат-NHS (32,3 г, 60 ммоль) отмеряли и растворяли в DMSO, добавляли смолу с защищенным пептидом P10 (85,8 г), полученным на стадии II, и оставляли

реагировать на 5 мин, по каплям добавляли DIEA (21 мл, 120 ммоль), и реакцию продолжали в течение 4 ч при комнатной температуре. Продукт реакции промывали DMF три раза, сжимали метанолом и сушили в вакууме, чтобы получить смолу с полностью защищенным пептидом (320,3 г).

5 [0137] Смолу с защищенным пептидом (80 г), полученную выше, добавляли в 1000-мл одnogорлую колбу, в колбу добавляли ранее приготовленный расщепляющий раствор (640 мг, TFA:тиоанизол:EDT:анизол=90:5:3:2 (объемное соотношение)), и оставляли взаимодействовать в течение 2,5 ч при комнатной температуре. Смолу отфильтровывали и промывали TFA (100 мл), фильтраты объединяли и добавляли в
10 абсолютный эфир (4500 мл), чтобы отделить твердое вещество желтого цвета. Твердое вещество центрифугировали, промывали абсолютным эфиром и сушили в вакууме, получая желтое твердое вещество (40,6 г). Выход неочищенного пептида составлял 97,1%, а чистота по ВЭЖХ составляла 76,3%. Полученное желтое твердое вещество очищали с помощью ВЭЖХ и сушили вымораживанием, получая фолат-P10 (28,25 г,
15 чистота: 98,6%).

[0138] **Стадия IV: синтез промежуточного соединения R9-P10 (Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Cys-Lys-Glu-Phe-Leu-His-Pro-Ser-Lys-Val-Asp-Leu-Pro-Arg-OH)**

[0139] Отмеряли часть смолы с защищенным пептидом P10, полученной на стадии II, и конъюгировали в соответствии с пептидной последовательностью R9, чтобы
20 получить промежуточное соединение R9-P10.

[0140] **Стадия V: синтез промежуточного соединения Mc-Val-Cit-PAB-MMAE**

[0141] MMAE (7,18 г, 10 ммоль) отмеряли и добавляли в 250-мл трехгорлую колбу, растворяли в безводном DMF и перемешивали до полного растворения при комнатной температуре в защитной атмосфере N₂. Mc-Val-Cit-PAB-PNP (7,37 г) и HOAt (72 мг, 2
25 ммоль) добавляли в раствор и проводили реакцию в течение 5 мин, а затем по каплям добавляли DIEA (3,5 мл, 20 ммоль), и реакцию продолжали в течение 30 мин при комнатной температуре, а затем температуру повышали до 40~50°C и реакцию оставляли на 20 ч, в течение которой использовали ВЭЖХ, чтобы контролировать ход реакции. DMF удаляли путем сушки в вакууме, и продукт Mc-Val-Cit-PAB-MMAE (10,7 г, чистота:
30 99,3%) получали путем дополнительной ВЭЖХ-очистки.

[0142] **Стадия VI: синтез конъюгатов LDC10B и LDC10H**

[0143] Mc-Val-Cit-PAB-MMAE (6,59 г, 5 ммоль), полученный на стадии V, отмеряли и добавляли в одnogорлую 5000-мл колбу, добавляли 3300 мл фосфатного буфера и перемешивали до просветления при pH=7,2. Добавляли промежуточный продукт фолат-P10 или R9-P10 (10,5 г, 5,02 ммоль) и проводили реакцию в течение 2 ч при комнатной
35 температуре, в течение чего использовали ВЭЖХ, чтобы контролировать ход реакции. После как завершения реакция раствор отфильтровали; LDC10B (14,53 г, чистота: 99,2%, выход: 85,02%) и LDC10H (12,37 г, чистота: 98,7%, выход: 81,34%) были получены с использованием ВЭЖХ и лиофилизации.

40 [0144] Конъюгаты, LDC10BR, LDC10BX, LDC11B, LDC12B, LDC13B, LDC1013, LDC11H и LDC12H могут быть получены с помощью аналогичных процедур.

[0145] **Стадия VII: синтез фолат-FITC (FITC-ACP-Lys(фолат)-OH)**

[0146] Смолу Wang (1 г, степень замещения: 1,1 ммоль/г) отмеряли и добавляли в колонку для твердофазных реакций, затем добавляли DMF с последующим набуханием
45 путем пропускания газообразного азота в течение 30 мин. В отдельной колбе Эрленмейера 2 мольных эквивалента (экв.) Fmoc-Lys(DDE)-OH и 2,4 экв. НОВт и 0,2 экв. DMAP отмеряли и растворяли в DMF и охлаждали до 0°C в водяной бане со льдом. Затем добавляли 2,4 экв. DIC и оставляли реагировать в течение 5 мин. Раствор

добавляли в реакционную колонку и оставляли взаимодействовать в течение трех часов, а затем высушивали с помощью вакуума и три раза промывали DMF.

[0147] По 10 экв. уксусного ангидрида и пиридина растворяли в DMFA (10 мл), полученную смесь добавляли к промытой смоле выше, и герметично укупоривали и оставляли при комнатной температуре на 5 ч, промывали DMF три раза, сжимали метанолом, а затем смолу сушили, получая Fmoc-Lys (DDE)-Wang смолу. Степень замещения была определена как 0,51 ммоль/г.

[0148] 1,3 г Fmoc-Lys (DDE)-Wang смолы (степень замещения 0,51 ммоль/г) отмеряли и добавляли в реакционную колонку, промывали DMF три раза и оставляли набухать в DMF на 30 мин. Защитную группу Fmoc удаляли с помощью DBLK, а затем промывали DMF шести раз. Отмеряли 2 экв. Fmoc-6-ACP-OH и 2,4 экв. НОВт и растворяли в DMF, после чего охлаждали до 0°C на водяной бане со льдом. Затем добавляли 2,4 экв. DIC и оставляли реагировать в течение 5 мин. Раствор добавляли в реакционную колонку и оставляли взаимодействовать в течение двух часов, а затем добавляли DBLK, чтобы удалить защитную группу Fmoc.

[0149] К смоле добавляли 1,5 экв. FITC в DMF, а затем по каплям добавляли 3 экв. DIEA. Реакцию проводили в течение 2 ч, и смолу три раза промывали DMF.

[0150] К вышеуказанной смоле добавляли 2%-й раствор гидрата гидразина в DMF и оставляли реагировать на 15 мин. Повторяли два раза, а затем шесть раз промывали DMF.

[0151] Фолат-NHS (2 экв.) отмеряли и растворяли в DMSO, после чего добавляли к смоле и проводили реакцию в течение 5 минут, по каплям добавляли DIEA (21 мл, 120 ммоль), и реакцию продолжали в течение 4 ч при комнатной температуре. Продукт реакции промывали DMSO и DMF три раза, соответственно, сжимали метанолом и сушили в вакууме, чтобы получить смолу с полностью защищенным пептидом.

[0152] После удаления защитных групп и отщепления от смолы неочищенный фолат-FITC очищали с помощью ВЭЖХ, получая продукт в виде желтого твердого вещества с чистотой 95%. Структура фолат-FITC показана на фиг.3.

[0153] Стадия VIII: синтез 10A-FITC

[0154] 0,1 ммоль (0,43 г) смолы с защищенным пептидом P10, полученной на стадии II, отмеряли и добавляли в колонку для твердофазных реакций, затем добавляли DMF с последующим набуханием путем пропускания газообразного азота в течение 30 минут. 2 экв. Fmoc-ε-ACP-OH, а затем 2 экв. DBLK добавляли для удаления защитной группы Fmoc. Раствор промывали DMF шесть раз.

[0155] К смоле добавляли 1,5 экв. FITC в DMF, а затем по каплям добавляли 3 экв. DIEA. Реакцию проводили в течение 2 ч, и смолу три раза промывали DMF.

[0156] После удаления защитной группы и отщепления от смолы, неочищенный 10A-FITC очищали с помощью ВЭЖХ, получая продукт с 95%-й чистотой в виде желтого твердого вещества. Структура 10A-FITC показана на фиг.3.

[0157] Стадия IX: синтез 10B-FITC

[0158] 0,1 ммоль (0,43 г) смолы с защищенным пептидом P10, полученный на стадии II, отмеряли и добавляли в колонку для твердофазных реакций, затем добавляли DMF с последующим набуханием путем пропускания газообразного азота в течение 30 минут. 2 экв. Fmoc-Lys(Dde)-OH, Fmoc-ε-ACP-OH, а затем 2 экв. DBLK добавляли для удаления защитной группы Fmoc. Раствор промывали DMF шесть раз.

[0159] К смоле добавляли 1,5 экв. FITC в DMF, а затем по каплям добавляли 3 экв. DIEA. Реакцию проводили в течение 2 ч, и смолу три раза промывали DMF.

[0160] К вышеуказанной смоле добавляли 2%-й раствор гидрата гидразина в DMF

и оставляли реагировать на 15 мин. Повторяли два раза, а затем шесть раз промывали DMF.

[0161] Фолат-NHS (2 экв.) отмеряли и растворяли в DMSO, после чего добавляли к смоле и проводили реакцию в течение 5 минут, по каплям добавляли DIEA (21 мл, 120 ммоль), и реакцию продолжали в течение 4 ч при комнатной температуре. Продукт реакции промывали DMSO и DMF три раза, соответственно, сжимали метанолом и сушили в вакууме, чтобы получить смолу с полностью защищенным пептидом.

[0162] После удаления защитных групп и отщепления от смолы неочищенный 10B-FITC очищали с помощью ВЭЖХ, получая продукт в виде желтого твердого вещества с чистотой 95%. Структура 10B-FITC показана на фиг.3.

[0163] Стадия X: синтез LDC10B-Cy5

[0164] 0,1 ммоль (0,43 г) смолы с защищенным пептидом P10, полученный на стадии II, отмеряли и добавляли в колонку для твердофазных реакций, затем добавляли DMF с последующим набуханием путем пропускания газообразного азота в течение 30 минут. 2 экв. Fmoc-Lys(Dde)-OH, а затем 2 экв. DBLK добавляли для удаления защитной группы Fmoc. Раствор промывали DMF шесть раз.

[0165] 100 мг флуоресцентного красителя Cy5, 1,5 экв. HATU и 1,5 экв. НОВт в DMF добавляли к смоле, а затем по каплям добавляли 3 экв. DIEA. Реакцию проводили в течение 2 ч, и смолу три раза промывали DMF.

[0166] К вышеуказанной смоле добавляли 2%-й раствор гидрата гидразина в DMF и оставляли реагировать на 15 мин. Повторяли два раза, а затем шесть раз промывали DMF.

