(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202291177 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.07.20

(22) Дата подачи заявки
2020.10.19

(51) Int. Cl. ***G01N 33/68*** (2006.01)
C12Q 1/37 (2006.01)

(54) САЙТ-СПЕЦИФИЧНЫЙ КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ КОНЪЮГИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

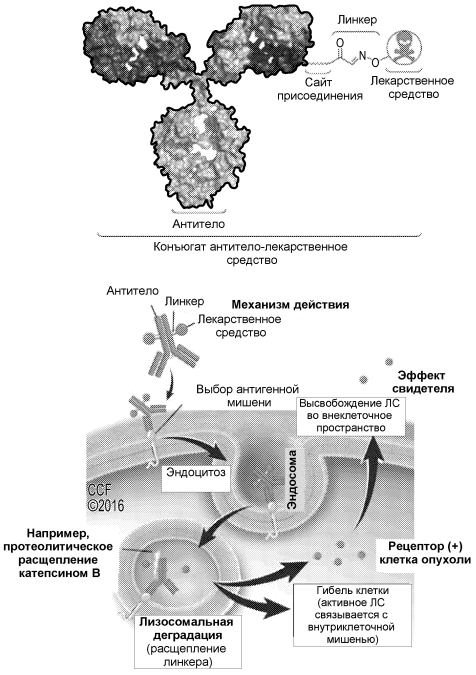
(31) **62/916,876; 63/043,756**
(32) **2019.10.18; 2020.06.24**
(33) **US**
(86) **PCT/US2020/056368**
(87) **WO 2021/077106 2021.04.22**

(71) Заявитель:
РИДЖЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Ян Сянкунь (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Способ сайт-специфичного количественного анализа или определения характеристик конъюгирования лекарственного средства в конъюгатах антитело-лекарственное средство с применением деконъюгирования лекарственного средства с помощью протеазы, мечения линкером и масс-спектрометрии, где указанное конъюгирование включает присоединенный компонент, связанный со специфичным сайтом конъюгирования частично конъюгированного пептида или белка в образце. Указанный способ включает отщепление части присоединенного компонента с получением пептида или белка, содержащего расщепленный линкер, добавление модифицированного линкера к неконъюгированному сайту конъюгирования частично конъюгированного пептида или белка; и последующее проведение масс-спектрометрического анализа образца с целью идентификации пептида или белка, содержащего расщепленный линкер и/или модифицированный линкер.



202291177 A1

202291177 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-574241EA/042

САЙТ-СПЕЦИФИЧНЫЙ КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ КОНЪЮГИРОВАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящая заявка в целом относится к способам сайт-специфичного количественного анализа или определения характеристик конъюгирования лекарственного средства в конъюгатах антитело-лекарственное средство с применением деконъюгирования лекарственного средства, выполняемого с помощью протеазы, и масс-спектрометрии.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Конъюгат антитело-лекарственное средство (antibody-drug conjugate, ADC) содержит антитело, связанное с биологически активными лекарственными средствами, например, лекарственным средством, представляющим собой полезную нагрузку (payload), линкерами. Разработка ADC является стратегией улучшения эффективности лекарственных средств, поскольку антитела способны связываться со специфичными сайтами клеток-мишеней, обеспечивая возможность эффективной доставки биологически активных лекарственных средств к клеткам-мишеням. Значительные улучшения были достигнуты при применении ADC для доставки химиотерапевтических лекарственных средств к раковым клеткам-мишеням.

Вследствие поливалентных свойств антител и неспецифичных электрофильных реакций между аминокислотами и линкерными молекулами получение ADC может представлять сложность. Общий профиль распределения ADC содержит смесь ADC, неконъюгированных антител и неконъюгированных лекарственных средств, представляющих собой полезную нагрузку. Количество лекарственных средств, которые могут быть доставлены к клеткам-мишеням, будет уменьшаться в присутствии неконъюгированных антител, поскольку неконъюгированные антитела конкурируют с антителами, конъюгированными с лекарственным средством, за антигены-мишени. Как правило, полученные ADC представляют собой весьма гетерогенные соединения, содержащие различные варианты ADC с переменным значением отношения лекарственного средства к антителу (drug-to-antibody ratio, DAR) и различными сайтами конъюгирования, включая конъюгированные сайты конъюгирования и неконъюгированные сайты конъюгирования. Гетерогенность ADC может оказывать значительное влияние на безопасность и эффективность лекарственных средств вследствие присутствия нежелательных вариантов ADC. Подходящие составы ADC должны иметь четко определенные значения DAR и степень гомогенности. Количественный анализ и определение характеристик сайт-специфичного конъюгирования лекарственных средств в ADC с переменным значением DAR, такие как сайт-специфичный количественный анализ конъюгирования лекарственных средств, являются крайне важными процессами для обеспечения контроля показателей качества

составов ADC, которые могут непосредственно влиять на эффективность ADC.

Для определения характеристик смесей ADC применяли масс-спектроскопию (МС), жидкостную хроматографию с масс-спектроскопией (ЖХ-МС) и капиллярное изоэлектрическое фокусирование с визуализационным контролем (iCIEF) (Wagh et al., mAbs, 10:2, 222-243, 2018, Challenges and new frontiers in analytical characterization of antibody-drug conjugates). Однако вследствие сложной гетерогенности ADC имеются существенные затруднения при сайт-специфичном количественном анализе конъюгирования лекарственных средств для определения характеристик ADC.

Следует понимать, что существует потребность в способах определения характеристик ADC для обеспечения четко определенных значений DAR и степени гомогенности, имеющих значение для безопасности и эффективности лекарственных средств, в частности, в способах сайт-специфичного количественного анализа и/или определения характеристик конъюгирования лекарственных средств в ADC.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

В настоящей заявке предложен способ сайт-специфичного количественного анализа и/или определения характеристик конъюгирования лекарственных средств в конъюгатах антитело-лекарственное средство, где конъюгирование включает присоединенный компонент, связанный со специфичным сайтом конъюгирования частично конъюгированного пептида или белка в образце. Могут существовать проблемы, касающиеся обеспечивающих связывание химических процессов, применяемых для конъюгирования антитела-лекарственного средства, вследствие значительной вариабельности значений DAR и слабой доступности контроля за положением присоединенного компонента в молекуле антитела. Полученный ADC может представлять собой высокогетерогенную смесь, содержащую различные варианты ADC. Сохраняются трудности, связанные с количественным анализом сайт-специфичного конъюгирования лекарственного средства в различных сайтах, а также подходящие составы ADC должны иметь четко определенные значения DAR и степень гомогенности.

В настоящем описании предложен способ количественного анализа или определения характеристик конъюгирования по меньшей мере одного присоединенного компонента, связанного по меньшей мере с одним специфичным сайтом конъюгирования частично конъюгированного пептида или белка в образце, включающий: отщепление части присоединенного компонента с получением пептида или белка, содержащего расщепленный линкер, где указанный присоединенный компонент содержит расщепленный линкер; добавление модифицированного линкера к неконъюгированному сайту конъюгирования частично конъюгированного пептида или белка; и проведение масс-спектрометрического анализа образца с целью идентификации пептида или белка, содержащего расщепленный линкер и/или модифицированный линкер. В некоторых аспектах часть присоединенного компонента отщепляют с помощью папаина, катепсина B или плазмина.

В некоторых аспектах в способе согласно настоящей заявке указанный по меньшей

мере один присоединенный компонент содержит линкер и полезную нагрузку, при этом отщепленная часть присоединенного компонента содержит полезную нагрузку, а линкер содержит расщепленный линкер. В некоторых аспектах способ согласно настоящей заявке дополнительно включает количественный анализ или определение характеристик сайт-специфичного конъюгирования присоединенного компонента на основании результатов количественного анализа расщепленного линкера и модифицированного линкера. В некоторых аспектах в способе согласно настоящей заявке масс-спектрометрический анализ проводят с помощью масс-спектрометра, масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометра с ионизацией наноэлектрораспылением, трехквадрупольного масс-спектрометра, где указанный масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии, при этом масс-спектрометр обеспечивает возможность проведения анализа методами ЖХ-МС (жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией), ЖХ-ММР-МС (жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией в режиме мониторинга множественных реакций) или ЖХ-МС/МС.

В некоторых аспектах способ согласно настоящей заявке дополнительно включает обработку пептида или белка ферментом с последующим отщеплением части присоединенного компонента и/или добавлением модифицированного линкера к неконъюгированному сайту конъюгирования. В некоторых аспектах способ согласно настоящей заявке дополнительно включает обработку образца ферментом с последующим проведением масс-спектрометрического анализа указанного образца. В некоторых аспектах часть присоединенного компонента отщепляют с помощью фермента, протеазы, химического вещества, кислоты, основания или восстанавливающего агента. В некоторых аспектах выполняют этап добавления модифицированного линкера к неконъюгированному сайту конъюгирования, после чего проводят этап отщепления части присоединенного компонента. В некоторых аспектах выполняют этап отщепления части присоединенного компонента, после чего проводят этап добавления модифицированного линкера и этап выполнения масс-спектрометрического анализа образца. В некоторых аспектах молекулярная масса модифицированного линкера отличается от молекулярной массы расщепленного линкера.

В других аспектах способ согласно настоящей заявке дополнительно включает обработку пептида или белка ферментом с последующим отщеплением части присоединенного компонента и/или добавлением модифицированного линкера к неконъюгированному сайту конъюгирования, при этом указанный фермент представляет собой трипсин. В некоторых аспектах способ согласно настоящей заявке дополнительно включает обработку образца ферментом с последующим проведением масс-спектрометрического анализа указанного образца, при этом указанный фермент представляет собой Glu-C. В некоторых аспектах специфичный сайт конъюгирования или неконъюгированный сайт конъюгирования расположен внутри остатка цистеина пептида или белка. В некоторых аспектах присоединенный компонент соединен по меньшей мере с одним специфичным сайтом конъюгирования через малеимидную присоединяющую

группу. В некоторых аспектах пептид или белок представляет собой антитело, фрагмент антитела, Fab-фрагмент антитела, Fc-фрагмент антитела или гибридный белок.

В некоторых аспектах линкер представляет собой кислотно-лабильный линкер, расщепляемый протеазой линкер, дисульфид-содержащий линкер, линкер на основе сложного диэфира пирофосфорной кислоты или гидразоновый линкер. В некоторых аспектах линкер содержит пептид, включая валин-аланин, фенилаланин-лизин, валин-цитруллин или их производные. В некоторых аспектах линкер дополнительно содержит полиэтиленгликоль, пара-аминобензилоксикарбонил (PABC) или пара-аминобензиловый спирт (PABA).

В других аспектах модифицированный линкер содержит полиэтиленгликоль. В некоторых аспектах модифицированный линкер добавляют к неконъюгированному сайту конъюгирования через малеимидную присоединяющую группу.

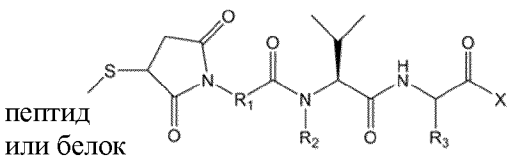
В других аспектах полезная нагрузка представляет собой лекарственное средство, соединение, токсин, цитотоксический агент, антимитотический агент, ингибитор микротрубочек, повреждающий ДНК агент, ингибитор топоизомеразы, ингибитор РНК-полимеразы, аналог аманитинов, аналог тубулизина, химиотерапевтическое лекарственное средство, ингибитор полимеризации микротрубочек или промотор полимеризации микротрубочек.

В некоторых аспектах частично конъюгированный пептид или белок выбран из группы, состоящей из конъюгированного пептида или белка формулы I:

,

где R представляет собой линкер, и X представляет собой полезную нагрузку. В некоторых аспектах линкер содержит полиэтиленгликоль, и полезная нагрузка представляет собой лекарственное средство, соединение, токсин, цитотоксический агент, антимитотический агент, ингибитор микротрубочек, повреждающий ДНК агент, ингибитор топоизомеразы, ингибитор РНК-полимеразы, аналог аманитинов, аналог тубулизина, химиотерапевтическое лекарственное средство, ингибитор полимеризации микротрубочек или промотор полимеризации микротрубочек.

В некоторых аспектах частично конъюгированный пептид или белок выбран из группы, состоящей из конъюгированного пептида или белка формулы II:

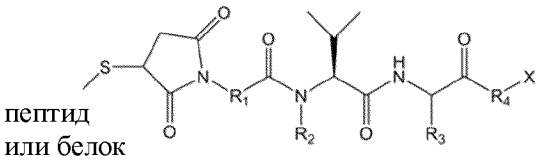


,

где R_1 представляет собой спейсер, при этом R_2 представляет собой -H или $-CH_3$,

при этом R_3 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3NHC(O)NH_2$, при этом X представляет собой полезную нагрузку. В некоторых аспектах спейсер содержит полиэтиленгликоль, и полезная нагрузка представляет собой лекарственное средство, соединение, токсин, цитотоксический агент, антимитотический агент, ингибитор микротрубочек, повреждающий ДНК агент, ингибитор топоизомеразы, ингибитор РНК-полимеразы, аналог аманитинов, аналог тубулизина, химиотерапевтическое лекарственное средство, ингибитор полимеризации микротрубочек или промотор полимеризации микротрубочек.

В других аспектах частично конъюгированный пептид или белок выбран из группы, состоящей из конъюгированного пептида или белка формулы III:



,

где R_1 представляет собой первый спейсер, при этом R_2 представляет собой -H или $-CH_3$, при этом R_3 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3NHC(O)NH_2$, при этом R_4 представляет собой второй спейсер, при этом X представляет собой полезную нагрузку. В некоторых аспектах первый спейсер содержит полиэтиленгликоль, второй спейсер содержит пара-аминобензилоксикарбонил (PABC) или пара-аминобензиловый спирт (PABA), и полезная нагрузка представляет собой лекарственное средство, соединение, токсин, цитотоксический агент, антимитотический агент, ингибитор микротрубочек, повреждающий ДНК агент, ингибитор топоизомеразы, ингибитор РНК-полимеразы, аналог аманитинов, аналог тубулизина, химиотерапевтическое лекарственное средство, ингибитор полимеризации микротрубочек или промотор полимеризации микротрубочек.

В настоящем описании, по меньшей мере частично, предложен способ количественного анализа или определения характеристик конъюгирования по меньшей мере одного присоединенного компонента, связанного по меньшей мере с одним специфичным сайтом конъюгирования частично конъюгированного белка в образце. В некоторых вариантах реализации способ согласно настоящей заявке включает отщепление части присоединенного компонента с помощью первого фермента с получением белка, содержащего расщепленный линкер, где указанный по меньшей мере один присоединенный компонент содержит расщепленный линкер; последующее воздействие на образец второго фермента с получением смеси пептидов; и проведение масс-спектрометрического анализа полученной смеси пептидов с целью количественного анализа или определения характеристик по меньшей мере одного специфичного сайта конъюгирования присоединенного компонента на основании результатов количественного анализа пептида, содержащего расщепленный линкер, и/или пептида, не содержащего расщепленный линкер. В одном из аспектов указанный по меньшей мере один специфичный сайт конъюгирования расположен внутри остатка лизина белка.

В одном из аспектов указанный по меньшей мере один присоединенный компонент

содержит линкер и полезную нагрузку, при этом отщепленная часть указанного по меньшей мере одного присоединенного компонента содержит полезную нагрузку, а линкер содержит расщепленный линкер. В одном из аспектов масс-спектрометрический анализ проводят с помощью масс-спектрометра, масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометра с ионизацией наноэлектрораспылением, трехквадрупольного масс-спектрометра, где указанный масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии и где указанный масс-спектрометр обеспечивает возможность проведения анализа методами ЖХ-МС (жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией), ЖХ-ММР-МС (жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией в режиме мониторинга множественных реакций) или ЖХ-МС/МС. В одном из аспектов способ согласно настоящей заявке дополнительно включает обработку смеси пептидов третьим ферментом с последующим проведением масс-спектрометрического анализа указанной смеси пептидов. В одном из аспектов первый фермент представляет собой папаин, катепсин В или плазмин; и/или при этом второй фермент представляет собой Glu-C или трипсин. В одном из аспектов третий фермент представляет собой Asp-N или Glu-C.

В одном из аспектов белок представляет собой антитело, фрагмент антитела, Fab-фрагмент антитела, Fc-фрагмент антитела или гибридный белок. В одном из аспектов линкер содержит валин-аланин, фенилаланин-лизин, валин-цитруллин или их производные. В одном из аспектов полезная нагрузка представляет собой лекарственное средство, соединение, токсин, цитотоксический агент, антимитотический агент, ингибитор микротрубочек, повреждающий ДНК агент, ингибитор топоизомеразы, ингибитор РНК-полимеразы, аналог аманитинов, аналог тубулизина, химиотерапевтическое лекарственное средство, ингибитор полимеризации микротрубочек или промотор полимеризации микротрубочек.

Эти и другие аспекты настоящего изобретения будут в большей степени разъяснены и понятны при рассмотрении совместно со следующим описанием и прилагаемыми чертежами. Несмотря на то, что в следующем описании указаны различные варианты реализации и их многочисленные конкретные элементы, оно приведено в качестве иллюстрации, а не в целях ограничения. Многочисленные замены, модификации, добавления или перестановки могут быть выполнены в пределах объема настоящего изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На ФИГ. 1 представлен конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), где лекарственное средство конъюгировано с антителом посредством линкера. Представляющий собой антитело компонент ADC связывается с опухолевым антигеном клетки-мишени, после чего комплекс ADC-антиген подвергается опосредованному рецепторами эндоцитозу. Лекарственные компоненты ADC могут высвобождаться вследствие лизосомальной деградации ADC или расщепления линкеров.

На ФИГ. 2 представлены структурные формулы Милотарга (Mylotarg®), Адцетриса

(Adcetris®) и Кадсилы (Kadcyla®).

На ФИГ. 3 представлено присоединение цистеина путем конъюгирования линкера с антителом посредством алкилирования с применением малеимида.

На ФИГ. 4 представлено деконъюгирование, относящееся к тиол-малеимидному конъюгированию, в случае ADC, конъюгированных по остаткам цистеина, посредством реакции тиолового обмена или обратной реакции.

На ФИГ. 5A представлены структурные формулы ADC в соответствии с некоторыми аспектами. Каждый ADC содержит антитело и полезную нагрузку, соединенные линкером, где линкер присоединен к сульфгидрильной группе остатка цистеина пептида или белка с помощью малеимидной присоединяющей группы в соответствии с некоторыми аспектами.

На ФИГ. 5B представлены структурные формулы ADC в соответствии с некоторыми аспектами. Каждый ADC содержит антитело и полезную нагрузку, соединенные линкером, где линкер присоединен к остатку лизина пептида или белка посредством лизин-амидного сочетания с применением активированного сложного эфира карбоновой кислоты или сложного эфира N-гидроксисукцинимида (NHS) в соответствии с некоторыми аспектами.

На ФИГ. 6A представлен типовой способ согласно настоящей заявке, включающий расщепление ADC трипсином, расщепление смеси триптических пептидов папаином с удалением полезной нагрузки; конъюгирование модифицированных линкеров с неконъюгированными сульфгидрильными группами (например, мечение); расщепление смеси пептидов с помощью Glu-C; и проведение анализа смеси пептидов методом ЖХ-МС согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 6B представлен типовой способ согласно настоящей заявке, включающий расщепление ADC трипсином, конъюгирование модифицированных линкеров с неконъюгированными сульфгидрильными группами (например, мечение); расщепление смеси пептидов папаином с удалением полезной нагрузки; расщепление смеси пептидов с помощью Glu-C; и проведение анализа смеси пептидов методом ЖХ-МС согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 6C представлен типовой способ согласно настоящей заявке, включающий расщепление образцов ADC папаином с удалением полезной нагрузки с последующим восстановлением и денатурацией, последующее расщепление образцов ADC трипсином с получением смеси триптических пептидов, расщепление смеси триптических пептидов с помощью Glu-C; конъюгирование модифицированных линкеров с неконъюгированными сульфгидрильными группами (например, мечение), и последующее проведение анализа смеси пептидов методом ЖХ-МС согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 7 представлен типовой способ согласно настоящей заявке, включающий расщепление образцов ADC папаином с удалением полезной нагрузки с последующим восстановлением и денатурацией, последующее алкилирование, последующее расщепление образцов ADC с помощью Glu-C с получением смеси пептидов,

образовавшихся под действием Glu-C, расщепление полученной смеси пептидов с помощью Asp-N, и последующее проведение анализа смеси пептидов методом ЖХ-МС согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 8A представлены присоединяемые компоненты линкера, например, линкера LK1, для соединения белка и полезной нагрузки через малеимидную присоединяющую группу согласно типовому варианту реализации. Малеимидную присоединяющую группу присоединяют к сульфгидрильной группе (-SH) пептида или белка. Присоединяемые компоненты линкера LK1 (mal-amido-PEG8-VA-PABA) включают ПЭГ8 (полиэтиленгликоль-8), дипептид валин-аланин (дипептид VA) и PABA. SG3199 представляет собой полезную нагрузку - лекарственное средство.

На ФИГ. 8B представлены присоединяемые компоненты расщепленного линкера (mal-amido-PEG8-VA), например, присоединяемые компоненты расщепленного LK1, который образуется после расщепления LK1 протеазой с высвобождением полезной нагрузки путем удаления PABA и полезной нагрузки - лекарственного средства согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 8C представлены присоединяемые компоненты модифицированного линкера LK1 (mal-amido-PEG8-COOH), например, присоединяемые компоненты LK2, согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 8D представлены присоединяемые компоненты линкера, например, линкера LK3, для соединения белка и нагрузки через малеимидную присоединяющую группу согласно типовому варианту реализации. Малеимидную присоединяющую группу присоединяют к сульфгидрильной группе (-SH) пептида или белка. Присоединяемые компоненты линкера LK3 (mal-amido-Val-Cit-PABA) включают дипептид валин-цитруллин (дипептид VCit) и PABA. Майтанзиноид представляет собой полезную нагрузку - лекарственное средство.

На ФИГ. 8E представлены присоединяемые компоненты расщепленного линкера (mal-amido-Val-Cit), например, присоединяемые компоненты расщепленного LK3, который образуется после расщепления LK3 протеазой с высвобождением полезной нагрузки путем удаления PABA и полезной нагрузки - лекарственного средства согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 8F представлены присоединяемые компоненты модифицированного линкера LK3 (mal-amido-Val-Cit), например, присоединяемые компоненты LK4, согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 8G представлены присоединяемые компоненты линкера LK5, например, adip-Val-Cit-PAB-NMe, включающие дипептид валин-цитруллин в качестве сайта ферментативного расщепления, для соединения белка и полезной нагрузки согласно типовому варианту реализации. Майтанзиноид (May), цитотоксическое соединение, представляет собой лекарственное средство - полезную нагрузку, которой нагружают LK5 согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 8H представлены присоединяемые компоненты расщепленного LK5,

например, adip-Val-Cit, который образуется после расщепления LK5 протеазой с высвобождением полезной нагрузки согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 8I представлена структурная формула неконъюгированного остатка лизина антитела согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 9A представлены межцепочечные дисульфидные связи антитела, которые были восстановлены с получением сульфгидрильных групп (-SH). Затем полученные сульфгидрильные группы применяли в качестве сайтов конъюгирования для получения ADC согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 9B представлен ADC, содержащий линкер LK1 и полезную нагрузку - лекарственное средство SG3199. ADC, например, Ab-mal-amido-PEG8-VA-PABA-SG3199, имеет сайт расщепления для высвобождения полезной нагрузки - лекарственного средства согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 9C представлен ADC, содержащий линкер LK3 и полезную нагрузку - лекарственное средство майтанзиноид. ADC, например, Ab-mal-amido-Val-Cit-PABA-майтанзиноид, имеет сайт расщепления для высвобождения полезной нагрузки - лекарственного средства согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 10 представлено определение отношения лекарственное средство-антитело ADC MAB1-LK1 с применением анализа массы интактного вещества согласно типовому варианту реализации. (ось X: интенсивность/[количество]; ось Y: наблюдаемая масса [m/z] от 1,45e5 до 1,58e5).

На ФИГ. 11 представлено удаление лекарственных веществ - нагрузок из ADC MAB1-LK1 с применением папаина согласно типовому варианту реализации. ADC MAB1-LK1 расщепляли трипсином с получением смеси триптических пептидов. Два триптических пептида, например, SCDK (серин-цистеин-аспарагиновая кислота-лизин) и GEC (глицин-глутаминовая кислота-цистеин), анализировали с помощью ЖХ-МС согласно типовому варианту реализации. При масс-спектрометрическом анализе LK1 обозначен как +1495,7 (включая полезную нагрузку), а расщепленный LK1 обозначен как +762,2.

На ФИГ. 12A показано, что папаин является протеазой, преимущественно расщепляющей сайт вблизи объемных гидрофобных или ароматических аминокислот.

На ФИГ. 12B представлена аминокислотная последовательность триптического пептида, первоначально расположенного в шарнирной области антитела. Этот триптический пептид шарнирной области (THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK (SEQ ID NO.: 1)) содержит несколько сайтов расщепления папаином. Сайты расщепления папаином указаны стрелками.

На ФИГ. 13A-13C представлены результаты анализа триптического пептида шарнирной области, расщепленного папаином, согласно типовому варианту реализации. На ФИГ. 13A представлены результаты анализа триптического пептида шарнирной области (THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK (SEQ ID NO.: 1)) согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 13B представлены результаты анализа пептида с аминокислотной последовательностью CPPCPAPE (SEQ ID NO.: 2) (триптический пептид шарнирной области, расщепленный папаином) согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 13C представлены результаты анализа пептида с аминокислотной последовательностью CPPCPAPELL (SEQ ID NO.: 3) (триптический пептид шарнирной области, расщепленный папаином) согласно типовому варианту реализации. Эти пептиды могут содержать LK1 (обозначен как +1495,7, включая полезную нагрузку) или расщепленный LK1 (обозначен как +762,4).

На ФИГ. 14 представлена эффективность мечения линкером для пептида шарнирной области согласно типовому варианту реализации. Пептид шарнирной области содержит два остатка цистеина. Большинство пептидов шарнирной области имеют двойную метку.

На ФИГ. 15 представлены результаты анализа расщепления образца с помощью Glu-C с последующим проведением ЖХ-МС согласно типовому варианту реализации. Профиль пептидов шарнирной области был значительно уменьшен, что существенно упростило количественный анализ с применением ЖХ-МС.

На ФИГ. 16 представлен сайт-специфичный количественный анализ конъюгирования лекарственного средства в ADC MAB1-LK1 согласно типовому варианту реализации. Показана площадь пика двух пептидов, например, пептидов с аминокислотными последовательностями SCDK или GEC. Эти пептиды могут содержать расщепленный LK1 (обозначен как +762,4) и/или LK2 (обозначен как +592,3).

На ФИГ. 17 представлена внутрисуточная прецизионность способа согласно настоящей заявке в отношении результатов анализа DAR пептида GEC, пептида SCDK и пептидов шарнирной области согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 18A и 18B представлены результаты сравнения двух способов согласно типовому варианту реализации. На ФИГ. 18A представлены результаты проведения расщепления папаином с последующим присоединением LK2 в соответствии со способом, показанным на ФИГ. 6A, согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 18B представлены результаты проведения присоединения LK2 с последующим расщеплением папаином в соответствии со способом, показанным на ФИГ. 6B, согласно типовому варианту реализации. Анализировали образцы ADC MAB1-LK1 с высоким значением DAR. Расщепленный LK1 обозначен как +762,4. LK2 обозначен как +592,3. (+592,3, +592,3) указывает на отсутствие конъюгирования. (+762,4, +592,3) указывает на конъюгирование одной молекулы лекарственного средства. (+762,4, +762,4) указывает на конъюгирование двух молекул лекарственного средства согласно типовому варианту реализации.

НА ФИГ. 19A представлен масс-спектрометрический анализ интенсивной фрагментации дипептидных структур линкера для триптического пептида SCDK, содержащего расщепленный LK1 (mal-amido-PEG8-Val-Ala), согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 19B представлен масс-спектрометрический анализ интенсивной фрагментации дипептидных структур линкера для триптического пептида SCDK, содержащего расщепленный LK3 (mal-amido-Val-Cit), согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 20A представлено процентное содержание конкретных суррогатных пептидов во всех пептидах, идентифицированных для образцов ADC MAB1-LK1, согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 20B представлено процентное содержание конкретных суррогатных пептидов во всех пептидах, идентифицированных для образцов ADC MAB1-LK3, согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 21A представлены площади пиков суррогатных пептидов при различных значениях отношения папаина к субстрату для анализа образцов ADC MAB1-LK1 согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 21B представлены площади пиков суррогатных пептидов при различных значениях отношения папаина к субстрату для анализа образцов ADC MAB1-LK3 согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 22 представлены площади пиков суррогатных пептидов, содержащих LK1 или LK3, таких как GEC, SCDK или шарнирный пептид, содержащий один или два интактных LK1 или LK3, при различном времени инкубирования согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 23 представлены площади пиков суррогатных пептидов, содержащих LK1 или LK3, таких как GEC, SCDK или шарнирный пептид, содержащий один или два расщепленных LK1 или LK3, при различном времени инкубирования согласно типовому варианту реализации. Площади пиков шарнирных пептидов, не содержащих расщепленного линкера, также отслеживали согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 24A представлен сайт-специфичный количественный анализ конъюгирования LK1 для ADC MAB1-LK1 путем анализа сайтов конъюгирования в GEC, SCDK и пептидах шарнирной области согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 24B представлен сайт-специфичный количественный анализ конъюгирования LK3 для ADC MAB1-LK3 путем анализа сайтов конъюгирования в GEC, SCDK и пептидах шарнирной области согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 25 представлена внутрисуточная и межсуточная прецизионность способа согласно настоящей заявке в отношении результатов анализа DAR GEC, SCDK и пептидов шарнирной области согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 26 показаны различия от партии к партии в распределении конъюгирования лекарственного средства для MAB1-LK1-L8 и MAB1-LK1-L22, определенном путем анализа сайтов конъюгирования в GEC, SCDK и пептидах шарнирной области согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 27 представлен процент снижения конъюгирования LK1 для ADC MAB1-LK1 в условиях термического воздействия при 40°C в течение 28 дней, определенный

путем анализа GEC, SCDK и пептидов шарнирной области при различных значениях pH, включая pH 5,5, pH 6 и pH 6,5, согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 28 представлен химический механизм гидролиза малеимидного кольца согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 29A представлены проценты гидролиза малеимидного кольца и сохранения конъюгирования, определенные путем анализа GEC, SCDK и шарнирных пептидов при различных значениях pH, включая pH 5,5, pH 6,0 и pH 6,5, согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 29B представлен анализ корреляции между сохранением конъюгирования и гидролизом малеимидного кольца согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 30A-30C представлен анализ конъюгирования лекарственного средства с остатком лизина 208 в легкой цепи антитела с применением расщепления папаином согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 31A-31C представлен анализ конъюгирования лекарственного средства с остатком лизина 393 и остатком лизина 389 в тяжелой цепи антитела (HC Lys393/HC* Lys389) с применением расщепления папаином согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 32A-32C представлен анализ конъюгирования лекарственного средства с остатком лизина 65 в легкой цепи антитела с применением расщепления папаином согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 33A-33C представлен анализ конъюгирования лекарственного средства с остатком лизина 39, 42 или 45 в легкой цепи антитела с применением расщепления папаином путем анализа пептида, содержащего 55 аминокислот, согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 34A-34B представлен анализ конъюгирования лекарственного средства с остатками лизина 64 и 75 в тяжелой цепи антитела (HC* Lys 64 и Lys75) в случае двойного конъюгирования с применением расщепления папаином согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 35A-35C представлен анализ конъюгирования лекарственного средства с остатками лизина 151 и 147 в тяжелой цепи антитела (HC Lys151/HC* Lys147) с применением расщепления папаином согласно типовому варианту реализации.

На ФИГ. 36 представлен сайт-специфичный количественный анализ конъюгирования лекарственного средства с различными остатками лизина для MAB2-LK5 согласно типовому варианту реализации.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) представляют собой терапевтические средства, в которых используется специфичность антител для избирательной доставки лекарственных средств, таких как сильнодействующие цитотоксические лекарственные средства или химиотерапевтические лекарственные средства, к клеткам-мишеням. ADC могут обеспечивать адресную доставку цитотоксических агентов для лечения рака. Антитела, нацеленные на специфичные

поверхностные антигены опухоли, могут быть конъюгированы с лекарственными средствами посредством линкеров с получением ADC в качестве эффективных терапевтических средств для лечения рака. Как показано на ФИГ. 1, представляющий собой антитело компонент ADC связывается с опухолевым антигеном, после чего комплекс ADC-антиген подвергается опосредованному рецепторами эндоцитозу. Поскольку лизосомы содержат протеазы, такие как катепсин B и плазмин, лекарственные компоненты ADC могут высвобождаться вследствие лизосомальной деградации ADC или расщепления линкеров. (Changshou Gao. 7th World ADC. 2016, San Diego, Instability of thiol/maleimide conjugation and strategies for mitigation; Jagadeesh et al., Antibody drug conjugates (ADCs): Changing the treatment landscape of lymphoma, Current Treatment Options in Oncology, 17, 55, 2016, https://doi.org/10.1007/s11864-016-0428-y). Предпочтительные антигены-мишени должны демонстрировать различную экспрессию в опухолевых и нормальных тканях при повышенной экспрессии в раковых клетках. ADC могут повышать эффективность и снижать токсичность за счет избирательной доставки лекарственных средств к раковым клеткам, тем самым снижая минимальную эффективную дозу по сравнению с традиционными химиотерапевтическими методами лечения рака. Поскольку меньшее количество лекарственных средств достигает ткани, не являющейся мишенью, например, нормальной ткани, за счет адресной доставки лекарственных средств антителом, максимальная переносимая доза лекарственного средства увеличивается. (Panowski et al., Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy, mAbs, 6:1, 34-45, DOI: 10.4161/ mabs.27022). Применение ADC может расширить терапевтическое окно за счет повышения эффективности, снижения системной токсичности, предпочтительной фармакокинетики, предпочтительной фармакодинамики и предпочтительного биораспределения по сравнению с традиционной химиотерапией. (Tsuchikama et al., Protein Cell, 2018, 9(1), pages 33-46, Antibody-drug conjugates: recent advances in conjugation and linker chemistries)

Одобренные FDA (Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США) ADC включают гемтузумаб озогамицин (Милотарг (Mylotarg®)) в 2000 г. для лечения CD33-положительного острого миелогенного лейкоза, брентуксимаб ведотин (Адцетрис (Adcetris®)) в 2011 г. для лечения CD30-положительной рецидивирующей или рефрактерной лимфомы Ходжкина и системной анапластической крупноклеточной лимфомы, трастузумаб эмтанзин (Кадсила (Kadcyla®)) в 2013 г. для лечения HER2-положительного рака молочной железы, инотузумаб озогамицин (Беспонса (Besponsa®)), нацеленный на CD22, в 2017 г. для лечения острого лимфобластного лейкоза, полатузумаб ведотин (Полайви (Polivy ®)), нацеленный на CD79b, в 2019 г. для лечения диффузной крупноклеточной B-клеточной лимфомы, энфортумаб ведотин (Падцев (Padcev®)), нацеленный на нектин-4, в 2019 г. для лечения рака мочевого пузыря, и трастузумаб дерукстекан (Энхерту(Enhertu®)), нацеленный на HER2, в 2019 г. для лечения рака молочной железы. Однако Милотарг (Mylotarg®) был отозван с рынка в 2010 г. из-за отсутствия клинической пользы и высокого показателя летальной токсичности по

сравнению со стандартной химиотерапией. Структурные формулы Милотарга (Mylotarg®), Адцетриса (Adcetris®) и Кадсилы (Kadcyla®) представлены на ФИГ. 2. (Tsuchikama et al.) Большинство активных клинических исследований ADC представляют собой в исследования фазы I для различных антигенов-мишеней. Примеры антигенов-мишеней ADC включают HER2, EGFR, CD19, CD33, CD70, cMet, BCMA, CD123, CD22, CD37, CD71, CD74, GC-C, FGFR, мезотелин, ENPP3, рецепторную тирозинкиназу AXL, CDH6, CEACAM4, DLL3, FLT3, рецептор фолиевой кислоты 1, PSMA, GPNMB, HER3, IGF-1R, SLC44A4, TAA и так далее. Разработка ADC является сложной задачей, поскольку, согласно оценкам, примерно 25% разработок ADC были прекращены во время клинических исследований.

ADC сконструированы из антитела, нацеленного на конкретный антиген, лекарственного средства - полезной нагрузки и линкера, который соединяет лекарственное средство - полезную нагрузку и антитело. Обычно применяемые для разработки ADC изотипы антител включают IgG1, IgG2 и IgG4. Существуют различные типы линкеров, подходящих для конъюгирования, включая расщепляемые протеазами линкеры, нерасщепляемые линкеры, гидразоновые линкеры и линкеры с дисульфидной связью. Доступные сайты конъюгирования в молекуле антитела включают остатки лизина и цистеина. Помимо этого, в молекулы антител в определенных сайтах могут быть добавлены неприродные аминокислоты или введенные с помощью генетической инженерии остатки цистеина. Доступные первичные сайты конъюгирования антитела включают аминогруппы остатков лизина. В типичной молекуле антитела имеется примерно 80 остатков лизина, и примерно 10 остатков лизина являются химически доступными. Химическое конъюгирование линкеров с антителами включает лизин-амидное сочетание с применением активированных сложных эфиров карбоновых кислот.

Конъюгирование по остаткам цистеина также может быть применено для конструирования ADC. Как правило, в молекулах антител отсутствуют свободные тиолы, поскольку все остатки цистеина образуют дисульфидные связи. В молекулах антител, таких как IgG1, имеется 4 межцепочечных и 12 внутрицепочечных дисульфидных связей. Межцепочечные дисульфидные связи, как правило, не имеют решающего значения для стабильности структуры IgG1. Сульфгидрильные группы (-SH) остатков цистеина антитела доступны в качестве первичных сайтов конъюгирования в случае, когда межцепочечные дисульфидные связи антитела избирательно восстановлены. Таким образом, конъюгирование по остаткам цистеина может быть ограничено восемью экспонированными сульфгидрильными группами после восстановления межцепочечных дисульфидных связей. Число звеньев линкер-лекарственное средство на молекулу антитела в случае конъюгирования по остаткам цистеина может составлять от 1 до 8, что обеспечивает получение более ста различных вариантов ADC. Диапазон гетерогенности смеси ADC относительно велик, поскольку эти варианты ADC различаются по содержанию лекарственного средства и сайтам конъюгирования. (Panowski et al.) Дополнительные остатки цистеина могут быть введены в молекулы антител с помощью

генетической инженерии или других технологий.

Обычно ADC имеют высокую степень структурной гетерогенности, включая различные значения DAR, сайты конъюгирования и степени занятости. Занятость полезной нагрузкой может различаться в различных сайтах конъюгирования в зависимости от доступности растворителя, локального заряда и пространственного влияния. Расположение и занятость конкретных сайтов конъюгирования может модулировать стабильность и эффективность ADC. Конъюгированные по остаткам лизина или цистеина ADC являются гетерогенными, включая варианты размера и варианты заряда. Рассмотрение показателей качества ADC, таких как конъюгированные по остаткам лизина или цистеина ADC, включает DAR, распределение нагрузки лекарственным средством, присутствие неконъюгированных антител и присутствие остаточных лекарственных средств. Выбор сайтов конъюгирования может модулировать стабильность и эффективность ADC. Методы конъюгирования по остаткам цистеина основаны на специфичной реакции между остатками цистеина антитела и взаимодействующими с тиолами функциональными группами. Может быть применен малеимид для конъюгирования линкера с тиолом восстановленного цистеина антитела посредством алкилирования малеимидом. На ФИГ. 3 показано взаимодействие малеимидного фрагмента с восстановленным остатком цистеина антитела (Tsuchikama et al.)

