

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392694 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.26(22) Дата подачи заявки
2022.03.25(51) Int. Cl. C07K 16/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61K 49/00 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)

(54) СКОНСТРУИРОВАННЫЕ С ЦИСТЕИНОМ КОНСТРУКЦИИ АНТИТЕЛ, КОНЬЮГАТЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/166,450

(32) 2021.03.26

(33) US

(86) PCT/CA2022/050453

(87) WO 2022/198335 2022.09.29

(71) Заявитель:

ЗАЙМВОРКС БиСи ИНК. (СА)

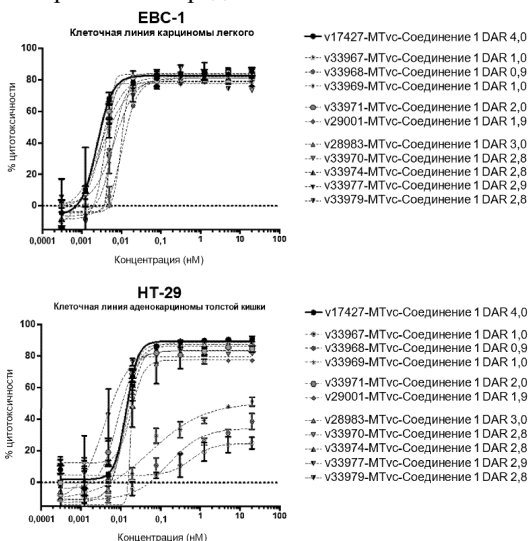
(72) Изобретатель:

Рич Джеймс Р., Санчес Марио, Дас
Самир, Фарбер Патрик (СА)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Описаны конструкции антител, сконструированные для введения по меньшей мере одной мутации со вставкой цистеина ("сконструированные с цистеином конструкции антител"). Вставленный остаток(остатки) цистеина можно использовать в качестве сайта для конъюгации одного или большего количества активных агентов с конструкцией антитела с получением конъюгатов, таких как конъюгаты "антитело-лекарственное средство".



202392694

A1

A1

202392694

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579692EA/061

СКОНСТРУИРОВАННЫЕ С ЦИСТЕИНОМ КОНСТРУКЦИИ АНТИТЕЛ, КОНЬЮГАТЫ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] Настоящее изобретение относится к области антител и, в частности, к антителам, сконструированным так, чтобы они включали одну или большее количество мутаций со вставкой цистеина, а также к конъюгатам, содержащим эти антитела и активный агент.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Конъюгаты антител с лекарственными средствами (ADC) представляют собой относительно новый и многообещающий класс терапевтических средств. ADC обычно состоят из моноклонального антитела, связанного с низкомолекулярным терапевтическим агентом («лекарственным средством») через линкер. Соотношение «лекарственное средство-антитело» (DAR) и конкретные сайты конъюгации лекарственного средства могут влиять на стабильность и экспозицию ADC (Hamblett, *et al.*, 2004, *Clin. Cancer Res.*, 10(20):7063-7070; Shen, *et al.*, 2012, *Nature Biotechnology*, 30:184-189). Традиционные способы получения ADC посредством конъюгации через нативные остатки цистеина или лизина обычно приводят к гетерогенным смесям конъюгатов, как с точки зрения лекарственной нагрузки, так и с точки зрения конъюгации, что приводит к возможным недостаткам в одном или большем количестве контекстов: стабильность антител, специфичность, распределение *in vivo*, фармакокинетика и/или эффективность.

[0003] Замена нативных аминокислот в антителе остатками цистеина для целей сайт-специфической конъюгации была впервые описана Lyons в контексте мечения антител (Lyons, *et al.*, 1990, *Protein Eng Des Sel.*, 3(8):703-708). Позже была описана сайт-специфическая конъюгация лекарственного средства со сконструированными остатками цистеина в антителах для решения проблемы гетерогенности (THIOMAB™) (Junutula, *et al.*, 2008, *Nat Biotechnol.*, 26:925-932; Vollmar, *et al.*, 2017, *Bioconjug Chem*, 28(10):2538-2548; Ohri, *et al.*, 2018, *Bioconjug Chem.*, 29(2):473-485). Также описаны другие примеры сайт-направленного мутагенного включения остатков цистеина (см., например, публикацию Sussman, *et al.*, 2018, *Protein Eng Des Sel.*, 31(2):47-54).

[0004] Также сообщалось о родственной стратегии, включающей вставку остатка цистеина, а не замену нативной аминокислоты остатком цистеина (Dimasi, *et al.*, 2017, *Mol. Pharmaceutics*, 14(5):1501-1516; публикация заявки на патент США № US 2018/0169255). Вставка остатка цистеина после места одного из ранее описанных положений замены цистеина в THIOMAB™ (S239C), обозначенного как C239i, использовалась в MEDI2228, клинической стадии изучения ADC. Вставка C239i приводит к отмене связывания FcγR и антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Описана структурная основа этих изменений в функции (Gallagher, *et al.*, 2019, *Pharmaceutics*, 11:546). Также были описаны другие подходы к встраиванию цистеина (публикация заявки на патент США № US

2020/0129635 и публикация международной заявки на патент № WO 2018/233572).

[0005] Эта вводная информация предоставляется с целью предоставления известной информации, которая, по мнению заявителя, может иметь отношение к настоящему изобретению. Не предполагается ни признания в обязательном порядке, ни должно быть истолкования того, что любая предшествующая информация представляет собой предшествующий уровень техники в отношении заявленного изобретения.

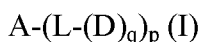
СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В данном документе описаны сконструированные с цистеином конструкции антител, конъюгаты и способы их применения.

[0007] В одном из аспектов настоящее изобретение относится к следующим положениям: сконструированная с цистеином конструкция антитела, содержащая домен VH, домен VH и домен VL, область Fc или их комбинацию, при этом область Fc содержит домен CH2 и/или домен CH3, при этом указанная конструкция антитела содержит одну или большее количество мутаций со вставкой цистеина, выбранных из следующих: (a) вставка остатка цистеина между положениями 39 и 40 в домене VL; (b) вставка остатка цистеина между положениями 40 и 41 в домене VL; (c) вставка остатка цистеина между положениями 126 и 127 в домене CL; (d) вставка остатка цистеина между положениями 148 и 149 в домене CL; (e) вставка остатка цистеина между положениями 149 и 150 в домене CL; (f) вставка остатка цистеина между положениями 9 и 10 в домене VH; (g) вставка остатка цистеина между положениями 169 и 170 в домене CH1; (h) вставка остатка цистеина между положениями 237 и 238 в домене CH2; (i) вставка остатка цистеина между положениями 295 и 296 в домене CH2 и (j) вставка остатка цистеина между положениями 299 и 300 в домене CH2, при этом нумерация аминокислот в доменах VL, CL, VH и CH1 представляет собой нумерацию по Kabat, а нумерация аминокислот в домене CH2 представляет собой нумерацию EU, и при этом конструкция антитела основана на иммуноглобулине G (IgG).

[0008] В другом аспекте настоящее изобретение относится к конъюгату, содержащему сконструированную с цистеином конструкцию антитела, как описано в любом из вариантов осуществления, приведенных в данном документе, и один или большее количество активных агентов, конъюгированных с каждым из одного или большего количества вставленных остатков цистеина.

[0009] В другом аспекте настоящее изобретение относится к конъюгату, имеющему Формулу (I):



[0010] где A представляет собой сконструированную с цистеином конструкцию антитела; L представляет собой линкер; D представляет собой активный агент; q представляет собой целое число от 1 до 4, а p представляет собой целое число от 1 до 8, при этом сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит домен VH, домен VH и домен VL, область Fc или их комбинацию, при этом область Fc содержит домен CH2 и/или домен CH3, и при этом сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит одну или большее количество мутаций со вставкой цистеина, выбранных из

следующих: (a) вставка остатка цистеина между положениями 39 и 40 в домене VL; (b) вставка остатка цистеина между положениями 40 и 41 в домене VL; (c) вставка остатка цистеина между положениями 126 и 127 в домене CL; (d) вставка остатка цистеина между положениями 148 и 149 в домене CL; (e) вставка остатка цистеина между положениями 149 и 150 в домене CL; (f) вставка остатка цистеина между положениями 9 и 10 в домене VH; (g) вставка остатка цистеина между положениями 169 и 170 в домене CH1; (h) вставка остатка цистеина между положениями 237 и 238 в домене CH2; (i) вставка остатка цистеина между положениями 295 и 296 в домене CH2 и (j) вставка остатка цистеина между положениями 299 и 300 в домене CH2, при этом нумерация аминокислот в доменах VL, CL, VH и CH1 представляет собой нумерацию по Kabat, а нумерация аминокислот в домене CH2 представляет собой нумерацию EU, и при этом конструкция антитела основана на иммуноглобулине G (IgG), и при этом каждый D связан со вставленным остатком цистеина через L.

[0011] В другом аспекте настоящее изобретение относится к композиции, содержащей конъюгат, как описано в любом из описанных в данном документе вариантов осуществления, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение эффективного количества конъюгата, как описано в данном документе, при этом активный агент, содержащийся в конъюгате, представляет собой терапевтический агент.

[0012] В другом аспекте настоящее изобретение относится к описанному в данном документе конъюгату для применения в терапии, при этом активный агент, содержащийся в конъюгате, представляет собой терапевтический агент.

[0013] В другом аспекте настоящее изобретение относится к применению конъюгата, как описано в данном документе, в изготовлении лекарственного средства для лечения субъекта, нуждающегося в этом, при этом активный агент, содержащийся в конъюгате, представляет собой терапевтический агент.

[0014] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения конъюгата, как описано в любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе, включающему помещение сконструированной с цистеином конструкции антитела в восстанавливающие условия, так что тиоловая группа одного или большего количества вставленных остатков цистеина восстанавливается, и реагирование структуры «линкер, реагирующий с тиолом-активный агент» с конструкцией антитела в условиях, которые обеспечивают образование связи между линкером и восстановленным тиолом.

[0015] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения конъюгата «антитело-лекарственное средство», имеющему заранее определенное соотношение лекарственного средства к антителу (DAR), при этом указанный способ включает: (i) предоставление сконструированной с цистеином конструкции антитела, содержащей домен VH, домен VH и домен VL, область Fc или их комбинацию, область Fc, содержащую домен CH2 и/или домен CH3, и конструкцию антитела, содержащую одну или

большее количество мутаций со вставкой цистеина, выбранных из следующих: (a) вставка остатка цистеина между положениями 39 и 40 в домене VL; (b) вставка остатка цистеина между положениями 40 и 41 в домене VL; (c) вставка остатка цистеина между положениями 126 и 127 в домене CL; (d) вставка остатка цистеина между положениями 148 и 149 в домене CL; (e) вставка остатка цистеина между положениями 149 и 150 в домене CL; (f) вставка остатка цистеина между положениями 9 и 10 в домене VH; (g) вставка остатка цистеина между положениями 169 и 170 в домене CH1; (h) вставка остатка цистеина между положениями 237 и 238 в домене CH2; (i) вставка остатка цистеина между положениями 295 и 296 в домене CH2, и (j) вставка остатка цистеина между положениями 299 и 300 в домене CH2, и (ii) реагирование сконструированной с цистеином конструкции антитела со структурой «лекарственное средство-линкер» для получения конъюгата «антитело-лекарственное средство»; при этом предварительно определенное значение DAR равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8, а сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит такое же количество мутаций со вставкой цистеина, что и предварительно определенное значение DAR, при этом нумерация аминокислот в доменах VL, CL, VH и CH1 представляет собой нумерацию по Kabat, а нумерация аминокислот в домене CH2 представляет собой нумерацию EU, и при этом сконструированная с цистеином конструкция антитела основана на иммуноглобулине G (IgG).

[0016] В другом аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду или набору полинуклеотидов, кодирующих сконструированную с цистеином конструкцию антитела, как описано в любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе.

[0017] В другом аспекте настоящее изобретение относится к вектору, содержащему один или большее количество полинуклеотидов, сконструированную с цистеином конструкцию антитела, как описано в любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе.

[0018] В другом аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей вектор, содержащий один или большее количество полинуклеотидов, кодирующих сконструированную с цистеином конструкцию антитела, как описано в любом из вариантов осуществления, описанных в данном документе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИГУР

[0019] На **Фиг. 1** продемонстрированы структуры «линкер-лекарственное средство»: (A) MCvcPAB-тубулизин M, (B) MCvcPABC-MMAE и (C) MTvcСоединение 1.

[0020] На **Фиг. 2** продемонстрирован (A) анализ посредством капиллярного электрофореза SDS (CE-SDS) в геле в невосстанавливающих условиях и (B) анализ CE-SDS в геле в восстанавливающих условиях для 30 иллюстративных конъюгатов «антитело-лекарственное средство» (ADC), полученных с применением вариантов со вставкой цистеина, по сравнению с неконъюгированным контролем (v17427) и контрольными ADC. Полоса A: неконъюгированный контроль (v17427); Полосы B-D. вариант v22760 (L_K39.5C), конъюгированный с MCvcPABC-MMAE (B), MCvcPAB-тубулизин M (C) и

MTvcСоединение 1 (D); Полосы E-G: вариант v22761 (L_K126.5C), конъюгированный с MCvcPABC-MMAE (E), MCvcPAB-тубулизин M (F) и MTvcСоединение 1 (G); Полосы H-J: вариант v22765 (H_G237.5C), конъюгированный с MCvcPABC-MMAE (H), MCvcPAB-тубулизин M (I) и MTvcСоединение 1 (J); Полосы K-M: вариант v22768 (H_Q295.5C), конъюгированный с MCvcPABC-MMAE (K), MCvcPAB-тубулизин M (L) и MTvcСоединение 1 (M); Полосы N-P: вариант v27321 (L_W148.5C), конъюгированный с MCvcPABC-MMAE (N), MCvcPAB-тубулизин M (O) и MTvcСоединение 1 (P); Полосы Q-S: вариант v27322 (L_K149.5C), конъюгированный с MCvcPABC-MMAE (Q), MCvcPAB-тубулизин M (R) и MTvcСоединение 1 (S); Полосы T-V: вариант v28983 (L_P40.5C), конъюгированный с MCvcPABC-MMAE (T), MCvcPAB-тубулизин M (U) и MTvcСоединение 1 (V); Полосы W-Y: вариант v28989 (H_A9.5C), конъюгированный с MCvcPABC-MMAE (W), MCvcPAB-тубулизин M (X) и MTvcСоединение 1 (Y); Полосы Z-BB: вариант v28993 (H_G169.5C), конъюгированный с MCvcPABC-MMAE (Z), MCvcPAB-тубулизин M (AA) и MTvcСоединение 1 (BB); Полосы CC-EE: вариант v29001 (H_T299.5C), конъюгированный с MCvcPABC-MMAE (CC), MCvcPAB-тубулизин M (DD) и MTvcСоединение 1 (EE); Полосы FF-HH: вариант v22758 (H_A114C; контроль), конъюгированный с MCvcPABC-MMAE (FF), MCvcPAB-тубулизин M (GG) и MTvcСоединение 1 (HH); Полосы II-KK: вариант v29013 (H_S239.5C; контроль), конъюгированный с MCvcPABC-MMAE (II), MCvcPAB-тубулизин M (JJ) и MTvcСоединение 1 (KK). Маркеры MW(сверху вниз): 119, 68, 48, 29, 21, 16 кДа.

[0021] **На Фиг. 3** продемонстрированы результаты анализа DAR на основе иммунопреципитационной масс-спектрометрии (IPMS) для конъюгатов «антитело-лекарственное средство» (ADC), содержащих варианты вставок цистеина, конъюгированных со структурой «лекарственное средство-линкер» MTvcСоединение 1, после инкубации с плазмой мыши. Продemonстрировано остаточное DAR (затушеванные кружки; левая ось) и % открытия малеимидного кольца (незатушеванные кружки; правая ось). (A) вариант v22760 (L_K39.5C), (B) вариант v22761 (L_K126.5C), (C) вариант v22765 (H_G237.5C), (D) вариант v22768 (H_Q295.5C), (E) вариант v27321 (L_W148.5C), (F) вариант v27322 (L_K149.5C), (G) вариант v28983 (L_P40.5C), (H) вариант v28989 (H_A9.5C), (I) вариант v28993 (H_G169.5C), (J) вариант v29001 (H_T299.5C), (K) вариант v22758 (H_A114C; контроль) и (L) вариант v29013 (H_S239.5C; контроль).

[0022] **На Фиг. 4** продемонстрированы результаты анализа DAR на основе иммунопреципитационной масс-спектрометрии (IPMS) для конъюгатов «антитело-лекарственное средство» (ADC), содержащих варианты вставок цистеина, конъюгированных со структурой «лекарственное средство-линкер» MCvcPABC-MMAE, после инкубации с плазмой мыши. Продemonстрировано остаточное DAR (затушеванные кружки; левая ось) и % открытия малеимидного кольца (незатушеванные кружки; правая ось). (A) вариант v22760 (L_K39.5C), (B) вариант v22761 (L_K126.5C), (C) вариант v22765 (H_G237.5C), (D) вариант v22768 (H_Q295.5C), (E) вариант v27321 (L_W148.5C), (F) вариант v27322 (L_K149.5C), (G) вариант v28983 (L_P40.5C), (H) вариант v28989

(H_A9.5C), (I) вариант v28993 (H_G169.5C), (J) вариант v29001 (H_T299.5C), (K) вариант v22758 (H_A114C; контроль) и (L) вариант v29013 (H_S239.5C; контроль).

[0023] На **Фиг. 5** продемонстрированы результаты анализа DAR на основе иммунопреципитационной масс-спектрометрии (IPMS) для конъюгатов «антитело-лекарственное средство» (ADC), содержащих варианты вставок цистеина, конъюгированных со структурой «лекарственное средство-линкер» MCvcPAB-тубулизин M, после инкубации с плазмой мыши. Продemonстрировано остаточное DAR (затушеванные кружки, сплошная линия; левая ось), % открытия малеимидного кольца (незатушеванные кружки; правая ось) и % разложения (потеря ацетила) MCvcPAB-тубулизин M (затушеванные кружки, пунктирная линия). (A) вариант v22760 (L_K39.5C), (B) вариант v22761 (L_K126.5C), (C) вариант v22765 (H_G237.5C), (D) вариант v22768 (H_Q295.5C), (E) вариант v27321 (L_W148.5C), (F) вариант v27322 (L_K149.5C), (G) вариант v28983 (L_P40.5C), (H) вариант v28989 (H_A9.5C), (I) вариант v28993 (H_G169.5C), (J) вариант v29001 (H_T299.5C), (K) вариант v22758 (H_A114C; контроль) и (L) вариант v29013 (H_S239.5C; контроль).

[0024] На **Фиг. 6** продемонстрированы результаты тестирования цитотоксичности ADC *in vitro*, содержащих варианты со вставкой цистеина, конъюгированные с MTvcСоединение 1 со значением DAR 1, 2 или 3, на различных клеточных линиях, экспрессирующих c-Met, (A) на клеточной линии EBC-1 (высокий уровень экспрессии c-Met) и (B) на клеточной линии HT-29 (средний уровень экспрессии c-Met) по сравнению с контрольным ADC (v17427-MTvcСоединение 1, DAR 4).

[0025] На **Фиг. 7** продемонстрирована противоопухолевая активность ADC *in vivo*, содержащих варианты со вставкой цистеина, конъюгированные с MTvcСоединение 1 со значением DAR 1, 2 или 3, в модели ксенотрансплантата колоректального рака HT-29 со средними уровнями экспрессии c-Met, по сравнению с контролями DAR4 при соответствующих токсину дозах (A) 6 мг/кг (DAR1), 3 мг/кг (DAR2), 2 мг/кг (DAR3) и 1,5 мг/кг (DAR4) и (B) 12 мг/кг (DAR1), 6 мг/кг (DAR2), 4 мг/кг (DAR3) и 3 мг/кг (DAR4).

[0026] На **Фиг. 8** продемонстрирована противоопухолевая активность ADC *in vivo*, содержащих варианты со вставкой цистеина, конъюгированные с MTvcСоединение 1 со значением DAR 1, 2 или 3, в модели ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легкого H1975 с высокими уровнями экспрессии c-Met, по сравнению с контролями DAR4 при соответствующих токсину дозах (A) 4 мг/кг (DAR1), 2 мг/кг (DAR2), 1,3 мг/кг (DAR3) и 1 мг/кг (DAR4) и (B) 24 мг/кг (DAR1), 12 мг/кг (DAR2), 8 мг/кг (DAR3) и 6 мг/кг (DAR4).

[0027] На **Фиг. 9** представлено выравнивание последовательностей доменов CH1 IgG1 человека (аллель *01 [SEQ ID NO:41] и аллель *03 [SEQ ID NO:42]), IgG2 (аллель *04 [SEQ ID NO:43], аллель *01 [SEQ ID NO:44] и аллель *02 [SEQ ID NO:45]), IgG3 (аллель *01 [SEQ ID NO:46], аллель *18 [SEQ ID NO:47] и аллель *17 [SEQ ID NO:48]) и IgG4 (аллель *01 [SEQ ID NO:49]).

[0028] На **Фиг. 10** представлено выравнивание последовательностей доменов CH2 IgG1 человека (аллель *01 [SEQ ID NO:3]), IgG2 (аллель *01 [SEQ ID NO:4] и аллель *02

[SEQ ID NO:5]), IgG3 (аллель *01 [SEQ ID NO:6], аллель *16 [SEQ ID NO:7], аллель *09 [SEQ ID NO:8], аллель *11 [SEQ ID NO:9], аллель *14 [SEQ ID NO:10] и аллель *18 [SEQ ID NO:11]) и IgG4 (аллель *01 [SEQ ID NO:12] и аллель *02 [SEQ ID NO:13]).

[0029] **На Фиг. 11** представлено выравнивание последовательностей доменов CH3 IgG1 человека (аллель *01 [SEQ ID NO:14], аллель *04 [SEQ ID NO:15] и аллель *03 [SEQ ID NO:16]), IgG2 (аллель *01 [SEQ ID NO:17] и аллель *06 [SEQ ID NO:18]), IgG3 (аллель *15 [SEQ ID NO:19], аллель *17 [SEQ ID NO:20], аллель *14 [SEQ ID NO:21], аллель *06 [SEQ ID NO:22], аллель *08 [SEQ ID NO:23], аллель *01 [SEQ ID NO:24], аллель *03 [SEQ ID NO:25] и аллель *13 [SEQ ID NO:26]) и IgG4 (аллель *03 [SEQ ID NO:27] и аллель *01 [SEQ ID NO:28]).

[0030] **На Фиг. 12** представлено выравнивание последовательностей доменов CL легкой каппа-цепи человека (аллель *01 [SEQ ID NO:29], аллель *04 [SEQ ID NO:30], аллель *05 [SEQ ID NO:31], аллель *02 [SEQ ID NO:32] и аллель *03 [SEQ ID NO:33]) и легкой лямбда-цепи человека (аллель 3*02 [SEQ ID NO:34], аллель 3*03 [SEQ ID NO:35], аллель 6*01 [SEQ ID NO:36], аллель 2*01 [SEQ ID NO:37], аллель 7*01 [SEQ ID NO:38], аллель 7*03 [SEQ ID NO:39] и аллель 1*02 [SEQ ID NO:40]).

[0031] **На Фиг. 13** продемонстрированы профили хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC) для (A) варианта v29013 (H_S239.5C; контроль), конъюгированного со структурой «лекарственное средство-линкер» MCvcPABC-MMAE, и (B) варианта v29001 (H_T299.5C), конъюгированного со структурой «лекарственное средство-линкер» MCvcPABC-MMAE.

[0032] **На Фиг. 14** продемонстрированы профили хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC) для (A) варианта v29013 (H_S239.5C; контроль), конъюгированного со структурой «лекарственное средство-линкер» MTvcСоединение 1, и (B) варианта v29001 (H_T299.5C), конъюгированного со структурой «лекарственное средство-линкер» MTvcСоединение 1.