[0167] Фолат-NHS (2 экв.) отмеряли и растворяли в DMSO, после чего добавляли к смоле и проводили реакцию в течение 5 минут, по каплям добавляли DIEA (21 мл, 120 ммоль), и реакцию продолжали в течение 4 ч при комнатной температуре. Продукт реакции промывали DMSO и DMF три раза, соответственно, сжимали метанолом и сушили в вакууме, чтобы получить смолу с полностью защищенным пептидом.

[0168] После удаления защитных групп и отщепления от смолы неочищенный LDC10B-CY5 очищали с помощью ВЭЖХ, получая продукт в виде желтого твердого вещества с чистотой 95%. LDC10B-Cy5 представляет собой меченую флуоресцентным красителем Cy5 версию LDC10B, где билигандный фрагмент конъюгирован с красителем Cy5 через лизиновый спейсер.

[0169] ПРИМЕР II: анализы эффективности конъюгатов

[0170] В анализ были включены следующие конъюгаты: LDC10B, LDC10BX, LDC10BR, LDC11B, LDC12B, LDC13B, LDC1013, LDC10H, LDC11H, LDC13H, LDC1, LDC10A, LDC11A и LDC13A. LDC1, LDC10A, LDC11A и LDC13A использовались в некоторых экспериментах в качестве контроля, и их структуры приведены ниже.

[0171] LDC1: Фолат-(ПЭГ)₃-MC-Val-Cit-PAB-MMAE

[0172] LDC10A: P10-MC-Val-Cit-PAB-MMAE

[0173] LDC11A: P11-MC-Val-Cit-PAB-MMAE

[0174] LDC13A: P13-MC-Val-Cit-PAB-MMAE

[0175] 1. Тест на эндоцитоз конъюгата LDC10B

[0176] В анализ были включены следующие конъюгаты: фолат-FITC (FITC-ACP-Lys (фолат)-OH), 10B-FITC и 10A-FITC.

[0177] Культуральная среда: RPMI 1640, без фолиевой кислоты

[0178] Экспериментальные способы:

[0179] 1) Клеточную линию KB рака носоглотки человека, линию клеток меланомы A375, клетки рака легких H460, клетки рака яичников SKOV3, клеточную линию

НСС1954 рака молочной железы инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в среде RPMI 1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки; клетки пассировали каждые 2-3 дня.

[0180] 2) Клеточную линию KB рака носоглотки человека, линию клеток меланомы A375, клетки рака легких H460, клетки рака яичников SKOV3, клеточную линию

НСС1954 рака молочной железы высевали по 1×10^3 клеток на лунку (96-луночного планшета) и инкубировали в течение 8-12 ч при 37°C, 5% CO₂.

[0181] 3) 1 мкМ FITC-конъюгаты или контроли добавляли к клеткам в планшете и инкубировали в течение 10-15 минут при температуре 37°C. Культуральную среду в лунках затем удаляли путем аспирации, и клетки три раза промывали PBS.

[0182] 4) Клетки затем визуализировали с помощью конфокальной микроскопии (компания) для визуализации эндоцитоза.

[0183] Результаты и анализ:

[0184] Для того чтобы показать, что добавление фолатного лиганда может способствовать опосредованному фолатным рецептором эндоцитозу билигандного соединения LDC10B, клетки KB (положительные по фолатному рецептору клетки) и клетки A375 (отрицательные по фолатному рецептору клетки) были протестировали с 10A-FITC, фолат-FITC и 10B-FITC. Как показано на фиг.2, фолат-FITC входит в клетки KB (положительные по фолатному рецептору клетки), но не в клетки A375

(отрицательные по фолатному рецептору клетки) (панели A и B) посредством опосредованного фолатным рецептором эндоцитоза, тогда как 10A-FITC не может войти ни в какие клетки (панели C и D) из-за отсутствия эндоцитоза. Однако добавление фолатного лиганда, преобразующее 10A-FITC в билигандный конъюгат, а именно 10B-FITC, давало конъюгату возможность войти в клетки KB (панель E), но не в клетки A375 (панель F) путем опосредованного фолатным рецептором эндоцитоза. Кроме того, предварительная инкубация клеток KB с 50 мМ (50-кратным избытком относительно конъюгата) свободным фолатом полностью блокировала эндоцитоз как фолат-FITC, так и 10B-FITC (данные не показаны), подтверждая то, что эндоцитоз действительно был опосредован фолатным рецептором.

[0185] 2. Тест на цитотоксичность конъюгата LDC10B

[0186] Тестируемый образец: LDC10B

[0187] Контрольные образцы: MMAE, LDC1, LDC10A

[0188] Культуральная среда: RPMI 1640, без фолиевой кислоты

[0189] Экспериментальные способы:

[0190] 1) Клеточную линию KB рака носоглотки человека, линию клеток меланомы A375, клетки рака легких H1299, клеточную линию K562 хронического миелоидного лейкоза, клетки рака легких H460, клетки рака яичников SKOV3, клеточную линию НСС1954 рака молочной железы, клетки N87 рака желудка человека и клетки SK-BR-3 рака молочной железы человека инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в среде RPMI 1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки; клетки пассировали каждые 2-3 дня.

[0191] 2) Клеточную линию KB рака носоглотки человека, линию клеток меланомы A375, клетки рака легких H1299, клеточную линию K562 хронического миелоидного лейкоза, клетки рака легких H460, клетки рака яичников SKOV3, клеточную линию НСС1954 рака молочной железы, клетки N87 рака желудка человека и клетки SK-BR-3 рака молочной железы человека высевали по 1×10^3 клеток на лунку (96-луночного планшета) и инкубировали в течение 8-12 ч при 37°C, 5% CO₂.

[0192] 3) Исходные растворы LDC-конъюгатов или контролей были приготовлены в растворе PBS. По 100 мкл/лунку серийно разведенных LDC-конъюгатов или контролей

добавляли к тестируемым клеткам в планшетах и инкубировали в течение 15-30 мин при температуре 37°C, 5% CO₂. Культуральную среду в лунках затем удаляли путем аспирации, и тестируемые клетки инкубировали в свежей культуральной среде без конъюгата (по 150 мкл/лунку) в течение 2-3 дней при 37°C, 5% CO₂.

[0193] 4) В каждую лунку добавляли CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega), чтобы измерить количество мертвых клеток, и каждый планшет инкубировали в инкубаторе в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂.

[0194] 5) Каждый планшет считывали при 490 нм на микропланшетном спектрофотометре, и выживаемость клеток была сопоставлена для тестируемых клеток с или без обработки конъюгатами LDC. Были определены концентрации LDC, которые были необходимы для 50%-й гибели клеток (значения IC₅₀).

[0195] Результаты и анализ:

[0196] LDC10B может очень эффективно убивать следующие раковые клетки: клеточную линию KB рака носоглотки человека, клетки рака легких H1299, клеточную линию K562 хронического миелоидного лейкоза, клетки рака яичников SKOV3, клеточную линию HCC1954 рака молочной железы, клетки N87 рака желудка человека, клетки SK-BR-3 рака молочной железы человека, и значения IC₅₀ для LDC10B были ниже (соединение является более сильным), чем для контролей LDC1 и LDC10A (таблица 4). Эти клеточные линии, как известно, экспрессируют фолатный рецептор и/или рецептор TRPV6. Однако цитотоксичность LDC10B была значительно ниже (более высокое значение IC₅₀) для клеточной линии меланомы A375, не экспрессирующей фолатный рецептор.

[0197] LDC10B представляет собой билигандный конъюгат лекарственного средства, который может связываться как с фолатным рецептором, так и с рецептором TRPV6. Для положительных по рецепторам клеточных линий можно видеть из таблицы 5, что цитотоксичность LDC10B была в 2-15 раз выше (значения IC₅₀ были 2-15 раз меньше) цитотоксичности монолигандного лекарственного конъюгата LDC1 или LDC10A. В отношении клеточной линии меланомы A375, не имеющей фолатного рецептора, LDC10B подобно LDC1 и LDC10A был примерно в 15 раз менее токсичен, что указывает на хорошую специфичность. Поэтому, билигандный конъюгат лекарственного средства LDC10B показывает синергетический эффект и вносит вклад в эффективность лекарственных средств.

Таблица 4: результаты тестов на цитотоксичность (значения IC₅₀) для конъюгата LDC10B относительно контролей

(Единицы измерения: моль/л, М)

ТАБЛИЦА 4А: время инкубации 30 мин

КЛЕТКИ	H1299	K562	H460	SKOV3	HCC1954	N87	SK-BR-3
ММАЕ	0,86×10 ⁻⁹	0,54×10 ⁻⁹	0,77×10 ⁻⁹	0,62×10 ⁻⁹	0,45×10 ⁻⁹	0,68×10 ⁻⁹	0,52×10 ⁻⁹
LDC1	2,62×10 ⁻⁷	9,31×10 ⁻⁸	1,92×10 ⁻⁷	1,02×10 ⁻⁷	9,44×10 ⁻⁸	2,39×10 ⁻⁷	9,82×10 ⁻⁸
LDC10A	5,09×10 ⁻⁷	1,11×10 ⁻⁷	4,83×10 ⁻⁷	1,25×10 ⁻⁷	1,06×10 ⁻⁷	5,17×10 ⁻⁷	1,09×10 ⁻⁷
LDC10B	5,88×10 ⁻⁸	1,48×10 ⁻⁸	5,04×10 ⁻⁸	1,57×10 ⁻⁸	1,41×10 ⁻⁸	7,51×10 ⁻⁸	1,59×10 ⁻⁸

ТАБЛИЦА 4В: время инкубации 15 мин

КЛЕТКИ	A375	KB
ММАЕ	1×10 ⁻⁷	8,9×10 ⁻⁸

LDC1	1×10^{-5}	$1,5 \times 10^{-5}$
LDC10A	1×10^{-5}	$8,5 \times 10^{-6}$
LDC10B	1×10^{-5}	$7,6 \times 10^{-7}$

[0198] 3. Тест на цитотоксичность конъюгата LDC11B

[0199] Тестируемый образец: LDC11B

[0200] Контрольные образцы: MMAE, LDC1, LDC11A

[0201] Культуральная среда: RPMI 1640, без фолиевой кислоты

[0202] Экспериментальные способы:

[0203] 1) Клетки рака легких H460, клетки рака яичников SKOV3, клетки 293A почки эмбриона человека инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в среде RPMI 1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки; клетки пассировали каждые 2-3 дня.

[0204] 2) Клетки рака легких H460, клетки рака яичников SKOV3, клетки 293A почки эмбриона человека высевали по 1×10^3 клеток на лунку (96-луночного планшета) и инкубировали в течение 8-12 ч при 37°C, 5% CO₂.