Существуют проблемы, касающиеся обеспечивающих связывание химических процессов, применяемых для конъюгирования антитела-лекарственного средства. Если полученные ADC представляют собой нестабильные структуры, они могут обеспечивать преждевременное высвобождение лекарственного средства. Другие проблемы связаны со значительной вариабельностью значений DAR и слабой доступностью контроля за положением присоединенного компонента в молекуле антитела. Проявления вариабельности и нестабильности ADC способствуют изменчивости фармакокинетических профилей. Полученный ADC может представлять собой высокогетерогенную смесь, содержащую различные варианты ADC. С ADC, конъюгированными по остаткам цистеина, может происходить деконъюгирование, как то деконъюгирование посредством реакции тиолового обмена или обратной реакции, как показано на ФИГ. 4 для нестабильности, связанной с тиол-малеимидным конъюгированием в случае конъюгирования по остаткам цистеина. В случае конъюгирования ADC по остаткам лизина в домене CH2 антитела, домен CH2 может подвергаться дестабилизации, вызывающей обусловленную посттрансляционной модификацией (PTM) деградацию, что оказывает негативное влияние на время полужизни антитела. Конъюгирование по остаткам лизина может нарушать аффинность связывания ADC, например, непосредственно путем изменения эпитопов связывания или опосредованно, путем обеспечения структурных изменений. Например, остаток метионина 258 в ADC более доступен для окисления по сравнению с таковым в неконъюгированных антителах. (Luo et al., Structural Characterization of a Monoclonal Antibody-Maytansinoid Immunoconjugate, Anal Chem 2016 Jan 5;88(1):695-702. doi:

10.1021/acs.analchem.5b03709. Epub 2015 Dec 14; Buecheler, J.W., et al. Journal of Pharmaceutical Sciences 109 (2020) 161-168162). Деконъюгирование полезной нагрузки может привести к снижению эффективности в отношении мишени, повышению нецелевой токсичности или неконтролируемому распределению лекарственного средства. Значение DAR ADC может меняться в сыворотке с течением временем. Сохраняются трудности, связанные с сайт-специфичным количественным анализом конъюгирования лекарственного средства и количественной оценкой снижения конъюгирования лекарственного средства в различных сайтах. Аналитическая характеристика ADC включает молекулярную целостность, гетерогенность, деградацию, стабильность и изменения значения DAR. Подходящие составы ADC должны иметь четко определенные значения DAR и степень гомогенности за счет снижения содержания нежелательных вариантов ADC с целью повышения безопасности и эффективности составов ADC.

DAR представляет собой среднее количество молекул лекарственного средства, конъюгированных с молекулой антитела, и может быть непосредственно связано с эффективностью и безопасностью ADC. Оценка DAR может иметь решающее значение для контроля важнейшего показателя качества ADC, поскольку четко определенное значение DAR предоставляет важную информацию об общем содержании присоединенного лекарственного средства, распределении присоединенного лекарственного средства, содержании неконъюгированных антител, содержании остаточных неконъюгированных молекул лекарственного средства и сайтах конъюгирования. Низкое значение DAR свидетельствует о низком содержании присоединенного лекарственного средства, что способствует снижению активности ADC. Высокое значение DAR свидетельствует о высоком содержании присоединенного лекарственного средства, что может изменять фармакокинетику и токсичность ADC. Основные показатели качества ADC включают оценку DAR, распределения присоединенного лекарственного средства, содержания неконъюгированных антител, содержания остаточных неконъюгированных молекул лекарственного средства, вариантов размера ADC и вариантов заряда ADC.

Определение характеристик и количественный анализ ADC с применением подходов масс-спектрометрии могут быть затруднены вследствие изменения характеристик от партии к партии, поскольку конъюгирование линкера и полезной нагрузки существенно влияет на ионизацию пептидов. Несмотря на то, что картирование пептидов, основанное на масс-спектрометрическом анализе, является эффективным для определения характеристик терапевтических белков, эта общая стратегия обычно не обеспечивает возможность количественного анализа сайт-специфичного конъюгирования в случае ADC из-за несоответствия ионизации вследствие существенных различий в молекулярной массе между пептидами дикого типа и конъюгированными пептидами. Помимо этого, расщепление ADC трипсином приводит к получению коротких пептидов, содержащих сайты конъюгирования, такие как межцепочечная дисульфидная связь между тяжелой цепью и легкой цепью, сохранение которых сложно обеспечить при обращенно-

фазовой жидкостной хроматографии (ОФЖХ). Кроме того, трансформация конъюгированных с лекарственными средствами пептидов во время подготовки образцов, например, при высокой температуре и/или в кислой среде, может привести к рискам, связанным со стабильностью аналита и воспроизводимостью. Применение капиллярного электрофореза с масс-спектрометрией (КЭФ-МС) для определения характеристик ADC обеспечивает сохранение коротких пептидов. Однако существуют трудности, связанные с воспроизводимостью количественного анализа.

Выбор линкеров имеет важное значение для эффективности ADC, поскольку идеальный линкер должен быть стабилен в кровотоке, при этом обеспечивая быстрое высвобождение активных свободных молекул лекарственных средств внутри опухолевых клеток. Применимые форматы линкеров могут включать нерасщепляемые или расщепляемые линкеры. Расщепляемые линкеры выполнены с возможностью расщепления в качестве реакции на изменение условий вследствие различий между внеклеточной и внутриклеточной средой, таких как pH или окислительно-восстановительный потенциал, или они могут быть расщеплены под действием специфичных лизосомальных ферментов.

Примерами расщепляемых линкеров являются кислотно-лабильные линкеры, расщепляемые протеазами линкеры, дисульфид-содержащие линкеры или линкеры на основе сложного диэфира пирофосфорной кислоты. Примером кислотно-лабильного линкера является гидразоновый линкер. Кислотно-лабильные линкеры выполнены с возможностью оставаться стабильными при величине pH крови, однако кислотно-лабильные линкеры могут становиться нестабильными и подвергаться деградации в среде с низким значением pH в лизосомах. Дисульфидный линкер содержит дисульфидную связь, которая может обеспечивать высвобождение свободных молекул лекарственных средств внутри клетки при высоком содержании внутриклеточного восстановленного глутатиона.

Расщепляемые протеазами линкеры выполнены с возможностью оставаться стабильными в крови, однако активные свободные молекулы лекарственных средств могут быстро высвобождаться внутри лизосом в клетках после расщепления лизосомальными ферментами. Активность протеаз внутри лизосом относительно высока. Некоторые специфичные пептидные последовательности могут быть распознаны и расщеплены лизосомальными протеазами, как то дипептидная связь, которая может быть гидролизована катепсином B. Катепсин B способен распознавать определенные дипептидные последовательности, такие как валин-аланин, фенилаланин-лизин и валин-цитруллин, и расщепляет пептидную связь на C-концевом участке таких последовательностей. Спейсер, такой как пара-аминобензилоксикарбонил (PABC) или пара-аминобензиловый спирт (PABA), может быть связан с этими дипептидами с получением расщепляемых дипептидных линкеров. Присутствие спейсера между дипептидным фрагментом и полезной нагрузкой позволяет катепсину B проявлять свою протеазную активность при использовании объемных молекул полезной нагрузки.

(Tsuchikama et al.)

Выбор полезной нагрузки - лекарственного средства может иметь решающее значение для терапевтического действия ADC. Предпочтительно, чтобы полезная нагрузка в ADC представляла собой цитотоксический химический агент, обладающий высокой активностью в отношении раковых клеток и низкой нецелевой цитотоксичностью в отношении нормальных клеток. В некоторых аспектах полезная нагрузка представляет собой цитотоксический агент или антимитотический агент. В некоторых аспектах полезная нагрузка представляет собой ингибиторы микротрубочек, такие как майтансины или ауристатины. В некоторых иллюстративных примерах полезная нагрузка представляет собой повреждающий ДНК агент, такой как антрациклины, калихеамицины, дуокармицины, пирролобензодиазепины или димеры пирролобензодиазепинов (PBD). Действие агента, повреждающего ДНК, заключается в связывании малой бороздки ДНК, вызывающем разрыв нити ДНК, алкилирование или перекрестное связывание. В некоторых аспектах полезная нагрузка представляет собой ингибитор топоизомеразы или ингибитор РНК-полимеразы. В некоторых аспектах полезная нагрузка представляет собой аналоги аманитинов или тубулизина. В некоторых аспектах полезная нагрузка представляет собой химиотерапевтическое лекарственное средство, включая аналоги фолиевой кислоты и пуринов (метотрексат, 6-меркаптопурин), ингибиторы/промоторы полимеризации микротрубочек (алкалоиды барвинка, таксаны) и повреждающие ДНК агенты (антрациклины, азотистый иприт).

В некоторых аспектах ADC содержит антитело, полезную нагрузку и линкер, где линкер содержит полезную нагрузку и присоединен к антителу, при этом линкер содержит сайт расщепления. В некоторых аспектах сайт расщепления может быть расщеплен в качестве реакции на изменение условий вследствие различий между внеклеточной и внутриклеточной средой, таких как pH или окислительно-восстановительный потенциал, или он может быть расщеплен под действием специфичных лизосомальных ферментов. В некоторых аспектах сайт расщепления представляет собой кислотно-лабильный сайт расщепления, сайт расщепления протеазой, дисульфид-содержащий сайт расщепления или сайт расщепления, содержащий сложный диэфир пирофосфорной кислоты.

В некоторых аспектах ADC содержит антитело, полезную нагрузку и линкер, где линкер содержит полезную нагрузку и присоединен к антителу, при этом линкер содержит спейсер и сайт расщепления, при этом спейсер представляет собой ПЭГ (полиэтиленгликоль) или ПЭГ8.

В других аспектах ADC содержит антитело, полезную нагрузку и линкер, где линкер содержит полезную нагрузку и присоединен к антителу, при этом линкер содержит первый спейсер, сайт расщепления и второй спейсер, при этом первый спейсер представляет собой ПЭГ или ПЭГ8, и второй спейсер представляет собой PABC или PABA.

В других аспектах ADC содержит антитело, полезную нагрузку и линкер, где

линкер присоединен к сульфгидрильной группе остатка цистеина антитела с помощью малеимидной присоединяющей группы, как показано в формуле I на ФИГ. 5А, где R представляет собой линкер, и X представляет собой полезную нагрузку. В некоторых вариантах реализации линкер содержит ПЭГ, и полезная нагрузка представляет собой лекарственное средство, соединение, токсин, цитотоксический агент, антимитотический агент, ингибитор микротрубочек, повреждающий ДНК агент, ингибитор топоизомеразы, ингибитор РНК-полимеразы, аналог аманитинов, аналог тубулизина, химиотерапевтическое лекарственное средство, ингибитор полимеризации микротрубочек или промотор полимеризации микротрубочек. В некоторых аспектах линкер дополнительно содержит сайт расщепления. В некоторых аспектах сайт расщепления представляет собой дипептид, который может распознаваться протеазой. В некоторых аспектах указанный дипептид представляет собой валин-аланин, фенилаланин-лизин, валин-цитруллин или их производные.

В некоторых аспектах ADC содержит антитело, полезную нагрузку и линкер, где линкер присоединен к сульфгидрильной группе остатка цистеина антитела с помощью малеимидной присоединяющей группы, как показано в формуле II на ФИГ. 5А, где R_1 представляет собой спейсер (такой как ПЭГ или ПЭГ8), при этом R_2 представляет собой -H или $-CH_3$, при этом R_3 представляет собой общую структуру боковой цепи аланина или цитруллина, такую как $-CH_3$ или $-(CH_2)_3NHC(O)NH_2$, при этом X представляет собой полезную нагрузку. В некоторых вариантах реализации полезная нагрузка представляет собой лекарственное средство, соединение, токсин, цитотоксический агент, антимитотический агент, ингибитор микротрубочек, повреждающий ДНК агент, ингибитор топоизомеразы, ингибитор РНК-полимеразы, аналог аманитинов, аналог тубулизина, химиотерапевтическое лекарственное средство, ингибитор полимеризации микротрубочек или промотор полимеризации микротрубочек.

В других аспектах ADC содержит антитело, полезную нагрузку и линкер, где линкер присоединен к сульфгидрильной группе остатка цистеина антитела с помощью малеимидной присоединяющей группы, как показано в формуле III на ФИГ. 5А, где R_1 представляет собой первый спейсер (такой как ПЭГ или ПЭГ8), при этом R_2 представляет собой -H или $-CH_3$, при этом R_3 представляет собой общую структуру боковой цепи аланина или цитруллина, такую как $-CH_3$ или $-(CH_2)_3NHC(O)NH_2$, при этом R_4 представляет собой второй спейсер (такой как PABC или PABA). В некоторых вариантах реализации полезная нагрузка представляет собой лекарственное средство, соединение, токсин, цитотоксический агент, антимитотический агент, ингибитор микротрубочек, повреждающий ДНК агент, ингибитор топоизомеразы, ингибитор РНК-полимеразы, аналог аманитинов, аналог тубулизина, химиотерапевтическое лекарственное средство, ингибитор полимеризации микротрубочек или промотор полимеризации микротрубочек.

В других аспектах ADC содержит антитело, полезную нагрузку и линкер, где линкер присоединен к остатку лизина антитела посредством лизин-амидного сочетания с применением активированного сложного эфира карбоновой кислоты или сложного эфира

NHS, как показано в формуле IV на ФИГ. 5B, где R представляет собой линкер, и X представляет собой полезную нагрузку. В некоторых вариантах реализации линкер содержит ПЭГ, и полезная нагрузка представляет собой лекарственное средство, соединение, токсин, цитотоксический агент, антимитотический агент, ингибитор микротрубочек, повреждающий ДНК агент, ингибитор топоизомеразы, ингибитор РНК-полимеразы, аналог аманитинов, аналог тубулизина, химиотерапевтическое лекарственное средство, ингибитор полимеризации микротрубочек или промотор полимеризации микротрубочек. В некоторых аспектах линкер дополнительно содержит сайт расщепления. В некоторых аспектах сайт расщепления представляет собой дипептид, который может распознаваться протеазой. В некоторых аспектах указанный дипептид представляет собой валин-аланин, фенилаланин-лизин, валин-цитруллин или их производные.

В некоторых аспектах ADC содержит антитело, полезную нагрузку и линкер, где линкер присоединен к остатку лизина антитела посредством лизин-амидного сочетания с применением активированного сложного эфира карбоновой кислоты или сложного эфира NHS, как показано в формуле V на ФИГ. 5B, где R_1 представляет собой спейсер (такой как ПЭГ или ПЭГ8), при этом R_2 представляет собой -H или $-CH_3$, при этом R_3 представляет собой общую структуру боковой цепи аланина или цитруллина, такую как $-CH_3$ или $-(CH_2)_3NHC(O)NH_2$, при этом X представляет собой полезную нагрузку. В некоторых вариантах реализации полезная нагрузка представляет собой лекарственное средство, соединение, токсин, цитотоксический агент, антимитотический агент, ингибитор микротрубочек, повреждающий ДНК агент, ингибитор топоизомеразы, ингибитор РНК-полимеразы, аналог аманитинов, аналог тубулизина, химиотерапевтическое лекарственное средство, ингибитор полимеризации микротрубочек или промотор полимеризации микротрубочек.

В некоторых аспектах ADC содержит антитело, полезную нагрузку и линкер, где линкер присоединен к остатку лизина антитела посредством лизин-амидного сочетания с применением активированного сложного эфира карбоновой кислоты или сложного эфира NHS, как показано в формуле VI на ФИГ. 5B, где R_1 представляет собой первый спейсер (такой как ПЭГ или ПЭГ8), при этом R_2 представляет собой -H или $-CH_3$, при этом R_3 представляет собой общую структуру боковой цепи аланина или цитруллина, такую как $-CH_3$ или $-(CH_2)_3NHC(O)NH_2$, при этом R_4 представляет собой второй спейсер (такой как PABC или PABA). В некоторых вариантах реализации полезная нагрузка представляет собой лекарственное средство, соединение, токсин, цитотоксический агент, антимитотический агент, ингибитор микротрубочек, повреждающий ДНК агент, ингибитор топоизомеразы, ингибитор РНК-полимеразы, аналог аманитинов, аналог тубулизина, химиотерапевтическое лекарственное средство, ингибитор полимеризации микротрубочек или промотор полимеризации микротрубочек.

В настоящей заявке предложен иллюстративный способ сайт-специфичного количественного анализа и/или определения характеристик конъюгирования

лекарственного средства в ADC, где ADC содержат конъюгированные и неконъюгированные сайты конъюгирования. Способ согласно настоящей заявке включает этапы расщепления ADC протеазой с получением смеси пептидов, где пептид может содержать конъюгированные и/или неконъюгированные сайты конъюгирования. Впоследствии смесь пептидов может быть модифицирована или помечена с обеспечением обнаруживаемых различий между конъюгированными и неконъюгированными сайтами конъюгирования. В настоящей заявке предложен новый способ деконъюгирования лекарственного средства с помощью протеаз и мечения линкеров (protease-assisted drug deconjugation and linker labelling (PADDLL)) для сайт-специфичного количественного анализа конъюгирования в ADC. В некоторых аспектах для расщепления ADC применяют трипсин. В некоторых аспектах для выявления различий между пептидами, содержащими конъюгированные и/или неконъюгированные сайты конъюгирования, применяют ЖХ-МС.

В некоторых аспектах в настоящей заявке предложен способ количественного анализа или определения характеристик конъюгирования по меньшей мере одного присоединенного компонента, связанного по меньшей мере с одним специфичным сайтом конъюгирования частично конъюгированного пептида или белка в образце, включающий: отщепление части присоединенного компонента с получением пептида или белка, содержащего расщепленный линкер, где указанный присоединенный компонент содержит расщепленный линкер; добавление модифицированного линкера к неконъюгированному сайту конъюгирования частично конъюгированного пептида или белка; проведение масс-спектрометрического анализа образца с целью идентификации пептида или белка, содержащего расщепленный линкер и/или модифицированный линкер; при этом по меньшей мере один присоединенный компонент содержит линкер и полезную нагрузку, при этом отщепленная часть присоединенного компонента содержит полезную нагрузку, и при этом линкер содержит расщепленный линкер. В некоторых аспектах способ дополнительно включает количественный анализ или определение характеристик сайт-специфичного конъюгирования присоединенного компонента на основании результатов количественного анализа расщепленного линкера и модифицированного линкера. В некоторых аспектах масс-спектрометрический анализ представляет собой масс-спектроскопию или жидкостную хроматографию с масс-спектроскопией. Сайт-специфичное конъюгирование полезной нагрузки (например, лекарственного средства) может быть рассчитано по результатам количественного анализа расщепленного линкера и модифицированного линкера, например, сайт-специфичное конъюгирование полезной нагрузки (например, лекарственного средства)=(количество расщепленного линкера) / (количество модифицированного линкера+количество расщепленного линкера).

В других аспектах способ согласно настоящей заявке может быть применен для количественного анализа различных ADC, которые содержат расщепляемые линкеры, такие как расщепляемые протеазами дипептидные линкеры, при этом ADC могут иметь различные изотипы антител, линкерные структуры и лекарственные средства,

представляющие собой полезную нагрузку, при этом ADC могут включать конъюгированные по остаткам лизина и конъюгированные по остаткам цистеина ADC. В некоторых аспектах способ согласно настоящей заявке включает инкубирование интактных ADC с активированным папаином в условиях, оптимизированных для полного деконъюгирования лекарственного средства - полезной нагрузки путем сведения к минимуму неспецифичного расщепления, с последующим проведением процедур картирования восстановленных пептидов, включающих восстановление, денатурацию и ферментативное расщепление. Затем проводят мечение незанятых сайтов конъюгирования модифицированными линкерами для обеспечения сопоставимой эффективности ионизации. Затем способ согласно настоящей включает масс-спектрометрический анализ образца ADC, такой как ЖХ-МС/МС (жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией), с целью идентификации пептида или белка, содержащего расщепленный линкер и/или модифицированный линкер. В некоторых аспектах модифицированный линкер и расщепляемый линкер ADC имеют схожие структуры. В некоторых аспектах сайт-специфичное конъюгирование полезной нагрузки (например, лекарственного средства) может быть рассчитано по результатам количественного анализа расщепленного линкера и модифицированного линкера. Процент сайт-специфичного конъюгирования лекарственного средства может быть рассчитан с использованием интенсивности сигнала ионов-предшественников пептида, деконъюгированного с лекарственным средством, и пептида, меченного линкером, включая:

$$\text{Сайт} - \text{специфичное конъюгирование ЛС (\%)} = \frac{\text{Деконъюгированный с ЛС пептид}}{\text{Деконъюгированный с ЛС пептид} + \text{Меченый линкером пептид}}$$

В некоторых предпочтительных аспектах выполняют этап добавления модифицированного линкера к неконъюгированному сайту конъюгирования, после чего проводят этап отщепления части присоединенного компонента. В некоторых предпочтительных аспектах пептид или белок представляет собой антитело, фрагмент антитела, Fab-фрагмент антитела, Fc-фрагмент антитела или гибридный белок. В некоторых предпочтительных аспектах молекулярная масса модифицированного линкера отличается от молекулярной массы расщепленного линкера, причем эти молекулярные массы различимы при масс-спектрометрическом анализе.

В некоторых аспектах способ согласно настоящей заявке включает расщепление ADC трипсином, расщепление смеси триптических пептидов папаином с удалением полезной нагрузки; конъюгирование модифицированных линкеров с неконъюгированными сульфгидрильными группами (например, мечение); последующее расщепление смеси пептидов с помощью Glu-C; и последующее проведение анализа смеси пептидов методом ЖХ-МС, как показано на ФИГ. 6А. В некоторых аспектах последовательность некоторых этапов может быть обратной, как показано на ФИГ. 6В. Может быть выполнен этап конъюгирования модифицированных линкеров с неконъюгированными сульфгидрильными группами пептидов с последующим

выполнением этапа удаления полезной нагрузки путем расщепления смеси пептидов папаином. Что касается этапа конъюгирования модифицированных линкеров с неконъюгированными сульфгидрильными группами пептидов, как правило, только свободные сульфгидрильные группы способны к конъюгированию с модифицированным линкером. В некоторых аспектах способ согласно настоящей заявке включает расщепление ADC трипсином с получением смеси триптических пептидов; конъюгирование модифицированных линкеров с неконъюгированными сульфгидрильными группами (например, мечение) смеси пептидов; расщепление смеси пептидов папаином с удалением полезной нагрузки; расщепление смеси пептидов с помощью Glu-C; и проведение анализа смеси пептидов методом ЖХ-МС, как показано на ФИГ. 6В.

В других аспектах последовательность этапов способа согласно настоящей заявке может быть изменена, как показано на ФИГ. 6С. Этап конъюгирования модифицированных линкеров с неконъюгированными сульфгидрильными группами пептидов может быть выполнена после выполнения этапа удаления полезной нагрузки путем расщепления смеси пептидов папаином и после выполнения этапов расщепления трипсином и Glu-C. В некоторых аспектах проводят расщепление папаином с последующим расщеплением трипсином для уменьшения неспецифичного расщепления папаином триптических пептидов. В некоторых аспектах этап мечения проводят после расщепления папаином для уменьшения ингибирования активности папаина (цистеиновой протеазы) малеимидными линкерами. В некоторых предпочтительных аспектах способ согласно настоящей заявке включает расщепление ADC папаином с удалением полезной нагрузки с последующим восстановлением и денатурацией, последующим расщеплением ADC трипсином с получением смеси триптических пептидов, расщеплением смеси триптических пептидов с помощью Glu-C, последующим конъюгированием модифицированных линкеров с неконъюгированными сульфгидрильными группами (например, мечением) и последующим анализом смеси пептидов методом ЖХ-МС, как показано на ФИГ. 6С.

В некоторых предпочтительных аспектах, чтобы свести к минимуму неспецифичное расщепление папаином, ADC сначала расщепляют папаином с удалением полезной нагрузки, после чего проводят другие этапы. В некоторых аспектах способ согласно настоящей заявке включает расщепление образца ADC папаином с удалением полезной нагрузки, последующее расщепление образца трипсином, последующее расщепление смеси триптических пептидов с помощью Glu-C, последующее конъюгирование модифицированных линкеров с неконъюгированными сульфгидрильными группами (например, мечение) и последующее проведение анализа смеси пептидов методом ЖХ-МС.

В некоторых аспектах способ согласно настоящей заявке включает расщепление образца ADC трипсином с получением смеси триптических пептидов, где ADC содержит антитело, по меньшей мере одну полезную нагрузку - лекарственное средство и по

меньшей мере один расщепляемый линкер, содержащий дипептид валин-аланин, при этом линкер присоединен к сульфгидрильной группе цистеинового остатка антитела; расщепление смеси триптических пептидов папаином для удаления полезной нагрузки с получением смеси расщепленных папаином триптических пептидов; конъюгирование модифицированных линкеров с неконъюгированными сульфгидрильными группами расщепленных папаином триптических пептидов; проведение масс-спектрометрического анализа смеси пептидов, такого как анализ методом ЖХ-МС. Перед проведением масс-спектрометрического анализа смесь пептидов может быть необязательно подвергнута расщеплению протеазой Glu-C с целью уменьшения количества пептидов шарнирной области для упрощения количественного анализа.

В некоторых аспектах способ согласно настоящей заявке включает расщепление образца ADC первым ферментом с получением первой смеси пептидов, где ADC содержит пептид или белок, по меньшей мере одну полезную нагрузку и по меньшей мере один линкер; расщепление первой смеси пептидов вторым ферментом для удаления полезной нагрузки с получением второй смеси пептидов, при этом второй фермент также может расщеплять пептиды в первой смеси пептидов; конъюгирование модифицированных линкеров с неконъюгированными сайтами конъюгирования в пептидах второй смеси пептидов с получением третьей смеси пептидов; и анализ третьей смеси пептидов с помощью ЖХ-МС. Перед проведением анализа методом ЖХ-МС третья смесь пептидов может быть необязательно подвергнута расщеплению третьим ферментом с целью уменьшения вариабельности пептидов для упрощения количественного анализа методом ЖХ-МС. В некоторых предпочтительных вариантах реализации первый фермент представляет собой трипсин, второй фермент представляет собой папаин, и третий фермент представляет собой Glu-C.

В других аспектах способ согласно настоящей заявке включает расщепление связанных по остаткам лизина ADC папаином с удалением полезной нагрузки с последующим восстановлением и денатурацией, последующим алкилированием, последующим расщеплением образцов ADC с помощью Glu-C с получением смеси пептидов, образовавшихся под действием Glu-C, расщеплением полученной смеси пептидов с помощью Asp-N, и последующим проведением анализа смеси пептидов методом ЖХ-МС, как показано на ФИГ. 7. Сайт-специфичное конъюгирование полезной нагрузки (например, лекарственного средства) может быть рассчитано по результатам количественного анализа пептидов, содержащих расщепленные линкеры, и нативных пептидов, не содержащих расщепленных линкеров, например, сайт-специфичное конъюгирование полезной нагрузки (например, лекарственного средства)=(количество пептидов, содержащих расщепленный линкер) / (количество пептидов, содержащих расщепленные линкеры+количество нативных пептидов).

В других аспектах в настоящей заявке предложен способ количественного анализа или определения характеристик конъюгирования лекарственного средства в связанных по остаткам лизина ADC, включающий отщепление полезной нагрузки - лекарственного

средства с помощью первого фермента с получением антитела, содержащего расщепленный линкер; последующего воздействия на образец второго фермента с получением смеси пептидов; и проведение масс-спектрометрического анализа полученной смеси пептидов с целью количественного анализа или определения характеристик по меньшей мере одного специфичного сайта конъюгирования лизина на основании результатов количественного анализа пептида, содержащего расщепленный линкер, и/или пептида, не содержащего расщепленный линкер.

Обеспокоенность гетерогенностью ADC вследствие присутствия нежелательных вариантов ADC привела к увеличению потребности в количественном анализе и определении характеристик сайт-специфичного конъюгирования лекарственного средства в ADC, как то в сайт-специфичном количественном анализе конъюгирования лекарственного средства, с целью повышения безопасности и эффективности лекарственных средств. Типовые варианты реализации, раскрытые в настоящем описании, удовлетворяют упомянутые выше потребности. С целью удовлетворения упомянутых выше потребностей в настоящем описании предложены способы количественного анализа или определения характеристик конъюгирования присоединяемого компонента, связанного со специфичным сайтом конъюгирования в ADC. Они удовлетворяют давно назревшие потребности в сайт-специфичном количественном анализе или определении характеристик конъюгирования лекарственного средства в ADC с целью обеспечения четко определенных значений DAR и степени гомогенности, имеющих значение для безопасности и эффективности лекарственных средств

Если не указано иное, все используемые в настоящем описании технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно подразумевается специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Несмотря на то, что при практическом осуществлении или апробации могут быть применены любые способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе, далее будут описаны конкретные способы и материалы. Во всем объеме настоящего описания имеются ссылки на различные публикации, включая патенты, патентные заявки, опубликованные патентные заявки, технические статьи и научные статьи. Все указанные источники и упомянутые публикации полностью включены в настоящее описание посредством ссылки во всех отношениях.

Термины в единственном числе следует понимать как означающие «по меньшей мере один»; и термины «примерно» и «приблизительно» следует понимать как допускающие стандартное отклонение, что будет понятно специалистам в данной области техники; и в случаях, когда указаны диапазоны, граничные значения включены. В контексте настоящего описания термины «включать», «включает» и «включающий» не имеют ограничительного характера, и их следует понимать как означающие «охватывать» («содержать»), «охватывает» («содержит») и «охватывающий» («содержащий»), соответственно.

В некоторых аспектах в настоящем описании предложен способ количественного

анализа или определения характеристик сайт-специфичного конъюгирования по меньшей мере одного присоединенного компонента, связанного по меньшей мере с одним специфичным сайтом конъюгирования частично конъюгированного пептида или белка в образце, включающий: отщепление части присоединенного компонента с получением пептида или белка, содержащего расщепленный линкер, где указанный присоединенный компонент содержит расщепленный линкер; добавление модифицированного линкера к неконъюгированному сайту конъюгирования частично конъюгированного пептида или белка; и проведение масс-спектрометрического анализа образца с целью идентификации пептида или белка, содержащего расщепленный линкер и/или модифицированный линкер. В некоторых аспектах в способе согласно настоящей заявке пептид или белок представляет собой антитело, фрагмент антитела, Fab-фрагмент антитела, Fc-фрагмент антитела или гибридный белок.

В контексте настоящего описания термин «конъюгированный пептид или белок» может относиться к пептиду или белку, присоединенному к биологически активному лекарственному средству (лекарственным средствам) с помощью линкера (линкеров) посредством лабильной связи (связей), включая «конъюгат антитело-лекарственное средство» или «ADC». Конъюгированный пептид, конъюгированный белок, конъюгат антитело-лекарственное средство, или ADC, могут содержать несколько молекул биологически активного лекарственного средства (или полезной нагрузки), которые могут быть ковалентно связаны с сайтами конъюгирования, такими как боковые цепи аминокислотных остатков конъюгированного пептида, конъюгированного белка или антитела (Siler Panowski et al., Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy, 6 mAbs 34-45 (2013)). Антитело, применяемое для получения ADC, может быть способно связываться с аффинностью, достаточной для избирательного накопления и длительного сохранения в целевом сайте. Большинство ADC могут иметь значения Kd в наномолярном диапазоне. Полезная нагрузка может иметь активность в наномолярном/пикомолярном диапазоне и может быть способна достигать внутриклеточных концентраций, обеспечиваемых после распределения ADC в ткани-мишени. Линкер, который образует связь между полезной нагрузкой и антителом, может быть способен оставаться достаточно стабильным в кровотоке, чтобы обеспечивать преимущества фармакокинетических свойств фрагмента антитела (например, длительный период полувыведения) и позволять полезной нагрузке оставаться присоединенной к антителу по мере его распределения в тканях, однако должен обеспечивать эффективное высвобождение биологически активного лекарственного средства после проникновения ADC в клетки-мишени. Линкеры могут представлять собой линкеры, которые не расщепляются во время клеточного процессинга, а также линкеры, которые расщепляются при достижении ADC целевого сайта. В случае нерасщепляемых линкеров биологически активное лекарственное средство, высвобождаемое внутри клетки, содержит полезную нагрузку и все элементы линкера, остающиеся присоединенными к аминокислотному остатку антитела, обычно к остатку лизина или цистеина, после полного

протеолитического расщепления ADC в лизосоме. Расщепляемые линкеры представляют собой линкеры, структура которых включает сайт расщепления, расположенный между полезной нагрузкой и сайтом присоединения аминокислоты в молекуле антитела. Механизмы расщепления могут включать гидролиз кислотно-лабильных связей во внутриклеточных компартментах с кислой средой, ферментативное расщепление амидных или сложноэфирных связей внутриклеточной протеазой или эстеразой, а также восстановительное расщепление дисульфидных связей в восстанавливающих условиях внутри клеток.

В контексте настоящего описания термин «антитело» предназначен для обозначения молекул иммуноглобулина, состоящих из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, соединенных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь имеет вариабельную область тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь имеет вариабельную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). Области VH и VL могут быть дополнительно разделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL может состоять из трех CDR и четырех FR, расположенных от амино-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин «антитело» включает указание как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин «антитело» включает, но не ограничивается ими, антитела, которые получены, экспрессированы, сконструированы или выделены с помощью рекомбинантных методов, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной с обеспечением возможности экспрессии антитела. IgG включает подмножество антител.

В контексте настоящего описания термин «пептид» или «белок» включает любой полимер аминокислот, имеющий ковалентно соединенные амидные связи. Белки содержат одну или более полимерных цепей аминокислот, широко известных в данной области техники как «пептиды» или «полипептиды». Белок может содержать один или несколько полипептидов, составляющих одну функционирующую биомолекулу. В некоторых аспектах белок может представлять собой антитело, биспецифичное антитело, полиспецифичное антитело, фрагмент антитела, моноклональное антитело, белок клетки-хозяина или комбинации указанного.

В контексте настоящего описания термин «фрагмент антитела» включает часть интактного антитела, такую как, например, антигенсвязывающая или вариабельная область антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab')2-фрагмент, Fc-фрагмент, scFv-фрагмент, Fv-фрагмент, диатело dsFv, dAb-фрагмент, Fd'-фрагмент, Fd-фрагмент и выделенную

определяющую комплементарность область (CDR), а также триатела, тетратела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и полиспецифичные антитела, полученные из фрагментов антител. Fv-фрагменты представляют собой комбинацию вариабельных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, а белки ScFv представляют собой рекомбинантные одноцепочечные полипептидные молекулы, в которых вариабельные области легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина соединены пептидным линкером. Фрагмент антитела может быть получен различными способами. Например, фрагмент антитела может быть получен ферментативным или химическим способом путем фрагментации интактного антитела и/или он может быть получен рекомбинантным путем на основе гена, кодирующего часть последовательности антитела. Дополнительно или в качестве альтернативы фрагмент антитела может быть полностью или частично получен синтетическим путем. Фрагмент антитела может необязательно содержать одноцепочечный фрагмент антитела. Дополнительно или в качестве альтернативы фрагмент антитела может содержать несколько цепей, которые связаны друг с другом, например, дисульфидными связями. Фрагмент антитела может необязательно содержать мультимолекулярный комплекс.

В некоторых аспектах в способе согласно настоящей заявке выполняют масс-спектрометрический анализ образца с целью идентификации пептида или белка, содержащего расщепленный линкер и/или модифицированный линкер. В некоторых аспектах способ согласно настоящей заявке дополнительно включает количественный анализ или определение характеристик сайт-специфичного конъюгирования присоединенного компонента на основании результатов количественного анализа расщепленного линкера и модифицированного линкера. В некоторых аспектах масс-спектрометрический анализ в способе согласно о настоящей заявке представляет собой масс-спектроскопию или жидкостную хроматографию с масс-спектроскопией. В некоторых вариантах реализации масс-спектроскопия анализ в способе согласно настоящей заявке может быть выполнена проводят с помощью масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометра с ионизацией наноэлектрораспылением, трехквадрупольного масс-спектрометра, где указанный масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии, при этом масс-спектрометр обеспечивает возможность проведения анализа методами ЖХ-МС (жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией), ЖХ-ММР-МС (жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией в режиме мониторинга множественных реакций) или ЖХ-МС/МС.

В контексте настоящего описания термин «масс-спектрометр» включает устройство, обеспечивающее возможность идентификации конкретных молекулярных частиц и определения их точных масс. Подразумевается, что указанный термин включает любой молекулярный детектор, в котором полипептид или пептид может быть элюирован для обнаружения и/или определения характеристик. Масс-спектрометр может включать три основные части: источник ионов, масс-анализатор и детектор. Роль источника ионов

заключается в обеспечении ионов в газовой фазе. Атомы, молекулы или кластеры аналита могут быть переведены в газовую фазу и ионизированы, либо это может происходить одновременно (как при ионизации электрораспылением). Выбор источника ионов в значительной степени зависит от области применения.

В контексте настоящего описания термин «жидкостная хроматография» относится к процессу, при котором смесь химических соединений, переносимая жидкостью или газом, может быть разделена на компоненты в результате дифференциального распределения химических соединений, когда их поток обтекает неподвижную жидкую или твердую фазу или проходит по ней. Неограничивающие примеры хроматографии включают традиционную обращенно-фазовую (ОФ) хроматографию, ионообменную (ИО) хроматографию, хроматографию со смешанным режимом и нормально-фазовую (НФ) хроматографию.

В контексте настоящего описания термин «ионизация электрораспылением» или «ESI» относится к процессу ионизации распылением, при котором либо катионы, либо анионы, находящиеся в растворе, переходят в газовую фазу посредством образования и десольватации при атмосферном давлении потока высокозаряженных капель, который возникает в результате приложения разности потенциалов между кончиком иглы для электрораспыления, содержащей раствор, и противоэлектродом. Обычно существует три основных этапов получения ионов в газовой фазе из ионов электролита в растворе. К ним относятся: (a) получение заряженных капель на наконечнике для введения электрораспылением; (b) сокращение размеров заряженных капель в результате испарения растворителя и повторного распада капель, приводящего к получению мелких сильно заряженных капель, способных обеспечить получение ионов в газовой фазе; и (c) механизм, посредством которого из очень мелких и сильно заряженных капель образуются ионы в газовой фазе. Этапы (a)-(c) обычно происходят в части устройства, имеющей атмосферное давление. В некоторых аспектах масс-спектрометр с ионизацией электрораспылением может представлять собой масс-спектрометр с ионизацией наноэлектрораспылением.

В контексте настоящего описания термин «трехквадрупольный масс-спектрометр» относится к тандемному масс-спектрометру, состоящему из двух последовательно соединенных квадрупольных масс-анализаторов с (не разрешающей массу) радиочастотой (РЧ), только квадруполь, расположенный между ними, работает как ячейка для диссоциации, индуцированной столкновением. В трехквадрупольном масс-спектрометре образец пептида вводят в систему для ЖХ, соединенную с прибором для МС. Первый квадруполь может использоваться в качестве масс-фильтра для выделения пептидов с целевым значением m/z. Второй квадруполь служит в качестве коллизионной ячейки для разбиения пептида на фрагменты. Третий квадруполь служит в качестве второго масс-фильтра для заданных фрагментов m/z исходного пептида-предшественника. В контексте настоящего описания термин «тандемная масс-спектрометрия» включает метод, в котором информация о структуре молекул образца может быть получена с применением

нескольких этапов отбора по массе и разделения по массе. Необходимым условием является то, что молекулы образца могут быть переведены в газовую фазу и ионизированы в неизменном виде, а также то, что можно вызвать их распад некоторым предсказуемым и контролируемым образом после первого этапа отбора по массе. Многомерная масс-спектрометрия МС/МС, или MC^n, может быть выполнена путем изначального отбора и выделения иона-предшественника (MC^2), его фрагментации, выделения первичного фрагментного иона (MC^3), его фрагментации, выделения вторичного фрагмента (MC^4) и так далее, пока можно получить значимую информацию или можно обнаружить сигнал фрагментного иона. Тандемная МС эффективно выполняется при разнообразных комбинациях анализаторов. То, какие анализаторы следует комбинировать для определенного применения, может определяться множеством различных факторов, таких как чувствительность, селективность и скорость, а также размер, стоимость и доступность. Двумя основными типами методов тандемной МС являются многосекторные (tandem-in-space) и многоэтапные (tandem-in-time), однако существуют также комбинации, в которых многоэтапные тандемные анализаторы объединены в пространстве или соединены с многосекторными тандемными анализаторами. Многосекторный тандемный масс-спектрометр содержит источник ионов, устройство для активации ионов-предшественников и по меньшей мере два масс-анализатора без захвата. Функции специфичного разделения по m/z могут быть выполнены таким образом, что ионы подвергаются отбору в одной секции прибора, диссоциируют в промежуточной области, а затем ионы-продукты передаются в другой анализатор для разделения по m/z и сбора данных. В многоэтапном тандемном масс-спектрометре ионы, образующиеся в источнике ионов, могут быть захвачены, выделены, фрагментированы и разделены по m/z в одном и том же физическом устройстве.

Типовые варианты реализации

В раскрытых в настоящем описании вариантах реализации предложены способы количественного анализа или определения характеристик конъюгирования по меньшей мере одного присоединенного компонента, связанного по меньшей мере с одним специфичным сайтом конъюгирования частично конъюгированного пептида или белка в образце.