[0033] **На Фиг. 15** продемонстрированы профили дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) для (A) варианта v29013 (H_S239.5C; контроль) и (B) варианта v29001 (H_T299.5C), каждый из которых сравнивается с контрольным вариантом, содержащим мутацию с замещением цистеина (v27320, L_K149C).

[0034] **На Фиг. 16** продемонстрирован (A) профиль хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC) ADC, содержащего v35074-MTvcСоединение 1 (DAR 6), в котором наблюдались два отчетливых пика; пик, элюированный в момент времени 7,07 мин, представляет собой DAR 5, а пик, элюируемый в момент времени 7,5 мин, представляет собой DAR 6, и (B) профиль эксклюзионной хроматографии (SEC) того же ADC, при этом фракции, элюированные в момент времени 3,3 мин, представляют собой мономер (99%).

[0035] **На Фиг. 17** продемонстрированы уменьшенные профили LC-MS для легкой цепи (LC) (A), тяжелой цепи 1 (B) и тяжелой цепи 2 (C) ADC, содержащего v35074-MTvcСоединение 1 (DAR 6), после обработки EndoS.

[0036] **На Фиг. 18** продемонстрирован профиль капиллярного электрофореза-SDS

(CE-SDS) варианта v35074 со вставкой цистеина в виде неконъюгированного антитела и конъюгированного со структурой «лекарственное средство-линкер» MTvcСоединение 1. Полоса 1: белковый лэддер; Полоса 2: Трастузумаб-контроль (невосстановленный (NR)); Полоса 3: неконъюгированный v35074 (NR); Полоса 4: v35074-MTvcСоединение 1 (NR); Полоса 5: трастузумаб (восстановленный (R)); Полоса 6: неконъюгированный v35074 (R); Полоса 7: v35074-MTvcСоединение 1 (R)

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0037] Настоящее изобретение относится к конструкциям антител, сконструированным для введения по меньшей мере одной мутации со вставкой цистеина («сконструированные с цистеином конструкции антител»). В контекста данного документа «мутация со вставкой цистеина» относится к ненативному остатку цистеина, который вводится между двумя аминокислотными остатками, присутствующими в последовательности конструкции родительского антитела. Вставленный остаток(и) цистеина можно применять в качестве сайта для конъюгации одного или большего количества активных агентов, таких как терапевтические, диагностические и маркировочные агенты, с конструкцией антитела для получения конъюгатов.

[0038] Определенные варианты осуществления относятся к конъюгатам, содержащим сконструированную с цистеином конструкцию антитела и активный агент, ковалентно присоединенный к вставленному остатку цистеина в конструкции антитела. Конъюгаты могут найти применение в различных терапевтических и диагностических целях.

Определения

[0039] Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют такое же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники.

[0040] Как применяется в данном документе, термин «около» относится к приблизительно +/-10% вариации от данного значения. Следует понимать, что такое изменение всегда включается в любое данное значение, предоставленное в настоящем документе, независимо от того, упоминается ли оно конкретно.

[0041] Применение слова в единственном числе при применении в сочетании с термином «содержащий» может означать «один», но оно также соответствует значению «один или большее количество», «по меньшей мере один» и «один или больше одного».

[0042] Как применяется в данном документе, термины «включающий», «имеющий», «охватывающий» и «содержащий» и их грамматические вариации являются включающими или неограничивающими, и не исключают дополнительные неперечисленные элементы и/или этапы способов. В контексте данного документа термин «по существу состоящий» в связи с композицией, применением или способом, отмечает возможно присутствующие дополнительные элементы и/или этапы способа, но такие дополнения фактически не влияют на стиль, которым излагаются композиция, способ или применяемые функции. Термин «состоящий из», при применении в данном документе в связи с композицией,

применением или способом, исключает наличие дополнительных элементов и/или этапов способа. Композиция, применение или способ, описанные в данном документе как включающие определенные элементы и/или стадии, в некоторых вариантах осуществления, также могут по существу состоять из таких элементов и/или этапов, а в других вариантах осуществления состоят из таких элементов и/или этапов, независимо от конкретного упоминания в этих вариантах осуществления.

[0043] В контексте данного документа термин «конструкция антитела» охватывает полноразмерные антитела и функциональные фрагменты полноразмерных антител. Функциональные фрагменты антител включают антигенсвязывающие фрагменты (такие как Fab'-фрагменты, F(ab')₂ фрагменты, Fab-фрагменты, одноцепочечные переменные области (scFv) и однодоменные антитела (sdAb)), а также Fc-фрагменты, содержащие область Fc, способный связываться с одним или большим количеством рецепторов Fc (FcR). Термин «конструкции антител» также охватывает слитые белки Fc, содержащие область Fc и один или большее количество гетерологичных полипептидов.

[0044] Полноразмерное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, собранные в виде гетеротетрамера, содержащего две тяжелые цепи и две легкие цепи. Тяжелая цепь обычно содержит домены (от N- до С-конца): VH-CH1-шарнир-CH2-CH3, а легкая цепь обычно содержит домены (от N- до С-конца): VL-CL. Если не указано иное, нумерация аминокислот в доменах VH, CH1, VL и CL, применяемая в данном документе, представляет собой нумерацию по Kabat, а нумерация аминокислотных остатков в доменах CH2 и CH3 и шарнирной области, применяемая в данном документе, представляет собой нумерацию EU, также называемую EU индекс (обе системы нумерации описаны в публикации Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).

[0045] В контексте данного документа термины «область Fc» и «Fc», применяемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к С-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина. Хотя границы области Fc тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьироваться, последовательность области Fc тяжелой цепи IgG человека обычно определяется как простирающаяся от положения 239 (нумерация EU) до С-конца тяжелой цепи. «Полипептид Fc» из димерного Fc, относится к одному из двух полипептидов, образующих димерный домен Fc, *т.е.* полипептид, содержащий С-концевые константные области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая способна к стабильной самоассоциации. Область Fc обычно содержит домен CH2 и домен CH3, но в некоторых вариантах осуществления может содержать только домен CH2 или только домен CH3. Также можно считать, что область Fc охватывает шарнирную область в определенных вариантах осуществления.

[0046] «Домен CH2» области Fc IgG человека обычно определяется как простирающийся от положения 239 до положения 340. «Домен CH3» обычно определяется как содержащий аминокислотные остатки на С-конце по отношению к домену CH2 в области Fc, *т.е.* от положения 341 до положения 447. «Шарнирная область» IgG1 человека

обычно определяется как простирающаяся от положения 216 до положения 238 (Burton, 1985, *Molec. Immunol.*, 22:161-206). Шарнирные области других изотипов IgG могут быть выровнены с последовательностью IgG1 путем выравнивания первого и последнего остатков цистеина, которые образуют дисульфидные связи между тяжелыми цепями.

[0047] В контексте настоящего описания «слитый белок Fc» представляет собой белок, содержащий всю или часть (например, домен CH2 или домен CH3) области Fc, слитой с гетерологичным белком или полипептидом.

[0048] Термины «полученный из» и «основанный на», применяемые в данном документе для описания аминокислотной последовательности, означают, что рассматриваемая аминокислотная последовательность по существу идентична заявленной эталонной аминокислотной последовательности.

[0049] Термин «по существу идентичный» применительно к аминокислотной последовательности означает, что при оптимальном выравнивании (например, с применением способов, описанных ниже) аминокислотная последовательность совпадает по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% по идентичности последовательности с эталонной аминокислотной последовательностью. Процентная идентичность между двумя аминокислотными последовательностями может быть определена различными способами, известными в данной области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как Smith Waterman Alignment (Smith & Waterman, 1981, *J Mol Biol* 147:195-7); “BestFit” (Smith & Waterman, 1981, *Advances in Applied Mathematics*, 482-489); BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; (Altschul, *et al.*, 1990, *J Mol Biol*, 215:403-10) и его вариантов и обновлений; а также программного обеспечения ALIGN, ALIGN-2, CLUSTAL или Megalign (DNASTAR). Кроме того, специалисты в данной области техники могут определить нужные параметры для выравнивания, включая алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по длине сравниваемых последовательностей. Как правило, для пептидов длина сравниваемых последовательностей будет составлять по меньшей мере 10 аминокислот, но специалист в данной области техники поймет, что фактическая длина будет зависеть от общей длины сравниваемых последовательностей. В определенных вариантах осуществления длина сравнительных последовательностей может равняться полной длине белковой или пептидной последовательности.

[0050] В контексте данного документа термин «выделенный», в отношении материала, означает, что материал удален из исходной среды (например, естественной среды, если он встречается в природе). Например, встречающиеся в природе полинуклеотид или полипептид, присутствующие в живом животном, не являются выделенными, но тот же самый полинуклеотид или полипептид, отделенные от некоторых или всех сосуществующих материалов в природной системе, являются выделенными. Такие полинуклеотиды могут быть частью вектора и/или такие полинуклеотиды или полипептиды

могут быть частью композиции, и все равно будут выделенными в том отношении, что такой вектор или композиция не являются частью их естественной среды.

[0051] Следует понимать, что положительное прочтение признака в одном варианте осуществления, описанном в настоящем документе, служит основанием для исключения этого признака в альтернативном варианте осуществления. В частности, если перечень вариаций представлен для данного варианта осуществления или пункта формулы изобретения, следует понимать, что один или большее количество вариантов могут быть удалены из этого перечня, а сокращенный перечень может образовывать альтернативный вариант осуществления, независимо от того, отмечается ли конкретно такой альтернативный вариант осуществления или нет.

[0052] Предполагается, что любой способ осуществления, обсуждаемый в данном документе, может быть реализован в отношении любого другого способа, применения или композиции, описанных в данном документе, и *наоборот*.

СКОНСТРУИРОВАННЫЕ С ЦИСТЕИНОМ КОНСТРУКЦИИ АНТИТЕЛ

[0053] Сконструированные с цистеином конструкции антител по настоящему изобретению представляют собой конструкции антител, содержащие одну или большее количество мутаций со вставкой цистеина. Сконструированная с цистеином конструкция антитела может быть, например, полноразмерным антителом, функциональным фрагментом полноразмерного антитела или слитым белком Fc. Функциональные фрагменты антител включают, например, антигенсвязывающие фрагменты и Fc-фрагменты. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают, помимо прочего, переменные области легких и/или тяжелых цепей антитела (VL, VH), переменные фрагменты (Fv), Fab'-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, Fab-фрагменты, одноцепочечные переменные области (scFv), определяющие комплементарность области (CDR) и однодоменные антитела (sdAbs). Fc-фрагменты обычно включают домены CH2 и CH3 антитела и способны связывать один или большее количество рецепторов Fc (FcR). Fc-фрагменты могут необязательно содержать шарнирную область.

[0054] Слитые белки Fc содержат область Fc, слитую или ковалентно присоединенную к одному или большому количеству гетерологичных полипептидов. В определенных вариантах осуществления слитые белки Fc содержат область Fc, слитый или ковалентно присоединенный к одному или большому количеству целевых связывающих доменов. Примеры целевых связывающих доменов, которые могут быть включены в слитый белок Fc в определенных вариантах осуществления, включают, помимо прочего, рецепторы, фрагменты рецепторов (такие как внеклеточные части), лиганды, цитокины и гетерологичные антигенсвязывающие фрагменты антител (такие как антигенсвязывающий фрагмент из другого класса или подкласса антител). Один или большее количество гетерологичных полипептидов могут быть слиты или ковалентно присоединены к области Fc непосредственно или через линкер, например, линкер на основе аминокислот.

[0055] Определенные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к сконструированным с цистеином конструкциям антител, которые содержат

антигенсвязывающий домен, область Fc или как антигенсвязывающий домен, так и область Fc. В некоторых вариантах осуществления сконструированные с цистеином конструкции антител содержат антигенсвязывающий домен, который содержит домен VH или домен VH и домен VL. В некоторых вариантах осуществления сконструированные с цистеином конструкции антител содержат область Fc, которая содержит домен CH2 и/или домен CH3. В некоторых вариантах осуществления сконструированные с цистеином конструкции антител содержат область Fc, которая содержит домен CH2 и домен CH3.

[0056] Определенные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к сконструированным с цистеином конструкциям антител, которые представляют собой полноразмерные антитела. В таких вариантах осуществления сконструированное с цистеином антитело может представлять собой, например, моноклональное антитело, антитело человека, химерное антитело или гуманизированное антитело. В этом контексте полноразмерное антитело может содержать одну или большее количество областей Fab. Например, полноразмерное антитело может быть одноцепочечным (моновалентным) антителом (ОАА), бивалентным антителом или поливалентным антителом.

[0057] Определенные варианты осуществления относятся к сконструированным с цистеином конструкциям антител, которые представляют собой функциональные фрагменты антител. В некоторых вариантах осуществления сконструированная с цистеином конструкция антитела представляет собой функциональный фрагмент, содержащий по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, такой как Fab, scFv или sdAb. В некоторых вариантах осуществления сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит более одного антигенсвязывающего домена, при этом антигенсвязывающие домены могут представлять собой, например, Fab, scFv или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит два или большее количество антигенсвязывающих доменов, соединенных линкером, например, в tandemном формате scFv или в формате scFv-Fab.

[0058] В некоторых вариантах осуществления сконструированное с цистеином антитело может представлять собой биспецифическое или мультиспецифическое антитело, содержащее два или большее количество антигенсвязывающих доменов, каждый из которых связывается с другим антигенным эпитопом.

[0059] Определенные варианты осуществления относятся к сконструированным с цистеином конструкциям антител, которые представляют собой слитые белки Fc.

[0060] Когда сконструированные с цистеином конструкции антител содержат один или большее количество антигенсвязывающих доменов, каждый антигенсвязывающий домен связывается с целевым антигеном. Целевые антигены обычно представляют собой молекулы клеточной поверхности, такие как белки, липиды или полисахариды, обнаруженные на поверхности целевой клетки, такой как опухолевая клетка, инфицированная вирусом клетка, инфицированная бактериями клетка, поврежденный эритроцит, артериальная бляшка, клетка воспалительной ткани или клетка фиброзной

ткани. Примеры целевых антигенов включают, помимо прочего, опухолеассоциированные антигены (ТАА), белки рецепторов клеточной поверхности, трансмембранные белки, сигнальные белки, факторы регуляции выживания клеток, факторы регуляции пролиферации клеток, молекулы, связанные с развитием или дифференцировкой тканей, лимфокины, цитокины, молекулы, участвующие в регуляции клеточного цикла, молекулы, участвующие в васкулогенезе, и молекулы, ассоциированные с ангиогенезом. Определенные варианты осуществления относятся к сконструированным с цистеином конструкциям антител, содержащим по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, который связывается с опухолеассоциированным антигеном (ТАА).

[0061] Сконструированные с цистеином конструкции антител по настоящему изобретению получены из иммуноглобулина G (IgG). В определенных вариантах осуществления сконструированную с цистеином конструкцию антитела получают из IgG человека. В некоторых вариантах осуществления сконструированную с цистеином конструкцию антитела получают из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека. В некоторых вариантах осуществления сконструированную с цистеином конструкцию антитела получают из IgG1. В некоторых вариантах осуществления сконструированную с цистеином конструкцию антитела получают из IgG1 человека.

[0062] В определенных вариантах осуществления, в которых сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит цистеиновую вставку в легкой цепи, конструкция антитела может содержать легкую каппа-цепь или легкую лямбда-цепь. В некоторых вариантах осуществления, в которых сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит цистеиновую вставку в легкой цепи, конструкция антитела содержит легкую каппа-цепь.

[0063] Аминокислотные последовательности доменов CH1, CH2 и CH3 для IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека, а также легких цепей каппа и лямбда известны в данной области техники (см., например, последовательности, представленные на сайте информационной системы International ImMunoGeneTics (IMGT®)). Репрезентативные аминокислотные последовательности доменов CH1, CH2 и CH3 для различных аллелей IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека также представлены на Фиг. 9-11 соответственно, а репрезентативные аминокислотные последовательности для аллелей каппа и лямбда доменов CL представлены на Фиг. 12.

[0064] В определенных вариантах осуществления мутация со вставкой цистеина не влияет или оказывает минимальное влияние на стабильность сконструированной с цистеином конструкции антитела, определяемую по температуре плавления (T_m). Под «отсутствие влияние или минимальное влияние» подразумевается, что T_m домена сконструированной с цистеином конструкции антитела, в которую вставлен остаток цистеина, находится в пределах ($m.e. \pm$) от 0°C до 8°C от T_m того же домена в соответствующей конструкции родительского антитела (в которой отсутствует мутация со вставкой цистеина). Например, для сконструированной с цистеином конструкции антитела, содержащей остаток цистеина, вставленный в домен CH2, T_m домена CH2

сконструированной с цистеином конструкции антитела находится в пределах от 0°C до 8°C от T_m домена CH2 соответствующей конструкции родительского антитела. В некоторых вариантах осуществления T_m домена сконструированной с цистеином конструкции антитела, в которую вставлен остаток цистеина, находится в пределах от 0°C до 7°C от T_m того же домена в соответствующей конструкции родительского антитела. В некоторых вариантах осуществления T_m домена сконструированной с цистеином конструкции антитела, в которую вставлен остаток цистеина, находится в пределах от 0°C до 6°C или в пределах от 0°C до 5°C от T_m того же домена в соответствующей конструкции родительского антитела.

[0065] T_m конструкции антитела можно определить различными способами, известными в данной области техники, например, круговым дихроизмом (CD), дифференциальной сканирующей калориметрией (DSC) или дифференциальной сканирующей флуориметрией (DSF). В определенных вариантах осуществления разница T_m между сконструированной с цистеином конструкции антитела и соответствующей конструкцией родительского антитела определяется с помощью DSC.

[0066] В определенных вариантах осуществления сконструированные с цистеином конструкции антител по настоящему изобретению включают одну и ту же мутацию со вставкой цистеина в каждой цепи конструкции антитела, например, в обеих тяжелых цепях или в обеих легких цепях, что приводит к получению конструкции антитела, которая при конъюгации с активным агентом имеет среднее отношение лекарственного средства к антителу (DAR), равное 2.

[0067] Определенные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к «DAR-настроенным» сконструированным с цистеином конструкциям антител. В данном контексте «DAR-настроенная» конструкция антитела представляет собой сконструированную с цистеином конструкцию антитела, которая содержит мутацию со вставкой цистеина только в одной цепи конструкции (что позволяет применять конъюгаты с DAR 1) или содержит комбинацию мутаций со вставкой цистеина (что позволяет применять конъюгаты имеющие $DAR \geq 2$, например, DAR 3, DAR 4 или DAR 6).

Мутации со вставкой цистеина

[0068] Путем комбинирования основанных на структуре вычислительных подходов и экспериментального тестирования в структуре IgG были идентифицированы подходящие сайты для мутаций со вставкой цистеина, как описано в приведенных в данном документе Примерах. В определенных вариантах осуществления сконструированные с цистеином конструкции антител по настоящему изобретению содержат одну или большее количество мутаций со вставкой цистеина, выбранных из следующих:

- (a) вставка остатка цистеина между положениями 39 и 40 в домене VL;
- (b) вставка остатка цистеина между положениями 40 и 41 в домене VL;
- (c) вставка остатка цистеина между положениями 126 и 127 в домене CL;
- (d) вставка остатка цистеина между положениями 148 и 149 в домене CL;
- (e) вставка остатка цистеина между положениями 149 и 150 в домене CL;

- (f) вставка остатка цистеина между положениями 9 и 10 в домене VH;
- (g) вставка остатка цистеина между положениями 169 и 170 в домене CH1;
- (h) вставка остатка цистеина между положениями 237 и 238 в домене CH2;
- (i) вставка остатка цистеина между положениями 295 и 296 в домене CH2, и
- (j) вставка остатка цистеина между положениями 299 и 300 в домене CH2.

[0069] Следует понимать, что мутация(и) со вставкой цистеина, которая может быть включена в данную конструкцию антитела, будет зависеть от формата конструкции антитела. Полноразмерная конструкция антитела, например, может содержать мутацию(и) со вставкой цистеина, как описано выше, в любом из доменов VH, VL, CL, CH1 и/или CH2, тогда как конструкция антитела, содержащая только область Fc, такую как слитый белок Fc, может содержать мутацию(и) со вставкой цистеина, как описано выше, в домене CH2. Аналогично, конструкция антитела, которая содержит антигенсвязывающий домен, такой как scFv или Fab, но не имеет области Fc, может содержать мутацию(и) со вставкой цистеина в доменах VH, VL, CL и/или CH1.

[0070] В некоторых вариантах осуществления сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит мутацию со вставкой цистеина в области Fc, выбранную из следующих мутаций:

- (a) вставка остатка цистеина между положениями 237 и 238 в домене CH2;
- (b) вставка остатка цистеина между положениями 295 и 296 в домене CH2, и
- (c) вставка остатка цистеина между положениями 299 и 300 в домене CH2.

[0071] В некоторых вариантах осуществления сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит мутацию со вставкой цистеина в области Fab, выбранную из:

- (a) вставка остатка цистеина между положениями 39 и 40 в домене VL;
- (b) вставка остатка цистеина между положениями 40 и 41 в домене VL;
- (c) вставка остатка цистеина между положениями 126 и 127 в домене CL;
- (d) вставка остатка цистеина между положениями 148 и 149 в домене CL;
- (e) вставка остатка цистеина между положениями 149 и 150 в домене CL;
- (f) вставка остатка цистеина между положениями 9 и 10 в домене VH, и
- (g) вставка остатка цистеина между положениями 169 и 170 в домене CH1.

[0072] В некоторых вариантах осуществления сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит мутацию со вставкой цистеина в домене CL или домене CH1, выбранную из следующих мутаций:

- (a) вставка остатка цистеина между положениями 126 и 127 в домене CL;
- (b) вставка остатка цистеина между положениями 148 и 149 в домене CL;
- (c) вставка остатка цистеина между положениями 149 и 150 в домене CL, и
- (d) вставка остатка цистеина между положениями 169 и 170 в домене CH1.

[0073] В некоторых вариантах осуществления сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит мутацию со вставкой цистеина в вариабельной области, выбранную из следующих мутаций:

- (a) вставка остатка цистеина между положениями 39 и 40 в домене VL;
- (b) вставка остатка цистеина между положениями 40 и 41 в домене VL, и
- (c) вставка остатка цистеина между положениями 9 и 10 в домене VH.

[0074] В некоторых вариантах осуществления сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит мутацию со вставкой цистеина, как описано выше, в домене CH2 или в вариабельной области. В некоторых вариантах осуществления сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит мутацию со вставкой цистеина, как описано выше, в домене CH2 или в вариабельной области, при этом мутация со вставкой цистеина выбрана из следующих мутаций:

- (a) вставка остатка цистеина между положениями 40 и 41 в домене VL;
- (b) вставка остатка цистеина между положениями 9 и 10 в домене VH;
- (c) вставка остатка цистеина между положениями 237 и 238 в домене CH2, и
- (d) вставка остатка цистеина между положениями 299 и 300 в домене CH2.

[0075] Мутации со вставкой цистеина, описанные в данном документе, могут быть введены в конструкцию антитела симметрично (*т.е.* одна и та же мутация со вставкой цистеина вводится в каждую соответствующую тяжелую цепь или легкую цепь) или они могут быть введены асимметрично (*т.е.* одна мутация со вставкой цистеина вводится в одну тяжелую или легкую цепь, а другая мутация со вставкой цистеина или отсутствие мутации со вставкой цистеина вводятся в другую тяжелую или легкую цепь). В определенных вариантах осуществления сконструированные с цистеином конструкции антител содержат симметричные мутации со вставкой цистеина. В некоторых вариантах осуществления сконструированные с цистеином конструкции антител содержат одну или большее количество асимметричных мутаций со вставкой цистеина. В некоторых вариантах осуществления сконструированные с цистеином конструкции антител содержат комбинацию симметричных и асимметричных мутаций со вставкой цистеина.

