

Цей винахід належить до кон'югатів зв'язуючого білка з лікарським засобом, що містять токсичні похідні антрацикліну.

Вступ

Ковалентні кон'югати токсинів малої молекулярної маси (MW переважно < 2500 дальтон) зі зв'язуючими білками, зокрема антитілами, специфічними до клітин пухлин, є потужними інструментами направленої знищення ракових клітин. Тому такі кон'югати зв'язуючого білка з лікарським засобом (BPDC), зокрема кон'югати антитіла з лікарським засобом (ADC), становлять високий медичний та комерційний інтерес для лікування ракових захворювань. Щоб розробити з метою лікування раку ефективні та безпечні кон'югати зв'язуючого білка з лікарським засобом або кон'югати антитіла з лікарським засобом, необхідно звернути увагу на кілька аспектів. По-перше, зв'язуючий білок або антитіло має бути специфічним до даного антигену пухлини (TSA), який не може експресуватися нормальними або здоровими клітинами тканин. По-друге, ковалентний зв'язок, або зв'язування, між лікарським засобом і зв'язуючим білком має бути достатньо функціонально стабільним у кровообігу, запобігаючи небажане вивільнення токсичного навантаження в кров, водночас він має давати змогу лікарському засобу ефективно вивільнятися після зв'язування та/або після надходження всередину ракових клітин. По-третє, токсичне навантаження повинно характеризуватися досить високою токсичністю або ефективністю для того, щоб знищити ракові клітини, навіть якщо на ракових клітинах експресовано потенційно обмежену кількість TSA і тому відповідно інтерналізовано лише обмежену кількість ADC або вивільнення токсичного навантаження не спричинює достатньої ефективності в разі зв'язування з раковими клітинами або за інтерналізації в ракові клітини.

Таким чином, перший аспект успішного цілеспрямованого впливу на ракове захворювання за допомогою TSA залежить від глибокого розуміння цільової біології та цільових молекул, розроблених для специфічного зв'язування, другий і третій аспекти, що пов'язані з оптимальним агентом зв'язування та токсичним навантаженням, зазвичай стосуються ефективності кон'югатів зв'язуючого білка з лікарським засобом (BPDC) або кон'югатів антитіла з лікарським засобом (ADC).

Усі ADC на стадії клінічних випробувань, два ADC, схвалені Управлінням продовольства та медикаментів (FDA) для лікування раку, кон'югат антитіла до CD30 з лікарським засобом Adcetris® (брентуксумаб ведотин) від Takeda та кон'югат антитіла до HER-2 з лікарським засобом Kadcyla® (трастузумаб емтанзин або T-DM1) від Roche/Genentech (див. Perez et al., 2014) утворюються шляхом хімічного кон'югування токсичного навантаження, що включає зв'язування малеїміду або з первинними аміногрупами лізинових залишків антитіла, або з вільними тіольними групами, утвореними м'яким відновленням внутрішньоланцюгових дисульфідних зв'язків антитіла. Хімічна кон'югація має два обмеження. По-перше, встановлено, що хімічний лінкер на основі малеїміду пов'язаний з небажаною відсутністю стабільності за наявності сироваткового альбуміну людини і, таким чином, призводить до виділення токсинів у кров пацієнтів, яких лікують за допомогою ADC, що містить малеїмідний лінкер (див. Alley et al., 2008). По-друге, класична хімічна кон'югація за допомогою хімізму малеїмідного лінкера призводить до гетерогенних BPDC або ADC, оскільки не можна контролювати, з якою аміногрупою або тіольною групою відбувається кон'югація. У результаті, отримано розподіл Гауса кількості лікарських засобів, ковалентно зв'язаних з антитілом, причому кон'юговані ADC мають середнє відношення антитіло до лікарського засобу (DAR) в діапазоні від 3,5 до 4. Проте окремі кон'югати можуть не мати приєднаного лікарського засобу до антитіла (DAR = 0) або мати до 8 приєднаних лікарських засобів (DAR = 8) у випадку кон'югатів цистеїну та ще більше лікарських засобів на антитіло (> DAR 10) у випадку кон'югатів лізину. Таким чином, класичні хімічно кон'юговані ADC представляють собою гетерогенну суміш різних молекул із різними функціональними властивостями (див. Panowski et al., 2014), що явно небажано з регуляторної точки зору в разі розробки ADC для лікування хворих на рак.

Внаслідок цього існує комерційна та медична потреба забезпечити сайт-специфічно кон'юговані ADC або BPDC, які є гомогенними стосовно співвідношення лікарського засобу до антитіла.

Крім того, існує комерційна та медична потреба забезпечувати ADC або BPDC зі стабільнішим зв'язком між лікарським засобом і білком, які так само стабільніші в кровотоці, ніж традиційні кон'югати на основі хімії малеїмідного лінкера.

Існує також комерційна та медична потреба в ADC або BPDC з вищою ефективністю та меншими побічними ефектами, ніж ADC або BPDC, які на цей момент наявні на ринку.

Загальні властивості винаходу

Цей винахід вирішує згадані проблеми. Винахід забезпечує токсичні речовини для використання в кон'югатах зв'язуючого білка з лікарським засобом, а також, необов'язково, новий метод для зв'язування сайт-специфічним чином цих токсичних речовин із указаними зв'язуючими білками, уникаючи класичної хімії малеїдного лінкера.

Загальні переваги цих двох властивостей будуть описані нижче.

Метод зв'язування

Указана вище сироваткова нестабільність та неоднорідність хімічно кон'югованих речовин, а також BPDC або ADC, які містять малеїдний лінкер, відповідальні за безпеку цих лікарських засобів для хворих на рак, оскільки вони доповнюють неспецифічний випуск токсину таких ADC у пацієнтів.

З одного боку, класичні малеїдні лінкери можуть бути порушені вільними тіолами в сироватці людини, зокрема цистеїном-34 людського сироваткового альбуміну, який, як найпоширеніший сироватковий білок, забезпечує найвищу концентрацію вільних тіолів у сироватці людини. Цистеїн-34 сироваткового альбуміну людини може порушувати тіоефірний зв'язок у малеїдних лінкерах шляхом так званої зворотної реакції Міхаеля, за якої токсин переноситься і ковалентно зв'язується з людським сироватковим альбуміном (HSA). Кон'югат токсин-HSA може потім поширювати токсин у кровообіг або в організм без будь-якої вибірковості стосовно пухлини (див. Alley et al., 2008).

З іншого боку, за вищих значень DAR хімічно кон'юговані, гетерогенні ADC, як відомо, мають коротший період напіврозпаду в сироватці через високу гідрофобність цих ADC та схильність до агрегації. Тому ці молекули з вищим значенням DAR швидше виводяться з сироватки, розкладаються та вивільняють токсини до того, як відбудеться зв'язування цих ADC з цільових раковими клітинами. Крім того, більші значення DAR молекул також призводять до швидшого вивільнення токсину, тому що окремі сайти кон'югації мають різну кінетику вивільнення, що залежить від структури амінокислоти, що несе токсин.

Вищезгадана сироваткова нестабільність та неоднорідність хімічно кон'югованих ADC перешкоджають успіху введення ADC у клінічну практику, незважаючи на те, що концепція доставки дуже сильного клітинного токсину до ракових клітин за допомогою його зв'язування з антитілом, специфічним для пухлинної клітини, є переконливою. Через побічні ефекти, пов'язані з токсином, перший ADC, схвалений Управлінням продовольства та медикаментів (FDA) у 2000 р., Mylotarg® (гемтузумаб озогаміцин) від Pfizer/Wyeth зняли з ринку через 10 років (<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm216448.htm>).

Таким чином, схильність до нестабільності хімічно кон'югованих ADC обмежує поточні розробки ADC токсинами з проміжною клітинною токсичністю, як наприклад, лікарські засоби на основі доластатина/ауристатина та майтанзіна, які інгібують полімеризацію тубуліну. Насправді, понад 90 % усіх ADC, які в цей час оцінюються клінічно, містять токсини, пов'язані з монометил ауристатіном E (MMAE) або F (MMAF) або з майтанзином (наприклад, DM1 або DM4) (див. Mullard (2013)).

Проте препарати, що інгібують полімеризацію тубуліну, не можуть досягти вмісту нижче значень наномольної концентрації, оскільки тубулін, компонент клітинного цитоскелету, є надзвичайно численним внутрішньоклітинним білком-мішенню, тому потрібно дифундувати або транспортувати до клітини багато молекул лікарського засобу, щоб зупинити метаболізм внутрішньоклітинного цитоскелету, необхідний для поділу клітини і виживання. Проміжна активність лікарських засобів, що інгібують полімеризацію тубуліну, і які можуть допускати певний ступінь вивільнення токсину з кон'югатів, як і їхня специфічна дія на клітини в стані поділу та мітотичні клітини, зробила токсини з цим типом дії найпопулярнішим для розробки ADC.

Проте для того, щоб вплинути на пухлини з низьким рівнем експресії TSA, знадобляться токсини з набагато більшою активністю. Тому новіші стратегії ADC на доклінічній фазі включають токсини з високою клітинною токсичністю та різним способом дії, зокрема токсини, що пошкоджують ДНК, як-от дуокарміцини (див. Doktor et al. (2014)) та піролобензодіазепіни (PBD) (див. Hartley & Hochhauser (2012)).

Антрациклінові похідні

Класом токсинів, що інтеркалюють ДНК, і представляють значний інтерес та використовуються як навантаження для BPDC або ADC, є антрацикліни, що мають доказану клінічну валідацію як хіміотерапевтичних засобів у терапії ракових захворювань (див. Minotti (2004)). Антрацикліни — полікетиди червоного кольору з високою протипухлинною активністю, які на початкових етапах

отримували з видів *Streptomyces*. Упродовж останніх 40 років описані численні похідні, зокрема ті, які зазвичай використовуються як хіміотерапевтичні засоби для лікування різних видів солідного раку та гематологічних злоякісних пухлин, наприклад, доксорубіцин (інша назва — адріаміцин), даунорубіцин, епірубіцин, ідрарубіцин або валрубіцин. Існує навіть один кон'югат антитіла до CD74 з лікарським засобом на I/II фазі клінічних досліджень для лікування множинної мієломи та інших гематологічних злоякісних пухлин за допомогою доксорубіцину як токсичного навантаження, мілатузумаб-доксорубіцин (див.: державний ідентифікатор клінічних досліджень: NCT01101594).

Усі хіміотерапевтичні засоби на основі антрациклінів показують обмежену активність стосовно клітин пухлин у вигляді лікарських засобів, не пов'язаних з білками плазми крові, за концентрації півмаксимального інгібування IC₅₀ в діапазоні значень мкмоль/мл для більшості клітин пухлин (Crooke and Prestayko, 1981). Незважаючи на приклад першого ADC-доксорубіцин, оціненого в клінічних дослідженнях, використання звичайних антрациклінів як токсичного навантаження для стратегій створення ADC, ймовірно, залишатиметься складним завданням.

Близько десяти років тому описано нову антрациклінову похідну, а саме PNU-159682, як метаболіт неморубіцину (див. Quintieri et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11, 1608-1617), який, як повідомляється, останнім часом демонструє надзвичайно високу активність стосовно знешкодження клітин *in vitro* у пікомольному-фемтомольному діапазоні з однією клітиною лінії яєчників (A2780) та однією клітинною лінією раку молочної залози (MCF7) (WO2012/073217 A1, Caruso et al.). Структура антрациклінової похідної PNU-159682, як описано в зазначених вище документах відомого рівня техніки, відображена на фіг. 2 з метою посилання, а також із зазначенням офіційної системи нумерації антрациклінів для реакційноздатного вуглецю тетрациклічної структури аглікону.

Виходячи з вищезгаданих недоліків хімічно кон'югованих ADC, а саме з огляду на нестабільність малеїмідного лінкера та вивільнення молекул з вищим значенням DAR у гетерогенних хімічно кон'югованих ADC, така сильний антрацикліновий токсин, як-от PNU-159682, буде дуже проблематичним у значенні класичного хімічного кон'югування через вивільнення токсину в кровообіг перед взаємодією з клітинами пухлини.

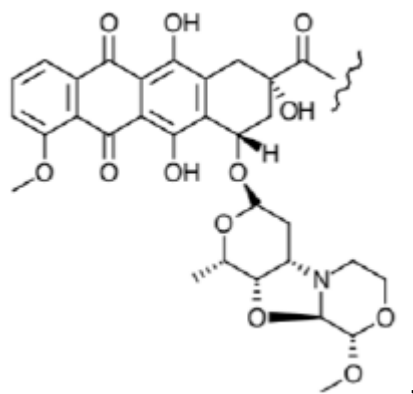
Тому необхідні гомогенні ADC з токсинами високої активності, як-от наприклад, PNU-159682, з визначеними фармакокінетичними властивостями та тривалою стійкістю в сироватці, щоб уникнути або звести до мінімуму побічні ефекти передчасного вивільнення токсинів у кровообіг пацієнтів. Проте, одночасно необхідна специфічна смерть пухлинних клітин, що характеризуються низькою експресією.

Хоча використання PNU-159682 як токсичного навантаження для ADC, утвореного за допомогою класичних хімічних підходів малеїмідного лінкера, розкрито раніше (WO2009/099741 A1, Cohen et al), у документі рівня техніки не представлені дані стосовно функціональності. Перші функціональні дані стосовно PNU-159682, зв'язаної з антитілами за допомогою різних лінкерів, та просторової структури хімічно кон'югованих молекул та гетерогенних кон'югатів, що містять малеїмідний зв'язуючий агент, відносно пухлинних клітин описані у документі рівня техніки WO 02010/009124 A2 (Beria et al.) без наведення інформації щодо безпеки та фармакокінетики.

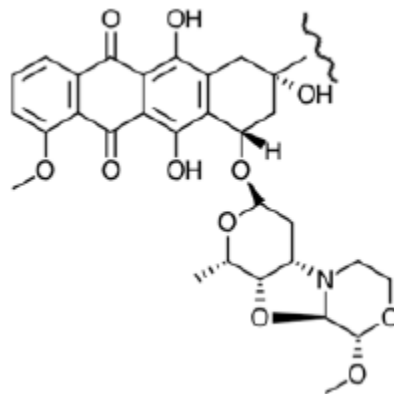
Переважні варіанти здійснення винаходу

Відповідно до першого переважного здійснення винаходу кон'югати антрациклінової похідної (PNU) містять похідні PNU-159682, де відсутній вуглець C14 та приєднана гідроксильна група тетрациклічної структури аглікону, характерної для антрациклінів. Як другий переважний варіант втілення у кон'югатів антрациклінової похідної (PNU) відсутній вуглець у положенні C13, що мав функції карбонільної групи, і C14 з функцією гідроксильної групи тетрациклічної структури аглікону, характерної для антрациклінів.