В некоторых аспектах в настоящем описании предложен способ количественного анализа или определения характеристик конъюгирования по меньшей мере одного присоединенного компонента, связанного по меньшей мере с одним специфичным сайтом конъюгирования частично конъюгированного пептида или белка в образце, включающий: отщепление части присоединенного компонента с получением пептида или белка, содержащего расщепленный линкер, где указанный присоединенный компонент содержит расщепленный линкер; добавление модифицированного линкера к неконъюгированному сайту конъюгирования частично конъюгированного пептида или белка; и проведение масс-спектрометрического анализа образца с целью идентификации пептида или белка, содержащего расщепленный линкер и/или модифицированный линкер.

В некоторых аспектах часть присоединенного компонента отщепляют с помощью фермента, такого как папаин, катепсин B или плазмин, при этом отношение фермента к субстрату составляет от примерно 1:0,1 до примерно 1:100, от примерно 1:10 до примерно 1:300, от примерно 1:10 до примерно 1:250, предпочтительно примерно 1:20, предпочтительно примерно 1:200, примерно 1:0,2, примерно 1:0,5, примерно 1:1, примерно 1:1,5, примерно 1:2, примерно 1:3, примерно 1:4, примерно 1:5, примерно 1:10, примерно 1:15, примерно 1:25, примерно 1:30, примерно 1:35, примерно 1:40, примерно 1:45, примерно 1:50, примерно 1:55, примерно 1:60, примерно 1:65, примерно 1:70, примерно 1:75, примерно 1:80, примерно 1:85, примерно 1:90 или примерно 1:95. Ферментативное расщепление проводят при температуре примерно 25-45°C в течение периода от примерно 1 мин до ночи; при температуре примерно 37°C в течение примерно 0,5 часа, предпочтительно примерно 1 часа, примерно 1,5 часов, примерно 2 часов, примерно 3 часов или менее чем 4 часов.

В других аспектах к неконъюгированному сайту конъюгирования частично конъюгированного пептида или белка добавляют модифицированный линкер. Модифицированный линкер инкубируют с пептидами при комнатной температуре в течение примерно 2 часов или при температуре примерно 18-37°C в течение периода от примерно 1 мин до ночи; при этом молярное отношение пептида к линкеру предпочтительно составляет примерно 1:500, от примерно 1:10 до примерно 1:2000, примерно 1:20, примерно 1:50, примерно 1:100, примерно 1:200, примерно 1:300, примерно 1:400, примерно 1:600, примерно 1:700, примерно 1:800, примерно 1:1000, примерно 1:1200, примерно 1:1500 или примерно 1:1800.

Следует понимать то, что указанный способ не ограничивается какими-либо из упомянутых выше пептидов, белков, антител, нацеленных на лекарственные средства антител, комплексов антиген-антитело, белковых фармацевтических продуктов, хроматографических колонок или масс-спектрометров.

Последовательное обозначение этапов способа цифрами и/или буквами, представленное в настоящем описании, не предназначено для ограничения способа или любых вариантов его реализации конкретным указанным порядком.

Настоящее раскрытие будет в большей степени понятно с учетом следующих примеров, которые представлены для более подробного описания настоящего раскрытия. Они предназначены для иллюстрации и не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего раскрытия.

ПРИМЕРЫ

Материалы и способы

1. Расщепляемые и модифицированные линкеры

LK1 представляет собой расщепляемый линкер для соединения белка и полезной нагрузки, как показано на ФИГ. 8A. LK1 содержит специфичную аминокислотную последовательность в качестве сайта ферментативного расщепления, например, дипептид валин-аланин (дипептид VA), который распознается протеазами, такими как катепсин B

или папаин. Линкер LK1 может быть конъюгирован с сульфгидрильной группой остатка цистеина пептида или белка с помощью малеимидной присоединяющей группы (mal-amido). Как показано на ФИГ. 8A, присоединяемые компоненты линкера LK1, например, mal-amido-PEG8-VA-PABA, включают ПЭГ8 (полиэтиленгликоль-8) в качестве первого спейсера, дипептид валин-аланин в качестве сайта ферментативного расщепления и PABA в качестве второго спейсера. SG3199, цитотоксическое соединение, представляет собой лекарственное средство - полезную нагрузку, которой нагружают LK1. На ФИГ. 8B представлены присоединяемые компоненты расщепленного LK1, например, mal-amido-PEG8-VA, который образуется после расщепления LK1 протеазой с высвобождением полезной нагрузки, при этом PABA и полезная нагрузка удаляются из конъюгата. При масс-спектрометрическом анализе LK1, включающий полезную нагрузку, обозначен как +1495,7, а расщепленный LK1 обозначен как +762,2. LK2, например, модифицированный линкер LK1 (модифицированный LK1), представляет собой линкер, содержащий ПЭГ8. На ФИГ. 8C представлены присоединяемые компоненты линкера LK2. Линкер LK2 может быть конъюгирован с сульфгидрильной группой остатка цистеина пептида или белка с помощью малеимидной присоединяющей группы (mal-amido). Существует разница в массе между расщепленным LK1 (ФИГ. 8B) и LK2 (ФИГ. 8C), поскольку LK2 не содержит дипептида валин-аланин. LK2 может быть конъюгирован с сульфгидрильной группой остатка цистеина пептида или белка с помощью малеимидной присоединяющей группы, например, mal-amido-PEG8-COOH. При масс-спектрометрическом анализе LK2 обозначен как +592,3. При масс-спектрометрическом анализе LK1, включающий полезную нагрузку, обозначен как +1495,7, а расщепленный LK1 обозначен как +762,2. Молекулярная масса PABA (пара-аминобензилового спирта) составляет примерно 137,1 Да. Молекулярная масса SG3199 (лекарственного средства - полезной нагрузки) составляет примерно 584,7 Да.

LK3 представляет собой расщепляемый линкер для соединения белка и полезной нагрузки, как показано на ФИГ. 8D. LK3 содержит специфичную аминокислотную последовательность в качестве сайта ферментативного расщепления, например, дипептид валин-цитруллин (дипептид Val-Cit), который распознается протеазами, такими как катепсин B или папаин. Линкер LK3 может быть конъюгирован с сульфгидрильной группой остатка цистеина пептида или белка с помощью малеимидной присоединяющей группы (mal-amido). Как показано на ФИГ. 8D, присоединяемые компоненты линкера LK3, например, mal-amido-Val-Cit-PABA, включают дипептид валин-цитруллин в качестве сайта ферментативного расщепления и PABA в качестве спейсера. Майтанзиноид (May), цитотоксическое соединение, представляет собой лекарственное средство - полезную нагрузку, которой нагружают LK3. На ФИГ. 8E представлены присоединяемые компоненты расщепленного LK3, например, mal-amido-Val-Cit, который образуется после расщепления LK3 протеазой с высвобождением полезной нагрузки, при этом PABA и полезная нагрузка удаляются из конъюгата. При масс-спектрометрическом анализе LK3, включающий полезную нагрузку, обозначен как +1332,6, а расщепленный

LK3 обозначен как +467,2. LK4, например, модифицированный линкер LK3 (модифицированный LK3), представляет собой линкер, содержащий дипептид валин-цитруллин. На ФИГ. 8F представлены присоединяемые компоненты линкера LK4. Линкер LK4 может быть конъюгирован с сульфгидрильной группой остатка цистеина пептида или белка с помощью малеимидной присоединяющей группы, например, mal-amido-Val-Cit. При масс-спектрометрическом анализе LK4 обозначен как +453,2. При масс-спектрометрическом анализе LK3, включающий майтанзиноид в качестве полезной нагрузки, обозначен как +1332,6, а расщепленный LK3 обозначен как +467,2.

LK5 представляет собой расщепляемый линкер для соединения белка и полезной нагрузки, как показано на ФИГ. 8G. LK5 содержит специфичную аминокислотную последовательность в качестве сайта ферментативного расщепления, например, дипептид валин-цитруллин (дипептид Val-Cit), который распознается протеазами, такими как катепсин B или папаин. Линкер LK5 может быть конъюгирован с остатком лизина пептида или белка посредством лизин-амидного сочетания с применением активированного сложного эфира карбоновой кислоты или сложного эфира NHS. Как показано на ФИГ. 8G, присоединяемые компоненты линкера LK5, например, adip-Val-Cit-PAB-NMe, включают дипептид валин-цитруллин в качестве сайта ферментативного расщепления. Майтанзиноид (May), цитотоксическое соединение, представляет собой лекарственное средство - полезную нагрузку, которой нагружают LK5. На ФИГ. 8H представлены присоединяемые компоненты расщепленного LK5, например, adip-Val-Cit, который образуется после расщепления LK5 протеазой с высвобождением полезной нагрузки. При масс-спектрометрическом анализе LK5, включающий полезную нагрузку, обозначен как +1249,6, а расщепленный LK5 обозначен как +384,2. На ФИГ. 8I представлена структурная формула неконъюгированного остатка лизина антитела.

2. Получение конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC)

Для получения ADC применяли MAB1, например, моноклональное антитело (IgG1) с мутацией в остатке 297 (N297Q). Вследствие мутации в остатке 297 MAB1 лишен сайта гликозилирования. Как показано на ФИГ. 9A, межцепочечные дисульфидные связи антитела были восстановлены с получением сульфгидрильных групп (-SH) в остатках цистеина антитела. Затем полученные сульфгидрильные группы применяли в качестве сайтов конъюгирования для получения ADC. Буфер для образца ADC содержал ФСБ с 5% глицерина. Как показано на ФИГ. 9B, линкер LK1, содержащий полезную нагрузку - лекарственное средство SG3199, конъюгировали с остатком цистеина MAB1 через малеимидную присоединяющую группу с получением ADC. Полученный ADC MAB1-LK1, например, Ab-mal-amido-PEG8-VA-PABA-SG3199, имеет сайт расщепления для высвобождения полезной нагрузки - лекарственного средства. Значение DAR для ADC MAB1-LK1-SG3199 составляет примерно 3,6. Молекулярная масса LK1, включая полезную нагрузку SG3199, составляет примерно 1495,7 Да. Длина спейсерной группы ПЭГ, например, ПЭГ8, составляет примерно 30,8 Å. Расщепляемый протеазой сайт ADC MAB1-LK1-SG3199 представляет собой дипептид валин-аланин (Val-Ala, или VA).

Как показано на ФИГ. 9C, линкер LK3, содержащий полезную нагрузку - лекарственное средство майтанзиноид (May), конъюгировали с остатком цистеина MAB1 через малеимидную присоединяющую группу с получением ADC. Полученный ADC MAB1-LK3-May, например, Ab-mal-amido-Val-Cit-PABA-майтанзиноид (Ab-MC-VCit-PABA-NME-May), имеет сайт расщепления для высвобождения полезной нагрузки - лекарственного средства. Значение DAR для ADC MAB1-LK3-May составляет примерно 2,2. Молекулярная масса LK3, включая полезную нагрузку - майтанзиноид, составляет примерно 1332,6 Да. Расщепляемый протеазой сайт ADC MAB1-LK3-May представляет собой дипептид валин-цитруллин (Val-Cit, или VCit). L-цитруллин (Cit) является встречающейся в природе аминокислотой, которая может быть превращена в L-аргинин и оксид азота.

Связанные по остаткам лизина конъюгаты антител получали с применением MAB2 и LK5. Линкеры LK5 конъюгировали с остатками лизина MAB2 посредством лизин-амидного сочетания с применением активированного сложного эфира карбоновой кислоты или сложного эфира NHS. В каждой тяжелой цепи имеется примерно 25 остатков лизина, и в каждой легкой цепи имеется примерно 10 остатков лизина. MAB2 представляет собой биспецифичное антитело, нацеленное на два различных эпитопа. Получали две различные партии ADC MAB2-LK5, которые имели значения DAR, составляющие примерно 2,9 и 2,7, соответственно.

3. Расщепление с помощью Glu-C

Glu-C представляет собой сериновую протеазу, выделенную из Staphylococcus aureus. Glu-C, например, протеаза V-8, представляет собой эндопротеиназу, которая специфично расщепляет карбоксильную часть остатков глутаминовой кислоты при проведении реакций в буферах на основе бикарбоната аммония и ацетата аммония с получением ограниченного количества пептидных фрагментов. Расщепление под действием Glu-C также может происходить как по остаткам глутаминовой кислоты, так и по остаткам аспарагиновой кислоты в фосфатных буферах. Glu-C представляет собой высокоспецифичную эндопротеиназу, применяемую для улучшения охвата последовательности при масс-спектрометрическом методе идентификации белков. Glu-C может быть применена отдельно или совместно с трипсином или другими протеазами при получении гидролизатов комплементарных белков для картирования пептидов и секвенирования белков. Glu-C может снижать C-концевую гетерогенность пептида шарнирной области (TH↑T↑CPPCPAPE↑L).

4. Расщепление с помощью Asp-N

Asp-N представляет собой цинковую металлопротеиназу, которая может быть применена отдельно или параллельно с трипсином или другими протеазами при получении гидролизатов белков для картирования пептидов и секвенирования белков. Asp-N представляет собой эндопротеиназу, которая расщепляет преимущественно аминную часть остатков аспарагиновой кислоты и остатков цистеиновой кислоты, которые образуются в результате окисления остатков цистеина, с получением

ограниченного количества пептидных фрагментов. Расщепление под действием Asp-N также может происходить по остаткам глутаминовой кислоты. AspN способна эффективно расщеплять белок за 2-20 часов при 37°C.

5. Приготовление реагентов для эксперимента

4.1. Подвижная фаза A (0,05% ТФУ в воде Milli-Q) для масс-спектрометрии: К 2 л воды Milli-Q в бутыли объемом 2 л из стекла Pyrex добавить 1 мл ТФУ (трифторуксусной кислоты). Перевернуть бутыль 3-4 раза для перемешивания. Хранить при комнатной температуре до 3 месяцев.

4.2. Подвижная фаза B (0,045% ТФУ в ацетонитриле) для масс-спектрометрии: К 1 л ацетонитрила в бутыли объемом 1 л из стекла Pyrex добавить 0,45 мл ТФУ. Перевернуть бутыль 3-4 раза для перемешивания. Хранить при комнатной температуре до 3 месяцев.

4.3. 5 мМ раствор уксусной кислоты: Разбавить 14,3 мкл ледяной уксусной кислоты до 50 мл водой Milli-Q и хорошо перемешать. Хранить при 4ºC до 3 месяцев.

4.4. 0,1 М стоковый раствор TCEP: Растворить 28,7 мг TCEP-HCl (трис-(2-карбоксиэтил)-фосфина гидрохлорида) в воде Milli-Q и довести конечный объем до 1 мл. Приготовить аликвоты по 50 мкл и хранить при -20ºC до 3 месяцев.

4.5. 8 М мочевина в 100 мМ Трис-HCl: Растворить 0,48 г мочевины в 640 мкл 100 мМ Трис-HCl, pH 7,5, довести конечный объем до 1 мл. Перемешать вихревым способом до полного растворения и центрифугировать при 14000 g в течение 3 минут, используя микроцентрифугу. Каждый раз готовить свежий. Для проведения эксперимента взвешивали 0,4829 г мочевины.

4.6. 5% раствор ТФУ: Разбавить 10 мкл ТФУ в 190 мкл воды Milli-Q, хорошо перемешать.

4.7. Стоковые растворы, содержащие 0,1 мг/мкл новой метки: Растворить 10 мг каждой метки в 100 мкл ДМСО (диметилсульфоксида) с получением стокового раствора, содержащего 0,1 мг/мкл. Приготовить аликвоты по 2 мкл в каждой.

4.8. Буфер для активации папаина (1,1 мМ ЭДТА, 0,067 мМ меркаптоэтанола и 5,5 мМ цистеина): К 2 мл воды добавить 4,4 мкл 0,5 М ЭДТА, 2,4 мкл 55 мМ меркаптоэтанола и 1,73 мг цистеина, хорошо перемешать.

6. Способ тестирования новых меток

В соответствии с концентрацией образцов ADC перенести 25 мкг каждого образца ADC в новую микроцентрифужную пробирку и добавить воды до общего объема 10 мкл. Разбавить 20 мкл суспензии папаина (10 мг/мл) в 180 мкл буфера для расщепления папаином, инкубировать при 37°C в течение 30 мин. Разбавить 30 мкл папаина (номинальная концентрация 1 мг/мл) в 120 мкл буфера для активации до номинальной концентрации 0,2 мг/мл. Определить концентрацию папаина с помощью анализа поглощения в УФ (ультрафиолетовой) области спектра при 280 нм и 320 нм, используя буфер для активации папаина в качестве холостой пробы буфера. Разбавить активированный папаин до конечной концентрации 0,1 мг/мл буфером для активации папаина. К интактному ADC добавить 1,25 мкл раствора папаина с концентрацией 0,1

мг/мл (отношение фермент: субстрат составляет 1:200), инкубировать при 37°C в течение 1 часа. К каждому образцу добавить 0,5 мкл 0,1 М TCEP-HCl. Перемешать образцы вихревым способом в течение 3 секунд, и затем осадить образцы с помощью миницентрифуги в течение 3 секунд. Инкубировать образцы при 95°C в течение 20 минут при встряхивании со скоростью 800 об./мин в термомиксере. После инкубирования охладить образцы до комнатной температуры в течение 5 минут. Осадить конденсат с помощью миницентрифуги в течение 3 секунд. К каждому образцу добавить 6 мкл 8 М мочевины в 1 М Трис-HCl, pH 7,5. Развести модифицированный трипсин подходящей для секвенирования степени чистоты (20 мкг/флакон) в 520 мкл воды Milli-Q до конечной концентрации 0,038 мкг/мкл. Если необходимо несколько флаконов трипсина, объединить растворы трипсина из разных флаконов. К каждому образцу добавить 32,5 мкл 0,038 мкг/мкл раствора трипсина. Инкубировать образцы при 37°C в темноте в течение 3 часов при встряхивании со скоростью 800 об./мин в термомиксере. Разбавить 0,1 М TCEP до 0,05 М TCEP водой. В каждый образец внести 0,8 мкл 0,05 М TCEP. Развести Glu-C подходящей для секвенирования степени чистоты (10 мкг/флакон) в 40 мкл воды Milli-Q до конечной концентрации 0,25 мкг/мкл. К каждому образцу добавить 5 мкл раствора Glu-C с концентрацией 0,25 мкг/мкл. Инкубировать образцы при 37°C в темноте в течение 1,5 ч при встряхивании со скоростью 800 об./мин в термомиксере. Разбавить линкер-метку ДМСО или водой, внести линкер-метку (с учетом структур линкеров различных ADC) в каждый образец с получением избытка линкера по отношению к свободным сульфгидрильным группам ADC. Инкубировать при комнатной температуре в течение 2 ч. Подкислить смеси для расщепления 0,6 мкл 5% ТФУ. Ввести 10 мкл каждого образца в систему Waters Acquity I-Class UPLC, соединенную с масс-спектрометром Q Exactive или Q Exactive Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap от Thermo Scientific. Хранить оставшиеся расщепленные образцы в морозильной камере при -80°C. Заморозить оставшуюся часть раствора для эксперимента по оптимизации ферментативного мечения.

Пример 1. Определение отношения лекарственное средство-антитело в ADC MAB1-LK1

Отношение лекарственное средство-антитело (DAR) в ADC MAB1-LK1 определяли с помощью анализа массы интактного вещества. Среднее значение DAR было рассчитано и оценено как 2,34, как показано на ФИГ. 10 (ось X: интенсивность/[количество]; ось Y: наблюдаемая масса [m/z] от 1,45e5 до 1,58e5). ADC MAB1-LK1 являются гетерогенными и имеют различные варианты, такие как варианты размера и варианты заряда.

Пример 2. Удаление полезной нагрузки из ADC

Для удаления полезной нагрузки из ADC MAB1-LK1 применяли папаин. Папаин (1 мг/мл) активировали в буфере для активации папаина (1,1 мМ ЭДТА, 0,067 мМ меркаптоэтанола и 5,5 мМ цистеина) при 37°C в течение 30 минут. ADC MAB1-LK1 расщепляли трипсином с получением смеси триптических пептидов. Затем смесь триптических пептидов расщепляли с применением активированного папаина при 37°C в

течение примерно или менее 4 часов для удаления полезной нагрузки, например, SG3199. Отношение фермента к субстрату составляет 1:20. Восстанавливали межцепочечные дисульфидные связи между тяжелой цепью и легкой цепью. Два триптических пептида, например, SCDK (серин-цистеин-аспарагиновая кислота-лизин) и GEC (глицин-глутаминовая кислота-цистеин), анализировали с помощью ЖХ-МС. Полезная нагрузка была полностью удалена в течение 1 часа, как показано на ФИГ. 11. Папаин может распознавать дипептид валин-аланин в линкере LK1. Сайт расщепления папаином находится между дипептидом валин-аланин и PABA, как показано на ФИГ. 9B. PABA и SG3199 удаляли из присоединяемых компонентов линкера LK1 после расщепления папаином, что приводило к снижению массы. Триптический пептид, содержащий LK1, обозначен как +1495,7 (включая полезную нагрузку) на ФИГ. 11. Триптический пептид, содержащий расщепленный LK1, обозначен как +762,4 на ФИГ. 11.

Полное отщепление удаляемой полезной нагрузки при применении расщепления папаином было достигнуто при отношении фермента к субстрату 1:20 в течение 1 часа при 37 °C. Активность папаина блокировали с помощью обратимого ингибитора папаина (такого как GGYR) или необратимого ингибитора папаина (такого как химостатин) в сочетании с этаом нагревания при 95°C в течение 20 минут для завершения реакции расщепления.

Пример 3. Расщепление триптического пептида шарнирной области с помощью папаина

ADC MAB1-LK1 расщепляли трипсином, и затем расщепляли папаином с получением пептидов для анализа методом ЖХ-МС. Папаин применяли для удаления полезной нагрузки посредством распознавания дипептида валин-аланин в LK1. Как показано на ФИГ. 9B, сайт расщепления папаином расположен между дипептидом валин-аланин и PABA в линкере LK1. Папаин является протеазой, которая преимущественно расщепляет сайт вблизи объемных гидрофобных или ароматических аминокислот, как показано на ФИГ. 12A. Следовательно, папаин также способен расщеплять триптические пептиды с получением более мелких фрагментов. Когда антитело расщепляют трипсином с получением триптических пептидов, образуется триптический пептид, первоначально расположенный в шарнирной области антитела, имеющий аминокислотную последовательность THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK (SEQ ID NO.: 1). Этот триптический пептид шарнирной области содержит два остатка цистеина (C), которые являются сайтами конъюгирования для присоединения звена линкер- полезная нагрузка через малеимидную присоединяющую группу. Этот триптический пептид шарнирной области также содержит несколько сайтов расщепления папаином, как показано на ФИГ. 12B. Сайты расщепления папаином указаны стрелками на ФИГ. 12B.

ADC MAB1-LK1 расщепляли трипсином с получением смеси триптических пептидов. Затем смесь триптических пептидов расщепляли с применением активированного папаина. Триптический пептид шарнирной области, расщепленный папаином, анализировали с помощью ЖХ-МС, как показано на ФИГ. 13A-13C.

Триптический пептид, содержащий LK1, обозначен как имеющий массу +1495,7 (включая полезную нагрузку) на ФИГ. 13A. Триптический пептид, содержащий расщепленный LK1, обозначен как имеющий массу +762,4 на ФИГ. 13A-13C. На ФИГ. 13A-13C представлены результаты анализа триптического пептида шарнирной области (ФИГ. 13A, аминокислотная последовательность THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK (SEQ ID NO.: 1)), пептида с аминокислотной последовательностью CPPCPAPE (SEQ ID NO.: 2) (ФИГ. 13B, триптический пептид шарнирной области, расщепленный папаином) и пептида с аминокислотной последовательностью CPPCPAPELL (SEQ ID NO.: 3) (ФИГ. 13C, триптический пептид шарнирной области, расщепленный папаином). Эти пептиды могут содержать LK1 (обозначен как +1495,7, включая полезную нагрузку) или расщепленный LK1 (обозначен как +762,4).

Пример 4. Присоединение модифицированных линкеров к неконъюгированным остаткам цистеина

ADC MAB1-LK1 с высоким или низким значением DAR расщепляли трипсином с получением смеси триптических пептидов. Папаин применяли для удаления полезной нагрузки посредством распознавания дипептида валин-аланин в LK1. Папаин также способен расщеплять триптические пептиды с получением более мелких фрагментов. Смесь триптических пептидов расщепляли папаином, и затем применяли модифицированный линкер для мечения расщепленных папаином триптических пептидов. Модифицированный линкер, содержащий PEG8-COOH (представлен на ФИГ. 8C), инкубировали с пептидами в 2 мМ TCEP (трис-(2-карбоксиэтил)-фосфине) при комнатной температуре в течение примерно 2 часов при молярном отношении пептида к линкеру 1:500. Модифицированные линкеры присоединяли к неконъюгированным остаткам цистеина через малеимидную присоединяющую группу для увеличения массы пептидов. Следовательно, масса пептида, содержащего неконъюгированный остаток цистеина, уравновешивается в отношении различий в массе по сравнению с конъюгированным пептидом, содержащим расщепленный LK1. На ФИГ. 14 представлена эффективность мечения линкером для пептида шарнирной области. Пептид шарнирной области содержит два остатка цистеина. Как показано на ФИГ. 14, большинство пептидов шарнирной области имеют двойные метки, что указывает на завершение присоединения модифицированного линкера, LK2, к неконъюгированным остаткам цистеина. Вследствие завершения присоединения линкера имеется возможность рассчитать сайт-специфичное конъюгирование лекарственного средства на основании результатов количественного определения меток расщепленных LK1 и LK2, например, сайт-специфичное конъюгирование лекарственного средства=(меченый расщепленным LK1) / (меченый LK2+меченый расщепленным LK1).

Пример 5. Расщепление с помощью Glu-C с последующим анализом методом ЖХ-МС

ADC MAB1-LK1 расщепляли трипсином с получением смеси триптических пептидов. Папаин применяли для удаления полезной нагрузки посредством распознавания

дипептида валин-аланин в LK1. Папаин также способен расщеплять триптические пептиды с получением более мелких фрагментов. Смесь триптических пептидов расщепляли папаином (примерно 30 минут), и затем применяли модифицированный линкер, например, LK2, для мечения неконъюгированных сайтов конъюгирования в расщепленных папаином триптических пептидах. После мечения LK2 и до проведения анализа методом ЖХ-МС смесь пептидов расщепляли с применением Glu-C. После расщепления папаином было получено более 9 пептидов шарнирной области. Вследствие применения Glu-C профиль пептидов шарнирной области сократился до трех пептидов (аминокислотные последовательности THTCPPCPAPE,(SEQ ID NO.: 4), TCPPCPAPE,(SEQ ID NO.: 5) и CPPCPAPE (SEQ ID NO.: 6)), что существенно упростило количественный анализ с применением ЖХ-МС, как показано на ФИГ. 15. Для расщепления с применением Glu-C отношение фермента к субстрату составляет 1:20 при 37°C в течение примерно 3 часов.

Пример 6. Сайт-специфичный количественный анализ конъюгирования лекарственного средства в ADC MAB1-LK1

Два образца ADC MAB1-LK1, например, один с низким значением DAR и другой с высоким значением DAR, анализировали с применением способа согласно настоящей заявке, как показано на ФИГ. 6A, где выполняют этап удаления полезной нагрузки с помощью папаина, после чего проводят этап добавления модифицированного линкера к неконъюгированному сайту конъюгирования. Два образца ADC MAB1-LK1 расщепляли трипсином с получением смеси триптических пептидов, и затем расщепляли папаином для удаления полезной нагрузки посредством распознавания дипептида валин-аланин в LK1. Затем применяли модифицированный линкер, например, LK2, для мечения неконъюгированных сайтов конъюгирования в расщепленных папаином триптических пептидах. После мечения LK2 пептиды расщепляли с применением Glu-C с последующим анализом методом ЖХ-МС. Образец ADC MAB1-LK1 с низким значением DAR, например, MAB1-LK1-L19, имеет расчетное значение DAR 1,9 (интактный, ESI). Образец ADC MAB1-LK1 с высоким значением DAR, например, MAB1-LK1-L8, имеет расчетное значение DAR 3,6 (интактный, ESI). Каждый образец ADC MAB1-LK1 был приготовлен в трех повторностях (n=3). На ФИГ. 16 представлен сайт-специфичный количественный анализ конъюгирования лекарственного средства в ADC MAB1-LK1. Показана площадь пика двух пептидов, например, пептидов с аминокислотными последовательностями SCDK или GEC. Эти пептиды могут содержать расщепленный LK1 (обозначен как +762,4) и/или LK2 (обозначен как +592,3). Площадь пика пептида, содержащего LK2 (+592,3), отражает количественную оценку сайта конъюгирования, который изначально не был конъюгирован. Площадь пика пептида, содержащего расщепленный LK1 (+762,4), отражает количественную оценку сайта конъюгирования, который изначально был конъюгирован с одной молекулой лекарственного средства - полезной нагрузки. Помимо этого, способ согласно настоящей заявке, например, способ, представленный на ФИГ. 6A, продемонстрировал хорошую внутрисуточную прецизионность, как показано на ФИГ. 17,

поскольку рассчитанные в соответствии со способом согласно настоящей заявке значения DAR были сопоставимы со значениями, полученными методом анализа массы интактного вещества. На ФИГ. 17 представлены результаты анализа пептида GEC, пептида SCDK и пептидов шарнирной области.

Пример 7. Мечение модифицированным линкером с последующим удалением полезной нагрузки

Проводили параллельное сравнение двух способов, например, способов, представленных на ФИГ. 6A и 6B. Один способ, показанный на ФИГ. 6A, применяли для анализа образцов ADC MAB1-LK1, при этом выполняли этап удаления полезной нагрузки с помощью папаина, после чего проводили этап мечения модифицированным линкером (LK2). Образец ADC MAB1-LK1 расщепляли трипсином с получением смеси триптических пептидов. Затем триптические пептиды расщепляли папаином для удаления полезной нагрузки посредством распознавания дипептида валин-аланин в LK1. Затем применяли модифицированный линкер, например, LK2, для мечения неконъюгированных сайтов конъюгирования пептидов. Затем пептиды расщепляли с применением Glu-C с последующим анализом методом ЖХ-МС. Результаты анализа представлены на ФИГ. 18A.

Другой способ, показанный на ФИГ. 6B, применяли для анализа образцов ADC MAB1-LK1, при этом выполняли этап мечения модифицированным линкером (LK2), после чего проводили этап удаления полезной нагрузки с помощью папаина. Образец ADC MAB1-LK1 расщепляли трипсином с получением смеси триптических пептидов. Затем применяли модифицированный линкер, например, LK2, для мечения неконъюгированных сайтов конъюгирования триптических пептидов. Затем пептиды расщепляли папаином для удаления полезной нагрузки посредством распознавания дипептида валин-аланин в LK1. Затем пептиды расщепляли с применением Glu-C с последующим анализом методом ЖХ-МС. Результаты анализа представлены на ФИГ. 18B.

Результаты сравнения представлены на ФИГ. 18A и 18B. На ФИГ. 18A представлены результаты проведения расщепления папаином с последующим присоединением LK2 в соответствии со способом, показанным на ФИГ. 6A. На ФИГ. 18B представлены результаты проведения присоединения LK2 с последующим расщеплением папаином в соответствии со способом, показанным на ФИГ. 6B. Анализировали образцы ADC MAB1-LK1 с высоким значением DAR. (+592,3, +592,3) указывает на отсутствие конъюгирования. (+762,4, +592,3) указывает на конъюгирование одной молекулы лекарственного средства. (+762,4, +762,4) указывает на конъюгирование двух молекул лекарственного средства. Присутствие конъюгированных нагрузок - лекарственных веществ может обеспечивать сайты предпочтительного расщепления папаином в пептидах шарнирной области. Предпочтительное расщепление папаином может вызывать эффекты пространственных затруднений, такие как эффекты «свидетеля». В случае, если выполняли этап мечения модифицированным линкером (LK2), после чего проводили этап

удаления полезной нагрузки с помощью папаина, предпочтительное расщепление папаином было снижено.

Пример 8. Расщепление папаином в качестве начального этапа

В связи с факторами, связанными с неспецифичным расщеплением ADC папаином, были протестированы несколько этапов в различных последовательностях, чтобы свести к минимуму указанное неспецифичное расщепление. Несколько ADC первоначально расщепляли папаином с удалением полезной нагрузки, после чего проводили другие этапы, как то последующее расщепление образца трипсином, расщепление образца с применением Glu-C или конъюгирование модифицированных линкеров с неконъюгированными сульфгидрильными группами (например, мечение).

Было обнаружено, что предпочтительная последовательность нескольких этапов заключалась в первоначальном расщеплении образца ADC папаином с удалением полезной нагрузки с последующим восстановлением и денатурацией, последующим расщеплением образца трипсином, последующим расщеплением полученной смеси триптических пептидов с помощью Glu-C; последующим конъюгированием модифицированных линкеров с неконъюгированными сульфгидрильными группами (например, мечением) и последующим проведением анализа смеси пептидов методом ЖХ-МС, как показано на ФИГ. 6C.

Триптические пептиды, полученные в результате анализа ADC, дополнительно исследовали в отношении фрагментации. Идентификаторы (ID) некоторых пептидов были изменены вследствие интенсивной фрагментации дипептидных структур линкера. Триптический пептид SCDK, содержащий расщепленный LK1 (mal-amido-PEG8-Val-Ala) или расщепленный LK3 (mal-amido-Val-Cit), анализировали на наличие интенсивной фрагментации, в результате которой образуются небольшие компоненты. На ФИГ. 19A представлен масс-спектрометрический анализ интенсивной фрагментации дипептидных структур линкера для триптического пептида SCDK, содержащего расщепленный LK1 (mal-amido-PEG8-Val-Ala). На ФИГ. 19B представлен масс-спектрометрический анализ интенсивной фрагментации дипептидных структур линкера для триптического пептида SCDK, содержащего расщепленный LK3 (mal-amido-Val-Cit).

Некоторые пептиды, содержащие сайты конъюгирования, были выбраны в качестве суррогатных пептидов. Как показано в таблице 1, некоторые пептиды, содержащие расщепленный LK1 или LK3, были выбраны в качестве суррогатных пептидов, включая пептиды GEC, пептиды SCDK и пептиды шарнирной области. Эти суррогатные пептиды охватывают более 95% подобных пептидов. На ФИГ. 20A представлено процентное содержание конкретных суррогатных пептидов во всех пептидах, идентифицированных для образцов ADC MAB1-LK1. На ФИГ. 20B представлено процентное содержание конкретных суррогатных пептидов во всех пептидах, идентифицированных для образцов ADC MAB1-LK3.

Таблица 1. Суррогатные пептиды

Сайт конъюгирования	Суррогатные пептиды с расщепленным LK1 или LK3
GEC (1 молекула ЛС)	GEC, SFNRGEC
SCDK (1 молекула ЛС)	SCDK, SCDKTHT
Шарнирная область (0 молекул ЛС)	THTCPPCPAPE, TCPPCPAPEL, TCPPCPAPE
Шарнирная область (1 молекула ЛС)	THTCPPCPAPE, TCPPCPAPEL, TCPPCPAPE, CPPCPAPE
Шарнирная область (2 молекулы ЛС)	TCPPCPAPEL, TCPPCPAPE, CPPCPAPE

Условия расщепления папаином оптимизировали с помощью мониторинга площадей пиков суррогатных пептидов. Исследовали различные значения отношения папаина к субстрату, такие как 1:20, 1:50, 1:100 и 1:200, для анализа образцов ADC MAB1-LK1 и ADC MAB1-LK3. Общая площадь пиков суррогатных пептидов уменьшалась при более высоких концентрациях папаина. На ФИГ. 21A представлены площади пиков суррогатных пептидов при различных значениях отношения папаина к субстрату для анализа образцов ADC MAB1-LK1. На ФИГ. 21B представлены площади пиков суррогатных пептидов при различных значениях отношения папаина к субстрату для анализа образцов ADC MAB1-LK3. Результаты показали, что отношение папаина к субстрату, составляющее 1:200, являлось предпочтительным как для ADC MAB1-LK1, так и для ADC MAB1-LK3.

Условия расщепления папаином также оптимизировали в отношении выбора предпочтительного периода времени расщепления. Присутствие полезной нагрузки интактным линкером определяли при различном времени инкубирования во время расщепления папаином путем мониторинга площадей пиков пептидов, содержащих интактный LK1 или LK3. На ФИГ. 22 представлены площади пиков суррогатных пептидов, содержащих LK1 или LK3, таких как GEC, SCDK или шарнирный пептид, содержащий один или два интактных LK1 или LK3, при различном времени инкубирования. Что касается расщепления MAB1-LK1 папаином, полезная нагрузка интактным линкером LK1 (содержащим дипептид Val-Ala) не обнаруживалась после одного часа расщепления папаином. Что касается расщепления MAB1-LK3 папаином, полезная нагрузка интактным линкером LK3 (содержащим дипептид Val-Cit) не обнаруживалась после пяти минут расщепления папаином. Результаты показали, что предпочтительное время расщепления папаином составляет один час. Период времени для достижения завершения расщепления папаином с удалением полезной нагрузки для LK3, например, субстрата, содержащего дипептид Val-Cit, был более коротким по сравнению с таковым для LK1, например, субстрата, содержащего дипептид Val-Ala.

Условия расщепления папаином также оптимизировали в отношении выбора предпочтительного периода времени расщепления с помощью мониторинга полезной

нагрузки расщепленным линкером. Присутствие полезной нагрузки расщепленным линкером определяли при различном времени инкубирования во время расщепления папаином путем мониторинга площадей пиков пептидов, содержащих расщепленный LK1 или LK3. На ФИГ. 23 представлены площади пиков суррогатных пептидов, содержащих LK1 или LK3, таких как GEC, SCDK или шарнирный пептид, содержащий один или два расщепленных LK1 или LK3, при различном времени инкубирования. Также отслеживали площади пиков шарнирных пептидов, не содержащих расщепленного линкера. Полное расщепление папаином с удалением полезной нагрузки - лекарственного средства как для LK1, так и для LK3 было достигнуто в течение одного часа инкубирования. Результаты показали, что предпочтительное время расщепления папаином составляет один час при условии, что отношение папаина к субстрату составляет 1:200.

Сайт-специфичный количественный анализ конъюгирования LK1 для ADC MAB1-LK1 осуществляли путем анализа сайтов конъюгирования в GEC, SCDK и пептидах шарнирной области, как показано на ФИГ. 24A. Сайт-специфичный количественный анализ конъюгирования LK3 для ADC MAB1-LK3 осуществляли путем анализа сайтов конъюгирования в GEC, SCDK и пептидах шарнирной области, как показано на ФИГ. 24B. Процент конъюгирования определяли на основании процентного содержания конъюгированных молекул лекарственных средств, присутствующих в конкретном пептиде. Например, процент конъюгирования шарнирной области можно определить с помощью формулы:

Процент конъюгирования (шарнирная область)=0 x (процент с 0 молекул ЛС) + 1 x (процент с 1 молекулой ЛС) + 2 x (процент с 2 молекулами ЛС)

Помимо этого, способ согласно настоящей заявке, например, способ, представленный на ФИГ. 6C, продемонстрировал хорошую внутрисуточную и межсуточную прецизионность, поскольку рассчитанные в соответствии со способом согласно настоящей заявке значения DAR были сопоставимы со значениями, полученными методом анализа массы интактного вещества. На ФИГ. 25 представлена внутрисуточная и межсуточная прецизионность способа согласно настоящей заявке в отношении результатов анализа DAR пептида GEC, пептида SCDK и пептидов шарнирной области. Была продемонстрирована хорошая внутрисуточная и межсуточная прецизионность сайт-специфичного количественного определения конъюгирования линкер-лекарственное средство для анализа ADC MAB1-LK1 и ADC MAB1-LK3, поскольку рассчитанные общие значения DAR были сопоставимы со значениями, полученными методом анализа массы интактного вещества. Значения DAR рассчитывали с помощью формулы:

DAR=[степень конъюгирования (шарнирная область) + степень конъюгирования (GEC) + степень конъюгирования (SCDK)] x 2.

ADC MAB1-LK1 исследовали в отношении различий от партии к партии и стабильности конъюгирования в различных сайтах конъюгирования, как показано в таблице 2. Две различные партии ADC MAB1-LK1, например, MAB1-LK1-L8 и MAB1-

LK1-L22, исследовали с целью наблюдения распределения конъюгирования лекарственного средства. Значение DAR для MAB1-LK1-L8 составило 3,6. Значение DAR для MAB1-LK1-L22 составило 3,65. На ФИГ. 26 показаны различия от партии к партии в распределении конъюгирования лекарственного средства для MAB1-LK1-L8 и MAB1-LK1-L22, определенном путем анализа сайтов конъюгирования в GEC, SCDK и пептидах шарнирной области.