[0076] Симметричное введение двух мутаций со вставкой цистеина в конструкцию антитела, например, в обе тяжелые цепи или в обе легкие цепи, приводит к получению сконструированной с цистеином конструкции антитела, которая при конъюгации с активным агентом имеет среднее отношение лекарственного средства к антителу (DAR), равное 2. Введение асимметричных мутаций со вставкой цистеина и/или комбинаций мутаций со вставкой цистеина в конструкцию антитела позволяет «настроить» DAR конечного конъюгата. Например, конструкции антител, которые содержат мутацию со вставкой цистеина только в одной цепи конструкции, позволяют применять конъюгаты с DAR 1, а конструкции антител, содержащие комбинацию мутаций со вставкой цистеина, позволяют применять конъюгаты, имеющие $DAR \geq 2$. В тех вариантах осуществления, в которых сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит комбинацию мутаций со вставкой цистеина, мутации могут быть введены симметрично (*т.е.* одни и те же мутации со вставкой цистеина включены в обе цепи конструкции антитела), асимметрично (*т.е.* мутация со вставкой цистеина или мутации в одной цепи конструкции антитела отличаются или отсутствуют в другой цепи конструкции антитела), или их

комбинация (*т. е.* по меньшей мере одна мутация со вставкой цистеина в одной цепи конструкции антитела такая же, как мутация со вставкой цистеина в другой цепи конструкции антитела, и по меньшей мере одна мутация со вставкой цистеина отличается или отсутствует в другой цепи). Как правило, когда конструкция антитела содержит одну мутацию со вставкой цистеина или асимметричные мутации со вставкой цистеина, мутацию(и) со вставкой цистеина вводят в тяжелую цепь конструкции антитела. Однако в определенных вариантах осуществления рассматриваются асимметричные мутации со вставкой цистеина в легкой цепи.

[0077] Определенные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к сконструированным с цистеином конструкциям антител, содержащим две симметричные мутации со вставкой цистеина (*т. е.* каждый вставленный остаток цистеина находится в одном и том же положении на каждой соответствующей тяжелой или легкой цепи).

[0078] Определенные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к «DAR-настроенным» сконструированным с цистеином конструкциям антител, которые содержат одну или комбинацию мутаций со вставкой цистеина, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит от 1 до 8 мутаций со вставкой цистеина. В некоторых вариантах осуществления сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит от 1 до 6 мутаций со вставкой цистеина. В некоторых вариантах осуществления сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит от 1 до 4 мутаций со вставкой цистеина.

[0079] Определенные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к DAR-настроенной сконструированной с цистеином конструкции антитела, содержащей нечетное количество мутаций со вставкой цистеина, например, 1, 3, 5 или 7 мутаций со вставкой цистеина. Некоторые варианты осуществления относятся к DAR-настроенной сконструированной с цистеином конструкции антитела, содержащей 1, 3 или 5 мутаций со вставкой цистеина. Некоторые варианты осуществления относятся к DAR-настроенной сконструированной с цистеином конструкции антитела, содержащей 1 или 3 мутации со вставкой цистеина.

[0080] Определенные варианты осуществления относятся к сконструированной с цистеином конструкции антитела, которая содержит единственную (1) мутацию со вставкой цистеина. В некоторых вариантах осуществления сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит единственную мутацию со вставкой цистеина в тяжелой цепи конструкции антитела. В некоторых вариантах осуществления сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит единственную мутацию со вставкой цистеина, выбранную из следующих мутаций:

- (a) вставка остатка цистеина между положениями 9 и 10 в домене VH;
- (b) вставка остатка цистеина между положениями 169 и 170 в домене CH1;
- (c) вставка остатка цистеина между положениями 237 и 238 в домене CH2;
- (d) вставка остатка цистеина между положениями 295 и 296 в домене CH2, и

(е) вставка остатка цистеина между положениями 299 и 300 в домене CH2.

[0081] В некоторых вариантах осуществления сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит единственную мутацию со вставкой цистеина, выбранную из следующих мутаций:

- (а) вставка остатка цистеина между положениями 9 и 10 в домене VH;
- (b) вставка остатка цистеина между положениями 237 и 238 в домене CH2, и
- (с) вставка остатка цистеина между положениями 299 и 300 в домене CH2.

[0082] Определенные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к сконструированной с цистеином конструкции антитела, которая содержит три мутации со вставкой цистеина, как описано в данном документе. В таких вариантах осуществления сконструированная с цистеином конструкция антитела может содержать три разные (асимметричные) мутации со вставкой цистеина или может содержать две симметричные мутации со вставкой цистеина (*т.е.* в одном и том же положении на каждой соответствующей тяжелой или легкой цепи) и одну асимметричную мутацию со вставкой цистеина (один вставленный остаток цистеина в одну легкую или тяжелую цепь). В некоторых вариантах осуществления сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит 3 мутации со вставкой цистеина, две из которых являются одинаковыми (симметричными) и одна отличается (асимметричная).

[0083] В определенных вариантах осуществления сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит 3 мутации со вставкой цистеина, две из которых являются одинаковыми (симметричными) и одна отличается (асимметричная), при этом симметричные мутации со вставкой цистеина выбраны из следующих мутаций:

- (а) вставка остатка цистеина между положениями 39 и 40 в домене VL;
- (b) вставка остатка цистеина между положениями 40 и 41 в домене VL;
- (с) вставка остатка цистеина между положениями 126 и 127 в домене CL;
- (d) вставка остатка цистеина между положениями 148 и 149 в домене CL;
- (е) вставка остатка цистеина между положениями 149 и 150 в домене CL;
- (f) вставка остатка цистеина между положениями 9 и 10 в домене VH;
- (g) вставка остатка цистеина между положениями 169 и 170 в домене CH1;
- (h) вставка остатка цистеина между положениями 237 и 238 в домене CH2;
- (i) вставка остатка цистеина между положениями 295 и 296 в домене CH2, и
- (j) вставка остатка цистеина между положениями 299 и 300 в домене CH2,

[0084] а асимметричная мутация со вставкой цистеина выбрана из следующих мутаций:

- (i) вставка остатка цистеина между положениями 9 и 10 в домене VH;
- (ii) вставка остатка цистеина между положениями 169 и 170 в домене CH1;
- (iii) вставка остатка цистеина между положениями 237 и 238 в домене CH2;
- (iv) вставка остатка цистеина между положениями 295 и 296 в домене CH2, и
- (v) вставка остатка цистеина между положениями 299 и 300 в домене CH2.

[0085] В определенных вариантах осуществления сконструированная с цистеином

конструкция антитела содержит 3 мутации со вставкой цистеина, две из которых являются одинаковыми (симметричными) и одна отличается (асимметричная), при этом симметричные мутации со вставкой цистеина выбраны из следующих мутаций:

- (a) вставка остатка цистеина между положениями 40 и 41 в домене VL;
- (b) вставка остатка цистеина между положениями 9 и 10 в домене VH, и
- (c) вставка остатка цистеина между положениями 299 и 300 в домене CH2,

[0086] а асимметричная мутация со вставкой цистеина выбрана из следующих мутаций:

- (i) вставка остатка цистеина между положениями 9 и 10 в домене VH;
- (ii) вставка остатка цистеина между положениями 237 и 238 в домене CH2, и
- (iii) вставка остатка цистеина между положениями 299 и 300 в домене CH2.

[0087] Определенные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к DAR-настроенной сконструированной с цистеином конструкции антитела, содержащей четное число мутаций со вставкой цистеина, например, 4, 6 или 8 мутаций со вставкой цистеина. Некоторые варианты осуществления относятся к DAR-настроенной сконструированной с цистеином конструкции антитела, содержащей 4 или 6 мутации со вставкой цистеина. Как правило, в таких вариантах осуществления мутации со вставкой цистеина представляют собой симметричные мутации со вставкой цистеина. Однако в некоторых вариантах осуществления также рассматриваются асимметричные мутации со вставкой цистеина.

[0088] В некоторых вариантах осуществления сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит 4, 6 или 8 мутаций со вставкой цистеина, при этом указанные мутации со вставкой цистеина выбраны из следующих мутаций:

- (i) вставка остатка цистеина между положениями 40 и 41 в домене VL;
- (ii) вставка остатка цистеина между положениями 126 и 127 в домене CL;
- (iii) вставка остатка цистеина между положениями 9 и 10 в домене VH;
- (iv) вставка остатка цистеина между положениями 237 и 238 в домене CH2, и
- (v) вставка остатка цистеина между положениями 299 и 300 в домене CH2.

[0089] В определенных вариантах осуществления сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит 4 или 6 мутаций со вставкой цистеина, при этом указанные мутации со вставкой цистеина выбраны из следующих мутаций:

- (i) вставка остатка цистеина между положениями 40 и 41 в домене VL;
- (ii) вставка остатка цистеина между положениями 126 и 127 в домене CL;
- (iii) вставка остатка цистеина между положениями 9 и 10 в домене VH;
- (iv) вставка остатка цистеина между положениями 237 и 238 в домене CH2, и
- (v) вставка остатка цистеина между положениями 299 и 300 в домене CH2.

Дополнительные мутации

[0090] В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения сконструированные с цистеином конструкции антител могут содержать дополнительные мутации, известные в данной области техники, для обеспечения желаемого изменения

функциональности конструкции антитела. Например, в некоторых вариантах осуществления мутации могут быть введены в домен СН2 сконструированной с цистеином конструкции антитела для изменения связывания с одним или большим количеством рецепторов Fc, и/или мутации могут быть введены в домен СН3 сконструированной с цистеином конструкции антитела для улучшения образования гетеродимера, когда конструкция антитела содержит гетеродимерную область Fc. В некоторых вариантах осуществления, в которых конструкция антитела является биспецифической или мультиспецифической, мутации также могут быть введены в области Fab, чтобы способствовать правильному спариванию между каждой тяжелой цепью и легкой цепью. Примеры таких мутаций области Fab включают мутации, описанные в публикациях международных патентных заявок №№ WO 2014/082179, WO 2015/181805 и WO 2017/059551.

Мутации домена СН2

[0091] В определенных вариантах осуществления сконструированная с цистеином конструкция антитела может содержать одну или большее количество дополнительных мутаций в домене СН2, например, сконструированная с цистеином конструкция антитела может содержать модифицированный домен СН2 с измененным связыванием с одним или большим количеством рецепторов Fc, таких как рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII.

[0092] В данной области техники известны различные аминокислотные мутации в домене СН2, которые избирательно изменяют аффинность к различным рецепторам Fcγ. Аминокислотные мутации, приводящие к усилению связывания, и аминокислотные модификации, приводящие к уменьшению связывания, могут быть полезны при определенных условиях. Например, повышение аффинности связывания Fc с FcγRIIIa (активирующий рецептор) приводит к усилению антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC), что, в свою очередь, приводит к усилению лизиса целевой клетки. Уменьшение связывания с FcγRIIb (ингибирующий рецептор) также может быть полезным при некоторых обстоятельствах. Усиление связывания с FcγRIIb, или ослабление или устранение связывания области Fc со всеми рецепторами Fcγ («нокаутные» варианты) могут быть полезными при снижении или устранении ADCC и опосредованной комплементом цитотоксичности (CDC), если это желательно.

[0093] Примеры аминокислотных мутаций, которые изменяют связывание рецепторами Fcγ, включают, помимо прочего, S298A/E333A/K334A и S298A/E333A/K334A/K326A (повышенная аффинность к FcγRIIIa) (Lu, *et al.*, 2011, *J Immunol Methods*, 365(1-2):132-41); F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L (повышенная аффинность к FcγRIIIa) (Stavenhagen, *et al.*, 2007, *Cancer Res*, 67(18):8882-90); F243L/R292P/Y300L/L235V/P396L (повышенная аффинность к FcγRIIIa) (Nordstrom, *et al.*, 2011, *Breast Cancer Res*, 13(6):R123); F243L (повышенная аффинность к FcγRIIIa) (Stewart, *et al.*, 2011, *Protein Eng Des Sel.*, 24(9):671-8); S298A/E333A/K334A (повышенная аффинность к FcγRIIIa) (Shields, *et al.*, 2001, *J Biol Chem*, 276(9):6591-604);

S239D/I332E/A330L и S239D/I332E (повышенная аффинность к FcγRIIIa) (Lazar, *et al.*, 2006, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(11):4005-10), и S239D/S267E и S267E/L328F (повышенная аффинность к FcγRIIb) (Chu, *et al.*, 2008, *Mol Immunol*, 45(15):3926-33).

[0094] Дополнительные модификации, влияющие на связывание Fc с Fcγ-рецепторами, описаны в публикации *Therapeutic Antibody Engineering* (Strohl & Strohl, Woodhead Publishing series in Biomedicine No 11, ISBN 1 907568 37 9, Oct 2012, page 283).

[0095] В различных публикациях описаны стратегии, которые использовались для конструирования антител с целью получения «нокаутных» вариантов (см., например, Strohl, 2009, *Curr Opin Biotech* 20:685-691; Strohl & Strohl, “Antibody Fc engineering for optimal antibody performance” In *Therapeutic Antibody Engineering*, Cambridge: Woodhead Publishing, 2012, pp 225-249). Эти стратегии включают снижение эффекторной функции за счет модификации гликозилирования, применения каркасов IgG2/IgG4 или введения мутаций в шарнир или домен CH2 Fc (см. также публикации патентов США №№ 2011/0212087, 2012/0225058 и 2012/0251531, международную публикацию № WO 2006/105338, и Strop *et al.*, 2012, *J. Mol. Biol.*, 420: 204-219).

[0096] Конкретные, не ограничивающие примеры известных аминокислотных мутаций для уменьшения связывания FcγR и/или комплемента с Fc включают, помимо прочего, N297A; L234A/L235A; C220S/C226S/C229S/P238S; C226S/C229S/E3233P/L235V/L235A; L234F/L235E/P331S; IgG2 V234A/G237A; IgG2 H268Q/V309L/A330S/A331S; IgG4 L235A/G237A/E318A и IgG4 S228P/L236E. Дополнительные примеры включают области Fc, сконструированные так, чтобы они включали модификации аминокислот L235A/L236A/D265S, и асимметричные модификации аминокислот, описанные в публикации международной патентной заявки № WO 2014/190441.

Мутации домена CH3

[0097] В определенных вариантах осуществления описанные в данном документе сконструированные с цистеином конструкции антител могут содержать одну или большее количество дополнительных мутаций в домене CH3, например, сконструированные с цистеином конструкции антител могут содержать модифицированный домен CH3, содержащий одну или большее количество мутаций аминокислот, которые больше способствуют образованию гетеродимерной Fc чем гомодимерной Fc. Гетеродимерные области Fc могут быть применены, например, в биспецифических сконструированных с цистеином конструкциях антител, содержащих одну мутацию со вставкой цистеина или асимметричные комбинации мутаций со вставкой цистеина.

[0098] Различные аминокислотные мутации, которые могут быть внесены в домен CH3 области Fc для стимуляции образования гетеродимерной Fc, известны в данной области техники и включают, например, модификации, описанные в публикации международной патентной заявки № WO 96/027011 («выступы-во-впадины»), Gunasekaran *et al.*, 2010, *J Biol Chem*, 285, 19637-46 («электростатическое взаимодействие»), Davis *et al.*, 2010, *Prot Eng Des Sel*, 23(4):195-202 (технология замены цепи для сконструированного

домена (SEED)) и Labrijn *et al.*, 2013, *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(13):5145-50 (обмен плечами Fab). Другие примеры включают асимметрично модифицированные области Fc, как описано в публикациях международных патентных заявок № WO 2012/058768 и WO 2013/063702.

[0099] В определенных вариантах осуществления сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит модифицированный домен CH3, в котором один полипептид Fc содержит аминокислотную мутацию в положении F405, выбранную из F405A, F405S, F405T и F405V, и аминокислотную мутацию в положении Y407, выбранную из Y407I и Y407V, а другой полипептид Fc содержит аминокислотную мутацию в положении T366, выбранную из T366I, T366L или T366M, и аминокислотную мутацию T394W. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная мутация в положении T366 представляет собой T366I или T366L.

[0100] В некоторых вариантах осуществления один полипептид Fc содержит аминокислотные мутации в положениях F405 и Y407, как описано выше, и дополнительно включает аминокислотную мутацию L351Y.

[0101] В некоторых вариантах осуществления один полипептид Fc содержит аминокислотные мутации в положениях T366 и T394, как описано выше, и дополнительно включает аминокислотную мутацию в положении K392, выбранную из K392F, K392L или K392M. В некоторых вариантах осуществления аминокислотная мутация в положении K392 представляет собой K392L или K392M.

[0102] В некоторых вариантах осуществления сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит модифицированный домен CH3, как описано выше, в котором один полипептид Fc содержит аминокислотные мутации в положениях F405 и Y407 и необязательно дополнительно содержит аминокислотную мутацию в положении L351, а другой полипептид Fc содержит аминокислотные мутации в положениях T366 и T394 и необязательно дополнительно содержит аминокислотную мутацию в положении K392, и один или оба полипептида Fc дополнительно содержат аминокислотную мутацию T350V.

[0103] В определенных вариантах осуществления сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит модифицированный домен CH3, в котором один полипептид Fc содержит аминокислотную мутацию F405A, F405S, F405T или F405V вместе с аминокислотной мутацией Y407I или Y407V и необязательно дополнительно включает аминокислотную мутацию L351Y, а другой полипептид Fc содержит аминокислотную мутацию T366I или T366L вместе с аминокислотной мутацией T394W и необязательно дополнительно включает аминокислотную мутацию K392L или K392M. В некоторых вариантах осуществления один или оба полипептида Fc дополнительно содержат аминокислотную мутацию T350V. В некоторых вариантах осуществления оба полипептида Fc дополнительно содержат аминокислотную мутацию T350V.

[0104] В определенных вариантах осуществления сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит модифицированный домен CH3, содержащий

аминокислотные мутации, указанные для любого из следующих вариантов: Вариант 1, Вариант 2, Вариант 3, Вариант 4 или Вариант 5 в Таблице 1.

Таблица 1: Модифицированные домены СНЗ

Вариант, №	Цепь	Мутации
1	A	L351Y_F405A_Y407V
	B	T366L_K392M_T394W
2	A	L351Y_F405A_Y407V
	B	T366L_K392L_T394W
3	A	T350V_L351Y_F405A_Y407V
	B	T350V_T366L_K392L_T394W
4	A	T350V_L351Y_F405A_Y407V
	B	T350V_T366L_K392M_T394W
5	A	T350V_L351Y_S400E_F405A_Y407V
	B	T350V_T366L_N390R_K392M_T394W

ПРИГОТОВЛЕНИЕ СКОНСТРУИРОВАННЫХ С ЦИСТЕИНОМ КОНСТРУКЦИЙ АНТИТЕЛ

[00105] Сконструированные с цистеином конструкции антител, описанные в данном документе, могут быть получены с применением стандартных рекомбинантных способов. Рекомбинантное производство обычно включает синтез одного или большего количества полинуклеотидов, кодирующих сконструированную с цистеином конструкцию антитела, клонирование одного или большего количества полинуклеотидов в соответствующий вектор или векторы и введение вектора(ов) в подходящую клетку-хозяина для экспрессии сконструированных с цистеином конструкций антител. Рекомбинантная продукция белков хорошо известна в данной области техники и может быть достигнута с применением стандартных методов, как описано, например, в публикациях Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2001); Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, (1987 & updates), John Wiley & Sons, New York, NY; and Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1990).

[00106] Таким образом, определенные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к выделенному полинуклеотиду или набору полинуклеотидов, кодирующих сконструированную с цистеином конструкцию антитела, как описано в данном документе. Таким образом, полинуклеотид в этом контексте может кодировать всю или часть сконструированной с цистеином конструкции антитела.

[00107] В контексте данного документа термины «полинуклеотид», «нуклеиновая кислота» и «молекула нуклеиновой кислоты» применяются взаимозаменяемо и относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, либо дезоксирибонуклеотидов, либо рибонуклеотидов, либо их аналогов. Полинуклеотид, который «кодирует» данный

полипептид, представляет собой полинуклеотид, который транскрибируется (в случае ДНК) и транслируется (в случае мРНК) в полипептид *in vivo* при помещении под контроль соответствующих регуляторных последовательностей. Границы кодирующей последовательности определяются стартовым кодоном на 5' (амино)-конце и стоп-кодом трансляции на 3' (карбокси)-конце. Последовательность терминации транскрипции может быть расположена на 3'-конце от кодирующей последовательности.

[00108] Для экспрессии сконструированной с цистеином конструкции антитела, один или большее количество полинуклеотидов, кодирующих сконструированную с цистеином конструкцию антитела, могут быть вставлены в подходящий вектор экспрессии либо непосредственно, либо после одного или большего количества этапов субклонирования с применением стандартных способов лигирования. Примеры подходящих векторов включают, помимо прочего, плазмиды, фагемиды, космиды, бактериофаги, бакуловирусы, ретровирусы или ДНК-вирусы. Вектор обычно выбирают так, чтобы он был функциональным в конкретной клетке-хозяине, которая будет применяться, *т. е.* вектор совместим с природой клетки-хозяина, обеспечивая амплификацию и/или экспрессию полинуклеотида(ов). Выбор подходящих комбинаций вектора и клетки-хозяина в этом отношении находится в рамках обычных навыков специалиста в данной области техники.

[00109] Таким образом, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к векторам (таким как векторы экспрессии), содержащим один или большее количество полинуклеотидов, кодирующих сконструированную с цистеином конструкцию антител, как описано в данном документе. Полинуклеотид(-ы) могут быть включены в один вектор или в больше чем один вектор. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды входят в состав мультицистронного вектора.

[00110] Как правило, векторы экспрессии будут содержать один или большее количество регуляторных элементов для поддержания плазмиды и для клонирования и экспрессии экзогенных полинуклеотидных последовательностей. Примеры таких регуляторных элементов включают промоторы, энхансерные последовательности, точки начала репликации, последовательности терминации транскрипции, донорные и акцепторные сайты сплайсинга, лидерные последовательности для секреции полипептида, сайты связывания рибосом, последовательности полиаденилирования, полилинкерные области для вставки полинуклеотида, кодирующего экспрессируемый полипептид, и селективируемые маркеры.

[00111] Регуляторные элементы могут быть гомологичными (*т. е.* происходящими из того же вида и/или штамма, что и клетка-хозяин), гетерологичными (*т. е.* происходящими от вида, отличного от вида или штамма клетки-хозяина), гибридными (*т. е.* комбинацией регуляторных последовательностей из больше чем одного источника) или синтетические. Таким образом, источником регуляторной последовательности может быть любой прокариотический или эукариотический организм при условии, что регуляторная последовательность является функциональной и может быть активирована природой

применяемой клетки-хозяина.

[00112] Необязательно, вектор может содержать последовательность, кодирующую «метку», то есть последовательность нуклеиновой кислоты, расположенную на 5'- или 3'-конце кодирующей последовательности, которая кодирует последовательность гетерологичного пептида, такую как полиHis (например, 6xHis) , FLAG[®], HA (гемагглютинин вируса гриппа), тус, металл-аффинный, авидин/стрептавидин, глутатион-S-трансфераза (GST) или биотиновая метка. Эта метка обычно остается слитой с экспрессируемым белком и может служить средством для аффинной очистки или обнаружения белка. Необязательно, метку впоследствии можно удалить из очищенного белка различными способами, например, с помощью определенных пептидаз для расщепления.

[00113] Различные векторы экспрессии легко доступны из коммерческих источников. В альтернативном варианте, когда коммерчески доступный вектор, содержащий все желаемые регуляторные элементы, недоступен, вектор экспрессии может быть сконструирован с применением коммерчески доступного вектора в качестве исходного вектора. Если один или большее количество желаемых регуляторных элементов еще не присутствуют в векторе, они могут быть получены по отдельности и лигированы в вектор. Способы получения различных регуляторных элементов и конструирования векторов экспрессии хорошо известны специалистам в данной области техники.

[00114] После создания вектора экспрессии, включающего полинуклеотид(ы), кодирующий сконструированную с цистеином конструкцию антитела, этот вектор можно вставлять в подходящую клетку-хозяина для амплификации и/или экспрессии белка. Трансформация вектора экспрессии в выбранной клетке-хозяине может быть осуществлена с помощью хорошо известных методов, в том числе трансфекции, инфекции, соосаждения фосфатом кальция, электропорации, микроинъекции, липофекции, DEAE-декстран, опосредованной трансфекции, и другими известными методиками. Выбранный способ будет частично зависеть от типа применяемой клетки-хозяина. Эти и другие подходящие способы хорошо известны специалисту в данной области техники (см., например, публикацию Sambrook *et al.*, там же).