[0205] 3) Исходные растворы LDC-конъюгатов или контролей были приготовлены в растворе PBS. По 100 мкл/лунку серийно разведенных LDC-конъюгатов или контролей добавляли к клеткам в планшетах и инкубировали в течение 15-30 мин при температуре 37°C, 5% CO₂. Культуральную среду в лунках затем удаляли путем аспирации, и клетки инкубировали в свежей культуральной среде без конъюгата (по 150 мкл/лунку) в течение 2-3 дней при 37°C, 5% CO₂.

[0206] 4) В каждую лунку добавляли CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega), чтобы измерить количество мертвых клеток, и планшет инкубировали в инкубаторе в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂.

[0207] 5) Планшет считывали при 490 нм на микропланшетном спектрофотометре, и выживаемость клеток была сопоставлена для клеток с или без обработки конъюгатами LDC. Были определены концентрации LDC, которые были необходимы для 50%-й гибели клеток (значения IC₅₀).

[0208] Результаты и анализ:

[0209] LDC11B может убивать следующие раковые клетки или ингибирует их рост: клетки рака легких H460, клетки рака яичников SKOV3, клетки 293A почки эмбриона человека. Эти клеточные линии, как известно, имеют высокий уровень экспрессии фолатного рецептора и/или LHRH-рецептора. Значения IC₅₀ у LDC11B были ниже, чем у контролей LDC1 и LDC11A (таблица 5).

[0210] LDC11B представляет собой билигандный конъюгат лекарственного средства, который может связывать как фолатный рецептор, так и рецептор LHRH. Как можно видно из таблицы 5, цитотоксичность LDC11B почти в десять раз превышает (значение IC₅₀ было почти в десять раз меньше) таковую для однолигандного конъюгата LDC1 или LDC11A. Поэтому, билигандный конъюгат лекарственного средства LDC11B показывает синергетический эффект и вносит вклад в эффективность лекарственных средств.

Таблица 5: результаты тестов на цитотоксичность (значения IC₅₀) конъюгата LDC11B относительно контролей

(Единицы измерения: моль/л, М)

КЛЕТКИ	H460	SKOV3	293A
MMAE	$0,58 \times 10^{-9}$	$0,44 \times 10^{-9}$	$0,86 \times 10^{-9}$

LDC1	$5,26 \times 10^{-7}$	$2,95 \times 10^{-7}$	$7,15 \times 10^{-7}$
LDC11A	$6,67 \times 10^{-7}$	$3,41 \times 10^{-7}$	$1,31 \times 10^{-6}$
LDC11B	$8,13 \times 10^{-8}$	$4,38 \times 10^{-8}$	$5,24 \times 10^{-7}$

[0211] 4. Тест на цитотоксичность конъюгата LDC12B

[0212] Тестируемый образец: LDC12B

[0213] Контрольный образец: MMAE

[0214] Культуральная среда: RPMI 1640, без фолиевой кислоты

[0215] Экспериментальные способы:

[0216] 1) Клетки HEC-1A рака эндометрия человека, клетки линии GTL-16 рака желудка человека, карциному HCT-116 толстой кишки человека, клеточную линию SH-SY5Y нейробластомы человека инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в среде RPMI 1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки; клетки пассировали каждые 2-3 дня.

[0217] 2) Клетки HEC-1A рака эндометрия человека, клетки линии GTL-16 рака желудка человека, карциному HCT-116 толстой кишки человека, клеточную линию SH-SY5Y нейробластомы человека высевали по 1×10^3 клеток на лунку (96-луночного планшета) и инкубировали в течение 8-12 ч при 37°C, 5% CO₂.

[0218] 3) Исходные растворы LDC-конъюгатов или контролей были приготовлены в растворе PBS. По 100 мкл/лунку серийно разведенных LDC-конъюгатов или контролей добавляли к клеткам в планшетах и инкубировали в течение 15-30 мин при температуре 37°C, 5% CO₂. Культуральную среду в лунках затем удаляли путем аспирации, и клетки инкубировали в свежей культуральной среде без конъюгата (по 150 мкл/лунку) в течение 2-3 дней при 37°C, 5% CO₂.

[0219] 4) В каждую лунку добавляли CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega), чтобы измерить количество мертвых клеток, и планшет инкубировали в инкубаторе в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂.

[0220] 5) Планшет считывали при 490 нм на микропланшетном спектрофотометре, и выживаемость клеток была сопоставлена для клеток с или без обработки конъюгатами LDC. Были определены концентрации LDC, которые были необходимы для 50%-й гибели клеток (значения IC₅₀).

[0221] Результаты и анализ:

[0222] LDC12B может убить следующие раковые клетки или ингибировать их рост: клетки HEC-1A рака эндометрия человека, клетки линии GTL-16 рака желудка человека, карциному HCT-116 толстой кишки человека, клеточную линию SH-SY5Y нейробластомы человека. Значения IC₅₀ приведены в таблице 6.

Таблица 6: результаты тестов на цитотоксичность (значения IC₅₀) конъюгата LDC12B относительно MMAE

(Единицы измерения: моль/л, М)

КЛЕТКИ	HCT-116	GTL-16	HEC-1A	SH-SY5Y
MMAE	$1,27 \times 10^{-8}$	$6,38 \times 10^{-9}$	$8,74 \times 10^{-9}$	$2,4 \times 10^{-8}$
LDC12B	$8,26 \times 10^{-7}$	$6,12 \times 10^{-7}$	$6,31 \times 10^{-7}$	$3,96 \times 10^{-7}$

[0223] 5. Тест на цитотоксичность конъюгата LDC13B

[0224] Тестируемый образец: LDC13B

[0225] Контрольные образцы: MMAE, LDC1, LDC13A

[0226] Культуральная среда: RPMI 1640, без фолиевой кислоты

[0227] Экспериментальные способы:

[0228] 1) Клеточную линию KB рака носоглотки человека, карциному НСТ-116 толстой кишки человека, клетки PC-3 рака предстательной железы человека, клетки линии GTL-16 рака желудка человека, клетки HEC-1A рака эндометрия человека и клетки N87 рака желудка человека инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в среде RPMI 1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки; клетки пассировали каждые 2-3 дня.

[0229] 2) Клеточную линию KB рака носоглотки человека, карциному НСТ-116 толстой кишки человека, клетки PC-3 рака предстательной железы человека, клетки линии GTL-16 рака желудка человека, клетки HEC-1A рака эндометрия человека и клетки N87 рака желудка человека высевали по 1×10^3 клеток на лунку (96-луночного планшета) и инкубировали в течение 8-12 ч при 37°C, 5% CO₂.

[0230] 3) Исходные растворы LDC-конъюгатов или контролей были приготовлены в растворе PBS. По 100 мкл/лунку серийно разведенных LDC-конъюгатов или контролей добавляли к клеткам в планшетах и инкубировали в течение 15-30 мин при температуре 37°C, 5% CO₂. Культуральную среду в лунках затем удаляли путем аспирации, и клетки инкубировали в свежей культуральной среде без конъюгата (по 150 мкл/лунку) в течение 2-3 дней при 37°C, 5% CO₂.

[0231] 4) В каждую лунку добавляли CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega), чтобы измерить количество мертвых клеток, и планшет инкубировали в инкубаторе в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂.

[0232] 5) Планшет считывали при 490 нм на микропланшетном спектрофотометре, и выживаемость клеток была сопоставлена для клеток с или без обработки конъюгатами LDC. Были определены концентрации LDC, которые были необходимы для 50%-й гибели клеток (значения IC₅₀).

[0233] Результаты и анализ:

[0234] LDC13B может убивать следующие раковые клетки или ингибировать их рост: клеточную линию KB рака носоглотки человека, карциному НСТ-116 толстой кишки человека, клетки PC-3 рака предстательной железы человека, клетки линии GTL-16 рака желудка человека, клетки HEC-1A рака эндометрия человека, клетки N87 рака желудка человека. В частности, LDC13B является сильнодействующим в отношении клеток KB, которые представляют собой клеточную линию, имеющую как фолатный, так и LHRH рецепторы. Кроме того, билигандный LDC13B является в 2-10 раза более сильным относительно любого монолигандного лекарственного конъюгата, а именно LDC1 и LDC13A, что подтверждает преимущество билигандного лекарственного конъюгата в эффективности. Значения IC₅₀ приведены в таблице 7.

Таблица 7: результаты тестов на цитотоксичность (значения IC₅₀) конъюгата LDC13B относительно контроля

(Единицы измерения: моль/л, М)

КЛЕТКИ	KB	НСТ-116	GTL-16	HEC-1A	PC-3	N87
MMAE	$2,88 \times 10^{-8}$	$1,27 \times 10^{-8}$	$6,38 \times 10^{-9}$	$8,74 \times 10^{-9}$	$1,28 \times 10^{-8}$	$3,83 \times 10^{-9}$
LDC1	$6,5 \times 10^{-8}$	-	-	-	-	-
LDC13A	$4,5 \times 10^{-6}$	-	-	-	-	-
LDC13B	$2,57 \times 10^{-8}$	$1,07 \times 10^{-6}$	$7,55 \times 10^{-7}$	$9,4 \times 10^{-7}$	$1,18 \times 10^{-6}$	$3,26 \times 10^{-7}$

[0235] 6. Тест на цитотоксичность конъюгата LDC10H

[0236] Тестируемый образец: LDC10H

[0237] Контрольные образцы: MMAE, LDC1, LDC10A

[0238] Культуральная среда: RPMI 1640, без фолиевой кислоты

[0239] Экспериментальные способы:

[0240] 1) Клетки H1299 рака легких человека, клетки SKOV3 рака яичников, клеточную линию HCC1954 рака молочной железы и клетки H460 рака легких человека инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в среде RPMI 1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки; клетки пассировали каждые 2-3 дня.

[0241] 2) Клетки H1299 рака легких человека, клетки SKOV3 рака яичников, клеточную линию HCC1954 рака молочной железы и клетки H460 рака легких человека высевали по 1×10^3 клеток на лунку (96-луночного планшета) и инкубировали в течение 8-12 ч при 37°C, 5% CO₂.

[0242] 3) Исходные растворы LDC-конъюгатов или контролей были приготовлены в растворе PBS. По 100 мкл/лунку серийно разведенных LDC-конъюгатов или контролей добавляли к клеткам в планшетах и инкубировали в течение 15-30 мин при температуре 37°C, 5% CO₂. Культуральную среду в лунках затем удаляли путем аспирации, и клетки инкубировали в свежей культуральной среде без конъюгата (по 150 мкл/лунку) в течение 2-3 дней при 37°C, 5% CO₂.

[0243] 4) В каждую лунку добавляли CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega), чтобы измерить количество мертвых клеток, и планшет инкубировали в инкубаторе в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂.

[0244] 5) Планшет считывали при 490 нм на микропланшетном спектрофотометре, и выживаемость клеток была сопоставлена для клеток с или без обработки конъюгатами LDC. Были определены концентрации LDC, которые были необходимы для 50%-й гибели клеток (значения IC₅₀).