Таблица 2. Различия от партии к партии и стабильность конъюгирования

Образцы	Партия	Условия воздействия	Концентрация (мг/мл)	Объем (мкл)	Буфер
1	MAB1-LK1-L8 (ESI: DAR 3,6)	/	5	400	PBS-G
2	MAB1-LK1-L22 (ESI: DAR 3,65)	/	4	100	10 мМ гистидин, pH 5,5
3	MAB1-LK1-L22	40 °C, 28 дней	4	100	10 мМ гистидин, pH 5,5
4	MAB1-LK1-L22	40 °C, 28 дней	4	100	10 мМ гистидин, pH 6,0
5	MAB1-LK1-L22	40 °C, 28 дней	4	100	10 мМ гистидин, pH 6,5

Пример 9. **Стабильность конъюгирования с пептидом SCDK**

Анализировали стабильность конъюгирования связанных по остатку цистеина ADC, поскольку Sanderson et al. показали, что связанный по остатку цистеина ADC антитела к CD30 обладал низкой стабильностью конъюгирования в тяжелых цепях антител (Sanderson et al., In vivo drug-linker stability of an anti-CD30 dipeptide-linked auristatin immunoconjugate, Clin Cancer Res. 2005 Jan 15;11:843-852). ADC MAB1-LK1 анализировали в условиях термического воздействия путем анализа снижения конъюгирования LK1. На ФИГ. 27 представлен процент снижения конъюгирования LK1 для ADC MAB1-LK1 в условиях термического воздействия при 40°C в течение 28 дней, определенный путем анализа GEC, SCDK и пептидов шарнирной области при различных значениях pH, таких как pH 5,5, pH 6 и pH 6,5. Результаты показали, что наблюдалось снижение конъюгирования LK1 с пептидом SCDK, превышающее 20%. Процент снижения увеличивался при более низких значениях pH.

Исследовали корреляцию между сохранением конъюгирования и гидролизом малеимидного кольца. Химический механизм гидролиза малеимидного кольца представлен на ФИГ. 28. На ФИГ. 29A представлены проценты гидролиза малеимидного кольца и сохранения конъюгирования, определенные путем анализа GEC, SCDK и шарнирных пептидов при различных значениях pH, включая pH 5,5, pH 6,0 и pH 6,5. На

ФИГ. 29B представлен анализ корреляции между сохранением конъюгирования и гидролизом малеимидного кольца. Результаты показали, что меньшая предрасположенность к гидролизу малеимидного кольца в SCDK (C в остатке 225) тяжелой цепи может быть связана с более низкой стабильностью конъюгирования.

Пример 10. Сайт-специфичный количественный анализ конъюгирования лекарственного средства в связанных по остатку лизина ADC

ADC MAB2-LK5, например, ADC, связанные по остатку лизина, анализировали с целью количественной оценки сайт-специфичного конъюгирования лекарственного средства. ADC MAB2-LK5 расщепляли папаином с удалением полезной нагрузки с последующим восстановлением и денатурацией, последующим алкилированием, последующим расщеплением образцов ADC с помощью Glu-C с получением смеси пептидов, образовавшихся под действием Glu-C, расщеплением полученной смеси пептидов с помощью Asp-N, и последующим проведением анализа смеси пептидов методом ЖХ-МС, как показано на ФИГ. 7. Сайт-специфичное конъюгирование лекарственного средства оценивали по результатам количественного анализа пептидов, содержащих расщепленные линкеры, и нативных пептидов, не содержащих расщепленных линкеров, например, сайт-специфичное конъюгирование лекарственного средства=(количество пептидов, содержащих расщепленный линкер) / (количество пептидов, содержащих расщепленные линкеры+количество нативных пептидов).

Конъюгирование лекарственного средства с остатком лизина 208 в легкой цепи антитела анализировали с применением расщепления папаином, как показано на ФИГ. 30A, ФИГ. 30 B и ФИГ. 30C. Результаты показали, что было достигнуто полное деконъюгирование лекарственного средства при незначительном неспецифичном расщеплении. Конъюгирование лекарственного средства с остатком лизина 393 и остатком лизина 389 в тяжелой цепи антитела (HC Lys393/HC* Lys389) анализировали с применением расщепления папаином, как показано на ФИГ. 31A, ФИГ. 31B и ФИГ. 31C. Результаты показали, что было достигнуто полное деконъюгирование лекарственного средства при незначительном неспецифичном расщеплении. Конъюгирование лекарственного средства с остатком лизина 65 в легкой цепи антитела анализировали с применением расщепления папаином, как показано на ФИГ. 32A, ФИГ. 32B и ФИГ. 32C. Результаты показали, что было достигнуто полное деконъюгирование лекарственного средства при незначительном неспецифичном расщеплении. Конъюгирование лекарственного средства с остатком лизина 39, 42 или 45 в легкой цепи антитела анализировали с применением расщепления папаином путем анализа пептида, содержащего 55 аминокислот, как показано на ФИГ. 33A, ФИГ. 33B и ФИГ. 33C. Результаты показали, что было достигнуто полное деконъюгирование лекарственного средства при незначительном неспецифичном расщеплении. Конъюгирование лекарственного средства с остатками лизина 64 и 75 в тяжелой цепи антитела (HC* Lys 64 and Lys75) в случае двойного конъюгирования анализировали с применением расщепления папаином, как показано на ФИГ. 34A и ФИГ. 34B. Результаты показали, что

деконъюгирование лекарственного средства может повышать чувствительность вариантов пептидов с низким содержанием. Площади пиков вариантов пептидов с низким содержанием увеличивались более чем в 20 раз. Конъюгирование лекарственного средства с остатками лизина 151 и 147 в тяжелой цепи антитела (HC Lys151/HC* Lys147) анализировали с применением расщепления папаином, как показано на ФИГ. 35A, ФИГ. 35B и ФИГ. 35C. Результаты показали, что не было достигнуто полного деконъюгирования лекарственного средства для одного пептида.

Количественно определяли конъюгирование лекарственного средства с 73/79 остатками лизина для четырех цепей. Результат количественного определения для 73/79 остатков лизина составил примерно 92,4%. Сайт-специфичный количественный анализ конъюгирования лекарственного средства с различными остатками лизина для MAB2-LK5 проводили, как показано на ФИГ. 36. Способ деконъюгирования лекарственного средства с помощью протеаз (protease-assisted drug deconjugation, PADD) согласно настоящей заявке позволил провести эффективный и надежный сайт-специфичный количественный анализ конъюгирования лекарственного средства с различными остатками лизина в связанных по остатку лизина ADC. Среднее значение DAR=сумма [% конъюгирования по уникальным пептидам в HC] + сумма [% конъюгирования по уникальным пептидам в HC*] +2 x сумма [% конъюгирования в LC + % конъюгирования в константных пептидах в HC и HC*].

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ количественного анализа или определения характеристик конъюгирования по меньшей мере одного присоединенного компонента, связанного по меньшей мере с одним специфичным сайтом конъюгирования частично конъюгированного пептида или белка в образце, включающий:

отщепление части по меньшей мере одного присоединенного компонента с получением пептида или белка, содержащего расщепленный линкер, где указанный присоединенный компонент содержит расщепленный линкер;

добавление модифицированного линкера к неконъюгированному сайту конъюгирования частично конъюгированного пептида или белка;

проведение масс-спектрометрического анализа образца с целью идентификации пептида или белка, содержащего расщепленный линкер и/или модифицированный линкер.

2. Способ по п. 1, где указанный по меньшей мере один присоединенный компонент содержит линкер и полезную нагрузку, при этом отщепленная часть присоединенного компонента содержит полезную нагрузку, а линкер содержит расщепленный линкер.

3. Способ по п. 1, дополнительно включающий количественный анализ или определение характеристик сайт-специфичного конъюгирования присоединенного компонента на основании результатов количественного анализа расщепленного линкера и модифицированного линкера.

4. Способ по п. 1, где масс-спектрометрический анализ проводят с помощью масс-спектрометра, масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометра с ионизацией наноэлектрораспылением, трехквадрупольного масс-спектрометра, где указанный масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии и где указанный масс-спектрометр обеспечивает возможность проведения анализа методами ЖХ-МС (жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией), ЖХ-ММР-МС (жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией в режиме мониторинга множественных реакций) или ЖХ-МС/МС.

5. Способ по п. 1, дополнительно включающий обработку пептида или белка ферментом с последующим отщеплением части присоединенного компонента и/или добавлением модифицированного линкера к неконъюгированному сайту конъюгирования.

6. Способ по п. 1, дополнительно включающий обработку образца ферментом, после которой проводят масс-спектрометрический анализ образца.

7. Способ по п. 1, где часть присоединенного компонента отщепляют с помощью фермента, протеазы, химического вещества, кислоты, основания или восстанавливающего агента.

8. Способ по п. 1, где выполняют этап добавления модифицированного линкера к неконъюгированному сайту конъюгирования, после чего проводят этап отщепления части присоединенного компонента.

9. Способ по п. 1, где выполняют этап отщепления части присоединенного

компонента, после чего проводят этап добавления модифицированного линкера и этап выполнения масс-спектрометрического анализа образца.

10. Способ по п. 1, где молекулярная масса модифицированного линкера отличается от молекулярной массы расщепленного линкера.

11. Способ по п. 5, где фермент представляет собой трипсин.

12. Способ по п. 1, где часть присоединенного компонента отщепляют с помощью папаина, катепсина B или плазмина.

13. Способ по п. 6, где фермент представляет собой Glu-C.

14. Способ по п. 1, где специфичный сайт конъюгирования или неконъюгированный сайт конъюгирования расположен внутри остатка цистеина пептида или белка.

15. Способ по п. 1, где присоединенный компонент соединен по меньшей мере с одним специфичным сайтом конъюгирования через малеимидную присоединяющую группу.

16. Способ по п. 1, где пептид или белок представляет собой антитело, фрагмент антитела, Fab-фрагмент антитела, Fc-фрагмент антитела или гибридный белок.

17. Способ по п. 2, где линкер представляет собой кислотно-лабильный линкер, расщепляемый протеазой линкер, дисульфидсодержащий линкер, линкер на основе сложного диэфира пирофосфорной кислоты или гидразоновый линкер.

18. Способ по п. 2, где линкер содержит пептид.

19. Способ по п. 2, где линкер содержит валин-аланин, фенилаланин-лизин, валин-цитруллин или их производные.

20. Способ по п. 2, где линкер содержит полиэтиленгликоль.

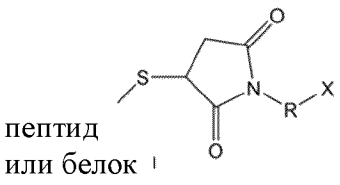
21. Способ по п. 2, где линкер содержит пара-аминобензилоксикарбонил (PABC) или пара-аминобензиловый спирт (PABA).

22. Способ по п. 1, где модифицированный линкер содержит полиэтиленгликоль.

23. Способ по п. 1, где модифицированный линкер добавляют к неконъюгированному сайту конъюгирования через малеимидную присоединяющую группу.

24. Способ по п. 2, где полезная нагрузка представляет собой лекарственное средство, соединение, токсин, цитотоксический агент, антимитотический агент, ингибитор микротрубочек, повреждающий ДНК агент, ингибитор топоизомеразы, ингибитор РНК-полимеразы, аналог аманитинов, аналог тубулизина, химиотерапевтическое лекарственное средство, ингибитор полимеризации микротрубочек или промотор полимеризации микротрубочек.

25. Способ по п. 1, где частично конъюгированный пептид или белок выбран из группы, состоящей из конъюгированного пептида или белка формулы I:

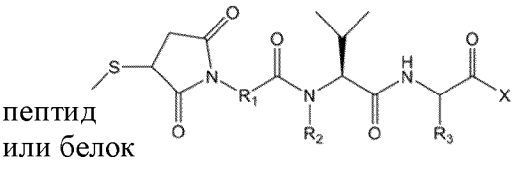


,

где R представляет собой линкер, и X представляет собой полезную нагрузку.

26. Способ по п. 25, где линкер содержит полиэтиленгликоль, и при этом полезная нагрузка представляет собой лекарственное средство, соединение, токсин, цитотоксический агент, антимитотический агент, ингибитор микротрубочек, повреждающий ДНК агент, ингибитор топоизомеразы, ингибитор РНК-полимеразы, аналог аманитинов, аналог тубулизина, химиотерапевтическое лекарственное средство, ингибитор полимеризации микротрубочек или промотор полимеризации микротрубочек.

27. Способ по п. 1, где частично конъюгированный пептид или белок выбран из группы, состоящей из конъюгированного пептида или белка формулы II:

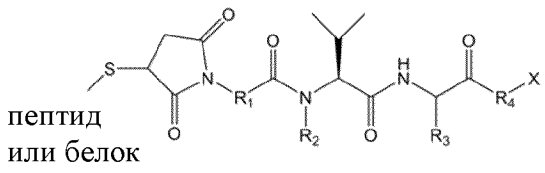


,

где R_1 представляет собой спейсер, при этом R_2 представляет собой -H или $-CH_3$, при этом R_3 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3NHC(O)NH_2$, при этом X представляет собой полезную нагрузку.

28. Способ по п. 27, где спейсер содержит полиэтиленгликоль, и при этом полезная нагрузка представляет собой лекарственное средство, соединение, токсин, цитотоксический агент, антимитотический агент, ингибитор микротрубочек, повреждающий ДНК агент, ингибитор топоизомеразы, ингибитор РНК-полимеразы, аналог аманитинов, аналог тубулизина, химиотерапевтическое лекарственное средство, ингибитор полимеризации микротрубочек или промотор полимеризации микротрубочек.

29. Способ по п. 1, где частично конъюгированный пептид или белок выбран из группы, состоящей из конъюгированного пептида или белка формулы III:



,

где R_1 представляет собой первый спейсер, при этом R_2 представляет собой -H или $-CH_3$, при этом R_3 представляет собой $-CH_3$ или $-(CH_2)_3NHC(O)NH_2$, при этом R_4 представляет собой второй спейсер, при этом X представляет собой полезную нагрузку.

30. Способ по п. 29, где первый спейсер содержит полиэтиленгликоль, и при этом второй спейсер содержит пара-аминобензилоксикарбонил (PABC) или пара-

аминобензиловый спирт (PABA), и при этом нагрузка представляет собой лекарственное средство, соединение, токсин, цитотоксический агент, антимитотический агент, ингибитор микротрубочек, повреждающий ДНК агент, ингибитор топоизомеразы, ингибитор РНК-полимеразы, аналог аманитинов, аналог тубулизина, химиотерапевтическое лекарственное средство, ингибитор полимеризации микротрубочек или промотор полимеризации микротрубочек.

31. Способ количественного анализа или определения характеристик конъюгирования по меньшей мере одного присоединенного компонента, связанного по меньшей мере с одним специфичным сайтом конъюгирования частично конъюгированного белка в образце, включающий:

отщепление части по меньшей мере одного присоединенного компонента с помощью первого фермента с получением белка, содержащего расщепленный линкер, где указанный присоединенный компонент содержит расщепленный линкер;

воздействие на образец второго фермента с получением смеси пептидов; и

проведение масс-спектрометрического анализа полученной смеси пептидов с целью количественного анализа или определения характеристик указанного по меньшей мере одного специфичного сайта конъюгирования на основании результатов количественного анализа или определения характеристик пептида, содержащего расщепленный линкер, и/или пептида, не содержащего расщепленный линкер.

32. Способ по п. 31, где указанный по меньшей мере один специфичный сайт конъюгирования расположен внутри остатка лизина белка.

33. Способ по п. 31, где указанный по меньшей мере один присоединенный компонент содержит линкер и полезную нагрузку, при этом отщепленная часть указанного по меньшей мере одного присоединенного компонента содержит полезную нагрузку, и при этом линкер содержит расщепленный линкер.

34. Способ по п. 31, где масс-спектрометрический анализ проводят с помощью масс-спектрометра, масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением, масс-спектрометра с ионизацией наноэлектрораспылением или трехквадрупольного масс-спектрометра, где указанный масс-спектрометр может быть соединен с системой жидкостной хроматографии и где указанный масс-спектрометр обеспечивает возможность проведения анализа методами ЖХ-МС (жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией), ЖХ-ММР-МС (жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией в режиме мониторинга множественных реакций) или ЖХ-МС/МС.

35. Способ по п. 31, дополнительно включающий обработку смеси пептидов третьим ферментом с последующим проведением масс-спектрометрического анализа указанной смеси пептидов.

36. Способ по п. 31, где первый фермент представляет собой папаин, катепсин B или плазмин; и/или второй фермент представляет собой Glu-C или трипсин.

37. Способ по п. 35, где третий фермент представляет собой Asp-N или Glu-C.

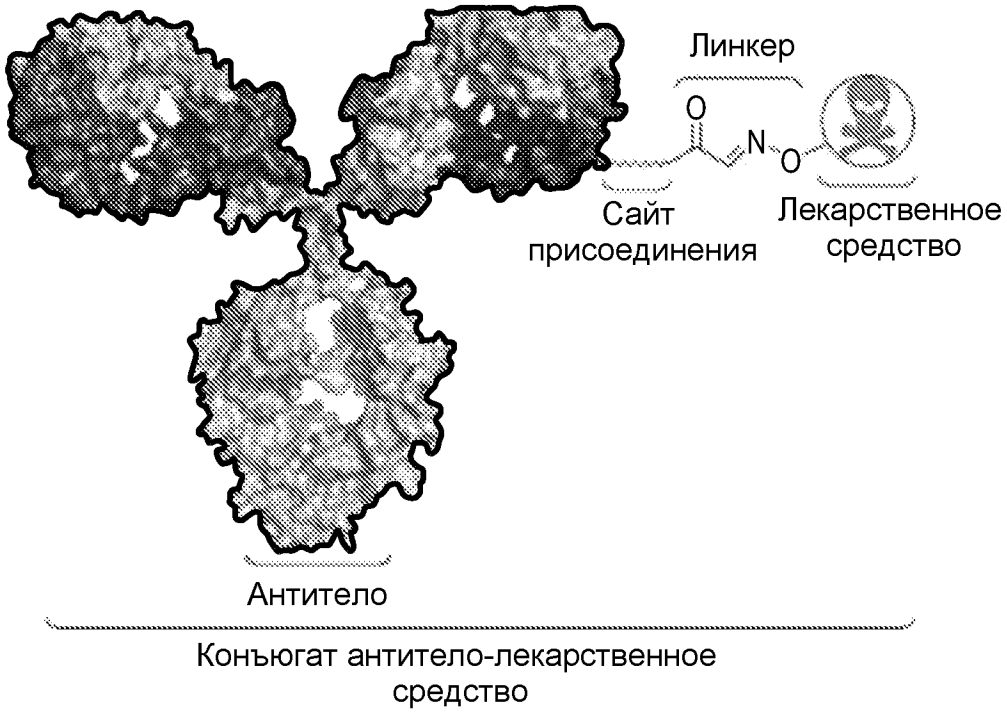
38. Способ по п. 31, где белок представляет собой антитело, фрагмент антитела,

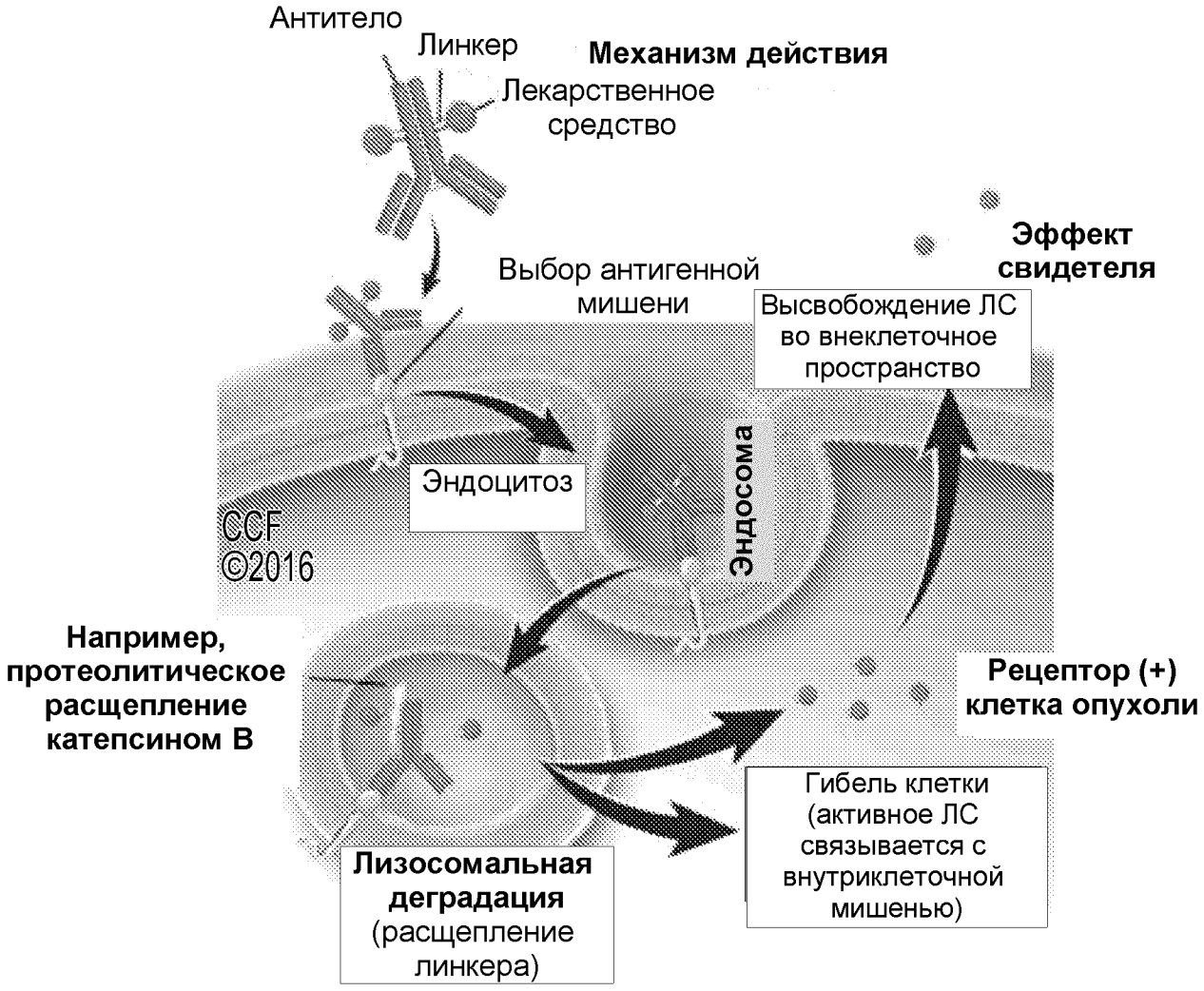
Fab-фрагмент антитела, Fc-фрагмент антитела или гибридный белок.

39. Способ по п. 33, где линкер содержит валин-аланин, фенилаланин-лизин, валин-цитруллин или их производные.

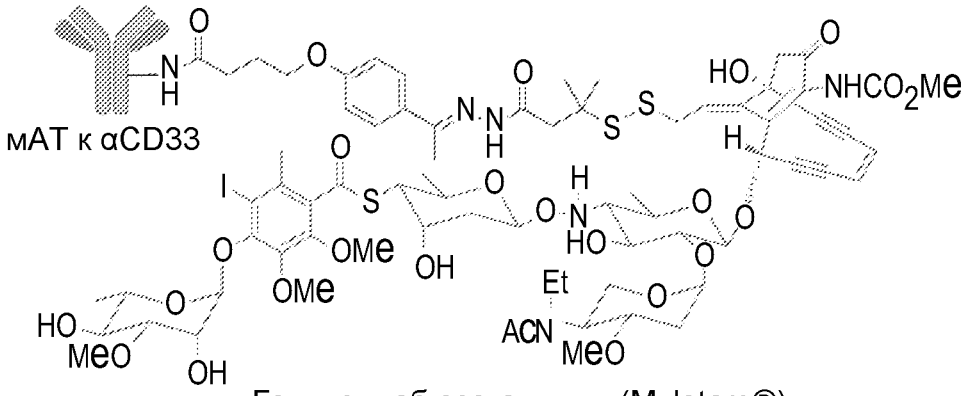
40. Способ по п. 33, где нагрузка представляет собой лекарственное средство, соединение, токсин, цитотоксический агент, антимитотический агент, ингибитор микротрубочек, повреждающий ДНК агент, ингибитор топоизомеразы, ингибитор РНК-полимеразы, аналог аманитинов, аналог тубулизина, химиотерапевтическое лекарственное средство, ингибитор полимеризации микротрубочек или промотор полимеризации микротрубочек.

По доверенности

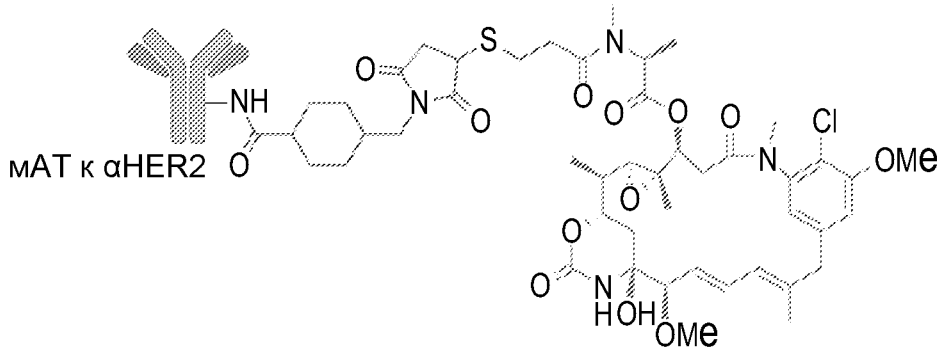

Линкер
O
N
O
Сайт присоединения
Лекарственное средство
Антитело
Конъюгат антитело-лекарственное средство


Антитело
Линкер
Механизм действия
Лекарственное средство
Эффект свидетеля
Выбор антигенной мишени
Высвобождение ЛС во внеклеточное пространство
Эндоцитоз
Эндосома
CCF ©2016
Например, протеолитическое расщепление катепсином B
Рецептор (+) клетка опухоли
Гибель клетки (активное ЛС связывается с внутриклеточной мишенью)
Лизосомальная деградация (расщепление линкера)

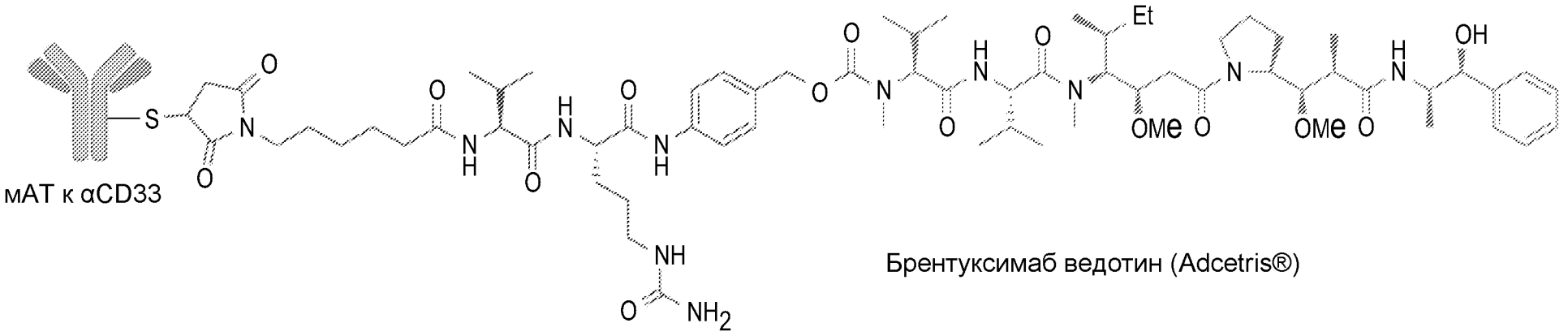
ФИГ. 1



Гемтузумаб озогамицин (Mylotarg®)

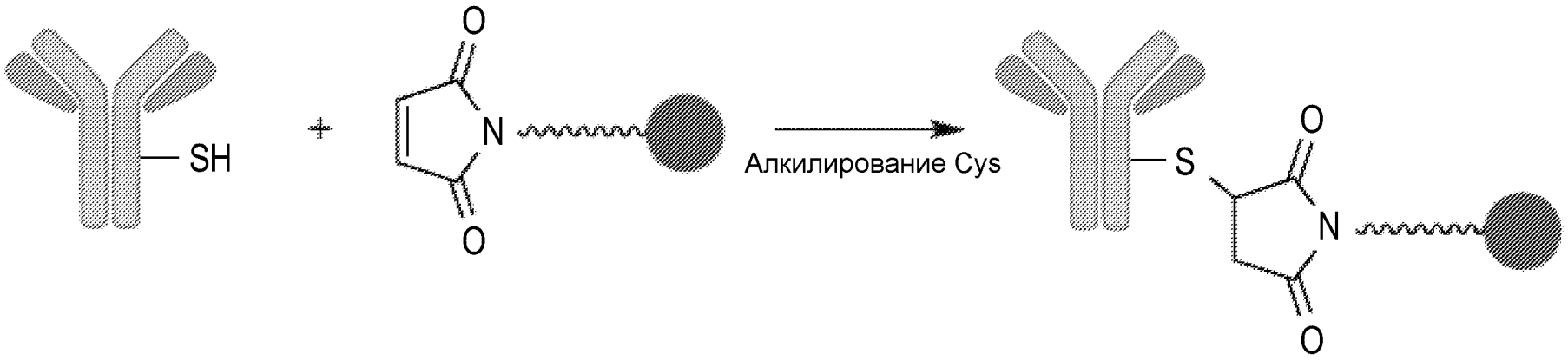


Трастузумаб эмтанзин (Kadcyla®)

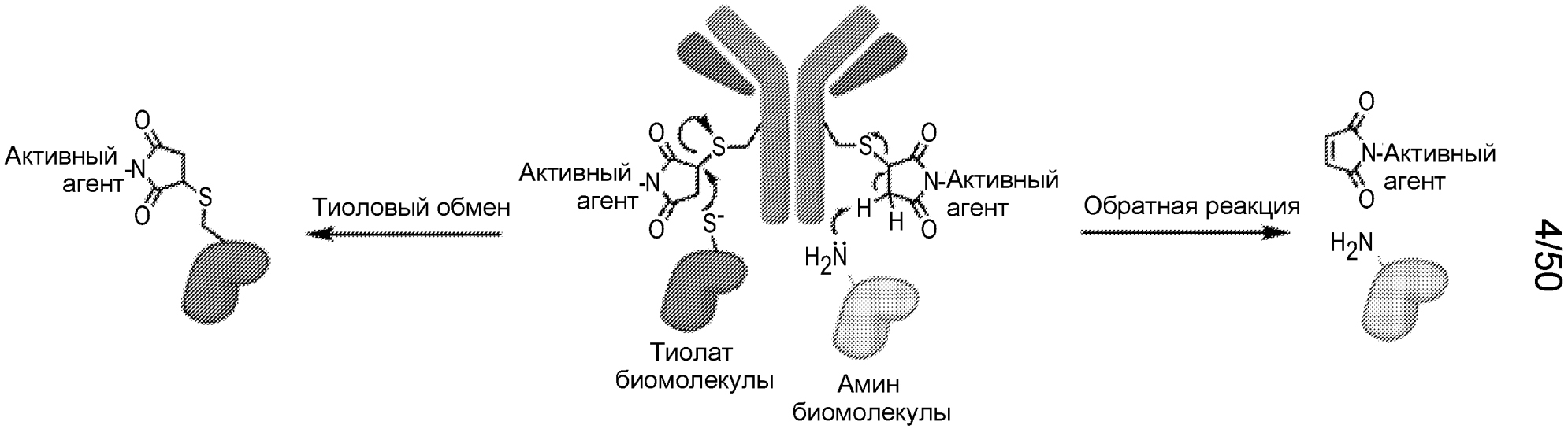


Брентуксимаб ведотин (Adcetris®)

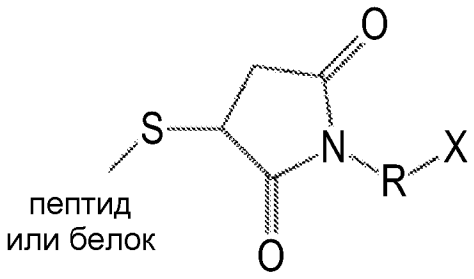
ФИГ. 2



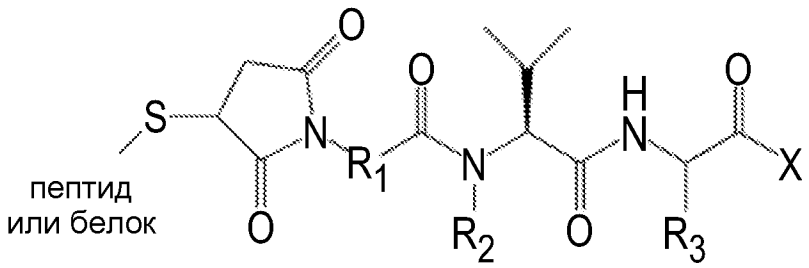
ФИГ. 3


Активный агент
Тиоловый обмен
Активный агент
N-Активный агент
Обратная реакция
N-Активный агент
Тиолат биомолекулы
Амин биомолекулы