У цих варіантах здійснення винаходу кон'югати антрациклінової похідної (PNU) включають похідну антрацикліну PNU-159682, що має наведену нижче формулу (i) або (ii):



формула (i)



формула (ii)

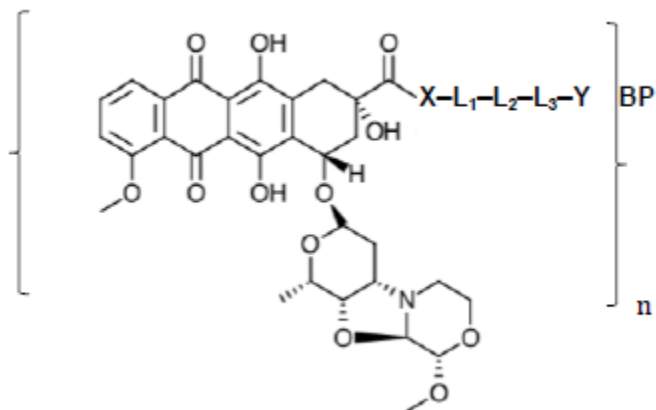
У цих кон'югатах під хвиляподібною лінією передбачена структура лінкера, яка може мати різні елементи $X-L_1-L_2-L_3-Y$, де L_1-L_3 — лінкери, і два з L_1-L_3 є необов'язковими, а X та Y додатково представляють один або ще кілька додаткових необов'язкових лінкерів.

Обидві похідні значно відрізняються від PNU-159682, яка є метаболітом антрацикліного неморубіцину та вперше розкрита Quintieri et al. (2005).

Обидва вуглеці у положенні C13 і C14 з функцією карбонільної та гідроксильної групи відповідно є обов'язковими елементами структурної ознаки PNU-159682, що не є частиною кон'югатів похідних, описаних у цьому документі.

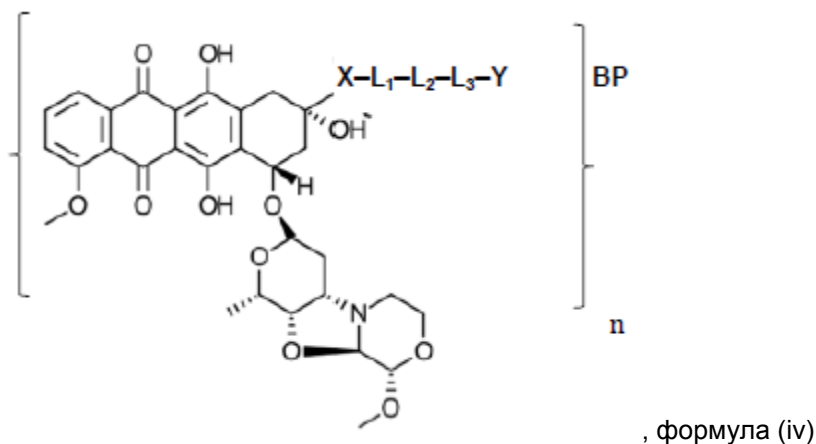
Уперше продемонстровано, що PNU-похідні без вуглецю у положенні 14 та приєднаної гідроксильної групи тетрациклічної структури аглікона характерні для клітинної токсичності антрациклінів, наприклад кон'югати сайт-специфічно зв'язаного антитіла з лікарським засобом. Переважні варіанти здійснення показані на фіг. 3 А, 6 А та 6 В.

Відповідного до іншого варіанта винаходу представлено кон'югати зв'язуючого білка з лікарським засобом (BPDC), які мають таку формулу:



формула (iii)

або

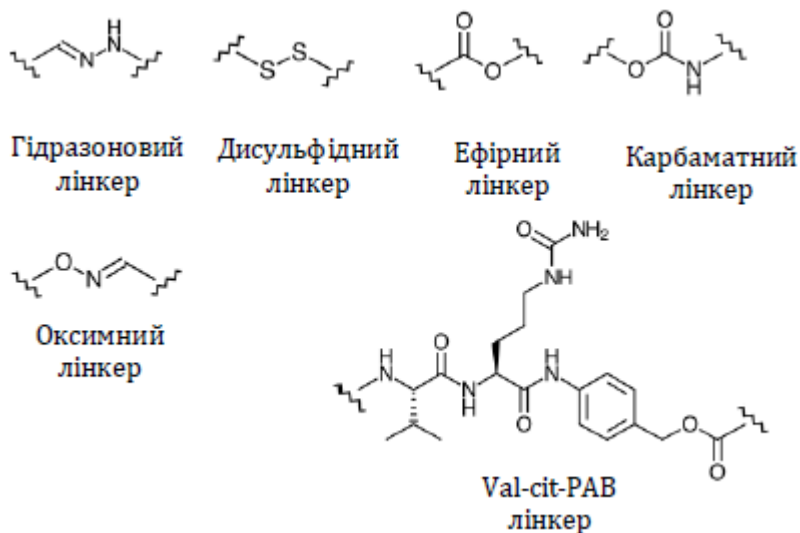


- де L1-L3 представляють лінкери, і два з L1-L3 є обов'язковими,
- X та Y - один або більше необов'язкових лінкерів,
- BP - зв'язуючий білок, і
- n - ціле число з проміжку ≥ 1 та ≤ 10 .

У цій конструкції кілька лінкерів можуть утворювати об'єднаний ланцюг, який приєднує один токсин до одного зв'язуючого білка, і/або кілька лінкерів можуть приєднувати кілька токсинів до одного зв'язуючого білка. Подібним чином, зв'язуючі агенти можуть приєднувати дві або більше субодиниць того самого зв'язуючого білка до двох або більше молекул токсину.

Необов'язковий лінкер X може являти собою будь-яку хімічну структуру для приєднання, відому з попереднього рівня техніки, яка використовувалася для ADC, щоб дозволити певне вивільнення токсину при інтерналізації в ракові клітини (див., наприклад, Ducry & Stump (2010) або McCombs et al. (2015)).

Деякі приклади таких лінкерів описані в попередньому рівні техніки і надані лише як необмежуючий приклад. Вони наведені нижче.



Лінкери L₁, L₂ L₃ описані нижче.

Необов'язковий лінкер Y може являти собою будь-який амінокислотний ланцюг у складі до 20 амінокислот, що забезпечує оптимальне приєднання зв'язуючого білка до об'єданого ланцюга лінкерів X, L₁, L₂, L₃ або їхніх варіацій, зокрема до L₃.

Крім того, наведено структури лінкерів, які дають змогу для сайт-специфічного приєднання похідних PNU до відповідних зв'язуючих білків, наприклад переважно до антитіл. Таким чином, похідні можуть бути використані для одержання кон'югатів сайт-специфічно поєднаних, гомогенних

зв'язуючих білків із лікарським засобом, які можуть застосовуватися в терапевтичних цілях, наприклад, для протипухлинної терапії.

Згідно з іншим переважним здійсненням похідної антрацикліну (PNU) структура лінкера містить L_2 , що являє собою олігопептид гліцину (Gly_n), з'єднаний безпосередньо або за допомогою іншого лінкера L_1 із указаною похідною антрацикліну так, що олігопептид гліцину (Gly_n) має вільний аміно-кінець, де n являє собою ціле число в діапазоні від ≥ 1 до ≤ 21 .

У кожному випадку (Gly_n) (інша назва (Gly_n)- NH_2 або Gly_n -відрізок) є олігопептидом гліцину. В іншому переважному варіанті винаходу n являє собою ціле число від ≥ 3 до ≤ 10 , переважно від ≥ 3 до ≤ 6 . Переважніший випадок, коли $n = 5$.

У цьому документі описані похідні антрацикліну (PNU), які є похідними PNU-159682 з відсутніми атомами вуглецю в положенні 13 і 14 або лише з відсутнім атомом вуглецю в положенні 14 з приєднаною функціональною групою.

Стосовно формули (i), то відповідно до одного з переважних варіантів здійснення винаходу олігопептид гліцину (Gly_n) (за значень $n \geq 1$ і ≤ 21 , переважно $n = 3$ або $n = 5$) кон'югується з похідною антрацикліну за допомогою алкілендіамінного лінкера ($NH_2-(CH_2)_m-NH_2$, де $m \geq 1$ та ≤ 11 , переважно $m = 2$), який приєднується до похідної антрацикліну за допомогою першого амідного зв'язку з вуглецем у положенні 13 та до карбоксильного кінця олігопептиду гліцину за допомогою другого амідного зв'язку. Переважна сполука PNU-EDA- Gly_5 , що є ефективною для створення кон'югатів сайт-специфічно зв'язаної антрациклінової похідної (PNU), зображена на фіг. 3 А.

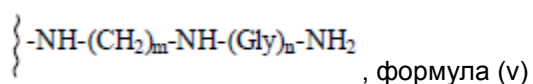
Стосовно формули (ii), то відповідно до одного з переважних варіантів здійснення винаходу олігопептид гліцину (Gly_n) (за значень $n \geq 1$ і ≤ 21 , переважно $n = 3$ або $n = 5$) безпосередньо зв'язується з кільцем А похідної PNU (або вуглецем у положенні 9 антрациклінової структури аглікону) так, що карбонільна група вуглецю в положенні 13 представляє карбоксильний кінець лінкера пептиду гліцину. Переважна сполука PNU- Gly_5 , що є ефективною для створення кон'югатів сайт-специфічно зв'язаної антрациклінової похідної (PNU), зображена на фіг. 6 А.

Стосовно формули (ii), то відповідно до одного з переважних варіантів здійснення винаходу олігопептид гліцину (Gly_n) (за значень $n \geq 1$ і ≤ 21 , переважно $n = 3$ або $n = 5$) безпосередньо зв'язується з кільцем А похідної PNU (або вуглецем у положенні 9 антрациклінової структури аглікону) за допомогою алкіленамінного лінкера ($(CH_2)_m-NH_2$ (де $m \geq 1$ та ≤ 11 , переважно $m = 2$), який зв'язаний з карбоксильним кінцем олігопептиду гліцину за допомогою амідного зв'язку. Переважна сполука PNU-EA- Gly_5 , що є ефективною для створення кон'югатів сайт-специфічно зв'язаної антрациклінової похідної (PNU), зображена на фіг. 6 В.

Далі в тексті кон'югати похідних антрацикліну згідно з вищенаведеним описом також називають "PNU-EDA- Gly_n-NH_2 ", "PNU- Gly_n-NH_2 " або "PNU-EA- Gly_n-NH_2 " або також у короткій формі "PNU-EDA- Gly_n ", "PNU- Gly_n ", або "PNU-EA- Gly_n " відповідно або за переважного здійснення з 5 залишками гліцину "PNU-EDA- Gly_5 ", "PNU- Gly_5 " або "PNU-EA- Gly_5 " відповідно.

Цей винахід додатково забезпечує кон'югат зв'язуючого білка з лікарським засобом (BPDC), який включає кон'югат похідної антрацикліну згідно з вищенаведеним описом, причому похідна додатково містить зв'язуючий білок з'єднаний з вільним аміно-кінцем олігопептиду гліцину (Gly_n) за допомогою додаткового амідного зв'язку.

Згідно з іншим втіленням похідної антрацикліну (PNU) або кон'югату зв'язуючого білка з лікарським засобом (BPDC) олігопептид гліцину (Gly_n), позначений як L_2 , з'єднується з похідним антрацикліну формули (i) за допомогою алкілендіамінного лінкера, позначеного як L_1 , де алкілендіамінний лінкер з'єднується з антрацикліновою похідною за допомогою першого амідного зв'язку, тоді як він поєднаний з карбоксильним кінцем олігопептиду гліцину за допомогою другого амідного зв'язку, згаданий кон'югат алкілендіамінного лінкера та олігопептиду гліцину має наступну формулу (v),



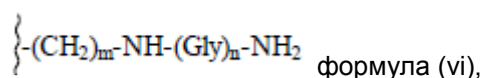
де хвильоподібна лінія означає зв'язок з похідною антрацикліну формули (i).

m - ціле число у діапазоні від ≥ 1 до ≤ 11 , а n - ціле число у діапазоні від ≥ 1 до ≤ 21 . Переважно m — ціле число у діапазоні від ≥ 2 до ≤ 4 , переважніше $m = 2$ (етилендіамінна група, EDA).

Алкілендіамінний лінкер використовується для приєднання (Gly)_n-лінкера для зв'язування з сортазою, так що зчеплення може відбуватися через С-кінець пептиду (Gly)_n, таким чином забезпечуючи вільний N-кінець остаточного аддукту токсину-лінкера для зв'язування з сортазою. Треба розуміти, що будь-яка метиленова група CH₂ в алкілендіамінному лінкері може бути заміщена іншим стабільним зв'язком, наприклад -O- (етерний), -S- (тіоетерний), -NH- (амінний), або будь-яким іншим алкілом, гетероалкілом, арилом або гетероарильною групою або будь-якою їхньою комбінацією для реалізації винаходу.

Відповідно до іншого варіанта здійснення похідної антрацикліну (PNU) або кон'югату зв'язуючого білка з лікарським засобом (BPDC) олігопептид гліцину (Gly)_n безпосередньо з'єднується з кільцем А (або вуглецем у положенні 9) похідної антрацикліну формули (ii). Див. фіг. 6 А.

Згідно з іншим втіленням похідної антрацикліну (PNU) або кон'югату зв'язуючого білка з лікарським засобом (BPDC) олігопептид гліцину (Gly)_n з'єднується з похідним антрацикліну формули (ii) за допомогою алкіленамінного лінкера, позначеного як L₁, де алкіленамінний лінкер з'єднується з карбоксильним кінцем олігопептиду гліцину амідним зв'язком, згаданий кон'югат алкіленамінного лінкера та олігопептида гліцину має наступну формулу (vi)



де хвилеподібна лінія вказує на зв'язок з похідною антрацикліну формули (ii), причому m має ціле значення у діапазоні ≥ 1 і ≤ 11 , а n — ціле значення з діапазону ≥ 1 і ≤ 11 . Переважно m — ціле число у діапазоні від ≥ 2 до ≤ 4 , переважніше m = 2 (етиленамінна група, EDA).

Алкіленамінний лінкер використовується для приєднання (Gly)_n-лінкера для зв'язування з сортазою, так що зчеплення може відбуватися через С-кінець пептиду (Gly)_n, таким чином забезпечуючи вільний N-кінець остаточного аддукту токсину-лінкера для зв'язування з сортазою. Треба розуміти, що будь-яка метиленова група CH₂ в алкіленамінному лінкері може бути заміщена іншим стабільним зв'язком, наприклад -O- (етерний), -S- (тіоетерний), -NH- (амінний), або будь-яким іншим алкілом, гетероалкілом, арилом або гетероарильною групою або будь-якою їхньою комбінацією для реалізації винаходу.

В іншому варіанті здійснення кон'югату зв'язуючого білка з лікарським засобом (BPDC) лінкерна структура L₃ містить пептидний мотив, який виникає внаслідок специфічного розщеплення мотиву розпізнавання ферменту сортази.