[0245] Результаты и анализ:

[0246] LDC10H может убивать следующие клетки или ингибирует их рост: клетки H1299 рака легких человека, клетки SKOV3 рака яичников, клеточную линию HCC1954 рака молочной железы и клетки H460 рака легких человека. Билигандный LDC10H является в 10 раз более сильным, чем монолигандный лекарственный конъюгат LDC10A, что указывает на то, что проникающая через мембрану пептидная последовательность (H) может способствовать доставке лекарственного средства в клетки посредством эндоцитоза. Кроме того, LDC10H также сильнее монолигандного конъюгата LDC1, что подтверждает преимущество билигандного лекарственного конъюгата в эффективности. Значения IC₅₀ для LDC10H были ниже, чем для контролей LDC1 и LDC10A (таблица 8).

Таблица 8: результаты тестов на цитотоксичность (значения IC₅₀) конъюгата LDC10H относительно контролей

(Единицы измерения: моль/л, M)

КЛЕТКИ	HCC1954	H1299	SKOV3	H460
MMAE	$0,29 \times 10^{-9}$	$0,71 \times 10^{-9}$	$0,49 \times 10^{-9}$	$0,56 \times 10^{-9}$
LDC1	$7,79 \times 10^{-8}$	$1,86 \times 10^{-7}$	$2,01 \times 10^{-7}$	$1,37 \times 10^{-7}$
LDC10A	$4,18 \times 10^{-7}$	$7,88 \times 10^{-7}$	$6,41 \times 10^{-7}$	$7,24 \times 10^{-7}$
LDC10H	$3,6 \times 10^{-8}$	$9,04 \times 10^{-8}$	$7,38 \times 10^{-8}$	$8,53 \times 10^{-8}$

[0247] 7. Тест на цитотоксичность конъюгата LDC1013

[0248] Контрольные образцы: MMAE, LDC1, LDC10A

[0249] Культуральная среда: RPMI 1640, без фолиевой кислоты

[0250] Экспериментальные способы:

[0251] 1) Клеточную линию KB рака носоглотки человека, линию клеток меланомы A375 и клетки рака легких H460 инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в среде RPMI 1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки; клетки пассировали каждые 2-3 дня.

[0252] 2) Клеточную линию KB рака носоглотки человека, линию клеток меланомы A375 и клетки рака легких H460 высевали по 1×10^3 клеток на лунку (96-луночного планшета) и инкубировали в течение 8-12 ч при 37°C, 5% CO₂.

[0253] 3) Исходные растворы LDC-конъюгатов или контролей были приготовлены в растворе PBS. По 100 мкл/лунку серийно разведенных LDC-конъюгатов или контролей добавляли к клеткам в планшетах и инкубировали в течение 15-30 мин при температуре 37°C, 5% CO₂. Культуральную среду в лунках затем удаляли путем аспирации, и клетки инкубировали в свежей культуральной среде без конъюгата (по 150 мкл/лунку) в течение 2-3 дней при 37°C, 5% CO₂.

[0254] 4) В каждую лунку добавляли CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega), чтобы измерить количество мертвых клеток, и планшет инкубировали в инкубаторе в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂.

[0255] 5) Планшет считывали при 490 нм на микропланшетном спектрофотометре, и выживаемость клеток была сопоставлена для клеток с или без обработки конъюгатами LDC. Были определены концентрации LDC, которые были необходимы для 50%-й гибели клеток (значения IC₅₀).

[0256] Результаты и анализ:

[0257] LDC1013 эффективно убивает следующие клеточные линии: клеточную линию KB рака носоглотки человека, клетки рака легких H460 и ингибирует рост клеточной линии A375 меланомы, и значения IC₅₀ для LDC1013 были ниже (более сильнодействующее соединение), чем для контролей LDC1 и LDC10A (таблица 9). Однако цитотоксичность LDC1013 была значительно ниже (значения IC₅₀ были выше)

относительно контрольной клеточной линии - клеточной линии A375 меланомы.

[0258] LDC1013 представляет собой билигандный конъюгат лекарственного средства, который может связываться как с рецептором LHRH, так и с рецептором TRPV6. Для положительных по рецепторам клеточных линий, что может быть видно из таблицы 9, цитотоксичность LDC1013 была 2-15 раз выше (значения IC₅₀ были в 2-15 раз ниже)

цитотоксичности монолигандных лекарственных конъюгатов LDC1 или LDC10A. В отношении A375, LDC1013 был примерно в 10-100 раз менее токсичен, чем в отношении клеток H460 и KB, соответственно, что указывает на хорошую специфичность. Поэтому, билигандный конъюгат лекарственного средства LDC1013 показывают синергетический эффект и вносит вклад в эффективность лекарственных средств.

Таблица 9: результаты тестов на (значения IC₅₀) конъюгата LDC1013 относительно контролей

(Единицы измерения: моль/л, M)

	MMAE	FA-MMAE	LDC10A	LDC1013
KB	2×10^{-8}	4×10^{-6}	$5,8 \times 10^{-6} \text{M}$	$1,3 \times 10^{-7}$
H460	$3,7 \times 10^{-8}$	$9,4 \times 10^{-6}$	$1,39 \times 10^{-5} \text{M}$	$2,2 \times 10^{-6}$
A375	$8,5 \times 10^{-8}$	$3,7 \times 10^{-5}$	$3,94 \times 10^{-5} \text{M}$	$1,19 \times 10^{-5}$

[0259] 8. Тест на цитотоксичность конъюгата LDC10BR

[0260] Контрольные образцы: MMAE и LDC10B

[0261] Культуральная среда: RPMI 1640, без фолиевой кислоты

[0262] Экспериментальные способы:

[0263] 1) Клеточную линию KB рака носоглотки человека, клеточную линию меланомы A375 и клетки рака легких H460 инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в среде RPMI 1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки; клетки пассировали каждые 2-3 дня.

[0264] 2) Клеточную линию KB рака носоглотки человека, клеточную линию меланомы A375 и клетки рака легких H460 высевали по 1×10^3 клеток на лунку (96-луночного планшета) и инкубировали в течение 8-12 ч при 37°C, 5% CO₂.

[0265] 3) Исходные растворы LDC-конъюгатов или контролей были приготовлены в растворе PBS. По 100 мкл/лунку серийно разведенных LDC-конъюгатов или контролей добавляли к клеткам в планшетах и инкубировали в течение 15-30 мин при температуре 37°C, 5% CO₂. Культуральную среду в лунках затем удаляли путем аспирации, и клетки инкубировали в свежей культуральной среде без конъюгата (по 150 мкл/лунку) в течение 2-3 дней при 37°C, 5% CO₂.

[0266] 4) В каждую лунку добавляли CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega), чтобы измерить количество мертвых клеток, и планшет инкубировали в инкубаторе в течение 1 ч при 37°C, 5% CO₂.

[0267] 5) Планшет считывали при 490 нм на микропланшетном спектрофотометре, и выживаемость клеток была сопоставлена для клеток с или без обработки конъюгатами LDC. Были определены концентрации LDC, которые были необходимы для 50%-й гибели клеток (значения IC₅₀).

[0268] Результаты и анализ:

[0269] LDC10BR эффективно убивает следующие клеточные линии: клеточную линию KB рака носоглотки человека, клетки рака легких H460 и ингибирует рост клеточной линии A375 меланомы, и значения IC₅₀ для LDC10BR были сопоставимы с значениями у билигандного конъюгата LDC10B (таблица 10).

[0270] LDC10BR представляет собой трилигандный конъюгат лекарственного средства, который может связываться с RGD-рецептором (интегрином-альфа), фолатным рецептором и рецептором TRPV6. Для положительных по рецепторам клеточных линий, как может быть видно из таблицы 10, цитотоксичность LDC10BR была сравнима с цитотоксичностью билигандного конъюгата LDC10B. Таким образом, трилигандный лекарственный конъюгат LDC10BR по меньшей мере является таким же эффективным, как билигандный конъюгат LDC10B. Кроме того, трилигандный LDC может иметь превосходную цитотоксичность и селективность в отношении раковых клеток с экспрессией всех трех рецепторов с тремя лигандами, обеспечивающими синергетический эффект и вносящими вклад в эффективность лекарственных средств.

Таблица 10: результаты тестов на цитотоксичность (значения IC₅₀) конъюгата LDC10BR относительно LDC10B

(Единицы измерения: моль/л, M)

	MMAE	LDC10B	LDC10BR
KB	2×10^{-8}	$2,2 \times 10^{-6}$	$6,6 \times 10^{-6}$
H460	$3,7 \times 10^{-8}$	$6,8 \times 10^{-6}$	$6,4 \times 10^{-6}$

A375	$8,5 \times 10^{-8}$	$5,13 \times 10^{-5}$	$3,81 \times 10^{-5}$
------	----------------------	-----------------------	-----------------------

[0271] **ПРИМЕР III: исследование эффективности конъюгатов на животных моделях**

[0272] Цель: изучить противоопухолевую эффективность конъюгатов на мышинных моделях в отношении лечения раковых заболеваний.

[0273] 1. Анализ ингибирования конъюгатами LDC10B и LDC10H ксенотрансплантированных опухолей

[0274] Конъюгаты, используемые для лечения: LDC10B, LDC10H

[0275] Животные: 6-8 недельные самки бестимусных мышей

[0276] Экспериментальные способы:

[0277] 1) Клетки H460 крупноклеточного рака легких человека, клетки A549 рака легких человека, клетки SKOV3 рака яичников и клеточную линию HCC1954 рака молочных желез инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в среде IMDM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки; клетки пассировали каждые 2-3 дня.

[0278] 2) Получение опухолей: 7×10^6 опухолевых клеток вводили подкожно в спину бестимусных мышей, и мышей разделяли по группам лечения после того, как размеры опухоли достигали примерно 100-200 мм³.

[0279] 3) Лечение: 3 мыши/группу получали лечение LDC10B, LDC10H, а также контрольным соединением MMAE и контролем носителя PBS в дозировке 5 и 10 мг/кг через каждые 5 дней по три инъекции.

[0280] 4) Проводили наблюдение за физическими характеристиками, весом тела и размерами опухолей у животных. В ходе эксперимента фиксировали число умерших животных.

[0281] Результаты и анализ:

[0282] LDC10B и LDC10H могут ингибировать рост опухолей из клеток H460 крупноклеточного рака легких человека, клеток SKOV3 рака яичников и клеточной линии HCC1954 рака молочных желез, причем большинство опухолей исчезли после трех инъекций в дозах 5 и 10 мг/кг. Подробные результаты представлены в таблице 11 и таблице 12.

