



(51) МПК
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
A61K 47/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 47/68 (2006.01); *A61K 31/475* (2006.01); *A61K 9/19* (2006.01); *C07K 16/30* (2006.01); *C07K 16/40* (2006.01); *C07K 2317/51* (2006.01); *C07K 2317/515* (2006.01); *C07K 2317/55* (2006.01); *C07K 2317/56* (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2016150377, 22.05.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.05.2015

Дата регистрации:
18.10.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
22.05.2014 EP 14169493.5

(43) Дата публикации заявки: 25.06.2018 Бюл. № 18

(45) Опубликовано: 18.10.2018 Бюл. № 29

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 22.12.2016

(86) Заявка РСТ:
EP 2015/061456 (22.05.2015)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2015/177360 (26.11.2015)

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

(72) Автор(ы):

АРИАНС, Герардус Йозеф Андреас (NL),
КАУМАНС, Руди Герардус Элизабет (NL)

(73) Патентообладатель(и):

СИНТОН БАЙОФАРМАСЬЮТИКАЛС
Б. В. (NL)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2006034488 A2, 30.03.2006.
Деев С.М. Современные технологии создания неприродных антител для клинического применения, АСТА NATURE, 2009.

(54) САЙТ-СПЕЦИФИЧНАЯ КОНЬЮГАЦИЯ ЛИНКЕРНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ С АНТИТЕЛАМИ И ПОЛУЧАЕМЫЕ В РЕЗУЛЬТАТЕ ADC

(57) Реферат:

Изобретение относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство для лечения солидных опухолей и гематологических злокачественных образований, в котором лекарственное средство с линкером сайт-специфичным образом конъюгировано с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, которое связывается с антигеном-

мишенью, экспрессируемом опухолевой клеткой, через встроенный цистеин в указанном антителе или его антигенсвязывающем фрагменте в положении 41 тяжелой цепи согласно нумерации Kabat, где указанное лекарственное средство с линкером представляет собой цитотоксическое средство с линкером. Изобретение расширяет арсенал средств для лечения солидных опухолей.

2 н. и 13 з.п. ф-лы, 4 ил., 7 табл., 1 пр.

R U 2 6 7 0 1 5 7 C 2

R U 2 6 7 0 1 5 7 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
A61K 47/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 47/68 (2006.01); *A61K 31/475* (2006.01); *A61K 9/19* (2006.01); *C07K 16/30* (2006.01); *C07K 16/40* (2006.01); *C07K 2317/51* (2006.01); *C07K 2317/515* (2006.01); *C07K 2317/55* (2006.01); *C07K 2317/56* (2006.01)

(21)(22) Application: **2016150377, 22.05.2015**(24) Effective date for property rights:
22.05.2015Registration date:
18.10.2018

Priority:

(30) Convention priority:
22.05.2014 EP 14169493.5(43) Application published: **25.06.2018** Bull. № 18(45) Date of publication: **18.10.2018** Bull. № 29(85) Commencement of national phase: **22.12.2016**(86) PCT application:
EP 2015/061456 (22.05.2015)(87) PCT publication:
WO 2015/177360 (26.11.2015)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**ARIAANS, Gerardus Joseph Andreas (NL),
COUMANS, Rudy Gerardus Elisabeth (NL)**

(73) Proprietor(s):

**SYNTHON BIOPHARMACEUTICALS B.V.
C/o Syntarga B.V. (NL)**(54) **SITE-SPECIFIC CONJUGATION OF LINKER DRUGS TO ANTIBODIES AND RESULTING ADCS**

(57) Abstract:

FIELD: pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to antibody-drug conjugates for the treatment of solid tumors and hematologic malignancies, wherein the linker drug is site-specifically conjugated to an antibody or antigen-binding fragment thereof that binds to the target antigen expressed by the tumor cell, via the inserted cysteine

in said antibody or antigen-binding fragment thereof at position 41 of the heavy chain according to Kabat numbering, wherein said drug with a linker is a cytotoxic agent with a linker.

EFFECT: invention widens the range of agents for treating solid tumors.

15 cl, 4 dwg, 7 tbl, 1 ex

RU 2 670 157 C2

RU 2 670 157 C2

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство (ADC), в которых линкерное лекарственное средство сайт-специфичным образом конъюгировано с антителом через встроенный цистеин, и их применению в лечении
5 солидных человеческих опухолей и гематологических злокачественных образований, в частности рака груди, рака желудка, рака ободочной и прямой кишки, рака уротелия, рака яичников, рака матки, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака поджелудочной железы, рака простаты и лейкемии.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) являются развивающимся классом направленной терапии, имеющей улучшенный терапевтический индекс по сравнению с традиционной химиотерапией. Лекарственные средства и линкеры являлись
10 центральными элементами разработки ADC, в дополнение к (моноклональному) антителу (mAb) и выбору мишени. Однако недавно была осознана важность гомогенности конъюгата. Обычные способы для прикрепления лекарственного средства к антителу приводят к разнородной смеси, и некоторые индивидуальные компоненты этой смеси могут иметь плохую работоспособность *in vivo*. Более новые способы для сайт-специфичного прикрепления лекарственного средства приводят к более гомогенным конъюгатам и позволяют контролировать сайт прикрепления лекарственного средства.
15 Эти небольшие улучшения могут оказывать сильное воздействие на *in vivo* эффективность и/или *in vivo* безопасность, и, таким образом, на терапевтический индекс. Способы для сайт-специфичной конъюгации лекарственного средства с антителами всесторонне рассматриваются в обзоре C.R. Behrens и B. Liu в mAbs, Vol. 6, Issue 1, 2014.

Обычные ADC обычно продуцируют посредством конъюгации линкерного лекарственного средства с антителом через боковые цепи или находящиеся на
25 поверхности лизина или свободные цистеины, полученные путем восстановления межцепочечных дисульфидных связей. Поскольку антитела содержат множество остатков лизина и дисульфидных связей цистеина, то обычная конъюгация обычно продуцирует гетерогенные смеси, которые представляют проблемы в отношении
30 аналитической характеристики и производства. Кроме того, отдельные компоненты этих смесей демонстрируют различные физико-химические свойства и фармакологию в отношении их профилей фармакокинетики, эффективности и безопасности, препятствуя рациональному подходу к оптимизации этой процедуры.

Эти две обычных методики для химической модификации антител применялись для
35 конструирования двух ADC с имеющимися в настоящий момент маркетинговыми разрешениями FDA. Brentuxимаб ведотин (Адцетрис™, Seattle Genetics) состоит из моноклонального антитела против CD30, конъюгированного с обладающим высокой цитотоксичностью лекарственным средством монометил ауристатином E (ММАЕ) через модификацию естественных тиолов боковой цепи цистеина. Производство
40 включает в себя частичное восстановление подвергнутых воздействию растворителя межцепочечных дисульфидов, после которого проводится модификация полученных в результате тиолов с помощью содержащих малеимид линкерных лекарственных средств. Для брентуксимаб ведотина тиолы были изменены с помощью mc-vc-PAV-ММАЕ, который содержит сайт расщепления протеазы катепсина В (vc, валин-цитруллин) и саморасщепляющийся линкер (PAV, пара-аминобензилоксикарбонил) между малеимидной группой (mc, малеимидокапроил) и цитотоксическим средством (ММАЕ). Стратегия прикрепления цистеина дает максимум два лекарственных средства на восстановленный дисульфид. Большинство человеческих молекул IgG имеют четыре

подвергаемых воздействию растворителя дисульфидных связи, и, таким образом, возможным является диапазон от нуля до восьми лекарственных средств на антитело. Точное число лекарственных средств на антитело определяется степенью восстановления дисульфидов и числом молярных эквивалентов линкерного лекарственного средства, используемого в последующей реакции конъюгации. Полное восстановление всех четырех дисульфидных связей дает гомогенную конструкцию с восемью лекарственными средствами на антитело, тогда как частичное восстановление обычно дает разнородную смесь с нулем, двумя, четырьмя, шестью или восемью лекарственными средствами на антитело. Brentuximab vedotin имеет в среднем около четырех лекарственных средств на антитело.

Другим ADC, имеющим текущее разрешение FDA, является адо-трастузумаб эмтанзин (T-DM1, кадцила™, Roche/Genentech), который был сконструирован путем соединения моноклонального антитела трастузумаба против HER2 с цитотоксическим лекарственным средством майтансином посредством модификации аминов боковой цепи лизина. Эта версия майтансина (DM1) была модифицирована с включением тиола, который может быть присоединен к малеимидному линкеру. Бифункциональный линкер (SMCC, сукцинимидил 4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат) с малеимидом на одном из концов и сложным эфиром N гидроксисукцинимидила (NHS) на другом конце реагировал с боковыми цепями первичного амина лизина с формированием стабильной амидной связи. Модифицированный майтансин (DM1) затем был присоединен к антителу через конъюгацию с малеимидным концом бифункционального линкера. В отличие от линкера, используемого в брентуксимаб ведотине, этот линкер не имеет какого-либо (протеазного) сайта расщепления, и, таким образом, требует лизосомального разложения части антитела ADC для высвобождения активного метаболита DM1-линкер-лизин. Способ присоединения приводил к образованию гетерогенной смеси конъюгатов со средним количеством 3,5 лекарственных средств на антитело. По сравнению с цистеиновым способом, описанным выше, эта стратегия давала более гетерогенную смесь, поскольку была обнаружена модификация от 20 до 40 остатков лизина, тогда как только максимально 8 различных остатков цистеина модифицируется с применением способа модификации нативного цистеина.

Недавно сообщалось о том, что фармакологический профиль ADC может быть улучшен посредством применения технологий сайт-специфичной конъюгации, в которых используются находящиеся на поверхности остатки цистеина, сконструированные в антителах, которые затем конъюгируют с линкерным лекарственным средством, в результате чего получают конъюгированные сайт-специфичным образом ADC с заданными отношениями лекарственного средства к антителу (DAR). По сравнению с гетерогенными смесями, создаваемыми с использованием обычных технологий конъюгации лизина и цистеина, конъюгированные сайт-специфичным образом ADC обычно демонстрировали, по меньшей мере, эквивалентную активность *in vivo*, улучшенную фармакокинетику и расширенное терапевтическое окно.

Первый сайт-специфичный подход к конъюгации был разработан в Genentech посредством внедрения остатка цистеина с применением сайт-направленного мутагенеза в позициях, демонстрирующих высокую тиоловую реакционную способность, в соответствии с разработанным в WO 2006/034488. Эта обычная практика в белковой модификации была более сложной для антитела вследствие присутствия различных нативных остатков цистеина. Введение дополнительного остатка цистеина в неподходящей позиции могло бы привести к неправильному формированию межцепочечных дисульфидных связей, и, следовательно, к неправильному сворачиванию

антитела. Встроенные остатки цистеина в подходящих позициях в подвергнутом мутации антителе часто покрываются другими тиолами, такими как цистеин или глутатион, с целью формирования дисульфидов.

Прикрепление лекарственного средства к остаткам мутанта было достигнуто путем восстановления как нативных межцепочечных, так и мутантных дисульфидов и последующего повторного окисления цистеинов с применением мягкого окислителя, такого как CuSO_4 или дигидроаскорбиновая кислота, после чего проводилась стандартная конъюгация освобожденного мутантного цистеина с линкерным лекарственным средством. При оптимальных условиях будет прикреплено два лекарственных средства на антитело (если один цистеин будет искусственно встроен в тяжелую цепь или легкую цепь mAb). Способ с использованием встроенного цистеина оказался подходящим для разработки сайт-специфичного ADC SGN-CD33A (Seattle Genetics), который недавно вошел в клиническое исследование с увеличением дозы фазы I для лечения острой миелоидной лейкемии (AML), а также в клиническое исследование фазы Ib в комбинации со стандартной поддерживающей химиотерапией, включающей цитарабин и даунорубин. Этот ADC содержит расщепляемый дипептидный линкер (то есть, валин-аланин) и перекрестно сшитый с ДНК пирролобензодиазепиновый (PBD) димер в качестве лекарственного средства, соединенного с позицией S239C тяжелой цепи в части Fc IgG1 mAb h2H12 (DAR 1.9; Sutherland *et al.* Blood 2013; 122(8):1455-1463).

В свою очередь, в WO 2006/034488 специфически поверхностно доступные остатки валина, аланина и серина, не участвующие во взаимодействиях для связывания антигена и удаленные от существующих межцепочечных дисульфидных связей, были замещены с целью получения встроенных остатков цистеина с высокой тиоловой реакционной способностью, а WO 2014/124316 компании Novartis специфично сосредотачивается на идентификации поверхностно доступных сайтов в константных областях тяжелой и легкой цепей антитела, в которых замена сайтов на остаток цистеина позволяет осуществлять эффективную конъюгацию полезных нагрузок и обеспечивает высокую стабильность конъюгатов.

В дополнение к стратегии конъюгации на основе встраиваемых цистеинов были разработаны другие способы для сайт-специфичного прикрепления лекарственных средств. Pfizer продемонстрировал новую методику для конъюгации с применением микробной трансглутаминазы для присоединения содержащего амина лекарственного средства к встроенному глутамину на антителе. Трансглутаминаза представляет собой фермент, который катализирует формирование амидной связи между ацильной группой боковой цепи глутамина и первичным амином боковой цепи лизина.

В дополнение к ферментативной конъюгации, ортогональная химическая конъюгация также применялась для сайт-специфичной модификации множества разнообразных белков с использованием неприродных аминокислот (в частности, технологии от Ambrx и Sutro Biopharma). В частности, *p*-ацетилфенил аланин и *p*-азидометил-L-фенилаланин были выбраны в качестве неприродных аминокислот, поскольку они содержат, соответственно, кетон и функциональную группу азиды, которые не присутствуют ни в одной из боковых цепей 20 природных аминокислот. Это позволяет осуществлять специфичную модификацию кетона и азидных групп без помех от других аминокислот. Этот способ предоставил дополнительный путь для конструирования ADC с максимум двумя лекарственными средствами на антитело (на одну такую неприродную аминокислоту).

Во всех способах уровня техники, раскрытых до настоящего времени, акцент делался

на сайт-специфичной конъюгации линкерных лекарственных средств в позициях на поверхности/подвергающихся воздействию растворителя, в позициях, демонстрирующих высокую тиоловую реакционную способность, и в позициях специфично в константных областях моноклональных антител, в целях повышения гомогенности и улучшения фармакокинетических свойств. Даже при том, что вышеописанные стандартные способы конъюгации на основе лизина и цистеина позволили получить одобренные FDA конъюгаты антитела-лекарственного средства, и они применяются для конструирования большинства из большого числа ADC, находящихся в настоящий момент в преклинических и клинических испытаниях, все еще существует потребность в новых стратегиях конъюгации с целью (дальнейшего) улучшения физико-химических, фармакокинетических, фармакологических и/или токсикологических свойств ADC для получения ADC, обладающих приемлемыми свойствами связывания антигена, эффективностью *in vivo*, терапевтическим индексом и/или стабильностью.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство (ADC), в которых линкерное лекарственное средство сайт-специфичным образом конъюгирован с антителом через встроенный цистеин, и их применению в лечении солидных человеческих опухолей и гематологических злокачественных образований, в частности, рака груди, рака желудка, рака ободочной и прямой кишки, рака уротелия, рака яичников, рака матки, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака поджелудочной железы, рака простаты и лейкемии.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг. 1А. Идентификация подходящих позиций конъюгации линкерного лекарственного средства в части Fab антитела.

Фиг. 1В. Прикрепление линкерного лекарственного средства дуокармицина *vc-seco-DUBA* в Fab полости антитела (наложение множества докингов *vc-seco-DUBA*).

Фиг. 1С. Идентификация подходящих позиций конъюгации линкерного лекарственного средства в части Fc антитела.

Фиг. 1D. Прикрепление линкерного лекарственного средства дуокармицина *vc-seco-DUBA* в полости Fc антитела (наложение множества докингов *vc-seco-DUBA*).

Фиг. 2А. *In vivo* эффективность ADC (SYD1091) антитела против PSMA со встроенным цистеином (VH S41C) в сравнении с контрольным наполнителем, компартором ADC (SYD1035) антитела против PSMA со встроенным цистеином (CH T120C) и ADC (SYD998) с неизменным антителом против PSMA wt (дикий тип), в концентрации 2 мг/кг каждый.

Фиг. 2В. *In vivo* эффективность ADC (SYD1091) антитела против PSMA со встроенным цистеином (VH S41C) в сравнении с контрольным наполнителем, компартором ADC (SYD1035) антитела против PSMA со встроенным цистеином (CH T120C) и ADC (SYD998) с неизменным антителом против PSMA wt, в концентрации 10 мг/кг каждый.

Фиг. 3. Влияние на массу тела ADC (SYD1091) антитела против PSMA со встроенным цистеином (VH S41C) в сравнении с контрольным наполнителем, компартором ADC (SYD1035) антитела против PSMA со встроенным цистеином (CH T120C) и ADC (SYD998) с неизменным антителом против PSMA wt, в концентрации 10 мг/кг каждый.

Фиг. 4А. *In vivo* эффективность ADC H8 (H8-41C-*vc-seco-DUBA*) антитела против 5T4 со встроенным цистеином (VH P41C) в сравнении с контрольным наполнителем и ADC H8 (H8-*vc-seco-DUBA*) с неизменным антителом против 5T4 wt, в концентрации 3 мг/кг каждый.

Фиг. 4В. *In vivo* эффективность ADC H8 (H8-41C-*vc-seco-DUBA*) антитела против 5T4 со встроенным цистеином (VH P41C) в сравнении с контрольным наполнителем и ADC

H8 (H8-vc-*seco*-DUBA) с неизменным антителом против 5T4 wt, в концентрации 10 мг/кг каждый.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) развиваются в качестве нового класса противораковой терапии, который комбинирует эффективность терапии малыми молекулами с возможностью нацеливания, обеспечиваемой антителами. Путем объединения этих двух компонентов в одну молекулярную сущность обладающие очень высокой цитотоксичностью низкомолекулярные лекарственные средства могут быть доставлены к раковым тканям-мишеням, посредством чего повышается эффективность при одновременном снижении потенциальных системных токсических побочных эффектов малых молекул.