Як описано в іншому місці цього документа, як і в WO 02014140317, вміст якої включено в цей опис за допомогою посилання, сортази (які також називаються транспептидазними сортазами) утворюють групу прокаріотичних ферментів, які модифікують поверхневі білки шляхом розпізнавання та розщеплення специфічного сортувального сигналу, що містить певний пептидний мотив. Цей пептидний мотив також називають «сортазний мотив розпізнавання ферментів», «сортазна мітка» або «мітка розпізнавання сортази». Зазвичай, певна сортаза має один або кілька мотивів розпізнавання ферментів. Сортазні ферменти можуть мати природне походження або бути продуктом генної інженерії (Doerr et al., 2014).

У переважному варіанті здійснення кон'югату зв'язуючого білка з лікарським засобом (BPDC) згаданий сортазний мотив розпізнавання ферментів містить пентапептид.

У переважному варіанті здійснення кон'югату зв'язуючого білка з лікарським засобом (BPDC) зазначений згаданий сортазний мотив розпізнавання ферментів містить принаймні одну з наступних амінокислотних послідовностей (показано у напрямку N-кінець -> С-кінець):

- LPXTG
- LPXSG i/або
- LAXTG.

Перші два сортазні мотиви розпізнавання ферментів визначаються диким типом сортази A *Staphylococcus aureus*. Другий також розпізнається сконструйованою сортазою A 4S9 *Staphylococcus aureus*, а третій — виявляється за допомогою сконструйованої сортази A 2A-9 *Staphylococcus aureus* (Doerr Et al, 2014). У всіх трьох випадках X може бути будь-якою з 20 пептидогенних амінокислот.

Ці сортазні мотиви розпізнавання ферментів, наприклад, з'єднуються з С-кінцем зв'язуючого білка або його домену чи субодиниці за допомогою генетичного злиття, і таким чином коекспресуються. Згадане злиття може бути здійснене безпосередньо або опосередковано через додатковий лінкер Y, описаний в будь-якому іншому місці цього документа.

Потрібно зазначити, що після інтеграції в структуру лінкера та з'єднання з L₂, L₃ бракує 5-го амінокислотного залишку (С-кінцевий G) сортазних мотивів розпізнавання ферментів. У таблиці 1 згаданий залишок G С-кінця показано в дужках. У разі, якщо сортазний мотив розпізнавання ферментів є пентапептидом, то L₃ — тетрапептид.

До зв'язування з сортазою сортазні мотиви розпізнавання ферментів можуть додатково нести мітки, як-от His-мітки, Мус-мітки або Strep-мітки (див. фіг. 4 а WO2014140317, вміст якої внесено до цієї заявки за допомогою посилання), приєднані С-кінцями до сортазного мотиву розпізнавання ферментів. Проте, оскільки пептидний зв'язок між 4-ю та 5-ю амінокислотами сортазного мотиву розпізнавання ферментів розривається під дією опосередкованого зв'язування з сортазою, ці додаткові теги за завершення будуть видалені з повністю кон'югованого BPDC.

Сортазні мотиви розпізнавання ферментів можуть бути з'єднані з лінкером (Gly)_n, який в свою чергу приєднаний до антрациклінової похідної за допомогою сортазного методу, описаного в цьому документі та в WO201414031. Протягом процесу приєднання тільки залишок гліцину вивільняється з лінкера (Gly)_n.

Варто зазначити, що ці три відрізки пептиду показані вище в класичному напрямку N-кінець -> С-кінець, а залишок L приєднується до С-кінця зв'язуючого білка або до С-кінця лінкера Y за допомогою пептидного зв'язку. П'ятий амінокислотний залишок (G) L₃ видалено після приєднання до пептиду (Gly)_n, тоді як 4-й T або S амінокислотний залишок L₃ фактично з'єднується з N-кінцем пептиду (Gly)_n.

Таблиця нижче надає огляд переважних варіантів здійснення кон'югатів зв'язуючого білка з лікарським засобом (BPDC) відповідно до винаходу з показаними L₁ – L₃.

Таблиця 1

Стандартна будова лінкерів

Токсини	L ₁	L ₂	L ₃ (показано у напрямку C' → N")	Зв'язуючий білок
формула (i)	алкілендіамінна група	(Gly) _n	(G)TXPL (G)SXPL (G)TXAL	антитіло
формула (ii)	алкіленамінна група	(Gly) _n	(G)TXPL (G)SXPL (G)TXAL	антитіло

Як говорилося, потрібно зазначити, що після інтеграції в структуру лінкера та з'єднання з L₂, L₃ бракує 5-го амінокислотного залишку (С-кінцевий G). У таблиці 1 згаданий залишок G С-кінця показано в дужках.

Згідно з іншим варіантом здійснення кон'югату зв'язуючого білка з лікарським засобом (BPDC) похідна антрацикліну (PNU) за допомогою одного або кількох лінкерів приєднується до карбоксильного кінця зв'язуючого білка або його домену чи субодиниці.

В іншому переважному варіанті здійснення n лінкера олігопептиду гліцину (Gly)_n є цілим числом у діапазоні між ≥ 3 і ≤ 11 , переважніше між ≥ 3 і ≤ 7 , переважно n = 3 або n = 5. Переважніше для лінкера олігопептиду гліцину (Gly)_n n має значення 5.

В одному з варіантів винаходу навантаження представляє собою формулу (i).

В іншому варіанті здійснення винаходу навантаження представляє собою формулу (ii).

Згідно з іншим варіантом здійснення кон'югату зв'язуючого білка з лікарським засобом (BPDC) зв'язуючий білок з'єднується з вільним аміно-кінцем олігопептиду гліцину (Gly)_n за допомогою амідного зв'язку.

Відповідно до іншого варіанта здійснення кон'югату зв'язуючого білка з лікарським засобом (BPDC) зв'язуючий білок є принаймні одним із групи, яка складається з

- антитіла,
- модифікованого формату антитіла,
- похідної антитіла або фрагмента, що зберігає цільові зв'язуючі властивості,
- зв'язуючого білка на основі антитіла,
- зв'язуючого олігопептида і/або
- імітатора антитіла.

Термін «зв'язуючий білок», що використовується в цьому документі, еквівалентний терміну «імуноліганд», який використовується в інших публікаціях винахідників, включаючи додаток 1, який надає подальші технічні деталі, розкриття та уможливлення застосування методу кон'югації сортази.

«Антитіла», що також синонімічно називаються «імуноглобулінами» (Ig), зазвичай, містять чотири поліпептидні ланцюги, два важких (H) та два легких (L), і, отже, є мультимерними білками або їхніми еквівалентними Ig гомологами (наприклад, наноантитіло верблюда, яке включає тільки важкий ланцюг, однодоменні антитіла (dAbs), які можуть бути отримані з важкого або легкого ланцюга); у тому числі повнорозмірні функціональні мутанти, варіанти або їхні похідні (включаючи, але не обмежуючись ними, мишачі, химерні, гуманізовані та повністю людські антитіла, які зберігають основні особливості зв'язування епітопу молекули Ig і включають подвійні специфічні, біспецифічні, мультиспецифічні імуноглобуліни та з подвійним варіабельним доменом; молекула імуноглобуліну може належати до будь-якого класу (наприклад, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA та IgY) або підкласу (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 та IgA2) та алотипу.

Якщо зв'язуючий білок є антитілом, кон'югат зв'язуючого білка з лікарським засобом є кон'югатом антитіла з лікарським засобом (ADC).

Відповідно до викладеної нижче інформації цього винаходу ADC також називаються "PNU-EDA-Gly_n-Ab", "PNU-Gly_n-Ab" або "PNU-EA-Gly_n-Ab".

«Зв'язуючий білок на основі антитіла», як використовується в цьому документі, може являти собою будь-який білок, що містить принаймні один із доменів імуноглобуліну V_H, V_L, або C_H, отриманих із антитіл, у контексті інших неімуноглобулінів або компонентів, отриманих не з антитіл. Такі білки на основі антитіл включають, але не обмежуються ними, (i) F_c-сполучені білки зв'язуючих білків, у тому числі рецептори або компоненти рецепторів з усіма частинами доменів C_H імуноглобуліну, (ii) зв'язуючі білки, у яких домени V_H та/або V_L поєднані з альтернативними молекулярними каркасами або молекули (iii), у яких домени V_H та/або V_L, та/або C_H імуноглобуліну комбіновані та/або приєднані таким чином, що, зазвичай, не зустрічаються в природних антитілах або фрагментах антитіл.

«Похідна антитіла або фрагмент», як використовується в даному документі, відноситься до молекули, що містить, принаймні, один поліпептидний ланцюг, отриманий із неповнорозмірного антитіла, включаючи, але не обмежуючись ними, (i) Fab-фрагмент, що являє собою моновалентний фрагмент, який складається з варіабельних доменів легкого (V_L), важкого (V_H) ланцюга та доменів константної області легкого (C_L) та важкого (C_{H1}) ланцюга 1; (ii) фрагмент F(ab')₂, який є бівалентним фрагментом, що містить два Fab-фрагменти, з'єднані дисульфідним мостиком у шарнірній області; (iii) частина важкого ланцюга фрагмента F_{ab} (F_d), який складається з доменів V_H і C_{H1}; (iv) варіабельний фрагмент (F_v), який містить домени V_L і V_H одного плеча антитіла; (v) фрагмент домену антитіла (dAb), що містить єдиний варіабельний домен; (vi) ізольовану область, що визначає комплементарність (CDR); (vii) фрагмент F_v єдиного ланцюга (scF_v); (viii) діатіло, що є бівалентним, біспецифічним антитілом, у якому домени V_H і V_L експресовані на єдиному поліпептидному ланцюгу, але з використанням закороткого лінкера, що не дає змоги для кон'югації між двома доменами на тому самому ланцюзі, таким чином змушуючи домени кон'югувати з комплементарними доменами іншого ланцюга та створювати два сайти зв'язування антигену; (ix) лінійне антитіло, яке включає пару послідовних сегментів F_v (V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}), які разом з комплементарними поліпептидами легких ланцюгів утворюють області зв'язування антигену; і (x) інші неповнорозмірні частини імуноглобуліну важких та/або легких ланцюгів або мутантів, варіантів або їхніх похідних окремо або в будь-якій комбінації. У будь-якому разі зазначені похідні або фрагменти зберігають цільові зв'язуючі властивості.

Термін «формат модифікованого антитіла», що використовується в цьому документі, охоплює кон'югати антитіла з лікарським засобом, модифіковані поліалкіленоксидом scFv, монотіла, діатіла, антитіла верблюда, доменні антитіла, бі- або триспецифічні антитіла, IgA або дві структури IgG, з'єднані за допомогою J-ланцюга і секреторний компонент, антитіла акули, нова світова каркасна

область приматів + не нова світова CDR приматів, антитіла IgG4 з видаленою шарнірною ділянкою, IgG з двома додатковими сайтами зв'язування в доменах CH3, антитіла зі зміненою Fc-ділянкою для посилення спорідненості до гамма-рецепторів Fc, димеризовані конструкції, що включають CH3+VL+VH і подібні.

Термін «імітатор антитіла», як використовується в цьому документі, стосується білків, що не належать до сімейства імуноглобулінів, і навіть до небілків, як-от аптамери або синтетичні полімери. Деякі типи мають подібну до антитіл бета-складчасту будову. Потенційними перевагами «імітаторів антитіл» або «альтернативних каркасів» над антитілами є краща розчинність, більша проникність в тканини, більша стійкість до тепла та ферментів та порівняно низькі витрати на виробництво.

Деякі імітатори антитіл можуть бути надані у великих бібліотеках, які пропонують специфічні типи таких імітаторів для зв'язування з усіма можливими цільовими молекулами. Аналогічно до антитіл, цільові специфічні імітатори антитіл можуть бути розроблені за допомогою технології високої пропускну здатності (HTS), а також із встановленими технологіями відображення, як-от технологія фагового дисплея, бактеріального дисплея, дисплея дріжджів або ссавців. У даний час розроблені імітатори антитіл охоплюють, наприклад, повторювані білки анкірину (DARPs), лектини C-типу, білки A-домену *S. aureus*, трансферини, ліпокаліни, 10-й домен фібронектину типу III, інгібітори протеази домену Куніца, зв'язувальні речовини, одержувані з убіквітину (афіліни), гамма-кристалічні зв'язувальні речовини, цистеїнові вузли або ноттіни, зв'язувальні речовини на основі каркаса тіоредоксину А, домени SH-3, страдотіла, «А домени» мембранних рецепторів, стабілізовані дисульфідними зв'язками та Ca²⁺, сполуки на основі CTLA4, Fyn SH3 та аптамери (молекули пептидів, які зв'язуються з конкретними молекулами мішені).

Термін «зв'язувальний олігопептид», як використовується в цьому документі, стосується олігопептидів, які мають здатність приєднуватись з високою спорідненістю до цільової молекули. Термін «оліго» стосується пептидів, що мають від 5 до 50 амінокислотних залишків.

Відповідно до іншого варіанта здійснення кон'югату зв'язуючого білка з лікарським засобом (BPDC) зв'язуючий білок приєднується, принаймні, до однієї з одиниць, вибраної з групи, що включає:

- рецептор,
- антиген,
- фактор росту,
- цитокін та/або
- гормон.

Цей список визначає різні типи мішеней, з якими може зв'язуватися білок. Як використовується в даному описі, термін «рецептор» означає молекулу клітинної поверхні, переважно, молекулу поверхні клітини, яка (i) зв'язує специфічні або групи специфічних сигнальних молекул (наприклад, рецептор, як-от VEGF) та/або (ii) має невідомий ліганд (наприклад, рецептор-сирота, як-от HER2/neu). Природні рецептори експресуються на поверхні популяції клітин або вони просто представляють позаклітинний домен такої молекули (незалежно від того, чи існує природна форма чи ні) або розчинну молекулу, яка виконує природну зв'язувальну функцію в плазмі або в межах клітини або органа. Переважно, такий рецептор є членом сигнального каскаду, який бере участь у певному патогенному процесі (наприклад, рецептор, який належить сигнальному каскаду фактора росту), або він експресується на поверхні клітини або частки, яка задіяна в патологічному процесі, наприклад, на ракових клітинах.

Як використовується в даному описі, термін «антиген» означає речовину, яка має здатність індукувати специфічну імунну відповідь і може включати поверхневі білки або білкові комплекси (наприклад, іонні канали). Часто антигени асоціюються з патогенними утвореннями, наприклад, раковою клітиною.

Як використовується в даному описі, термін «цитокін» стосується дрібних клітинних сигнальних білкових молекул, які секретуються численними клітинами, і є категорією сигнальних молекул, що широко використовуються у міжклітинній комунікації. Цитокіни можна класифікувати як білки, пептиди або глікопротеїни; термін «цитокіни» охоплює велику і різноманітну сім'ю регуляторів, що виробляються в організмі клітинами різного ембріонального походження.