Таблица 11: эффективность ингибирования конъюгатом LDC10B ксенотрансплантированных опухолей

Время	Трансплантированная опухоль H460				Трансплантированная опухоль HCC1954		Трансплантированная опухоль SKOV3	
	5 мг/кг		10 мг/кг		10 мг/кг		10 мг/кг	
	Вес тела мышей (г)	Размер опухоли (мм ³)	Вес тела мышей (г)	Размер опухоли (мм ³)	Вес тела мышей (г)	Размер опухоли (мм ³)	Вес тела мышей (г)	Размер опухоли (мм ³)
Перед инъекцией	23,13	89,25	22,51	97,38	21,85	225,32	22,96	178,68
Пять дней после 1-й инъекции	22,53	78,63	22,53	45,74	22,2	108,73	22,44	163,05
Пять дней после 2-й инъекции	22,26	49,11	23,37	6,32	22,55	0	23,23	120,51
Пять дней после 3-й инъекции	21,65	52,5	23	0	22,38	0	23,53	68,31

Таблица 12: эффективность ингибирования конъюгатом LDC10H ксенотрансплантированных опухолей

LDC10H	Трансплантированная опухоль H460				Трансплантированная опухоль HCC1954	
	5 мг/кг		10 мг/кг		10 мг/кг	
	Вес тела мышей (г)	Размер опухоли (мм ³)	Вес тела мышей (г)	Размер опухоли (мм ³)	Вес тела мышей (г)	Размер опухоли (мм ³)

Перед инъекцией	23,29	136,49	23,37	126	22,05	88,6
Пять дней после 1-й инъекции	24,26	71,51	24,39	108,15	23,32	16,77
Пять дней после 2-й инъекции	23,14	65,73	22,12	37,5	22,87	0
Пять дней после 3-й инъекции	23,22	11,64	23,61	2,34	22,51	0

[0283] 2. Анализ ингибирования конъюгатами LDC11A, LDC11B ксенотрансплантированных опухолей

[0284] Конъюгаты, используемые для лечения: LDC11A и LDC11B

[0285] Животные: 6-8 недельные самки бестимусных мышей

[0286] Экспериментальные способы:

[0287] 1) Клетки H460 крупноклеточного рака легких человека, клетки SKOV3 рака яичников, клеточную линию HCC1954 рака молочной железы и клетки SK-BR-3 рака молочной железы человека инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в среде IMDM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки; клетки пассировали каждые 2-3 дня.

[0288] 2) Получение опухолей: 7×10⁶ опухолевых клеток вводили подкожно в спину бестимусных мышей, и мышей разделяли по группам лечения после того, как размеры опухоли достигали примерно 100-200 мм³.

[0289] 3) Лечение: 3 мыши/группу получали лечение LDC11A, LDC11B, а также контрольным соединением MMAE и контролем носителя PBS в дозировке 5 и 10 мг/кг через каждые 5 дней по три инъекции.

[0290] 4) Проводили наблюдение за физическими характеристиками, весом тела и размерами опухолей у животных. В ходе эксперимента фиксировали число умерших животных.

[0291] Результаты и анализ:

[0292] LDC11B может ингибировать рост опухолей из клеток H460 крупноклеточного рака легких человека, клеток SKOV3 рака яичников и клеточной линии HCC1954 рака молочных желез, причем большинство опухолей исчезли после трех инъекций в дозировке 10 мг/кг. В случае LDC11A, животные умирали после первой инъекции вследствие сильной токсичности. Подробные результаты представлены в таблице 13 и таблице 14.

Таблица 13: эффективность ингибирования конъюгатом LDC11B ксенотрансплантированных опухолей

Время	Трансплантированная опухоль H460		Трансплантированная опухоль HCC1954		Трансплантированная опухоль SKOV3	
	10 мг/кг		10 мг/кг		10 мг/кг	
	Вес тела мышей (г)	Размер опухоли (мм ³)	Вес тела мышей (г)	Размер опухоли (мм ³)	Вес тела мышей (г)	Размер опухоли (мм ³)
Перед инъекцией	21,85	225,32	22,11	169,22	22,76	218,76
Пять дней после 1-й инъекции	22,2	108,73	24,28	137,66	22,56	87,51
Пять дней после 2-й инъекции	22,55	0	23,6	76,13	23,15	0
Пять дней после 3-й инъекции	22,38	0	24,92	27,84	23,48	0

Таблица 14: эффективность ингибирования конъюгатом LDC11A ксенотрансплантированных опухолей

LDC11A	Трансплантированная опухоль H460
	10 мг/кг

	Вес тела мышей (г)	Размер опухоли (мм ³)
Перед инъекцией	24,46	294
Три дня после 1-й инъекции	18,25	300
Пять дней после 1-й инъекции	Смерть	Смерть

[0293] 3. Анализ ингибирования конъюгатом LDC13B ксенотрансплантированных опухолей

[0294] Конъюгаты, используемые для лечения: LDC13B

[0295] Животные: 6-8 недельные самки бестимусных мышей

[0296] Экспериментальные способы:

[0297] 1) Клетки H460 крупноклеточного рака легких человека инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в среде IMDM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки; клетки пассировали каждые 2-3 дня.

[0298] 2) Получение опухолей: 7×10⁶ опухолевых клеток вводили подкожно в спину бестимусных мышей, и мышей разделяли по группам лечения после того, как размеры опухоли достигали примерно 200 мм³.

[0299] 3) Лечение: 3 мыши/группу получали лечение LDC13B, а также контрольным соединением MMAE и контролем носителя PBS в дозировке 5 и 10 мг/кг через каждые 3 дня по четыре инъекции.

[0300] 4) Проводили наблюдение за физическими характеристиками, весом тела и размерами опухолей у животных. В ходе эксперимента фиксировали число умерших животных.

[0301] Результаты и анализ:

[0302] LDC13B может ингибировать рост опухолей из клеток H460 крупноклеточного рака легких человека, причем большинство опухолей быстро уменьшались в размере при дозировке 2,5 мг/кг и полностью исчезли после четырех инъекций при дозировке 5 мг/кг. Подробные результаты приведены в таблице 15.

Таблица 15. Эффективность ингибирования конъюгатом LDC13B ксенотрансплантированных опухолей

Время	Трансплантированная опухоль H460			
	2,5 мг/кг		5 мг/кг	
	Вес тела мышей (г)	Размер опухоли (мм ³)	Вес тела мышей (г)	Размер опухоли (мм ³)
Перед инъекцией	22,7	294	20,95	196
3 дня после 1-й инъекции	22,73	384	18,36	144
3 дня после 2-й инъекции	22,65	384	19,65	40
3 дня после 3-й инъекции	22,47	144	18,21	18
3 дня после 4-й инъекции	21,76	144	18,22	13,5

[0303] 4. Анализ ингибирования конъюгатов LDC1013 ксенотрансплантированных опухолей

[0304] Конъюгаты, используемые для лечения: LDC1013

[0305] Животные: 6-8 недельные самки бестимусных мышей

[0306] Экспериментальные способы:

[0307] 1) Клетки HCC1954 рака молочных желез человека инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в среде IMDM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки; клетки пассировали каждые 2-3 дня.

[0308] 2) Получение опухолей: 7×10⁶ опухолевых клеток вводили подкожно в спину бестимусных мышей, и мышей разделяли по группам лечения после того, как размеры

опухоли достигали примерно 180-320 мм³.

[0309] 3) Лечение: 3 мыши/группу получали лечение LDC1013, а также контрольным соединением MMAE и контролем носителя PBS в дозировках 2,5 и 5 мг/кг через каждые 3 дня по четыре инъекции.

[0310] 4) Проводили наблюдение за физическими характеристиками, весом тела и размерами опухолей у животных. В ходе эксперимента фиксировали число умерших животных.

[0311] Результаты и анализ:

[0312] LDC1013 может полностью уничтожить ксенотрансплантированную опухоль из клеток HCC1954 после 7 доз по 2,5 мг/кг и 7 доз по 5 мг/кг, вводимых каждые три дня, соответственно. Подробные результаты приведены в таблице 16.

Таблица 16. Эффективность ингибирования конъюгатом LDC1013 ксенотрансплантированных опухолей

Время	Трансплантированная опухоль HCC1954			
	2,5 мг/кг		5 мг/кг	
	Вес тела мышей (г)	Размер опухоли (мм ³)	Вес тела мышей (г)	Размер опухоли (мм ³)
Перед инъекцией	24,14	180	21,92	320
3 дня после 1-й инъекции	24,46	198	20,7	405
3 дня после 2-й инъекции	24,54	198	20,43	405
3 дня после 3-й инъекции	23,94	180	21,31	288
3 дня после 4-й инъекции	24,3	113	21,15	88
4 дня после 5-й инъекции	24,98	64	21,21	40
5 дней после 6-й инъекции	24,73	22	20,49	0
6 дней после 7-й инъекции	24,43	0	24,49	-

[0313] **5. Анализ ингибирования конъюгатов LDC10BX ксенотрансплантированных опухолей**

[0314] Конъюгаты, используемые для лечения: LDC10BX

[0315] Животные: 6-8 недельные самки бестимусных мышей

[0316] Экспериментальные способы:

[0317] 1) Клетки H460 крупноклеточного рака легких человека инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в среде IMDM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки; клетки пассировали каждые 2-3 дня.

[0318] 2) Получение опухолей: 7×10⁶ опухолевых клеток вводили подкожно в спину бестимусных мышей, и мышей разделяли по группам лечения после того, как размеры опухоли достигали примерно 180-320 мм³.

[0319] 3) Лечение: 3 мыши/группу получали лечение LDC10BX, а также контрольным соединением LDC13A в дозировке 10 мг/кг через каждые 3 дня по три инъекции.

[0320] 4) Проводили наблюдение за физическими характеристиками, весом тела и размерами опухолей у животных. В ходе эксперимента фиксировали число умерших животных.

[0321] Результаты и анализ:

[0322] LDC10BX уничтожал ксенотрансплантированную опухоль из клеток H460 после 3 доз по 10 мг/кг, вводимых каждые три дня.

[0323] 6. Определение концентрации конъюгата в моделях ксенотрансплантированных опухолей

[0324] Образцы: LDC10B, LDC10H

[0325] Животные: 6-8 недельные самки бестимусных мышей

[0326] Экспериментальные способы:

[0327] 1) Клетки SKOV3 рака яичников и клетки HCC1954 рака молочных желез человека инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в среде IMDM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки; клетки пассировали каждые 2-3 дня.

[0328] 2) Получение опухолей: 7×10⁶ опухолевых клеток вводили подкожно в спину бестимусных мышей, и мышей разделяли по группам лечения после того, как размеры опухоли достигали примерно 100-200 мм³.

[0329] 3) Лечение: 3 мыши/группу, 10 мг/кг, перитонеальная инъекция.

[0330] 4) Сбор крови: время для сбора крови до лечения было установлено как 0-е, кровь собирали через 20 мин, 2 ч, 4 ч и 24 ч после лечения. Кровь центрифугировали для сбора сыворотки, которую замораживали и сохраняли.