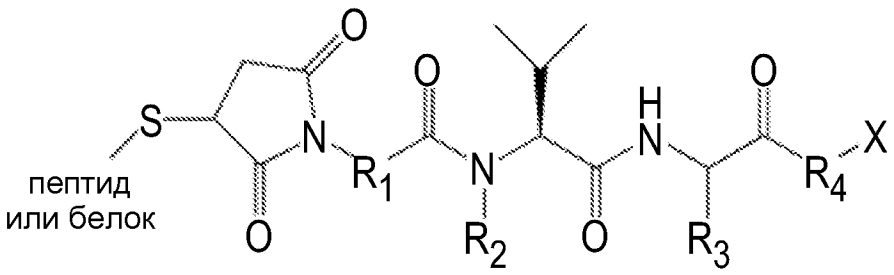
ФИГ. 4



Формула I

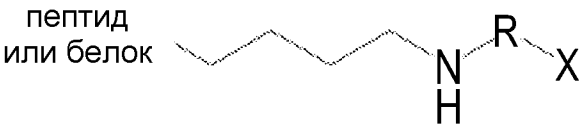


Формула II

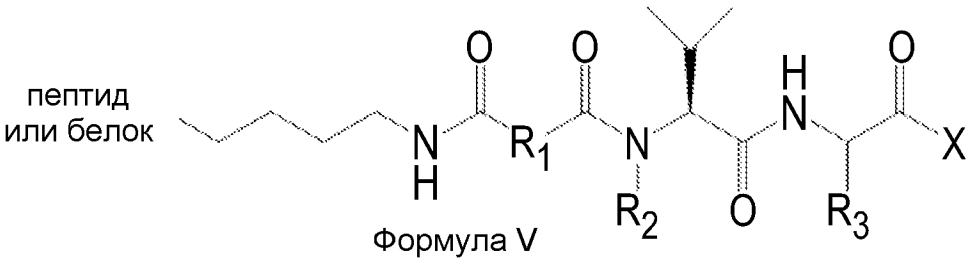


Формула III

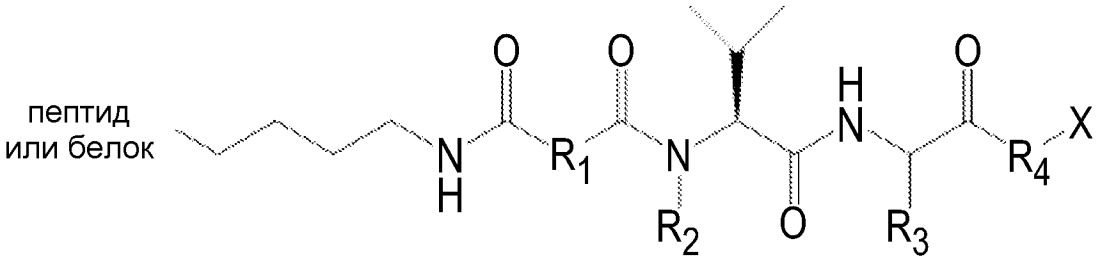
ФИГ. 5А



Формула IV

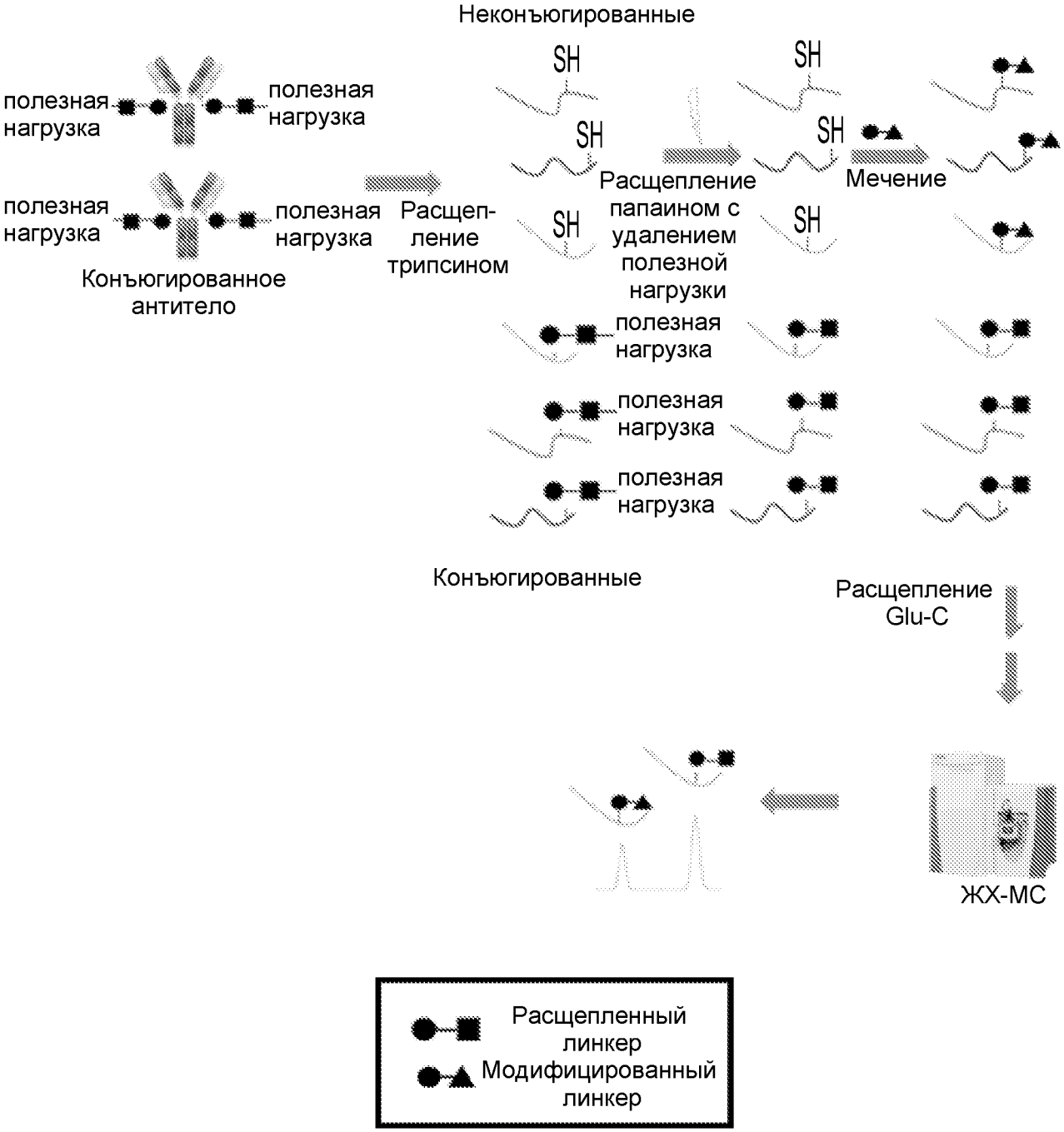


Формула V

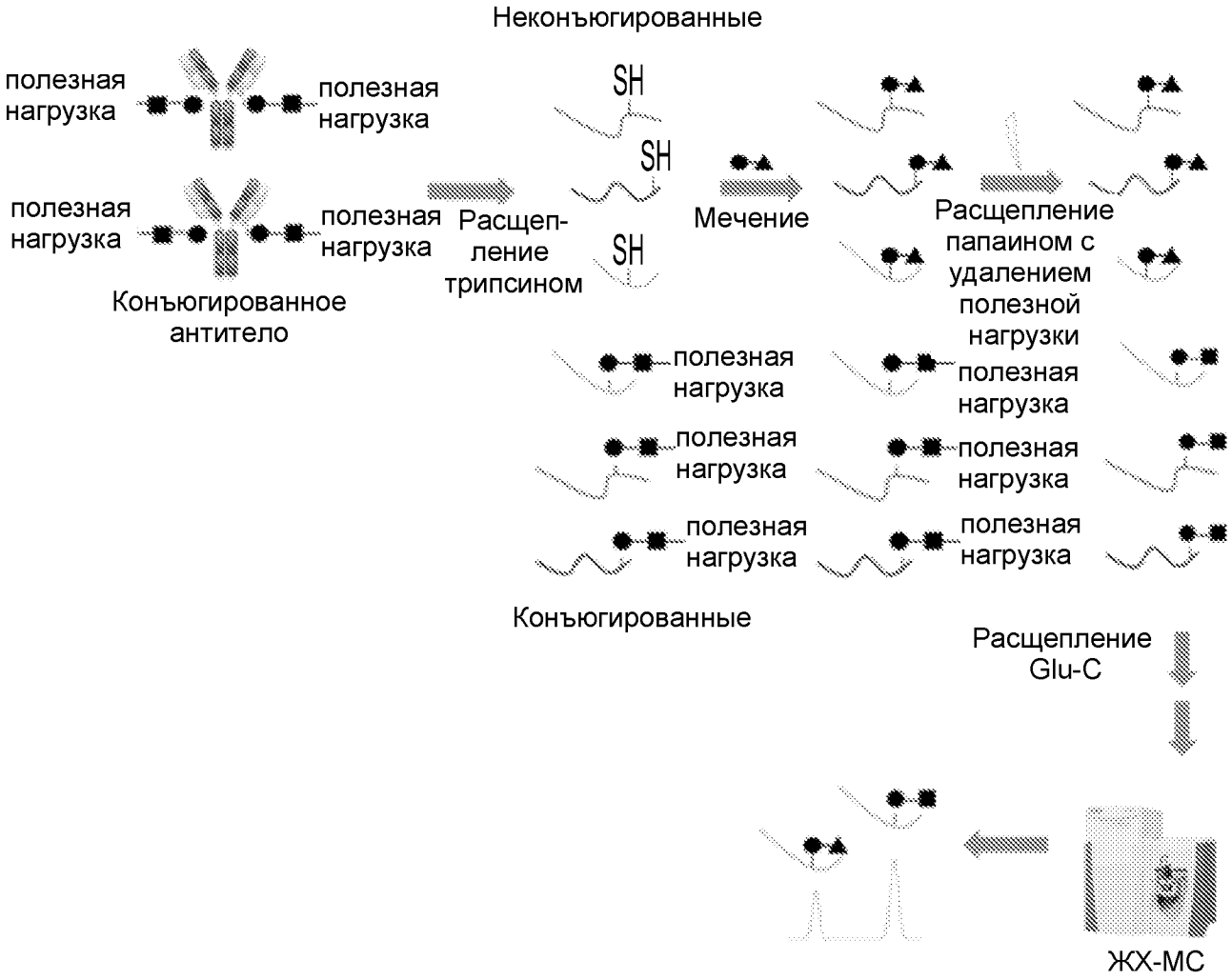


Формула VI

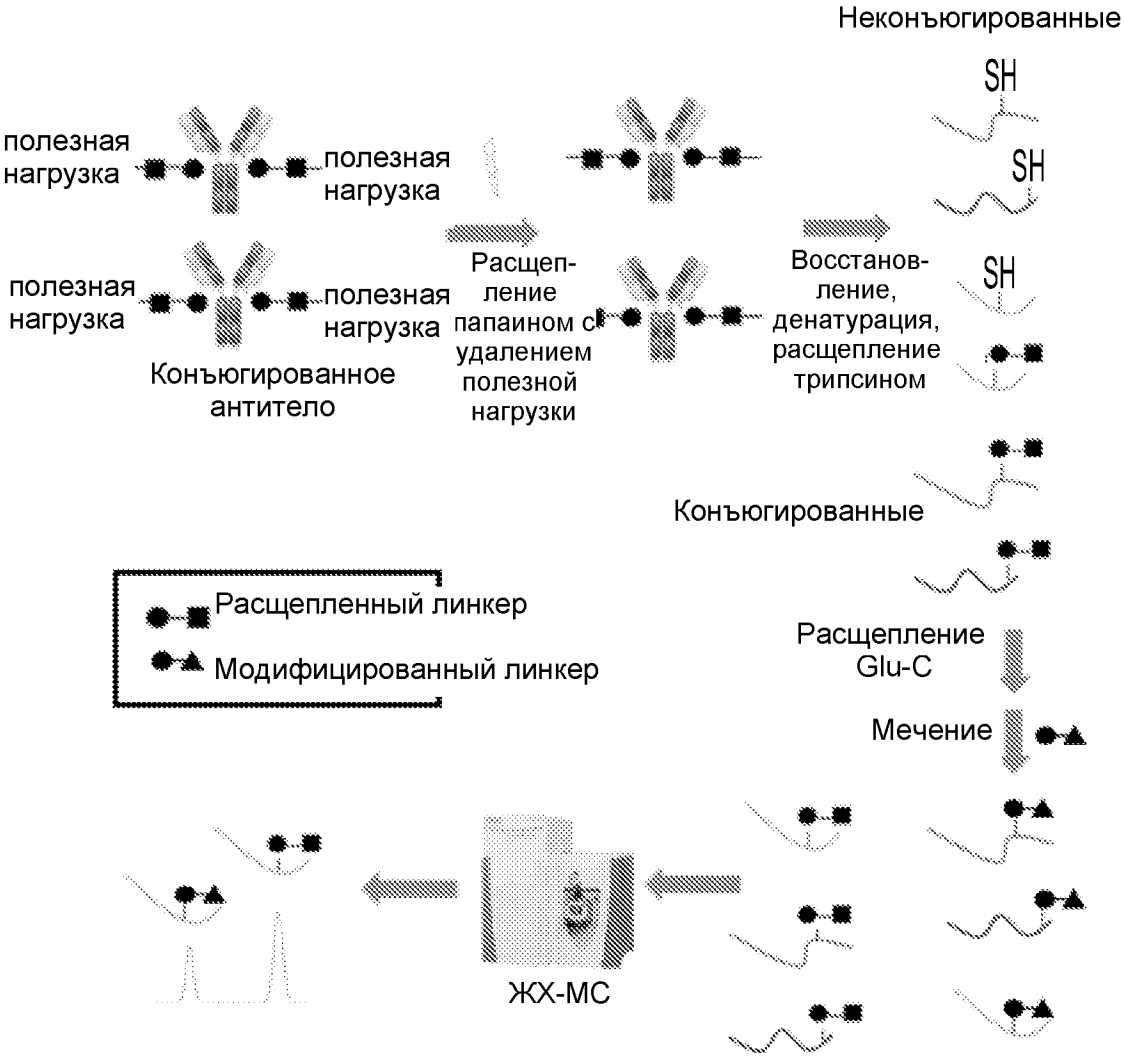
ФИГ. 5В


полезная нагрузка
полезная нагрузка
полезная нагрузка
полезная нагрузка
Конъюгированное антитело
Расщеп-ление трипсином
Неконъюгированные
SH
Расщепление папаином с удалением полезной нагрузки
Мечение
полезная нагрузка
полезная нагрузка
полезная нагрузка
Конъюгированные
Расщепление Glu-C
ЖХ-МС
Расщепленный линкер
Модифицированный линкер

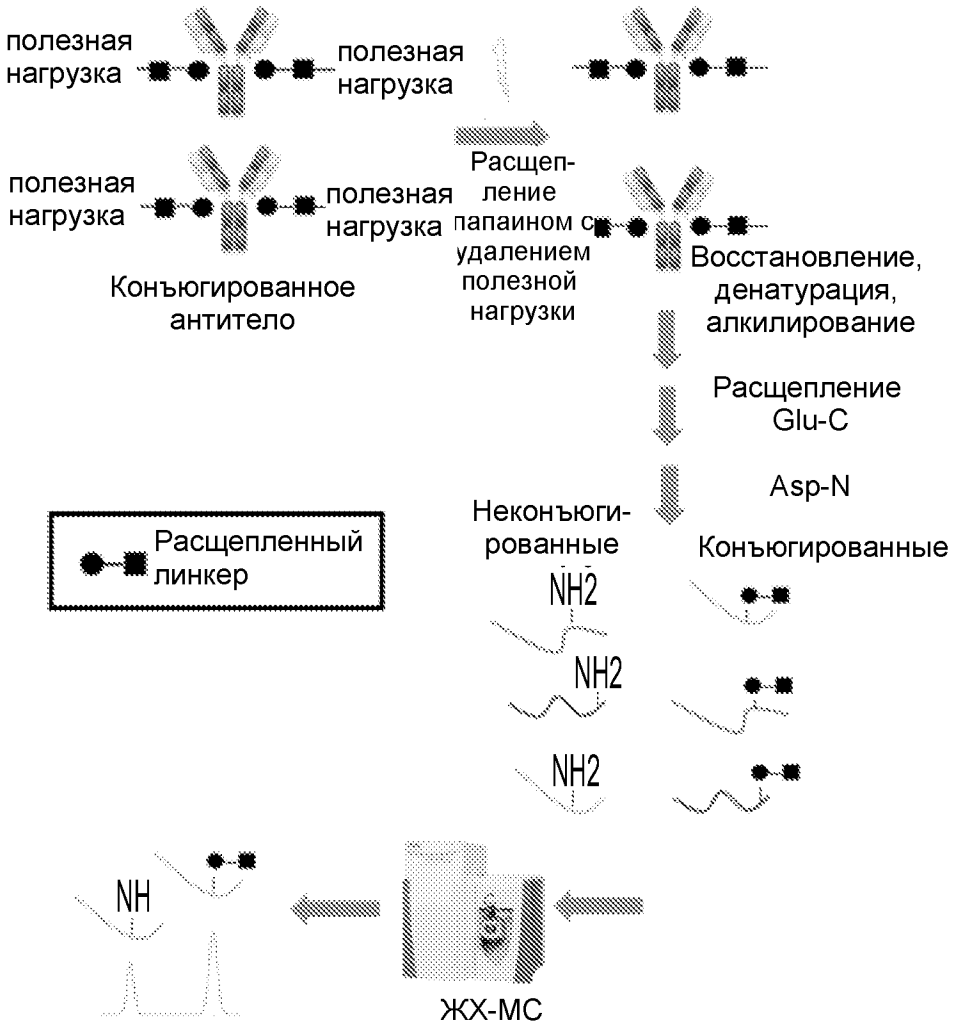
ФИГ. 6А


Неконъюгированные
полезная нагрузка
полезная нагрузка
полезная нагрузка
полезная нагрузка
Конъюгированное антитело
Расщеп-ление трипсином
SH
SH
SH
Мечение
Расщепление папаином с удалением полезной нагрузки
полезная нагрузка
полезная нагрузка
полезная нагрузка
полезная нагрузка
полезная нагрузка
полезная нагрузка
Конъюгированные
Расщепление Glu-C
ЖХ-МС
Расщепленный линкер
Модифицированный линкер

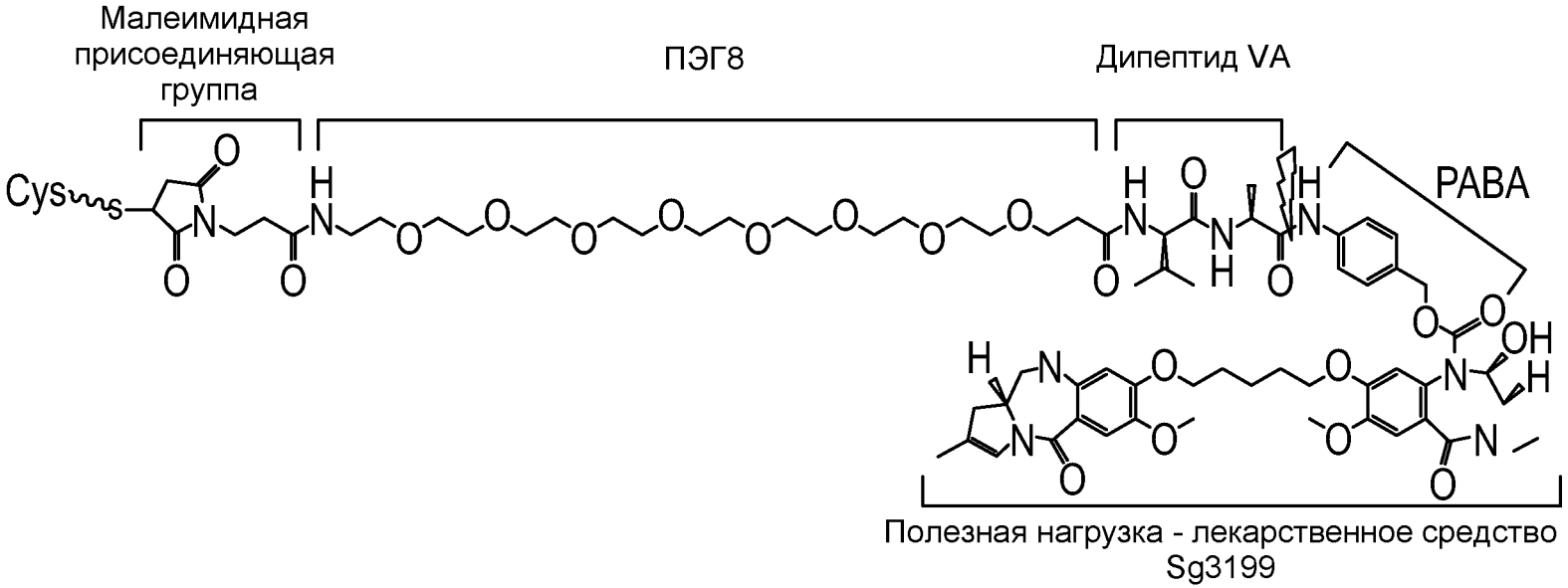
ФИГ. 6B


Неконъюгированные
SH
SH
полезная нагрузка
полезная нагрузка
полезная нагрузка
полезная нагрузка
Конъюгированное антитело
Расщеп-ление папаином с удалением полезной нагрузки
Восстанов-ление, денатурация, расщепление трипсином
SH
Конъюгированные
Расщепленный линкер
Модифицированный линкер
Расщепление Glu-C
Мечение
ЖХ-МС

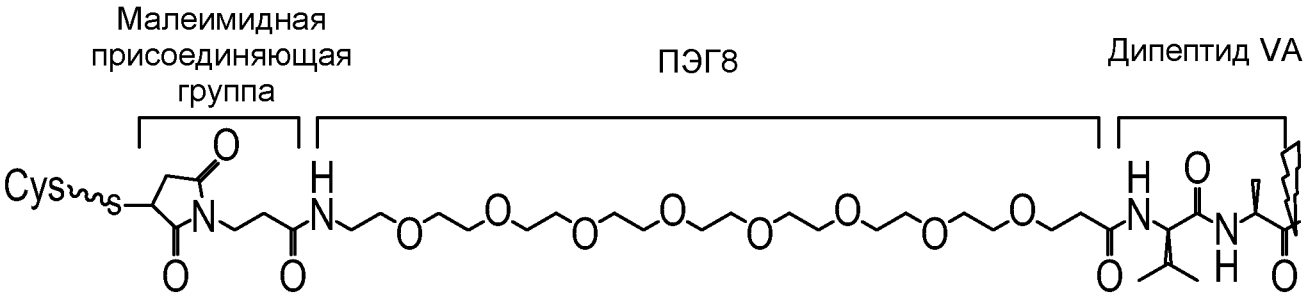
ФИГ. 6С


полезная нагрузка
полезная нагрузка
полезная нагрузка
полезная нагрузка
Конъюгированное антитело
Расщеп-ление папаином с удалением полезной нагрузки
Восстановление, денатурация, алкилирование
Расщепление Glu-C
Asp-N
Неконъюги-рованные
Конъюгированные
Расщепленный линкер
NH2
NH2
NH2
NH
ЖХ-МС

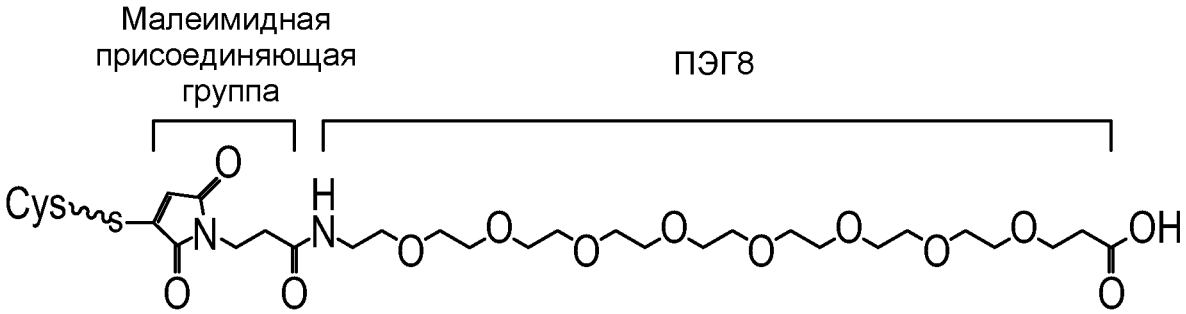
ФИГ. 7



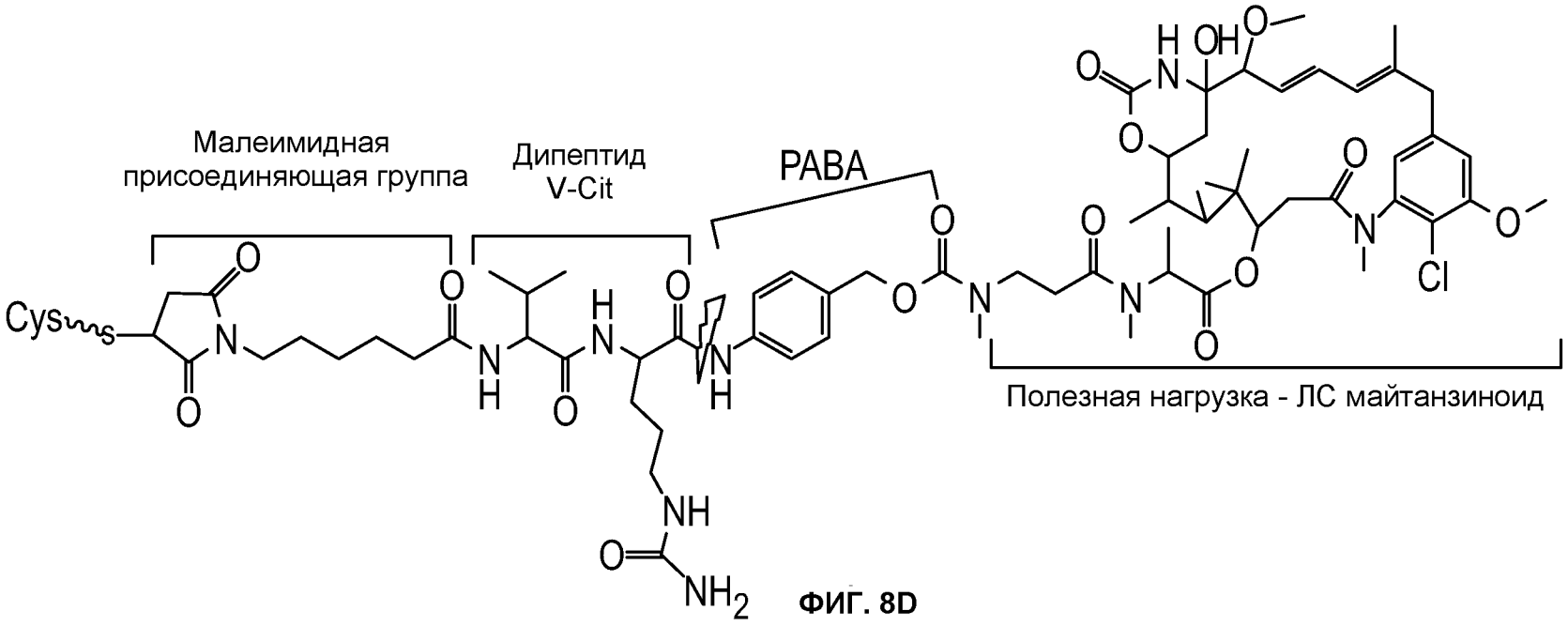
ФИГ. 8A



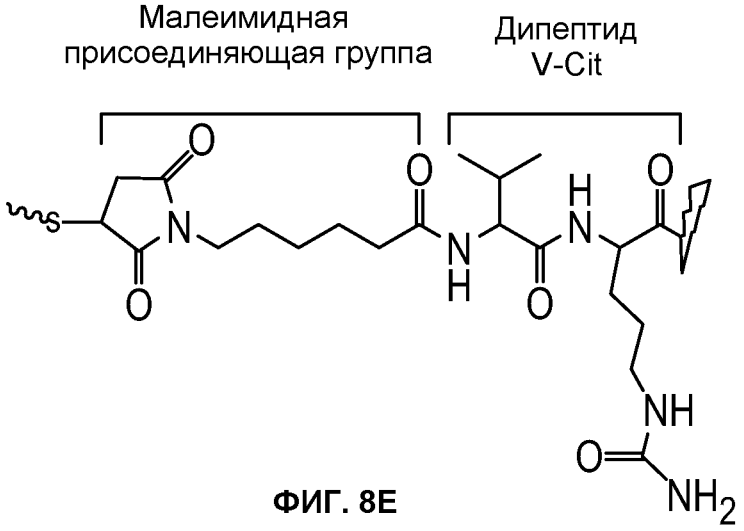
ФИГ. 8B



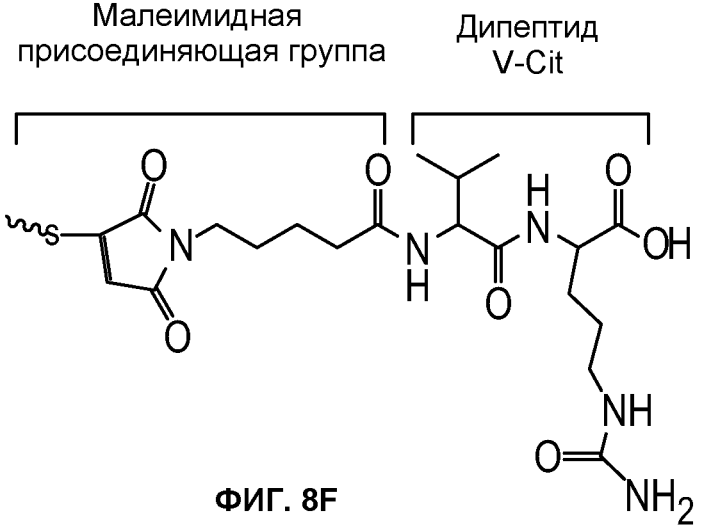
ФИГ. 8C



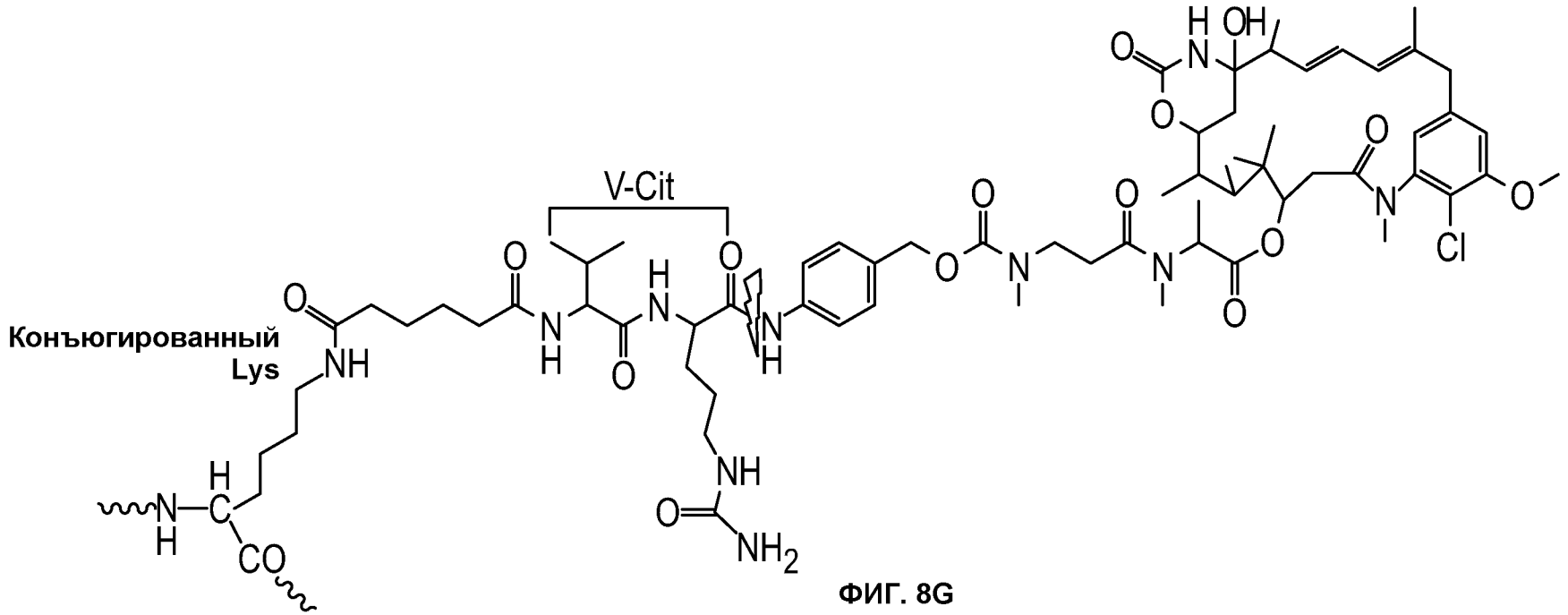
ФИГ. 8D



ФИГ. 8E

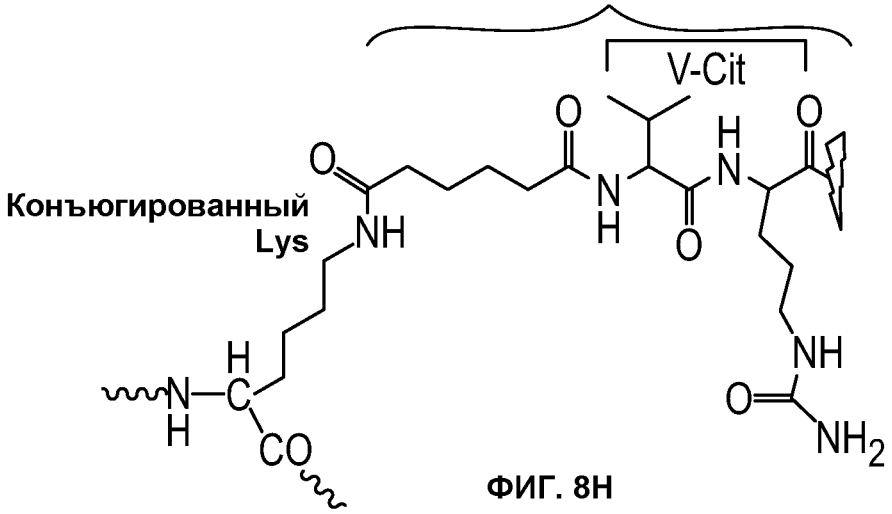


ФИГ. 8F



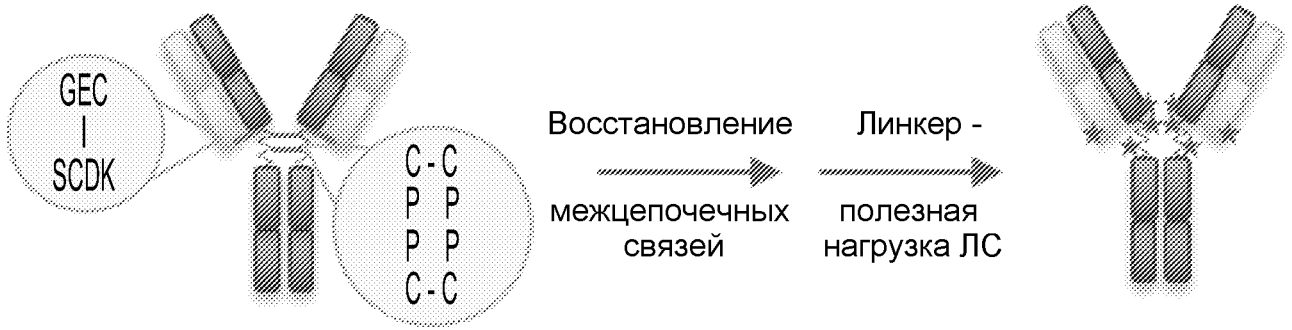
ФИГ. 8G

Модификация расщепленного Lk5, +384,2 Да

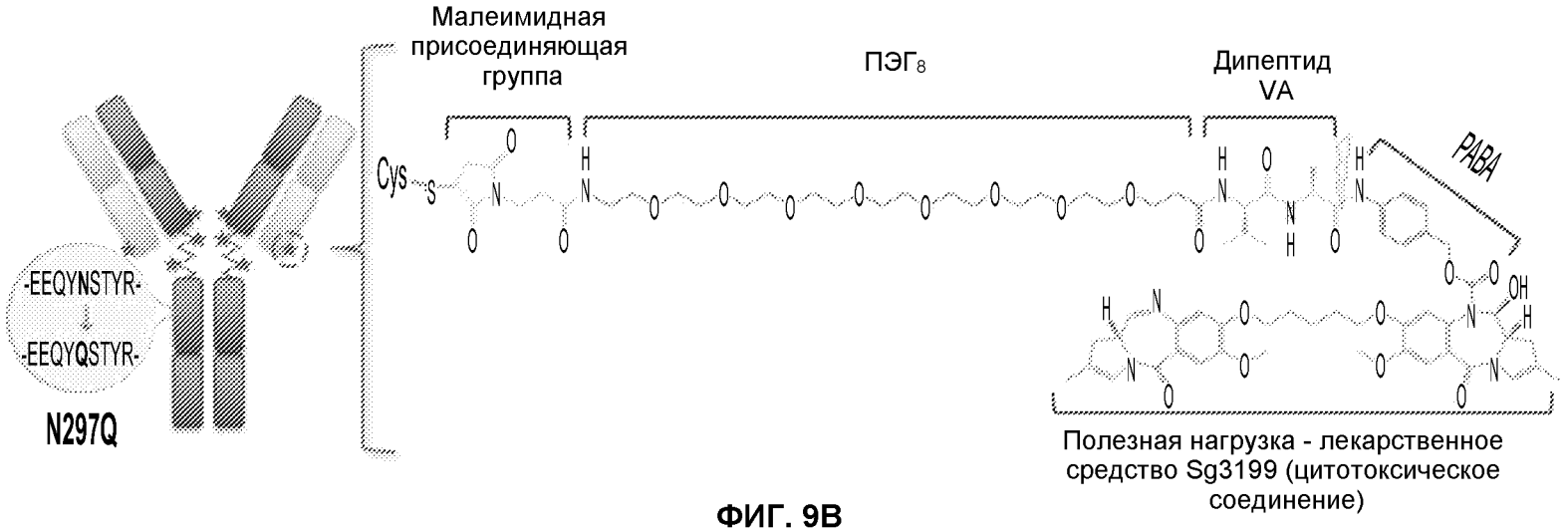


ФИГ. 8H

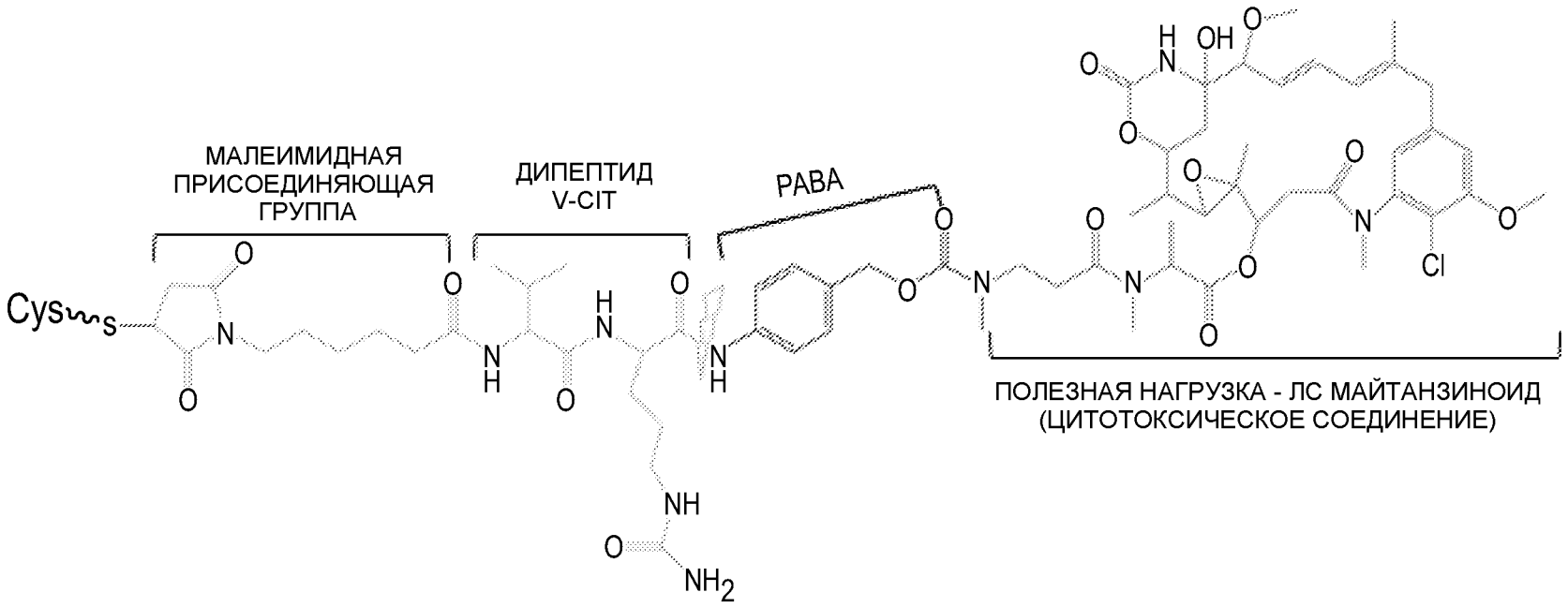
ФИГ. 8I


GEC
I
SCDK
C - C
P P
P P
C - C
Восстановление
межцепочечных
связей
Линкер -
полезная
нагрузка ЛС

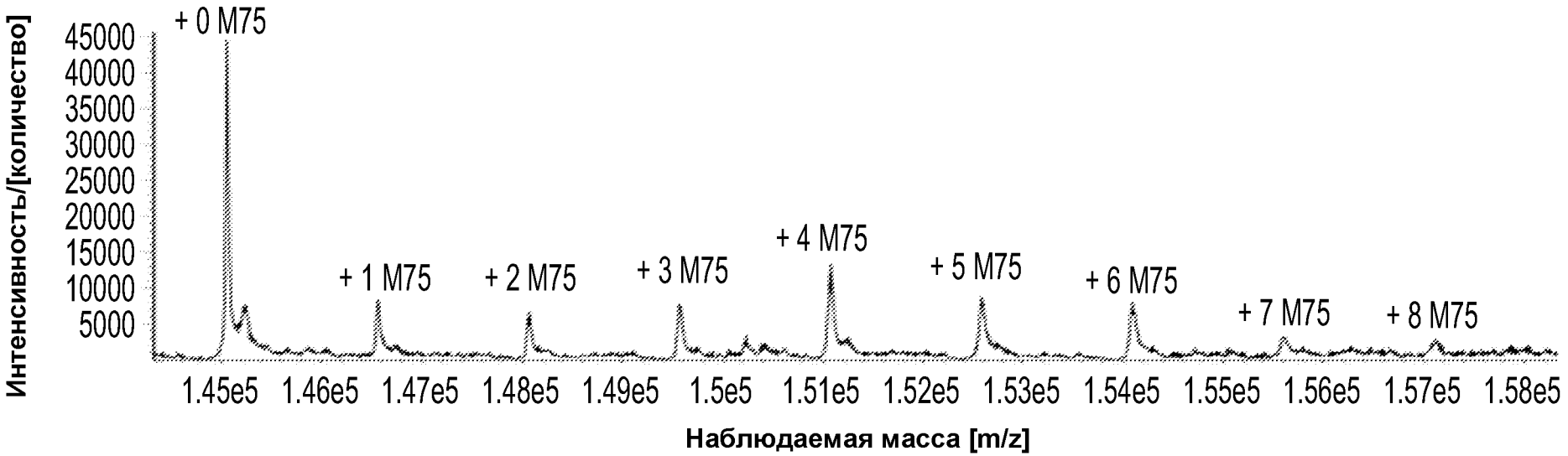
ФИГ. 9A


Малеимидная
присоединяющая
группа
ПЭГ8
Дипептид
VA
PABA
Cys
-EEQYNSTYR-
-EEQYQSTYR-
N297Q
Полезная нагрузка - лекарственное
средство Sg3199 (цитотоксическое
соединение)

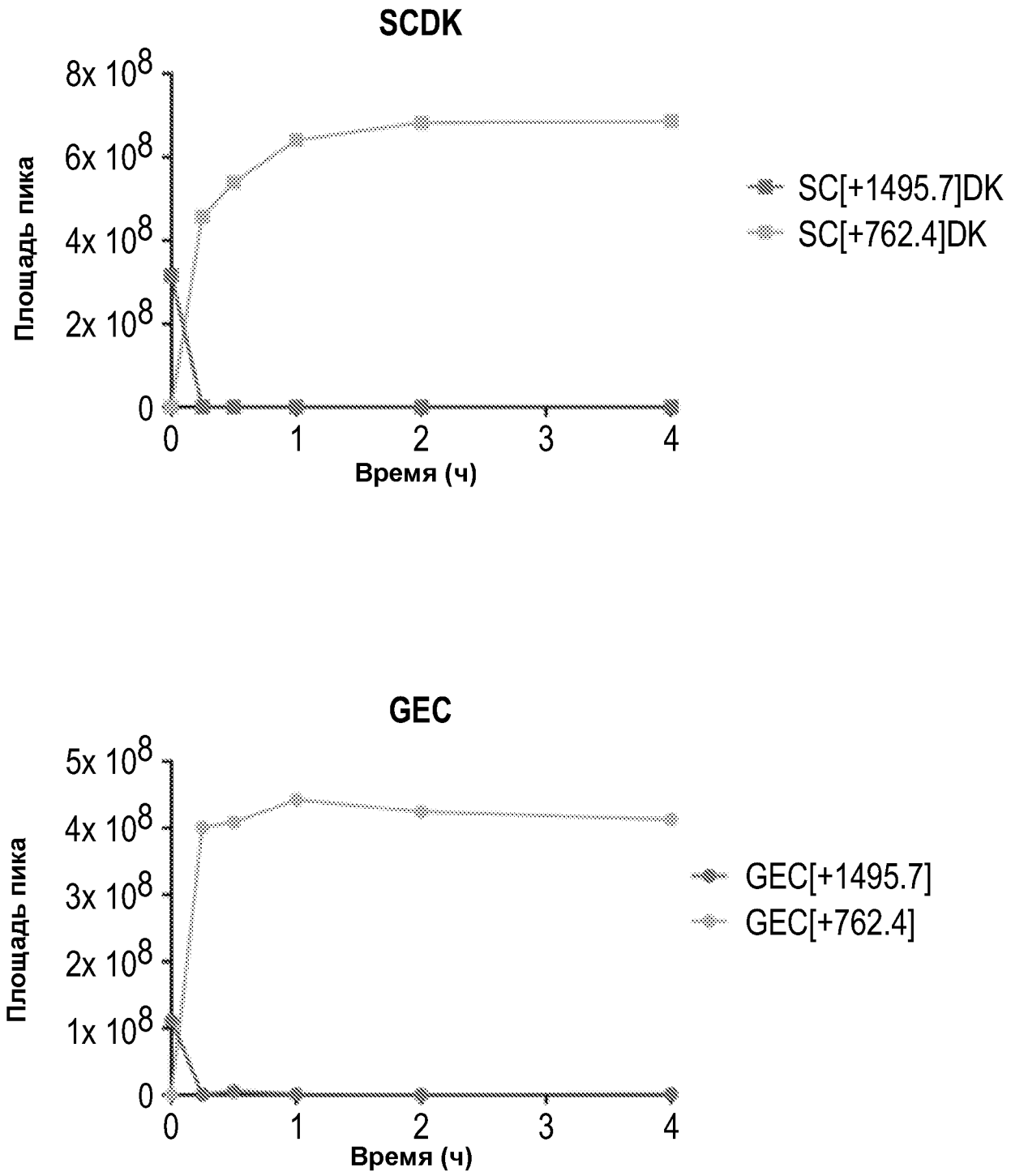
ФИГ. 9B


МАЛЕИМИДНАЯ ПРИСОЕДИНЯЮЩАЯ ГРУППА
ДИПЕПТИД V-CIT
PABA
ПОЛЕЗНАЯ НАГРУЗКА - ЛС МАЙТАНЗИНОИД (ЦИТОТОКСИЧЕСКОЕ СОЕДИНЕНИЕ)
Cys
S
O
N
H
OH
Cl
NH
NH2