10 Антитела были конъюгированы со множеством цитотоксических лекарственных средств, включая малые молекулы, которые связывают ДНК (например, антрациклины), алкилируют или сшивают ДНК (например, дуокармицины или димеры пирролобензодиазепина, соответственно), вызывают разрывы нити ДНК (например, калихеамицины) или разрывают микротрубки (например, майтанзиноиды и ауристатины).

Настоящее изобретение относится к соединению конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), в котором линкерное лекарственное средство сайт-специфичным 20 образом конъюгирован с антителом через встроенный цистеин в одной или более позициях указанного антитела, выбранных из 40, 41, 89 (нумерация Kabat), 152, 153, 155, 171, 247, 297, 339, 375 и 376 (нумерация Eu) тяжелой цепи, и 40, 41 (нумерация Kabat), 165 и 168 (нумерация Eu) легкой цепи.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к соединению конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), в котором линкерное лекарственное средство сайт-специфичным образом конъюгирован с антителом через встроенный цистеин в одной или более позициях указанного антитела, выбранных из 40, 41, 89, 152, 153, 155, 171, 247, 297, 339 и 375 тяжелой цепи, и 40, 41, и 165 легкой цепи.

В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение 30 относится к соединению конъюгата антитело-лекарственное средство, в котором линкерное лекарственное средство сайт-специфичным образом конъюгирован с антителом через встроенный цистеин в одной или более позициях указанного антитела, выбранных из 40, 41 и 89 (согласно нумерации Kabat) тяжелой цепи и 40 и 41 (согласно нумерации Kabat) легкой цепи.

35 Поскольку более ранняя работа над сайт-специфичными ADC была сосредоточена на нахождении позиций конъюгации, которые демонстрируют хорошую реакционную способность с линкерным лекарственным средством и одновременно имеют низкий риск формирования дисульфидных связей между антителами (приводящих к агрегации) или нарушения структуры антитела (так называемой перестановки дисульфидной связи), то влияние на гидрофобность конъюгатов в отношении сайта конъюгации не оценивалось. Кроме того, фокус прежде всего был сделан на нахождении подходящих сайтов в константных областях антитела, поскольку модификация переменных областей антитела, как обычно считается, связана с высоким риском частичной или 40 полной потери связывания антигена.

Изобретатели по настоящему изобретению, однако, сосредоточились на влиянии характеристик гидрофобности на сайт-специфичные ADC.

Способ *in silico*, в котором используется пакет программного обеспечения YASARA (www.yasara.org, см.: Krieger и соавт. Proteins 2009; 77 Suppl 9: 114-122), применялся для

идентификации сайтов сильного взаимодействия линкерного лекарственного средства с антителом. Подходящие местоположения демонстрируют минимальное увеличение гидрофобной поверхности. Вблизи идентифицированных таким образом сайтов взаимодействия были идентифицированы подходящие остатки (то есть, с достаточной доступностью) для преобразования в цистеины. В этом подходе отсутствует ограничение в отношении константных областей антитела, и также рассматривались аминокислоты из варибельной области, если они не находились вблизи сайтов связывания антигена. Местоположения в варибельном домене части Fab, как оказалось, являлись предпочтительными.

Прикрепление линкерных лекарственных средств к моделям Fab и Fc различных антител моделировалось с помощью обычно используемого алгоритма VINA (Trott O and Olson AJ. J. Comput. Chem. 2010; 31: 455-461), реализованного в YASARA. Используемые модели Fab и Fc антител были получены из рентгеновских структур или посредством гомологичного моделирования с применением YASARA.

Было показано, что линкерные лекарственные средства типа дуокармицина, например, *vc-seco-DUBA* (то есть, SYD980; его соединение ADC изображено в формуле II) имеют сильное предпочтение в отношении связывания в полостях, которые присутствуют во всех структурах антител (см. фиг. 1B и 1D для частей Fab и Fc антитела, соответственно). Множественные подходящие позиции конъюгации для прикрепления линкерного лекарственного средства были идентифицированы в этих полостях и в непосредственной близости от них, то есть, с хорошей доступностью встроенных цистеинов в этих местоположениях (см. фиг. 1A и 1C для частей Fab и Fc антитела, соответственно).

В контексте настоящего изобретения нумерация Kabat используется для указания положений аминокислот встроенных цистеинов в тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC) варибельных областей, и нумерация Eu используется для указания положений в константных областях тяжелой цепи и легкой цепи антитела. Ввиду варибельности последовательности в варибельных областях антител точная аминокислота, которая будет замещена цистеином, может отличаться для различных антител. Для большинства антител, в частности, антител IgG, в тяжелой цепи варибельной области (VH) обычно присутствует A или S в позиции 40, P в позиции 41 и V в позиции 89, и в легкой цепи варибельной области (VL) обычно присутствует P в позиции 40 и G в позиции 41. В тяжелой цепи константных областей (CH1, CH2 и CH3) обычно присутствует E в позиции 152, P в позиции 153, T в позиции 155, P в позиции 171, P в позиции 247, N в позиции 297, A в позиции 339, S в позиции 375 и D в позиции 376, и в легкой цепи к константной области (CL) обычно присутствует E в позиции 165 и S в позиции 168. В пяти константных областях изотипа λ легкой цепи (CL) обычно присутствует S в позиции 165 и S в позиции 168.

Выражение «нумерация Kabat» обозначает систему нумерации, используемую для варибельных доменов тяжелой цепи или варибельных доменов легкой цепи компиляции антител в Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). При использовании этой системы нумерации фактическая линейная последовательность аминокислот может содержать меньше аминокислот или может содержать дополнительные аминокислоты, соответствующие укорачиванию или вставке в каркасную область (FR) или определяющую комплементарность область (CDR) варибельного домена. Нумерация Kabat для остатков может быть определена для заданного антитела с помощью выравнивания в областях гомологии последовательности антитела со «стандартной»

пронумерованной по Kabat последовательностью.

Выражение «нумерация Eu» обозначает индекс Eu в соответствии с Kabat, E.A. *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD., NIH publication no. 91-3242, pp. 662, 680, 689 (1991). «Индекс Eu как в Kabat» обозначает нумерацию остатков человеческого антитела IgG1 Eu (Edelman, G.M. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 63, 78-85 (1969)).

Позиции тяжелой цепи 40, 41 и 89 располагаются в вариабельной области, и позиции 152, 153, 155, 171, 247, 297, 339, 375 и 376 располагаются в константной области антитела. Позиции легкой цепи 40 и 41 располагаются в вариабельной области, и позиции 165 и 168 располагаются в константной области антитела.

Позиции тяжелой цепи 40, 41, 89, 152, 153, 155 и 171 и позиции легкой цепи 40, 41, 165 и 168 располагаются в части Fab, и позиции тяжелой цепи 247, 297, 339, 375 и 376 располагаются в части Fc антитела.

В соответствии с настоящим изобретением, термин «встроенный цистеин» означает замену не являющейся цистеином аминокислоты в тяжелой цепи или легкой цепи антитела на цистеин. Как известно специалисту в данной области техники, это может быть сделано или на аминокислотном уровне, или на уровне ДНК, например, с применением сайт-направленного мутагенеза.

Изобретателями по настоящему изобретению неожиданно было обнаружено, что сайт-специфичным образом конъюгированные соединения ADC по настоящему изобретению продемонстрировали улучшенные физико-химические, фармакологические и/или фармакокинетические свойства по сравнению с ADC, в которых линкерное лекарственное средство конъюгировано через нативные межцепочечные дисульфидные связи антитела, и, кроме того, по сравнению с ADC со встроенными цистеинами, в которых линкерное лекарственное средство конъюгировано в позициях, раскрытых в предшествующем уровне техники, в отличие от специфично указанных в настоящей заявке на патент. Соединения ADC в соответствии с настоящим изобретением обладают способностями связывания, аналогичными обычным антителам, хорошей эффективностью *in vivo*, повышенным терапевтическим индексом и/или улучшенной стабильностью. В частности, было обнаружено, что соединения ADC обычно являются менее гидрофобными и менее подверженными расщеплению посредством катепсина В, и, следовательно, также, вероятно, посредством других внутри- или внеклеточных ферментов/протеаз в опухолевой массе (микросреде опухоли), чем ADC, которые сайт-специфичным образом конъюгированы в других позициях, но все еще демонстрируют аналогичную цитотоксичность *in vitro*. Неожиданно, ADC в соответствии с настоящим изобретением продемонстрировали улучшенную эффективность *in vivo* в ксенотрансплантатной модели опухоли животных по сравнению с ADC, которые были сайт-специфичным образом конъюгированы в других позициях.

Вне связи с какой-либо теорией, изобретатели по настоящему изобретению обнаружили, что когда линкерные лекарственные средства конъюгированы в определенных позициях антитела, как заявлено в настоящей заявке, указанное линкерное лекарственное средство встраивается или в полость Fab, которая сформирована доменами CH1, VH, VL и CL антитела, или в полость Fc, которая сформирована двумя доменами CH2 и двумя доменами CH3 антитела. В антителе IgG1 верх полости Fc сформирован гликозидом/углеводом, который прикреплен к позиции N297 тяжелой цепи. В результате линкерное лекарственное средство (которое обычно является более гидрофобным, чем антитело) экранируется от гидрофильной водной среды, окружающей антитело, и ADC, таким образом, является менее гидрофобным по сравнению с ADC,

в которых линкерное лекарственное средство конъюгировано через нативные дисульфидные связи антитела, и является намного менее гидрофобным по сравнению с ADC, в которых линкерное лекарственное средство сайт-специфичным образом конъюгировано в различных позициях, которые не заявлены в настоящей заявке, и в которых линкерное лекарственное средство вытесняется за пределы антитела, то есть, направляется в направлении от антитела.

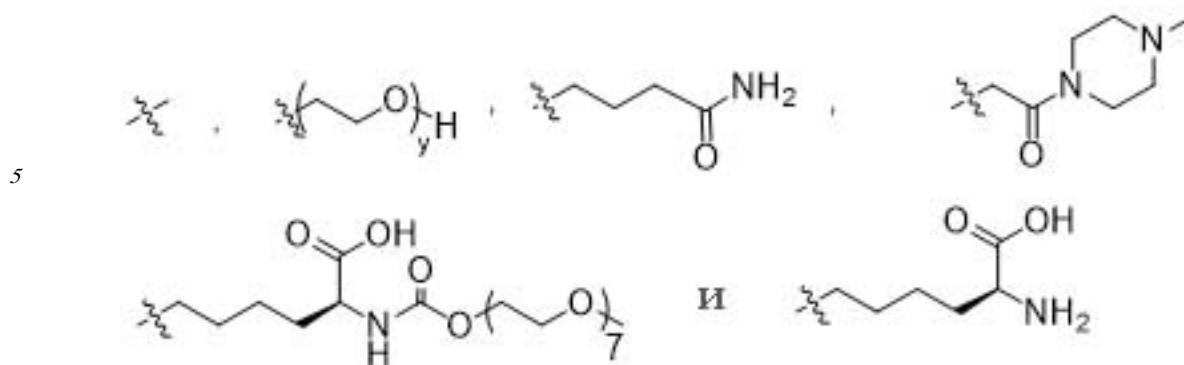
В одном конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), в котором линкерное лекарственное средство сайт-специфичным образом конъюгировано с антителом через встроенный цистеин в одной или более позициях указанного антитела, выбранных из 40, 41, 152, 153, 247, 339 и 375 тяжелой цепи, и 40, 41, и 165 легкой цепи.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), в котором линкерное лекарственное средство сайт-специфичным образом конъюгировано с антителом через встроенный цистеин в одной или более позициях указанного антитела, выбранных из 40, 41, 89, 247, 297 и 376 тяжелой цепи, и 40 и 41 легкой цепи.

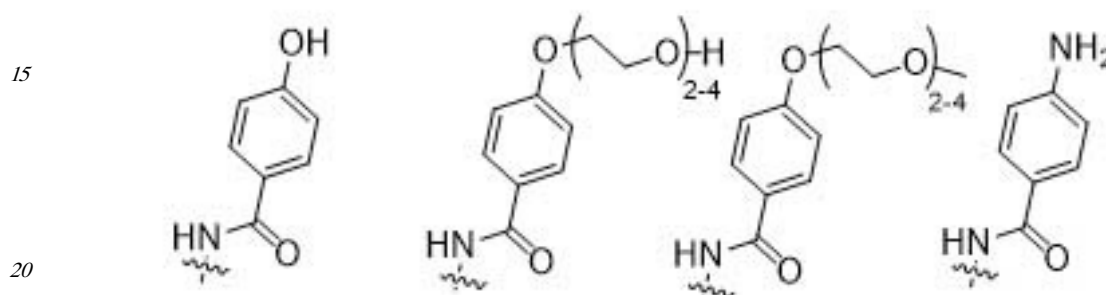
В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к соединению конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), в котором линкерное лекарственное средство сайт-специфичным образом конъюгировано с антителом через встроенный цистеин в одной или более позициях указанного антитела, выбранных из 40, 41, 89, 152, 153, 155 и 171 тяжелой цепи, и 40, 41, 165 и 168 легкой цепи в части Fab указанного антитела.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), в котором линкерное лекарственное средство сайт-специфичным образом конъюгировано с антителом через встроенный цистеин в одной или более позициях указанного антитела, выбранных из 40, 41, 152 и 153 тяжелой цепи, и 40, 41 и 165 легкой цепи в части Fab указанного антитела.

Модификаций вариабельной части антитела обычно избегают, поскольку они могут привести к частичной или полной потере способности связывать антиген. Однако, вопреки обычным ожиданиям, было обнаружено, что определенные остатки в каркасных областях и легких, и тяжелых цепей антитела являются подходящими для конъюгации, и при этом не приводят (к значимому) снижению связывания антигена после конъюгации линкерного лекарственного средства. Поэтому, в особенно предпочтительном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к соединению конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), в котором указанный встроенный цистеин находится в одной или более позициях указанного антитела, выбранных из 40, 41 тяжелой цепи и 89 и 40 и 41 легкой цепи в части Fab указанного антитела. Предпочтительно, указанный встроенный цистеин находится в позициях 40 или 41 тяжелой цепи и/или позициях легкой цепи 40 или 41, более предпочтительно, в позиции тяжелой цепи 41 и/или позиции легкой цепи 40 или 41, наиболее предпочтительно, в позиции тяжелой цепи 41. Поскольку из литературы известно, что ассоциированные с опухолью протеазы в микросреде опухоли могут частично расщепить константные домены Fc под шарнирной областью, то конъюгация в части Fab является предпочтительной относительно конъюгации в части Fc. Расщепление константных доменов Fc привело бы к потере Fc-конъюгированных линкерных лекарственных средств, что, в свою очередь, привело бы к снижению активности ADC *in vivo*. (Fan *et al.* Breast Cancer Res. 2012; 14: R116 и Brezsky *et al.* PNAS 2009; 106: 17864-17869). Кроме того, конъюгация в этих позициях в части Fab также позволяет использовать связывающие антиген фрагменты.



у составляет 1-16, и
 R^2 выбирается из



В структурных формулах, показанных в настоящей спецификации, n представляет
 целое число от 0 до 3, тогда как m представляет среднее отношение лекарственного
 средства к антителу (DAR) от 1 до 6. Как хорошо известно в технике, DAR и
 25 распределение содержания лекарственного средства могут быть определены, например,
 с применением хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC) или
 высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенными фазами (RP-HPLC).
 HIC является особенно подходящей для определения среднего DAR.

Соединения формулы (I) в соответствии с настоящим изобретением могут быть
 30 получены согласно способам и процедурам, которые известны специалисту в данной
 области техники. Подходящие способы для сайт-специфичной конъюгации линкерных
 лекарственных средств можно, например, найти в примерах 7 и 8 из WO 2005/084390,
 которые описывают стратегии полного восстановления для (частичной) загрузки
 35 антител линкерным лекарственным средством α -MMAE, в примерах 11 и 12 из WO
 2006/034488, которые описывают сайт-специфичную конъюгацию содержащего
 майтансин (DM1) линкерного лекарственного средства, и в работе Doronina *и соавт.*
 Bioconjugate Chem. 17 (2006): 114-124, в которой описана конъюгация с α -MMAF.

Конъюгация с двумя или более сайтами встроенных цистеинов по настоящему
 изобретению позволяет приготовить ADC, содержащие классы гидрофобных
 40 лекарственных средств с более высоким DAR, а именно, с DAR равным 4, не получая
 слишком высокую агрегацию.

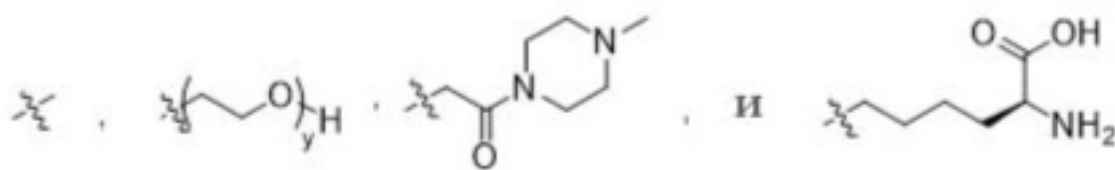
В соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящего изобретения,
 один или два встроенных цистеина могут быть включены в тяжелую цепь и/или легкую
 цепь антитела, что при оптимальных условиях реакции дает соединение ADC, имеющее
 45 DAR, равный 2 или 4, соответственно. В случае, когда вносится один встроенный
 цистеин, он может быть помещен или в части Fab, или в части Fc антитела. Является
 предпочтительным внесение указанного цистеина в часть Fab антитела в позиции HC
 (тяжелой цепи) 40, 41, 89, 152 или 153 или LC (легкой цепи) 40, 41 или 165,

предпочтительно, HC 40, 41 или 89 или LC 40, 41 или 165, более предпочтительно, HC 40 или 41 или LC 40 или 41, еще более предпочтительно, HC 41 или LC 40 или 41, наиболее предпочтительно, HC 41. В случае, когда вносятся два встроенных цистеина, эти два цистеина могут быть оба расположены в части Fab или в части Fc антитела или,
 5 предпочтительно, один из них может находиться в части Fab, предпочтительно, HC 40, 41, 152 или 153 или LC 40, 41 или 165, более предпочтительно, HC 40 или 41 или LC 40 или 41, еще более предпочтительно, HC 41 или LC 40 или 41, наиболее предпочтительно, HC 41, и другой может находиться в части Fc антитела, предпочтительно, HC 247, 297, 339 или 375, более предпочтительно, HC 339 или 375, наиболее предпочтительно, HC
 10 375. В случае, когда два встроенных цистеина вносятся в часть Fab антитела, один остаток цистеина может быть представлен в тяжелой цепи, и другой цистеин может быть представлен в легкой цепи антитела, например, HC 40 или 41 и LC 40 или 41. Кроме того, когда два встроенных цистеина представлены в части Fab антитела, один остаток цистеина может быть внесен в одной из конкретных позиций в соответствии с
 15 идентифицированным в настоящем изобретении, например, HC 40 или 41, или LC 40 или 41, и другой может быть расположен в находящейся на поверхности (то есть, не заявляемой в настоящем описании) позиции встроенного цистеина, что приводит к более высокому DAR при все еще являющейся приемлемой гидрофобности.