[0331] 5) Обнаружение: общее количество MMAE, LDC10B, LDC10H, а также метаболиты MMAE из LDC10B и LDC10H, детектировали в сыворотке крови мышей с помощью набора анти-MMAE ELISA.

[0332] Результаты и анализ:

[0333] Следовые количества LDC10B были обнаружены в сыворотке через 24 ч после лечения, тогда как ни LDC10H, ни его метаболит MMAE не были обнаружены, что свидетельствует о том, что свободные лекарственные соединения быстро выводятся из организма/метаболизируются в организме *in vivo*. Подробные результаты приведены в таблице 17.

Таблица 17: концентрации конъюгатов у животных с ксенотрансплантированными опухолями

Концентрация (мкг/мл)	LDC10B	LDC10H
Перед лечением	0	0
20 мин	10,8	0,77
2 ч	5,035	0,58
4 ч	0,53	0,196
24 ч	0,1179	0

[0334] В свете вышеизложенного, исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что:

[0335] (a) Полилигандные лекарственные конъюгаты (mLDC) связываются с клетками-мишенями и/или проникают в клетки-мишени путем эндоцитоза и убивают клетки за счет цитотоксического действия полезной нагрузки. Были протестированы более 20 различных клеточных линий рака, и результаты подтвердили этот вывод.

[0336] (b) *In vivo* визуализация на живых животных показала, что флуоресцентно меченый LDC10B-Cy5 концентрируется в месте положения опухолевой массы и остается более чем на 24 ч (см. фиг.4).

[0337] (c) mLDC могут полностью уничтожать ксенотрансплантированные опухоли в мышинной модели. Большинство исследуемых соединений показало превосходную эффективность в ингибировании роста или уничтожении ксенотрансплантированных опухолей, зависимым от дозы и уровня экспрессии рецепторов образом, не вызывая потери веса или других очевидных проявлений токсичности. После уничтожения опухолей, у мышей не появлялось новых опухолей до конца их жизни (> 6 месяцев).

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Coherent Biopharma

<120> Полилигандные лекарственные конъюгаты и их применение

<130> 066138-8001W001

<150> CN201510489556.6

<151> 2015-08-11
 <150> CN201510489560.2
 <151> 2015-08-11
 <160> 20
 5 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 7
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 10 <220>
 <223> Сайт узнавания матрипазы
 <400> 1
 Lys Ser Arg Ala Glu Asp Glu
 1 5
 15 <210> 2
 <211> 6
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 20 <223> Сайт узнавания MMP-2
 <400> 2
 Pro Leu Gly Leu Ala Gly
 1 5
 <210> 3
 25 <211> 4
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Сайт узнавания простат-специфического антигена
 30 <400> 3
 Ser Ser Leu Tyr
 1
 <210> 4
 <211> 7
 35 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Сайт узнавания TMPRSS2
 <400> 4
 40 Leu Leu Arg Ser Leu Ile Gly
 1 5
 <210> 5
 <211> 4
 <212> Белок
 45 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Сайт узнавания активированного белка C
 <400> 5

Leu Val Lys Arg
 1
 <210> 6
 <211> 4
 5 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Сайт узнавания фактора I α
 <400> 6
 10 Leu Val Val Arg
 1
 <210> 7
 <211> 4
 <212> Белок
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Сайт узнавания фактора VII α
 <400> 7
 Gln Leu Thr Arg
 20 1
 <210> 8
 <211> 4
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 25 <220>
 <223> Сайт узнавания фактора X α
 <400> 8
 Leu Glu Gly Arg
 1
 30 <210> 9
 <211> 6
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 35 <223> Сайт узнавания калпаина-а
 <400> 9
 Pro Leu Phe Ala Glu Pro
 1 5
 <210> 10
 40 <211> 6
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Сайт узнавания калпаина-2
 45 <400> 10
 Gly Leu Gly Ser Glu Pro
 1 5
 <210> 11

<211> 5
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <223> Сайт узнавания энтеропептидазы
 <400> 11
 Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5
 <210> 12
 10 <211> 4
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Сайт узнавания MMP-8
 15 <400> 12
 Gly Pro Ser Gly
 1
 <210> 13
 <211> 4
 20 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Сайт узнавания пропротеинконвертазы 5
 <400> 13
 25 Arg Ser Lys Arg
 1
 <210> 14
 <211> 4
 <212> Белок
 30 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Сайт узнавания калпаина-3
 <400> 14
 Val Gly Val Phe
 35 1
 <210> 15
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <223> P10
 <400> 15
 Cys Lys Glu Phe Leu His Pro Ser Lys Val Asp Leu Pro Arg
 1 5 10
 45 <210> 16
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> P11
 <400> 16
 Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly Cys
 5 1 5 10
 <210> 17
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 10 <220>
 <223> P12
 <400> 17
 Ala Gly Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys
 1 5 10
 15 <210> 18
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 20 <223> P13
 <220>
 <221> ПРОЧИЕ ПРИЗНАКИ
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa=D-Lys
 25 <400> 18
 Glu His Trp Ser Tyr Xaa Leu Arg Pro Gly Cys
 1 5 10
 <210> 19
 <211> 9
 30 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> R9
 <400> 19
 35 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5
 <210> 20
 <211> 13
 <212> Белок
 40 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Tat-пептид
 <400> 20
 Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
 45 1 5 10

(57) Формула изобретения

1. Конъюгированное соединение или его фармацевтически приемлемая соль для

доставки полезной нагрузки пациенту, содержащие по меньшей мере одну полезную нагрузку и два или более видов взаимодействующих с клетками молекул, причем полезная нагрузка конъюгирована с по меньшей мере одной из взаимодействующих с клетками молекул, причем два или более видов взаимодействующих с клетками молекул

5 включают

а) первый лиганд, способный специфично связываться с первым клеточным поверхностным рецептором, и второй лиганд, способный специфично связываться со вторым клеточным поверхностным рецептором, причем первый и второй клеточные поверхностные рецепторы отличаются друг от друга; или

10 б) первый лиганд, способный специфично связываться с первым клеточным поверхностным рецептором, и молекулу эндоцитоза, способную опосредовать эндоцитоз, причем первый и второй поверхностные рецепторы выбраны из группы, состоящей из рецептора соматостатина-14 (SST-14), рецептора рилизинг-гормона лютеинизирующего гормона (LHRH), рецептора члена 6 подсемейства V катионного канала транзитного рецепторного потенциала (TRPV6) и рецептора интегрин альфа;

15 и

молекула эндоцитоза выбрана из группы, состоящей из фолата и его аналогов и проникающего в клетки пептида,

причем полезная нагрузка выбрана из группы, состоящей из низкомолекулярного соединения, нуклеотида, пептида и белка,

20 причем аналоги фолата выбраны из группы, состоящей из 5-метилтетрагидрофолата, 5-формилтетрагидрофолата, сульфаниламида, метотрексата и 5,10-метилентетрагидрофолата.

2. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где полезная нагрузка конъюгирована по меньшей мере с одной из взаимодействующих с клетками молекул через линкер.

3. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где полезная нагрузка конъюгирована с первым лигандом, и первый лиганд конъюгирован со вторым лигандом.

30 4. Соединение по п.3 или его фармацевтически приемлемая соль, где первый лиганд конъюгирован со вторым лигандом через спейсер.

5. Соединение по п.4 или его фармацевтически приемлемая соль, где спейсер содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-14, Arg-Arg, Ala-Ser-Asn, Ala-Ala-Ala, Ser-Ser-Arg, Pro-Arg и Pro-Leu-Gly.

35 6. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где полезная нагрузка конъюгирована напрямую с каждым из первого лиганда и второго лиганда.

7. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где полезная нагрузка конъюгирована с первым лигандом через первый линкер, и полезная нагрузка конъюгирована со вторым лигандом через второй линкер.

40 8. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, дополнительно содержащие третий лиганд, способный специфично связываться с третьим клеточным поверхностным рецептором.

9. Соединение по п.8 или его фармацевтически приемлемая соль, где первый, второй и третий клеточные поверхностные рецепторы отличаются друг от друга.

45 10. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, содержащие одну, две, три, четыре или большее число полезных нагрузок.

11. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где полезная нагрузка представляет собой низкомолекулярное соединение.

12. Соединение по п.11 или его фармацевтически приемлемая соль, где низкомолекулярное соединение выбрано из группы, состоящей из майтанзина, таксинола, ауристатинов, эпотилонов, блеомицина, дактиномицина, пликамицина, и миромидина С.

13. Соединение по п.12 или его фармацевтически приемлемая соль, где низкомолекулярное соединение представляет собой ауристатины.

14. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где проникающий в клетки пептид выбран из группы, состоящей из связывающегося с опухолевыми клетками пептида, митохондриального проникающего пептида, активируемого проникающего в клетки пептида и антибактериального пептида.

15. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где проникающий в клетки пептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 20.

16. Соединение по п.8 или его фармацевтически приемлемая соль, где третий лиганд выбран из группы, состоящей из пептида, фолата и его аналогов, где аналоги фолата выбраны из группы, состоящей из 5-метилтетрагидрофолата, 5-формилтетрагидрофолата, сульфаниламида, метотрексата и 5,10-метилентетрагидрофолата.

17. Соединение по п.16 или его фармацевтически приемлемая соль, где пептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15 и гомологичного пептида, имеющего по меньшей мере 70% гомологии по аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 15, где гомологичный пептид представляет собой функциональный эквивалент пептида SEQ ID NO: 15.

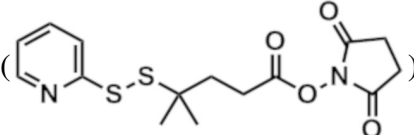
18. Соединение по п.16 или его фармацевтически приемлемая соль, где пептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, Arg-Gly-Asp, гомологичного пептида, имеющего по меньшей мере 70% гомологии по аминокислотной последовательности с любой из SEQ ID NO: 16-18, где гомологичный пептид представляет собой функциональный эквивалент любому из пептидов SEQ ID NO: 16-18.

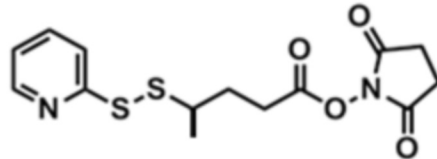
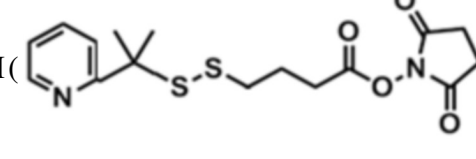
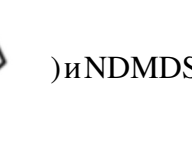
19. Соединение по п.2 или его фармацевтически приемлемая соль, где линкер представляет собой пептидный линкер, дисульфидный линкер или pH-зависимый линкер.