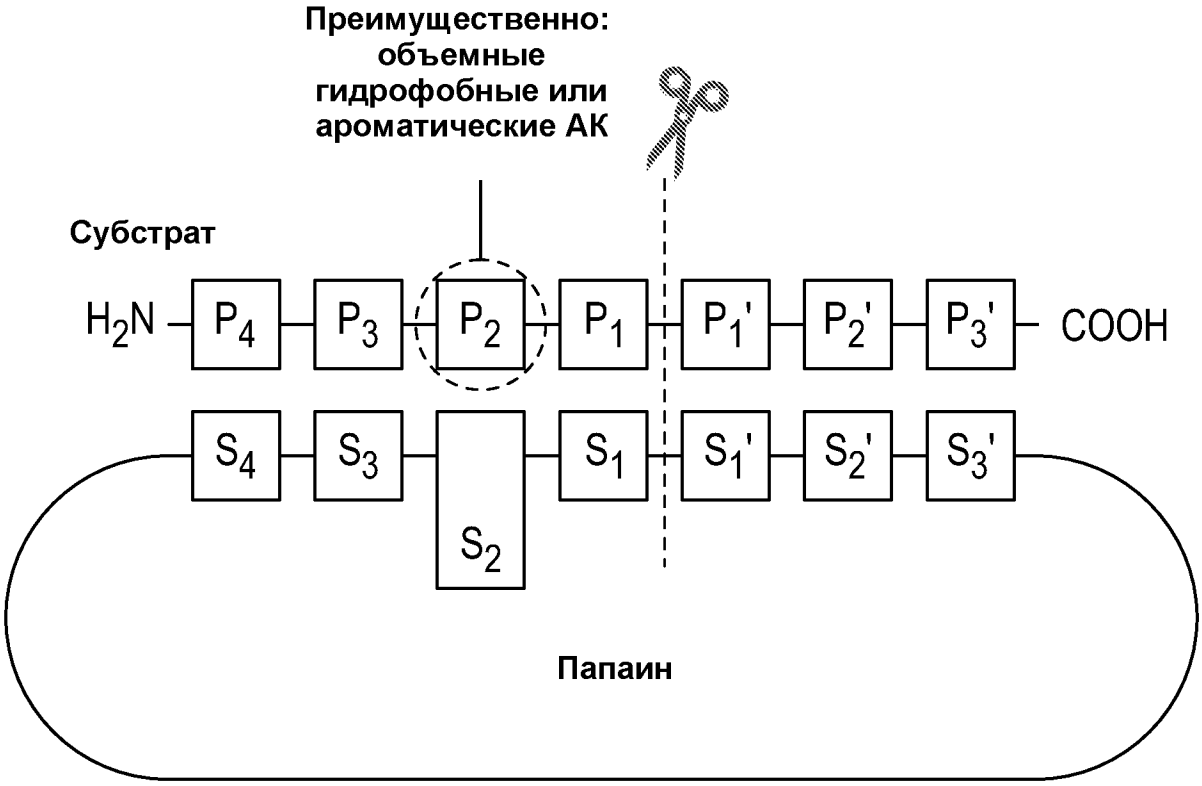
ФИГ. 9C


Интенсивность/[количество]
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
+ 0 M75
+ 1 M75
+ 2 M75
+ 3 M75
+ 4 M75
+ 5 M75
+ 6 M75
+ 7 M75
+ 8 M75
1.45e5
1.46e5
1.47e5
1.48e5
1.49e5
1.5e5
1.51e5
1.52e5
1.53e5
1.54e5
1.55e5
1.56e5
1.57e5
1.58e5
Наблюдаемая масса [m/z]

ФИГ. 10


SCDK
Площадь пика
8x 10^8
6x 10^8
4x 10^8
2x 10^8
0
0
1
2
3
4
Время (ч)
SC[+1495.7]DK
SC[+762.4]DK
GEC
Площадь пика
5x 10^8
4x 10^8
3x 10^8
2x 10^8
1x 10^8
0
0
1
2
3
4
Время (ч)
GEC[+1495.7]
GEC[+762.4]

ФИГ. 11



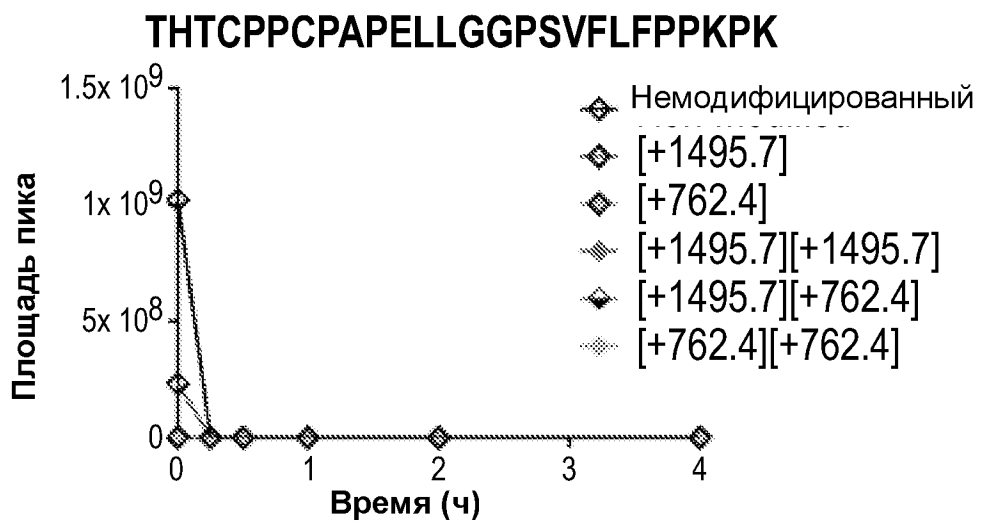
ФИГ. 12A

Несколько сайтов расщепления папаином в последовательности пептида шарнирной области:

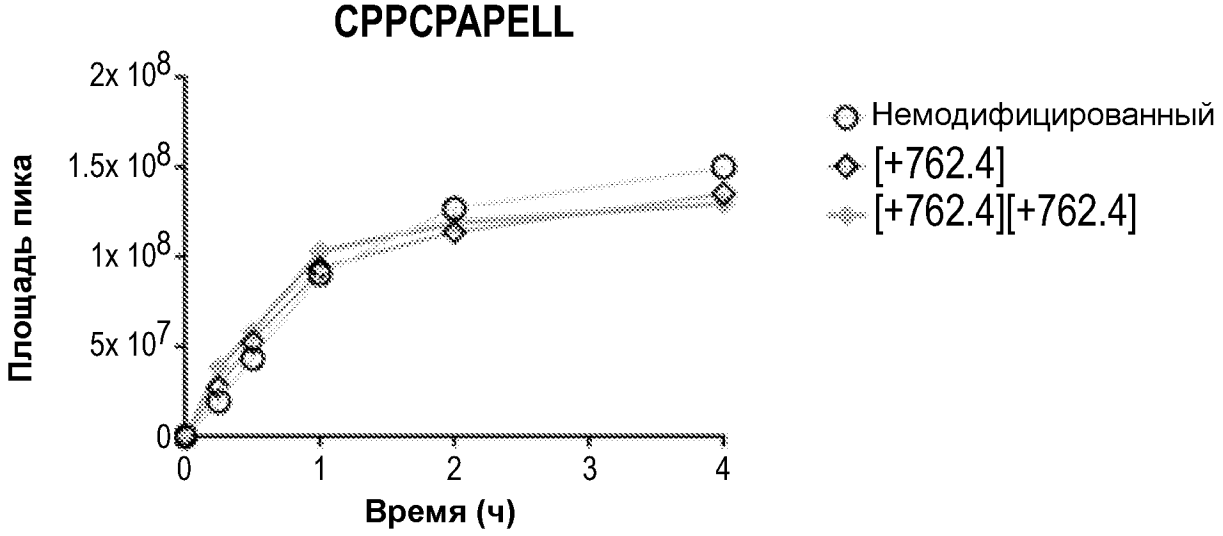
TH⇑T⇑CPPCPAPE⇑LL⇑G⇑GPSVFLFPPKPK

TH⇑T⇑CPPCPAPE⇑L⇑L⇑G⇑GPSVF⇑L⇑FPPKPK

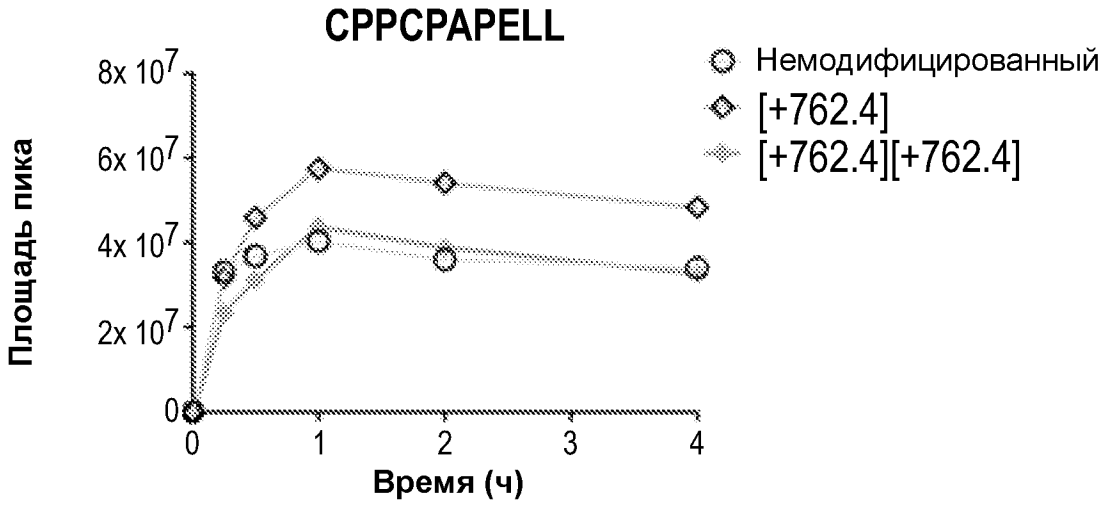
ФИГ. 12B



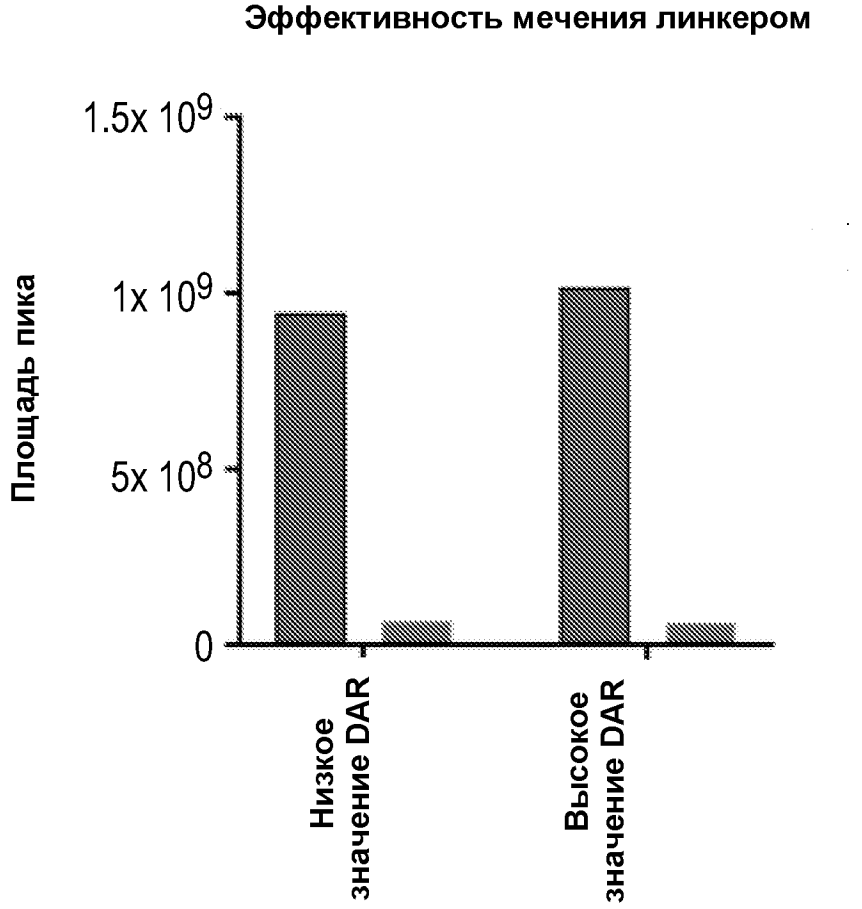
ФИГ. 13A



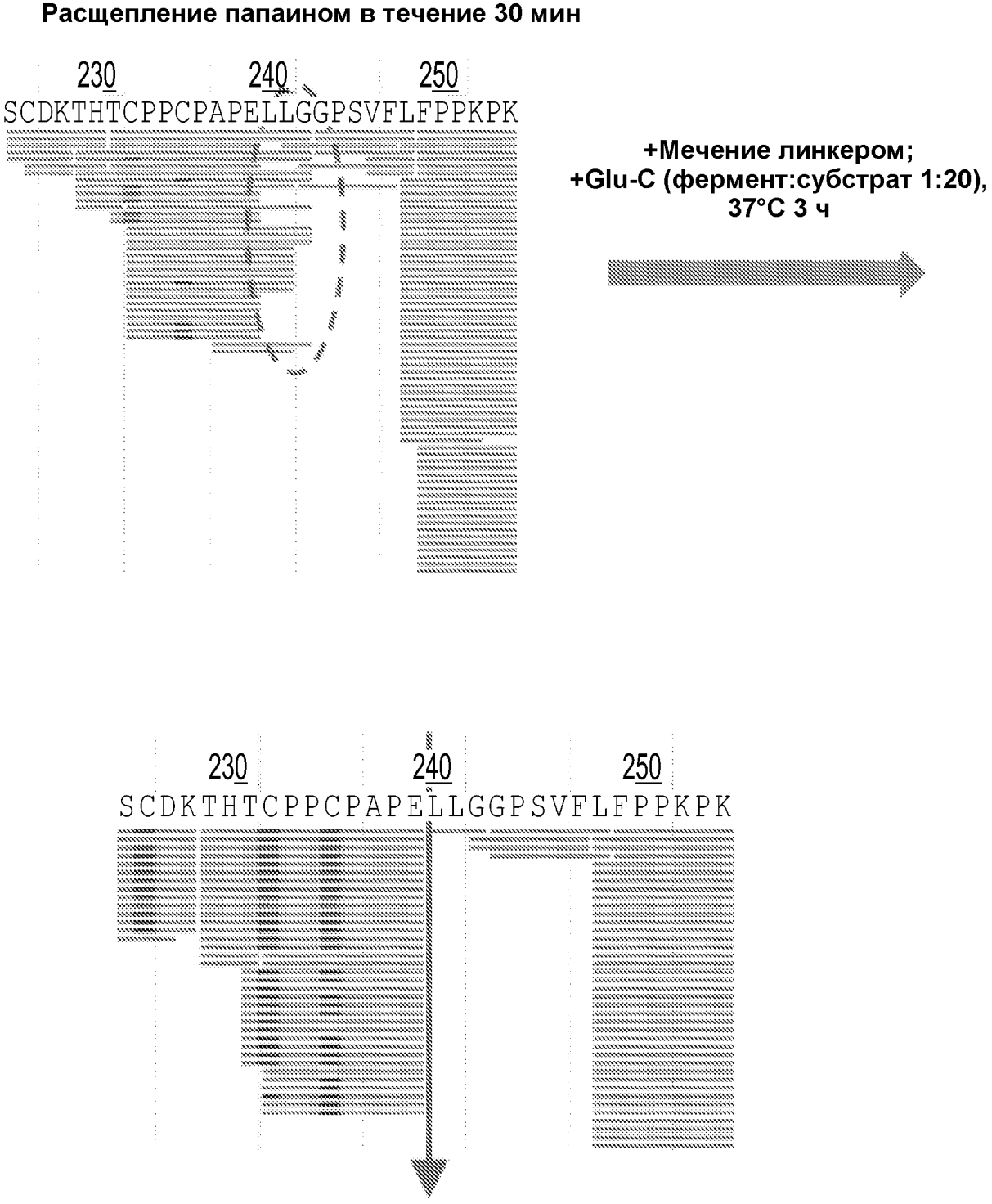
ФИГ. 13B



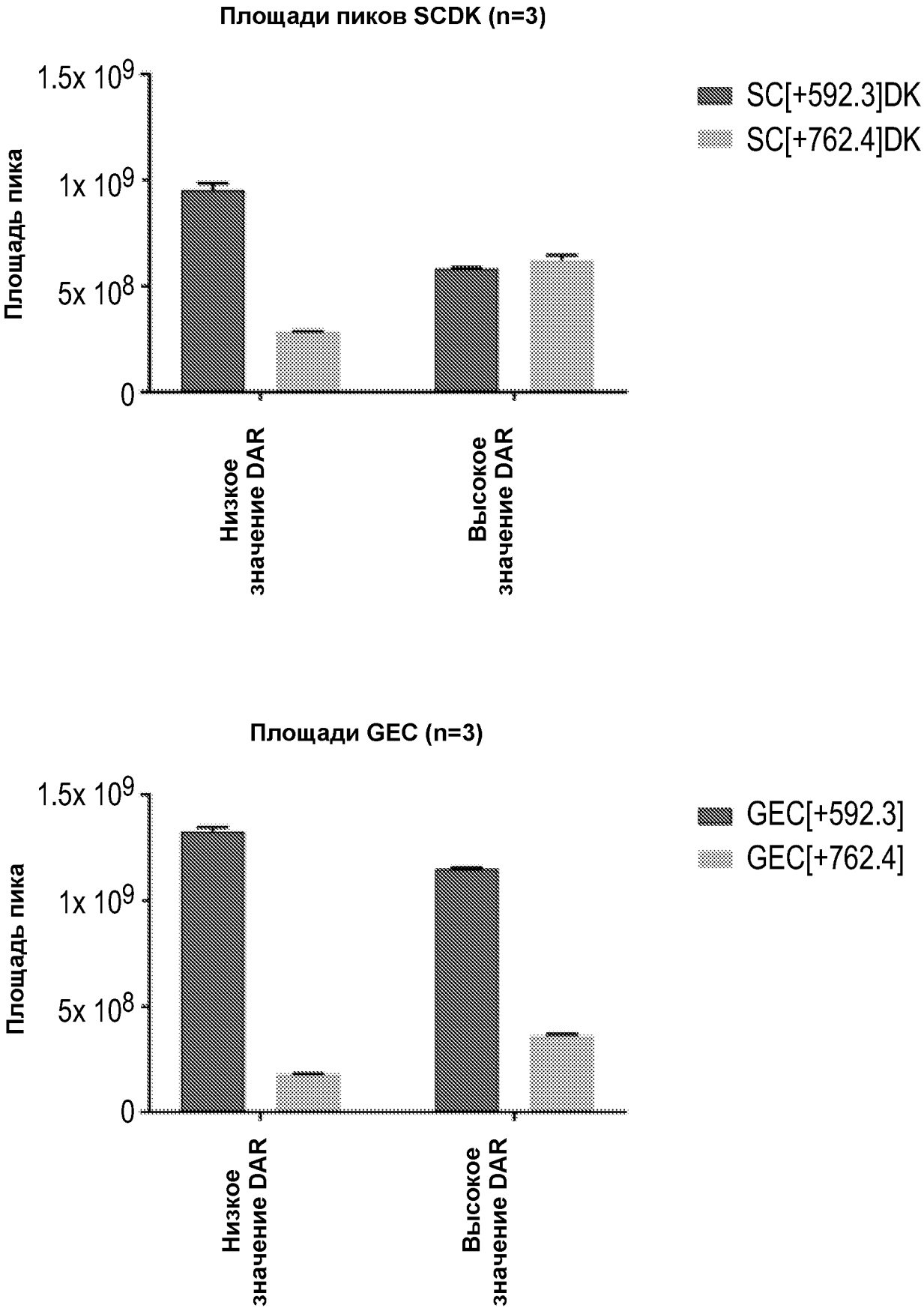
ФИГ. 13C


Эффективность мечения линкером
Площадь пика
1.5x 10^9
1x 10^9
5x 10^8
0
Низкое значение DAR
Высокое значение DAR
Пептиды шарнирной области с двумя метками
Пептиды шарнирной области без метки или с одной меткой

ФИГ. 14


Расщепление папаином в течение 30 мин
230
240
250
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
+Мечение линкером;
+Glu-C (фермент:субстрат 1:20),
37°C 3 ч
230
240
250
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK

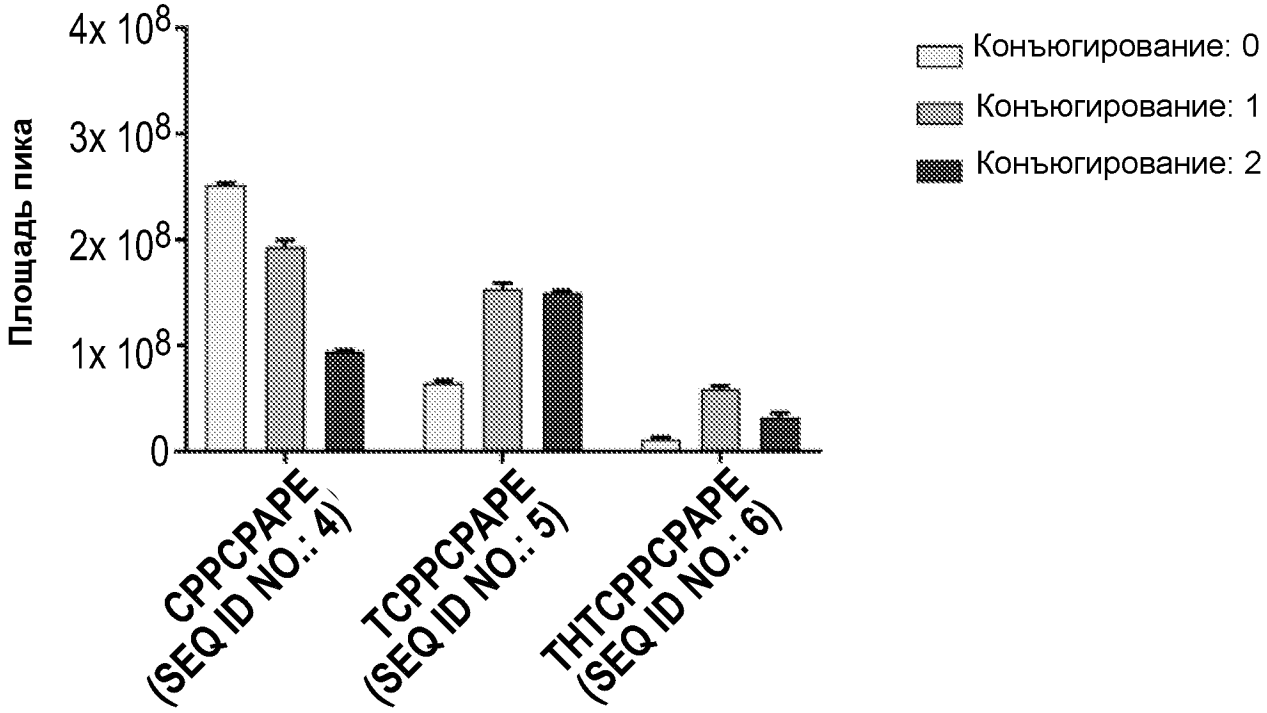
ФИГ. 15


Площади пиков SCDK (n=3)
Площадь пика
1.5x 10^9
1x 10^9
5x 10^8
0
SC[+592.3]DK
SC[+762.4]DK
Низкое значение DAR
Высокое значение DAR
Площади GEC (n=3)
Площадь пика
1.5x 10^9
1x 10^9
5x 10^8
0
GEC[+592.3]
GEC[+762.4]
Низкое значение DAR
Высокое значение DAR

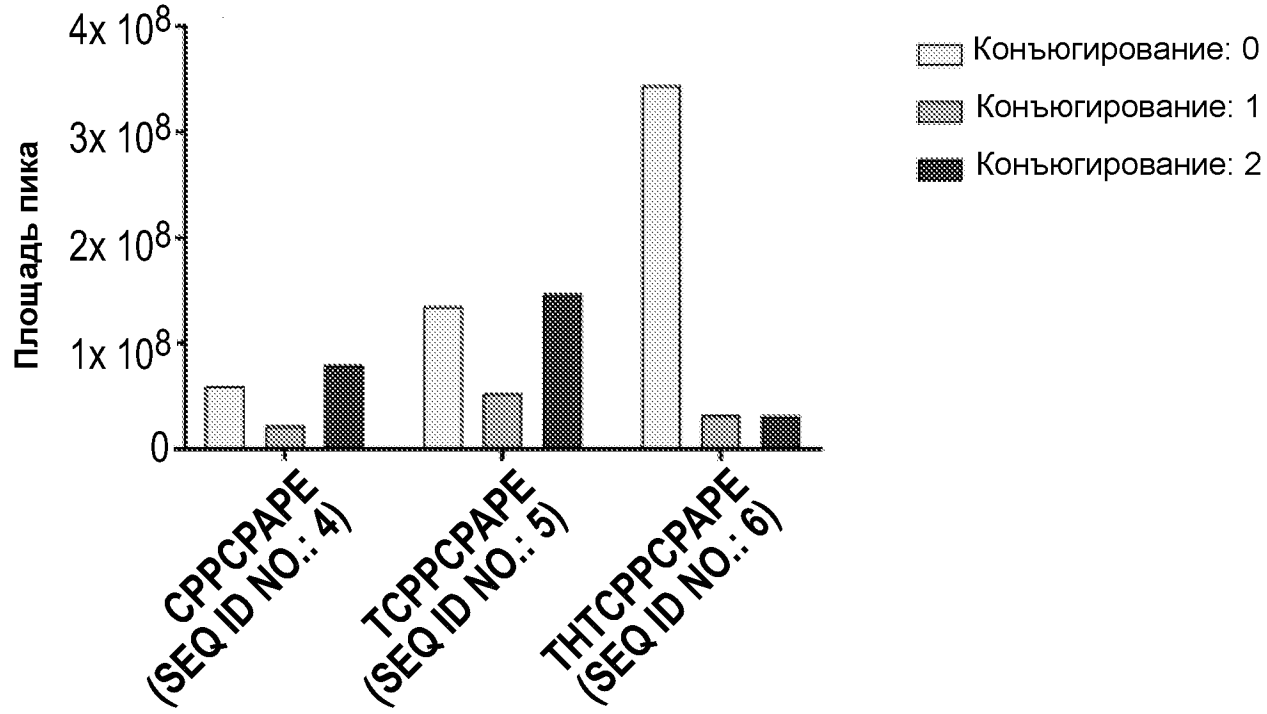
ФИГ. 16

	MAB1-L19 (n=3) Низкое значение DAR (ИЭР, интактный: 1,9)		MAB1-L18 (n=3) Высокое значение DAR (ИЭР, интактный: 3,6)	
	Определенный % конъюгирования	КВ, %	Определенный % конъюгирования	КВ, %
GEC	12.1 ± 0.1	0.9	24.0 ± 0.3	1.1
SCDK	23.1 ± 0.5	2.0	51.6 ± 0.6	1.2
Пептиды шарнирной области	73.0 ± 0.4	0.6	95.0 ± 0.2	0.2
DAR	2.16 ± 0.01	0.5	3.41 ± 0.02	0.6

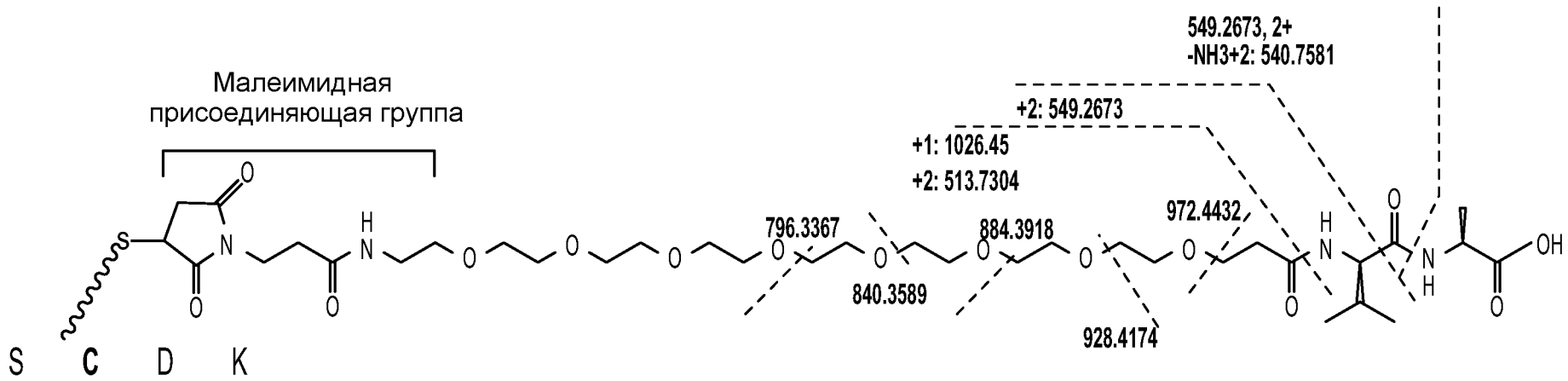
ФИГ. 17

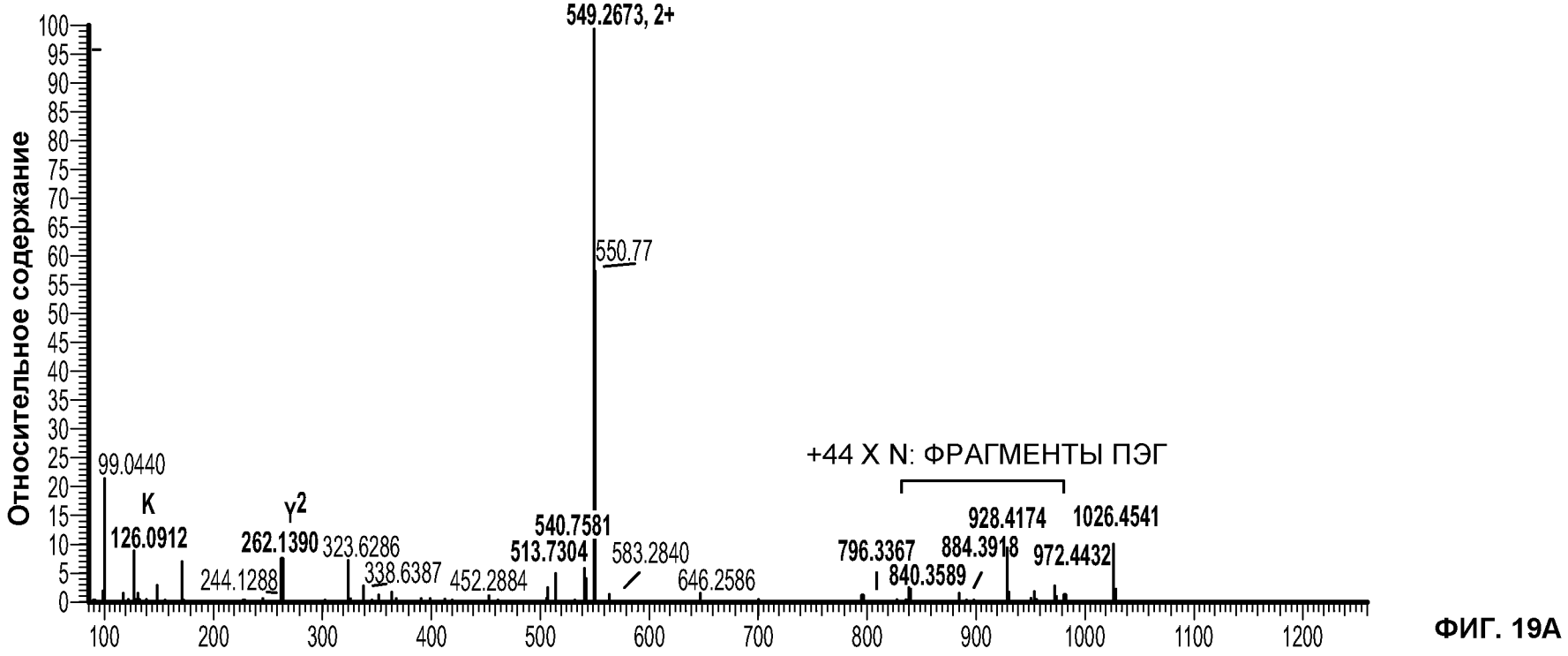


ФИГ. 18A

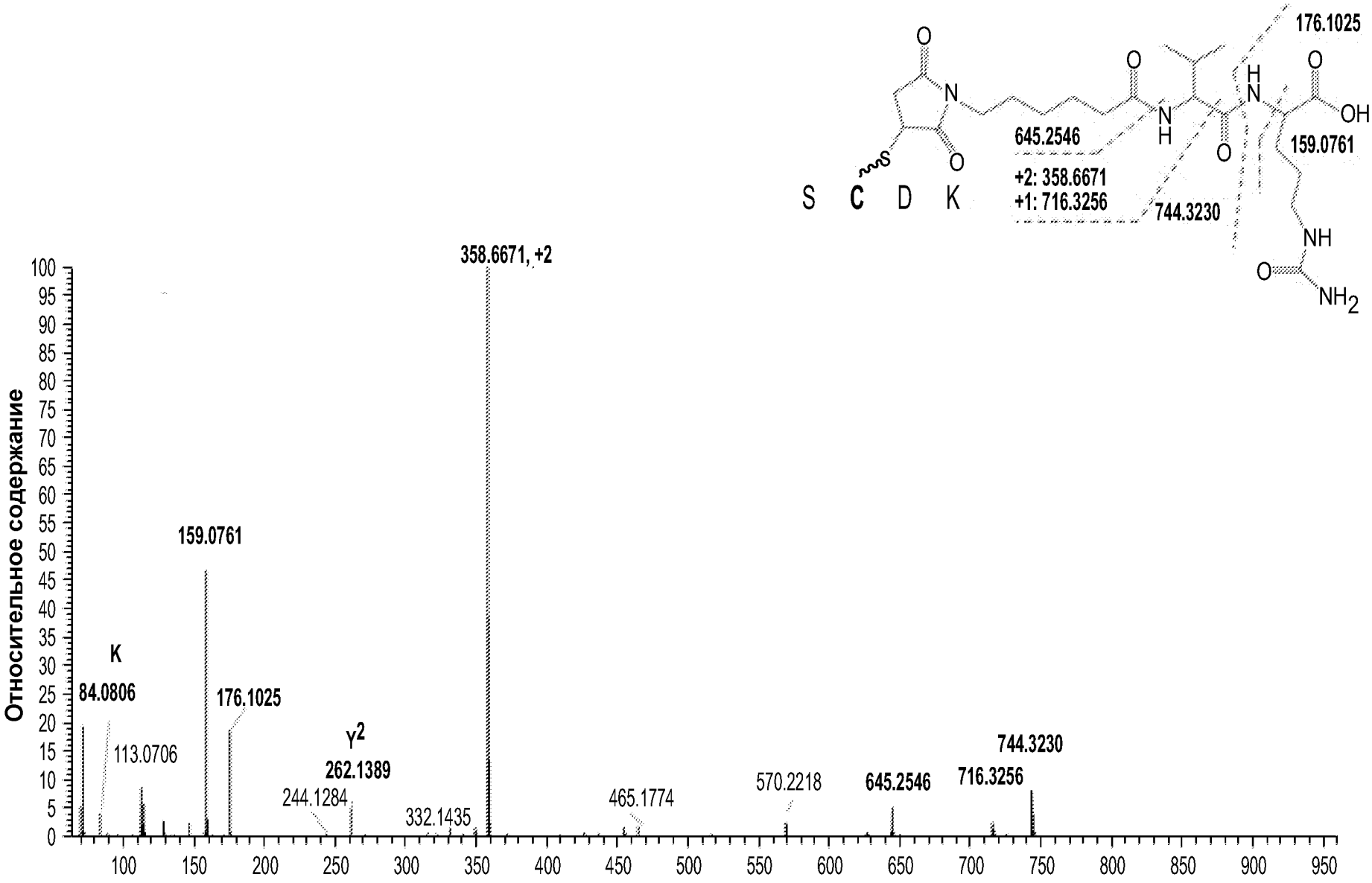


ФИГ. 18B

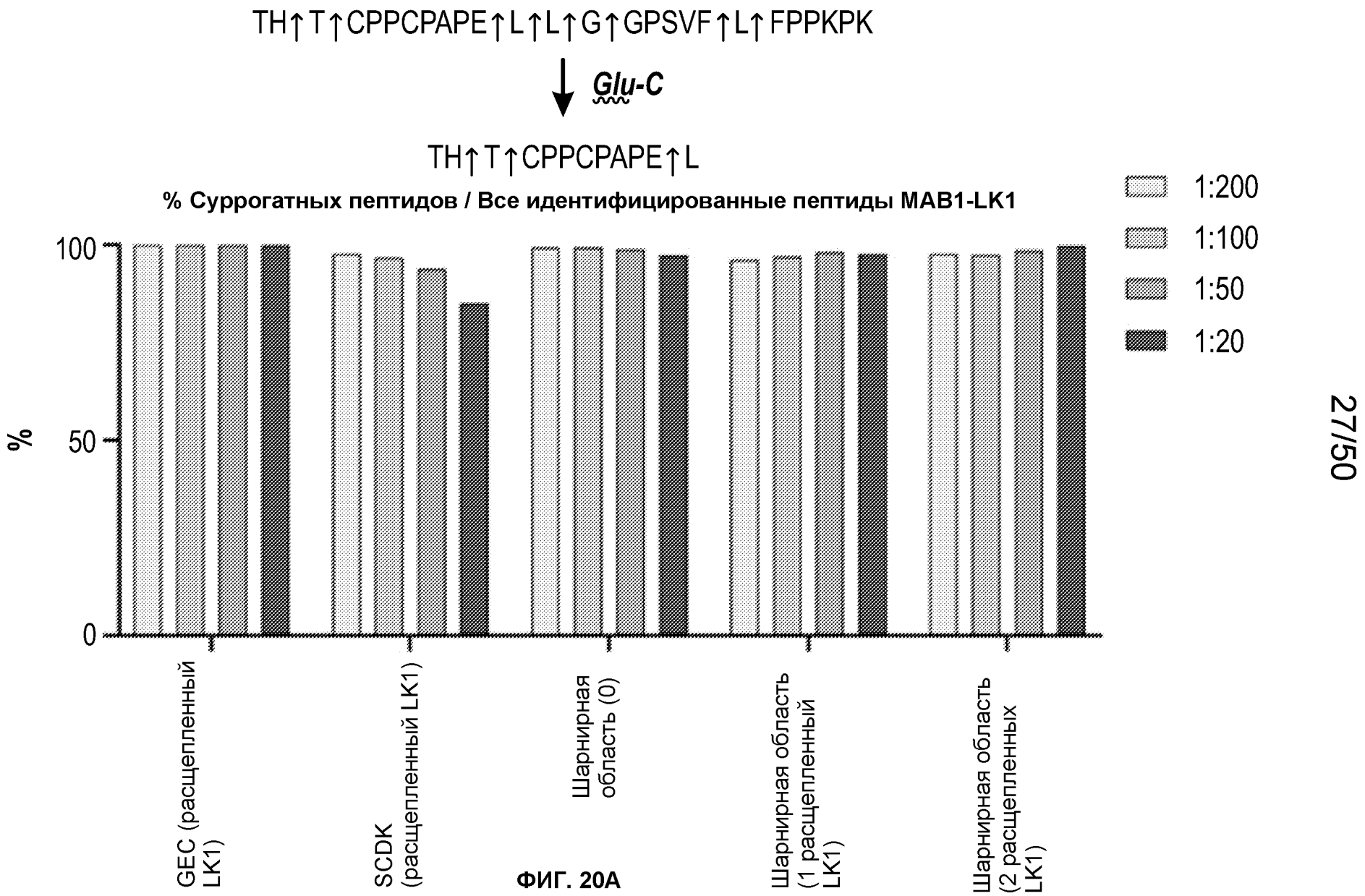

Малеимидная
присоединяющая группа
549.2673, 2+
-NH3+2: 540.7581
+2: 549.2673
+1: 1026.45
+2: 513.7304
796.3367
884.3918
972.4432
840.3589
928.4174
S C D K