[00115] Клетка-хозяин, трансформированная вектором экспрессии, при культивировании в соответствующих условиях экспрессирует белок, кодируемый вектором, и белок впоследствии может быть получен из культуральной среды (если клетка-хозяин секретирует белок) или непосредственно из клетки-хозяина, продуцирующей его (если белок не секретируется). Клетка-хозяин может быть прокариотической (например, бактериальная клетка) или эукариотической (например, клетка дрожжей, грибов, растений или млекопитающих). Выбор подходящей клетки-хозяина может быть легко осуществлен специалистом в данной области техники с учетом различных факторов, таких как желаемые уровни экспрессии, модификации полипептидов, которые желательны или необходимы для активности (такие как гликозилирование или фосфорилирование) и легкость складывания в биологически активную молекулу

[00116] Определенные варианты осуществления настоящего изобретения, таким образом, относятся к клеткам-хозяевам, содержащим полинуклеотид(ы), кодирующий сконструированную с цистеином конструкцию антитела, или один или большее количество векторов, содержащих полинуклеотид(ы), кодирующий сконструированную с цистеином конструкцию антитела. В определенных вариантах осуществления клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку.

[00117] Например, в качестве клеток-хозяев можно применять эукариотические микроорганизмы, такие как мицелиальные грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых были «гуманизированы» (см., например, публикации Gerngross, 2004, *Nat. Biotech.*, 22:1409-1414, и Li *et al.*, 2006, *Nat. Biotech.*, 24:210-215). Клетки растений также можно применять в качестве клеток-хозяев (см., например, патенты США №№ 5,959,177; 6,040,498; 6,420,548; 7,125,978 и 6,417,429, описывающие технологию PLANTIBODIES™).

[00118] В некоторых вариантах осуществления указанная клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. В качестве клеток-хозяев можно применять различные клеточные линии млекопитающих. Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают, помимо прочего, линию CV1 почки обезьяны, трансформированную SV40 (COS-7), линию почки эмбриона человека 293 (клетки HEK293, как описано, например, в публикации Graham, *et al.*, 1977, *J. Gen Virol.*, 36:59), клетки почек детенышей хомяка (BHK), клетки сертоли мыши (клетки TM4, как описано, например, в Mather, 1980, *Biol. Reprod.*, 23:243-251), клетки почки обезьяны (CV1), клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76), клетки карциномы шейки матки человека (HeLa), клетки почки собаки (MDCK), клетки печени крысы буффало (BRL 3A), клетки легкого человека (W138), клетки печени человека (Hep G2), клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562), клетки TRI (как описано, например, в публикации Mather, *et al.*, 1982, *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68), клетки MRC 5, клетки FS4, клетки яичника китайского хомяка (CHO) (включая клетки DHFR⁻ CHO, как описано в публикации Urlaub, *et al.*, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216) и клеточные линии миеломы (такие как Y0, NS0 и Sp2/0). См. также публикацию Yazaki and Wu, 2003, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, pp. 255-268 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J.).

[00119] Определенные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам получения сконструированной с цистеином конструкции антитела, как описано в данном документе, включающим трансфекцию клетки-хозяина одним или большим количеством полинуклеотидов, кодирующих сконструированную с цистеином конструкцию антитела, например, в виде одного или большего количества векторов, содержащих полинуклеотид(ы), и культивирование клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии сконструированной с цистеином конструкции антитела.

[00120] Как правило, сконструированную с цистеином конструкцию антитела выделяют из клетки-хозяина после экспрессии и, необязательно, подвергают очистке. Способы выделения и очистки экспрессированных белков хорошо известны в данной

области техники. Стандартные способы очистки включают, например, хроматографические методы, такие как ионный обмен, гидрофобное взаимодействие, аффинность, сортировку по размеру, гель-фильтрацию или обращенно-фазовую хроматографию, которые можно проводить при атмосферном давлении или при среднем или высоком давлении с применением таких систем, как FPLC, MPLC и HPLC. Другие способы очистки включают электрофоретические, иммунологические способы, способы преципитации, диализа и хроматофокусирования. Также применимы методики ультрафильтрации и диафильтрации в сочетании с концентрацией белка.

[00121] В данной области техники известно множество природных белков, связывающих области Fc или другие области антител, и поэтому эти белки можно применять для очистки Fc-содержащих белков. Например, бактериальные белки A и G связываются с областью Fc. Аналогичным образом бактериальный белок L связывается с областью Fab некоторых антител. Очистка часто может быть обеспечена конкретным партнером по слиянию или аффинной меткой, как описано выше. Например, антитела можно очищать, применяя смолу с глутатионом, если используется GST-гибридизация, аффинная хроматография с Ni^{+2} , если используется His-маркер, или иммобилизованное антитело anti-flag, если применяется flag-метка. Примеры пригодных методов очистки описаны в публикациях Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1990) и *Protein Purification: Principles and Practice*, 3rd Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY (1994).

КОНЬЮГАТЫ

[00122] Определенные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к конъюгатам, содержащим сконструированную с цистеином конструкцию антитела, как описано в данном документе, и активный агент, конъюгированный с конструкцией антитела посредством вставленного остатка цистеина. Активным агентом может быть, например, терапевтический агент, диагностический агент или маркировочный агент.

[00123] Конъюгация выбранного активного агента с сконструированной с цистеином конструкцией антитела может быть осуществлена различными способами, известными в данной области техники, и может быть прямой или через линкер. Линкеры для конъюгации активных агентов представляют собой бифункциональные или многофункциональные фрагменты, способные связывать один или большее количество активных агентов с конструкцией антитела. Бифункциональный (или моновалентный) линкер связывает один активный агент с одним сайтом в конструкции антитела, тогда как мультифункциональный (или мультивалентный) линкер связывает больше одного активного агента с одним сайтом в конструкции антитела. Линкеры, способные связывать один активный агент с больше чем одним сайтом на антителе, также могут рассматриваться как мультифункциональные.

[00124] Когда линкер применяется для конъюгации активного агента с сконструированной с цистеином конструкцией антитела, линкер содержит тиол-реакционноспособную функциональную группу, позволяющую ему реагировать со

вставленным остатком цистеина в конструкции антитела. Примеры тиол-реакционноспособных функциональных групп включают, помимо прочего, малеимид, α -галогенацетил, активированные сложные эфиры, такие как сукцинимидные сложные эфиры, 4-нитрофениловые сложные эфиры, пентафторфениловые сложные эфиры, тетрафторфениловые сложные эфиры, ангидриды, хлорангидриды, сульфонилхлориды, изотиоцианаты и изоцианаты.

[00125] Линкер также включает функциональную группу, способную реагировать с целевой группой на активном агенте. Подходящие функциональные группы известны в данной области техники и включают те, которые описаны, например, в публикации *Bioconjugate Techniques* (G.T. Hermanson, 2013, Academic Press). Группы на активном агенте, которые могут служить целевыми группами для присоединения линкера, включают, помимо прочего, тиольные, гидроксильные, карбоксильные, аминные, альдегидные и кетонные группы.

[00126] Не ограничивающие примеры функциональных групп для реагирования с тиолами описаны выше. Неограничивающие примеры функциональных групп для реагирования с аминами включают активированные сложные эфиры (такие как сложные эфиры N-гидроксисукцинамида (NHS) и сложные эфиры сульфо-NHS), имидоэфиры (такие как реактив Траута), изотиоцианаты, альдегиды и ангидриды кислот (такие как диэтилентриаминпентауксусный ангидрид (DTPA)). Другие примеры включают сукцинимидо-1,1,3,3-тетра-метилурония тетрафторборат (TSTU) и бензотриазол-1-ил-окситрипирролидинофосфония гексафторфосфат (PyBOP).

[00127] Неограничивающие примеры функциональных групп, способных реагировать с электрофильной группой активного агента (такой как, альдегидная или кетон-карбонильная группа), включают гидразид, оксим, амина, гидразин, тиосемикарбазон, карбоксилат гидразина и арилгидразид.

[00128] Линкеры могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми. Расщепляемый линкер обычно подвержен расщеплению во внутриклеточных условиях, например, посредством лизосомных процессов. Примеры включают линкеры, которые являются чувствительными к протеазе, чувствительными к кислоте или чувствительными к восстановлению. Нерасщепляемые линкеры, наоборот, основаны на деградации антитела в клетке, которая, как правило, приводит к высвобождению фрагмента «аминокислота-линкер-активный агент».

[00129] Подходящие расщепляемые линкеры включают, например, пептидсодержащие линкеры, расщепляемые внутриклеточной протеазой, такой как лизосомальная протеаза или эндосомальная протеаза. Например, линкер может включать дипептид, такой как валин-цитруллин (Val-Cit) или фенилаланин-лизин (Phe-Lys). Другие примеры подходящих дипептидов для включения в линкеры охватывают Val-Lys, Ala-Lys, Phe-Lys, Val-Cit, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, Phe-Arg, Ala-Phe, Val-Ala, Met-Lys, Asn-Lys, Ile-Pro, Ile-Val, Asp-Val, His-Val, Met-(D)Lys, Asn-(D)Lys, Val-(D)Asp, NorVal-(D)Asp, Ala-(D)Asp, Me3Lys-Pro, PhenylGly-(D)Lys, Met-(D)Lys, Asn-(D)Lys, Pro-(D)Lys and Met-

(D)Lys. Линкеры могут также включать более длинные пептидные последовательности, такие как трипептиды Met-Cit-Val, Gly-Cit-Val, (D)Phe-Phe-Lys или (D)Ala-Phe-Lys, или тетрапептиды Gly-Phe-Leu-Gly, Gly-Gly-Phe-Gly или Ala-Leu-Ala-Leu.

[00130] Дополнительные примеры расщепляемых линкеров включают линкеры, содержащие дисульфид. Примеры дисульфидсодержащих линкеров включают, помимо прочего, N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)бутаноат (SPBD) и N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)-2-сульфобутаноат (сульфо-SPBD). Дисульфидсодержащие линкеры могут необязательно включать дополнительные группы для обеспечения стерических препятствий рядом с дисульфидной связью, чтобы улучшить внеклеточную стабильность линкера, например, включение геминальной диметильной группы. Другие подходящие линкеры включают линкеры, гидролизующиеся при определенном pH или в пределах диапазона pH, такие как гидразоновые линкеры.

[00131] Дополнительный пример расщепляемого линкера представляет собой линкер, содержащий β -глюкуронид, который расщепляется β -глюкуронидазой, ферментом, присутствующим в лизосомах и опухолевом интерстиции (см., например, публикацию De Graaf, *et al.*, 2002, *Curr. Pharm. Des.* 8:1391-1403).

[00132] Расщепляемые линкеры необязательно могут дополнительно включать в себя один или большее количество дополнительных функциональностей, таких как саморасщепляющиеся и самоуудаляющиеся группы, удлиняющие вставки или гидрофильные фрагменты.

[00133] Саморасщепляющиеся и самоуудаляющиеся группы, которые находят применение в линкерах включают, например, группы *p*-аминобензилоксикарбонила (PABC) и *p*-аминобензильного эфира (PABE), а также метилированный этилендиамин (MED). Другие примеры саморасщепляющихся групп включают, помимо прочего, ароматические соединения, которые электронно подобны группе PABC или PABE, такие как гетероциклические производные, например, производные 2-аминоимидазол-5-метанола, как описано в патенте США № 7,375,078. Другие примеры включают группы, которые подвергаются циклизации при гидролизе амидной связи, такие как замещенные и незамещенные амиды 4-аминомасляной кислоты (Rodrigues, *et al.*, 1995, *Chemistry Biology* 2:223-227) и амиды 2-аминофенилпропионовой кислоты (Amsberry, *et al.*, 1990, *J. Org. Chem.* 55:5867-5877). Саморасщепляющиеся и самоуудаляющиеся группы, по отдельности или в комбинации, часто включаются в линкеры на основе пептидов, а также могут быть включены в линкеры других типов.

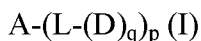
[00134] Удлиняющие вставки, которые могут находить применение в линкерах для ADC, включают, например, алкиленовые группы и удлиняющие вставки на основе алифатических кислот, дикислот, аминов или диаминов, таких как дигликолят, малонат, капроат и капроамид. Другие удлиняющие вставки включают, например, удлиняющие вставки на основе глицина и полиэтиленгликоля (PEG) или монометоксиполиэтиленгликоля (mPEG).

[00135] В данной области также известны различные нерасщепляемые линкеры для

связывания активных агентов с антителами. Примеры включают, помимо прочего, линкеры на основе следующих соединений: N-сукцинимидил-4-(малеимидометил)циклогексанкарбоксилат (SMCC), сульфосукцинимидил-4-[N-малеимидометил]циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC), N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбокси-(6-амидокапроат) («длинноцепочечный» SMCC или LC-SMCC), N-сукцинимидиловый эфир κ-малеимидоундекановой кислоты (KMUA), N-сукцинимидиловый эфир γ-малеимидомасляной кислоты (GMBS), N-гидроксисукцинимидный эфир ε-малеимидокапроновой кислоты (EMCS), m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный эфир (MBS), N-(α-малеимидоацетокси)-сукцинимидный эфир (AMAS), сукцинимидил-6-(β-малеимидопропионамидо)гексаноат (SMPH), N-сукцинимидил-4-(p-малеимидофенил)бутират (SMPB), N-(p-малеимидофенил)изоцианат (PMPI), N-сукцинимидил-4-(йодоацетил)аминобензоат (SIAB), N-сукцинимидилиодацетат (SIA), N-сукцинимидилбромацетат (SBA) и N-сукцинимидил-3-(бромацетамидо)пропионат (SBAP).

[00136] Количество молекул активного агента, которые могут быть конъюгированы с данной сконструированной с цистеином конструкцией антитела (отношение лекарственного средства к антителу, или DAR), будет зависеть от количества мутаций со вставкой цистеина, содержащихся в конструкции антитела, и от типа применяемого линкера (моновалентный или мультивалентный).

[00137] Определенные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к конъюгату, имеющему Формулу (I):



где:

A представляет собой сконструированную с цистеином конструкцию антитела, как описано в данном документе;

L представляет собой линкер (например, линкер, как описано в любом из вариантов осуществления, описанных выше);

D представляет собой активный агент;

q представляет собой целое число от 1 до 4, и

p представляет собой целое число от 1 до 8,

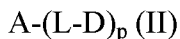
где D связан со вставленным остатком цистеина в сконструированную с цистеином конструкцию антитела через L.

[00138] В некоторых вариантах осуществления Формулы (I) q равно 1, 2 или 3. В некоторых вариантах осуществления Формулы (I) q равно 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления формулы (I) p представляет собой целое число от 1 до 6. В некоторых вариантах осуществления Формулы (I) p равно 1, 2, 3 или 4. В некоторых вариантах осуществления Формулы (I) p равно 6.

[00139] В некоторых вариантах осуществления в Формуле (I) q равно 1, 2 или 3, а p равно 1, 2, 3 или 4. В некоторых вариантах осуществления в Формуле (I) q равно 1 или 2, а p представляет собой целое число от 1 до 8. В некоторых вариантах осуществления в

Формуле (I) q равно 1 или 2, а p равно 1, 2, 3 или 4. В некоторых вариантах осуществления в Формуле (I) q равно 1 или 2, а p равно 6.

[00140] В определенных вариантах осуществления конъюгат описан Формулой (II):



где:

A представляет собой сконструированную с цистеином конструкцию антитела, как описано в данном документе;

L представляет собой линкер (например, линкер, как описано в любом из вариантов осуществления, описанных выше);

D представляет собой активный агент, и

p представляет собой целое число от 1 до 8,

где D связан со вставленным остатком цистеина в сконструированную с цистеином конструкцию антитела через L .

[00141] В некоторых вариантах осуществления в Формуле (II) p представляет собой целое число от 1 до 6. В некоторых вариантах осуществления в Формуле (II) p равно 1, 2, 3 или 4. В некоторых вариантах осуществления в Формуле (II) p равно 1, 2 или 3. В некоторых вариантах осуществления в Формуле (II) p равно 2. В некоторых вариантах осуществления в Формуле (II) p равно 1 или 3. В некоторых вариантах осуществления в Формуле (II) p равно 4 или 6.

[00142] Способы конъюгирования различных агентов со свободными тиоловыми группами на белках, включая антитела, известны в данной области техники (см., например, в публикации *Bioconjugate Techniques* (G.T. Hermanson, 2013, Academic Press)), а типовые способы также описаны в примерах данного документа.

[00143] Определенные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам получения конъюгатов, содержащих сконструированную с цистеином конструкцию антитела по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления указанный способ включает помещение сконструированной с цистеином конструкции антитела, содержащей по меньшей мере один встроенный остаток цистеина, как описано в данном документе, в восстанавливающие условия, так что тиоловая группа вставленного остатка цистеина восстанавливается, и реагирование структуры «линкер, реагирующий с тиолом-активный агент» с конструкцией антитела в условиях, которые обеспечивают образование связи между линкером и восстановленным тиолом.

[00144] Определенные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам получения конъюгата антитело-лекарственное средство с заранее определенным соотношением лекарственного средства к антителу (DAR), способу, включающему реагирование сконструированной с цистеином конструкции антитела, содержащего одну или большее количество мутаций со вставкой цистеина, как описано в данном документе, со структурой «лекарственное средство-линкер» для получения конъюгата антитело-лекарственное средство, при этом предварительно определенное значение DAR равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8, а сконструированная с цистеином конструкция

антитела содержит такое же количество мутаций со вставкой цистеина как предварительно определенное значение DAR. В определенных вариантах осуществления этого способа предварительно определенное значение DAR равно 2. В некоторых вариантах осуществления предварительно определенное значение DAR равно 1 или 3. В некоторых вариантах осуществления предварительно определенное значение DAR равно 4 или 6.

[00145] В некоторых вариантах осуществления предварительно определенное значение DAR равно 1 или 3, а мутации со вставкой цистеина, содержащиеся в сконструированной с цистеином конструкции антитела, выбраны из следующих мутаций:

- (a) вставка остатка цистеина между положениями 9 и 10 в домене VH;
- (b) вставка остатка цистеина между положениями 40 и 41 в домене VL;
- (c) вставка остатка цистеина между положениями 237 и 238 в домене CH2, и
- (d) вставка остатка цистеина между положениями 299 и 300 в домене CH2.

[00146] В некоторых вариантах осуществления предварительно определенное значение DAR равно 1 или 3, а мутации со вставкой цистеина, содержащиеся в сконструированной с цистеином конструкции антитела, выбраны из следующих мутаций:

- (i) вставка остатка цистеина между положениями 40 и 41 в домене VL;
- (ii) вставка остатка цистеина между положениями 126 и 127 в домене CL;
- (iii) вставка остатка цистеина между положениями 9 и 10 в домене VH;
- (iv) вставка остатка цистеина между положениями 237 и 238 в домене CH2, и
- (v) вставка остатка цистеина между положениями 299 и 300 в домене CH2.

Активные агенты

[00147] Активные агенты, которые могут быть конъюгированы с сконструированной с цистеином конструкцией антитела, включают терапевтические агенты, диагностические агенты и маркировочные агенты.

[00148] Примеры терапевтических агентов включают, помимо прочего, антиметаболиты, алкилирующие агенты, антрациклины, антибиотики, антимитотические агенты, токсины, апоптотические агенты, тромботические агенты, антиангиогенные агенты, модификаторы биологического ответа, факторы роста, радиоактивные материалы и макроциклические хелаторы, применяемые для конъюгации ионов радиометаллов. Примеры диагностических агентов включают, помимо прочего, различные визуализирующие агенты, такие как флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы и радиоактивные материалы. Примеры маркировочных агентов включают, помимо прочего, ферменты, простетические группы, флуоресцентные материалы, люминесцентные материалы и радиоактивные материалы.

[00149] Определенные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к конъюгатам, содержащим сконструированную с цистеином конструкцию антитела, как описано в данном документе, и терапевтический агент. Некоторые варианты осуществления относятся к конъюгатам, содержащим сконструированную с цистеином конструкцию антитела, как описано в данном документе, и противораковый агент. Примеры противораковых агентов включают, помимо прочего, майтансиноиды,

ауристатины, гемиастерлины, тубулизины, доластатины, трихотецены, дуокармицины, камптотецины, калихеамицины и другие ендиновые антибиотики, таксаны, антрациклины, экзотоксин *Pseudomonas* (PE), пирролобензодиазапены (PBD), и их аналоги и производные.

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ

[00150] Определенные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к фармацевтическим композициям для терапевтического или диагностического применения, содержащим конъюгат, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Композиции могут быть приготовлены известными способами с применением хорошо известных и легкодоступных ингредиентов и могут быть составлены для введения субъекту, например, пероральным (включая, например, буккальный или сублингвальный), местным, парентеральным, ректальным или вагинальным путем, или в виде ингаляции или спрея. В контексте данного документа термин «парентеральный» включает инъекцию или инфузию подкожным, внутрикожным, внутрисуставным, внутривенным, внутримышечным, внутрисосудистым, интратеральным или интратекальным путем.

[00151] Композиция будет, как правило, составлена в формате, подходящем для введения субъекту выбранным путем, например, в виде сиропа, элексира, таблетки, леденца, пастилки, твердой или мягкой капсулы, пилюли, суппозитория, масляной или водной суспензии, диспергируемого порошка или гранулы, эмульсии, инъекционного препарата или раствора. Композиции могут быть представлены в виде однократных лекарственных форм.

[00152] Фармацевтически приемлемые носители обычно являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозировках и концентрациях. Примерами таких носителей являются, помимо прочего, буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота и метионин; консерванты, такие как октадецилдиметилбензиламмония хлорид, гексаметония хлорид, бензалкония хлорид, бензетония хлорид, фенол, бутиловый спирт, бензиловый спирт, алкилпарабены (например, метил- или пропилпарабен), катехин, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и m-крезол; полипептиды с низкой молекулярной массой (менее около 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин или желатин; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, такие как глюкоза, манноза или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлами, такие как комплексы Zn-белок, и неионные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (PEG).

[00153] В определенных вариантах осуществления изобретения композиции могут быть представлены в форме стерильного инъекционного водного или масляного раствора или суспензии. Такие суспензии могут составлять с применением подходящего

диспергирующего или увлажняющего агентов и/или суспендирующего агента, которые известны в данной области техники. Стерильный инъекционный раствор или суспензия могут содержать конъюгат в нетоксичном приемлемом для парентерального введения разбавителе или растворителе. Приемлемые разбавители и растворители, которые могут применяться, включают, например, 1,3-бутандиол, воду, раствор Рингера или изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, стерильные нелетучие масла можно применять в качестве растворителя или суспендирующей среды. Для данной цели можно применять различные легкие нелетучие масла, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, в препаратах инъекционных лекарственных форм находят применение жирные кислоты, такие как олеиновая кислота. Адъюванты, такие как местные анестетики, консерванты и/или буферные агенты, известные в данной области техники, также могут быть включены в инъекционный раствор или суспензию.

[00154] В данной области техники известны другие фармацевтические композиции и способы приготовления фармацевтических композиций, и это описано, например, в публикации «*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*» (раньше «*Remingtons Pharmaceutical Sciences*»); Gennaro, A., Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2000).

СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

[00155] Конъюгаты, содержащие сконструированную с цистеином конструкцию антитела по настоящему изобретению, конъюгированную с активным агентом, можно применять в способах лечения, способах диагностики и способах скрининга. Точная характеристика способа будет зависеть от природы конъюгата, включая тип активного агента, конъюгированного с сконструированной с цистеином конструкцией антитела.

[00156] Например, некоторые варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам лечения заболевания или нарушения путем введения субъекту, страдающему этим заболеванием или нарушением, конъюгата, содержащего сконструированную с цистеином конструкцию антитела, как описано в данном документе, конъюгированную с терапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления, в которых терапевтический агент представляет собой противораковый агент, конъюгаты можно применять в способах лечения рака.