Як використовується в цьому документі, термін «фактор росту» відноситься до природних речовин, здатних стимулювати клітинний ріст, проліферацію та клітинне диференціювання. Зазвичай, фактор росту — це білок або стероїдний гормон. Фактори росту важливі для регулювання різних клітинних процесів.

Як використовується в цьому описі, термін «гормон» відноситься до хімічного вивільнення речовини клітиною, залозою або органом в одній частині тіла, що посиляє повідомлення, які впливають на клітини в інших частинах організму. Цей термін охоплює пептидні гормони, ліпідні та фосфоліпідні гормони, включаючи стероїдні гормони та моноаміни.

Якщо зв'язуючий білок приєднується до рецептора або антигена, кон'югат зв'язуючого білка з лікарським засобом (BPDC) може, наприклад, бути спрямований на певний сайт, наприклад, патогенного утворення, наприклад, ракової клітини, куди доставляється навантаження, наприклад, токсин. Таким чином, системна токсичність токсину або хіміотерапевтичного агента зменшується, тоді як локальна концентрація останнього на ділянці дії підвищується, що забезпечує кращу ефективність при зменшенні побічних ефектів. Крім того, відповідний сигнальний каскад може бути пригнічений приєднанням зв'язуючого білка. У випадку, якщо навантаження є маркером, останній, таким чином, може використовуватися для позначення певного місця для діагностики, наприклад, ракової клітини, яка характеризується даним поверхневим антигеном, виявленим зв'язуючим білком.

Якщо зв'язуючий білок зв'язує фактор росту, цитокін і/або гормон, кон'югат зв'язуючого білка з лікарським засобом (BPDC), наприклад, може бути спрямований на сайт, до якого зазвичай приєднується цитокін чи гормон росту, щоб доставити навантаження сайт-специфічним способом. Крім того, відповідний сигнальний каскад може бути пригнічений приєднанням зв'язуючого білка.

Як використовується в цьому описі, термін «зв'язати, приєднати» означає добре зрозумілу взаємодію або інше не випадкове зв'язування між зв'язуючим білком, наприклад, антитілами або фрагментами антитіл та їхніми мішенями. Переважно, така реакція зв'язування характеризується високою специфічністю та/або чутливістю до мішені. Переважно реакція зв'язування характеризується константою дисоціації (K_d) $\leq 10^{-3}$ M, переважно $\leq 10^{-4}$ M, $\leq 10^{-5}$ M, $\leq 10^{-6}$ M, $\leq 10^{-7}$ M, $\leq 10^{-8}$ M, $\leq 10^{-9}$ M та найпреважніше $\leq 10^{-10}$.

Відповідного до іншого варіанта здійснення зв'язуючий білок має, принаймні, дві субодниці.

У цьому варіанті здійснення одна субоднина може бути кон'югована з похідною антрацикліну PNU-159682, розкритою в цьому документі (див. фіг. 3A та 6A та 6B).

Переважно, принаймні, два різних лікарських засоби можуть бути сайт-специфічно приєднані до, принаймні, двох субодниць. Ця функція забезпечує універсальну панель інструментів, з якою можна створити велику різноманітність різних конструкцій зв'язуючого білка з лікарським засобом.

Переважно, принаймні, два різних лікарських засоби перешкоджають різним шляхам клітинного метаболізму. Це означає, що разом із кон'югатом похідної антрацикліну, описаним у цьому документі, другий токсин може бути приєднано до іншої субоднини того самого білка зв'язування.

Такий варіант здійснення може бути досягнутий, наприклад, шляхом кон'югування двох різних лікарських засобів до кожного з 2-х легких та 2-х важких ланцюгів повнорозмірного антитіла відповідно за допомогою двох різних ферментів сортази, що визначають різні мотиви розпізнавання ферментів («тег сортази») плюс антитіло, яке містить різні С-кінцеві модифікації у важких та легких ланцюгах, що включають відповідні мотиви розпізнавання для зазначених різних ферментів сортази.

Таким чином, можна створити кон'югат антитіла з лікарським засобом, який складається з двох повнорозмірних легких і важких ланцюгів Ig, які містять різні навантаження, ковалентно приєднані до вказаних важких і легких ланцюгів.

Такий варіант здійснення забезпечує, переважно, сайт-специфічну кон'югацію, принаймні, двох субодниць для одержання кон'югатів зв'язуючого білка з лікарським засобом, що характеризується сайт-специфічністю та рівним навантаженням кожної субоднини.

В одному варіанті здійснення кон'югату зв'язуючого білка з лікарським засобом (BPDC) зв'язуючий білок з'єднується з HER-2. Переважно, зв'язуючим білком є антитіло, специфічне до HER-2.

У цьому варіанті здійснення антитіло, специфічне до HER-2, переважно:

- а) включає області 1-6 CDR трастузумабу (гуманізований hu4D5),
- б) містить варіабельний домен важкого та легкого ланцюга трастузумабу,
- в) має ідентичність амінокислотної послідовності 90 % або вище з областями або доменами а) або б),
- г) є трастузумабом або фрагментом зв'язування мішені або їхньою похідною,
- е) конкурує з трастузумабом за зв'язування з Her-2.

Моноклональне антитіло трастузимаба проти HER-2 приєнується до домену IV HER-2. Переважно, антитіло до HER-2 включає первинні амінокислотні послідовності ланцюгів IgH та IgL на фіг. 11 A (Seq ID№1 та 2).

Послідовності трастузимабу також розкриті в банку лікарських засобів під номером доступу DB00072 (BIOD00098, BTD00098), які за допомогою посилання додано до цього документа, як і базу даних IMGT (VH: <http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/details.cgi?pdbcode=7637&Part=Chain&Chain=7637H> & VL: <http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/details.cgi?pdbcode=7637&Part=Chain&Chain=7637L>).

В іншому варіанті здійснення кон'югату зв'язуючого білка з лікарським засобом (BPDC) зв'язуючий білок з'єднується з CD30. Переважно, зв'язуючим білком є антитіло, специфічне до CD30.

У цьому варіанті здійснення антитіло переважно:

- а) включає області 1-6 CDR брентуксимабу (химерний сAc10),
- б) містить варіабельний домен важкого та легкого ланцюга брентуксимабу,
- с) має ідентичність амінокислотної послідовності 90 % або вище з областями або доменами а) або б),
- д) є брентуксимабом або фрагментом зв'язування мішені або їхньою похідною, і/або
- е) конкурує з брентуксимабом за зв'язування з CD30.

Послідовності брентуксимабу (клон сAc10), який є компонентом антитіла затвердженого лікарського засобу Адцетрис/Брентуксимаб ведотину, описано в US2008213289A1.

Переважно, антитіло до CD30 включає первинні амінокислотні послідовності ланцюгів IgH та IgL на фіг. 11 (Seq ID№3 та 4).

Переважно, у цьому варіанті здійснення винаходу токсин представляє собою формулу (i).

- L₁ — етилендіамінний лінкер,
- L₂ — лінкер олігопептиду гліцину (Gly_n) (де n, переважно, представляє собою 5 амінокислот), і
- L₃ представляє амінокислотні залишки 1–4 процесованого пентапептидного мотиву сортазної мітки (позбавлений С-кінця залишок G (5-й амінокислотний залишок), що видаляються після опосередкованої сортазної кон'югації з пептидом (Gly)_n,
- лінкер X відсутній, і
- Y являє собою лінкер 5-ї амінокислоти між С-кінцем легкого ланцюга Ig і L₃, який переважно має амінокислотну послідовність GGGGS.

Як альтернатива, токсин представляє собою формулу (ii), в якій

- L₁ — етиленамінний лінкер,
- L₂ — лінкер олігопептиду гліцину (Gly_n) (де n, переважно, представляє собою 5 амінокислот),
- L₃ представляє амінокислотні залишки 1–4 процесованого пентапептидного мотиву сортазної мітки (позбавлений С-кінця залишок G (5-й амінокислотний залишок)), що видаляються після опосередкованої сортазної кон'югації з пептидом (Gly)_n,
- лінкер X відсутній, і
- Y являє собою лінкер 5-ї амінокислоти між С-кінцем легкого ланцюга Ig і L₃, який переважно має амінокислотну послідовність GGGGS.

Винахід додатково пропонує спосіб одержання кон'югату зв'язуючого білка з лікарським засобом (BPDC) відповідно до викладеного вище опису, де зв'язуючий білок із сортазним мотивом розпізнавання ферментів з'єднаний за допомогою ферменту сортази з, принаймні, одним кон'югатом похідної антрацикліну, який як L₂ несе олігопептид гліцину (Gly)_n.

Сортазна технологія сортуванні, її переваги (сайт-специфічна кон'югація, стехіометрично визначені співвідношення між токсином і зв'язуючим білком, висока ефективність кон'югації) докладно пояснюється в заявці WO2014140317A1, вміст якої включено в цю заявку за допомогою посиланням. Додаткові пояснення стосовно сортазних міток указано вище в тексті.

Переважним варіантом здійснення даного винаходу є кон'югація навантажень PNU-похідною за допомогою технології SMAC з С-кінцем зв'язуючих білків і, переважно, з С-кінцем антитіла або ланцюгів імуноглобуліну з, принаймні, одним легким або важким ланцюгом Ig. Це досягається шляхом створення конструкцій експресії клітин ссавців для зв'язуючих білків або імуноглобулінових субодиниць, які кодують для С-кінця пентапептидного мотиву розпізнавання ферментів сортази безпосередньо за С-кінцем зв'язуючого білка або поліпептидної субодиниці мультимерного зв'язуючого білка, як, наприклад, антитіло.

Слід розуміти, що пентапептидний мотив сортази A *Staphylococcus aureus*, який є LPXTG або LPXSG, і який був згаданий раніше, надається лише як необмежуючий приклад і може бути замінений будь-яким іншим пентапептидним мотивом, що розпізнається ферментами сортази інших видів або інших класів, наприклад, сортаза B *Staphylococcus aureus*, яка розпізнає пентапептидний мотив NPQTN. Також можуть бути використані мотиви розпізнавання, які виявляються сконструйованими ферментами сортази, як-от, наприклад, LAETG розпізнається сконструйованою версією сортази A *Staphylococcus aureus*, що недавно описана Dorr et al. (2014).

У документі WO2014140317 додатково наведені технічні деталі, розкриття та уможливлення використання технології кон'югації сортази, яка також називається технологією SMAC (технологія опосередкованої кон'югації сортази з антитілом). Ця технологія дозволяє кон'югацію двох структур, одна з них позначена відрізком $(\text{Gly})_n$ (як повідомлялося для токсину вище в документі), а інша — сортазною міткою, що є пептидною міткою, яка потім може бути приєднана, наприклад, до зв'язуючого білка.

Ці сортазні мітки — олігопептиди, зазвичай, пентапептидні мотиви, які злиті з першою структурою (тут: зв'язуючий білок), яка повинна бути кон'югована з другою структурою (тут: похідна антрацикліну) так, щоб С-кінець згаданого пентапептиду сортазної мітки залишився вільним. Як описано в WO 02014140317, це може бути досягнуто шляхом експресії зв'язуючих білків з векторів експресії, що кодують додаткові амінокислоти для пентапептидної мітки сортази.

Такими сортазними мітками є, наприклад, LPXTG або LPXSG (для сортази A *Staphylococcus aureus*), LPXSG (для сконструйованої сортази A 4S9 від *Staphylococcus aureus*, описаної в Dorr et al., 2014) або LAXTG (для сконструйованої сортази A 2A9 *Staphylococcus aureus*, описаної в Dorr et al., 2014), де X є будь-якою з 20 природних амінокислот. Проте такі сортазні мітки можуть відрізнятися в послідовностях для ферментів сортази від інших бактеріальних видів або для класів сортази, як описано в WO 02140317 і в попередньому рівні техніки (Spirig et al. 2011).

Друга структура включає відрізок пептиду гліцину (Gly_n -відрізок) з вільним N-кінцем ($-\text{NH}_2$), де Gly_n -відрізок олігопептидом гліцину. Переважно, n — ціле число з проміжку ≥ 1 та ≤ 21 . В іншому переважному варіанті винаходу n являє собою ціле число від ≥ 3 до ≤ 10 , переважно n=3 або n=5. Переважніший випадок, коли n = 5.

Після цього ферменти сортази здатні об'єднувати обидві структури за допомогою реакції транспептидації, під час якої розщеплюється С-кінцевий амінокислотний залишок (наприклад, G в LPXTG), а потім заміщується першим гліцином зазначеного відрізка пептиду гліцину.

В іншому переважному варіанті здійснення мотив розпізнавання пентапептиду може безпосередньо долучатися до останньої амінокислоти С-кінця легких або важких ланцюгів імуноглобуліну, причому в разі легкого каппа-ланцюга людського імуноглобуліну це залишок цистеїну С-кінця, у разі легкого лямбда-ланцюга людського імуноглобуліну це залишок серину С-кінця і за важкого ланцюга людського імуноглобуліну IgG₁ може бути залишком лізину С-кінця, кодовану людським Fc γ 1 cDNA. Однак ще одним переважним варіантом здійснення є також безпосереднє приєднання сортазного мотиву пентапептиду до другого останнього залишку гліцину С-кінця, кодованого людським рецентором Fc γ 1 cDNA, оскільки зазвичай кінцеві залишки лізину важких ланцюгів антитіл обрізані шляхом пострасляційної модифікації клітин ссавців. Таким чином, у більше, ніж 90 % випадків природному IgG1 людини бракує залишків лізину С-кінця важких ланцюгів IgG1.

В іншому переважному варіанті здійснення мотив розпізнавання пентапептиду може бути приєднаний до С-кінця важкого ланцюга імуноглобуліну IgG₁ людини, де залишок лізину С-кінця, що кодується людським Fc γ 1 cDNA, замінений амінокислотним залишком, відмінним від лізину.

У заявці вже було загадано, що в деяких випадках (наприклад, на С-кінці легких каппа-ланцюгів Ig (Beerli et al. 2015) доцільно приєднувати додаткові амінокислоти між С-кінцем зв'язуючого білка та сортазною міткою L₃. Це покращує ефективність кон'югації навантаження ферментів сортази зі зв'язуючим білком. Для легких каппа-ланцюгів Ig встановлено, що шляхом додавання 5 амінокислот (GGGGS) між останньою С-кінцевою амінокислотою цистеїн легкого каппа-ланцюга Ig та сортазною міткою поліпшує кінетику кон'югації так, що С-кінець легких каппа-ланцюгів Ig та важких ланцюгів Ig може бути кон'югований з подібною кінетикою (див. Beerli et al. (2015). Таким чином, інший переважний варіант здійснення винаходу полягає в необов'язковому лінкері Y амінокислоти ≥ 1 та ≤ 21 між останньою С-кінцевою амінокислотою зв'язуючого білка або субодинця антитіла та сортазною міткою L₃.