Относительное содержание
549.2673, 2+
550.77
+44 X N: ФРАГМЕНТЫ ПЭГ
99.0440
K
126.0912
y2
262.1390
323.6286
338.6387
244.1288
452.2884
540.7581
513.7304
583.2840
646.2586
796.3367
884.3918
840.3589
928.4174
972.4432
1026.4541

ФИГ. 19А


S C D K
645.2546
+2: 358.6671
+1: 716.3256
744.3230
176.1025
159.0761
Относительное содержание
358.6671, +2
159.0761
K
84.0806
176.1025
113.0706
y2
262.1389
244.1284
332.1435
465.1774
570.2218
645.2546
716.3256
744.3230

ФИГ. 19B


TH↑T↑CPPCPAPE↑L↑L↑G↑GPSVF↑L↑FPPKPK
Glu-C
TH↑T↑CPPCPAPE↑L
% Суррогатных пептидов / Все идентифицированные пептиды MAB1-LK1
1:200
1:100
1:50
1:20
100
50
0
%
GEC (расщепленный LK1)
SCDK (расщепленный LK1)
Шарнирная область (0)
Шарнирная область (1 расщепленный LK1)
Шарнирная область (2 расщепленных LK1)

ФИГ. 20А

% Суррогатных пептидов / Все идентифицированные пептиды MAB1-LK3
100
50
0
%
1:200
1:100
1:50
1:20
GEC (расщепленный LK3)
SCDK (расщепленный LK3)
Шарнирная область (0)
Шарнирная область (1 расщепленный LK3)
Шарнирная область (2 расщепленных LK3)

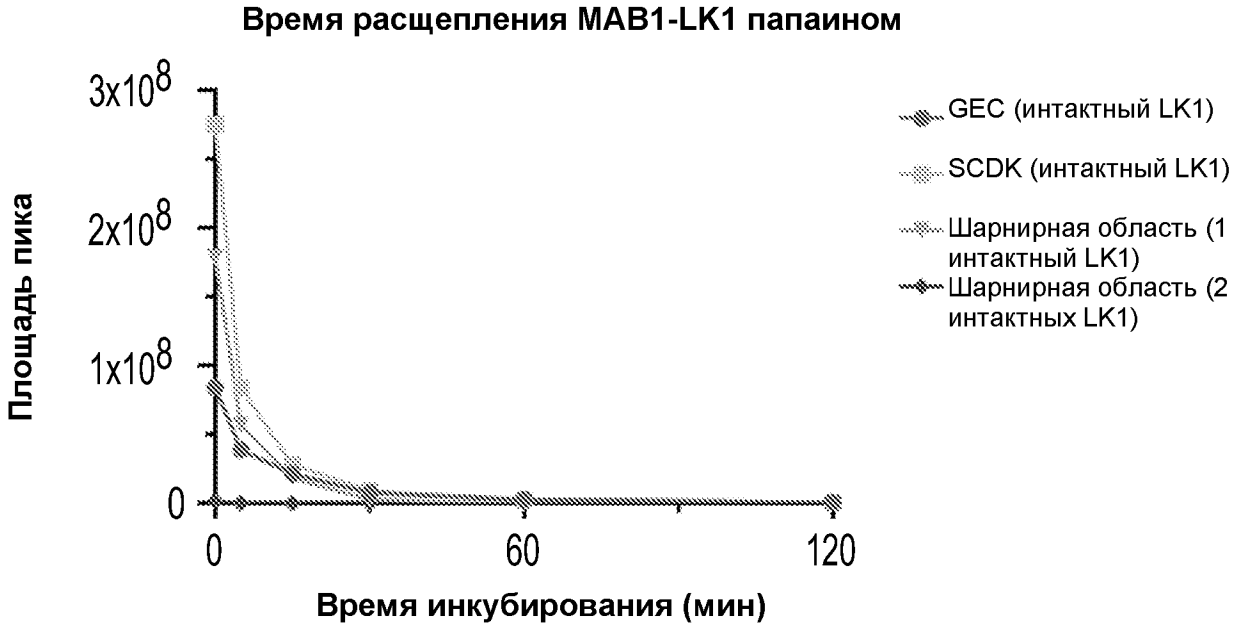
ФИГ. 20В

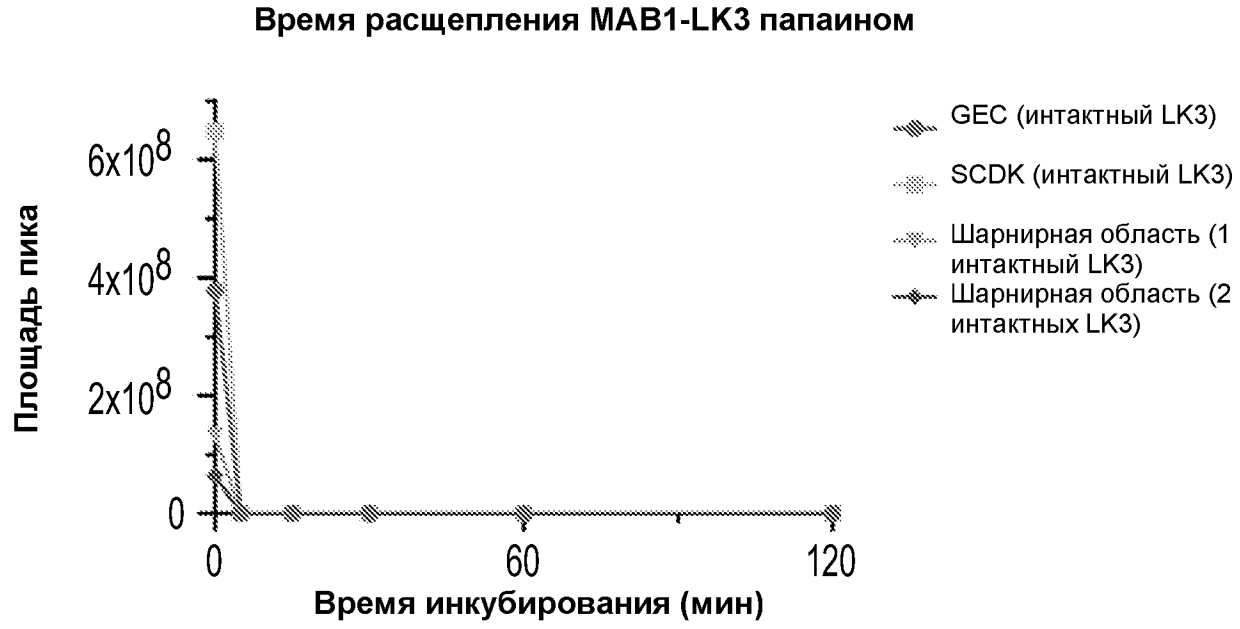
Отношение папаин:субстрат для MAB1-LK1
Площадь пика
1.5x10^9
1x10^9
5x10^8
0
1:200
1:100
1:50
1:20
GEC (расщепленный LK3)
SCDK (расщепленный LK3)
Шарнирная область (0)
Шарнирная область (1 расщепленный LK3)
Шарнирная область (2 расщепленных LK3)

ФИГ. 21A

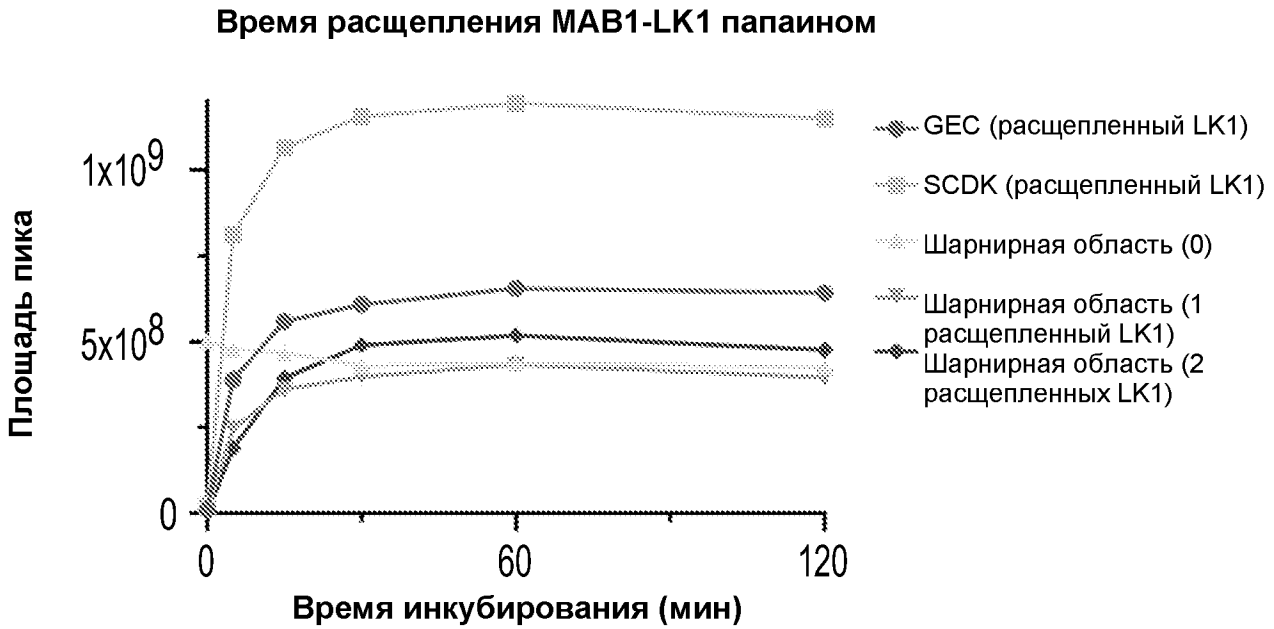
Отношение папаин:субстрат для MAB1-LK3
Площадь пика
1.5x10^9
1x10^9
5x10^8
0
1:200
1:100
1:50
1:20
GEC (расщепленный LK3)
SCDK (расщепленный LK3)
Шарнирная область (0)
Шарнирная область (1 расщепленный LK3)
Шарнирная область (2 расщепленных LK3)

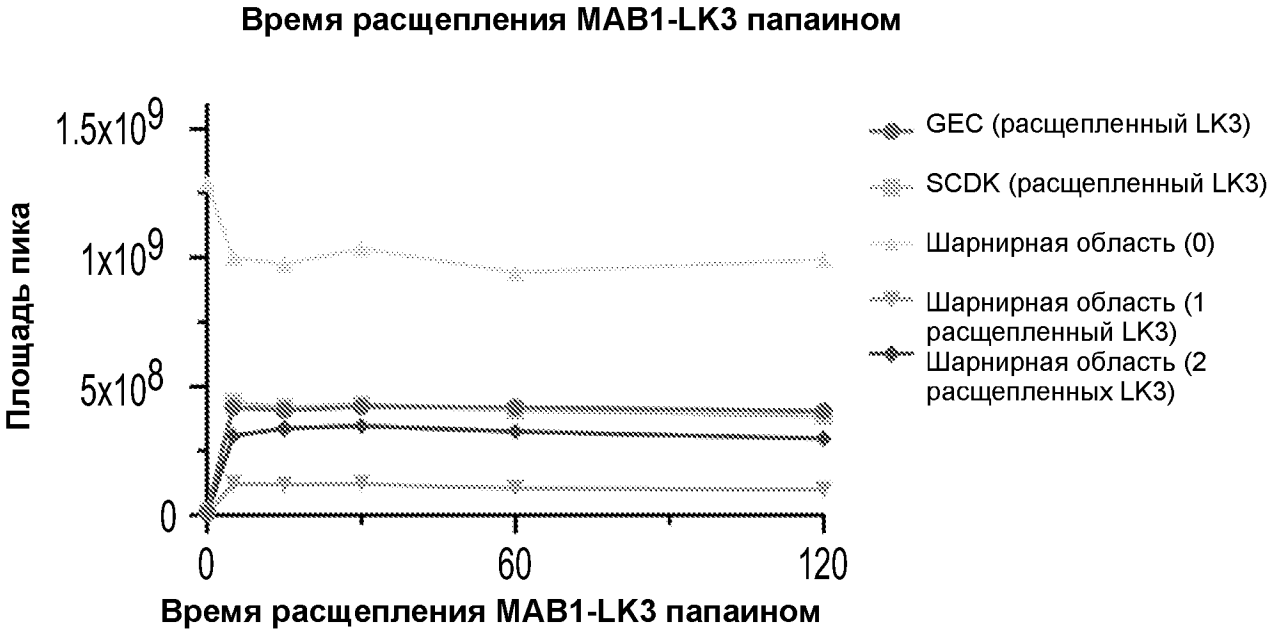
ФИГ. 21В


Время расщепления MAB1-LK1 папаином
Площадь пика
3x10^8
2x10^8
1x10^8
0
0
60
120
Время инкубирования (мин)
GEC (интактный LK1)
SCDK (интактный LK1)
Шарнирная область (1 интактный LK1)
Шарнирная область (2 интактных LK1)

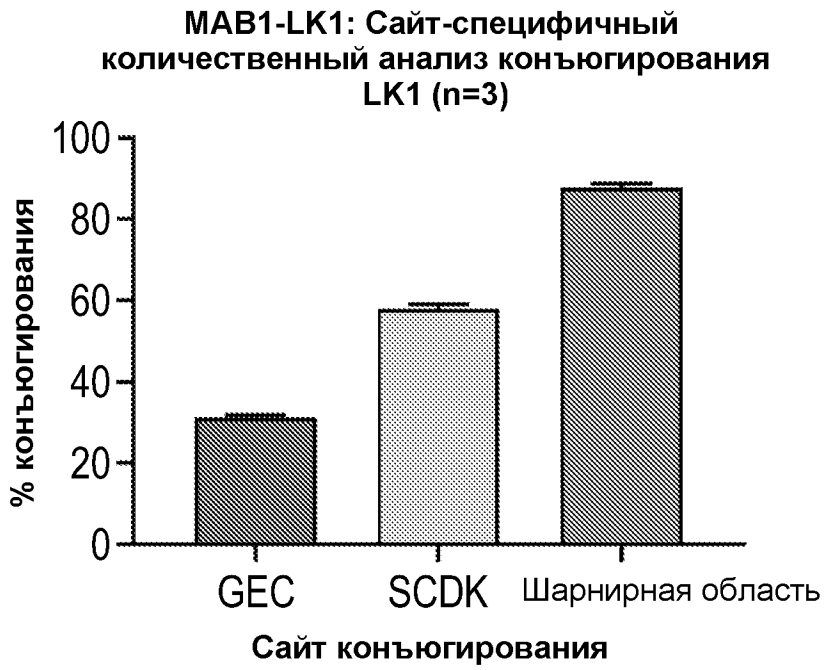

Время расщепления MAB1-LK3 папаином
Площадь пика
6x10^8
4x10^8
2x10^8
0
0
60
120
Время инкубирования (мин)
GEC (интактный LK3)
SCDK (интактный LK3)
Шарнирная область (1 интактный LK3)
Шарнирная область (2 интактных LK3)

ФИГ. 22

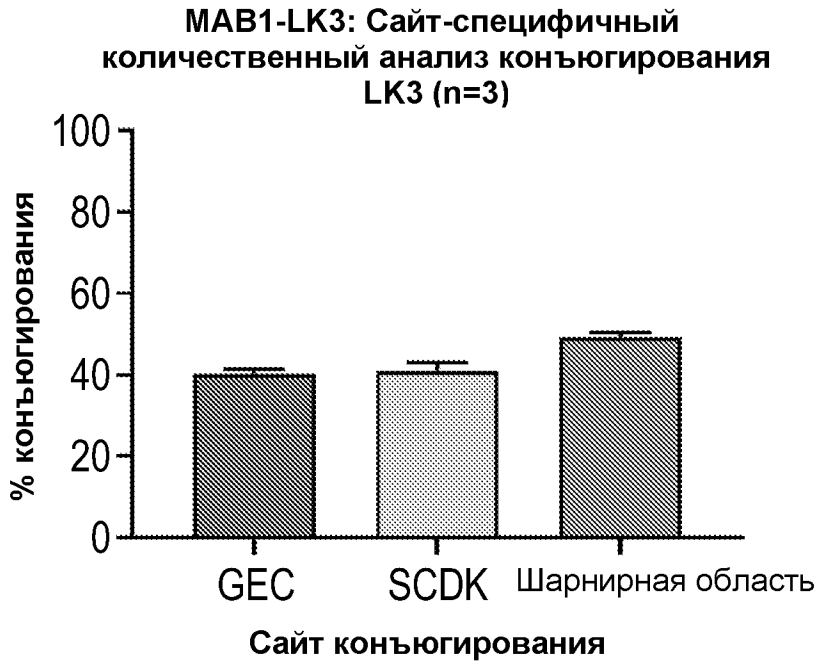

Время расщепления MAB1-LK1 папаином
Площадь пика
1x10^9
5x10^8
0
0
60
120
Время инкубирования (мин)
GEC (расщепленный LK1)
SCDK (расщепленный LK1)
Шарнирная область (0)
Шарнирная область (1 расщепленный LK1)
Шарнирная область (2 расщепленных LK1)


Время расщепления MAB1-LK3 папаином
Площадь пика
1.5x10^9
1x10^9
5x10^8
0
0
60
120
Время расщепления MAB1-LK3 папаином
GEC (расщепленный LK3)
SCDK (расщепленный LK3)
Шарнирная область (0)
Шарнирная область (1 расщепленный LK3)
Шарнирная область (2 расщепленных LK3)

ФИГ. 23



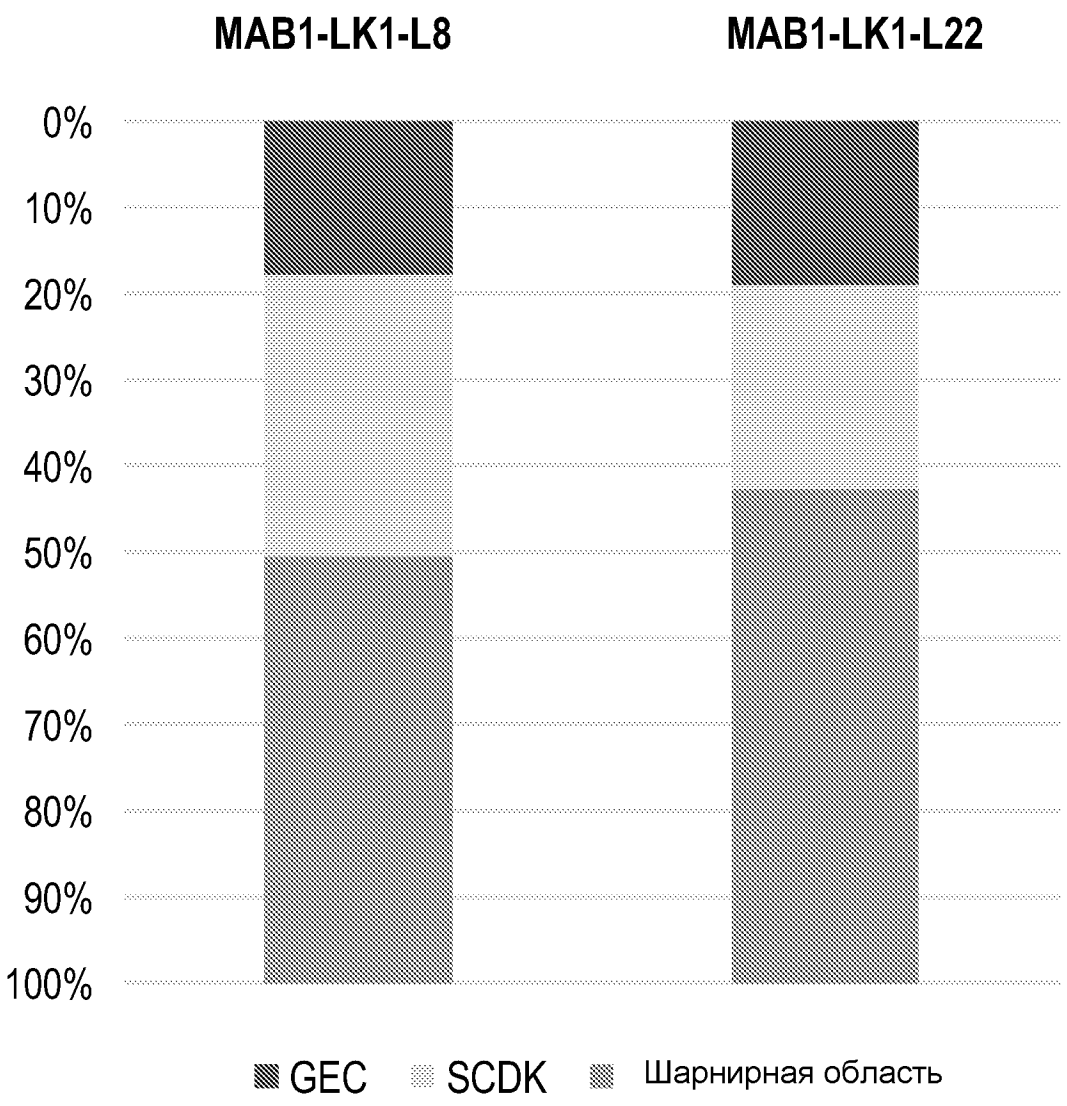
ФИГ. 24A



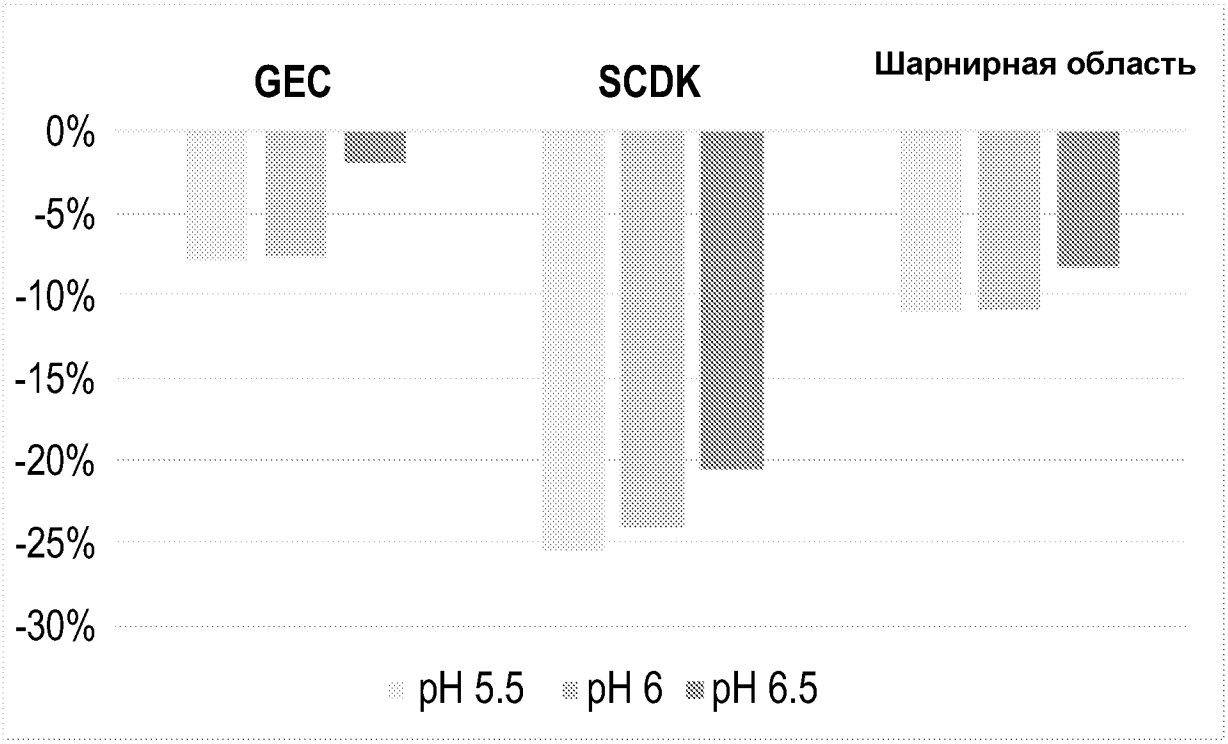
ФИГ. 24B

Сайт конъюгирования	MAB1-LK3-L9 (ИЭР: 2,2)				MAB1-LK3-L8 (ИЭР: 3,6)			
	Внутрисуточная (n=3)		Межсуточная (n=3 x 3/сутки)		Внутрисуточная (n=3)		Межсуточная (n=3 x 3/сутки)	
	Отношение	ОСО, %	Отношение	ОСО, %	Отношение	ОСО, %	Отношение	ОСО, %
GEC	0.40	2.8%	0.40	1.7%	0.31	0.4%	0.31	2.9%
SCDK	0.41	3.4%	0.43	4.5%	0.58	0.9%	0.57	0.9%
Шарнирная область (--CPPCPAPE--)	0.49	1.5%	0.48	2.1%	0.88	0.9%	0.89	4.0%
DAR	2.61	2.4%	2.63	1.8%	3.54	0.8%	3.56	2.6%
% пептидов шарнирной области (0 ЛС)	71.3%	0.5%	71.8%	0.7%	39.8%	1.3%	39.2%	4.2%
% пептидов шарнирной области (1 ЛС)	8.2%	0.7%	8.3%	1.0%	32.9%	0.7%	32.3%	1.5%
% пептидов шарнирной области (2 ЛС)	20.5%	1.7%	20.0%	2.5%	27.3%	1.1%	28.4%	6.9%

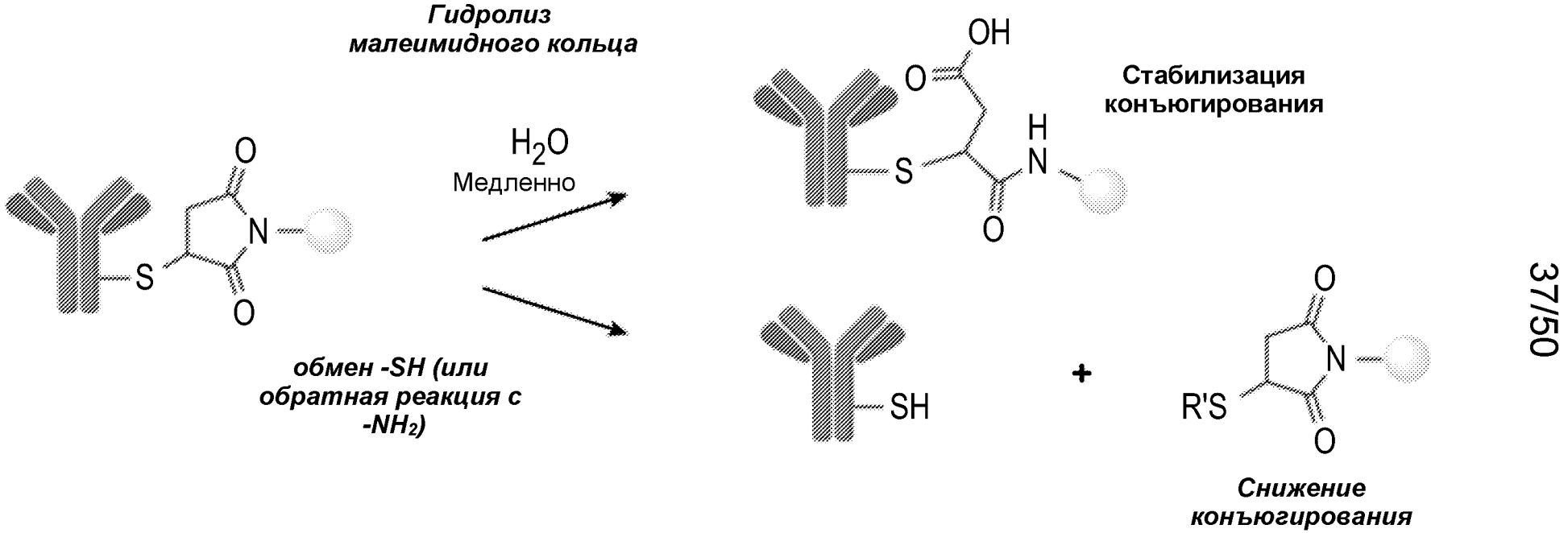
ФИГ. 25


MAB1-LK1-L8
MAB1-LK1-L22
0%
10%
20%
30%
40%
50%
60%
70%
80%
90%
100%
GEC
SCDK
Шарнирная область

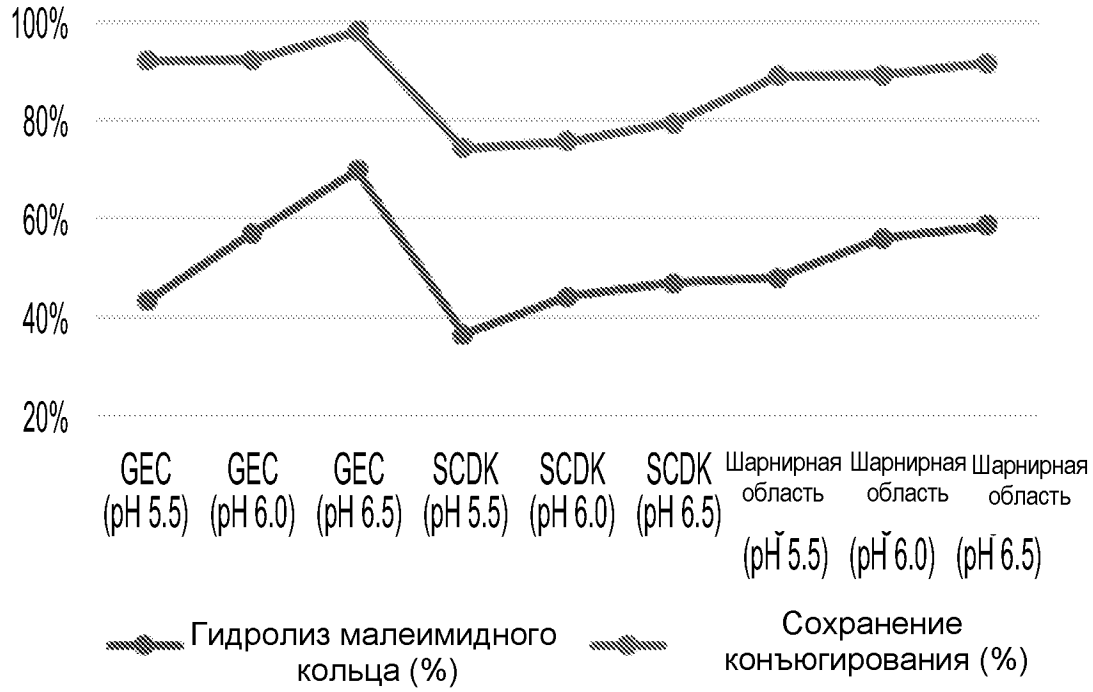
ФИГ. 26



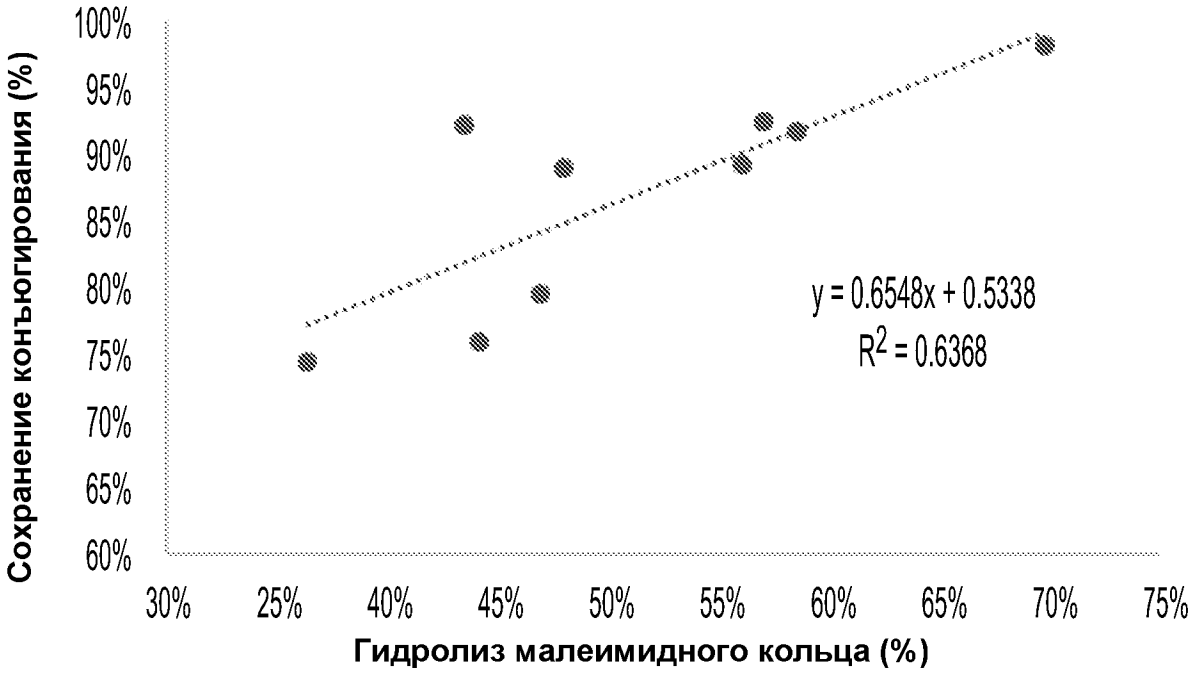
ФИГ. 27


Гидролиз
малеимидного кольца
H2O
Медленно
обмен -SH (или
обратная реакция с
-NH2)
OH
O
S
H
N
O
Стабилизация
конъюгирования
SH
+
R'S
N
O
Снижение
конъюгирования

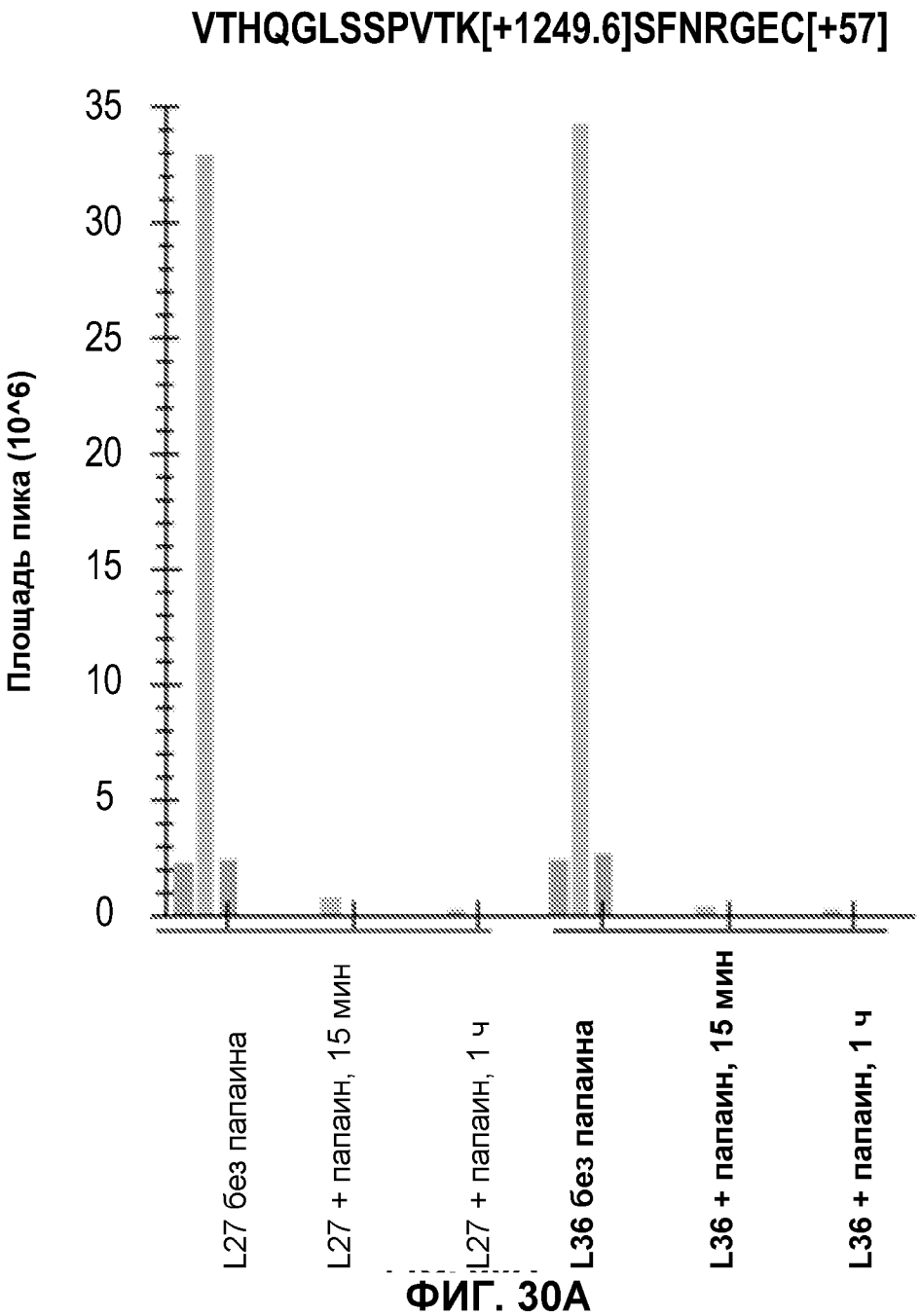
ФИГ. 28



ФИГ. 29A

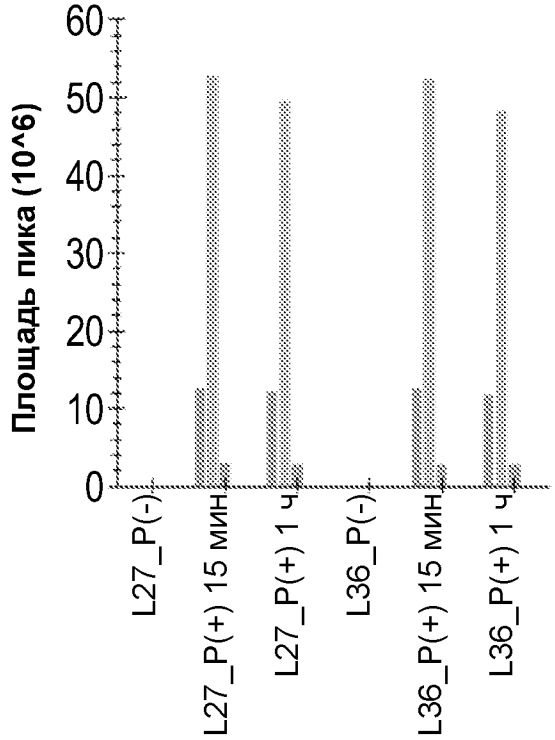


ФИГ. 29B


VTHQGLSSPVTK[+1249.6]SFNRGEC[+57]
Площадь пика (10^6)
35
30
25
20
15
10
5
0
L27 без папаина
L27 + папаин, 15 мин
L27 + папаин, 1 ч
L36 без папаина
L36 + папаин, 15 мин
L36 + папаин, 1 ч

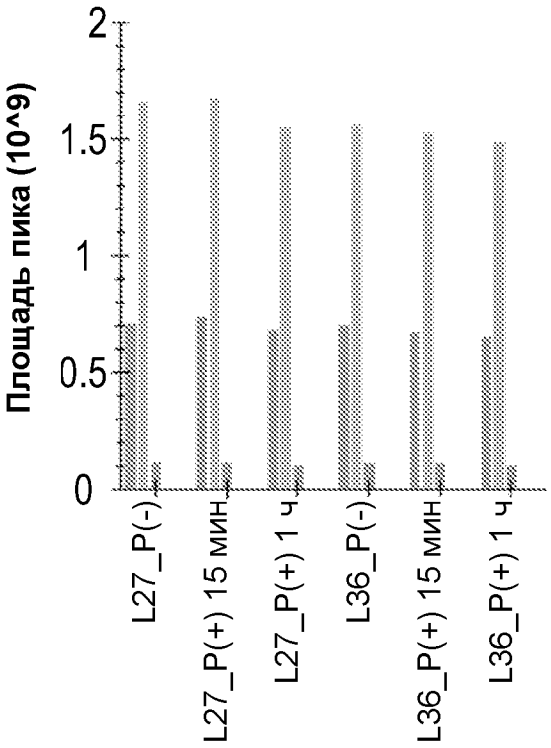
ФИГ. 30А

VTHQGLSSPVTK[+384.2]SFNRGEC[+57]