[00157] Определенные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам диагностики заболевания или нарушения, включающим введение субъекту, с подозрением или известным наличием заболевания или нарушения, конъюгата, содержащего сконструированную с цистеином конструкцию антитела, как описано в данном документе, конъюгированную с диагностическим агентом. Некоторые варианты осуществления относятся к способам диагностики заболевания или нарушения, включающим приведение в контакт биологического образца, взятого у субъекта с подозрением или известным наличием заболевания или нарушения, с конъюгатом, содержащим сконструированную с цистеином конструкцию антитела, описанную в данном документе, конъюгированную с диагностическим агентом.

[00158] Определенные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к способам скрининга биологического образца, такого как образец, взятый у субъекта, на наличие целевого фрагмента, включающим приведение образца в контакт с конъюгатом, содержащим описанную в данном документе сконструированную с цистеином конструкцию антитела, конъюгированную с маркировочным агентом, при этом сконструированная с цистеином конструкция антитела специфически связывается с целевым фрагментом.

[00159] Следующие примеры являются исключительно иллюстративными и никоим образом не подразумевают ограничения объема заявленного изобретения.

ПРИМЕРЫ

ОБЩИЕ ПРОЦЕДУРЫ

1. Клонирование, экспрессия и очистка сконструированных с цистеином вариантов

[00160] Антитела IgG1, нацеленные на с-Met или FR α и имеющие гетеродимерную область Fc (HetFc), применяли для конструирования сконструированных с цистеином конструкций и контролей, описанных в следующих Примерах. HetFc включает следующие мутации в домене CH3:

[00161] Цепь А (HC-A): T350V_L351Y_F405A_Y407V

[00162] Цепь В (HC-B): T350V_T366L_K392L_T394W

[00163] Сконструированные с цистеином конструкции и контроли клонировали и экспрессировали следующим образом. Гены, кодирующие тяжелую и легкую цепи антител, конструировали посредством генного синтеза с использованием кодонов, оптимизированных для экспрессии у человека/млекопитающих. Сигнальный пептид MAVMAPRTLVL LLSGALALTQ TWAG [SEQ ID NO:1] был включен на N-конце каждой полипептидной последовательности. В некоторых случаях легкая цепь содержала пептид ESSCDVKLV [SEQ ID NO:2], слитый непосредственно с С-концевым остатком.

[00164] Конечные генные продукты субклонировали в вектор экспрессии PTT5 млекопитающих (NRC-BRI, Канада) и экспрессировали в клетках CHO (Durocher, *et al.*, 2002, *Nucl Acids Res.*, 30(2):E9). Вкратце, клетки CHO-3E7 выращивали в суспензии в среде FreeStyle™ F17 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) с добавлением 0,1% вес./об. Плюроник и 4 mM глутамин до плотности клеток 1,5-2 миллиона клеток/мл с сохранением жизнеспособности $\geq 97\%$. Транфекцию проводили, как описано Durocher и соавт. (Delafosse, *et al.*, 2016, *J Biotechnol*, 227:103-111; Raymond, *et al.*, 2015, *MAbs*, 7(3):571-83) с применением смеси "плазмидная ДНК: 5% плазида рТТo-GFP" (зеленый флуоресцентный белок для определения эффективности трансфекции), 15% плазида рТТ22-AKT, 21% ДНК конструкция антитела (в соотношении 1:1:3 HC-A, HC-B, LC), 68,37% ДНК спермы лосося. После трансфекции колбу, содержащую клетки, помещали на орбитальный шейкер со скоростью 120 об/мин в увлажненный инкубатор с 5% CO₂ при 37 °C. Через 24 часа после трансфекции, к культурам добавляли 1% масс./об. триптона N1 (TN1) и 0,5 mM вальпроевой кислоты. Затем культуры переносили на орбитальный шейкер

(120 об/мин), помещенный в увлажненный инкубатор с 5% CO₂ при 32°C. Через 24-48 часов GFP-положительные клетки должны составлять 30-60%, что определяется с помощью проточной цитометрии. Клетки собирали через 7-10 дней после трансфекции и центрифугировали при 4000 об/мин, затем стерилизовали фильтрованием (осветляли) с применением фильтра 0,45 мкм (Millipore Sigma, Берлингтон, штат Массачусетс) и замораживали при -80 °C.

[00165] Размороженную осветленную культуральную среду загружали в колонку MabSelect™ SuRe™ Protein-A (GE Healthcare, Чикаго, штат Иллинойс) и промывали 10 объемами колонки PBS-буфера при pH 7,2. Антитело элюировали 10 объемами колонки цитратного буфера при pH 3,6, а объединенные фракции, содержащие антитело, нейтрализовали с помощью TRIS при pH 11.

[00166] Элюат белка-A, содержащий антитела, дополнительно очищали эксклюзионной хроматографией (SEC). Для SEC образцы загружали в колонку Sephadex 200 HiLoad® 16/60 200 prepgrade (GE Healthcare, Чикаго, штат Иллинойс) с применением системы очистки АКТА™ (GE Healthcare, Чикаго, штат Иллинойс; Express, FPLC или система очистки (Purifier system)) при скорости потока 1 мл/мин. Буфер PBS с pH 7,4 применяли при скорости потока 1 мл/мин. Фракции, соответствующие очищенному антителу, объединяли на основании анализа SDS-PAGE или капиллярного электрофореза (LabChip GX®; PerkinElmer, Inc., Уолтем, штат Массачусетс) и, при необходимости, концентрировали до 5-10 мг/мл. Кроме того, если для последующего анализа требовался низкий уровень эндотоксина, то перед очисткой белка, системы, колонки и смолу (где это применимо) депирогенизировали с применением растворов NaOH по стандартным протоколам.

2. Конъюгация лекарственных средств

[00167] Сконструированные с цистеином варианты и контроли экспрессировали в форме, кэпированной цистеином, с L-цистеиновым кэпом, глутатионовым кэпом или их комбинацией. Чтобы уменьшить гетерогенность образца и повысить эффективность конъюгации, все антитела подвергали стадии восстановления-окисления перед конъюгацией в структуру «активированное малеимидом лекарственное средство-линкер». Репрезентативная процедура представлена ниже.

[00168] 3 мг раствора варианта v28983 с концентрацией 5 мг/мл (см. Таблицу 2.2; молекулярная масса 146301 Da) восстанавливали в PBS, pH 7,4, с применением 25 экв. молярного избытка трис(2-карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР) в течение 3 часов при 37°C (водяная баня) в присутствии 1 mM диэтилентриаминпентауксусной кислоты (ДТРА) на основании следующего расчета (Таблица А):

Таблица А: Образец варианта со вставкой цистеина, v28983

Антитело	v28983
Целевая структура SH/mAb	2
mAb MW (Да)	146301

Концентрация mAb, мг/мл	5,00
Концентрация mAb, М	3,42E-05
Количество mAb, мг	3
mAb, мкл	600,0
ТСЕР экв.	25
10 мМ ТСЕР, мкл	51,3
5 мМ ДТРА в PBS pH 7,4, мкл	170,0
Конечная конц. ДТРА, мМ	1
PBS, мкл	28.7
Общий объем, мкл	850,0
Конечная конц., мг/мл	3,5

[00169] После завершения восстановления избыток ТСЕР удаляли на спиновой обессоливающей колонке 5 мл 40 kD Zeba™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), уравновешенной PBS, pH 7,4. Восстановленное антитело подвергали окислению в течение ночи (18 часов) 25-молярным избытком дегидроаскорбиновой кислоты (DHAA) (при условии 100%-ного извлечения после очистки на колонке Zeba™) при 4°C для восстановления межцепочечных дисульфидных связей при сохранении вставленного цистеина в восстановленной (не содержащей тиол) форме. Добавление DHAA было основано на следующем расчете (Таблица В):

Таблица В: Образец окисления варианта со вставкой цистеина, v28983

Антитело	v28983
Целевая структура SH/mAb	2
mAb MW (Да)	146301
Концентрация mAb, мг/мл	5,00
Концентрация mAb, М	3,42E-05
Количество mAb, мг	3
DHAA экв.	25
15 мМ DHAA, мкл	51,3
DHAA мМ	10,0

[00170] Окисленное антитело разделяли на три аликвоты по 1 мг для конъюгации с тремя различными структурами «лекарственное средство-линкер»: MTvcСоединение 1, MCvcРАВС-ММАЕ и MCvcРАВ-тубулизин М. Строение трех структур «лекарственное средство-линкер» продемонстрировано на Фиг. 1. Конъюгация была достигнута путем инкубации с 5-молярным избытком структуры «лекарственное средство-линкер» при комнатной температуре. Структуры «лекарственное средство-линкер» готовили в виде исходных растворов 10 или 20 мМ DMSO и добавляли в реакцию на основе следующих

расчетов (Таблица С):

Таблица С: Конъюгация варианта со вставкой цистеина v28983 с тремя различными структурами «лекарственное средство-линкер»

Антитело	v28983	v28983	v28983
Целевая структура SH/mAb	2	2	2
Лекарственное средство-Линкер	MTvcСоединение 1	MCvcPABC-MMAE	MCvcPAB-тубулизин М
Концентрация структуры «лекарственное средство-линкер», mM	20	10	10
Лекарственное средство-Линкер экв	5	5	5
mAb, мг	1	1	1
mAb MW (Да)	146301	146301	146301
Объем структуры «лекарственное средство-линкер», мкл	1,7	3,5	3,5

3. Дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC)

[00171] Термическую стабильность антител с модифицированным цистеином измеряли с помощью DSC следующим образом. 400 мкл очищенного образца в концентрациях 0,2 мг/мл или 0,4 мг/мл в PBS использовали для анализа DSC с помощью MicroCal VP-Capillary DSC™ (GE Healthcare, Чикаго, штат Иллинойс). В начале каждого прогона DSC, проводили 5 холостых инъекций буфера для стабилизации исходного уровня, а также инъекции буфера проводили перед каждым введением образца для сравнения. Каждый образец сканировали от 20 до 100 °C со скоростью 60 °C/ч с низкой обратной связью, 8 сек фильтрации, 5 мин preTstat, и давлением азота, равным 70 psi. Полученные термограммы сопоставляли и анализировали с помощью программного обеспечения Origin 7 (OriginLab Corporation, Нортгемптон, штат Массачусетс).

4. Хроматография с гидрофобным взаимодействием (HIC)

[00172] Для прогонов HIC, колонку TSKgel Butyl-NPR (2,5 мкм, 4,6×35 мм) (TOSOH Bioscience GmbH, Грисхайм, Германия) уравнивали 5 объемами колонки буфера А (1,5 М (NH₄)₂SO₄, 25 mM PO₄³⁻, pH 6,95) при комнатной температуре. Обычно 20-30 мкг образца с концентрацией 2-3 мг/мл загружали в колонку с 95% буфером А и 5% буфером В (75% 25 mM PO₄³⁻ pH 6,95, плюс 25% изопропанола) и запускали прогон на 15 минут при скорости 0,5 мл/мин с использованием следующего градиента (Таблица D):

Таблица D: Градиент HIC

Время (мин)	% Буфер А	% Буфер В
0	95	5
0,1	95	5
5	80	20
9,5	65	35
11,5	50	50
12,5	5	95
13,5	5	95
12,6	95	5
15	95	5

[00173] Для каждого образца, хроматограмму HIC интегрировали с помощью соответствующих параметров, которые обеспечивали полное интегрирование каждого пика «от исходного уровня до исходного уровня» с последующим интегрированием каждого пика, показавшего приемлемое разделение. Были идентифицированы пики, соответствующие отдельным видам DAR в образцах. Пик DAR 0 демонстрировал одинаковое время удерживания с «голым» (восстановлено-окисленным) антителом. Для ADC, содержащего вариант с одиночной вставкой цистеина, каждый последующий пик представляет DAR 1 и DAR 2.

[00174] DAR по HIC рассчитывали на основе AUC для отдельных видов DAR (0, 1 и 2):

Расчетный показатель $DAR = (\%AUC_{x0} + \%AUC_{x1} + \%AUC_{x2}) / 100$

[00175] Время удерживания HIC (HIC-RRT) для отдельных ADC рассчитывали следующим образом:

$HIC-RRT = RT \text{ целевого DAR} / RT \text{ DAR0}$

[00176] Чтобы свести к минимуму влияние кэпирования антител цистеином на HIC-RRT, RT DAR0 относится к времени удерживания восстановлено-окисленного антитела без конъюгации с полезной нагрузкой. Каждый вариант имеет свой собственный DAR0 RT для расчета HIC-RRT.

5. Аналитическая эксклюзионная хроматография (SEC)

[00177] Для аналитических прогонов SEC, колонку Agilent Advance Bio SEC (300 Å, 2,7 мкм, 7,8×150 мм) (Agilent Technologies, Inc., Санта-Клара, штат Калифорния; серийный номер 6377910-24) уравнивали 5 объемами колонки с буфером А (150 мМ Na_xPO₄, pH 6,95) при комнатной температуре. Обычно 20-30 мкг образца с концентрацией 2-3 мг/мл загружали в колонку и запускали в прогон на 7 минут со скоростью 1 мл/мин в изократическом режиме и регистрировали поглощение при 280 нм. Для каждого образца, хроматограмму интегрировали, чтобы обеспечить полную интеграцию каждого пика «от

исходного уровня до исходного уровня» с приемлемым разделением между частично разрешенными пиками. Пик, соответствующий основному компоненту IgG (приблизительное время удерживания 3,3 мин), регистрировали как мономер на основании профиля SEC контрольного антитела IgG1, трастузумаба. Любой пик, возникающий до 3,3 мин, обозначался как HMWS, а любой пик, возникающий после 3,3 мин, обозначался как LMWS, с исключением пиков растворителя (более 5,2 мин).

6. Жидкостная хроматография/масс-спектрометрия (LC-MS)

[00178] Для DAR посредством LC-MS, ADC разводили до концентрации 1 мг/мл в PBS, pH 7,4, затем дегликозилировали. Для дегликозилирования обычно использовали 1 мкг EndoS на каждые 10 мкг ADC и реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение часа. Образцы восстанавливали путем добавления 3 мкл 500 мМ ТСЕР к каждому образцу объемом 10 мкл с последующей инкубацией при 70°C в течение часа. Наконец, образцы запускали в прогон на квадрупольной время пролетной системе (QTOF) LC-MS (Agilent 1290 HPLC, подключенной к QTOF Agilent 6545; Agilent Technologies, Inc., Санта-Клара, штат Калифорния), вводя по 1 мкл каждого образца. Подробная процедура описана ниже.

Колонка: PLRP-S 1000Å, 8 мкм, 50×2,1 мм (Agilent Technologies, Inc., Санта-Клара, штат Калифорния)

Подвижная фаза C: 0,1% муравьиной кислоты, 0,025% трифторуксусной кислоты и 10% изопропилового спирта в H₂O

Подвижная фаза D: 0,1% муравьиной кислоты и 10% изопропилового спирта в ацетонитриле.

Обнаружение: сигнал A (280 нм, ширина полосы 4,0), сигнал B (220 нм, ширина полосы 4,0)

Градиент:

Время (мин)	Буфер C	Буфер D
0	80	20
20	60	40
22	10	90
22,5	1	99
24	1	99

Время пост прогона: 2 минуты

7. Капиллярный электрофорез-SDS (CE-SDS)

[00179] Первоначально все образцы разбавляли до концентрации 1 мг/мл перед подготовкой образцов в 96-луночной планшете для PCR в соответствии с протоколом производителя (Protein Express Assay LabChip™; PerkinElmer, Inc., Уолтем, штат Массачусетс). Вкратце, 2 мкл ADC смешивали с 7 мкл буфера Protein Express в присутствии или в отсутствие 400 мМ дитиотреитола (DTT) в качестве восстановителя, с последующей

тепловой денатурацией при 95°C в течение 5 минут. Затем перед сбором данных образцы разбавляли dH₂O в соотношении 1:2. После каждого прогона CE-SDS, гель и соответствующую электрофореграмму анализировали с помощью LabChip™ Reviewer (PerkinElmer, Inc., Уолтем, штат Массачусетс).

ПРИМЕР 1: ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ САЙТОВ ВСТАВКИ ЦИСТИНА С ПОМОЩЬЮ КОНСТРУИРОВАНИЯ *in silico*

[00180] Идентификацию предполагаемых сайтов вставок цистеина в IgG1 проводили на траекториях молекулярной динамики (MD) с явным растворителем для молекулы модели Fab (полученной из PDB ID 1JPT, D3H44) и модели Fc (полученной из PDB ID 1E4K) в соответствии со следующими руководящими критериями:

Исключение CDR

Предотвращение наличия вторичных структур

Относительная доступная для растворителя площадь поверхности (SASA): rSASA > 30%

Предотвращение вмешательства в связывание белка A и FcRn

[00181] Затем положения были помечены в соответствии с rSASA и среднеквадратичной флуктуацией (RMSF) следующим образом:

Тип 1: желательный rSASA (30-60%) и подвижный (RMSF выше среднего +1 порог стандартного отклонения (SD))

Тип 2: желательный rSASA (30-60%), но упорядоченный (RMSF ниже среднего +1SD порога)

Тип 3: открытый (rSASA >60%) и подвижный (RMSF выше среднего +1SD порога)

Тип 4: открытый rSASA (rSASA >60%), но упорядоченный (RMSF ниже среднего +1SD порога)

[00182] Сайты вставки цистеина («дизайны») в фазе 1 были предложены на основе полурационального подхода, ориентированного на структуру. Предполагаемые сайты вставки были ранжированы на основе их риска (вмешательство в функцию других известных лигандов и дисульфидного скремблирования), окружающей среды (метка Типов 1-4, как описано выше) и предполагаемой вероятности структурного воздействия и стабильности конъюгации. Всего в Фазе I было предложено 13 дизайнов, в которых использовались образцы различных структурных областей IgG1.

[00183] Фаза 2 включала проведение экспериментов по моделированию для каждой отдельной предполагаемой вставки цистеина и выбор вариантов на основе параметров, рассчитанных на основе траекторий молекулярной динамики (MD) с неявным растворителем для смоделированных вставок. Вкратце, каждая представляющая интерес петля (n остатков) была удалена, а $n+1$ петля из депонированной структуры в RCSB PDB (Научно-исследовательская совместная лаборатория структурной биоинформатики - банк данных белков) была привита на ее место на основе наименьшего среднеквадратичного отклонения (RMSD) с закреплением граничных остатков. Затем каждую петлю мутировали для соответствия исходной последовательности остатком цистеина, вставленным в каждое

соответствующее положение. Для каждой модели с привитой петлей была рассчитана траектория MD с неявным растворителем, и дизайны были ранжированы в соответствии с параметрами и критериями, описанными в Таблице 1.1 ниже.

[00184] В тех немногих случаях, когда алгоритм прививания петель не смог обеспечить решение, дизайны из этих петель выбирали по методологии, описанной для дизайнов Фазы 1. Всего в результате этого процесса было создано 32 варианта: 13 вариантов в Фазе 1 и 19 вариантов в Фазе 2.

Таблица 1.1: Параметры и критерии ранжирования дизайнов

Метрика	Ожидаемый диапазон или поведение	Коррелирует с	Релевантность
CYS pKa	>9,5 предпочтительно 9,0-9,5 приемлемо	Стабильность конъюгатов	Высокая
Визуальный контроль	Положение закрепленных остатков Достоверность конформации трансплантата Вероятность поражения вторичных структур Экспозиция/захоронение полярных/аполярных остатков	Стабильность белка Достоверность показателей	Высокая
CYS SASA	rSASA: оптимальный диапазон ~10-50%. SASA: <60Å	Эффективность конъюгации Стабильность конъюгатов	Средняя
Петля на остаток RMSF	Остатки в середине петли более подвижны, чем остатки вблизи закрепленной петли, по оценке RMSF.	Стабильность белка Эффективность конъюгации	Средняя

	RMSF < 1: очень жесткий		
Amber_складывание	Сравнение внутренних петель Меньшее значение: более стабильный	Стабильность белка	Низкая
Средний суммарный заряд Наличие +ve остатка	В целом негативно заряженная среда предположительно предпочтительнее Наличие заряда +ve рядом с CYS-связью предположительно полезно	Стабильность конъюгатов	Низкая

ПРИМЕР 2: ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ ИСХОДНЫХ ВАРИАНТОВ *in vitro*

[00185] 32 варианта из Примера 1 вместе с контролями, продемонстрированными в Таблице 2.1, были клонированы и экспрессированы, как описано в Общей процедуре 1. В эту исходную характеристику также были включены две дополнительные конструкции: v27321 и v27322. Эти два варианта включают вставку цистеина до и после положения K149 соответственно. Ранее была описана замена цистеина в положении K149 (Vollmar, *et al.*, 2017, *Bioconjug Chem*, 28(10):2538-2548).

[00186] Во всех примерах для мутаций со вставкой цистеина используется следующая номенклатура. Нумерация положений - по Kabat для области Fab (VH, VL, CH1 и CL) и EU для области Fc (CH2 и CH3). Все вставки цистеина пронумерованы на основе остатка, предшествующего вставке, со ссылкой на немодифицированную тяжелую цепь (H) или легкую цепь (L), за которой следует «.5». Например, L_K149.5C указывает на цистеин, вставленный после остатка Lys 149 в легкой цепи.

Таблица 2.1: Контроли и дополнительные варианты для исходной характеристики *in vitro*

Вариант	Вставка/Замена ¹	Домен	Описание
v22758	H_A114C	Fab/CH1	Контроль (THIOMAB™) Замена цистеина ²
v29008	H_S239C	Fc/CH2	Контроль Замена цистеина ³

v29013	H_S239.5C	Fc/CH2	Контроль Вставка цистеина
v27320	L_K149C	Fab/CL	Контроль Замена цистеина ⁴
v27323	H_A138C	Fab/CH1	Контроль Замена цистеина
v27321	L_W148.5C	Fab/CL	Вставка цистеина
v27322	L_K149.5C	Fab/CL	Вставка цистеина

¹ H=тяжелая цепь; L=легкая цепь

² Junutula, *et al.*, 2008, *Nature Biotechnology*, 26:925-932

³ Sussman, *et al.*, 2018, *Protein Engineering, Design and Selection*, 31(2): 47-54

⁴ Vollmar, *et al.*, 2017, *Bioconjug Chem*, 28(10):2538-2548

[00187] Затем каждое антитело конъюгировали с MTvcСоединением 1 или MCvcPABC-MMAE, как описано в Общей процедуре 2. Предварительную характеристику *in vitro* каждого антитела и ADC проводили, как описано в Общих процедурах 3-6. Варианты ранжировали по следующим критериям:

DSC: разница Tm от родительского антитела определяется как

Без изменений (0 °C ≤ разница Tm ≤ 3 °C)

Низкая (3 °C < разница Tm ≤ 8 °C)

Высокая (разница Tm > 8 °C) высокая

Выход антитела при одной трансфекции объемом 500 мл в клетках CHO

Соотношение лекарственное средство-антитело DAR (MS), определенное методом LC-MS.

Соотношение лекарственное средство-антитело DAR (HIC), определяемое методом HIC

Относительное время удерживания (RRT D2/D0), рассчитанное путем деления времени удерживания HIC видов DAR 2 на время удерживания HIC видов DAR 0.

[00188] Для дальнейшей характеристики были выбраны 10 вариантов, продемонстрировавших наиболее благоприятные характеристики. Свойства, определенные на основе предварительной характеристики этих 10 вариантов и 5 контрольных вариантов, продемонстрированы в Таблице 2.2.