Винахід додатково забезпечує використання кон'югату зв'язуючого білка з лікарським засобом (BPDC) згідно з вищенаведеним описом або його створення за способом, описаним вище, для лікування людини або тварини,

- у яких є ризик розвитку та/або
- яким встановлено діагноз, пов'язаний з визначеним патологічним станом.

Винахід додатково забезпечує використання кон'югату зв'язуючого білка з лікарським засобом згідно з вищенаведеним описом для виробництва лікарського препарату з метою лікування людини або тварини,

- у яких є ризик розвитку та/або
- яким встановлено діагноз, пов'язаний з визначеним патологічним станом.

Переважно, патологічним станом є неопластичне захворювання. Переважніше, неопластичне захворювання представляє собою:

- ракове захворювання, що має показник експресії HER-2 1+, 2+ або 3+, як визначено за допомогою ІГХ або гібридизації *in situ*, причому ракове захворювання, переважно, являє собою рак грудей;

- ракове CD30 позитивне захворювання, як визначено за допомогою ІГХ, ІФА або проточної цитометрії, є переважно лімфомою, переважніше хворобою Годжкіна (HL) або системною анапластичною великоклітинною лімфомою (sALCL).

Стан HER-2 може, наприклад, визначатися згідно з інструкціями ASCO/CAP (Американське товариство медичинської онкології/Коледж американських патологів), як описано у Wolff et al. 2013.

Стан CD30 може, наприклад, визначатися згідно з методом Янг (Young) 2014.

Винахід додатково забезпечує фармацевтичну композицію, яка містить кон'югат зв'язуючого білка з лікарським засобом (BPDC) згідно з вищенаведеним описом або згаданий кон'югат, створений за описаним вище способом, і, принаймні, один інший фармацевтично прийнятний компонент.

Опис

Для подолання основних недоліків традиційного зв'язування за допомогою малеїмідного лінкера для утворення BPDC та ADC, розроблено ферментативний підхід для отримання BPDC або ADC, використовуючи послідовно-специфічні транспептидазні ферменти, так звані інтеїни розщеплення, замість сортазних ферментів (див. WO2014140317A1). Зокрема, можна продемонструвати, що сайт-специфічна кон'югація малих молекулярних навантажень за допомогою сортазних ферментів, по відношенню до антитіл, іншими словами технологія SMAC (технологія опосередкованої кон'югації сортази з антитілом), призводить до ADC з активністю, яка рівна активності хімічно кон'югованих ADC стосовно знешкодження ракових клітин *in vitro*, якщо застосовується такий самий зв'язуючий білок і навантаження. Крім того, ADC, створені за допомогою технології SMAC, і які є специфічними до мішеней HER-2, призводять до такої само активності регресії пухлин у моделях ксенотрансплантації, якщо використовується те саме цільове антитіло (трастузумаб з антитілом до HER-2) та те саме токсичне навантаження (DM1) (WO2014140317A1). Однак, по-перше, у процесі утворення ADC за технологією SMAC не використовувалося зв'язування за допомогою малеїмідного лінкера, по-друге, реакція кон'югації проводилась сайт-специфічним методом стосовно С-кінця ланцюгів IgH або IgL антитіла, таким чином отримано однорідніші ADC.

У разі застосування технології SMAC сайт-специфічна кон'югація може бути здійснена, наприклад, за допомогою ферменту рекомбінантної сортази A *Staphylococcus aureus*, який розпізнає мотив пентапептиду LPXTG або LPXSG (де X — будь-яка з 20 природних амінокислот), і який може бути приєднаний до рекомбінантного антитіла, призначеного для кон'югації. Потім сортаза A використовує відрізок олігопептиду гліцину як нуклеофіль, щоб каталізувати транспептидацію, за якої аміногрупа олігопептиду гліцину здійснює нуклеофільну атаку на пептидний зв'язок між треоніном або серином і гліцином мотиву пентапептиду LPXTG або LPXSG. Це призводить до руйнування пептидного зв'язку та утворенню нового пептидного зв'язку між N-кінцем олігопептиду гліцину (див. фіг. 1), тобто призводить до транспептидації.

Хоча було доведено, що кон'югати трастузумаб-DM1, отримані за допомогою опосередкованої кон'югації з сортазою, мають активність, яку можна порівняти з активністю кон'югатів DM1 (T-DM1 або Kadcyla®, яка вже застосовується в клінічній практиці), які хімічно кон'юговані, однак, не досягнуто

більшої активності ADC, створених за технологією SMAC (WO2014140317A1). Такий результат не був очікуваним, оскільки застосовано те саме цільове антитіло та навантаження.

Виходячи з цього, а також інших експериментів з різними моноклональними антитілами, які специфічно зв'язуються з іншими TSA, які потенційно експресуються у меншій кількості на ракових клітинах, ніж мішень HER-2, або потенційно менш ефективно інтерналізуються при зв'язуванні з ADC (дані не відображаються), стало очевидним, що для отримання достатньо ефективних ADC необхідні токсичні навантаження з вищою активністю, ніж у майтанзину, і/або з потенційно різним способом дії. Крім того, навантаження повинно піддаватися модифікації принаймні однієї реактивної групи, що дає змогу приєднувати олігопептид гліцину, щоб забезпечити сортазну кон'югацію навантаження до зв'язувальних білків, модифікованих LPXTG або LPXSG. Нарешті, якщо застосовуються активніші токсини, модифікація повинна забезпечувати стабільний зв'язок між гліциновим відрізком та навантаженням, щоб запобігти небажане вивільнення токсичного навантаження в кровообіг, але в той самий час токсин повинен призводити до ефективного знешкодження шляхом специфічного зв'язування та інтерналізації BPDC або ADC у клітини пухлин.

Емпірична оцінка різних токсичних навантажень, описаних у попередньому рівні техніки в контексті технології SMAC, призвела до висновку, що високоактивна похідна антрацикліну неморубіцину, що має назву PNU-159682 (Quintieri et al., 2005) (див. фіг. 2), який був модифікований етилендіамінним спейсером, з метою приєднання відрізка пентагліцину може дуже ефективно кон'югувати з антитілами, модифікованими LPXTG, за технологією SMAC, що призводить до майже повністю кон'югованих ADC на основі аналізу продуктів за допомогою хроматографії гідрофобної взаємодії та хроматографії з оберненою фазою (дані не показані). Крім того, якщо ця модифікована похідна PNU-159682, що має назву PNU-EDA-Gly₅, кон'югована відповідно до технології SMAC з різними моноклональними антитілами, як описано в ПРИКЛАДАХ, представлених нижче, здійснюється дуже активне і TSA-залежне знешкодження клітин пухлини. Зокрема, клітини раку грудей людини з низькою експресією HER-2 можуть бути ефективно знешкоджені *in vitro* за допомогою кон'югатів PNU-EDA-Gly₅, отриманих за технологією SMAC, тоді як кон'югати майтанзин-токсин практично не були ефективними. Це демонструє потенційне використання похідної PNU-EDA-Gly₅ для створення сильних BPDC та ADC, які переважно містять PNU-EDA-Gly₅ або будь-яку PNU-похідну з олігопептидом гліцину, до якого приєднано, принаймні, два гліцини. Крім того, це демонструє корисність BPDC та ADC, що містять переважно PNU-EDA-Gly₅, або будь-яку PNU-похідну з олігопептидом гліцину як навантаження для лікування ракових захворювань.

Хоча похідна антрацикліну PNU-159682 (фіг. 2) та її використання по відношенню до хімічного кон'югування та ADC були описані в попередньому рівні техніки (наприклад, WO2009099741A1, WO2010009124, WO2012073217, надані для інформації), сполука, подібну до PNU-EDA-Gly_n або ADC, які містять PNU-EDA-Gly_n, кон'юговану за допомогою сортази, як описано в цьому документі, ще не була описана в попередньому рівні техніки, як і конкретна будова PNU-похідної з EDA спейсером та лінкером Gly_n не була розкрита або заявлена в жодному документі попереднього рівня техніки. Стабільні аддукти, в яких PNU-похідні стійко з'єднані з білками через пептидні зв'язки, а не через ефірні зв'язки та малеїмідні лінкери, можуть мати вищу стабільність та фармакокінетичну поведінку *in vivo* через загальну високу стійкість пептидних зв'язків у сироватці крові, як далі описано у прикладах нижче. Окрім того, PNU-похідні з відрізком Gly_n, які, як очікується, матимуть стабільні лікарські кон'югати, отримані шляхом технології SMAC, наведено на фіг. 6 A та 6 B.

Експериментальні приклади та фігури винаходу

Незважаючи на те, що винахід ілюстровано та детально описано на фігурах та у вищезазначеному описі, така ілюстрація та опис повинні розглядатися як ілюстративні або зразкові, а не обмежувальні; винахід не обмежується описаними варіантами здійснення. Інші варіанти здійснення вже розкритих варіантів можуть бути зрозумілими і здійснені фахівцями в цій галузі техніки в практиці заявленого винаходу, шляхом вивчення фігур винаходу, опису та заявленої формули винаходу. У формулі винаходу слово «містить» не виключає інших елементів або кроків, а зазначення однини не виключає множини. Простий факт, що деякі величини наводяться у різних залежних пунктах формули, проте це не вказує на те, що комбінація цих заходів не може бути використана для переваги. Будь-які довідникові посилання в формулі не повинні тлумачитися як обмеження сфери застосування.

Усі амінокислотні послідовності, описані в цьому документі, показані у напрямку з N-кінця до C-кінця; всі послідовності нуклеїнових кислот, описані в цьому документі, показані у напрямку 5'→3'.

Приклад 1. Отримання моноклонального антитіла брентуксимабу та трастузумабу з сайт-специфічним С-кінцевим PNU-EDA-Gly_n-навантаженням за допомогою технології опосередкованої кон'югації сортази з антитілом (технологія SMAC)

Послідовності варіабельної області важкого та легкого ланцюга моноклонального антитіла брентуксимабу (клон сAc10), специфічного до CD30 людини, отримані з патенту US2008213289A1, ті послідовності специфічного людського антигену HER-2 трастузумабу, що містяться у комерційному антитілі Герцептин (трастузумаб) або ADC Kadcyla®, отриманого від нього, були отримані з онлайн бази даних IMGT (VH: <http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/details.cgi?pdbcode=7637&Part=Chain&Chain=7637H> & VL: <http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/details.cgi?pdbcode=7637&Part=Chain&Chain=7637L>). Химерне моноклональне антитіло (mAb) сAc10 та гуманізоване mAb трастузумабу одержували з важкими та легкими ланцюгами, С-кінці яких помічені послідовністю розпізнавання сортази А та додатковою міткою Strep II очищення афінності (послідовність мітки важкого ланцюга: LPETGGWSHPQFEK; послідовність мітки легкого ланцюга: GGGGSLPETGGWSHPQFEK), використовуючи відомі фахівцям методи. (див. Фіг. 11 А та 11 В).

Похідну антрацикліну PNU-EDA-Gly₅ (фіг. 3 А) забезпечила компанія Levana Biopharma, Сан-Дієго, штат Каліфорнія, яка приєднала пептид пентагліцину до карбонільної групи PNU159682 за допомогою етилендіамінного (EDA) лінкера згідно зі схемою синтезу на фіг. 3 В. Для цього комерційно доступний PNU159682 спочатку окиснили для одержання його карбонової кислоти (1 на фіг. 3 В) за допомогою NaIO₄ у 60 % метанолі при кімнатній температурі протягом 3 годин. Після цього N-гідроксисукцинімід (NHS, 46 мг, 400 мкмоль) та етил(диметиламінопропіл) карбодіімід (EDC, 100 мг, 523 мкмоль) в 6 мл дихлорметану (DCM) додавали до розчину 1 (51 мг, 81 мкмоль) в 6 мл дихлорметану. Через 30 хв суміш промили водою (2 x 6 мл), висушили над Na₂SO₄ та випарили. Потім залишок розчинили в 2 мл диметилформаміду (DMF) перед додаванням аміну (2 на фіг. 3 В, 55 мг, 81 мкмоль, у вигляді солі трифторацетату), з подальшим додаванням N, N-диізопропілетиламіну (DIEA, 50 мкл). Суміш перемішували протягом 1 години перед додаванням піперидину (40 мкл), після чого додатково перемішували 20 хв. Суміш очищали за допомогою BEPX, одержуючи PNU-EDA-Gly₅ (3 на фіг. 3 В, 34 мг, 44 %) у вигляді червоної твердої речовини; MC m/z 955,2 (M + H).

PNU-EDA-Gly₅ була приєднана до mAbs за допомогою інкубації mAbs [10 мкМ], поміченого LPETG, з PNU-EDA-Gly₅ [200 мкМ] за наявності 0,62 мкМ сортази А в 50 ммоль буфера Hepes, 150 ммоль NaCl, 5 ммоль C₂CaCl₂, pH 7,5 протягом 3,5 год за 25 °С. Реакцію зупинили, пропускаючи суміш через колонку Protein A HiTrap (GE Healthcare), врівноважену 25 ммоль натрію фосфату pH 7,5, потім промиваючи буфером 5 об'ємами колонки (CV). Зв'язаний кон'югат елюювали 5 CV елюючого буфера (0,1 М бурштинова кислоти, pH 2,8) з фракціями 1 CV, зібраними в пробірки, що містять 25 % об./об. 1 М трис-основи для нейтралізації кислоти. Білкововмісні фракції об'єднали і сформували в 10 мкмоль сукцинат натрію pH 5,0, 100 мг/мл трегалози, 0,1 % мас./об. полісорбату або фосфату 20 на колонній хроматографії G25 за допомогою NAP 25 (GE Healthcare) відповідно до інструкцій виробника.

Сукупний вміст кожного кон'югату оцінювали шляхом хроматографії на TOSOH TSKgel G3000SWXL 7,8 мм x 30 см, з діаметром зерна 5 мкм, колонку запускали за 0,5 мл/хв в 10 % ізопропілового спирту, 0,2 М фосфату калію, 0,25 М хлориду калію, pH 6,95. Вміст лікарського препарату оцінювали як за допомогою хроматографії гідрофобної взаємодії (HIC) і хроматографії зворотної фази. HIC виконували на TOSOH Butyl-NPR 4,6 мм x 3,5 см та діаметром зерна 2,5 мкм, колонку запускали за 0,8 мл/хв з 12-хвилинним лінійним градієнтом між А - 1,5 М (NH₄)₂SO₄, 25 мкмоль NaPi, pH = 6,95 ± 0,05 та В - 75 % 25 мкмоль NaPi, pH = 6,95 ± 0,05, 25% ізопропілового спирту. Хроматографію зворотної фази проводили на Polymer Labs PLRP 2,1 мм x 5 см, діаметр зерна 5 мкм, колонку запускали за 1мл/хв/80 °С з 25-хвилинним лінійним градієнтом між 0,05 % трифтороцтова кис-та/H₂O і 0,04 % трифтороцтова кис-та/CH₃CN.. Зразки зменшили інкубацією з ДТТ за pH 8,0, 37 °С протягом 15 хвилин. ADC на основі PNU-EDA-Gly₅ були переважно мономерними та мали співвідношення лікарський засіб–антитіло близьке до теоретичного максимуму, відповідно, 4. Таблиця 2 підсумовує результати отримання ADC.