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к
 20 соединению формулы (I), как раскрыто выше, при этом n составляет 0-1, m представляет среднее DAR от 1 до 6, предпочтительно, от 1 до 4, более предпочтительно, от 1 до 2, наиболее предпочтительно, от 1,5 до 2,

R^1 выбирается из

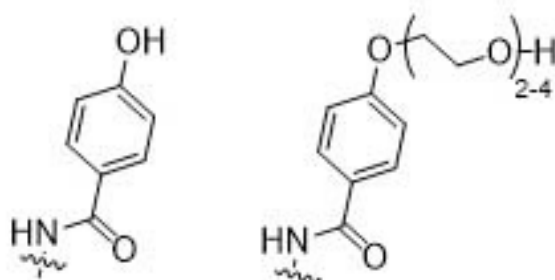
25



30 у равно 1-16, предпочтительно, 1-4, и

R^2 выбирается из

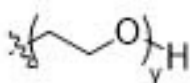
35



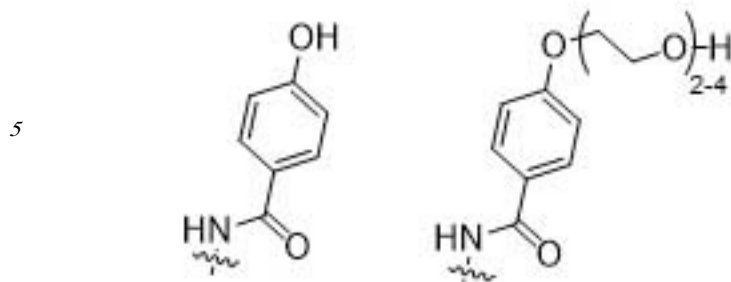
40

В конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению со структурной формулой (I), как раскрыто выше, при этом n составляет 0-1, m представляет среднее DAR от 1,5 до 2, R^1 представляет собой

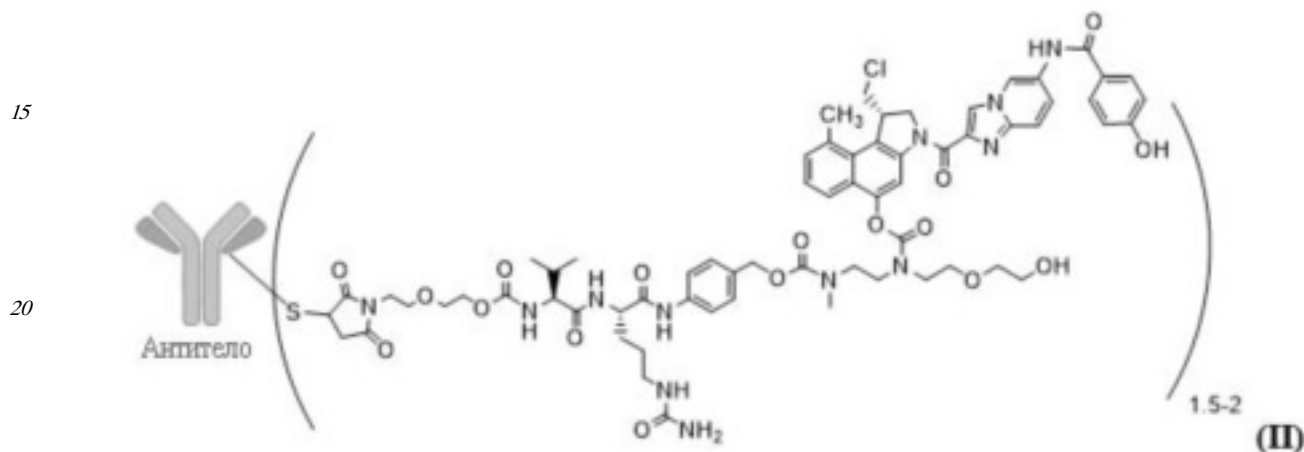
45



у равно 1-4, и R^2 выбирается из



10 В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению с формулой (II)



25 В соответствии с настоящим изобретением, любое антитело, в частности, любое антитело, которое, как известно, обладает терапевтической активностью, или любое антитело, известное в технике для ADC, или любой антиген, связывающий фрагмент

30 такого антитела, может применяться для сайт-специфичной конъюгации линкерного лекарственного средства в конкретных позициях антитела, заявляемых в настоящем описании. Указанное антитело может представлять собой антитело IgA, IgD, IgE, IgG или IgM. Указанное антитело может иметь κ (каппа) легкие цепи или λ (лямбда) легкие

35 цепи. Указанное антитело IgG может представлять собой антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Предпочтительно, антитело связывается с антигеном-мишенью a(n), который экспрессируется в или на клеточной мембране (например, на поверхности клеток)

40 опухолевой клетки, более предпочтительно, антитело поглощается клеткой после связывания с (антигеном)-мишенью, после чего токсин высвобождается внутри клетки. Предпочтительно, антитело представляет собой антитело IgG, более предпочтительно, антитело IgG1, наиболее предпочтительно, антитело IgG1, имеющее κ легкие цепи. Предпочтительно, антитело IgG несет нативную молекулу гликозида/углевода, прикрепленную в позиции в N297 тяжелой цепи антитела.

45 Подходящие антитела включают антитело против аннексина A1, антитело против CD19, антитело против CD22, антитело против CD30, антитело против CD33, антитело против CD37, антитело против CD38, антитело против CD44, антитело против CD47, антитело против CD56, антитело против CD70, антитело против CD74, антитело против CD79, антитело против CD115, антитело против CD123, антитело против CD138, антитело против CD203c, антитело против CD303, антитело против CEACAM, антитело против CLL-1, антитело против c-MET (или против HGFR), антитело против Cripto, антитело против DLL3, антитело против EGFR, антитело против EPCAM, антитело против EphA2, антитело против EphB3, антитело против ETBR, антитело против FcRL5, антитело

против FOLR1, антитело против GCC, антитело против GPNMB, антитело против Her2, антитело против HMW-MAA, антитело против интегрина, антитело против подобного Льюис А углевода, антитело против Льюис Y, антитело против LIV1, антитело против мезотелина, антитело против MN, антитело против MUC1, антитело против MUC16,
5 антитело против NaPi2b, антитело против нектин-4, антитело против PSMA, антитело против SIRP α , антитело против SLC44A4, антитело против STEAP-1, антитело против 5T4 (или против TPBG, трофобластного гликопротеина), антитело против Tag72, антитело против TF (или антитканевый фактор), антитело против TROP2, антитело и антитело против VLA.

10 Предпочтительно, антитело представляет собой антитело против аннексина A1, антитело против CD115, антитело против CD123, антитело против CLL-1, антитело против с-MET, антитело против MUC1, антитело против PSMA, антитело против 5T4 или антитело против TF. Более предпочтительно, антитело представляет собой антитело против PSMA или антитело против 5T4.

15 Антитело, которое будет применяться в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно, является моноклональным антителом (mAb) и может являться химерным, гуманизированным или человеческим mAb. Более предпочтительно, в соответствии с настоящим изобретением применяется гуманизированное или
20 человеческое mAb, еще более предпочтительно, гуманизированное или человеческое антитело IgG, наиболее предпочтительно, гуманизированное или человеческое mAb IgG1. Предпочтительно, указанное антитело имеет κ (каппа) легкие цепи, то есть, оно является гуманизированным или человеческим IgG1-к антителом.

В гуманизированных антителах связывающие антиген CDR в переменных областях получают из антител не являющихся человеком видов, обычно из мыши, крысы или
25 кролика. Эти нечеловеческие CDR размещаются в пределах человеческой каркасной области (FR1, FR2, FR3 и FR4) переменной области, и комбинируются с человеческими константными областями. Как и человеческие антитела, эти гуманизированные антитела могут быть пронумерованы согласно системе нумерации Kabat. Настоящее изобретение, в частности относится к соединению ADC, в котором указанный встроенный цистеин
30 находится в положении, выбранном из VH 40, VH 41, VH 89, VL 40 или VL 41 в человеческой каркасной области (то есть, VH 40, VH 41, VL 40 и VL 41 находится в середине FR2, VH 89 находится в FR3) гуманизированного антитела, более конкретно, в VH 40, VH 41, VL 40 или VL 41, еще более конкретно, в VH 41, VL 40 или VL 41, особенно в VH 41.

35 В соответствии с настоящим изобретением, эти конкретные остатки в каркасных областях являются подходящими для конъюгации линкерного лекарственного средства, и при этом не приводят к значительному снижению способности связывания антигена для антитела после конъюгации линкерного лекарственного средства. Кроме того, эти сайты являются подходящими не только в антителах, но также и в любых связывающих
40 антиген фрагментах таких антител.

В одном конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению ADC в соответствии с описанным выше в настоящем описании, при этом указанное антитело представляет собой антитело против аннексина A1, антитело против CD115, антитело против CD123, антитело против CLL-1, антитело против с-MET,
45 антитело против MUC1, антитело против PSMA, антитело против 5T4 или антитело против TF, и указанное линкерное лекарственное средство содержит производную дуокармина, предпочтительно, соединение ADC в соответствии с формулой (I) или (II).

В еще одном конкретном варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению ADC, в соответствии с описанным выше, в котором указанное антитело представляет собой (моноклональное) антитело против PSMA или (моноклональное) антитело против 5T4, и указанный линкерный лекарственный содержит производную дуокармицина, предпочтительно, соединение ADC в соответствии с формулой (I) или (II).

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению ADC в соответствии с описанным выше, в котором указанное линкерное лекарственное средство содержит производную дуокармицина и конъюгирован в позиции 41 из вариабельной области тяжелой цепи (моноклонального) антитела против PSMA или (моноклонального) антитела против 5T4, наиболее предпочтительно, соединение ADC согласно формуле (II). Подходящие антитела против PSMA описаны в WO 98/03873 (например, пример 12), WO 02/098897 (например, фиг. 1-2), WO 2007/002222 (например, таблица 1) и WO 2011/069019 (например, фиг. 2). Подходящие антитела против 5T4 включают H8, которое описано в WO 2006/031653, и антитела A1 и A3, которые описаны в WO 2007/106744, а также любые антитела, связывающиеся с тем же самым эпитопом, что и эти известные антитела.

В более предпочтительном варианте осуществления тяжелая цепь антитела против PSMA содержит последовательность аминокислот SEQ ID (идентификатор последовательности) NO:2, и легкая цепь антитела против PSMA содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:5. Более предпочтительно, тяжелая цепь антитела против PSMA содержит последовательности аминокислот SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3, и легкая цепь антитела против PSMA содержит последовательности аминокислот SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6.

В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению ADC формулы (II), в котором антитело представляет собой антитело против PSMA, тяжелая цепь указанного антитела против PSMA содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:2, и легкая цепь указанного антитела против PSMA содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:5. Более предпочтительно, тяжелая цепь указанного антитела против PSMA содержит последовательности аминокислот SEQ ID NO:2 и SEQ ID NO:3, и легкая цепь указанного антитела против PSMA содержит последовательности аминокислот SEQ ID NO:5 и SEQ ID NO:6.

В другом более предпочтительном варианте осуществления тяжелая цепь антитела против 5T4 содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:8, и легкая цепь антитела против 5T4 содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:11. Более предпочтительно, тяжелая цепь антитела против 5T4 содержит последовательности аминокислот SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:9, и легкая цепь антитела против 5T4 содержит последовательности аминокислот SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:6.

В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению ADC формулы (II), в котором антитело представляет собой антитело против 5T4, тяжелая цепь указанного антитела против 5T4 содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:8, и легкая цепь указанного антитела против 5T4 содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:11. Более предпочтительно, тяжелая цепь указанного антитела против 5T4 содержит последовательности аминокислот SEQ ID NO:8 и SEQ ID NO:9, и легкая цепь указанного антитела против 5T4 содержит последовательности аминокислот SEQ ID NO:11 и SEQ ID NO:6.

Настоящее изобретение также относится к соединению ADC в соответствии с описанным выше для применения в качестве медикамента.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к соединению ADC в соответствии с описанным выше для применения в лечении человеческих солидных опухолей и гематологических злокачественных образований.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению ADC в соответствии с описанным выше для применения в лечении человеческих солидных опухолей, выбранных из группы, состоящей из рака груди, рака желудка, рака ободочной и прямой кишки, рака уротелия (например, рака мочевого пузыря), рака яичников, рака матки, рака легких (в особенности, немелкоклеточного рака легких и мелкоклеточного рака легких), мезотелиомы (в особенности, злокачественной плевральной мезотелиомы), рака печени, рака поджелудочной железы и рака простаты.

В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению ADC в соответствии с описанным выше, в частности, к соединению, содержащему (моноклональное) антитело против PSMA и производную дуокармицина в качестве линкерного лекарственного средства, для применения в лечении рака простаты.

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению ADC в соответствии с описанным выше, в частности, к соединению, содержащему (моноклональное) антитело против 5T4 и производную дуокармицина в качестве линкерного лекарственного средства, для применения в лечении человеческих солидных опухолей, выбранных из группы, состоящей из рака груди, рака желудка, рака ободочной и прямой кишки, рака яичников и рака легких (в особенности, немелкоклеточного рака легких (NSCLC) и мелкоклеточного рака легких (SCLC)) и злокачественной плевральной мезотелиомы.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к соединению ADC в соответствии с описанным выше для применения в лечении человеческих гематологических злокачественных образований, в частности лейкемии, выбранной из группы, состоящей из острой лимфобластной и миелоидной лейкемии (ALL и AML, соответственно).

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение ADC в соответствии с описанным выше и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов. Типичные фармацевтические составы терапевтических белков, такие как моноклональные антитела и конъюгаты (моноклональное) антитело-лекарственное средство, принимают форму лиофилизированных таблеток (лиофилизированных порошков), которые требуют (водного) растворения (то есть, восстановления) перед внутривенным вливанием, или форму замороженных (водных) растворов, которые требуют размораживания перед использованием.

Как правило, фармацевтическая композиция предоставляется в форме лиофилизированной таблетки. Подходящие фармацевтически приемлемые эксципиенты для включения в фармацевтическую композицию (перед сублимационной сушкой) в соответствии с настоящим изобретением включают буферные растворы (например, содержащие цитрат, гистидин или сукцинат солей в воде), лиопротекторы (например, сахароза, трегалоза), регуляторы тоничности (например, хлорид натрия), поверхностно-активные вещества (например, полисорбат) и наполнители (например, маннитол, аминокислота). Эксципиенты, используемые для подвергнутых сублимационной сушке белковых составов, выбирают по их способности предотвращать денатурацию

белка во время процесса сублимационной сушки, а также во время хранения. Например, состав в форме стерильного лиофилизированного порошка для одноразового использования Kadcyла™ (Roche) содержит - после восстановления с использованием бактериостатической или стерилизованной воды для инъекций (BWFI или SWFI) - 20 мг/мл адо-трастузумаб эмтанзина, 0,02% вес/объем полисорбат 20, 10 мМ сукцинат натрия и 6% вес/объем сахарозы с рН, равным 5,0.

Настоящее изобретение также относится к применению соединения или фармацевтической композиции в соответствии с описанным выше для лечения человеческих солидных опухолей и гематологических злокачественных образований в соответствии с описанным выше.

Настоящее изобретение также относится к применению последовательно или одновременно вводимой комбинации соединения или фармацевтической композиции в соответствии с описанным выше с терапевтическим антителом и/или химиотерапевтическим средством для лечения человеческих солидных опухолей и гематологических злокачественных образований в соответствии с описанным выше.