Таблица 2.2: Предварительная характеристика вариантов и ADC

Вариант	Вставка/ Замена	Фаза	Домен	Петля	DTm (от DSC)	Выход (мг)	MCvcPABC- MMAE			MTvcСоединение 1		
							DA R (MS)	DA R (HIC)	RRT (D2/D0)	DA R (MS)	DA R (HIC)	RR T (D2/D0)
v22758	H_A114C	Контроль	Fab/CH1	--	Без изменений	6	1,7	1,6	1,36	1,7	1,7	1,1
v29008	H_S239C	Контроль	Fc/CH2	--	Без изменений	5,32	1,5	1,2	1,29	1,7	1,7	1,08
v29013	H_S239.5C	Контроль	Fc/CH2	--	Высокая	10,91	1,9	1,9	1,2	1,8	2	1,01
v27320	L_K149C	Контроль	Fab/CL	--	Без изменений	4,29	0,9	1	1,58	1,3	1	1,14
v27323	H_A138C	Контроль	Fab/CH1	--	Без изменений	8,84	0,9	0,9	1,36	0,8	1,0	1,09
v22760 ¹	L_K39.5C	1	Fab/VL	L3	Низкая	1,6	2	1,6	1,16	1,9	1,8	1,04
v22761 ¹	L_K126.5C	1	Fab/CL	L8	Без изменений	2,8	1,6	2	1,36	1,4	1,8	1,08
v22765	H_G237.5C	1	Fc/CH2	FC1	Без изменений	11,5	1,8	1,8	1,35	1,8	1,7	1,08
v22768	H_Q295.5C	1	Fc/CH2	FC6	Без изменений	2,3	1,9	1,5	1,36	1,7	1,5	1,12
v28983	L_P40.5C	2	Fab/VL	L3	Без изменений	2,54	2	1,8	1,17	2	1,8	1,04

v289 89	H_A9.5 C	2	Fab/ VH	H1	Без измене ний	6,48	1,8	1,9	1,16	1,9	2	1,06
v289 93	H_G169 .5C	2	Fab/ CH1	H9a	Без измене ний	13,7 5	1,9	1,8	1,48	1,9	1,9	1,14
v290 01	H_T299 .5C	2	Fc/C H2	FC6	Низкая	5,76	2	2	1,05	2	2	1,02
v273 22	L_K149 .5C	2	Fab/ CL	--	Без измене ний	0,94	1,9	1,8	1,41	2	1,8	1,08
v273 21 ²	L_W14 8.5C	2	Fab/ CL	--	ND ³	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

¹ Вариант включал пептид ESSCDVKLV [SEQ ID NO:2], слитый с С-концевым остатком легкой цепи

² v27321 имел ограниченную экспрессию

³ ND=не определено

[00189] Примеры профилей НИС для одного варианта (v29001 (H_T299.5C)) и контрольного варианта (v29013 (H_S239.5C)), конъюгированного с MCvcPABC-ММАЕ или MTvcСоединение 1, продемонстрированы на Фиг. 13 и 14 соответственно. Профили DSC для тех же двух вариантов (неконъюгированных) продемонстрированы на Фиг. 15.

[00190] Видно, что профили НИС для контрольного варианта v29013 (H_S239.5C) состоят из нескольких пиков, указывающих на присутствие множества видов (Фиг. 13А и 14А), тогда как профили НИС для варианта v29001 (H_T299.5C) демонстрируют одиночный мономерный пик (Фиг. 13В и 14В). Также на Фиг. 14 продемонстрировано, что конъюгат MTvcСоединение 1, полученный с применением варианта v29001, оказался менее гидрофобным (меньшее значение НИС-RRТ), чем конъюгат MTvcСоединение 1, полученный с контрольным вариантом v29013. Профили DSC на Фиг. 15 демонстрируют, что более выраженная дестабилизация наблюдалась для контрольного варианта v29013 (Tm для домена СН2 составляет 62°C), чем для варианта v29001 (Tm для домена СН2 составляет 65°C). Tm для домена СН3 для обоих этих вариантов была очень схожей, что подтверждает, что вставка цистеина не влияет на стабильность этого домена.

ПРИМЕР 3: ПРИГОТОВЛЕНИЕ КОНЬЮГАТОВ «АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО», СОДЕРЖАЩИХ ВАРИАНТЫ СО ВСТАВКОЙ ЦИСТЕИНА

[00191] Каждый из 10 вариантов, продемонстрированных в Таблице 2.2, вместе с двумя контрольными, v22758 (H_A114C) и v29013 (H_S239.5C), конъюгировали с тремя

различными структурами «лекарственное средство-линкер» (MTvcСоединение 1, MCvcPABC-ММАЕ и MCvcPAB-тубулизин М; см. Фиг. 1) в соответствии с Общей процедурой 2.

[00192] Полученные 36 ADC были охарактеризованы с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC), эксклюзионной хроматографии (SEC), жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC-MS), капиллярного электрофореза SDA (CE-SDS) и анализа связывания на клетках, как описано в Примерах 4-8.

ПРИМЕР 4: ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ *in vitro* - ХРОМАТОГРАФИЯ ГИДРОФОБНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

[00193] ADC из Примера 3 были охарактеризованы с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC), как описано в Общей процедуре 4. HIC позволяет разделять различные белки на основе присущей им гидрофобности, а поскольку это неденатурирующий метод, HIC позволяет разделять различные виды DAR, содержащиеся в данном ADC. HIC также является пригодным методом ранжирования ADC на основе их относительного времени удерживания (RRT). Поскольку гидрофобные ADC могут быстрее выводиться из кровообращения *in vivo*, значения HIC-RRT являются потенциально ценным биофизическим параметром для определения наиболее полезных сайтов вставки цистеина.

[00194] HIC использовали для определения DAR для всех ADC, конъюгированных с MTvcСоединение 1, MCvcPABC-ММАЕ и MCvcPAB-Тубулизин М, а также HIC-RRT для всех ADC, конъюгированных с MTvcСоединение 1 и MCvcPABC-ММАЕ. Результаты приведены в Таблицах 4.1 и 4.2.

Таблица 4.1: Значения DAR, определенные с помощью HIC

Вариант	Положение вставки/замены	Лекарственное средство-Линкер		
		MTvcСоединение 1	MCvcPABC-ММАЕ	MCvcPAB-Тубулизин М
v22760 ¹	L_K39.5C	1,8	1,7	1,7
v22761 ¹	L_K126.5	1,7	1,7	1,7
v22765	H_G237.5C	1,5	1,7	1,5
v22768	H_Q295.5C	1,5	1,4	1,4
v27321	L_W148.5C	1,7	1,6	1,7
v27322	L_K149.5C	1,6	1,7	1,7
v28983	L_P40.5C	1,8	1,7	1,8
v28989	H_A9.5C	2,0	1,8	1,9

v28993	H_G169.5C	1,7	1,8	1,8
v29001	H_T299.5C	2,0	2,0	2,0
v22758 (контроль)	H_A114C	1,7	1,6	1,7
v29013 (контроль)	H_S239.5C	2,0	1,9	1,9

¹ Вариант включал пептид ESSCDVKLV [SEQ ID NO:2], слитый с С-концевым остатком легкой цепи.

Таблица 4.2: Значения HIC-RRT

Вариант	Положение вставки/замены	Лекарственное средство-Линкер	
		MTvcСоединение 1	MCvcPABC-MMAE
v22760 ¹	L_K39.5C	1,09	1,16
v22761 ¹	L_K126.5	1,12	1,36
v22765	H_G237.5C	1,14	1,35
v22768	H_Q295.5C	1,18	1,36
v27321	L_W148.5C	1,15	ND ²
v27322	L_K149.5C	1,15	1,41
v28983	L_P40.5C	1,09	1,18
v28989	H_A9.5C	1,10	1,16
v28993	H_G169.5C	1,19	1,48
v29001	H_T299.5C	1,03	1,05
v22758 (контроль)	H_A114C	1,15	1,36
v29013 (контроль)	H_S239.5C	1,08	ND

¹ Вариант включал пептид ESSCDVKLV [SEQ ID NO:2], слитый с С-концевым остатком легкой цепи.

² ND=не определено из-за слабого разделения видов DAR.

[00195] В целом все ADC продемонстрировали диапазон DAR от 1,4 до 2,0. Один вариант, v29001, при конъюгации с каждой из трех структур «лекарственное средство-

линкер» продемонстрировал одиночный пик на НИС с полной нагрузкой DAR 2.0 в каждом случае. Вариант v22768 продемонстрировал самую низкую нагрузку лекарственным средством, всего 1,4-1,5 для каждой структуры «лекарственное средство-линкер». Ожидалось, что эффективность конъюгации будет зависеть от сайта из-за влияния тиоловой pKa, SASA и местной окружающей среды вставленного цистеина, и это отражалось в значениях DAR (Таблица 4.1).

[00196] Структура «лекарственное средство-линкер», MTvcСоединение 1, является относительно гидрофильной. Конъюгация этой структуры «лекарственное средство-линкер» с любым из вариантов с сайт-специфической вставкой цистеина оказывала минимальное влияние на время удерживания по данным НИС. Для большинства вариантов, конъюгированных с MTvcСоединение 1, значения НИС-RRT были ниже 1,15, что также соответствовало наблюдаемому значению НИС-RRT для контрольного ADC v22758, конъюгированного с той же структурой «лекарственное средство-линкер». Два варианта, v22768 и v28993, конъюгированные с MTvcСоединение 1, продемонстрировали немного более высокие значения НИС-RRT, чем контрольный v22758, конъюгированный с той же структурой «лекарственное средство-линкер»: 1,18 и 1,19 соответственно. Вариант v29001, конъюгированный с MTvcСоединение 1, оказался менее гидрофобным, чем оба контроля (v22758 и v29013), конъюгированные с той же структурой «лекарственное средство-линкер».

[00197] Структура «лекарственное средство-линкер», MCvcPABC-MMAE, является более гидрофобной, чем структура MTvcСоединение 1, и, следовательно, значения НИС-RRT для всех ADC, содержащих MCvcPABC-MMAE, были выше, чем для соответствующих конъюгатов MTvcСоединение 1. В целом для конъюгатов MCvcPABC-MMAE наблюдалась аналогичная тенденция, как и для конъюгатов MTvcСоединение 1: v28993, конъюгированный с MCvcPABC-MMAE, продемонстрировал самое высокое значение НИС-RRT, а v29001, конъюгированный с MCvcPABC-MMAE, продемонстрировал самое низкое значение НИС-RRT (1,05). Для одного варианта, v27321, конъюгированного с MCvcPABC-MMAE, а также для контрольного v29013, конъюгированного с той же структурой «лекарственное средство-линкер», значения НИС-RRT не удалось определить из-за слабого разрешения профилей НИС для каждого из этих двух ADC.

ПРИМЕР 5: ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ *in vitro* - ЭКСКЛЮЗИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

[00198] ADC из Примера 3 дополнительно характеризовали с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC). SEC является пригодным методом для оценки размера белков и определения присутствия агрегированных/высокомолекулярных частиц (HMWS) и фрагментации/низкомолекулярных частиц (LMWS) в препарате белка.

[00199] Во время приготовления ADC любое неправильное окисление, возникающее в результате образования дисульфидной связи через вставленные остатки цистеина, может привести к образованию конкатемеров и других HMWS. Чтобы исследовать молекулярный размер и относительную распространенность различных видов, каждый из ADC

анализировали с помощью SEC, как описано в Общей процедуре 5.

[00200] Результаты приведены в Таблице 5.1.

Таблица 5.1: Процент мономеров, HMWS и LMWS в препаратах ADC, определенный методом HPLC-SEC

Вариант	Положение вставки/замены	Лекарственное средство-Линкер								
		MTvcСоединение 1			MCvcPABC-MMAE			MCvcPAB-Тубулизин М		
		Мономер %	HMWS %	LMWS %	Мономер %	HMWS %	LMWS %	Мономер %	HMWS %	LMWS %
v22760 ¹	L_K39.5C	99	1	0	98	1	1	97	1	2
v22761 ¹	L_K126.5	99	1	0	99	1	0	97	1	1
v22765	H_G237.5C	98	1	1	97	1	2	97	1	2
v22768	H_Q295.5C	94	6	0	97	3	0	97	3	0
v27321	L_W148.5C	99	1	0	99	1	0	99	1	0
v27322	L_K149.5C	94	3	2	96	2	2	93	2	5
v28983	L_P40.5C	98	1	1	98	1	1	97	1	2
v28989	H_A9.5C	99	1	0	98	1	1	99	1	0
v28993	H_G169.5C	96	1	3	96	1	3	94	2	4
v29001	H_T299.5C	99	1	0	97	1	3	92	1	7
v22758 (контроль)	H_A114C	95	1	4	97	1	2	97	1	2

v29013 (контроль)	H_S239.5 С	99	1	0	97	1	1	99	1	0
----------------------	---------------	----	---	---	----	---	---	----	---	---

¹ Вариант включал пептид ESSCDVKLV [SEQ ID NO:2], слитый с С-концевым остатком легкой цепи.

[00201] Как видно из Таблицы 5.1, все препараты ADC содержали >90% мономера по данным HPLC-SEC. В целом, ADC, содержащие структуру «лекарственное средство-линкер» MTvcСоединение 1, продемонстрировали самое высокое содержание мономера, за исключением варианта v22768, который продемонстрировал самое высокое содержание HMWS (6%) и самое низкое содержание мономера (94%) для конъюгатов MTvcСоединение 1. Контрольный ADC, v22758 (A114C), конъюгированный с MTvcСоединение 1, продемонстрировал содержание мономера 95%.

[00202] ADC, содержащие структуру «лекарственное средство-линкер» MCvcPABC-MMAE, продемонстрировали аналогичную тенденцию с ADC, содержащими MTvcСоединение 1, с диапазоном мономеров от 97% до 99%, с низкими количествами HMWS и LMWS.

[00203] Напротив, ADC, содержащие структуру «лекарственное средство-линкер» MCvcPAB-Тубулизин М, продемонстрировали более низкое содержание мономеров, чем ADC, содержащие любую из двух других структур «лекарственное средство-линкер». ADC, v29001-MCvcPAB-Тубулизин М, продемонстрировал самое низкое содержание мономеров (92%) и самое высокое содержание LMWS (7%) среди всех протестированных ADC.

ПРИМЕР 6: ХАРАКТРИЗАЦИЯ *in vitro* - ЖИДКОСТНАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ (LC-MS)

[00204] ADC из Примера 3 дополнительно характеризовали с помощью жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC-MS), как описано в Общей процедуре 6.

[00205] LC-MS представляет собой стандартный аналитический метод измерения соотношения лекарственное средство-антитело (DAR) и распределения лекарственной нагрузки в ADC. Общая процедура измерения DAR на основе LC-MS на интактном уровне ADC включает в себя деконволюцию масс-спектров до серии масс с «нулевым зарядом», а затем получение распределения DAR или вычисление среднего DAR путем интегрирования и взвешивания площади спектрального пика или интенсивности пика.

[00206] Для анализа ADC из Примера 3 перед анализом LC-MS ADC дегликозилировали путем обработки EndoS, которая удалила все присоединенные углеводные фрагменты, за исключением восстанавливающего концевой N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) и фукозы (Fuc). Некоторые из ADC также были обработаны IdeS, протеазой, которая расщепляет непосредственно после шарнирного цистеина в положении ²³⁶G-G²³⁷ тяжелой цепи. В результате восстановления образцов, обработанных IdeS, получили три разных вида: Fc/2, Fd и LC. Определение DAR с помощью MS для образцов, обработанных IdeS, еще больше повысило точность измерения DAR и

предоставило дополнительную структурную информацию об ADC.

[00207] Средние значения DAR, определенное методом LC-MS для каждого из ADC, приведено в Таблице 6.1.

Таблица 6.1: Значения DAR, определенные методом LC-MS

Вариант	Положение вставки/замены	Лекарственное средство-Линкер		
		MTvcСоединение 1	MCvcPABC-MMAE	MCvcPAB-Тубулизин М
v22760 ¹	L_K39.5C	1,9	2,0	2,0
v22761 ¹	L_K126.5	1,8	1,8	1,8
v22765	H_G237.5C	1,7	1,8	1,8
v22768	H_Q295.5C	2,0	2,0	1,9
v27321	L_W148.5C	1,8	1,8	1,8
v27322	L_K149.5C	1,8	1,9	1,9
v28983	L_P40.5C	2,0	2,0	2,0
v28989	H_A9.5C	1,9	1,9	1,9
v28993	H_G169.5C	1,9	1,9	1,9
v29001	H_T299.5C	2,0	2,0	2,0
v22758 (контроль)	H_A114C	1,8	1,7	1,7
v29013 (контроль)	H_S239.5C	2,0	2,0	1,9

¹ Вариант включал пептид ESSCDVKLV [SEQ ID NO:2], слитый с С-концевым остатком легкой цепи.

[00208] Как показано в Таблице 6.1, значение DAR для ADC, определенное с помощью LC-MS, находилось в диапазоне от 1,7 до 2,0, что указывает на то, что все три структуры «лекарственное средство-линкер» имели одинаковую эффективность конъюгации. Какой-либо обнаруживаемой конъюгации шарнирных или межцепочечных дисульфидных остатков цистеина не наблюдалось.

[00209] В целом, значение DAR, определенное с помощью LC-MS, хорошо коррелирует со значением DAR, полученным с помощью HIC (см. Таблицу 4.1). Например, вариант v29001 при конъюгации с каждой из трех структур «лекарственное средство-

линкер» продемонстрировал DAR 2 как по данным LC-MS, так и по измерениям HIC. Для вариантов v27321 и v29013, конъюгированных с MCvcPABC-MMAE, расчет DAR с помощью HIC оказался неудачным из-за слабого разделения соответствующих пиков. Однако значение DAR для этих двух ADC было успешно определено методом LC-MS (DAR 1,8 и 2,0 соответственно).

ПРИМЕР 7: ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ *in vitro* - КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ-SDS (CE-SDS)

[00210] Каждый из ADC из Примера 3 анализировали с помощью капиллярного электрофореza-SDS (CE-SDS) в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, как описано в Общей процедуре 7, чтобы оценить чистоту образцов.

[00211] В восстанавливающих условиях межцепочечные дисульфидные связи в антителе ADC восстанавливаются с образованием соответствующих тяжелых цепей (HC) и легких цепей (LC), которые можно разделить за счет разницы в их молекулярных массах. Напротив, в невосстанавливающих условиях антитело остается интактным и может быть отделено от любых частичных антител или фрагментов антител, а также от любых конкатемеров. Интактный полноразмерный IgG1 (2H-2L) имеет наибольшую молекулярную массу примерно 150 кДа, за ним следуют фрагменты 2H-L, HH, HL, H, L с молекулярной массой примерно 125, 100, 75, 50 и 25 кДа. соответственно. Неполное или частичное окисление антитела во время приготовления ADC приведет к присутствию некоторых или всех этих LMWS в образце, тогда как чрезмерное окисление приведет к образованию конкатенированных цистеин-цистеиновых олигомерных HMWS.

[00212] Полученные результаты приведены на Фиг. 2. Следует обратить внимание, что интактные невосстановленные ADC, включая неконъюгированный контроль (v17427), продемонстрировали MW ~ 160 кДа (как показано на Фиг. 2 (A)), а не расчетные 150 кДа. Это несоответствие, вероятно, связано либо с влиянием связывающих красителей, используемых в протоколе LabChip™, на пептидные связи, либо с присущими ограничениями точности оборудования (точность размера $\pm 20\%$, согласно протоколу производителя). Аналогичным образом, все восстановленные образцы, включая неконъюгированный контроль (v17427), продемонстрировали MW ~28 кДа для LC и ~64 кДа для HC, что немного выше расчетных значений ~23 кДа и 50 кДа соответственно (см. Фиг. 2(B)).

[00213] Сравнение всех 36 ADC, продемонстрированных на Фиг. 2, с неконъюгированным контролем (v17427) показывает, что этапы восстановления-окисления в протоколе конъюгации были успешными и что каждое антитело повторно сворачивалось в исходную полноразмерную конформацию перед конъюгацией со структурой «лекарственное средство-линкер».

ПРИМЕР 8: АНАЛИЗ СВЯЗЫВАНИЯ АНТИГЕНА НА КЛЕТКЕ МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

[00214] Кажущуюся аффинность связывания ADC из Примера 3 с их мишенью c-Met, как в виде «голых» антител, так и в виде конъюгатов, оценивали с помощью проточной

цитометрии, как описано ниже, и сравнивали с аффинностью связывания контрольного неконъюгированного родительского антитела (v17427).

[00215] Клетки из линии клеток EBC-1 с высокой экспрессией c-Met (4 миллиона рецепторов на клетку) (XenoTech, LLC, Ленокса, штат Канзас) высевали по 25 000 клеток на лунку с минимальным объемом посева 100 мкл. Вкратце, прикрепившиеся клетки EBC-1 отделяли от своих культуральных сосудов с использованием буфера для диссоциации клеток и высевали в 96-луночные планшеты по 25 000 клеток/лунку. Клетки выдерживали на льду в течение 10 минут, осаждали центрифугированием при 400 g x 3 минуты и супернатант удаляли, встряхивая перевернутый планшет. Осадок клеток хранили на льду. Тестируемые образцы титровали в холодном буфере FACS и клетки обрабатывали 50 мкл назначенной обработки на лунку; планшет для анализа, покрывали парафиновой пленкой и инкубировали в течение ночи при 4°C. Затем клетки промывали, инкубировали с вторичным A647-козьим антителом против человеческого Fc (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Вест-Гроув, штат Пенсильвания) в концентрации 2 мкг/мл и снова промывали. Клетки ресуспендировали в 25 мкл буфера FACS и анализировали с использованием высокопроизводительного пробоотборника (HTS) BD LSRFortessa™ (X-20) (BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния). Полученные значения GeoMean затем использовали для построения графика специфического связывания с помощью программного обеспечения Prism 8 (GraphPad Prism Software) и для расчета значений K_D и V_{max} .

[00216] В этом примере все 10 вариантов со вставкой цистеина и оба контроля из Примера 3 оценивали как «голые» антитела и как соответствующие ADC, содержащие структуру «лекарственное средство-линкер» MTvcСоединение 1. Оба контроля и два выбранных варианта со вставкой цистеина, содержащие вставку цистеина либо легкой, либо тяжелой цепи (варианты v27321 и v22765 соответственно), также были протестированы в качестве ADC, содержащих структуру «лекарственное средство-линкер» MCvcPABC-MMAE. Кроме того, контроль v22758 (A114C) и два выбранных варианта со вставкой цистеина, v27321 и v22765, были протестированы в качестве ADC, содержащих структуру «лекарственное средство-линкер» MCvcPAB-Тубулизин М.

[00217] Результаты приведены в Таблице 8.1.

Таблица 8.1: Кажущиеся значения K_D и V_{max} для связывания «голых» антител и ADC с клетками EBC-1¹

Вариант	Положение вставки/замены	Лекарственное средство-Линкер	V_{max}	Кажущееся значение K_d (нМ)
v17427 (родительский)	нет	нет	11163	0,10

v17427 (родительский)	нет	MTvcСоединение 1 (стохастический DAR 4)	12427	0,14
v22758 (контроль)	H_A114C	нет	11348	0,16
v22758 (контроль)	H_A114C	MTvcСоединение 1	9929	0,26
v22758 (контроль)	H_A114C	MCvcPABC-ММАЕ	11742	0,18
v22758 (контроль)	H_A114C	MCvcPAB-Тубулизин М	11960	0,31
v29013 (контроль)	H_S239.5C	нет	10080	0,16
v29013 (контроль)	H_S239.5C	MTvcСоединение 1	9162	0,22
v29013 (контроль)	H_S239.5C	MCvcPABC-ММАЕ	10654	0,21
v22760 ²	L_K39.5C	нет	11907	0,07
v22760 ²	L_K39.5C	MTvcСоединение 1	11557	0,22
v22761 ²	L_K126.5C	нет	10097	0,13
v22761 ²	L_K126.5C	MTvcСоединение 1	11114	0,23
v22765	H_G237.5C	нет	12417	0,21
v22765	H_G237.5C	MTvcСоединение 1	12097	0,20
v22765	H_G237.5C	MCvcPABC-ММАЕ	11161	0,26
v22765	H_G237.5C	MCvcPAB-Тубулизин М	11783	0,23
v22768	H_Q295.5C	нет	12335	0,16
v22768	H_Q295.5C	MTvcСоединение 1	12290	0,23
v27321	L_W148.5C	нет	13536	0,23
v27321	L_W148.5C	MTvcСоединение 1	12086	0,20

v27321	L_W148.5C	MCvcPABC-MMAE	11562	0,25
v27321	L_W148.5C	MCvcPAB-Тубулизин М	12695	0,37
v27322	L_K149.5C	нет	14520	0,34
v27322	L_K149.5C	MTvcСоединение 1	12500	0,29
v28983	L_P40.5C	нет	12413	0,19
v28983	L_P40.5C	MTvcСоединение 1	11870	0,20
v28989	H_A9.5C	нет	12111	0,19
v28989	H_A9.5C	MTvcСоединение 1	12529	0,31
v28993	H_G169.5C	нет	12008	0,17
v28993	H_G169.5C	MTvcСоединение 1	11290	0,22
v29001	H_T299.5C	нет	12112	0,57
v29001	H_T299.5C	MTvcСоединение 1	10222	0,33

¹ Контрольный человеческий IgG не продемонстрировал связывания, как и ожидалось.