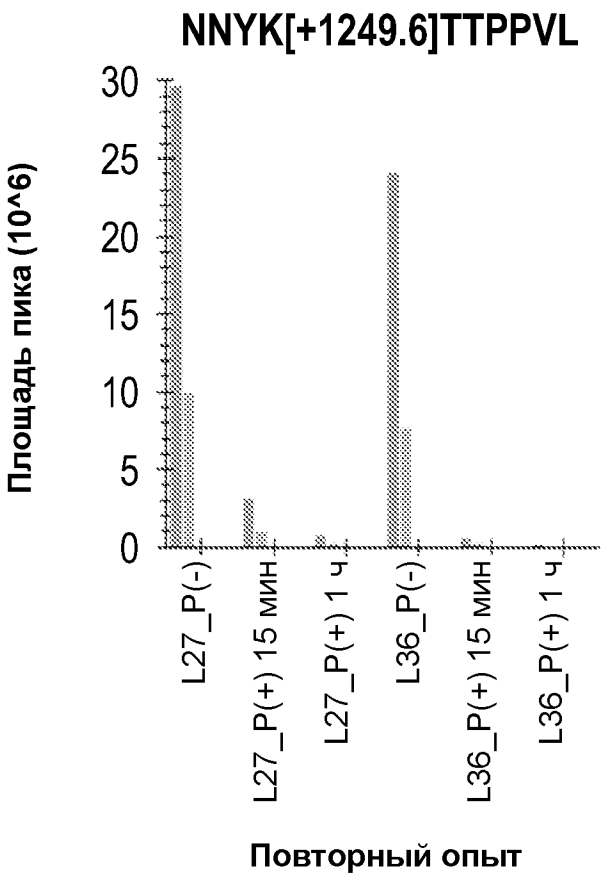


ФИГ. 30B

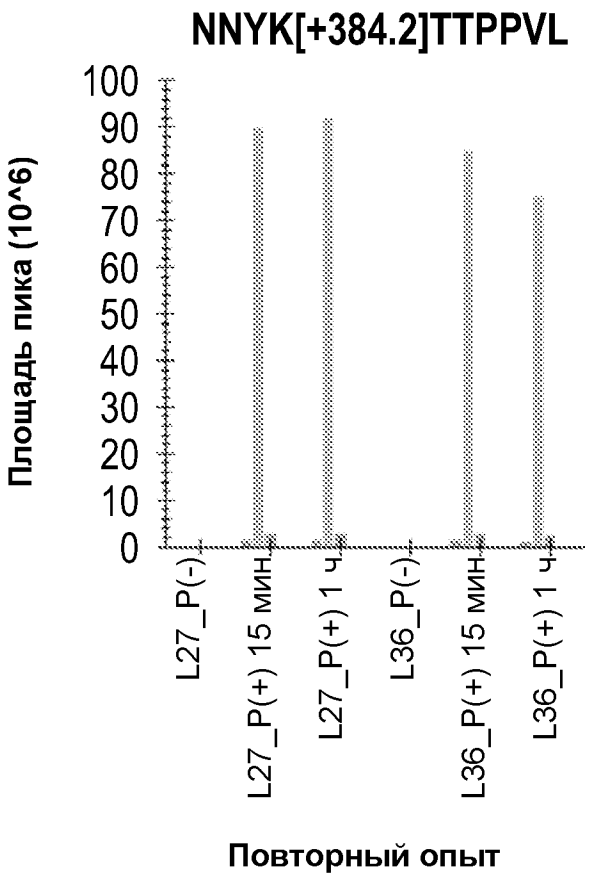
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC[+57]



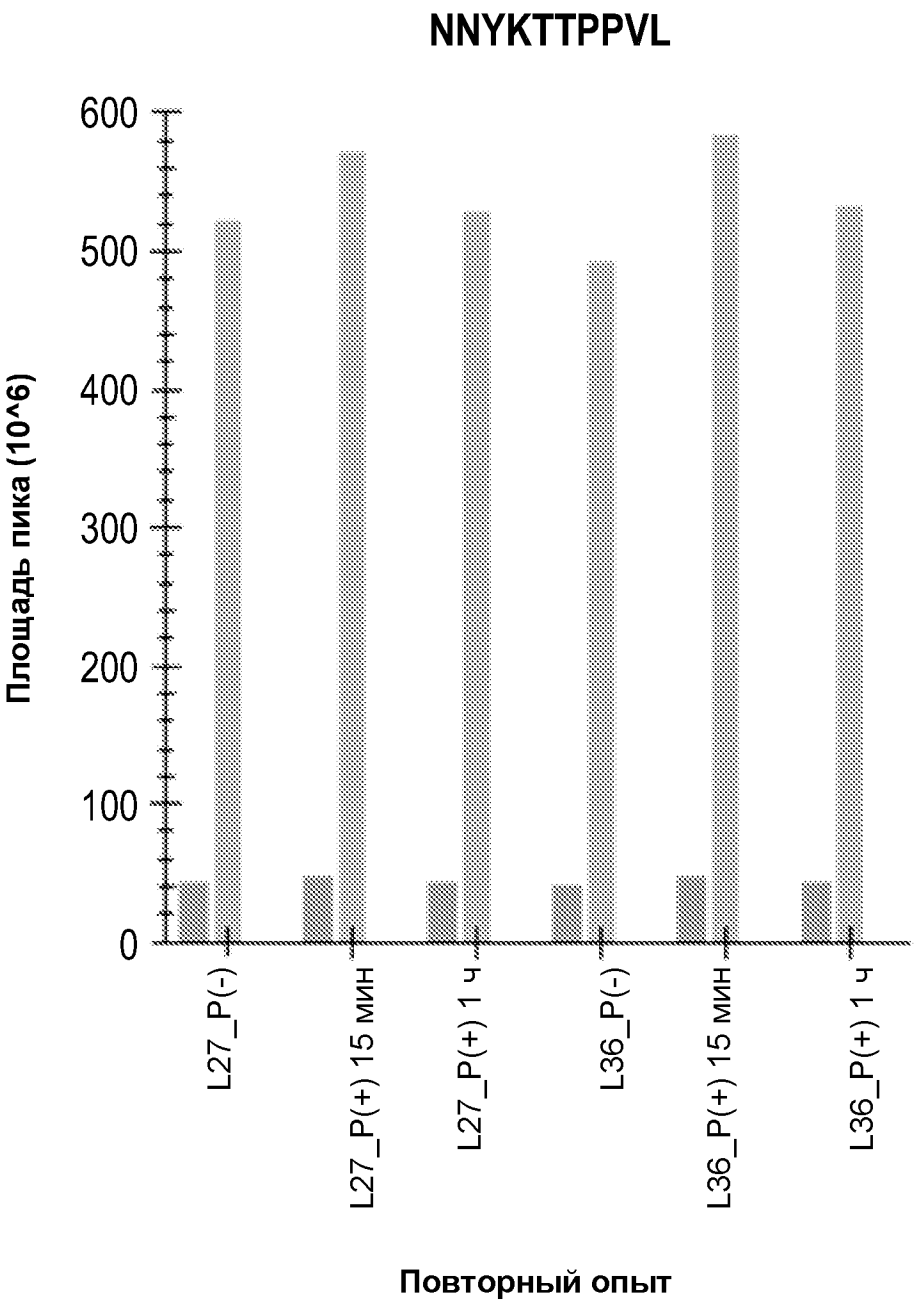
ФИГ. 30C



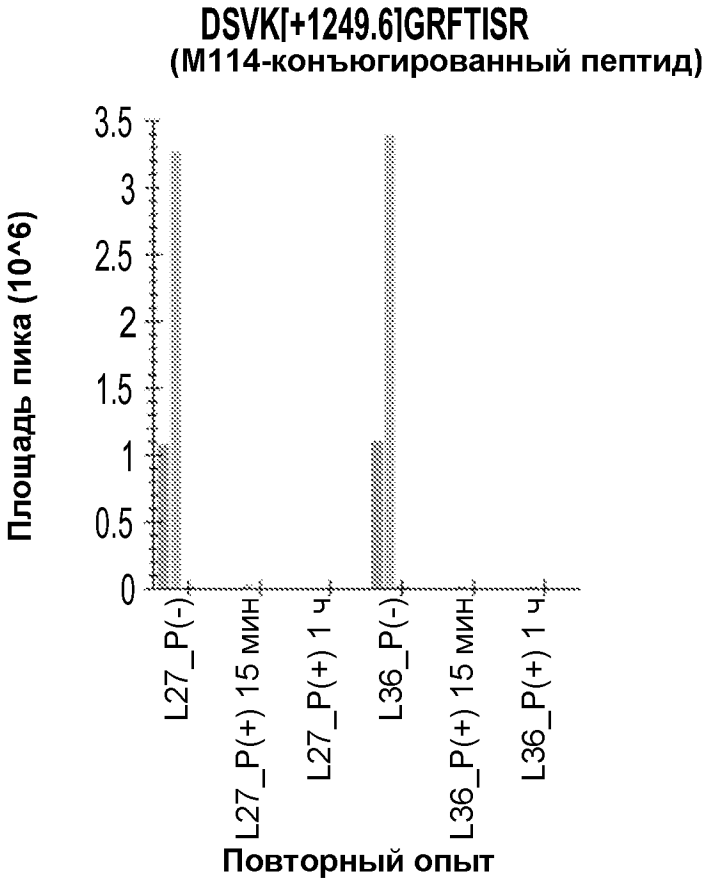
ФИГ. 31A



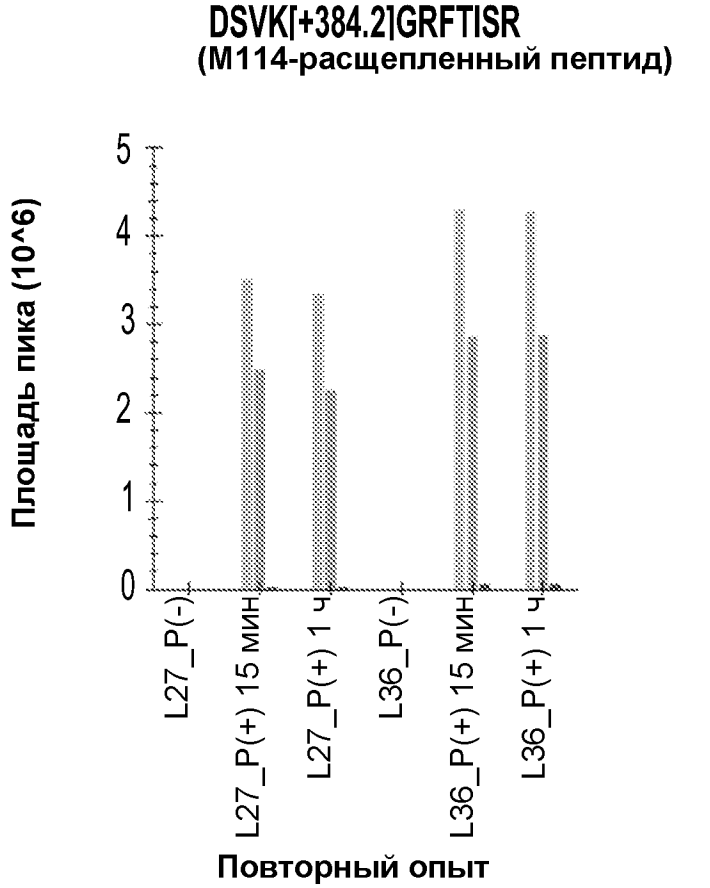
ФИГ. 31B


NNYKTTPPVL
Площадь пика (10^6)
600
500
400
300
200
100
0
L27_P(-)
L27_P(+) 15 мин
L27_P(+) 1 ч
L36_P(-)
L36_P(+) 15 мин
L36_P(+) 1 ч
Повторный опыт

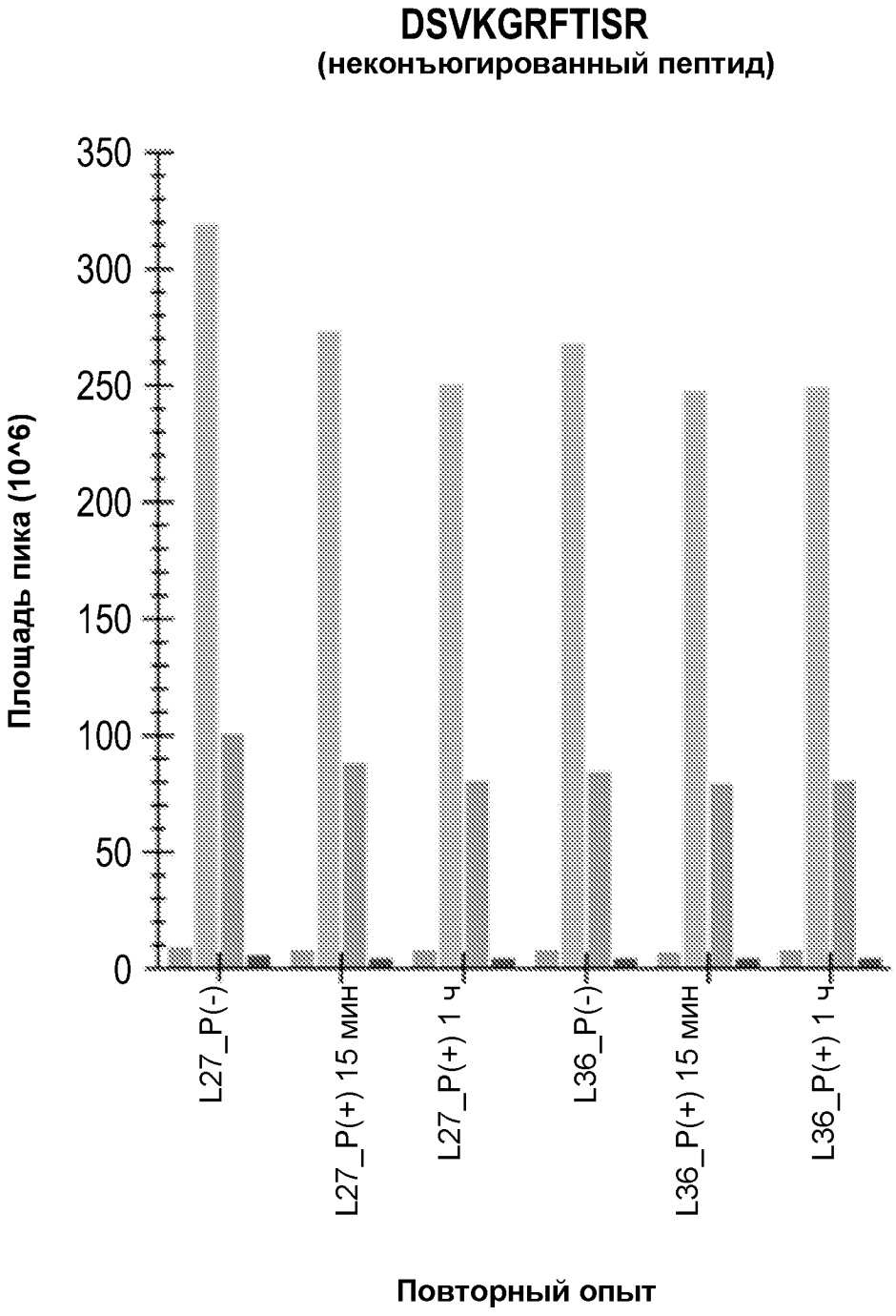
ФИГ. 31C



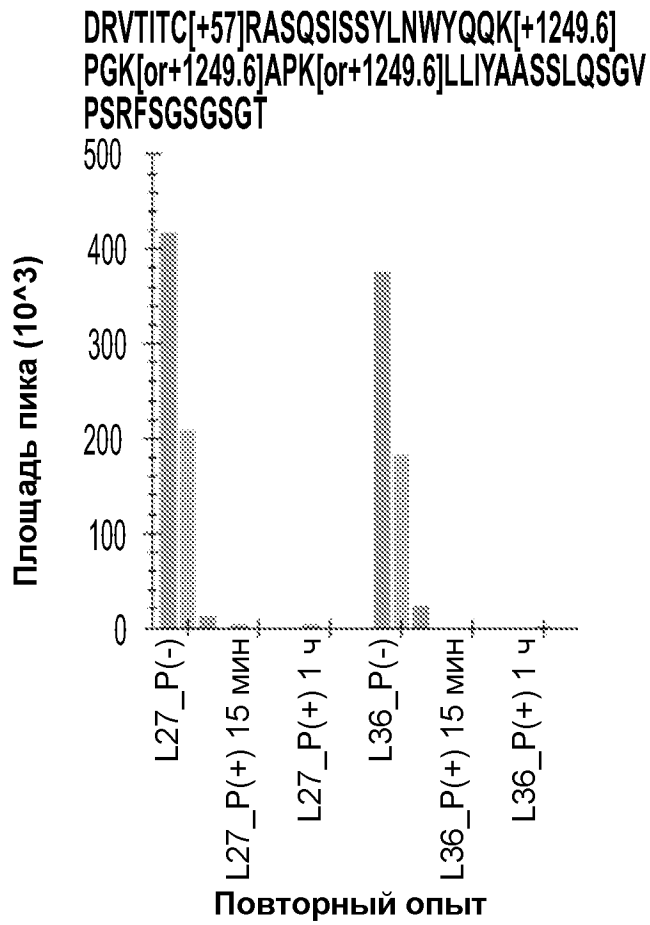
ФИГ. 32A



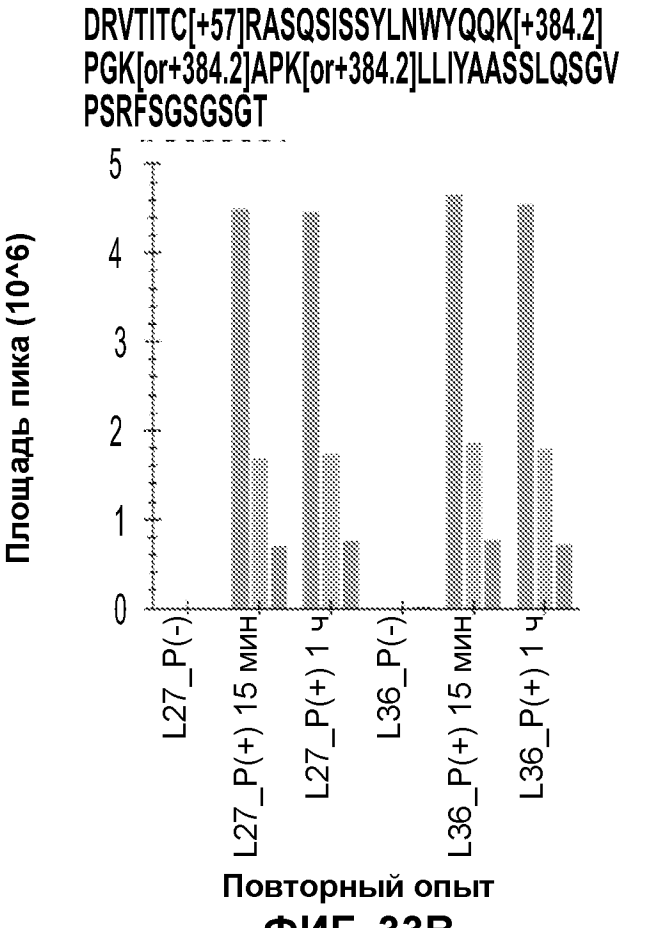
ФИГ. 32B


DSVKGRFTISR
(неконъюгированный пептид)
Площадь пика (10^6)
350
300
250
200
150
100
50
0
L27_P(-)
L27_P(+) 15 мин
L27_P(+) 1 ч
L36_P(-)
L36_P(+) 15 мин
L36_P(+) 1 ч
Повторный опыт

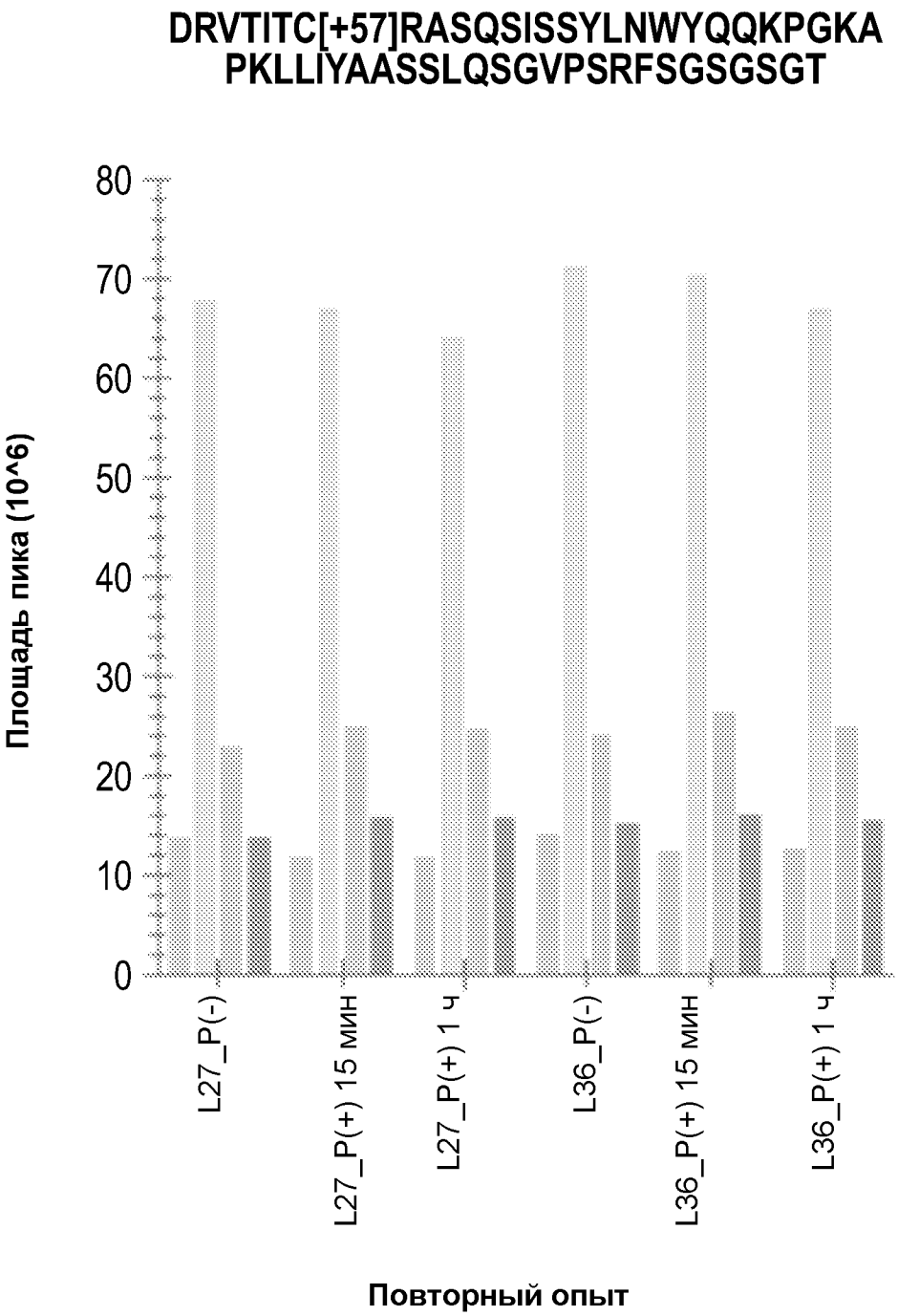
ФИГ. 32C



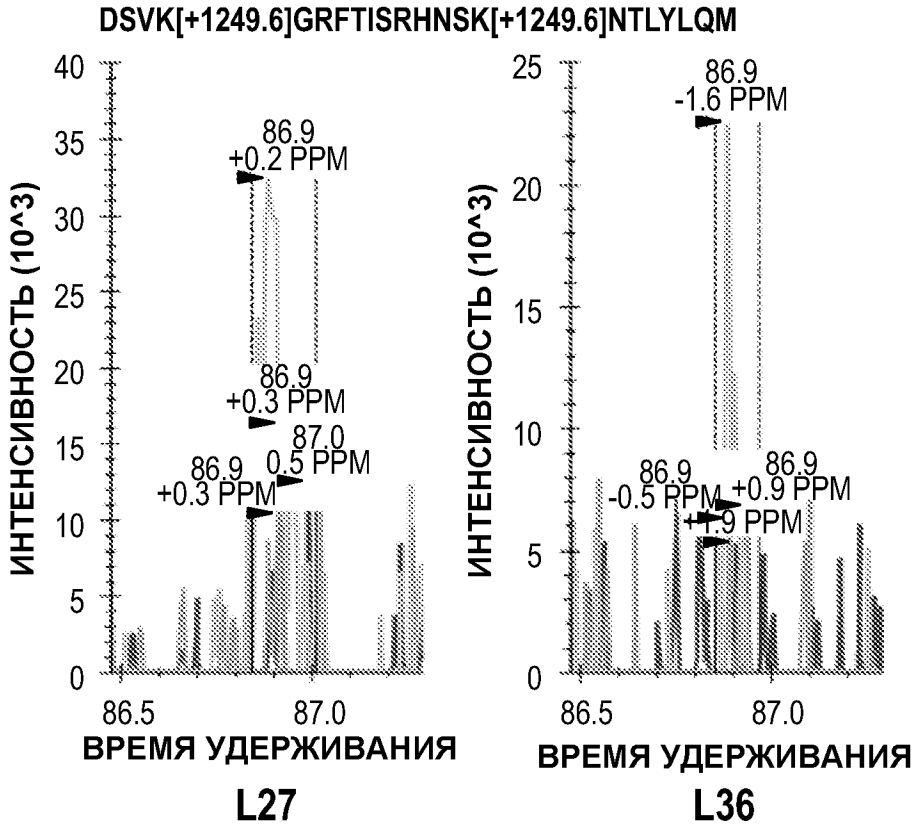
ФИГ. 33A



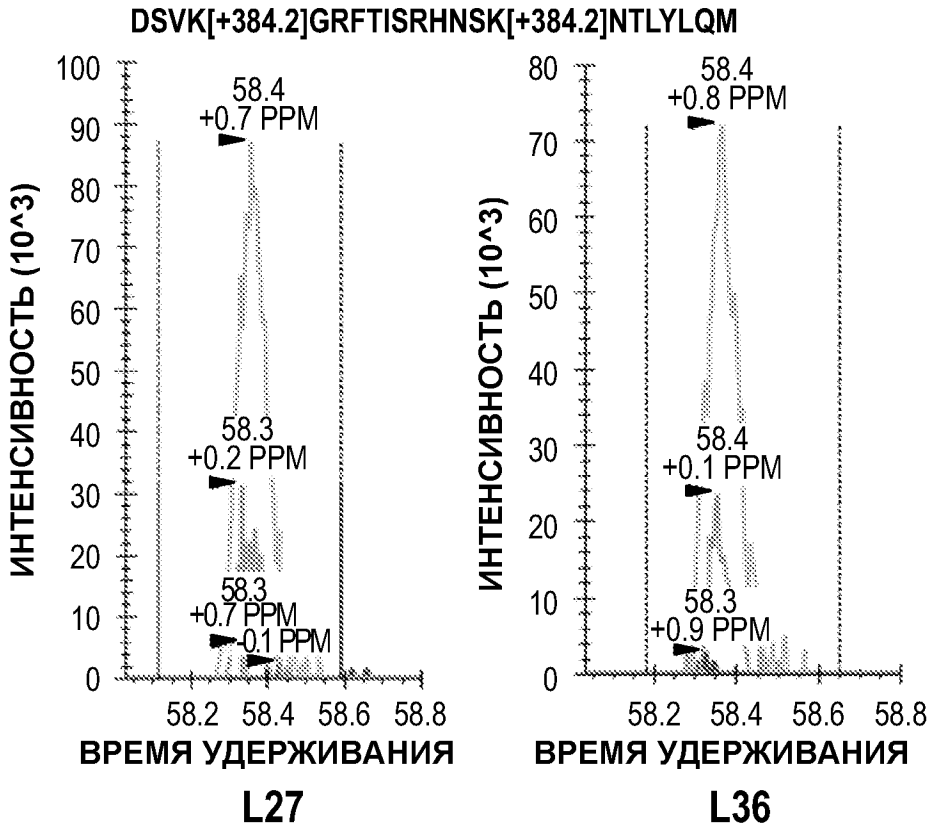
ФИГ. 33B


DRVTITC[+57]RASQSISSYLNWYQQKPGKA
PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGT
Площадь пика (10^6)
0
10
20
30
40
50
60
70
80
L27_P(-)
L27_P(+) 15 мин
L27_P(+) 1 ч
L36_P(-)
L36_P(+) 15 мин
L36_P(+) 1 ч
Повторный опыт

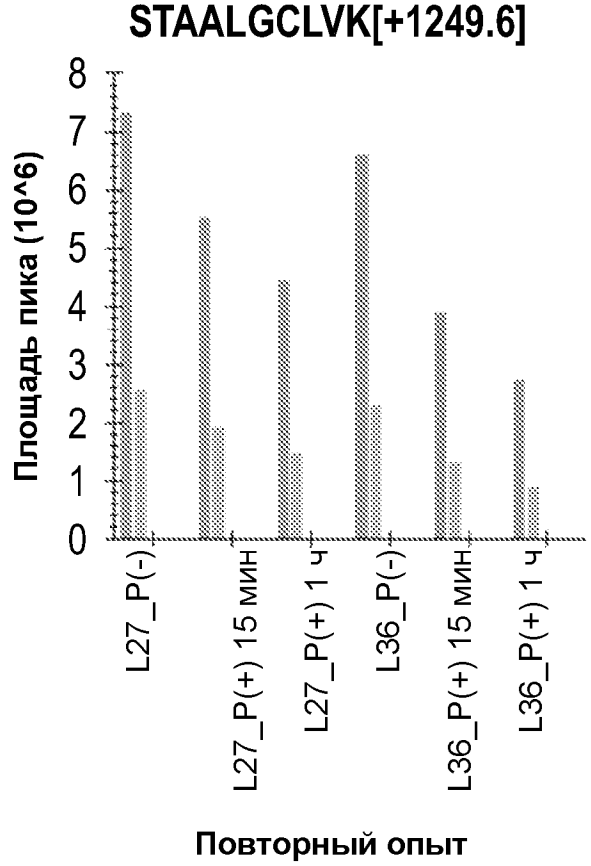
ФИГ. 33C



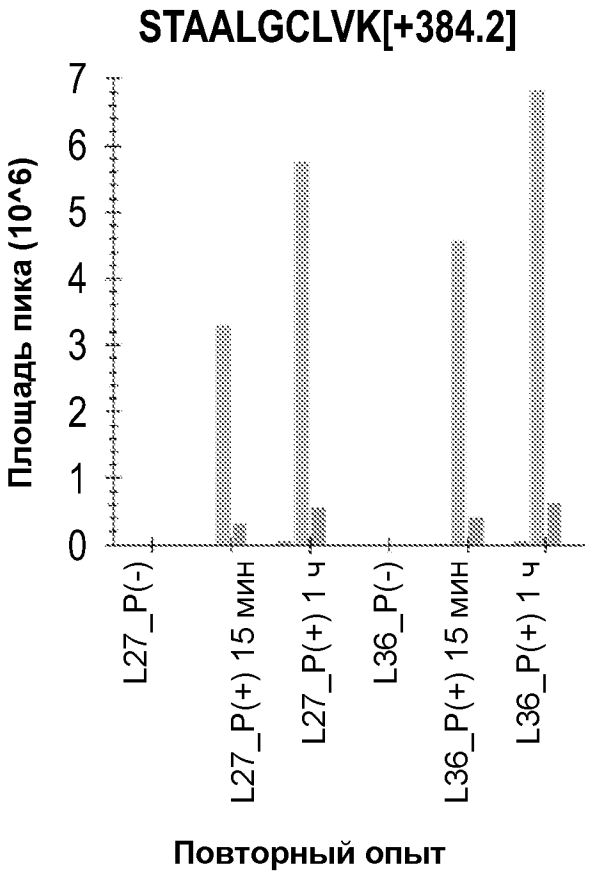
ФИГ. 34A



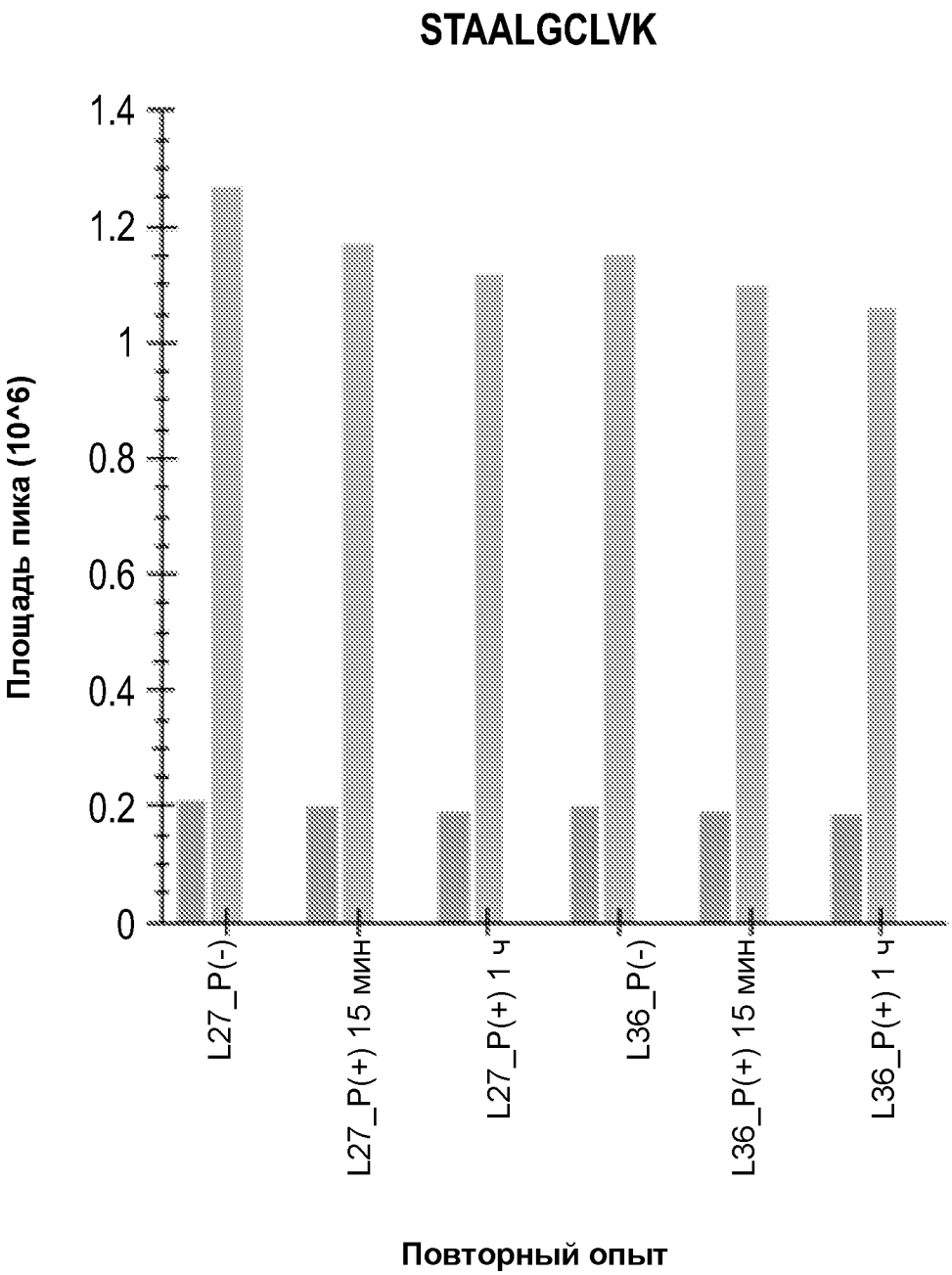
ФИГ. 34B



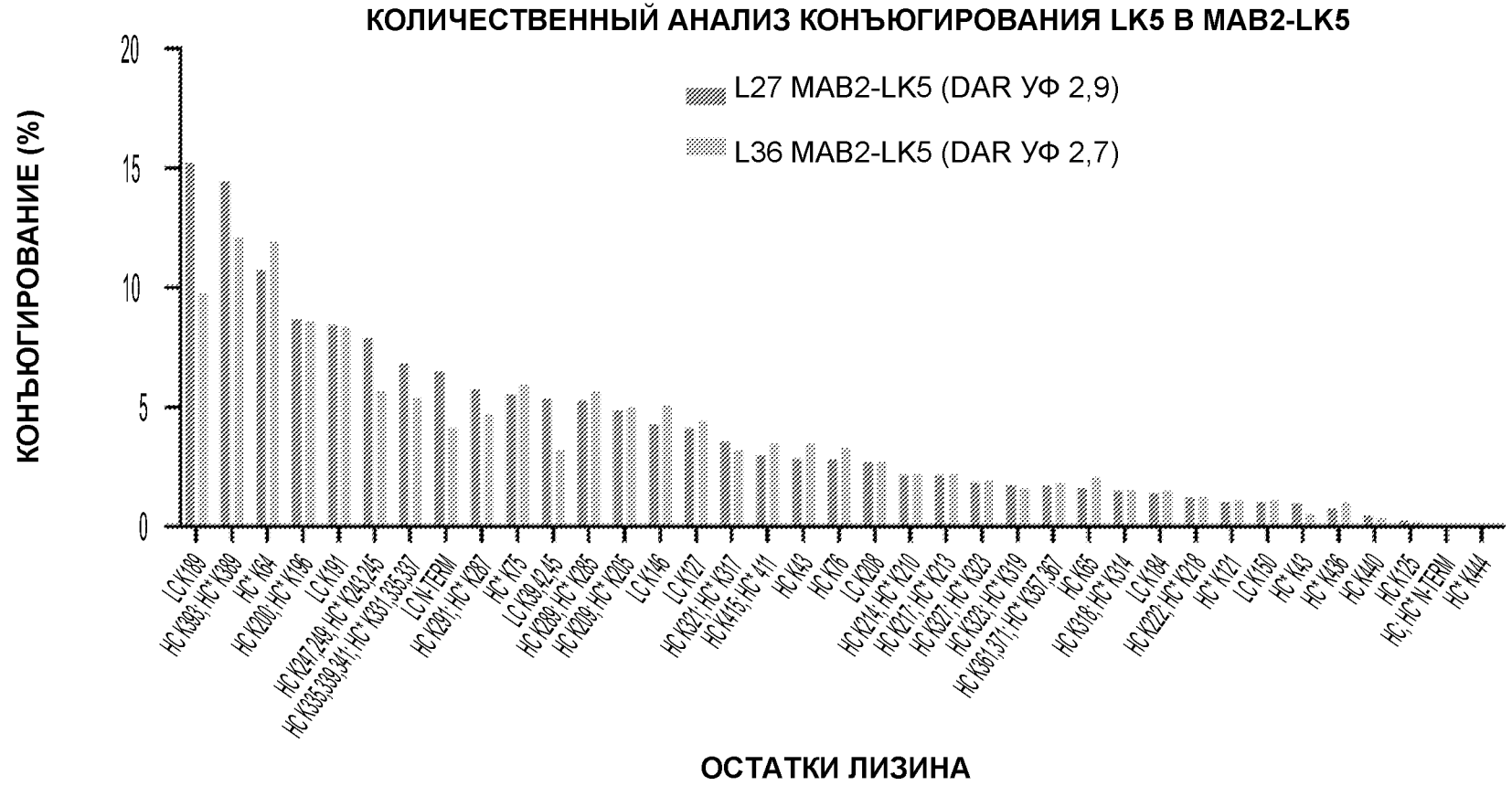
ФИГ. 35A



ФИГ. 35B


STAALGCLVK
Площадь пика (10^6)
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
L27_P(-)
L27_P(+) 15 мин
L27_P(+) 1 ч
L36_P(-)
L36_P(+) 15 мин
L36_P(+) 1 ч
Повторный опыт

ФИГ. 35C



	MAB2-LK5 L27	MAB2-LK5 L36
DAR (PADD)	2.86	2.60
DAR (УФ)	2.9	2.7

ФИГ. 36