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения терапевтическое антитело представляет собой адекатумумаб, алемтузумаб, аматуксимаб, бевацизумаб, цетуксимаб, деносумаб, этарацизумаб, фарлетузумаб, гемтузумаб, лабетузумаб, мапатумумаб, минретумомаб, нимотузумаб, ниволумаб, ореговомаб, панитумумаб, пемтумомаб, пертузумаб, рамуцирумаб, сибротузумаб, трастузумаб или волоциксимаб, и химиотерапевтическое средство представляет собой: i) алкилирующий агент, в частности азотистые иприты, такие как мехлорэтамин, хлорамбуцил, циклофосфамид, ифосфамид и мелфалан, нитрозомочевины, такие как стрептозоцин, кармустин и ломустин, алкилсульфонаты, такие как бисульфан, триазины, такие как дакарбазин и темозоломид, этиленимины, такие как тиотепа и алтретамин, или платиновые препараты, такие как цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин; ii) ингибиторы обмена веществ, в частности 5-фторурацилы, 6-меркаптопурин, капецитабин, цитарабин, флоксуридин, флударабин, гемцитабин, гидроксимочевина, метотрексат или пеметрексед; iii) противоопухолевый антибиотик, в частности, даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин, идарубицин, актиномицин D, блеомицин, митомицин-С или митоксантрон; iv) ингибитор топоизомеразы, в частности ингибитор топоизомеразы I, такой как топотекан и иринотекан, или ингибиторы топоизомеразы II, такие как этопозид, тенипозид и митоксантрон; v) митотический ингибитор, в частности таксаны, такие как паклитаксел, карбазитаксел и доцетаксел, эпотилоны, такие как иксабепилон, алкалоиды барвинка, такие как винбластин, винкристин и винорелбин, или эстрамустин; vi) ингибитор сигнального каскада, в частности ингибиторы mTOR (мишень млекопитающего для рапамицина), такие как темсиролимус и эверолимус, или ингибиторы тирозинкиназы, такие как gefитиниб, эрлотиниб, иматиниб, пазопаниб, церитиниб, кризотиниб, лапатиниб и афатиниб; vii) кортикостероид, в частности преднизон, метилпреднизолон или дексаметазон; viii) гормональное терапевтическое средство, в частности средства модуляции андрогенового рецептора, такие как бикалутамид, энзалутамид и абиратерон ацетат, антиэстрогены, такие как тамоксифен, или ингибирующие ароматазу или модифицирующие стероиды средства, такие как анастрозол, летрозол, фулвестрант и эксеместан; ix) ингибитор PARP, в частности олапариб; или x) другой химиотерапевтический лекарственный препарат, в частности L-аспарагиназу или бортезомиб. Специалист в данной области техники не испытывает затруднений в выборе подходящей комбинированной терапии для применения в лечении человеческих солидных опухолей и гематологических злокачественных образований в соответствии

с описанным выше.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, особенно в случае соединения ADC против PSMA, содержащего производную дуокармицина в качестве линкерного лекарственного средства, терапевтическое антитело представляет собой 5 бевацизумаб, деносумаб, или трастузумаб, и химиотерапевтическое средство представляет собой ингибитор топоизомеразы II, в частности, митоксантрон, митотический ингибитор, в частности, таксан, более конкретно, карбазитаксел или доцетаксел, кортикостероид, в частности, преднизон, или гормональное терапевтическое средство, в частности, средство модуляции андрогенового рецептора, более конкретно, 10 энзалутамид или абиратерон ацетат.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения, в частности, в случае соединения ADC против 5T4, содержащего производную дуокармицина в качестве линкерного лекарственного средства, терапевтическое антитело представляет собой 15 бевацизумаб, цетуксимаб, ниволумаб или рамуцирумаб, и химиотерапевтическое средство представляет собой алкилирующий агент, в частности платиновый лекарственный препарат, более конкретно, цисплатин или карбоплатин, ингибитор обмена веществ, в частности гемцитабин или пеметрексед, ингибитор топоизомеразы II, в частности, 20 этопозид, митотический ингибитор, в частности таксан или алкалоид барвинка, более конкретно, паклитаксел или доцетаксел, или винбластин или винорелбин, или ингибитор сигнального каскада, в частности ингибитор тирозинкиназы, более конкретно, эрлотиниб, церитиниб, кризотиниб или афатиниб.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения, в частности в случае соединения ADC против 5T4, содержащего производную дуокармицина в качестве линкерного лекарственного средства, терапевтическое антитело представляет собой 25 бевацизумаб, и химиотерапевтическое средство представляет собой алкилирующий агент, в частности азотистый иприт, платиновый лекарственный препарат или триазин, более конкретно, циклофосфамид, ифосфамид, цисплатин, или темозоломид, 30 противопухолевый антибиотик, в частности доксорубицин, антиметаболит, в частности гемцитабин, ингибитор топоизомеразы I или II, в частности топотекан, иринотекан или этопозид, или митотический ингибитор, в частности таксан или алкалоид барвинка, более конкретно паклитаксел или доцетаксел, или винкристин или винорелбин.

В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения, в частности, в случае соединения ADC против 5T4, содержащего производную дуокармицина в качестве линкерного лекарственного средства, терапевтическое антитело представляет собой 35 аматуксимаб, и химиотерапевтическое средство представляет собой алкилирующий агент, в частности платиновый лекарственный препарат, более конкретно, цисплатин или карбоплатин, ингибитор обмена веществ, в частности гемцитабин или пеметрексед, или митотический ингибитор, в частности, алкалоид барвинка, более конкретно, 40 винорелбин.

Терапевтически эффективное количество соединений в соответствии с настоящим изобретением находится в диапазоне от около 0,01 до около 15 мг/кг массы тела, в частности в диапазоне от около 0,1 до около 10 мг/кг массы тела, более конкретно, в 45 диапазоне от около 0,3 до около 10 мг/кг массы тела. Этот последний диапазон примерно соответствует фиксированной дозе в диапазоне от 20 до 800 мг соединения ADC.

Соединение по настоящему изобретению может вводиться раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели или раз в месяц, например еженедельно в течение первых 12 недель и затем каждые три недели до прогрессирования болезни. Альтернативные 50 схемы лечения могут применяться в зависимости от серьезности болезни, возраста

пациента, вводимого соединения, и подобных других факторов, которые мог бы принять во внимание лечащий врач.

Примеры

Транзиентная экспрессия антител со встроенными цистеинами (мутантных антител)

5 1a) Подготовка кДНК

Последовательность кДНК для тяжелой цепи была получена из аминокислотных последовательностей лидерной последовательности (SEQ ID NO:1) варибельной области тяжелой цепи антитела против PSMA (SEQ ID NO:2, нумерация Kabat, имеет остаток цистеина в позиции 41) и константной области тяжелой цепи человека IgG1 (SEQ ID NO:3, последовательная нумерация, нумерация Eu начинается в аланине 118) посредством обратной трансляции объединенных аминокислотных последовательностей в последовательность кДНК, оптимизированную для экспрессии в клетках человека (*Homo sapiens*) (SEQ ID NO:4).

15 Аналогично, последовательность кДНК для легкой цепи была получена из последовательностей аминокислот сигнала секретиции (SEQ ID NO:1), варибельной области легкой цепи антитела против PSMA (SEQ ID NO:5, нумерация Kabat) и константной области к легкой цепи человеческого Ig (SEQ ID NO:6, последовательная нумерация) посредством обратной трансляции объединенных аминокислотных последовательностей в последовательность кДНК, оптимизированную для экспрессии
20 в клетках человека (*Homo sapiens*) (SEQ ID NO:7).

Аналогично, последовательность кДНК для тяжелой цепи антитела против 5T4 H8-НС41 (SEQ ID NO:10) была получена из аминокислотных последовательностей лидерной последовательности (SEQ ID NO:1), варибельной области тяжелой цепи антитела H8 (SEQ ID NO:8, последовательная нумерация, имеет остаток цистеина в позиции 41) и
25 константной области тяжелой цепи человеческого IgG1 (SEQ ID NO:9, последовательная нумерация, нумерация Eu начинается с аланина 118).

Последовательность кДНК для легкой цепи антитела H8 (SEQ ID NO:12) была получена из аминокислотных последовательностей лидерной последовательности (SEQ ID NO:1), варибельной области легкой цепи антитела H8 (SEQ ID NO:11, нумерация
30 Kabat) и константной области к легкой цепи человеческого Ig (SEQ ID NO:6, последовательная нумерация).

Последовательность кДНК для тяжелой цепи натализумаба (SEQ ID NO:16) была получена из аминокислотных последовательностей лидерной последовательности (SEQ ID NO:13), варибельной области тяжелой цепи натализумаба (SEQ ID NO:14, нумерация
35 Kabat) и константной области тяжелой цепи человеческого IgG4 (SEQ ID NO:15, последовательная нумерация, нумерация Eu начинается в аланине 118; имеет остаток пролина в позиции 225 и остаток цистеина в позиции 375).

Последовательность кДНК для легкой цепи натализумаба (SEQ ID NO:19) была получена из аминокислотных последовательностей лидерной последовательности (SEQ ID NO:17), варибельной области легкой цепи натализумаба (SEQ ID NO:18, нумерация
40 Kabat) и константной области к легкой цепи человеческого Ig (SEQ ID NO:6, последовательная нумерация).

Конструкции кДНК тяжелой цепи и легкой цепи синтезировались химически и были получены из коммерческого источника (Life Technologies). Расщепление лидерной
45 последовательности соответствовало предсказанному с использованием программы SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) сайту расщепления.

1b) Векторная конструкция и стратегия клонирования

Для экспрессии цепей антитела экспрессионный вектор млекопитающего 0098 был

создан следующим образом. Кассета экспрессии CMV:BGHrA была иссечена из плазмиды pсDNA3.1 (-) (Life Technologies) и повторно вставлена назад в тот же самый исходный вектор (все еще содержащий интактную кассету экспрессии CMV:BGHrA), посредством чего осуществлялась дупликация кассеты экспрессии CMV:BGHrA в целях обеспечения экспрессии кДНК и HC, и LC из единственного плазмидного вектора. Впоследствии, фрагмент IRES-DHFR был выделен из вектора рOptiVEC-ТОРО (Life Technologies) и вставлен между промотором CMV и последовательностью полиаденилирования BGHrA в одной из кассет экспрессии CMV:BGHrA.

кДНК для тяжелой цепи (HC) и легкой цепи (LC) были лигированы в плазмидные векторы рМА-RQ и рМА-T (Life Technologies), соответственно с использованием сайтов рестрикции SfiI. После переноса в *E. coli* K12 и размножения, кДНК LC была перенесена в экспрессионный вектор млекопитающего 0098 с использованием сайтов рестрикции AscI и HpaI. Конечный вектор был расщеплен рестрикционными ферментами BamHI и NheI и лигирован с фрагментом кДНК HC, расщепленным теми же самыми рестрикционными ферментами. Конечный вектор, содержащий кассеты экспрессии и HC, и LC (CMV:HC:BGHrA и CMV:LC-BGHrA, соответственно) был перенесен и размножен в клетках *E. coli* NEB 5-альфа (New England Biolabs).

Крупномасштабное продуцирование конечного вектора экспрессии мутантного антитела для трансфекции выполнялось с применением наборов Maxi-Megaprep (Qiagen).

2) Транзиентная экспрессия в клетках млекопитающих

Коммерчески доступные клетки Expi293F (Life Technologies) были трансфицированы экспрессионным вектором мутантного антитела, приготовленным в соответствии с пунктом 1) выше с применением средства для трансфекции ExpiFectamine (Life Technologies) согласно инструкциям производителя следующим образом: 75×10^7 клеток были посеяны в 300 мл экспрессионной среды Expi293; 300 мкг экспрессионного вектора мутантного антитела были объединены с 800 мкл средства для трансфекции ExpiFectamine и добавлены к клеткам. Через день после трансфекции, 1,5 мл энхансера 1 и 15 мл энхансера 2 было добавлено к культуре. Через шесть дней после трансфекции супернатант клеточной культуры был собран посредством центрифугирования на 4000g в течение 15 минут и фильтрации очищенных собранных клеток через фильтры MF 75 (Nalgene).

3) Очистка экспрессированных белков

Очищенные собранные клетки были сначала проверены на уровень экспрессии с применением электрофореза SDS-PAGE. Если продуцирование признавалось адекватным, антитела очищали с применением коммерчески доступной смолы на основе белка А (MabSelect SuRe, GE Healthcare) с применением хроматографического оборудования Äkta (GE Healthcare). Колонка с высотой слоя 20 см использовалась с предельно допустимой загрузкой упакованной смолы, составляющей 25 мг/мл. Процесс выполнялся RT.

После уравнивания (PBS pH7,4) и загрузки этап очистки включал в себя два этапа промывки (PBS pH7.4 и NaAc pH5, соответственно) и этап элюции (25 mM NaAc, pH3), после которых проводились этапы регенерации, прополаскивания и чистки, соответственно, до начала нового цикла. Во время этапа элюции целевой белок был собран в пике, начинающемся и заканчивающемся при поглощающей способности 0,05-0,1 AU (длина клетки 0,2 см). После очистки белок хранился при температуре от -20°C до -80°C.

4) Концентрация и замена буфера на буфер конъюгации ADC

Элюаты белка А, при необходимости, концентрировались до 20-25 мг/мл с

применением устройств центрифугирования Vivaspin (отсечение 5 или 30 кДа, Vivaproducts). После получения требуемых концентраций концентрированные растворы (обычно 25 мг/мл) диализировались дважды с применением колонок PD10 (GE Healthcare E) и буфера 4,2 мМ L-гистидин+50 мМ трегалоза, рН 6,0. Альтернативно, когда
5 концентрации элюата белка А составляли приблизительно 10 мг/мл, этап концентрации не проводился, и элюат сразу же диализировался три раза с применением гофрированной трубки для диализа (отсечение 10 кДа, Thermo Scientific) против буфера 4,2 мМ L-гистидин+50 мМ трегалоза, рН 6,0. Любой появившийся осадок удалялся посредством
10 фильтрации после завершения диализа. Концентрации были измерены посредством УФ-спектроскопии с применением Nanodrop или кюветного УФ- спектрофотометра (оба производства Thermo Scientific). Анализ качества показал, что белок имел чистоту >95% и содержал незначительное количество димеров или фрагментов, в соответствии с определенным посредством HPSEC. Изоэлектрическая точка мутанта со встроенным цистеином была идентична дикому типу.

15 С применением аналогичной/той же самой процедуры, как описана выше, для приготовления и очистки антитела против PSMA со встроенным цистеином (VH 41C, нумерация Kabat), антитела H8-NC41 со встроенным цистеином (VH 41C, нумерация Kabat) и натализумаба со встроенным цистеином (CH 225P, 375C, нумерация Kabat), также и другие антитела из примеров были приготовлены и очищены.

20 Общий протокол сайт-специфичной конъюгации

К раствору антитела со встроенным цистеином (5-10 мг/мл в 4,2 мМ гистидине, 50 мМ трегалозе, рН=6) была добавлена EDTA (25 мМ в воде, 4% объем/объем). рН был скорректирован до ~7,4 с использованием Трис-буфера (1М в воде, рН=8), после чего был добавлен ТСЕР (10 мМ в воде, 20 эквивалентов), и полученная в результате смесь
25 инкубировалась при комнатной температуре в течение 1-3 часов. Избыточный ТСЕР был удален с помощью деминерализующей колонки PD-10 или концентрирующей центрифуги Vivaspin (отсечение 30 кДа, PES) с использованием 4,2 мМ гистидина, 50 мМ трегалозы, рН=6. рН полученного в результате раствора антитела был поднят до ~7,4 с использованием Трис-буфера (1М в воде, рН=8), после чего была добавлена
30 дигидроаскорбиновая кислота (10 мМ в воде, 20 эквивалентов), и полученная в результате смесь культивировалась при комнатной температуре в течение 1-2 часов. Был добавлен DMA, после чего добавлялся раствор линкерного лекарственного средства (10 мМ в DMA). Конечная концентрация DMA составляла 5-10%. Полученная в результате смесь культивировалась при комнатной температуре в отсутствие света в
35 течение 1-16 часов. В целях удаления избытка линкерного лекарственного средства был добавлен активированный уголь, и смесь культивировалась при комнатной температуре в течение 1 часа. Уголь был удален с использованием PES-фильтра на 0,2 мкм, и полученный в результате ADC был составлен в 4,2 мМ гистидине, 50 мМ трегалозе, рН=6 с использованием концентрирующей центрифуги Vivaspin (отсечение
40 30 кДа, PES). Наконец, раствор ADC подвергался стерильной фильтрации с применением фильтра PES 0,22 мкм.

Общий протокол конъюгации для конъюгации через частично восстановленные эндогенные дисульфиды (конъюгация дикого типа)

45 К раствору антитела (5-10 мг/мл в 4,2 мМ гистидине, 50 мМ трегалозе, рН=6) была добавлена EDTA (25 мМ в воде, 4% объем/объем). рН был скорректирован до ~7,4 с использованием Трис-буфера (1М в воде, рН=8), после чего был добавлен ТСЕР (10 мМ в воде, 1-3 эквивалента в зависимости от антитела и требуемого DAR), и полученная в результате смесь культивировалась при комнатной температуре в течение 1-3 часов.

Был добавлен DMA, после чего добавлялся раствор линкерного лекарственного средства (10 мМ в DMA). Конечная концентрация DMA составляла 5-10%. Полученная в результате смесь культивировалась при комнатной температуре в отсутствие света в течение 1-16 часов. Для того чтобы удалить избыток линкерного лекарственного средства, был добавлен активированный уголь, и смесь культивировалась при комнатной температуре в течение 1 часа. Уголь был удален с использованием PES-фильтра на 0,2 мкм, и полученный в результате ADC был составлен в 4,2 мМ гистидине, 50 мМ трегалозе, pH=6 с использованием концентрирующей центрифуги Vivaspin (отсечение 30 кДа, PES). Наконец, раствор ADC подвергался стерильной фильтрации с применением фильтра PES 0,22 мкм.

С применением указанных выше общих процедур, ADC со встроенным цистеином и ADC дикого типа, основанные на *vc-seco-DUBA* (SYD980; то есть соединение 18b, n=1 в примере 10 на странице 209 WO2011/133039), *vc-MMAE* и линкерные лекарственные средства *vc-MMAF* были синтезированы и охарактеризованы с применением аналитической хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC), эксклюзионной хроматографии (SEC), экранированной гидрофобной фазовой хроматографии (SHPC), RP-HPLC и тестированием эндотоксина LAL.

Для аналитической HIC 5-10 мкл образца (1 мг/мл) было инъецировано в колонку TSKgel Butyl-NPR (4,6 мМ ID x 3,5 см L, Tosoh Bioscience, кат. номер 14947). Метод элюирования состоял в линейном градиенте от 100%-ного буфера А (25 мМ фосфат натрия, 1,5М сульфат аммония, pH=6,95) до 100%-ного буфера В (25 мМ сульфат аммония, pH=6,95, 20% изопропанол) со скоростью 0,4 мл/мин в течение более чем 20 минут. Использовалась система Waters Acquity H-Class UPLC, оборудованная детектором PDA и программным обеспечением Empower. Поглощающая способность была измерена при 214 нм, и было определено время удержания ADC.