Таблиця 2

Результати отримання ADC на основі PNU-EDA-Gly₅. % мономер — % мономерного вмісту; DAR —

співвідношення лікарський засіб-антитіло.

mAb (моноклональне антитіло)	Мішень	Мітка важкого ланцюга	Мітка легкого ланцюга	% моно	DAR
Брентуксимаб	CD30	Так	Так	99,6	4,0
Трастузумаб	HER-2	Так	Так	98,2	3,9

Приклад 2. Реакція цитотоксичності in vitro кон'югату антитіла з лікарським засобом, а саме брентуксимаб-PNU-EDA-Gly₅ і трастузумаб-PNU-EDA-Gly₅, зв'язаних за допомогою сортази А

Цитотоксичність брентуксимаб-PNU-EDA-Gly₅ досліджували, використовуючи Karpas-299, лінію клітин Негоджкінської лімфоми, яка експресує високі рівні CD30, і L428, лінію клітин лімфоми Годжкіна, яка експресує від низького до середнього рівня CD30 (фіг. 4). Для контролю ефективність cAc10-PNU-EDA-Gly₅ була порівняна з комерційно доступними кон'югатами Adcetris®, cAc10-vcPAB-MMAE, специфічним до CD30 (як позитивний контроль) та комерційно доступним кон'югатом Kadcyla®, трастузумаб-DM1, специфічним до HER-2 (як негативний контроль). Для цього клітини були перенесені на 96-лункові планшети в 100 мкл RPMI-розчину/10 % FCS за щільності 10⁴ клітин на лунку та вирощували за 37 °C у зволоженому інкубаторі в атмосфері з 5 % CO₂. Після інкубації протягом одного дня 25 мкл середовища ретельно видаляли з кожної лунки та замінювали на 25 мкл 3,5-кратних серійно розведених розчинів кожного ADC у середовищі росту, в результаті чого кінцева концентрація ADC коливалася від 20 мкг/мл до 0,25 нг/мл. Кожне розведення проводилося в двох екземплярах. Через 4 додаткових днів планшети видаляли з інкубатора та доводили до кімнатної температури. За приблизно 30 хвилин до кожної лунки додавали 100 мкл люмінесцентного розчину CellTiter-Glo® (Promega, № набору G7570), після струшування планшетів за 450 об./хв протягом 5 хв проводили інкубацію протягом 10 хв без струшування, вимірювали люмінесценцію на Tecan Infinity F200 з інтеграційним терміном 1 секунда на лунку.

Як і очікувалося, кон'югат антитіла до CD30 з лікарським засобом Adcetris®, що використовувався як позитивний контроль, ефективно знищив клітини Karpas-299 з CD30^{HI} за півмаксимальної ефективної концентрації, EC50, 8,2 нг/мл (фіг. 4 А), в той самий виявляючи неефективність для знешкодження клітин L428 з CD30^{LO} (фіг. 4 В). На противагу цьому кон'югат антитіла HER-2 з лікарським засобом Kadcyla®, що використовувався як негативний контроль, не показав конкретного знешкодження клітин і був неефективним на обох клітинних лініях (фіг. 4). Показово, що ADC cAc10-PNU-EDA-Gly₅, кон'югований сортазою, ефективно знешкодив клітини CD30^{HI} Karpas-299 зі значенням EC50 6,9 нг/мл (фіг. 4 А). cAc10-PNU-EDA-Gly₅ знешкодив клітини CD30^{LO} L4288 тільки за більших концентрацій, подібно до контрольних ADC, що використовувались, вказуючи на те, що ефективність цього ADC є дійсно специфічною і опосередкована зв'язуванням CD30 (фіг. 4 В). Таким чином, опосередкована сортазою кон'югація PNU-EDA-Gly₅ призвела до ADC з дуже високою ефективністю, навіть більшою, ніж у порівняльного Adcetris®.

Ефективність знищення пухлинних клітин за допомогою кон'югату трастузумаб-PNU-EDA-Gly₅, створеного з використанням технології SMAC, досліджували за допомогою клітин SKBR3, клітинної лінії раку молочної залози людини, яка надмірно експресує HER-2, та клітин T47D, клітинну лінію раку молочної залози, яка природно експресує низький рівень HER-2, і порівнювали з комерційно доступним кон'югатом Kadcyla® трастузумаб-DM1, специфічним до HER-2 (фіг. 5). Для цього клітини були перенесені на 96-лункові планшети в 100 мкл RPMI-розчину/10 % FCS за щільності 10⁴ клітин з проведенням реакції як описано вище.

Як і очікувалось, кон'югат Kadcyla®, як позитивний контроль, ефективно знищив клітини SKBR3 раку молочної залози, які надмірно експресують HER-2, зі значенням EC50 23,7 нг/мл (фіг. 5А), але виявився неефективним для знищення клітин HER-2LO T47D (фіг. 5 В). Важливо, що трастузумаб-PNU-EDA-Gly₅, створений за технологією SMAC, демонстрував вищу цитотоксичність і не тільки знищував клітини SKBR3 з надвисокою експресією HER-2, але також клітини T47D з низькою експресією HER2 зі значеннями EC50 відповідно 4,8 та 11,0 нг/мл (фіг. 5). Таким чином, опосередкована сортазою кон'югація PNU-EDA-Gly₅ з трастузумабом дає ADC з дуже високою ефективністю, що перевищує ефективність комерційно доступного та схваленого FDA кон'югату антитіла з лікарським засобом Kadcyla®, і є навіть ефективним для клітин раку молочної залози з низькою експресією HER2.

Приклад 3. Стабільність в сироватці крові *in vitro* кон'югованого за допомогою сортази A сAc10-PNU-EDA-Gly₅ в порівнянні з трастузумабом емтанзином (Kadcyla®), що містить малеїмідний лінкер

Стабільність в сироватці крові *in vitro* брентуксимаб-PNU-EDA-Gly₅ (сAc10-PNU-EDA-Gly₅) і ADC Kadcyla вимірювалась за допомогою ІФА. сAc10-PNU-EDA-Gly₅ розвели в сироватці миші (Sigma, M5905), щура (Sigma, R9759) та людини (Sigma, H6914), інкубували за 37 °С. Зразки заморожували в рідкому азоті протягом 0, 3, 7, 14 днів і зберігали при –80 °С до ІФА аналізу. Для сироватки гризунів серії розведення сироваткових зразків сAc10-PNU-EDA-Gly₅ були перенесені на планшет ІФА, покритий 2 мкг/мл моноклональним антитілом миші до PNU (продукується у лабораторії шляхом вакцинації мишей кон'югатом людини IgG-PNU та скринінгу за допомогою кон'югату BSA-PNU) для зв'язування з ADC, або покритий Fc F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch) для зв'язування з загальним IgG, і виявлення з розведенням 1:2500 антитіл до людського F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch), кон'югованих за допомогою HRP. Для сироватки приматів 2 мкг/мл рекомбінантного людського CD30 (Sino Biologicals, 10777-H08H) використали для покриття планшета ІФА, для виявлення загального IgG та ADC відповідно використали 1:2500 розведення антитіл до людського IgG F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch) або 1мкг/мл антитіл IgG миші до PNU (вироблено в лабораторії) з додаванням HRP-кон'югованих антитіл до Fc F(ab')₂ миші (Jackson ImmunoResearch). У випадку з Кадцила використовувався такий самий протокол, як зазначено вище, для визначення стабільності в сироватці миші, щура та людини, але з виробленим у лабораторії моноклональним антитілом до майтанзину для зв'язування з ADC. Концентрації ADC та загального IgG в сироватці крові розраховувались з половини максимальних значень титрування зразка порівняно зі зразками того самого ADC з відомою концентрацією.

На фіг. 7 А показана зразкова стабільність кон'югату сAc10-PNU-EDA-Gly₅, особливо порівняно з Кадцила, що містить малеїмідний лінкер (фіг. 7 В), практично без зниження рівня ADC протягом всього експерименту в будь-якій сироватці з чотирьох перевірених видів. При встановленні часових точок між 0 та 14 днями для однофазної експоненціальної функції спаду, обмеженої досягненням кінцевої концентрації 0, значення напіврозпаду сAc10-PNU-EDA-Gly₅ та Кадцила визначали в кожній сироватці. Період напіврозпаду Кадцила становив відповідно 3,7 дня, 4,4 дня та 2,9 дня в сироватці миші, щура і людини, тоді як період напіврозпаду сAc10-PNU-EDA-Gly₅ був більше, ніж 14 днів у сироватці миші, щура та людини.

Приклад 4. Стабільність *in vivo* кон'югованого сортазою Ac10-Gly₅-PNU у миші

Кон'югат Ac10-Gly₅-PNU був доведений до кімнатної температури та розбавлений до 0,2 мг/мл у стерильному фосфатно-сольовому буферному розчині для дозуючої концентрації 1мг/кг. Зразки вводили внутрішньовенно в об'ємі 5 мл/кг дев'яти самицям швейцарської миші Вебстер. Зразки крові в тварин брали після сплиття 1год, 24 год, 72 год, 7 днів, 14 днів та 21 дня. Індивідуальні тварини відповідно до етичних стандартів використовувались лише для двох разів у взятті крові, принаймні, з тижневим інтервалом. Таким чином, у трьох мишей брали кров після 1 год і 7 днів, у трьох інших мишей — після 24 годин і 14 днів, а в останніх трьох мишей — після 72 годин і 21 у групі з дев'яти мишей. Для кожної групи тварин приблизно зібрано 200 мкл крові шляхом взяття крові голкою-шприцом з підщелепної вени під час першого збору та приблизно 600 мкл крові тим самим шляхом під час остаточної збору (термінальна кров). Вся кров була зібрана в пробірки, що містили K2-EDTA. Плазму відділили від крові за допомогою центрифугування з параметрами 1500g протягом 10 хвилин і перенесли в стерильні кріопробірки для зберігання за –80 °С до проведення ІФА, як описано у прикладі 4.

Дані на фіг. 8 показують високу стабільність ADC, створеного за допомогою технології SMAC. Протягом усього періоду експерименту концентрації ADC лише набагато нижчі, ніж для загального IgG, що означає, що лінкер між лікарським засобом та антитілом стабільний *in vivo*. При встановленні часових точок між 3 та 21 днями для однофазної експоненціальної функції спаду, обмеженої досягненням кінцевої концентрації 0, значення напіврозпаду *in vivo* повільної фази спостерігалось на 8,3 та 7,8 день для загального IgG та ADC відповідно.

Приклад 5. Опис та характеристика лінії клонів EMT-6, які експресують HER-2

Цитотоксичність ADC до HER-2 досліджували за допомогою клітинної лінії EMT-6 пухлин молочної залози мишей, розробленої з надмірною експресією HER-2 людини. Клітини EMT-6 культивували як моношари в DMEM (середовище Ігла модифіковане за способом Дульбекко, високе значення

глюкози), доповнене 10 % (об./об.) FCS (ембріональна теляча сироватка), 1 % (об./об.) 10 000 МО/мл пеніцилін-стрептоміцину і 1 % (об./об.) 200 ммоль L-глутаміну.

Клітини EMT-6 були електропоровані з вектором експресії, що кодує ген HER-2 людини, причому маркер стійкості до пуроміцину і популяції клітин, які стабільно експресують HER-2 людини, були вибрані методами, відомими фахівцям в даній галузі.

Експресію HER-2 підтвердили проточною цитометрією. Після трипсинізації 10^6 клітин центрифугували в пробірках FACS; отримані гранули ресуспендували в PBS (фосфатно-буферний фізіологічний розчин), доповненого 2% FCS. Потім клітини інкубували з антитілом трастузумаба до HER-2 (30 хв, 4 °C), після чого проводили центрифугування та промивання (3мл PBS з 2% FCS). Згодом клітини ресуспендували, як раніше, та інкубували з антитілом PE (Ebioscience) до людського IgG (Fc-гамма-специфічний) в темряві (30 хв, 4 °C) перед промиванням (4 мл PBS з 2 % FCS). Далі провели проточну цитометрію на FACS Calibur (BD).

Клітини EMT-6, трансфіковані HER-2, були розділені на поодинокі клітини за допомогою проточної цитометрії, використовуючи FACS ARIA II, щоб виділити окремі клони клітин. Експресія HER-2 перевірялася за допомогою проточної цитометрії.

На фіг. 9 показані дані аналізу FACS для клона, вибраного з досліджень *in vivo* (приклад 6).

Приклад 6. Ефективність *in vivo* кон'югованого сортазою трастузумаб-PNU-EDA-Gly₅ в ортотопічній моделі раку молочної залози

Ефективність *in vivo* трастузумаб-PNU-EDA-Gly₅ оцінювалася в імунокомпетентній ортотопічній моделі HER-2-позитивного раку молочної залози миші. Для цього 10^6 клітин EMT6 раку молочної залози, які експресують HER-2 людини (Приклад 6), раніше визначені як придатні для росту *in vivo*, імплантували в жирову тканину правої молочної залози самиці миші Balb/c. Додатково контрольним тваринам імплантували HER-2-негативні клітини EMT6. Надалі первинні розміри пухлини вимірюють за допомогою визначення діаметру. Після 13 днів, коли було досягнуто середнього об'єму пухлини 100-150 мм³, тварини з пухлинами були розділені на групи по 6 тварин відповідно до розміру пухлини. Тварин почали лікувати в той самий день (13-й день, коли відбувалось розділення на групи) та 7 днів пізніше (20-й день) за допомогою внутрішньовенної ін'єкції згаданого кон'югату антитіла з лікарським засобом Kadcyла® (15 мг/кг), трастузумаб-PNU-EDA-Gly₅ (1 мг/кг) або контрольним розчином. Розмір пухлин визначався за допомогою вимірювання діаметру, і тварини з об'ємом пухлин 1000-1500 мм³ були знищені (фіг. 10).