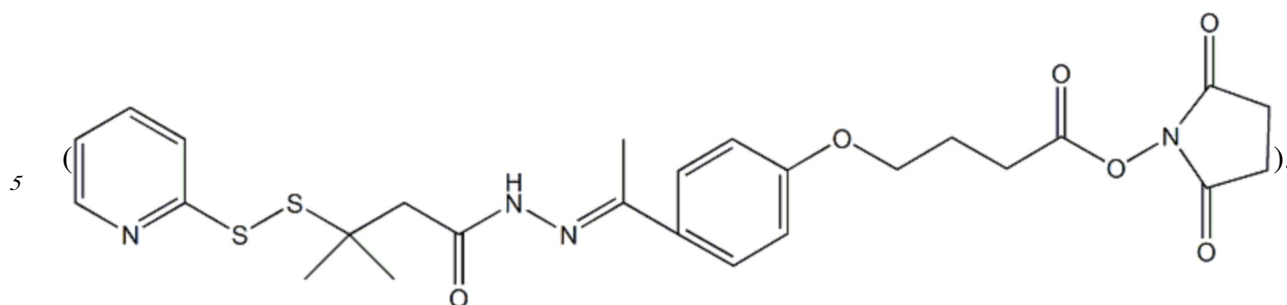
20. Соединение по п.19 или его фармацевтически приемлемая соль, где пептидный линкер способен расщепляться в определенном физиологическом окружении путем расщепления протеазой или восстановления.

21. Соединение по п.19, или его фармацевтически приемлемая соль, где пептидный линкер выбран из группы, состоящей из валин-цитруллина, фенилаланин-лизина и валин-лизина.

22. Соединение по п.19 или его фармацевтически приемлемая соль, где дисульфидный

линкер выбран из группы, состоящей из DMDS () , MDS (

) , DSDM () и NDMS ()



23. Соединение по п.19 или его фармацевтически приемлемая соль, где рН-зависимый линкер представляет собой *цис*-аконитовый ангидрид.

24. Соединение по п.8 или его фармацевтический приемлемая соль, где третий клеточный поверхностный рецептор независимо выбирают из группы, состоящей из трансферринового рецептора (TFR), рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLR), фолатного рецептора (FR), киназного рецептора мочевой кислоты, рецептора фактора некроза опухолей (TNFR), рецептора SST-14, рецептора LHRH, рецептора TRPV6 и рецептора поверхностного антигена протеазы.

25. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где конъюгированное соединение выбрано из группы, состоящей из следующих соединений: LDC10B, LDC10BR, LDC10BX, LDC11B, LDC12B, LDC13B, LDC1013, LDC10H, LDC11H и LDC12H, как показано в фигуре 1.

26. Конъюгированное соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, которые дополнительно содержат третью взаимодействующую с клетками молекулу, где третья взаимодействующая с клетками молекула представляет собой проникающий в клетки пептид.

27. Фармацевтическая композиция для доставки полезной нагрузки пациенту, содержащая соединение по любому из пп. 1-26 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель.

28. Фармацевтическая композиция по п.27, где композиция предназначена для внутривенного, подкожного, перорального, внутримышечного или интравентрикулярного введения.

29. Способ доставки полезной нагрузки пациенту, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-26 или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по п.27 или 28.

30. Способ лечения заболевания у пациента, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп. 1-26 или его фармацевтически приемлемой соли, или фармацевтической композиции по п.27 или 28, где заболевание выбирают из группы, состоящей из рака, иммунологического заболевания, сердечно-сосудистого заболевания, метаболического заболевания и неврологического заболевания.

31. Способ по п.30, где рак выбирают из группы, состоящей из рака молочных желез, рака легких, рака предстательной железы, рака почек, лейкемии, рака яичников, рака желудка, рака матки, рака эндометрия, рака печени, рака толстой кишки, рака щитовидной железы, рака поджелудочной железы, колоректального рака, рака пищевода, рака кожи, лимфомы, множественной миеломы.

32. Способ по п.30, где иммунологическое заболевание представляет собой аутоиммунное заболевание.

33. Способ по п.32, где аутоиммунное заболевание выбирают из группы, состоящей из болезни соединительной ткани, системного склероза, ревматоидного артрита и

системной красной волчанки.

34. Способ по п.30, где сердечно-сосудистое заболевание выбирают из группы, состоящей из стенокардии, инфаркта миокарда, инсульта, сердечного приступа, гипертонической болезни сердца, ревматической болезни сердца, кардиомиопатии, сердечной аритмии и врожденного порока сердца.

35. Способ по п.30, где метаболическое заболевание выбирают из группы, состоящей из диабета, подагры, ожирения, гипогликемии, гипергликемии и дислипидемии.

36. Способ по п.30, где неврологическое заболевание выбирают из группы, состоящей из болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, болезни Хантингтона, травмы головы, рассеянного склероза, головокружения, комы и эпилепсии.

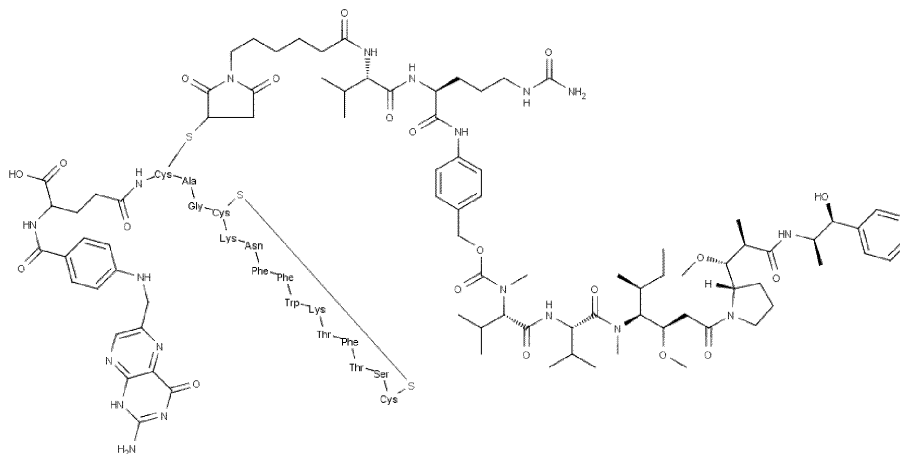
37. Способ по любому из пп. 30-36, где способ дополнительно включает введение одного или более терапевтических агентов в комбинации с соединением или его фармацевтически приемлемой солью, или фармацевтической композицией.

38. Способ по п.37, где терапевтический агент направлен на раковую терапевтическую мишень, индуцирует или усиливает противораковый иммунный ответ или является химиотерапевтическим агентом.

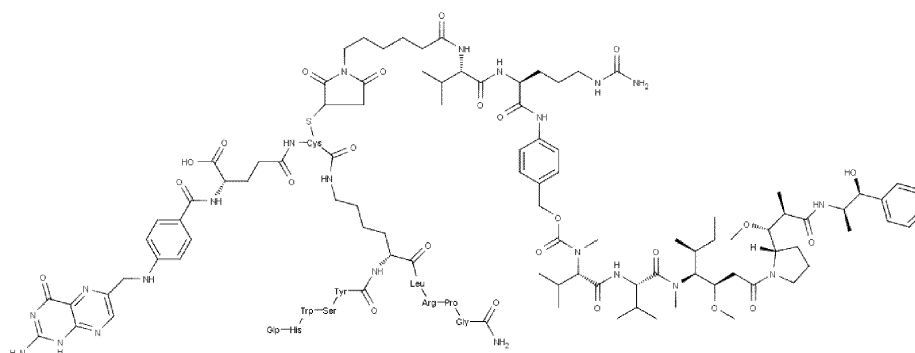
[illegible]

ФИГ. 1

2/9



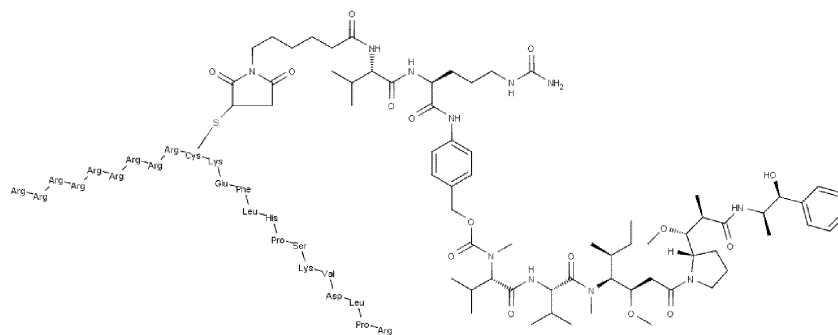
LDC12B



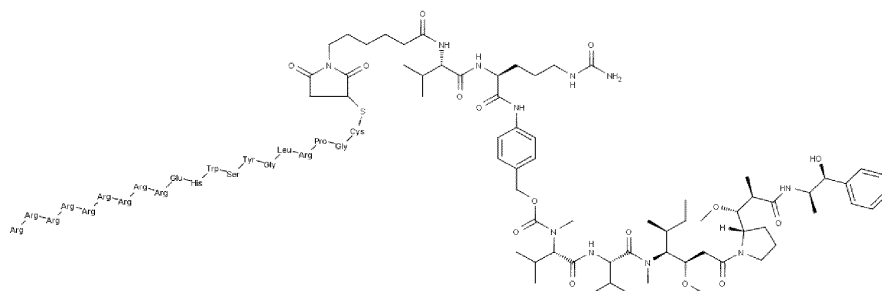
LDC13B

ФИГ. 1 (продолжение)