Как видно из аналитической HIC, имелись различия во времени удержания (RT) для разновидностей DAR2 различных ADC со встроенными цистеинами по сравнению с конъюгатами wt (таблицы 1, 2 и 3). Наиболее интересно, конъюгация линкерного лекарственного средства в специфичных сайтах в полости Fab или полости Fc (в соответствии с предсказанным с помощью алгоритма молекулярного моделирования) вызывала (существенное) сокращение времени удержания по сравнению с ADC, которые были конъюгированы через частично восстановленные эндогенные дисульфиды, что позволило изобретателям по настоящему изобретению заключить, что на основании данных HIC ADC со встроенными цистеинами, в которых линкерное лекарственное средство конъюгировано со специфичными сайтами в полости Fab или полости Fc, являются менее гидрофобными, чем конъюгаты wt. В целях дальнейшей квантификации данного эффекта, вводится термин «относительная гидрофобность», который определяется как:

$$(RT_{DAR2} - RT_{DAR0}) / (RT_{DAR2, ADC wt} - RT_{DAR0, ADC wt})$$

По существу, относительная гидрофобность представляет собой меру, которая позволяет легко сравнить гидрофобность ADC со встроенными цистеинами с wt-конъюгированными аналогами на основании данных HIC. Данные резюмированы в таблицах 1-3.

Таблица 1. Относительная гидрофобность ADC *vc-seco-DUBA* на ранее указанной аналитической колонке HIC

ADC (<i>vc-seco-DUBA</i>)	Мутации Cys		DAR	HMW (%) ²	RT _{DAR2}	RT _{DAR0}	Относительная гидрофобность ³
	HC	LC					

	ADC-wt(SYD998) ¹	wt	wt	1,8	7,7	9,7	6,9	1,0
	ADC-HC41 (SYD1091)	S41C	wt	1,7	1,4	8,5	6,8	0,6
	ADC-HC120 (SYD1035) ⁶	T120C	wt	1,8	0,9	11,3	6,8	1,6
5	ADC-HC152	E152C	wt	1,5	1,2	8,5	6,5	0,7
	ADC-HC153	P153C	wt	1,5	2,4	8,7	6,5	0,8
	ADC-HC236 ⁶	G236C	wt	1,0	1,1	10,4	6,5	1,4
	ADC-HC247	P247C	wt	1,3	1,3	9,2	7,3	0,7
	ADC-HC339	A339C	wt	1,7	0,5	8,6	7,3	0,5
	ADC-HC375	S375C	wt	1,8	1,0	7,5	6,6	0,3
10	ADC-HC376	D376C	wt	1,4	3,1	9,8	6,6	1,1
	ADC-HC41-120 ⁷	S41C, T120C	wt	3,3	40,0	12,3	7,3	0,9
	ADC-HC41-375	S41C, S375C	wt	3,0-4,3 ⁴	1,9	9,3 ⁵	7,3	0,4
	ADC-LC40	wt	P40C	1,8	0,5	9,5	6,9	0,9
	ADC-LC41	wt	G41C	1,8	0,6	8,7	6,9	0,6
15	ADC-LC109 ⁶	wt	T109C	1,0	-	12,4	7,2	1,9
	ADC-LC154 ⁶	wt	L154C	1,7	6,4	12,4	6,8	2,0
	ADC-LC157 ⁶	wt	G157C	1,1	-	12,5	7,1	1,9
	ADC-LC165	wt	E165C	1,5	2,3	8,4	6,6	0,6
	ADC-LC205 ⁶	wt	V205C	1,8	1,0	10,6	6,9	1,3
20	H8-wt ¹	wt	wt	2,0	4,4	9,9	6,4	1,0
	H8-HC40	S40C	wt	1,7	1,2	8,8	6,2	0,7
	H8-HC41	P41C	wt	1,7	0,4	7,4	6,2	0,3
	Натализумаб-HC375	S375C ⁸	wt	1,7	26,0	7,8	6,8	0,4

¹ Случайное - не сайт-специфичное - прикрепление

² HMW представляют собой молекулы с высоким молекулярным весом, отражающие количество сформированных агрегатов

³ Определена как $(RT_{DAR2} - RT_{DAR0}) / (RT_{DAR2, wt-ADC} - RT_{DAR0, wt-ADC})$, RT представляет собой время удержания

⁴ Основано на данных MS

⁵ RT, wt DAR4 =12,2

⁶ Компарторные ADC с линкерным лекарственным средством, конъюгированным с остатком цистеина, указывающим наружу

⁷ ADC с линкерным лекарственным средством, конъюгированным с одним цистеином в полости Fab и одним цистеином, указывающим наружу; процесс еще не оптимизирован

⁸ Также мутация 225P для предотвращения димеризации IgG4

Таблица 2. Относительная гидрофобность ADC vs-MMAE на ранее указанной аналитической колонке HIC

ADC (vs-MMAE)	Мутации Cys		DAR	HMW (%) ¹	RT _{DAR2}	RT _{DAR0}	Относительная гидрофобность ²
	HC	LC					
ADC-wt	wt	wt	1,7	0,6	9,6	7,2	1,0
ADC-HC41	S41C	wt	1,8	0,5	8,1	7,2	0,4
ADC-LC40	wt	P40C	1,8	0,6	8,5	7,2	0,5
ADC-LC41	wt	G41C	1,9	0,9	8,4	7,3	0,5
H8-HC40	S40C	wt	1,7	1,4	8,1	6,5	ND ³

¹ HMW представляют собой молекулы с высоким молекулярным весом, отражающие

количество сформированных агрегатов

² Определена как $(RT_{DAR2} - RT_{DAR0}) / (RT_{DAR2, wt-ADC} - RT_{DAR0, wt-ADC})$, RT представляет собой время удержания

³ ND означает «не определено»; дикий тип H8-vc-MMAE не был подготовлен

Таблица 3. Относительная гидрофобность ADC mc-MMAF на ранее указанной аналитической колонке HIC

ADC (mc-MMAF)	Мутации Cys		DAR	HMW (%) ¹	RT _{DAR2}	RT _{DAR0}	Относительная гидрофобность ²
	HC	LC					
ADC-wt	wt	wt	1,8	0,6	8,0	7,2	1,0
ADC-HC41	S41C	wt	1,8	0,5	7,4	7,2	0,3
ADC-LC40	wt	P40C	1,8	0,5	7,6	7,2	0,5
ADC-LC41	wt	G41C	1,8	0,6	7,5	7,3	0,3
H8-wt	wt	wt	4,2	0,4	7,2	6,2	1,0
H8-HC40	S40C	wt	1,4	1,2	6,9	6,5	0,4

¹ HMW представляют собой молекулы с высоким молекулярным весом, отражающие количество сформированных агрегатов

² Определена как $(RT_{DAR2} - RT_{DAR0}) / (RT_{DAR2, wt-ADC} - RT_{DAR0, wt-ADC})$, RT представляет собой время удержания

Клеточное связывание

Три ADC против PSMA SYD998 (wt), SYD1091 (HC41) и компартор SYD1035 (HC120) обладали равными связывающими способностями на PSMA-экспрессирующих клетках LNCaP-C4.2 (EC₅₀ в диапазоне 0,1-0,2 мкг/мл), аналогичными антителу дикого типа, и все три ADC не были способны связываться с PSMA-отрицательными клетками DU-145 (EC₅₀ >10 мкг/мл).

Два ADC против 5T4 H8-wt и H8-HC40 обладали равными связывающими способностями на 5T4-экспрессирующих клетках MDA-MB-468 (EC₅₀ в диапазоне 0,1-1,2 мкг/мл), аналогичными антителу дикого типа H8, и оба ADC не были способны связываться с 5T4-отрицательными клетками SK-MEL-30 (EC₅₀ >10 мкг/мл).

На способности связывания антигена ADC, таким образом, не оказывал влияния прикрепленный линкерное лекарственное средство на основе производной дуокармина.

Цитотоксичность *in vitro*

Активности сайт-специфичным образом конъюгированных ADC против PSMA были аналогичны обычно соединенному ADC дикого типа (SYD998) на PSMA-экспрессирующих клетках LNCaP-C4.2 (IC₅₀ в диапазоне 0,1-0,5 нМ, на основании эквивалентов лекарственного средства, см. таблицу 4 ниже). Все ADC были неактивны на PSMA-отрицательных клетках DU-145 (IC₅₀ >70 нМ), что демонстрирует селективное уничтожение опухолевых клеток через PSMA.

Два несвязывающих контрольных ADC были по меньшей мере в 50 раз менее активны, чем ADC против PSMA, на каждой из оцененных клеточных линий.

Таблица 4. Цитотоксичность *in vitro* ADC против PSMA *vc-seco*-DUBA в человеческих опухолевых клетках, экспрессирующих PSMA

ADC (vc-seco-DUBA)	Мутации Cys		PSMA-положительная клеточная линия LNCaP-C4.2		
	HC	LC	IC ₅₀ (нМ)	95% CI (нМ) ¹	% эффективность ²
ADC-Wt (SYD998)	wt	wt	0,23	0,20-0,27	82

	ADC-HC41 (SYD1091)	S41C	wt	0,25	0,21-0,28	78
	ADC-HC120 (SYD1035)	T120C	wt	0,14	0,13-0,16	82
	ADC-HC152	E152C	wt	0,44	0,36-0,55	78
	ADC-HC153	P153C	wt	0,34	0,28-0,41	79
5	ADC-HC236	G236C	wt	0,22	0,19-0,26	76
	ADC-HC247	P247C	wt	0,10	0,09-0,12	82
	ADC-HC339	A339C	wt	0,12	0,11-0,13	83
	ADC-HC375	S375C	wt	0,25	0,22-0,28	81
	ADC-HC376	D376C	wt	0,20	0,18-0,22	82
10	ADC-LC40	wt	P40C	0,30	0,23-0,37	80
	ADC-LC41	wt	G41C	0,31	0,25-0,38	80
	ADC-LC154	wt	L154C	0,24	0,19-0,29	82
	ADC-LC165	wt	E165C	0,51	0,40-0,65	79
	ADC-LC205	wt	V205C	0,17	0,15-0,19	83
	Несвязывающий контроль wt	wt	wt	28,86	24,76-36,02	96
15	Несвязывающий контроль -HC41	P41C	wt	> 100	Нет данных	Нет данных
	Свободное линкерное лекарственное средство			0,02	0,02-0,03	98

¹ 95% CI является 95%-м доверительным интервалом

² Процент эффективности приведен для самой высокой тестируемой концентрации (~100 нМ) и вычислен путем деления измеренной люминесценции для каждого лекарственного средства или ADC на среднее значение необработанных клеток (только среда для выращивания), умноженное на 100.

Конъюгация vc-MMAE в позициях HC41, LC40 и LC41 на антителах против PSMA давала цитотоксические активности в PSMA-положительных клетках LNCaP-C4.2, аналогичные ADC против PSMA-vc-*sec*-DUBA, соединенным в этих сайтах цистеина (таблицы 4 и 5). ADC против PSMA-vc-MMAE не обладали активностью на PSMA-отрицательных клетках DU-145 ($IC_{50} > 70$ нМ).

Таблица 5. Цитотоксичность *in vitro* ADC против PSMA-vc-MMAE в человеческих опухолевых клетках, экспрессирующих PSMA

ADC (vc-MMAE)	Мутации Cys		PSMA-положительная клеточная линия LNCaP-C4.2		
	HC	LC	IC_{50} (нМ)	95% CI (нМ) ¹	% эффективность ²
ADC- wt	wt	wt	0,34	0,31-0,38	89
ADC-HC41	S41C	wt	0,39	0,35-0,43	91
ADC-LC40	wt	P40C	0,31	0,27-0,35	90
ADC-LC41	wt	G41C	0,33	0,29-0,37	90
Несвязывающий контроль wt	wt	wt	> 100	Нет данных	90
Свободное линкерное лекарственное средство			0,23	0,18-0,28	94

¹ 95% CI являются 95%-м доверительным интервалом

² Процент эффективности приведен для самой высокой тестируемой концентрации (~100 нМ) и вычислен путем деления измеренной люминесценции для каждого лекарственного средства или ADC на среднее значение необработанных клеток (только среда для выращивания), умноженное на 100.

Активности ADC против 5T4 со встроенными цистеинами были равны активностям связанных обычным способом ADC H8-wt на 5T4-экспрессирующих клетках MDA-MB-468 (IC_{50} между 0,07 и 0,09 нМ, таблица 6). ADC против 5T4 были неактивны на 5T4-

отрицательных клетках SK-MEL-30 ($IC_{50} > 90$ нМ).

Таблица 6. Цитотоксичность *in vitro* ADC против 5T4-vc-*seco*-DUBA в человеческих опухолевых клетках, экспрессирующих 5T4

ADC (vc- <i>seco</i> -DUBA)	Мутации Cys		vc- <i>seco</i> -DUBA 5T4-положительная клеточная линия MDA-MB-468		
	HC	LC	IC_{50} (нМ)	95% CI (нМ) ¹	% эффективность ²
H8-wt	wt	wt	0,09	0,08-0,10	91
H8-HC40	S40C	wt	0,07	0,07-0,08	88
H8-HC41	R41C	wt	0,07	0,06-0,08	88
Несвязывающий контроль-HC41	R41C	wt	40,18	34,24-47,16	85
Свободное линкерное лекарственное средство			0,02	0,01-0,02	94

¹ 95% CI являются 95%-м доверительным интервалом

² Процент эффективности приведен для самой высокой тестируемой концентрации (~100 нМ) и вычислен путем деления измеренной люминесценции для каждого лекарственного средства или ADC на среднее значение необработанных клеток (только среда для выращивания), умноженное на 100.

Вместе, эти данные показывают, что протестированные позиции цистеина для сайт-специфичной конъюгации не оказывали влияние на способность уничтожения опухолевых клеток для ADC, содержащих два различных линкерных лекарственных средств. Кроме того, сайт-специфичное связывание линкерных лекарственных средств в вариабельной области части Fab различных антител является общеприменимым.

Ферментативное расщепление катепсином В

Молекула валина-цитруллин, присутствующая в линкере ADC с vc-*seco*-DUBA (SYD980) и vc-MMAE, может быть расщеплена цистеинпротеазами, такими как катепсин В, что приводит к последующему внутриклеточному высвобождению лекарственного средства (*seco*-) DUBA или MMAE в лизосомах опухоли или внеклеточному высвобождению в микросреде опухоли. Для оценки чувствительности к катепсину В ADC обрабатывались в течение 2 минут и 4 часов активированным катепсином В (Calbiochem). Цитотоксическая активность высвобожденного лекарственного средства из ADC против PSMA была измерена на PSMA-отрицательных клетках DU-145.

Цитотоксическая активность высвобожденного лекарственного средства из ADC против 5T4 была измерена на 5T4-отрицательных клетках SK-MEL-30. Во время этапа предварительной инкубации при 37°C 1 мг/мл каждого ADC был смешан с 5 мкг/мл катепсина В (0,04 единицы/лунка) в 0,1М Na-ацетате с pH=5, содержащим 4 мМ DTT. В качестве контроля 1 мг/мл каждого ADC было непосредственно разбавлено в культуральной среде (RPMI 1640, 10% разбавленный FBS). Серийные разведения были выполнены для этих растворов ADC в культуральной среде. Для измерения высвобождения соответствующих свободных токсинов DUBA или MMAE PSMA-отрицательные клетки DU-145 (1000 клеток/лунка) и 5T4-отрицательные клетки SK-MEL-30 (2000 клеток/лунка) культивировались с ADC в течение 6 дней, и жизнеспособность клеток была измерена после 6 дней с применением набора для анализов CellTiter-Glo™ (CTG).

Различия в активности высвобожденного лекарственного средства на PSMA-отрицательных клетках DU-145 и 5T4-отрицательных клетках SK-MEL-30 отражают количество лекарственного средства, которое отщепляется от ADC, и, таким образом,

доступность сайта расщепления валина-цитруллина для катепсина В. Как показано в таблице 7, чувствительность для протеолитического расщепления отличалась среди ADC после четырех часов воздействия активированного катепсина В (см. значения IC_{50}), в то время как ни один из ADC не был расщеплен после короткого периода воздействия катепсина В в течение 2 минут ($IC_{50} > 0$ нМ, данные не показаны в таблице).

Вместе эти данные показывают, что сайт конъюгации влияет на доступность линкерного лекарственного средства для ферментативного расщепления, и что линкерное лекарственное средство *vc-seco-DUBA* (SYD980) в ADC против PSMA ADC-NC41, ADC-NC152, ADC-NC339, ADC-NC375, ADC-LC41 и ADC-LC165 больше всего экранируется от расщепления указанным ферментом. Конъюгация *vc-MMAE* в позициях NC41 и LC41 антител против PSMA приводила к аналогичному экранированию сайта расщепления валина-цитруллина (Таблица 7). Подобная тенденция была также замечена для антитела против 5T4 H8-NC41, конъюгированного с *vc-seco-DUBA* (SYD980) через ту же самую позицию NC41.

Совместно эти данные показывают, что, в частности, позиция 41C является подходящей позицией для сайт-специфичного соединения линкерных лекарственных средств с различными антителами.

Таблица 7. Цитотоксичность свободного лекарственного средства, расщепленного катепсином В

ADC	Мутации Cys		Предварительная инкубация в течение 4 часов с катепсином В		
	NC	LC	IC_{50} (нМ)	95% CI (нМ)	% эффективность
Антитела против PSMA, конъюгированные к <i>vc-seco-DUBA</i>					
Wt ADC (SYD998)	wt	wt	0,70	0,62-0,79	97
ADC-NC41 (SYD1091)	S41C	wt	~ 5,00	Нет данных	59
ADC-NC120 (SYD1035)	T120C	wt	0,38	0,34-0,42	96
ADC-NC152	E152C	wt	> 10	Нет данных	50
ADC-NC153	P153C	wt	0,76	0,69-0,84	98
ADC-NC236	G236C	wt	2,08	1,64-2,65	100
ADC-NC247	P247C	wt	2,01	1,69-2,39	99
ADC-NC339	A339C	wt	5,00	3,50-7,15	99
ADC-NC375	S375C	wt	> 10	Нет данных	45
ADC-NC376	D376C	wt	0,60	0,52-0,68	98
ADC-LC40	wt	P40C	2,11	1,91-2,34	96
ADC-LC41	wt	G41C	> 10	Нет данных	Нет данных
ADC-LC154	wt	L154C	0,26	0,22 0,30	98
ADC-LC165	wt	E165C	> 10	Нет данных	50
ADC-LC205	wt	V205C	0,48	0,41-0,58	97
Несвязывающий контроль wt	wt	wt	0,32	0,28-0,35	97
Несвязывающий контроль - NC41	P41C	wt	1,56	1,36-1,79	98
антитела против PSMA, конъюгированные с <i>vc-MMAE</i>					
Wt ADC	wt	wt	0,63	0,31-0,38	96
ADC-NC41	S41C	wt	2,28	2,11-2,46	97
ADC-LC40	wt	P40C	0,60	0,55-0,64	96
ADC-LC41	wt	G41C	4,28	3,65-5,02	96
Несвязывающий контроль wt	wt	wt	0,64	0,57-0,72	97
антитела против 5T4, конъюгированные с <i>vc-seco-DUBA</i>					
H8-wt	wt	wt	0,35*	0,30-0,40	98
H8-NC40	S40C	wt	0,98	0,83-1,15	93
H8-NC41	P41C	wt	1,27*	0,98-1,67	98
Несвязывающий контроль - NC41	P41C	wt	1,86	1,42-2,45	85

* LNCaP-C4.2 использовалась в качестве 5T4-отрицательной клеточной линии.