Пухлини в мишей з контрольним розчином виростали швидко і досягали об'єму приблизно 1000 мм³ протягом 30 днів після трансплантації клітин (фіг. 10 A). Лікування за допомогою Kadcyла® мало малий ефект на ріст пухлин у більшості тварин. Тільки в одній тварині з шести спостерігалось значне зменшення росту пухлини (фіг. 10 C). Для демонстрації контрасту — у всіх тварин, що отримували трастузумаб-PNU-EDA-Gly₅, пухлини постійно регресували під час лікування і практично не виявлялися на 30-й день після трансплантації клітин (фіг. 10 D). У більшості тварин на 60-й день не було виявлено пухлин, і тільки в одній тварині приблизно на 40-й день спостерігався рецидив пухлини. Важливо, що протипухлинна активність трастузумаб-PNU-EDA-Gly₅ була високоспецифічною, і лікування мишей, що мали HER-2-негативні пухлини, не призвело до регресії пухлини (фіг. 10 B). Дані показують, що кон'югат трастузумаб EDA-Gly₅-PNU, отриманий за допомогою опосередкованого сортазою сайт-специфічного зв'язування, є ADC зі значно більшою активністю стосовно знешкодження пухлинних клітин *in vivo*, ніж порівняльний кон'югат антитіла з лікарським засобом Kadcyла®.

Умовні позначення фігур

Фіг. 1. Схематичне зображення сайт-специфічної опосередкованої сортазою кон'югації антитіла (технологія SMAC). Моноклональні антитіла повинні бути одержані з С-кінцевими сортазними мітками LPXTG. Токсичне навантаження повинно містити відрізок олігопептиду гліцину (Gly_n-відрізок) з певною кількістю залишків гліцину в ряду ($n \geq 1$ і ≤ 21 , переважно $n \geq 3$ і ≤ 10 , переважно $n = 3$ або $n = 5$, переважніше $n = 5$). Фермент сортази A *Staphylococcus aureus* специфічно розпізнає мотив пентапептиду LPXTG і каталізує реакцію транспептидації відрізка олігопептиду гліцину з пептидним зв'язком LPXTG треонін-гліцин пептиду, тим самим, створюючи новий стабільний пептидний зв'язок між треоніном та N-кінцем гліцину відрізка олігогліцину.

Фіг. 2. Структура PNU-159682, як описано в попередньому рівні техніки (наприклад, WO2009099741 або Quintieri et al. (2005)), використовуючи офіційну систему нумерації антрациклінів для реакційоздатного вуглецю тетрацикліної структури аглікону.

Фіг. 3. (A) Структура PNU-похідна-EDA-Gly₅, яка в цьому документі називається "PNU-EDA-Gly₅", використовується для приєднання за технологією SMAC до С-кінця сортазної мітки LPETG моноклонального антитіла, використовуючи фермент сортази, як описано в прикладах, наведених в документі. (B) Схема синтезу антрациклінової похідної PNU-EDA-Gly₅.

Фіг. 4. Дозозалежний ефект цитотоксичності зазначених ADC на клітинну лінію Karpas-299 Негоджкінської лімфоми, яка експресує високий рівень CD30 на поверхні клітин (A), і на клітинну лінію L428 лімфоми Годжкіна, клітини якої експресують дуже низькі рівні CD30 на поверхні клітини (B). Адцетріс відноситься до комерційно доступного кон'югату антитіла з лікарським засобом стосовно CD30, брентуксимаб ведотину. Кадцила відноситься до комерційно доступного кон'югату T-DM1 (трастузумаб емтанзин) відносно HER-2/neu. Обидві клітинні лінії є негативними стосовно HER-2/neu, тому кадцила діє як негативний контроль для ADC, який не повинен спричинювати знешкодження клітин мішень-специфічним способом. Клітини інкубували з серійними розведеннями ADC протягом 4-х днів, після чого додавали люмінесцентний розчин CellTiter-Glo® (Promega) і обчислювали життєздатні клітини за допомогою люмінесценції на Tecan Infinity F200.

Фіг. 5. Дозозалежний ефект цитотоксичності зазначених ADC на клітинну лінію SKBR3 раку молочної залози, клітини якої експресують високий рівень HER-2/neu (A), і на клітинну лінію T47D раку молочної залози, клітини якої експресують дуже низькі рівні HER-2/neu (B). Клітини інкубували з серійними розведеннями ADC протягом 4-х днів, після чого додавали люмінесцентний розчин CellTiter-Glo® (Promega) і обчислювали життєздатні клітини за допомогою люмінесценції на Tecan Infinity F200.

Фіг. 6. Додаткові похідні антрацикліну, пов'язані з PNU-159682, корисні для сайт-специфічної кон'югації зв'язуючих білків, мічених LPXTG, або антитіл за технологією SMAC для отримання BPDC або ADC. Відображені лише переважні варіанти з Gly5-відрізком. Фіг. 6 A зображає похідну, у якій амінокислотний відрізок Gly5 безпосередньо зв'язаний через С-кінець до кільця А тетрациклінової структури аглікона PNU-похідної. Фіг. 6 B зображає похідну, у якій переважний етиленамінний лінкер та амінокислотний відрізок Gly5 безпосередньо приєднаний до кільця А тетрациклінової структури аглікона PNU-похідної.

Фіг. 7. Вимірювання концентрації *in vitro* кон'югату брентуксимаб-PNU-EDA-Gly₅ (позначеного як "сAc10-PNU ADC") та загального IgG в сироватці миші (A), щура (B), людини (C) через 14 днів. (B) Вимірювання концентрації *in vitro* кон'югату трастузумаб емтасину (Kadcyla®) та загального IgG в сироватці миші (A), щура (B), людини (C) через 14 днів.

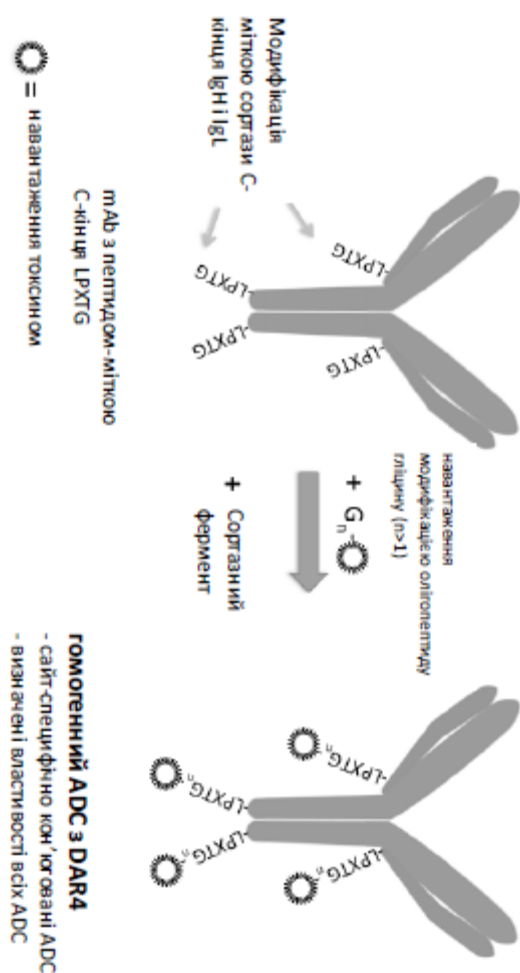
Фіг. 8. Концентрація в плазмі *in vivo* ADC і загального IgG, вимірюваних на 6 контрольних моментах через період в 21 день після миші кон'югату Ac10-Gly5-PNU.

Фіг. 9. Дані FACS аналізу клону HER-2 EMT-6, вибраного для досліджень *in vivo* після інкубації з антитілом трастузумабу до HER-2, а потім інкубацією з антитілом PE до людського IgG, що містить флюорофор (Fc-гамма-специфічний) PE.

Фіг. 10. Оцінювання *in vivo* кон'югату антитіла з лікарським засобом, що є специфічним до HER-2, в імунотопічній ортотопічній моделі HER2-позитивного раку молочної залози миші. EMT6 клітини раку молочної залози миші, що експресують HER-2 (A, C, D) людини або нерелевантний антиген ROR-1, вирощували в жировій тканині молочних залоз мишей Balb/c. На 13-й та 20-й дні тваринам внутрішньовенно вводили контрольний розчин (A), 1 мкг/кг трастузумабу-PNU159682 (B, D) або 15 мкг/кг Кадцила (C). Спостереження за ростом пухлин продовжувалось до знешкодження тварин з етичних причин.

Фіг. 11 A та B. Амінокислотний склад кон'югованих за технологією SMAC С-кінців ланцюгів IgH і IgL похідної трастузумабу (A) та брентуксимабу (B) PNU-токсину в складі кон'югатів антитіла з лікарським засобом, які використовувались для досліджень, причому PNU-похідна, зображена на фіг. 3 B, зв'язана через аміногрупу Gly5-відрізка з 4-ю амінокислотою сортазної мітки (виділена жирним шрифтом) через пептидний зв'язок після кон'югації ферментном сортази.

Dorr et al. (2014) PNAS 111, 13343-8
 Quintieri L et al (2005), Clin Cancer Res. 2005 Feb 15;11(4):1608-17.
 Roguska et al. (1994) PNAS 91, pp969-971
 Perez et al. (2014) Drug Discovery Today 19, pp.869-881
 Alley et al. (2008) Bioconjug. Chem. 19, pp. 759-765
 Panowski et al. (2014) mAbs 6, pp. 34-45
 Wolff AC et al (2013), J Clin Oncol. 2013 Nov 1;31(31):3997-4013
 Young KH (2014) Clinical Advances in Hematology & Oncology, Volume 12, Issue 4, Supplement 10
 Spirig et al. (2011) Mol. Microbiol. 82, 1044-1059
 Ducry & Stump (2010) Bioconjug. Chem. 21,5-13,
 McCombs et al. (2015) The AAPS Journal 17, 339-351
 Mullard (2013) Nature Rev Drug Disc 12, 329-332
 Doktor et al. (2014) Mol Cancer Ther 13, 2618-2629
 Hartley & Hochhauser (2012) Curr. Opin. Pharmacol. 12, 398-402
 Minotti (2004) Pharmacol. Rev 56, 185-229
 Cancer and Chemotherpay - Antineoplastic Agents Vol. III, Stanley T. Crooke and Archie W. Prestayko (eds.), Academic Press 1981).



Фіг. 1

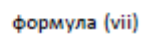


Fig. 2

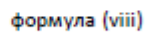
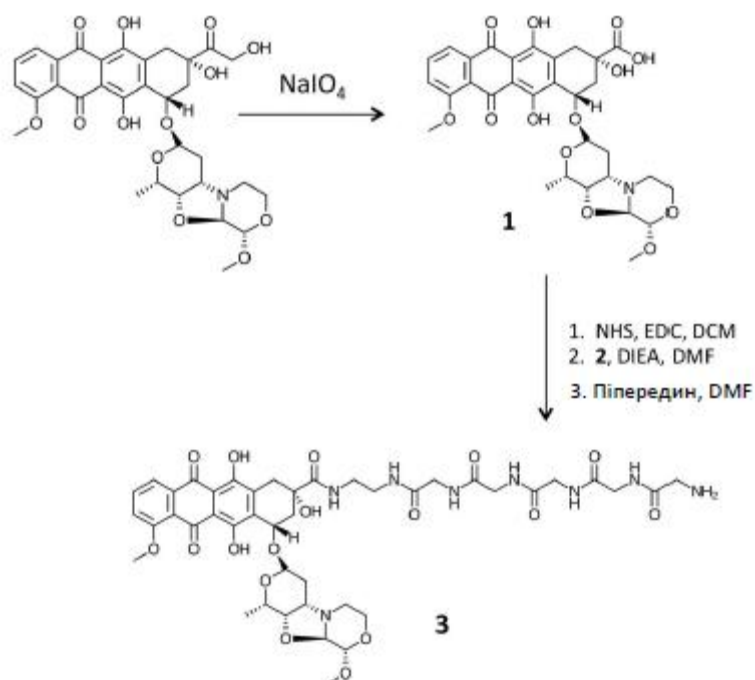
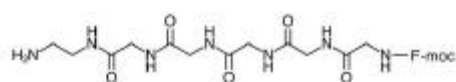