² Вариант включал пептид ESSCDVKLV [SEQ ID NO:2], слитый с С-концевым остатком легкой цепи.

[00218] В целом варианты со вставкой цистеина продемонстрировали сравнимое связывание с родительским (v17427) «голым» антителом и ADC, содержащим v17427-MTvcСоединение 1. Однако вариант v29001 и его конъюгат MTvcСоединение 1 демонстрировали более низкое связывание (более высокое значение K_d , в 5 раз) по сравнению с контролем v17427.

[00219] Все ADC в целом демонстрировали очень схожее связывание со своими аналогами «голыми» антителами. ADC, содержащие MTvcСоединение 1, варианта v29001 со вставкой цистеина и контроль v22758, демонстрировали несколько меньшее значение V_{max} , чем их соответствующие аналоги «голые» антитела.

[00220] Контроль v29013 (S239.5), как в виде «голового» антитела, так и в виде ADC с любой структурой «лекарственное средство-линкер», демонстрировал более низкие значения V_{max} по сравнению с родительским антителом (v17427).

[00221] В целом, этот пример демонстрирует, что, за исключением варианта v29001, ADC, содержащие варианты со вставками цистеина, не проявляют дифференциального связывания по сравнению с их аналогами «голыми» антителами, а также демонстрируют сравнимое связывание с родительским антителом. Однако связывание, продемонстрированное ADC, содержащим вариант v29001, все еще находилось в пределах диапазона, аналогичного связыванию соответствующих ADC, содержащих контроли

v22758 и v29013.

ПРИМЕР 9: ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ *in vitro*

[00222] Цитотоксичность ADC из Примера 3, содержащих либо MCvcPABC-MMAE, либо MTvcСоединение 1, тестировали *in vitro* против различных линий опухолевых клеток, экспрессирующих целевой поверхностный антиген (с-Met), как описано ниже. Использовали следующие клеточные линии (Таблица 9.1).

Таблица 9.1: Клеточные линии, использованные для анализа цитотоксичности

Клеточная линия	Тип опухоли	Уровень экспрессии с-Met	Плотность посева (клеток/лунку)	Инкубация (дни)
ЕВС-1	Карцинома легкого	Высокий	1500	4
BT-20	Карцинома молочной железы	Низкий	1000	4
HCC827	Карцинома легкого	Средний	700	4
H292	Карцинома легкого	Средний	700	4

[00223] Каждую из клеточных линий, продемонстрированных в Таблице 9.1, выращивали в соответствующей полной питательной среде до дня анализа. После удаления из культуральных сосудов с использованием трипсина-EDTA клетки подсчитывали с помощью счетчика клеток Scepter™ (Sigma-Aldrich Canada, Оквилл, Онтарио). Клетки разводили в полной питательной среде до 20000 клеток/мл, так что 50 мкл/лунку в 384-луночных планшетах соответствовали 1000 клеток/лунку, если не указано иное. Все ADC разводили до начальной концентрации 15 нМ в полной питательной среде (RPMI 1640) с последующим разведением 1:3 в стерильных 96-луночных планшетах для разведения (конечный объем 200 мкл/лунку). Образцы (20 мкл/лунку) переносили в 384-луночный планшет в двух повторностях. Затем планшеты засевали суспензией тестируемой клеточной линии с концентрацией 20 000 клеток/мл (50 мкл/лунку), если не указано иное. Клеткам давали осесть на дне лунок, оставляя их при комнатной температуре на 5-10 минут с последующей инкубацией при 37 °C/5% CO₂ в течение 4 ночей. После инкубации жизнеспособность клеток определяли количественно путем добавления 1x реагента CellTiter-Glo® (Promega Corporation, Мэдисон, штат Висконсин) в количестве 10 мкл/лунку. После инкубации в темноте в течение 30 минут, люминесценцию измеряли с помощью гибридного многорежимного считывателя Synergy™ H1 (BioTek Instruments Inc., Винуски, штат Вирджиния). Данные анализировали с помощью программного обеспечения Prism 7 (GraphPad Prism Software).

[00224] Результаты приведены в Таблице 9.2.

Таблица 9.2: Значения EC₅₀¹ для ADC в линиях опухолевых клеток, экспрессирующих С-Met

ADC	EC ₅₀ (нМ)			
	ЕВC-1	BT-20	H292	HCC827
ММAЕ (без лекарственного средства)	0,16	0,13	0,11	0,36
v22760 ² -MCvcPABC-MMAE	0,08	IC ³	>15	>15
v22761 ² -MCvcPABC-MMAE	0,08	0,59	>15	>15
v22765-MCvcPABC-MMAE	0,05	2,03	>15	>15
v22768-MCvcPABC-MMAE	0,08	0,82	>15	>15
v27321-MCvcPABC-MMAE	0,07	1,65	>15	>15
v27322-MCvcPABC-MMAE	0,07	1,03	>15	>15
v28983-MCvcPABC-MMAE	0,05	0,64	>15	>15
v28989-MCvcPABC-MMAE	0,08	1,34	>15	>15
v28993-MCvcPABC-MMAE	0,07	8,13	>15	>15
v29001-MCvcPABC-MMAE	0,07	0,64	>15	>15
v22758-MCvcPABC-MMAE (контроль)	0,08	0,58	>15	>15
v29013-MCvcPABC-MMAE (контроль)	0,04	1,27	>15	>15
Соединение 1 (без лекарственного средства)	22,61	16,12	9,17	26,82
v22760 ² -MTvcСоединение 1	0,03	0,16	1,50	0,39
v22761 ² -MTvcСоединение 1	0,04	0,19	0,49	0,71
v22765-MTvcСоединение 1	0,03	0,11	0,46	0,24
v22768-MTvcСоединение 1	0,03	0,12	1,19	0,50
v27321-MTvcСоединение 1	0,03	0,15	1,04	0,85
v27322-MTvcСоединение 1	0,04	0,13	>15	0,47
v28983-MTvcСоединение 1	0,02	0,08	IC	0,44

v28989-MTvcСоединение 1	0,03	0,09	0,39	0,32
v28993-MTvcСоединение 1	0,02	0,11	0,39	0,42
v29001-MTvcСоединение 1	0,03	0,09	0,40	0,31
v22758-MTvcСоединение 1 (контроль)	0,02	0,10	0,65	0,47
v29013-MTvcСоединение 1 (контроль)	0,02	0,07	0,82	0,11
v17427-MTvcСоединение 1 (DAR 2 фракция) (контроль дикого типа)	0,03	0,11	0,77	0,43

¹ n=2

² Вариант включал пептид ESSCDVKLV [SEQ ID NO:2], слитый с С-концевым остатком легкой цепи.

³ IC=Тестируемый образец продемонстрировал цитотоксичность, но полученная кривая не была оптимальной для точного определения EC₅₀

[00225] Как и ожидалось, ADC, содержащие MTvcСоединение 1, продемонстрировали наибольшую эффективность в клеточной линии с высоким уровнем экспрессии с-Met, EBC-1, по сравнению с активностью в клеточных линиях с более низкой экспрессией с-Met. Все ADC, содержащие эту структуру «лекарственное средство-линкер», включая очищенный посредством НИС контроль дикого типа DAR 2 (v17427-MTvcСоединение 1), продемонстрировали EC₅₀ в диапазоне 0,02-0,04 нМ в клеточной линии EBC-1. В клеточной линии BT-20 с низкой экспрессией с-Met более высокая эффективность наблюдалась для вариантов со вставкой цистеина v28993 (EC₅₀ 0,11 нМ), v29001 (EC₅₀ 0,12 нМ), v28983 (EC₅₀ 0,12 нМ), v28989 (EC₅₀ 0,13 нМ), v22765 (EC₅₀ 0,14 нМ) и v27321 (EC₅₀ 0,14 нМ), чем для контроля дикого типа (v17427-MTvcСоединение 1 DAR 2 фракция) (EC₅₀ 0,15 нМ), что указывает на важность сайт-специфической конъюгации по сравнению со стохастической конъюгацией. Все ADC, содержащие структуру «лекарственное средство-линкер» MTvcСоединение 1, продемонстрировали EC₅₀ >15 нМ в клеточной линии H292, экспрессирующей с-MET на среднем уровне. Для клеточной линии HCC827, экспрессирующей с-MET на среднем уровне, варианты со вставкой цистеина, конъюгированные с MTvcСоединение 1, продемонстрировали значения EC₅₀ в диапазоне 0,24-0,71 нМ. Контрольный ADC, v29013 (S239.5), конъюгированный с MTvcСоединение 1, продемонстрировал наибольшую активность *in vitro* (EC₅₀ 0,16 нМ) в этой клеточной линии.

[00226] Для ADC, содержащих MCvcPABC-MMAE, контроль v29013 (S239.5) продемонстрировал наибольшую активность в клеточной линии с высокой экспрессией с-

Met, EBC-1 (EC_{50} 0,04 нМ). Все 10 вариантов со вставкой цистеина, конъюгированных с MCvcPABC-ММАЕ, продемонстрировали активность в диапазоне EC_{50} 0,05-0,09 нМ. В клеточной линии BT-20 с низкой экспрессией с-MET более высокая активность наблюдалась для вариантов со вставкой цистеина v22761 (EC_{50} 0,59 нМ), v29001 (EC_{50} 0,64 нМ), v28983 (EC_{50} 0,64 нМ) и v27322 (EC_{50} 1,03 нМ), конъюгированных с MCvcPABC-ММАЕ, по сравнению с контролем, v29003 (S239.5), конъюгированным с MCvcPABC-ММАЕ (EC_{50} 1,27 нМ). Все ADC, содержащие структуру «лекарственное средство-линкер» MCvcPABC-ММАЕ, продемонстрировали значения $EC_{50} > 15$ нМ в клеточных линиях H292 и HCC827, экспрессирующих с-Met на среднем уровне.

[00227] В целом, этот пример демонстрирует, что активность ADC, содержащих варианты со вставкой цистеина, по-видимому, не зависит от положения индивидуального сайта вставки цистеина.

ПРИМЕР 10: СТАБИЛЬНОСТЬ КОНЬЮГАТОВ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО В ПЛАЗМЕ МЫШИ

[00228] По множеству причин, включая ферментативный метаболизм и ретро-реакции Михаэля, ADC может потерять свою полезную нагрузку во время циркуляции в кровотоке *in vivo*, или полезная нагрузка может быть изменена таким образом, что делает ADC неэффективным. ADC из Примера 3 оценивали с помощью анализа стабильности в плазме мыши, как описано ниже, для определения потери полезной нагрузки (лекарственное средство-линкер).

[00229] ADC разводили в плазме мышей в концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали на водяной бане при 37°C в течение 0, 1, 3 и 7 дней, после чего оценивали потерю лекарственного средства для каждого из них. Образцы извлекали из водяной бани в отмеченные моменты времени и сразу же замораживали при -80 °C. Моменты времени в пределах 24 часов были отдельно подготовлены для ADC, содержащих структуру «лекарственное средство-линкер» MCvcPAB-Тубулизин М. ADC и антитело выделяли методом иммунопреципитации. Образцы сначала дегликозилировали с помощью 250 нг фермента EndoS (2 мкг ADC в 50 мкл PBS) в течение 1 часа при комнатной температуре (КТ). Дегликозилированные ADC затем захватывались на магнитные гранулы стрептавидина (GE Healthcare Life Sciences, Чикаго, штат Иллинойс), предварительно связанные с биотинилированным козьим антителом против человеческого IgG F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., Вест Гроув, штат Пенсильвания), 15 мкг захватывающего антитела на 100 мкл суспензии магнитных гранул на образец, в течение 1,5 часов при КТ. После захвата ADC образцы восстанавливали с помощью 25 мМ DTT (ThermoFisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс) на 100 мкл образца в течение 1 часа при КТ, а затем элюировали в 20 мкл элюирующего буфера (20% ацетонитрила, 1% муравьиной кислоты, в dH₂O) в течение 1 часа при КТ. Контрольный ADC (v22758), введенный в плазму мышей в дозе 2,0 мкг, был включен в качестве контроля для валидации процедуры иммунопреципитации. DAR для каждого образца оценивали с помощью LC-MS, как описано в Общей процедуре 6, чтобы определить величину потери структуры

«лекарственное средство-линкер».

[00230] Помимо потенциальной потери структуры «лекарственное средство-линкер», малеимидное кольцо в линкере потенциально может подвергнуться раскрытию кольца под действием воды, что, в свою очередь, стабилизирует ADC. Открытие малеимидного кольца приведет к увеличению массы ADC на 18 Да. Для всех образцов рассчитывали степень раскрытия малеимидного кольца в дополнение к потере структуры «лекарственное средство-линкер».

[00231] Тубулизин М подвержен метаболизму за счет потери ацетильной группы во время циркуляции в кровотоке. Понимание того, происходит ли этот тип разложения в ADC варианте со вставкой цистеина, дает дополнительную информацию относительно стабильности/экспозиции/доступности соответствующего сайта вставки цистеина. Чтобы оценить, способствует ли какой-либо из сайтов вставки цистеина защите полезной нагрузки Тубулизина М от потери ацетила, контролировали стабильность плазмы и сравнивали с ADC, содержащими контроли v22758 (Тиомаб HC-A114C) и v29013 (S239.5). В общем, % разложения для Тубулизина М ADC рассчитывали как долю всех видов с нагруженным лекарственным средством, потерявших массу ацетильной группы (с раскрытым кольцом и без раскрытого кольца), деленную на сумму всех видов с нагруженным лекарственным средством.

[00232] Результаты исследования стабильности представлены на Фиг. 3, 4 и 5.

[00233] Как видно из Фиг. 3, для ADC, содержащих структуру «лекарственное средство-линкер» MTvcСоединение 1, потеря DAR была одинаковой для большинства вариантов, при этом наибольшее снижение происходило в первые 24 часа и достигало окончательного DAR ~1,6 ко дню 7. Для ADC, содержащих варианты v27322, v29001 и контроль v29013, потеря DAR была почти незначительной в течение всего инкубационного периода. Раскрытие малеимидного кольца для большинства вариантов начиналось с 0-20% и достигало полного раскрытия кольца к 7 дням. ADC, содержащие варианты v22765 и контроль v29013, достигли открытия кольца только на ~70% ко дню 7.

[00234] На Фиг. 4 продемонстрировано, что для ADC, содержащих структуру «лекарственное средство-линкер» MCvcPABC-MMAE, потеря DAR составила ~10% для большинства вариантов в течение инкубационного периода. Наименее стабильными оказались ADC, содержащие варианты v22760 и v22768, которые потеряли 50% DAR за 7 дней. Для MCvcPABC-MMAE ADC раскрытие кольца и потеря DAR не полностью коррелировали: ADC, содержащие варианты v22760 и v22768, продемонстрировали раскрытие кольца ~70%, но также продемонстрировали самые высокие потери DAR. Наиболее стабильными были те ADC, которые содержали контроли v29013 и v22758, а также те, которые содержали варианты со вставкой цистеина v22761, v22765, v27321 и v27322, все из которых продемонстрировали потерю <10% DAR.

[00235] На Фиг. 5 показано, что среди ADC, содержащих структуру «лекарственное средство-линкер» MCvcPAB-Тубулизин М, те, которые содержат варианты v22761, v27321, v27322 и контроль v22758, демонстрируют быстрое разложение Тубулизина М, с

разложением >70% через 24 часа и 100% ко дню 7. Большая часть потерь DAR в ADC, содержащих варианты v22761 и v27321, произошла из-за этого разложения. Наиболее стабильный MCvcPAB-Тубулизин М ADC содержал вариант v29001, который демонстрировал разложение только ~20% в течение 7 дней, умеренное раскрытие кольца и очень небольшую потерю DAR. Разложение в этом ADC было на 5% меньше, чем количество разложения, демонстрируемое контрольным v29013-MCvcPAB-Тубулизин М ADC.

ПРИМЕР 11: ПРИГОТОВЛЕНИЕ DAR-НАСТРОЕННЫХ КОНЬЮГАТОВ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

[00236] ADC, описанные в предыдущих Примерах, имели среднее значение DAR ~2 с одинаковой вставкой цистеина либо в обеих тяжелых цепях (1xcys HC), либо в обеих легких цепях (1xcys LC). В этом Примере вставки цистеина оценивали на предмет потенциальных комбинаций для создания конструкций с более или менее чем двумя вставками остатков цистеина на антитело, что позволяет генерировать ADC, имеющие среднее значение DAR 1, 2 или 3, как описано ниже.

[00237] Конструкции, содержащие одну вставку на молекулу антитела (1xcys Ab), генерировали посредством гетеродимерной сборки тяжелых цепей. Эти конструкции содержали одну тяжелую цепь без какой-либо вставки и одну тяжелую цепь с одним вставленным остатком цистеина (1xcys HC).

[00238] Конструкции, содержащие три вставки на молекулу антитела (3xcys Ab), генерировали посредством гетеродимерной сборки тяжелых цепей. Это было достигнуто либо путем объединения двух легких цепей, каждая из которых имеет одну вставку цистеина (1xcys LC), с одной тяжелой цепью, имеющей одну вставку цистеина (1xcys HC), и одной тяжелой цепью без какой-либо вставки, либо путем объединения одной тяжелой цепи, содержащей одну вставку цистеина (1xcys HC) с одной тяжелой цепью, имеющей две вставки цистеина (2xcys HC).

[00239] Подробная информация представлена в Таблице 11.1.

[00240] Кроме того, конструкции с четырьмя вставленными цистеинами на молекулу антитела (4xCys Ab) могут быть сгенерированы путем объединения двух разных наборов конструкций вставок - либо путем объединения двух легких цепей, имеющих по одной вставке цистеина каждая (1xCys LC), с двумя тяжелыми цепями, имеющими одну вставку цистеина каждая (1xCys HC), либо путем объединения двух тяжелых цепей, имеющих по две вставки цистеина каждая (2xCys HC), или двух легких цепей, имеющих по две вставки цистеина каждая (2xCys LC).

Таблица 11.1: Выбранные сайты вставки цистеина и ожидаемые значения DAR

Вариант (ADC)	Вариант (mAb)	Целевое значение DAR	Сайт вставки цистеина		
			Тяжелая цепь А	Тяжелая цепь В	Легкая цепь (2х)
v34293	v17427 (родительское антитело)	2 (стохастиче ский) ¹	нет	нет	нет
v34276	v33967	1	H_T299.5C	нет	нет
v34277	v33968		H_G237.5C	нет	нет
v34278	v33969		H_A9.5C	нет	нет
v34279	v29001	2	H_T299.5C	H_T299.5C	нет
v34280	v28983		нет	нет	L_P40.5C
v34281	v33970	3	H_T299.5C	нет	L_P40.5C
v34282	v33971		H_G237.5C, H_T299.5C	H_T299.5C	нет
v34284	v33974		H_A9.5C, H_T299.5C	H_T299.5C	нет
v34285	v33977		H_A9.5C	нет	L_P40.5C
v34286	v33979		H_A9.5C, H_G237.5C	H_A9.5C	нет

¹ Конъюгация с лизином

[00241] Антитела получали, как описано в Общей процедуре 1, и каждое антитело конъюгировали с МТvcСоединение 1, как описано в Общей процедуре 2, за исключением v17427, который стохастически конъюгировали с Соединением 1, активированным NHS-эфиром, на остатках лизина при DAR2 с получением ADC v34293.

[00242] Характеризацию каждого полученного «DAR-настроенного» ADC in vitro с помощью HIC, UPLC-SEC, LC-MS и CE-SDS проводили, как описано в Общих процедурах 4-7. Результаты приведены в Таблице 11.2.

Таблица 11.2: Характеризация in vitro DAR-настроенных ADC

Вариант (ADC)	Вариант (mAb)	Целевое значение DAR	HIC RRT	DAR (MS)	UPLC-SEC		
					Мономер %	HMWS %	LMW S %
v34293	v17427 (родительское антитело)	2 (стохастический) ¹	н/д	2,07	95	5	0
v34276	v33967	1	1,02	1,0	99,2	0	0,8
v34277	v33968		1,06	0,9	97,7	0,8	1,5
v34278	v33969		1,04	1,0	96,6	0,9	2,6
v34279	v29001	2	1,02	2,0	96,4	0,9	2,7
v34280	v28983		1,09	1,9	95,3	0,4	0
v34281	v33970	3	1,07	3,0	96,1	2,4	1,5
v34282	v33971		1,05	2,8	92,5	1,4	6,1
v34284	v33974		1,11	2,8	92,8	1,3	5,9
v34285	v33977		1,2	2,9	94,7	3,4	1,9
v34286	v33979		1,15	2,8	97,7	1,6	0,7

¹ Конъюгация с лизином

[00243] Как видно из Таблицы 11.2, все варианты были успешно конъюгированы с MTvcСоединение 1 при соответствующем целевом значении DAR, что определено методом LC-MS. Значения HIC-RRT для каждого ADC хорошо коррелировали с расчетными значениями для ADC, содержащих DAR 2 MTvcСоединение 1 (см. Примеры 4 и 6). Профили UPLC-SEC продемонстрировали >90% мономеров для каждого из DAR-настроенных ADC.

[00244] Анализ CE-SDS показал, что все DAR-настроенные ADC, выглядели в основном как полноразмерные антитела с незначительным количеством неспецифической конъюгации.

ПРИМЕР 12: АНАЛИЗ СВЯЗЫВАНИЯ НА КЛЕТКАХ- DAR-НАСТРОЕННЫЕ ADC

[00245] Характеризацию ADC *in vitro* из Примера 11 по связыванию с клетками оценивали, как описано в Примере 8, на клеточных линиях EBC-1, H292 и BT-20, экспрессирующих cMet . ADC v34281 (DAR 3) тестировали только на клеточных линиях EBC-1 и H292. Родительское антитело (v17427), конъюгированное со структурой «лекарственное средство-линкер» ADvcСоединение 1 при DAR 2 (стохастическая

конъюгация с лизином) или MTvcСоединение 1 при DAR 4 (стохастическая конъюгация с цистеином), включали в качестве дополнительных контролей.

[00246] Результаты приведены в Таблице 12.1. Как и ожидалось, все DAR-настроенные ADC продемонстрировали сходное целевое связывание с неконъюгированным родительским антителом (v17427), независимо от DAR.

Таблица 12.1: Клеточное связывание DAR-настроенных ADC

Вариант (ADC)	Вариант (mAb)	Целевое значение DAR	EBC-1		H292		BT-20	
			Вmax	Кажущееся значение Kd (нМ)	Вmax	Кажущееся значение Kd (нМ)	Вmax	Кажущееся значение Kd (нМ)
-	v17427	-	5 604	0,14	1 398	0,02	2 451	0,02
v34276	v33967	1	5 588	0,14	1 423	0,02	2 256	0,02
v34277	v33968		5 731	0,13	1 435	0,01	2 276	0,02
v34278 ¹	v33969		5 813	0,28	1 431	0,03	2 334	0,03
v34279	v29001	2	5 707	0,13	1 367	0,01	2 255	0,01
v34280	v28983		5 455	0,16	1 432	0,01	2 241	0,01
v34281	v33970	3	5 345	0,13	1 335	0,01	2 141	0,01
v34282	v33971		5 806	0,14	1 286	0,01	2 188	0,01
v34284	v33974		5 611	0,23	1 306	0,02	2 047	0,01
v34285	v33977		5 422	0,17	1 382	0,02	2 352	0,02

v34286	v33979		5 441	0,20	1 297	0,02	2 443	0,02
-	v22277	-	138	> 80	13	> 10	32	> 10

¹ DAR конъюгата ADC v34278, применяемого в этом эксперименте, составляло 1,4

ПРИМЕР 13: ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ *in vitro* - DAR-НАСТРОЕННЫЕ ADC

[00247] Цитотоксичность ADC *in vitro* из Примера 11 оценивали, как описано в Примере 9. Родительское антитело (v17427), конъюгированное со структурой «лекарственное средство-линкер» MTvcСоединение 1 при DAR 4 (стохастическая, конъюгация с цистеином), включали в качестве дополнительного контроля.