Модель ксенотрансплантата опухоли животных

In vivo эффективность трех ADC против PSMA была оценена в ксенотрансплантатной модели LNCaP C4-2 рака простаты. Клеточная линия LnCaP-C4.2 представляет собой
 5 линию человеческих эпителиальных клеток рака простаты, полученную из ксенотрансплантата, который был последовательно распространен у мышей после вызванной кастрацией регрессии и рецидива парентеральной, андроген-зависимой клеточной линии ксенотрансплантата LnCaP-FGC.

Опухоли были индуцированы подкожно путем инъекирования 1×10^7 клеток LnCaP C4.2 в 200 мкл 1640 RPMI, содержащем матригель (50:50, объем:объем) в правый бок
 10 мышей-самцов CB17-SCID. Имплантация опухолевых клеток LnCaP-C4.2 выполнялась спустя 24-72 часа после облучения всего тела источником γ -излучения (1,44 Gy, ^{60}Co , BioMer, Bretenières, Франция). Лечение было запущено, когда опухоли достигли среднего
 15 объема 100-200 мм³. Мыши были рандомизированы в группы в соответствии с их индивидуальным объемом опухоли, и получали одну в/в инъекцию ADC против PSMA (2 или 10 мг/кг) или наполнителя в хвостовую вену. Наблюдались изменения в объемах опухоли (фиг. 2) и массе тела (фиг. 3). Все три ADC имели среднее DAR, составляющее приблизительно 1,8.

Фиг. 2А демонстрирует, что при 2 мг/кг компарторный ADC против PSMA со
 20 встроенным цистеином SYD1035 является менее активным по сравнению с нативным, не имеющим встроенных цистеинов SYD998. Однако, эффективность SYD1091, ADC со встроенным цистеином в соответствии с настоящим изобретением, значительно
 25 выше, чем эффективность компартора SYD1035, и выше, чем эффективность нативного, не имеющего встроенных цистеинов SYD998. Различие между компарторным SYD1035 и SYD1091 является еще более явным при 10 мг/кг, как показано на фиг. 2В. У мышей, имеющих опухоли LnCaP C4.2, развивалась кахексия, как проиллюстрировано на фиг. 3. Эта потеря массы тела часто восстанавливается после введения эффективного лечения и считается биомаркером эффективности чувствительности. Лечение SYD1091 приводило
 30 к намного более быстрому восстановлению массы тела, чем наблюдалось для компартора SYD1035 или нативного, не имеющего встроенных цистеинов SYD998 (фиг. 3).

In vivo эффективность двух ADC против 5T4, то есть нативного H8-vc-*seco*-DUBA (среднее DAR 2,0) и ADC со встроенным цистеином (VH P41C) H8-41C-vc-*seco*-DUBA
 35 (среднее DAR 1,7), была оценена в ксенотрансплантатной модели PA-1 рака яичников. Клеточная линия PA-1 был построена из клеток, взятых из асцитической жидкости, собранной у женщины с раком яичников (Zeuthen J. *et al.* Int. J. Cancer 1980; 25(1): 19-32).

Опухоли PA-1 были индуцированы подкожно посредством инъекирования 1×10^7 клеток в 100 мкл 1640 RPMI, содержащем матригель (50/50, объем/объем) в правый бок
 40 мышей-самок без вилочковой железы Valb/c. Инъекирование PA-1 выполнялось спустя 24-72 часа после облучения всего тела источником γ -излучения (2Gy, ^{60}Co , BioMer, Bretenières, Франция). Лечение было запущено, когда опухоли достигли среднего объема 200-300 мм³. Мыши были рандомизированы в группы в соответствии с их
 45 индивидуальным объемом опухоли, и получали одну в/в инъекцию ADC против 5T4 (3 или 10 мг/кг) или наполнителя в хвостовую вену, и наблюдались изменения в объемах опухоли (фиг. 4А и 4В). Даже притом, что оба варианта имели аналогичную эффективность при более высокой дозе 10 мг/кг (фиг. 4В), при 3 мг/кг ADC против 5T4

со встроенным цистеином Н8-41С-*vc-seco*-DUBA являлся явно более активным при сравнении с нативным, не имеющим встроенных цистеинов ADC против 5Т4, Н8-*vc-seco*-DUBA (фиг. 4А).

5 Совместно эти результаты исследования демонстрируют, что, *in vivo*, сайт-специфичные ADC со встроенными цистеинами согласно настоящему изобретению демонстрируют предпочтительные свойства в отношении эффективности в мышинных моделях опухолей.

SEQ ID NO:1 (лидерная последовательность HAVT20)

1 MACPGFLWAL VISTCLEFSM A

10 SEQ ID NO:2 (антитело против PSMA HC S41C)

1 EVQLVQSGAE VKKPGASVKI SCKTSGYTFT EYTIHWVKQA CGKGLEWIGN
51 INPNNGGTTY NQKFEDRATL TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAAGW
101 NFDYWGQGTT VTVSS

SEQ ID NO:3 (константная область тяжелой цепи (HC) человеческого антитела IgG1)

15 1 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV
51 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKEP
101 KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
151 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
201 EYKCKVSNKA LPAIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC
20 251 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
301 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

SEQ ID NO:4 (антитело против PSMA HC S41C, кДНК)

1 ATGGCCTGTC CTGGATTCT GTGGGCCCTC GTGATCAGCA CCTGTCTGGA
ATTCAGCATG

25 61 GCCGAGGTGC AGCTGGTGCA GTCTGGCGCC GAAGTGAAGA AACCAGGCGC
CAGCGTGAAG

121 ATCAGCTGCA AGACCAGCGG CTACACCTTC ACCGAGTACA CCATCCACTG
GGTCAAGCAG

181 GCCTGTGGCA AGGGCCTGGA ATGGATCGGC AACATCAACC CCAACAACGG
30 CGGCACCACC

241 TACAACCAGA AGTTCGAGGA CCGGGCCACC CTGACCGTGG ACAAGAGCAC
AAGCACCGCC

301 TACATGGAAC TGAGCAGCCT GCGGAGCGAG GACACCGCCG TGTA CTATTG
TGCCGCCGGA

35 361 TGGA ACTTCG ACTACTGGGG CCAGGGCACC ACCGTGACAG TGTCTAGCGC
CAGCACAAG

421 GGCCCCAGCG TGTTCCTCT GGCCCTAGC AGCAAGTCTA CCTCTGGCGG
AACAGCCGCC

481 CTGGGCTGCC TCGTGAAGGA CTA CTTTCCC GAGCCCGTGA CCGTGTCTG
40 GAACTCTGGC

541 GCTCTGACAA GCGGCGTGCA CACCTTTCCA GCCGTGCTGC AGAGCAGCGG
CCTGTA CTCT

601 CTGAGCAGCG TCGTGACTGT GCCCAGCAGC AGCCTGGGCA CCCAGACCTA
CATCTGCAAC

45 661 GTGAACCACA AGCCCAGCAA CACCAAGGTG GACAAAAAGG TGGAACCCAA
GAGCTGCGAC

721 AAGACCCACA CCTGTCCCCC TTGTCCTGCC CCTGAACTGC TGGGCGGACC
TTCCGTGTTT

781 CTGTTCCCCC CAAAGCCCAA GGACACCCTG ATGATCAGCC GGACCCCCGA
AGTGACCTGC

841 GTGGTGGTGG ATGTGTCCCA CGAGGACCCT GAAGTGAAGT TCAATTGGTA
CGTGGACGGC

5 901 GTGGAAGTGC ACAACGCCAA GACCAAGCCC AGAGAGGAAC AGTACAACAG
CACCTACCGG

961 GTGGTGTCCG TGCTGACAGT GCTGCACCAG GACTGGCTGA ACGGCAAAGA
GTACAAGTGC

10 1021 AAGGTGTCCA ACAAGGCCCT GCCTGCCCCC ATCGAGAAAA CCATCAGCAA
GGCCAAGGGC

1081 CAGCCCCGCG AACCCAGGT GTACACACTG CCTCCCAGCA GGGACGAGCT
GACCAAGAAC

1141 CAGGTGTCCC TGACATGCCT CGTGAAAGGC TTCTACCCCT CCGATATCGC
CGTGGAATGG

15 1201 GAGAGCAACG GCCAGCCCGA GAACAACACTAC AAGACCACCC CCCCTGTGCT
GGACAGCGAC

1261 GGCTCATTCT TCCTGTACAG CAAGCTGACT GTGGATAAGT CCCGGTGGCA
GCAGGGCAAC

20 1321 GTGTTTCAGCT GCAGCGTGAT GCACGAGGCC CTGCACAACC ACTACACCCA
GAAAAGCCTG

1381 TCCCTGAGCC CCGGCAAG

SEQ ID NO:5 (легкая цепь (LC) антитела против PSMA)

1 DIVMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKASQDVG TAVDWYQQKP GKAPKLLIYW

51 ASTRHTGVPD RFTGSGSGTD FTLTISSLQP EDFADYFCQQ YNSYPLTFGG

25 101 GTKLEIK

SEQ ID NO:6 (к константная область LC человеческого антитела IgG)

1 RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG

51 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK

101 SFNRGEC

30 SEQ ID NO:7 (легкая цепь (LC) антитела против PSMA, кДНК)

1 ATGGCTTGTC CTGGATTTCT GTGGGCCCTC GTGATCAGCA CCTGTCTGGA
ATTCAGCATG

61 GCCGACATCG TGATGACCCA GAGCCCCAGC TCTCTGAGCG CCAGCGTGGG
CGACAGAGTG

35 121 ACCATCACAT GCAAGGCCAG CCAGGACGTG GGCACCGCCG TGGATTGGTA
TCAGCAGAAG

181 CCTGGCAAGG CCCCCAAGCT GCTGATCTAC TGGGCCAGCA CCAGACACAC
CGGCGTGCCC

40 241 GATAGATTCA CAGGCAGCGG CTCCGGCACC GACTTCACCC TGACAATCAG
CAGCCTGCAG

301 CCCGAGGACT TCGCCGACTA CTTCTGCCAG CAGTACAACA GCTACCCCCT
GACCTTCGGC

361 GGAGGCACCA AGCTGGAAAT CAAGCGGACA GTGGCCGCTC CCAGCGTGTT
CATCTTCCCA

45 421 CCTAGCGACG AGCAGCTGAA GTCTGGCACC GCCTCTGTCG TGTGCCTGCT
GAACAACCTC

481 TACCCCCGCG AGGCCAAGGT GCAGTGGAAG GTGGACAATG CCCTGCAGAG
CGGCAACAGC

541 CAGGAAAGCG TGACCGAGCA GGACAGCAAG GACTCCACCT ACAGCCTGAG
CAGCACCTG

601 ACCCTGAGCA AGGCCGACTA CGAGAAGCAC AAGGTGTACG CCTGCGAAGT
GACCCACCAG

5 661 GGCCTGTCTA GCCCCGTGAC CAAGAGCTTC AACCGGGGCG AGTGC
SEQ ID NO:8 (H8 HC P41C)
1 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT GYMHVVKQS CGQGLEWIGR
51 INPNNGVTLY NQKFKDRVMT TRDTSISTAY MELSRRLSDD TAVYYCARST
101 MITNYVMDYW GQGTLVTVSS

10 SEQ ID NO:9 (константная область HC человеческого антитела IgG1)
1 ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
51 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKKVEP
101 KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS
151 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
15 201 EYKCKVSNKA LPAIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC
251 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
301 QQGNVFCSSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
SEQ ID NO:10 (H8 HC P41C, κДНК)
1 ATGGCCTGTC CTGGATTTCT GTGGGCCCTC GTGATCAGCA CCTGTCTGGA

20 ATTCAGCATG
61 GCCCAGGTGC AGCTGGTGCA GTCTGGCGCC GAAGTGAAGA AACCAGGCGC
CAGCGTGAAG
121 GTGTCCTGCA AGGCCAGCGG CTACAGCTTC ACCGGCTACT ACATGCACTG
GGTCAAGCAG

25 181 AGCTGCGGCC AGGGCCTGGA ATGGATCGGC AGAATCAACC CCAACAACGG
CGTGACCCTG
241 TACAACCAGA AATTCAAGGA CCGCGTGACC ATGACCCGGG ACACCAGCAT
CAGCACCGCC
301 TACATGGAAC TGAGCCGGCT GAGAAGCGAC GACACCGCCG TGTACTACTG

30 CGCCCGGTCC
361 ACCATGATCA CCAACTACGT GATGGACTAC TGGGGCCAGG GCACCCTCGT
GACAGTGTCT
421 AGCGCCAGCA CAAAGGGCCC CAGCGTGTTT CCTCTGGCCC CTAGCAGCAA
GAGCACATCT

35 481 GGCGGAACAG CCGCCCTGGG CTGCCTCGTG AAGGATTACT TCCCCGAGCC
CGTGACCGTG
541 TCCTGGAATA GCGGAGCCCT GACAAGCGGC GTGCACACCT TTCCAGCCGT
GCTGCAGAGC

40 601 AGCGGCCTGT ACTCTCTGAG CAGCGTCGTG ACTGTGCCCA GCAGCAGCCT
GGGCACCCAG
661 ACCTACATCT GCAACGTGAA CCACAAGCCC AGCAACACCA AGGTGGACAA
GAAGGTGGAA
721 CCCAAGAGCT GCGACAAGAC CCACACCTGT CCCCTTGTC CTGCCCCTGA
ACTGCTGGGC

45 781 GGACCTTCCG TGTTCCTGTT CCCCCAAAG CCCAAGGACA CCCTGATGAT
CAGCCGGACC
841 CCCGAAGTGA CCTGCGTGGT GGTGGATGTG TCCCACGAGG ACCCTGAAGT
GAAGTTCAAT

901 TGGTACGTGG ACGGCGTGGA AGTGCACAAC GCCAAGACCA AGCCCAGAGA
GGAACAGTAC

961 AACAGCACCT ACCGGGTGGT GTCCGTGCTG ACAGTGCTGC ACCAGGACTG
GCTGAACGGC

5 1021 AAAGAGTACA AGTGCAAGGT GTCCAACAAA GCCCTGCCTG CCCCCATCGA
GAAAACCATC

1081 AGCAAGGCCA AGGGCCAGCC CCGCGAACCC CAGGTGTACA CACTGCCTCC
CAGCCGGGAA

10 1141 GAGATGACCA AGAACCAGGT GTCCCTGACA TGCCTCGTGA AAGGCTTCTA
CCCCTCCGAT

1201 ATCGCCGTGG AATGGGAGAG CAACGGCCAG CCCGAGAACA ACTACAAGAC
CACCCCCCT

1261 GTGCTGGACA GCGACGGCTC ATTCTTCCTG TACAGCAAGC TGACCGTGGA
CAAGTCCCGG

15 1321 TGGCAGCAGG GCAACGTGTT CAGCTGCAGC GTGATGCACG AGGCCCTGCA
CAACCACTAC

1381 ACCCAGAAGT CCCTGAGCCT GAGCCCCGGC AAA

SEQ ID NO:11 (H8 LC)

1 DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQSVS NDVAWYQQKP GQSPKLLISY

20 51 TSSRYAGVPD RFSGSGSGTD FTLTISSLQA EDVAVYFCQQ DYNPPTFGG

101 GTKLEIK

SEQ ID NO:12 (H8 LC, κДНК)

1 ATGGCCTGTC CTGGATTTCT GTGGGCCCTC GTGATCAGCA CCTGTCTGGA
ATTCAGCATG

25 61 GCCGACATCG TGATGACCCA GAGCCCCGAT AGCCTGGCCG TGTCTCTGGG
AGAGAGAGCC

121 ACCATCAACT GCAAGGCCAG CCAGAGCGTG TCCAACGACG TGGCCTGGTA
TCAGCAGAAG

30 181 CCCGGCCAGA GCCCTAAGCT GCTGATCTCC TACACCAGCA GCAGATATGC
CGGCGTGCCC

241 GACAGATTTT CCGGCAGCGG CTCTGGCACC GACTTCACCC TGACAATCAG
CTCCCTGCAG

301 GCCGAGGACG TGGCCGTGTA CTTCTGTCAG CAAGACTACA ACAGCCCCC
CACCTTCGGC

35 361 GGAGGCACCA AGCTGGAAAT CAAGCGGACA GTGGCCGCTC CCAGCGTGTT
CATCTTCCCA

421 CCTAGCGACG AGCAGCTGAA GTCCGGCACA GCCTCTGTCG TGTGCCTGCT
GAACAACCTC

40 481 TACCCCCGCG AGGCCAAGGT GCAGTGGAAG GTGGACAATG CCCTGCAGAG
CGGCAACAGC

541 CAGGAAAGCG TGACCGAGCA GGACAGCAAG GACTCCACCT ACAGCCTGAG
CAGCACCTG

601 ACCCTGAGCA AGGCCGACTA CGAGAAGCAC AAGGTGTACG CCTGCGAAGT
GACCCACCAG

45 661 GGAAGTACCA GCCCTGTGAC CAAGAGCTTC AACCGGGGCG AGTGC

SEQ ID NO:13 (лидерная последовательность зародышевой линии)

1 MDWTWRILFL VAAATGAHS

SEQ ID NO:14 (натализумаб, HC)