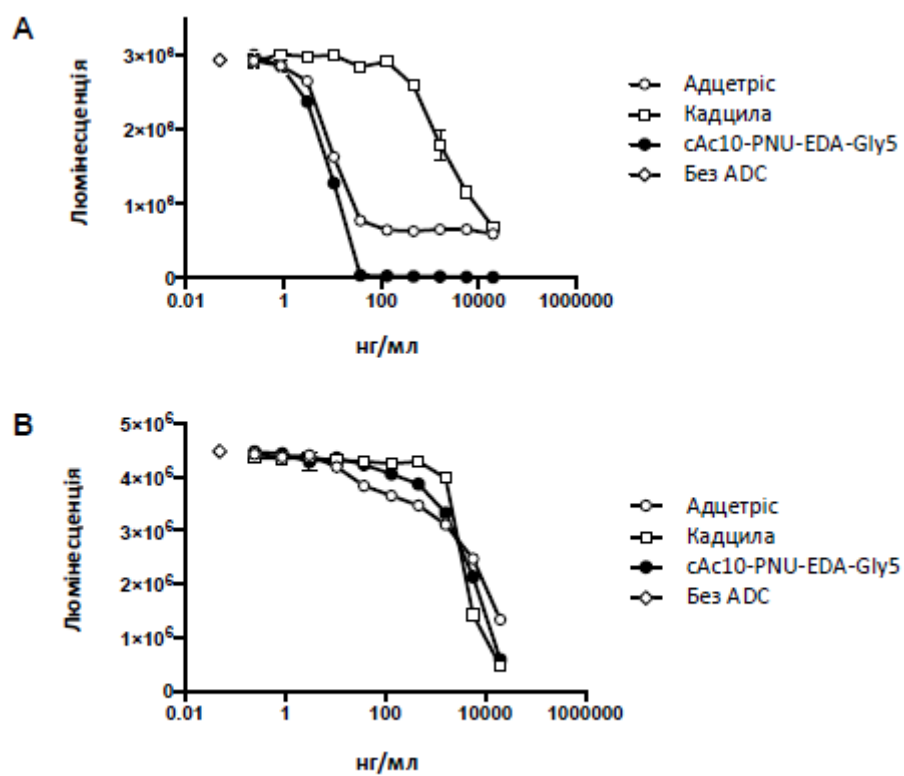
Fig. 3A



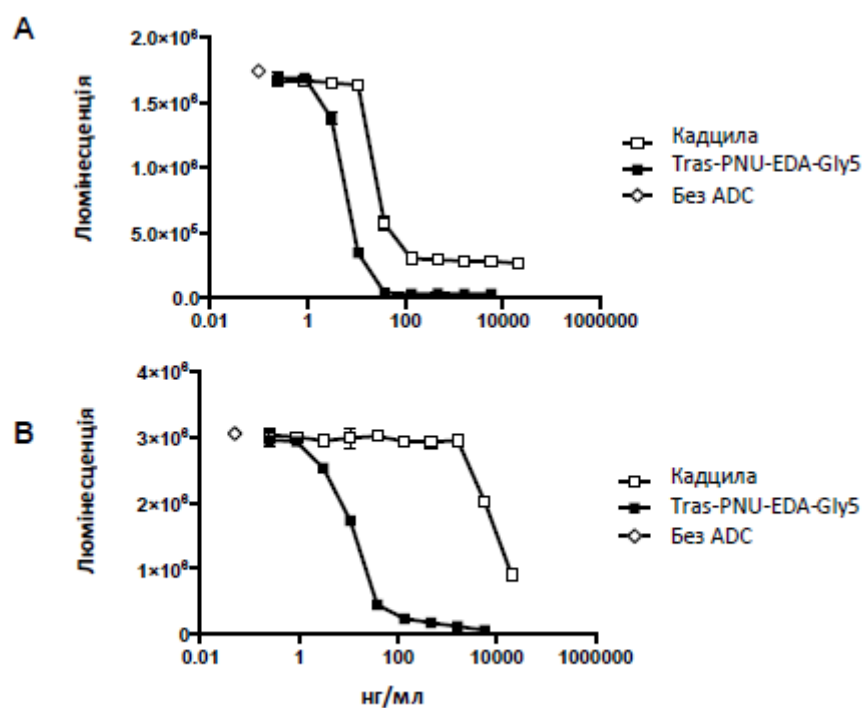
2 відповідає зазначеному нижче



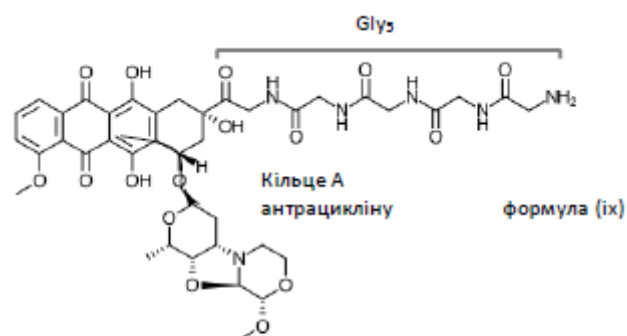
Фіг. 3В



Фіг. 4

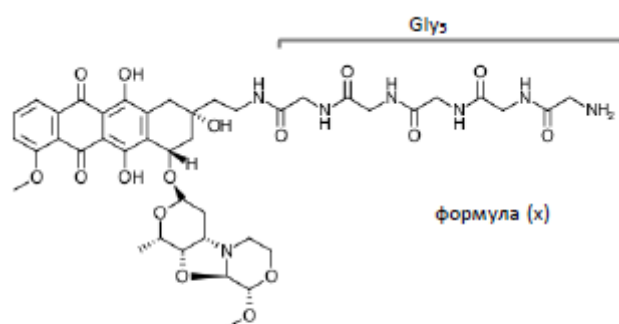


Фіг. 5



PNU-Gly₅

Фіг. 6A



PNU-EA-Gly₅

Фіг. 6B

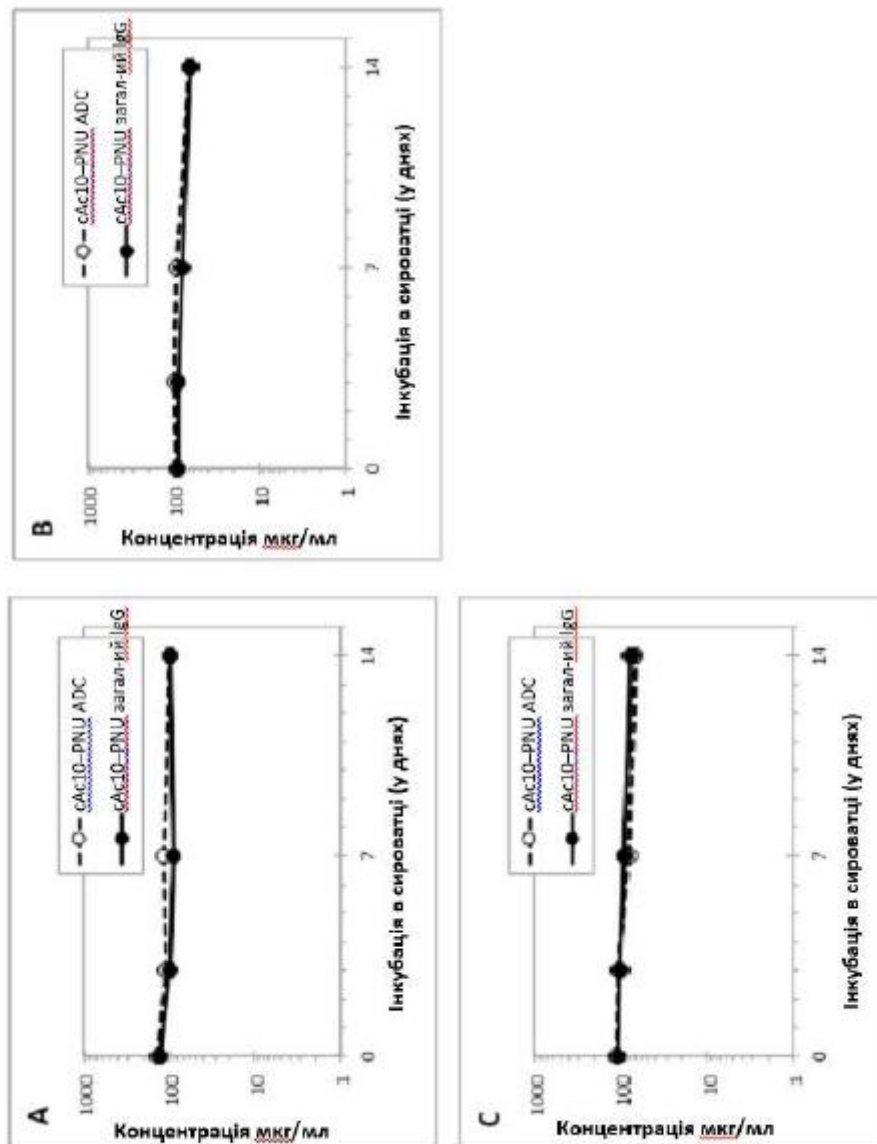
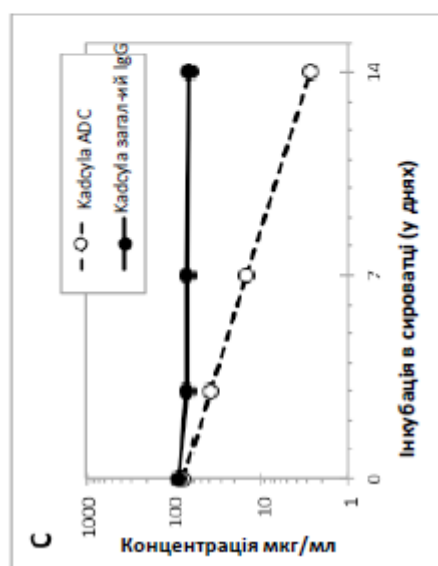
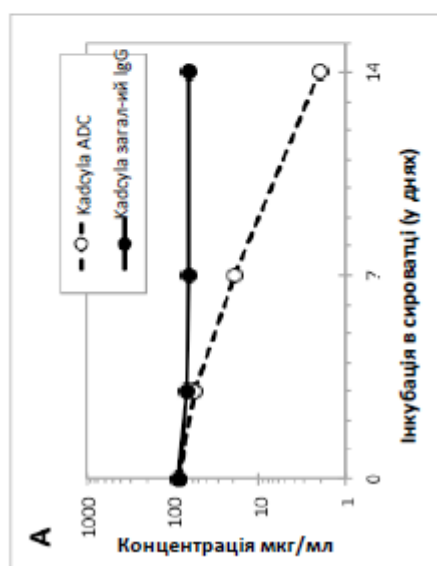
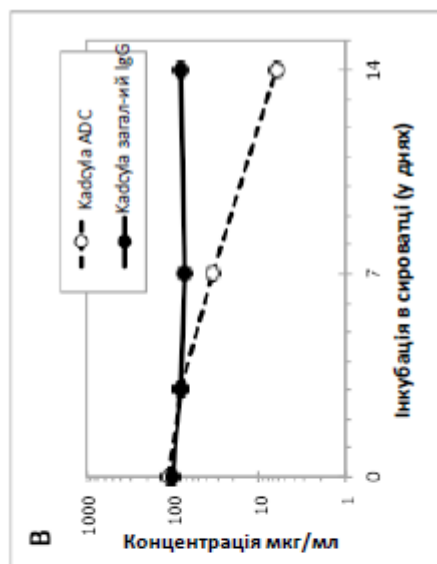
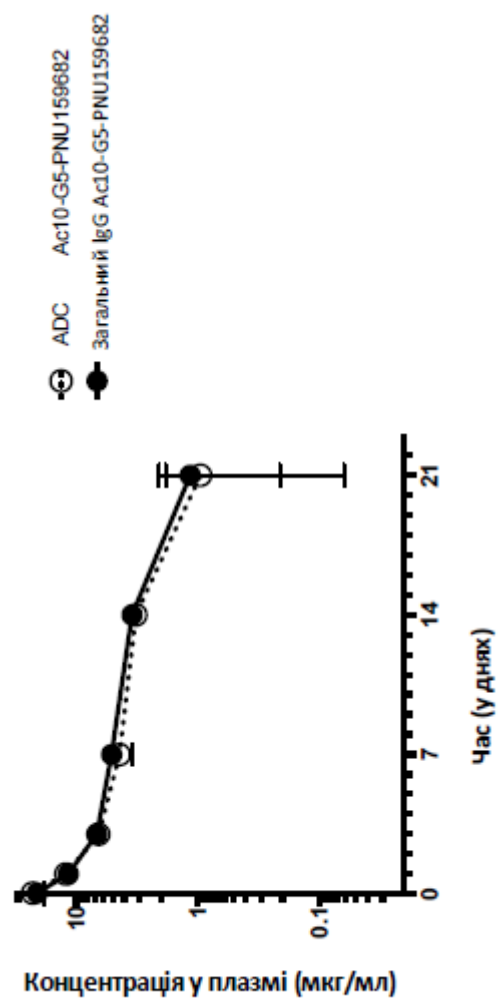


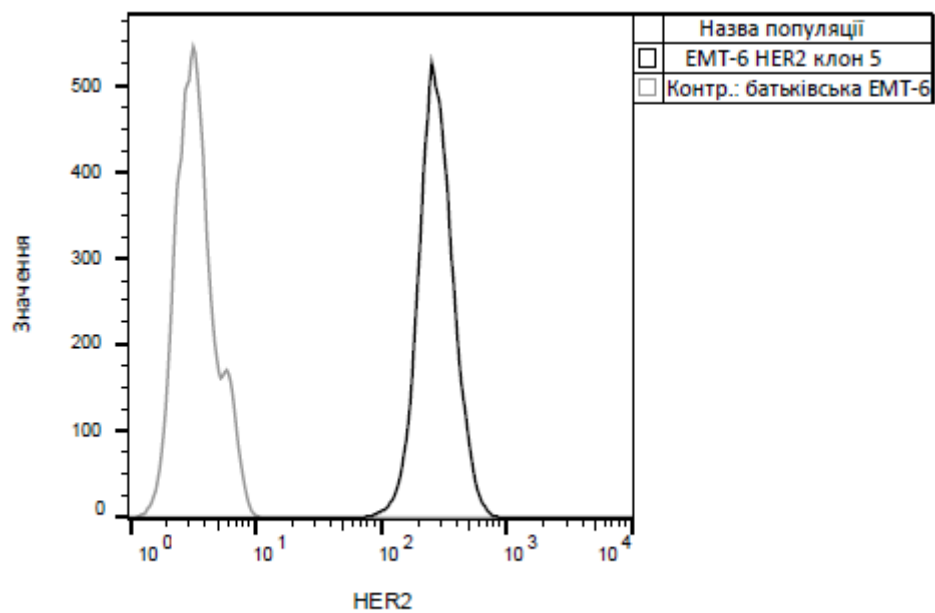
Fig. 7A



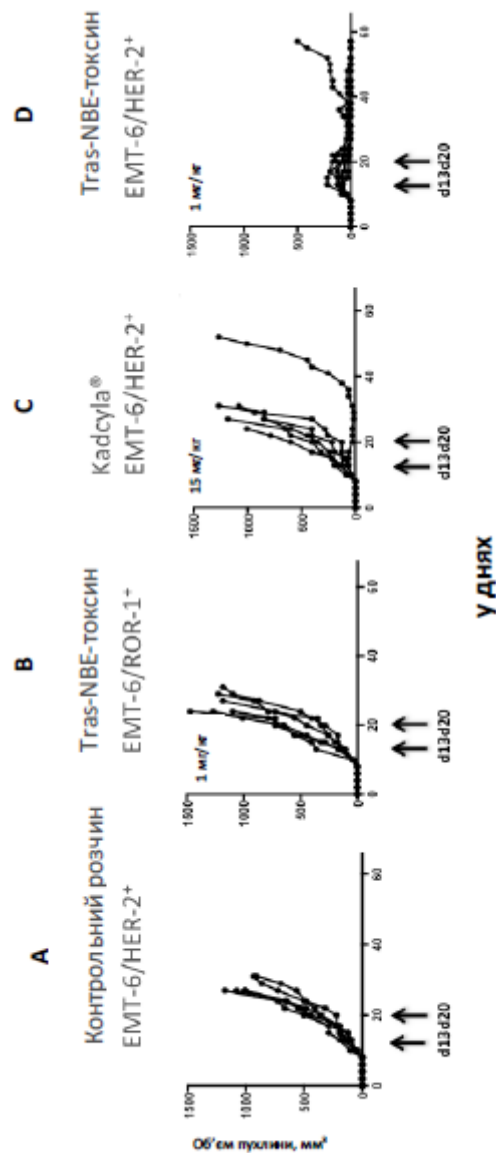
Фіг. 7В



Фіг. 8



Фіг. 9



Фиг. 10

Трастузумаб-HC-LPETGGGGG-PNU-токсин

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFINIKDTYIHVWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV
YYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCTPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKLSLSLSPGKLPETGGGGG-PNU-
toxin

Трастузумаб-LC-GGGGS-LPETGGGGG-PNU-токсин

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHYTTPP
TFGGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSLPETGGGGG-PNU-toxin

Фиг. 11А

Брентуксимаб-НС-LPETGGGGG-PNU-токсин

QIQLLQSGPEVVKPGASVKISCKASGYTFTDYYITWVKQKPGQGLEWIGWIYPGSGNTKYNEKFKGKATLTVDTSSTAFMQLSSLTSED
AVYFCANYGNYWFAYWGQGTQVTVSAASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKLPETG
GGGG-PNU-toxin

Брентуксимаб-LC-GGGGS-LPETGGGGG-PNU-токсин

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDFDGD SYMNWYQKPGQPPKVLIIAASNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYC
QQSNEDPWTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST
LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSLPETGGGGG-PNU-toxin

Фиг. 11В