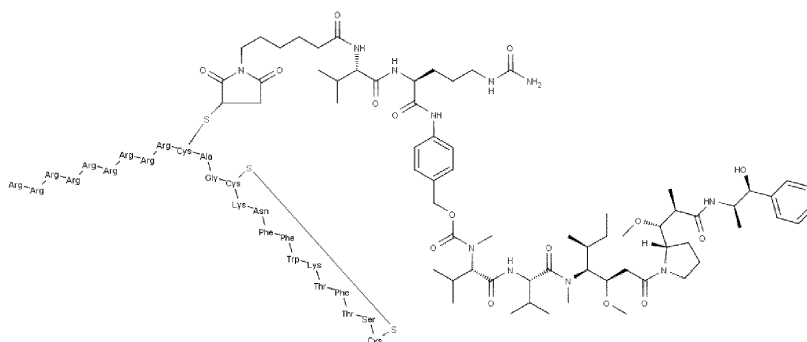
3/9



LDC10H



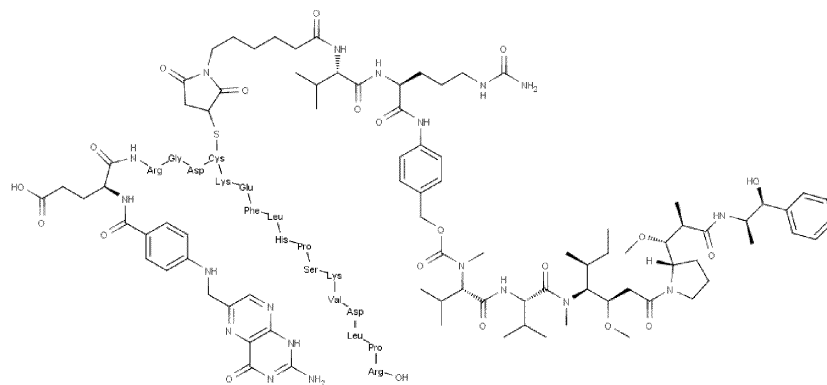
LDC11H



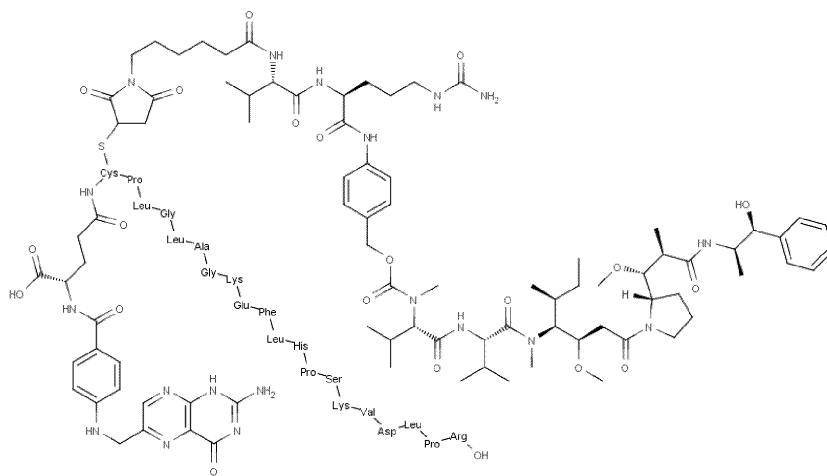
LDC12H

ФИГ. 1 (продолжение)

4/9



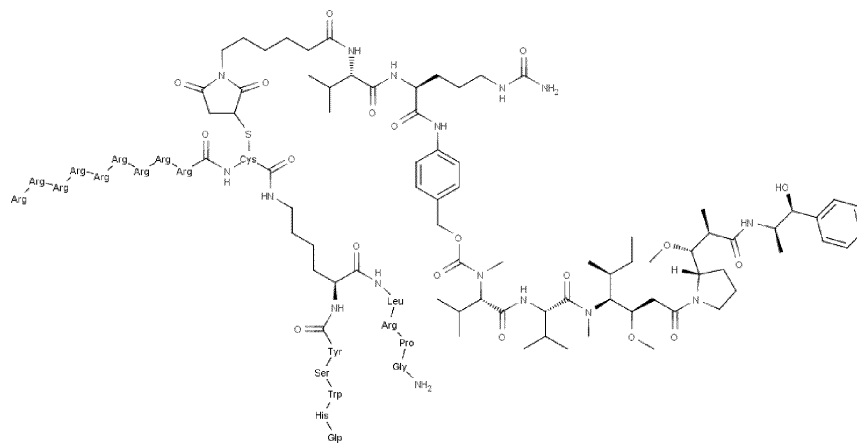
LDC10BR



LDC10BX

ФИГ. 1 (продолжение)

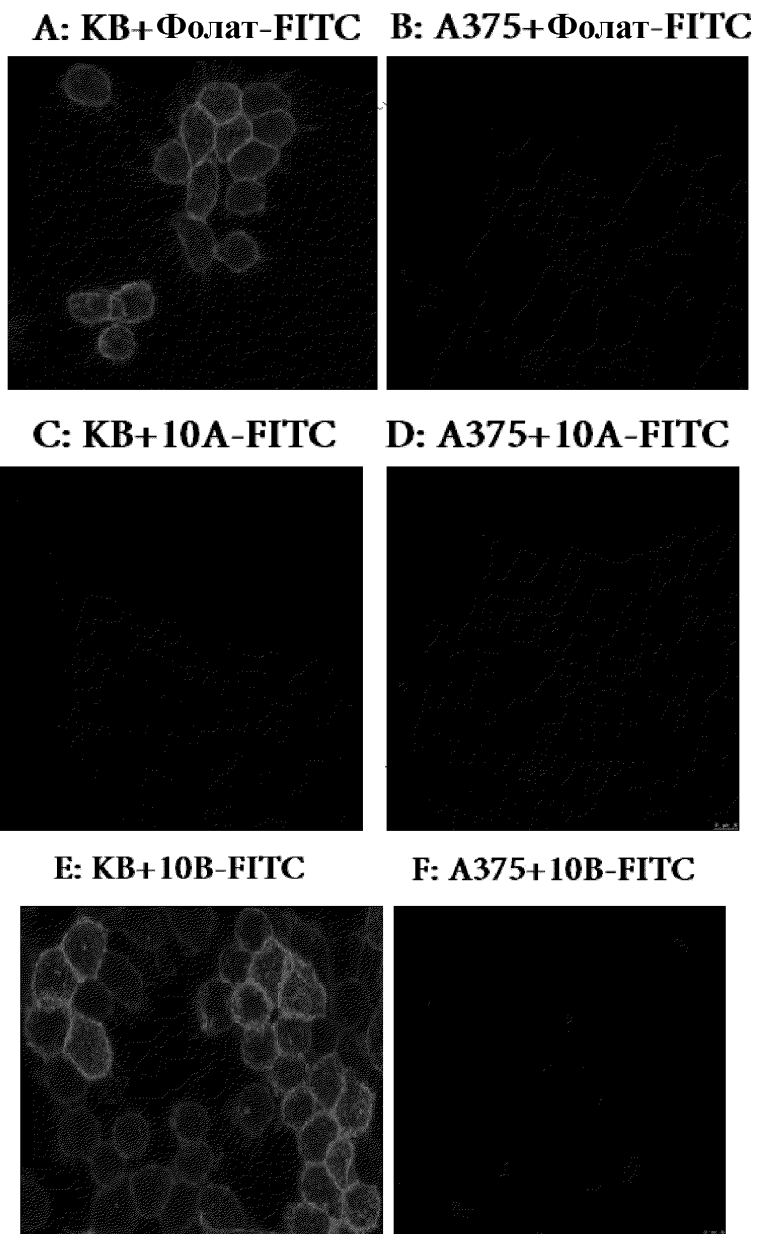
5/9



LDC1013

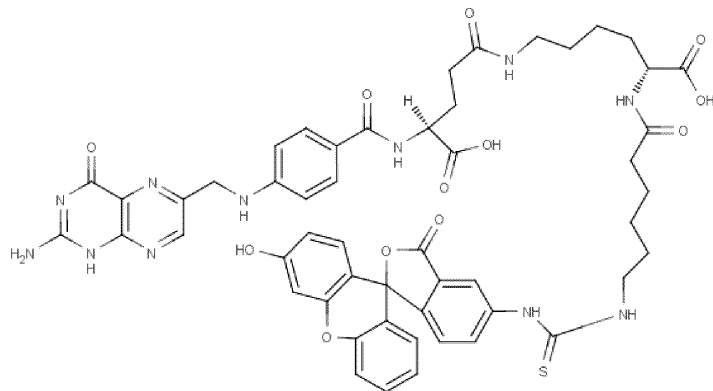
ФИГ. 1 (продолжение)

6/9

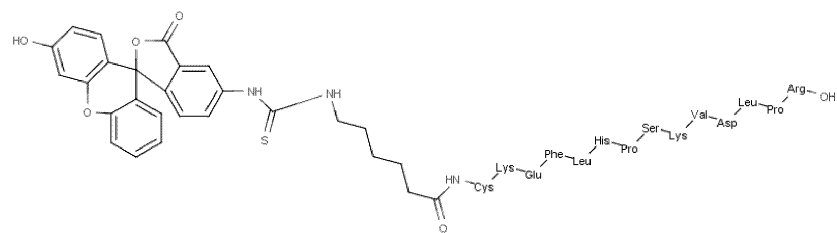


ФИГ. 2

7/9



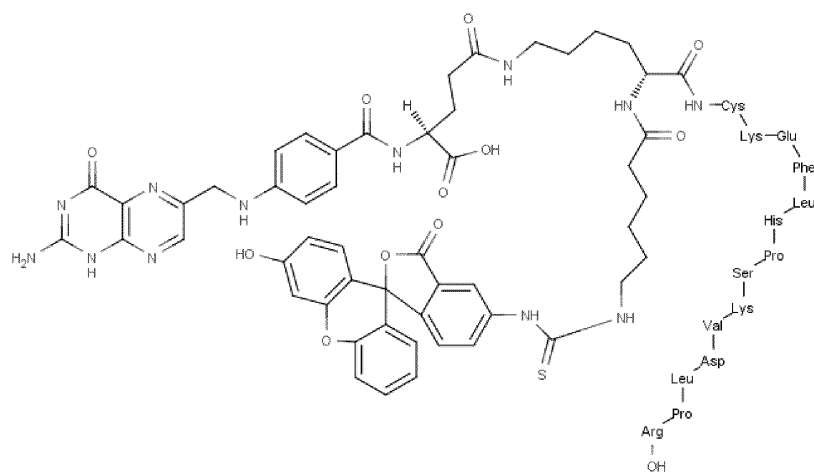
Фолат-ФИТС



10A-ФИТС

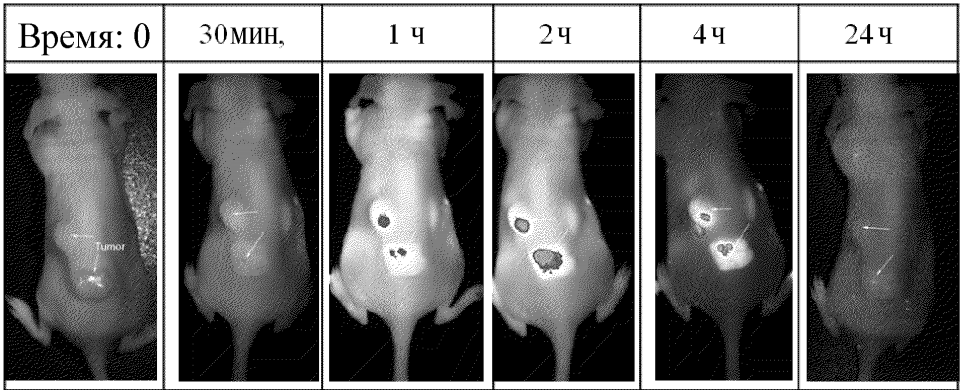
ФИГ. 3

8/9



10B-FITC

ФИГ. 3 (продолжение)



ФИГ. 4