1 QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGFNIK DTYIHWVRQA PGQRLEWMGR
 51 IDPANGYTKY DPKFQGRVTI TADTSASTAY MELSSLRSED TAVYYCAREG
 101 YYGNYGVYAM DYWGQGTLLV VSS
 SEQ ID NO:15 (натализумаб, HC S225P, S375C)

5 1 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
 51 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
 101 KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSDQED
 151 PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
 201 CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK
 10 251 GFYPCDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
 301 NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSLGK
 SEQ ID NO:16 (натализумаб, HC S225P, S375C, кДНК)

1 ATGGACTGGA CCTGGCGCAT CCTGTTTCTG GTGGCCGCTG CTACCGGCGC
 TCACTCCCAG
 15 61 GTGCAGCTGG TGCAGTCTGG CGCCGAAGTG AAGAAACCTG GCGCCTCCGT
 GAAGGTGTCC
 121 TGCAAGGCCT CCGGCTTCAA CATCAAGGAC ACCTACATCC ACTGGGTCCG
 ACAGGCCCT
 181 GGACAGCGGC TGAATGGAT GGCAGAAATC GACCCCGCCA ACGGCTACAC
 20 TAAGTACGAC
 241 CCAAGTTCC AGGGCAGAGT GACCATCACC GCCGACACCT CCGCCTCCAC
 AGCCTACATG
 301 GAACTGTCCT CCCTGCGGAG CGAGGACACC GCCGTGTACT ACTGCGCCAG
 AGAGGGCTAC
 25 361 TACGGCAACT ACGGCGTGTA CGCCATGGAC TACTGGGGCC AGGGCACCCCT
 GGTACCCGTG
 421 TCCTCCGCTT CCACCAAGGG CCCCTCCGTG TTCCCTCTGG CCCCTTGCTC
 CCGGTCCACC
 481 TCCGAGTCTA CCGCCGCTCT GGGCTGCCTG GTCAAGGACT ACTTCCCCGA
 30 GCCCGTGACC
 541 GTGTCCTGGA ACTCTGGCGC CCTGACCTCT GGCCTGCACA CCTTCCCTGC
 TGTGCTGCAG
 601 TCCTCCGGCC TGTA CTCCCT GTCCCTCCGTC GTGACCGTGC CCTCCAGCTC
 CCTGGGCACC
 35 661 AAGACCTACA CCTGTAACGT GGACCACAAG CCCTCCAACA CCAAGGTGGA
 CAAGCGGGTG
 721 GAATCTAAGT ACGGCCCTCC CTGCCCCCCC TGCCCTGCC CTGAATTTCT
 GGGCGGACCT
 781 TCCGTGTTCC TGTTCCCCC AAAGCCCAAG GACACCCTGA TGATCTCCCG
 40 GACCCCGAA
 841 GTGACCTGCG TGGTGGTGGG CGTGTCCAG GAAGATCCCG AGGTCCAGTT
 CAATTGGTAC
 901 GTGGACGGCG TGGAAGTGCA CAACGCCAAG ACCAAGCCA GAGAGGAACA
 GTTCAACTCC
 45 961 ACCTACCGGG TGGTGTCCGT GCTGACCGTG CTGCACCAGG ACTGGCTGAA
 CGGCAAAGAG
 1021 TACAAGTGCA AGGTGTCCAA CAAGGGCCTG CCCAGCTCCA TCGAAAAGAC
 CATCTCCAAG

1081 GCCAAGGGAC AGCCTCGCGA GCCCCAGGTG TACACCCTGC CTCCAAGCCA
 GGAAGAGATG
 1141 ACCAAGAACC AGGTGTCCCT GACCTGTCTG GTCAAGGGCT TCTACCCCTG
 CGATATCGCC
 5 1201 GTGGAATGGG AGTCCAACGG CCAGCCCGAG AACAACTACA AGACCACCCC
 CCCTGTGCTG
 1261 GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTGTACTCT CGGCTGACCG TGGACAAGTC
 CCGGTGGCAG
 1321 GAAGGCAACG TCTTCTCCTG CTCCGTGATG CACGAGGCC TGCACAACCA
 10 CTACACCCAG
 1381 AAGTCCCTGT CCCTGAGCCT GGGCAAG
 SEQ ID NO:17 (лидерная последовательность зародышевой линии)
 1 MDMRVPAQLL GLLLLWLRGA RC
 SEQ ID NO:18 (натализумаб, LC)
 15 1 DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCKTSQDIN KYMAWYQQTP GKAPRLLIHY
 51 TSALQPGIPS RFSGSGSGRD YFTFISSLQP EDIATYYCLQ YDNLWTFGQG
 101 TKVEIK
 SEQ ID NO:19 (натализумаб, LC, кДНК)
 1 ATGGACATGA GAGTGCCCGC CCAGCTGCTG GGAAGTCTGC TGCTGTGGCT
 20 GAGAGGCGCC
 61 AGATGCGACA TCCAGATGAC CCAGTCCCCC TCCAGCCTGT CCGCCTCCGT
 GGGCGACAGA
 121 GTGACCATCA CATGCAAGAC CTCCCAGGAC ATCAACAAGT ACATGGCCTG
 GTATCAGCAG
 25 181 ACCCCCGGCA AGGCCCTCG GCTGCTGATC CACTACACCT CCGCTCTGCA
 GCCTGGCATC
 241 CCCTCCAGAT TCTCCGGCTC CGGCTCTGGC CGGGAATA CTTTACCAT
 CTCCAGTCTG
 301 CAGCCCGAGG ATATCGCCAC CTAATACTGC CTGCAGTACG ACAACCTGTG
 30 GACCTTCGGC
 361 CAGGGCACCA AGGTGGAAAT CAAGCGGACC GTGGCCGCTC CCTCCGTGTT
 CATCTTCCCA
 421 CCCTCCGACG AGCAGCTGAA GTCCGGCACC GCCTCCGTCG TGTGCCTGCT
 GAACAACCTC
 35 481 TACCCCGCG AGGCCAAGGT GCAGTGGAAG GTGGACAACG CCCTGCAGTC
 CGGCAACTCC
 541 CAGGAATCCG TCACCGAGCA GGAATCCAAG GACAGCACCT ACTCCCTGTC
 TCCACCCTG
 601 ACCCTGTCCA AGGCCGACTA CGAGAAGCAC AAGGTGTACG CCTGCGAAGT
 40 GACCCACCAG
 661 GGCCTGTCCA GCCCCGTGAC CAAGTCCTTC AACCGGGGCG AGTGC

(57) Формула изобретения

1. Соединение конъюгат антитело-лекарственное средство для лечения солидных
 45 опухолей и гематологических злокачественных образований, в котором лекарственное
 средство с линкером сайт-специфичным образом конъюгировано с антителом или его
 антигенсвязывающим фрагментом, которое связывается с антигеном-мишенью,
 экспрессируемом опухолевой клеткой, через встроенный цистеин в указанном антителе

или его антигенсвязывающем фрагменте в положении 41 тяжелой цепи согласно нумерации Kabat, где указанное лекарственное средство с линкером представляет собой цитотоксическое средство с линкером.

2. Соединение по п. 1, дополнительно содержащее встроенный цистеин в позиции 375 в части Fc указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, согласно нумерации Eu.

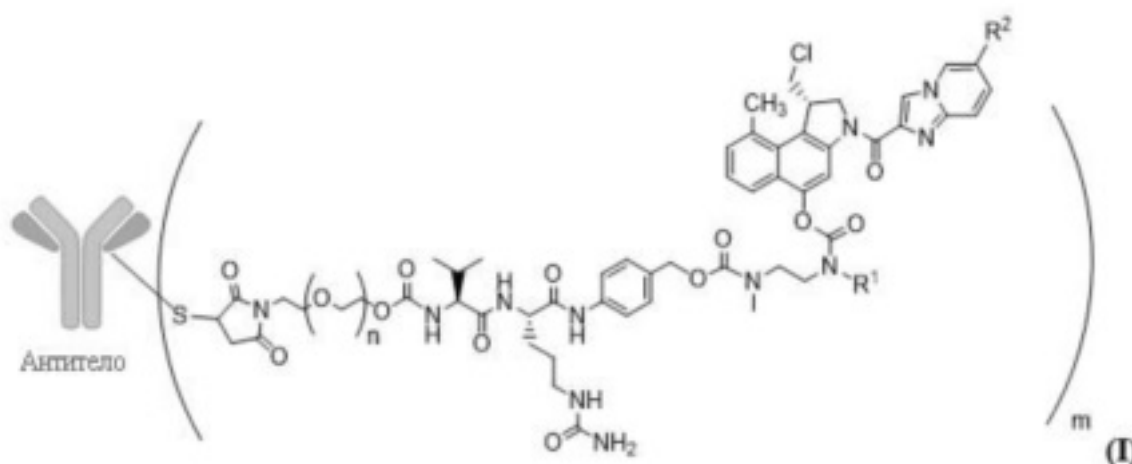
3. Соединение по п. 1 или 2, в котором указанное лекарственное средство с линкером содержит производную дуокармицина.

4. Соединение по любому из пп. 1-3 с формулой (I)

10

15

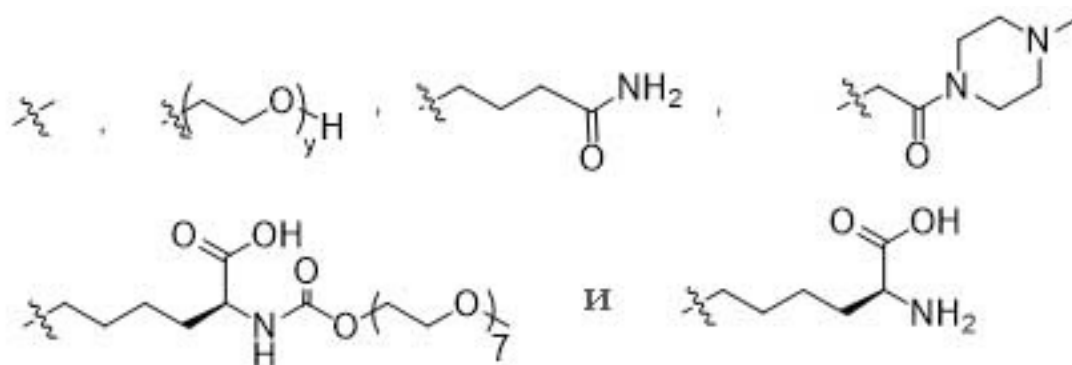
20



при этом n составляет 0-3, m представляет среднее DAR от 1 до 6, R^1 выбирается из

25

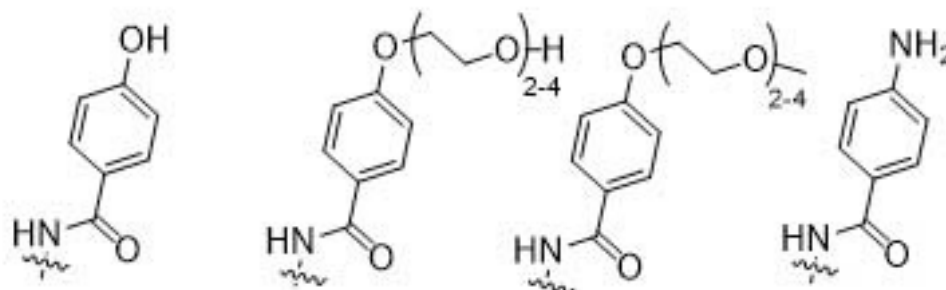
30



35

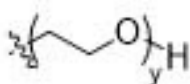
у равно 1-16 и R^2 выбирается из

40

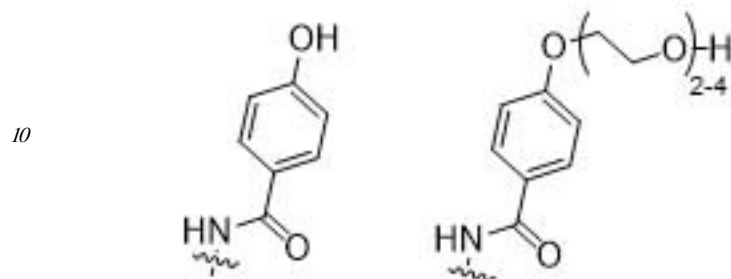


45

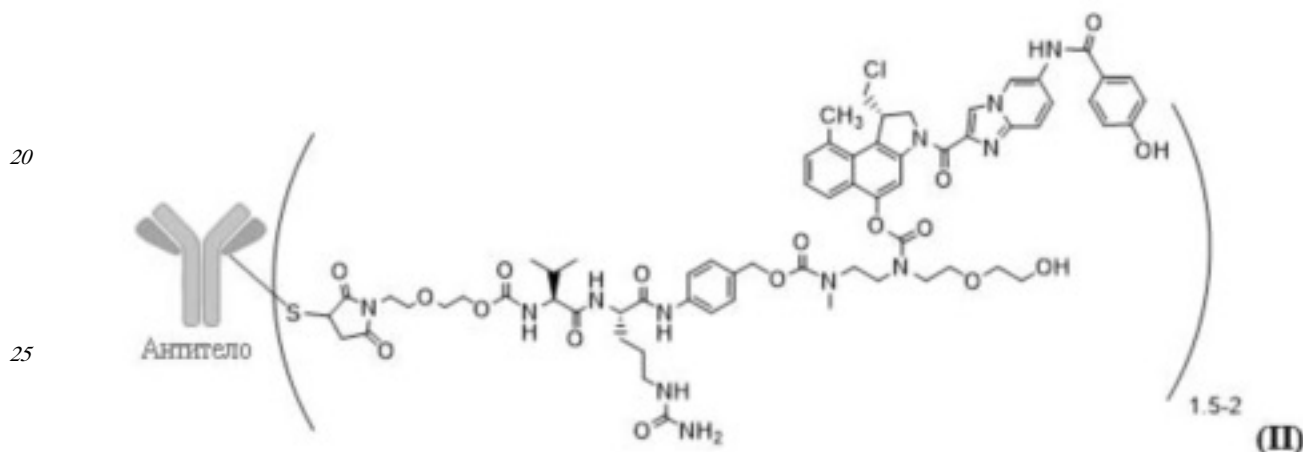
5. Соединение по п. 4, в котором n составляет 0-1, m представляет среднее DAR от 1,5 до 2, R^1 представляет собой



5 у равно 1-4 и R² выбирается из



15 6. Соединение по любому из пп. 1-5 с формулой (II)



7. Соединение по любому из пп. 1-6, в котором указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с антигеном-мишенью, который экспрессирован в или на клеточной мембране опухолевой клетки, и при этом указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент поглощается клеткой после связывания с указанной целью.

8. Соединение по любому из пп. 1-7, в котором указанное антитело представляет собой антитело против аннексина A1, антитело против CD115, антитело против CD123, антитело против CLL-1, антитело против с-MET, антитело против MUC1, антитело против PSMA, антитело против 5T4 или антитело против TF.

9. Соединение по любому из пп. 1-8, в котором указанное антитело представляет собой моноклональное антитело против PSMA или моноклональное антитело против 5T4.

10. Соединение по п. 9, в котором тяжелая цепь указанного антитела против PSMA содержит последовательность аминокислот с SEQ ID NO:2, и легкая цепь указанного антитела против PSMA содержит последовательность аминокислот с SEQ ID NO:5.

11. Соединение по п. 9, в котором тяжелая цепь указанного антитела против 5T4 содержит последовательность аминокислот с SEQ ID NO:8, и легкая цепь указанного антитела против 5T4 содержит последовательность аминокислот SEQ ID NO:11.

12. Фармацевтическая композиция для лечения солидных опухолей и гематологических злокачественных образований, содержащая соединение по любому из пп. 1-9 и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов,

предпочтительно в форме лиофилизированного порошка.

13. Соединение по любому из пп. 1-11 или фармацевтическая композиция по п. 12 для применения в качестве медикамента.

14. Соединение по любому из пп. 1-11 или фармацевтическая композиция по п. 12 для применения в лечении человеческих солидных опухолей и гематологических злокачественных образований.

15. Соединение или фармацевтическая композиция по п. 14, при этом человеческие солидные опухоли выбираются из группы, состоящей из рака груди, рака желудка, рака ободочной и прямой кишки, рака уротелия, рака яичников, рака матки, рака легких, мезотелиомы, рака печени, рака поджелудочной железы и рака простаты.

15

20

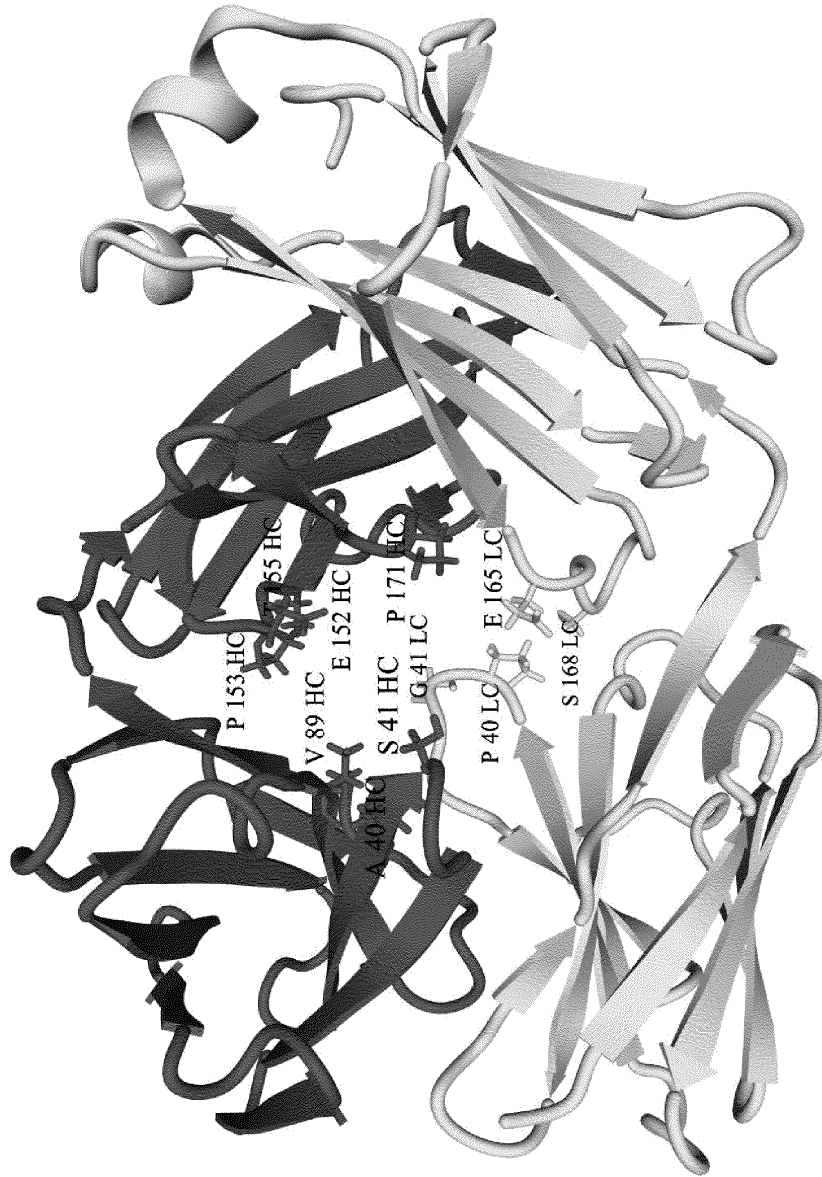
25

30

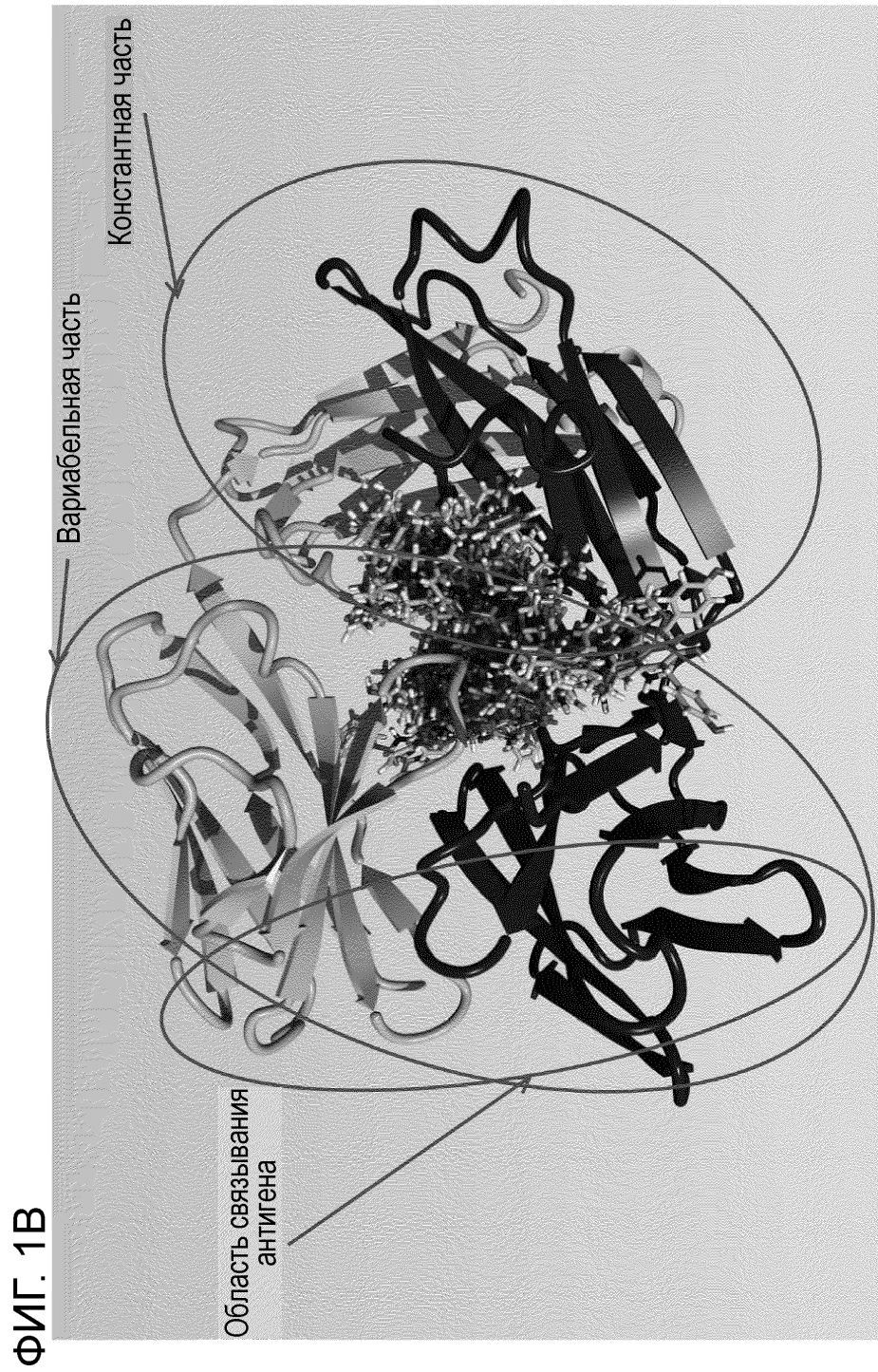
35

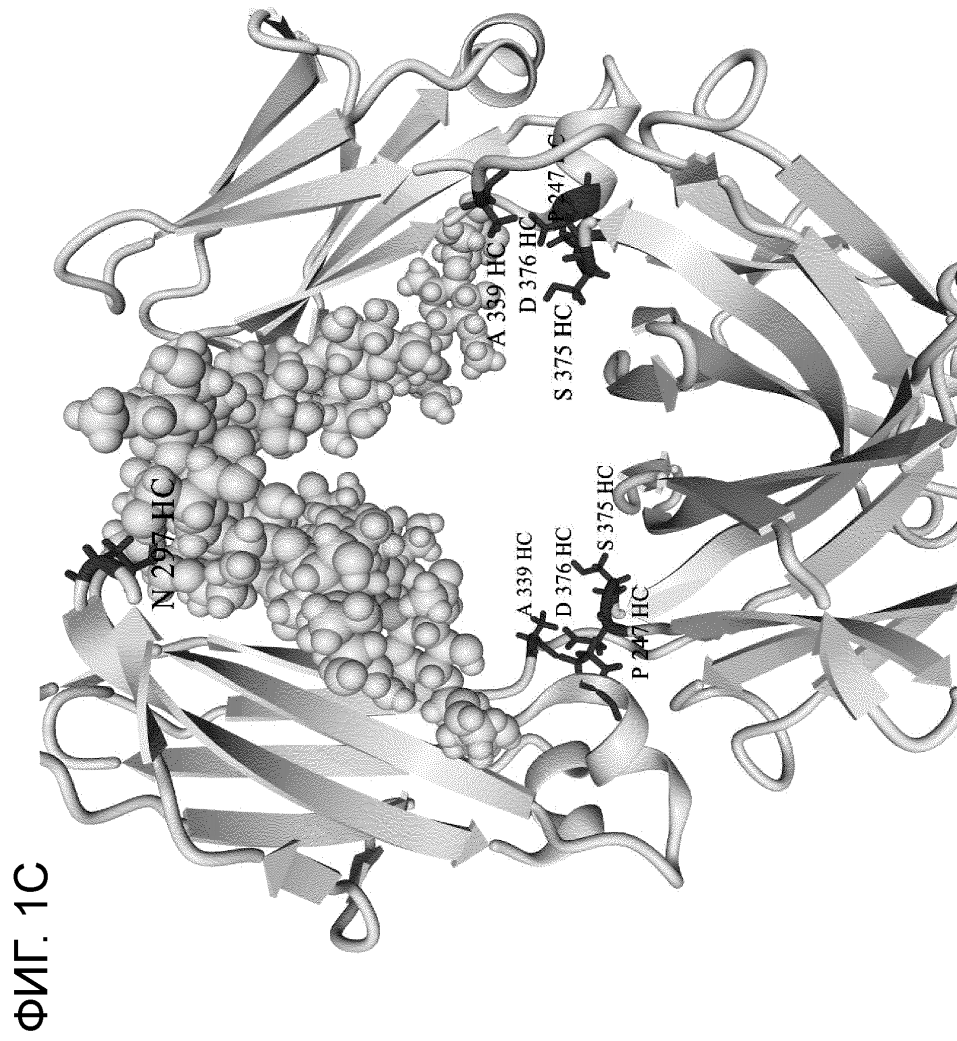
40

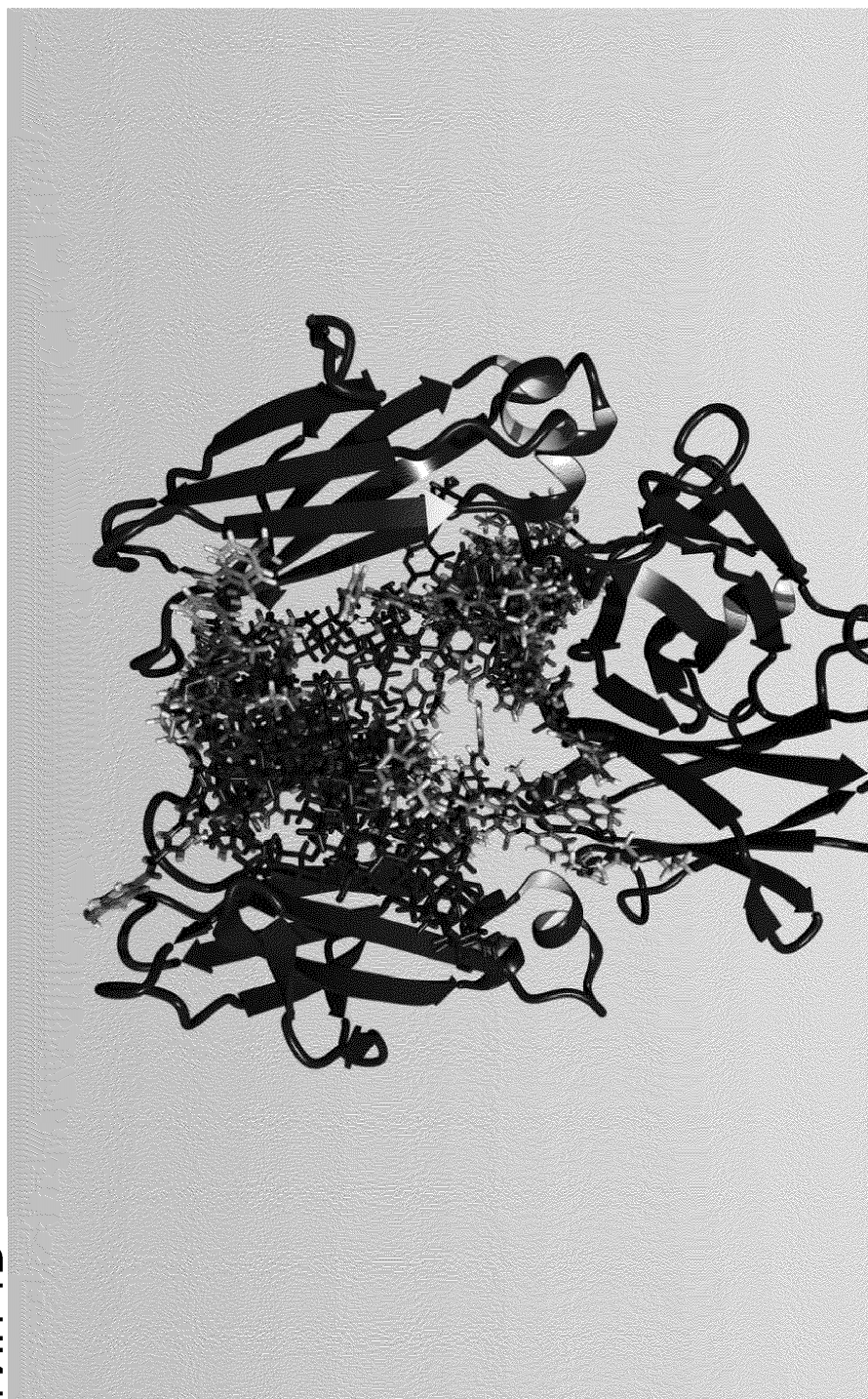
45



ФИГ. 1А



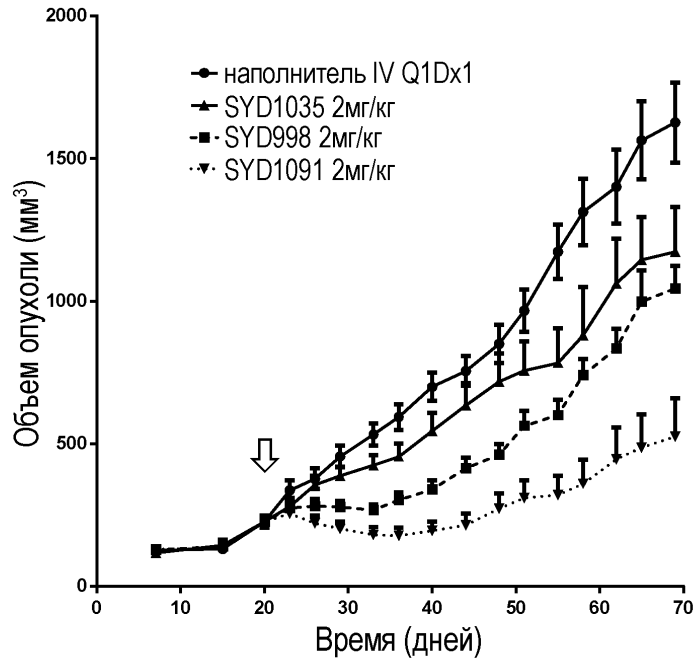




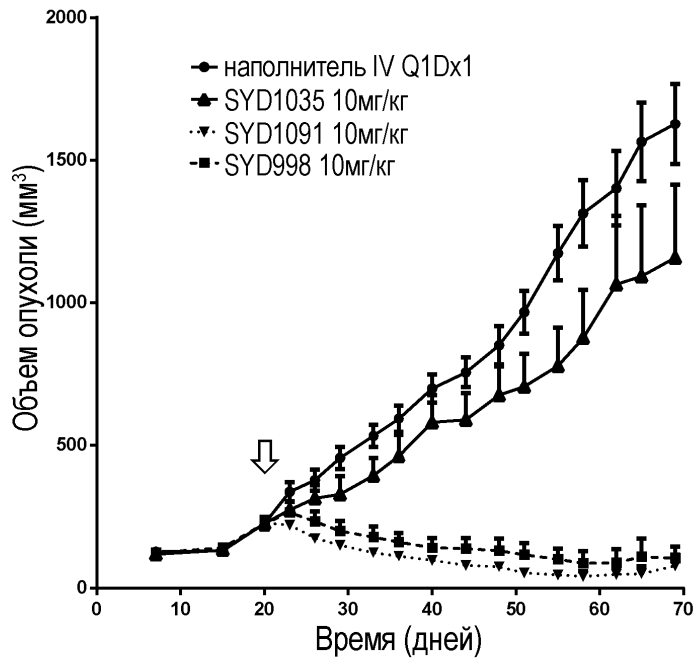
Фиг. 1D

5/7

ФИГ. 2А

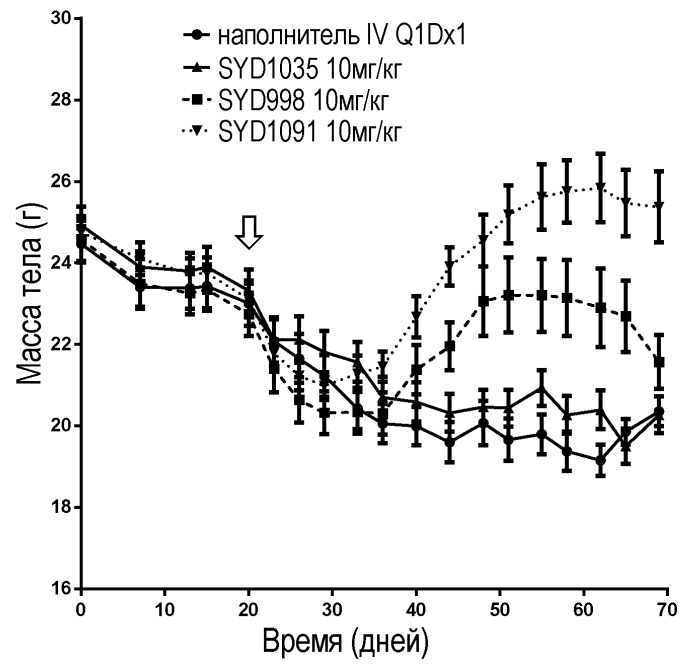


ФИГ. 2В



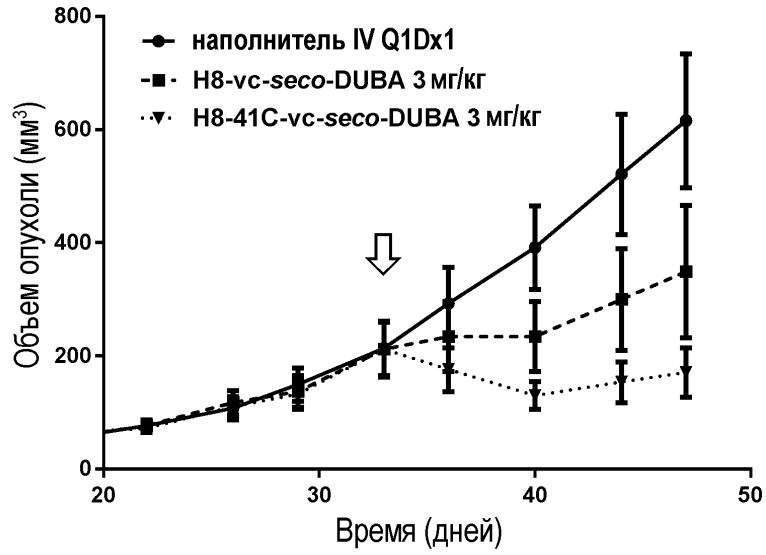
6/7

ФИГ. 3



7/7

ФИГ. 4А



ФИГ. 4В