[00248] Результаты приведены на Фиг. 6 и в Таблице 13.1. В целом цитотоксичность DAR 3 ADC была выше, чем у DAR 2 и DAR 1 ADC. Между DAR 1 ADC не наблюдалось существенных различий в цитотоксичности.

Таблица 13.1: Значения EC₅₀ для ADC в линиях опухолевых клеток, экспрессирующих C-Met

ADC вариант	Образец	DAR	EC ₅₀ (pM)	
			ЕВС-1	НТ-29
-	Соединение 1 (без лекарственного средства)	-	55 320	66 850
v34276	v33967-MTvc-Соединение 1	1,0	2,7	585,9
v34277	v33968-MTvc-Соединение 1	0,9	10,5	156,4
v34278	v33969-MTvc-Соединение 1	1,0	5,9	54,8
v34282	v33971-MTvc-Соединение 1	2,0	3,2	8,4
v34279	v29001-MTvc-Соединение 1	1,9	3,1	18,4
v34280	v28983-MTvc-Соединение 1	3,0	3,9	13,7
v34281	v33970-MTvc-Соединение 1	2,8	6,7	18,1
v34284	v33974-MTvc-Соединение 1	2,8	5,0	13,9
v34285	v33977-MTvc-Соединение 1	2,9	9,9	12,9
v34286	v33979-MTvc-Соединение 1	2,8	5,0	3,9
-	v17427-MTvc-Соединение 1	4,0	2,4	13,8

[00249] В целом результаты показывают, что все DAR-настроенные ADC были активны против клеточных линий ЕВС-1 и НТ-29, экспрессирующих с-Met. Активность этих ADC *in vitro* хорошо коррелировала со значениями DAR (*т.е.* количеством конъюгированных токсинов).

ПРИМЕР 14: ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ *in vivo*

[00250] Отобранные ADC из Примера 11 оценивали на противоопухолевую активность *in vivo* в модели ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легкого с высокой экспрессией c-Met H1975 и в модели ксенотрансплантата колоректального рака со средней экспрессией c-Met HT-29. Для сравнения оценивали активность контрольных ADC v17427-MCvcPABC-MMAE (DAR4), v17427-MTvc-Соединение 1 (DAR4) и v17427-ADvc-Соединение 1 (DAR2).

[00251] Для модели HT-29, суспензии опухолевых клеток (3×10^6 клеток в 0,1 мл PBS) имплантировали подкожно «голым» мышам balb/c. Когда средний объем опухоли достигал $\sim 160 \text{ мм}^3$, животных случайным образом распределяли по группам (n=8 на группу) и однократно вводили внутривенную дозу тестируемых образцов, как показано в Таблице 14.1. Уровни доз ADC при различных DAR соответствовали молярному значению токсина. Объем опухоли и массу тела измеряли два раза в неделю при продолжительности исследования 32 дня.

[00252] Для модели H1975, суспензии опухолевых клеток (5×10^6 клеток в 0,1 мл PBS) имплантировали подкожно «голым» мышам balb/c. Когда средний объем опухоли достигал $\sim 150 \text{ мм}^3$, животных случайным образом распределяли по группам (n=8 на группу) и однократно вводили внутривенную дозу тестируемых образцов, как показано в Таблице 14.1. Объем опухоли и массу тела измеряли два раза в неделю при продолжительности исследования 38 дня.

Таблица 14.1: Дозы для исследования *in vivo*

Исследуемый препарат	DAR	Доза (мг/кг)	
		HT-29	H1975
Носитель		0	0
v33967-MTvc-Соединение 1	1	12, 6	24, 4
v33968-MTvc-Соединение 1	1	12, 6	24, 4
v29001-MTvc-Соединение 1	2	6, 3	12, 2
v28983-MTvc-Соединение 1	2	6, 3	12, 2
v17427-ADvc-Соединение 1 (контроль)	2	6, 3	12, 2
v33970-MTvc-Соединение 1	3	4, 2	8, 1,3
v33971-MTvc-Соединение 1	3	4, 2	8, 1,3
v33979-MTvc-Соединение 1	3	4, 2	8, 1,3
v17427-MTvc-Соединение 1 (контроль)	4	3, 1,5	6, 1

v17427-MCvcPABC-MMAE (контроль)	4	1,5	6
------------------------------------	---	-----	---

[00253] Результаты приведены на Фиг. 7 и Фиг. 8.

[00254] В модели HT-29 все сайт-специфические и стохастические конъюгированные ADC, содержащие DAR2, DAR3 и DAR4 Соединение 1, значимо ингибировали рост опухоли по сравнению с носителем при дозах антител, соответствующих токсину, 6, 4 и 3 мг/кг соответственно ($p < 0,05$, модель смешанных эффектов для скорости роста опухоли) (Фиг. 7B). ADC, содержащие DAR1 Соединение 1, не ингибировали рост опухоли при дозе, соответствующей токсину, и составляющей 12 мг/кг (Фиг. 7B). Все сайт-специфические и стохастические конъюгированные ADC, содержащие DAR2, DAR3 и DAR4 Соединение 1, за исключением v28983-MTvc-Соединение 1, также значимо ингибировали рост опухоли по сравнению с носителем при дозах антител, соответствующих токсину, 3, 2 и 1,5 мг/кг соответственно (Фиг. 7A). Для сравнения, v17427-MCvcPABC-MMAE значимо не ингибировал рост опухоли при тестируемой дозе 1,5 мг/кг (Фиг. 7A). Наблюдалась тенденция к положительной корреляции DAR с противоопухолевой активностью, когда доза антитела соответствовала токсину. Активность сайт-специфического ADC, содержащего v29001-MTvc-Соединение 1 DAR2, была сопоставима с активностью стохастического контроля v17427-ADvcСоединение 1 DAR2 (Фиг. 7A).

[00255] Для модели H1975, все ADC, содержащие DAR1, DAR2, DAR3 и DAR4 Соединение 1, значимо ингибировали рост опухоли по сравнению с носителем при дозах антител, соответствующих токсину, 24, 12, 8 и 6 мг/кг соответственно ($p < 0,05$, модель смешанных эффектов для скорости роста опухоли) (Фиг. 8B). Хотя все ADC, содержащие DAR2, DAR3 и DAR4 Соединение 1, также значимо ингибировали рост опухоли по сравнению с носителем при дозах антител, соответствующих токсину, 2, 1,3 и 1 мг/кг соответственно, ADC, содержащие DAR1 Соединение, значимо не ингибировали рост опухоли при дозе антител, соответствующей токсину, 4 мг/кг (Фиг. 8A).

[00256] Какой-либо значимой потери массы тела не наблюдалось ни в одной группе лечения ни в одном исследовании.

ПРИМЕР 15: СВЯЗЫВАНИЕ ВАРИАНТОВ СО ВСТАВКОЙ ЦИСТЕИНА С FcγR И FcRn

[00257] 10 вариантов со вставкой цистеина, представленных в Таблице 2.2, оценивали на предмет их способности связываться с неонатальным рецептором Fc (FcRn) и рецепторами Fcγ (FcγR): CD64a (FcγRI), CD32a (FcγRIIA; аллельные формы His131 и Arg131), CD32b (FcγRIIB) и CD16a (FcγRIIIA; аллельные формы V158 и F158), как описано ниже.

[00258] Связывание с FcγRs: Аффинность FcγR к тестируемым вариантам измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с помощью системы Biacore™ T200 (Cytiva, Мальборо, штат Массачусетс) с буфером PBS pH 7,4, содержащим 0,05% Твин 20

и 3,4 мМ EDTA. Белок А (Genscript Biotech Corporation, Пискатауэй, штат Нью-Джерси; кат. Z02201) в концентрации 15 мкг/мл в 10 мМ ацетате натрия, pH 4,5, ковалентно иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 посредством стандартного аминного связывания с 2000 RU (единицы отклика). Каждый тестируемый вариант в дозе 2,5 мкг/мл вводили со скоростью потока 10 мкл/мин в течение 30 сек для захвата белка А. FcγR вводили со скоростью 25 мкл/мин над поверхностью, иммобилизованной антителами, используя кинетику одного цикла. Для CD32aH, CD32aR и CD32bY, которые обладают слабой аффинностью и быстрыми взаимодействиями on и off, использовали 15-секундные возрастающие концентрации от 0,15 до 12 мкМ. Для CD16aF и CD16aV использовали 40-секундные инъекции возрастающих концентраций от 0,06 до 5 мкМ. Для CD64a использовали 100-секундные инъекции возрастающих концентраций от 0,41 до 300 нМ. Для всех FcγR использовали диссоциацию 120 сек, а поверхности белка А регенерировали с помощью 30-секундного импульса 10 мМ глицина с pH 1,5 между циклами инъекции. Сенсорограммы дважды сопоставляли и подгоняли к модели стационарного состояния для определения аффинности или модели связывания 1:1 для кинетики и аффинности, если фаза диссоциации была достаточно медленной для CD64a. Сообщаемые значения K_D являются средним значением двух независимых прогонов. Все эксперименты проводили при температуре 25°C.

[00259] Связывание с FcRn: Аффинность FcRn к тестируемым вариантам измеряли методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с помощью системы Biacore™ T200 (Cytiva, Мальборо, штат Массачусетс) с буфером PBS, содержащим 0,05% Tween 20 и 3,4 мМ EDTA, доведенным до pH 5,9. Нейтравидин (ThermoFisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс; кат. 31000) в концентрации 10 мкг/мл в 10 мМ ацетате натрия, pH 4,5, ковалентно иммобилизовали на сенсорном чипе CM5 посредством стандартного аминного связывания с 2000 RU (единицы ответа). Человеческий FcRn с С-концевым биотином на большой субъединице в дозе 5 мкг/мл вводили со скоростью потока 20 мкл/мин в течение 20 сек до достижения уровня захвата FcRn 70 RU. Каждый тестируемый вариант вводили на поверхность, иммобилизованную FcRn, с использованием кинетики одного цикла. Варианты антител вводили с возрастающей концентрацией от 5 до 1200 нМ в течение 45 сек при скорости 50 мкл/мин с диссоциацией в течение 180 сек по методике одного цикла в рабочем буфере с pH 5,9. Поверхность FcRn регенерировали с помощью 30-секундного импульса PBST pH 7,4 между циклами инъекции. Сенсорограммы дважды сопоставляли и подгоняли к модели стационарного связывания для генерации значений аффинности. Сообщаемые значения K_D являются средним значением двух независимых прогонов. Все эксперименты проводили при температуре 25°C.

[00260] Результаты: Результаты приведены в Таблице 15.1. Все варианты со вставкой цистеина связывались с FcRn с одинаковой аффинностью, в пределах 2-кратного значения K_D от контроля дикого типа (v17427). Большинство вариантов со вставкой цистеина также связывались со всеми FcγR с аналогичной аффинностью, в пределах 2-кратного значения K_D от контроля дикого типа (v17427), за исключением v29001

(H_T299.5C) и v22765 (H_G237.5C), которые продемонстрировали значимое снижение связывания с FcγR, и вариант v22768 (H_Q295.5C), который продемонстрировал снижение связывания с CD16aF, CD16aV, CD32aH и CD32aR (>2 раза по сравнению с K_D контроля дикого типа, v17427) . Контрольный вариант v29013 со вставкой цистеина (H_S239.5C) также продемонстрировал значимое снижение связывания с FcγR, как и ожидалось.

Таблица 15.1: SPR Аффинность связывания (K_D) вариантов со вставкой цистеина с FcγR и FcRn

Вариант	Конструкция	FcRn	CD64a	CD32aH	CD32aR	CD32bY	CD16aF	CD16aV
v17427	Контроль дт	2,97E-07	4,86E-11	4,10E-07	5,88E-07	2,63E-06	1,45E-06	4,61E-07
v32634	Контроль дт (homoFc)	3,81E-07	7,32E-11	7,25E-07	1,11E-06	5,30E-06	1,97E-06	6,33E-07
v29001	H_T299.5C	2,08E-07	1,43E-07	ND ¹	ND	ND	ND	ND
v22765	H_G237.5C	3,42E-07	ND	ND	ND	ND	ND	ND
v22768	H_Q295.5C	2,95E-07	8,55E-11	1,36E-06	1,39E-06	4,72E-06	4,18E-06	1,35E-06
v27321	L_W148.5C	2,79E-07	4,53E-11	4,27E-07	5,75E-07	2,51E-06	1,12E-06	4,14E-07
v27322	L_K149.5C	2,23E-07	4,26E-11	3,97E-07	5,42E-07	2,43E-06	1,32E-06	4,46E-07
v28983	L_P40.5C	2,24E-07	4,51E-11	4,31E-07	6,12E-07	2,71E-06	1,47E-06	4,88E-07
v28989	H_A9.5C	3,32E-07	4,95E-11	4,16E-07	5,97E-07	2,67E-06	1,46E-06	4,53E-07
v28993	H_G169.5C	3,20E-07	4,99E-11	4,33E-07	6,19E-07	2,67E-06	1,34E-06	4,20E-07
v34685 ²	L_K39.5C	3,22E-07	5,24E-11	4,55E-07	6,22E-07	2,81E-06	1,40E-06	4,54E-07
v34686 ³	L_K126.5C	3,28E-07	4,40E-11	3,99E-07	5,21E-07	2,36E-06	1,25E-06	4,13E-07

v29013	H_S239.5C (контроль)	1,92E-07	8,61E-09	ND	ND	ND	ND	ND
--------	-------------------------	----------	----------	----	----	----	----	----

¹ ND=не определено

² Вариант является эквивалентом v22760 в Таблице 2.2, но в нем отсутствует дополнительный пептид ESSCDVKLV [SEQ ID NO: 2], слитый с С-концевым остатком легкой цепи.

³ Вариант является эквивалентом v22761 в Таблице 2.2, но с дополнительным пептидом ESSCDVKLV [SEQ ID NO: 2], слитым с С-концевым остатком легкой цепи

ПРИМЕР 16: ПЕРЕДАВАЕМОСТЬ МУТАЦИЙ СО ВСТАВКОЙ ЦИСТЕИНА

[00261] Чтобы продемонстрировать, что мутации со вставкой цистеина могут передаваться на другие антитела, четыре сайта вставки были выбраны и внедрены в четыре различных антитела, как подробно описано в Таблице 16.1, всего семь новых вариантов.

Таблица 16.1: Варианты, сгенерированные для демонстрации передаваемости мутаций со вставкой цистеина

Домен	Сайта вставки цистеина	Вариант, №	Антитело	Мишень
Fc	H_T299.5	v34014	Трастузумаб	HER2
		v34217	Анти-FR α	FR α
Fc	H_G237.5	v34012	Трастузумаб	HER2
Fab	L_P40.5	v33996	CR8071 ¹	Гемагглютинин (HA)
		v34004	H3 ²	HER3
Fab	L_A9.5	v34015	SGNCD19a ³	CD19
		v34010	Трастузумаб	HER2

¹ Dreyfus, *et al.*, 2012, *Science*, 337:1343-1348

² Патент США № 9,249,230

³ Патент США № 10,808,039

[00262] Варианты со вставками цистеина были приготовлены на основе различных антител согласно тому же протоколу, что описан в Общем протоколе 1. Варианты на основе трастузумаба, CR8071, H3 и SGNCD19a (v34014, v34012, v34010, v33996, v34004 и v34015) конъюгировали со структурой «лекарственное средство-линкер» MTvcСоединение 1, как описано в Общей процедуре 2, за следующим исключением. Для вариантов v34012 и v34010, после завершения восстановления восстановленные варианты заменяли буфером на PBS, pH 6,5 для окисления либо при комнатной температуре, либо с последующей

конъюгацией с МТvcСоединение 1. Образцы, приготовленные окислением при 4°C, продемонстрировали лучшие биофизические свойства.

[00263] Вариант v34217 конъюгировали с 3 различными структурами «лекарственное средство-линкер» на основе камптотецина (MC-GGFG-Камптотецин 1, MC-GGFG-Камптотецин 2 и MC-GGFG-*Камптотецин 2), как описано ниже. Структура «лекарственное средство-линкер» MC-GGFG-*Камптотецин 2 содержит тот же аналог камптотецина, что и структура «лекарственное средство-линкер» MC-GGFG-Камптотецин 2, но линкер прикреплен к другому положению в молекуле лекарственного средства.

[00264] Раствор (647,2 мкл) варианта v34217 (6 мг) разбавляли до 6,4 мг/мл 5 мМ раствором DTPA (диэтилтриаминапентауксусная кислота, конечная концентрация 1 мМ, объем: 188 мкл) в PBS (pH 7,4), и к этому раствору добавляли 25 мМ трис(2-карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР) (25 экв., 104 мкл). После инкубации в течение 3 часов на водяной бане с температурой 37°C восстановленные антитела очищали на центрифугирующей колонке Zeba™ 40 кДа 5мл (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, штат Массачусетс), предварительно кондиционированной 10 мМ ацетата натрия, pH 5,5. Восстановленное антитело подвергали окислению в течение ночи (18 часов) 25-молярным избытком дегидроаскорбиновой кислоты (DHAА) (при условии 100%-ного извлечения после очистки на колонке Zeba™) при 4°C для восстановления межцепочечных дисульфидных связей при сохранении вставленного цистеина в восстановленной (не содержащей тиол) форме. Повторно окисленное антитело разделяли на 3 равные аликвоты и конъюгировали с функционализированной малеимидом структурой «лекарственное средство-линкер» MC-GGFG-Камптотецин 1, MC-GGFG-Камптотецин 2 или MC-GGFG-*Камптотецин 2 путем инкубации с 4 молярными избытками 10 мМ исходного раствора DMSO структуры «лекарственное средство-линкер» в присутствии 10% (об/об) DMSO при комнатной температуре в течение 60-75 минут после тщательного перемешивания путем пипетирования. Образовавшиеся конъюгаты затем очищали на колонках Zeba™ 40K, предварительно уравновешенных 10 мМ ацетата натрия, pH 4,5.

[00265] После завершения конъюгации все ADC анализировали с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC), эксклюзионной хроматографии (SEC), жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC-MS) и капиллярного электрофореза-SDS (CE-SDS), как описано в разделе Общие протоколы 4, 5, 6 и 7 соответственно.

[00266] Полученные результаты приведены в Таблице 16.2 и демонстрируют, что в целом мутации со вставкой цистеина можно успешно применять в различных антителах и для конъюгации различных структур «лекарственное средство-линкер». Для большинства ADC, значения DAR, измеренные с помощью HIC или LC-MS, оказались такими, как ожидалось (~ DAR 2). Для v33996, элюция на HIC даже в виде «голового» антитела была относительно широкой и, следовательно, после конъюгации не наблюдалось отчетливого пика, и не удалось измерить ни DAR, ни HIC-RRT. Для v34012, наблюдалась определенная степень неспецифической конъюгации, что привело к получению значения DAR 2,1. ADC

продемонстрировали по меньшей мере 95% мономера при SEC, за исключением двух ADC: v34012 и v34010, конъюгированных с MTvcСоединение 1. Для этих двух ADC после окисления (до добавления структуры «лекарственное средство-линкер») наблюдалось ~15% LMWS, которое оставалось неизменным после конъюгации. Дальнейшее усовершенствование этапа окисления оптимизирует количество LMWS, наблюдаемое для этих двух вариантов.

Таблица 16.2: Биофизические свойства

Вариант	Положение вставки	Лекарственное средство-Линкер	HIC		UPLC-SEC			DAR (LC-MS)
			DAR	RRT	Мономер %	HMWS %	LMWS %	
v33996	L_P40.5	MTvcСоединение 1	ND ¹	ND ¹	95	1	4	1,9
v34004	L_P40.5	MTvcСоединение 1	1,7	1,12	96	1	3	2,0
v34015	H_A9.5	MTvcСоединение 1	1,8	1,16	96	1	3	2,0
v34014	H_T299.5	MTvcСоединение 1	2,0	1,01	99	1	0	2,0
v34012	H_G237.5	MTvcСоединение 1	2,1	1,10	83	1	16	2,1 ³
v34010	H_A9.5	MTvcСоединение 1	ND ²	ND ²	84	3	13	1,9
v34217	H_T299.5	MC-GGFG-Камптотецин 1	2,0	1,18	100	0	0	2,0
		MC-GGFG-Камптотецин 2	2,0	1,12	100	0	0	2,0
		MC-GGFG-*Камптотецин 2	2,0	1,12	100	0	0	2,0

¹ «Голый» вариант имел более широкий пик на HIC, поэтому DAR по HIC и HIC-RRT не удалось рассчитать.

² Из-за множества пиков DAR по HIC и HIC-RRT не удалось рассчитать.

³ Из-за некоторой степени неспецифической конъюгации наблюдалось значение DAR>2.

ПРИМЕР 17: ПРИГОТОВЛЕНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ DAR-НАСТРОЕННЫХ КОНЪЮГАТОВ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

[00267] В этом примере множество сайтов вставки цистеина объединяли для получения антител, способных к сайт-специфической конъюгации с получением ADC со значением DAR 4 и 6. Используемые комбинации сайтов вставки цистеина приведены в Таблице 17.1.

Таблица 17.1: Комбинации сайтов вставки цистеина и целевые значения DAR

Целевое значение DAR	Положения вставки цистеина	Антитело	Вариант
DAR 4	H_A9.5+L_P40.5	Анти-cMet	v33943
	H_G237.5+L_P40.5	Анти-cMet	v33948
	H_A9.5+H_G237.5	Анти-cMet	v33952
	H_T299.5+L_P40.5	Анти-cMet	v33955
	H_A9.5+H_T299.5	Анти-cMet	v33959
	H_G237.5+H_T299.5	Анти-cMet	v33961
DAR 4	H_T299.5, L_K126.5	Анти-FR α	v34218
	H_T299.5, L_P40.5	Анти-FR α	v34456
DAR 6	H_G237.5+H_T299.5+L_P40.5	Анти-cMet	v35073
	H_A9.5+H_T299.5+L_P40.5	Анти-cMet	v35074

[00268] Варианты со вставкой цистеина были приготовлены в соответствии с протоколом, описанным в Общем протоколе 1. Варианты анти-cMet с DAR 4 и DAR 6 экспрессировали в кэпированной цистеином форме с кэпом L-цистеина, кэпом глутатиона или их комбинацией. Восстановление, окисление и конъюгацию со структурой «лекарственное средство-линкер» MTvcСоединение 1 проводили, как описано в Общей процедуре 2, со следующими модификациями. Чтобы учесть дополнительное кэпирование цистеином, для вариантов DAR 4 и DAR 6, восстановление проводили с 30 и 40 экв. молярным избытком трис(2-карбоксиэтил)фосфина (TCEP) соответственно, в аналогичных условиях. Окисление проводили с 30 и 40 экв. молярным избытком дегидроаскорбиновой кислоты (DHAA) для вариантов DAR 4 и DAR 6 соответственно.

[00269] Конъюгацию вариантов анти-FR α DAR 4 со структурами «лекарственное средство-линкер» MC-GGFG-Камптотецин 1, MC-GGFG-Камптотецин 2 и MC-GGFG-*Камптотецин 2 проводили, как описано в Примере 16.

[00270] После завершения конъюгации все ADC анализировали с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC), эксклюзионной хроматографии (SEC), жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC-MS) и капиллярного

электрофореза-SDS (CE-SDS), как описано в разделе Общие протоколы 4, 5, 6 и 7 соответственно.

[00271] Результаты приведены в Таблице 17.2 (антитело анти-сMet) и Таблице 17.3 (антитело анти-FR α).

[00272] В целом, сайт-специфические конъюгации с DAR 4 и DAR 6 на основной цепи антитела анти-сMet оказались успешными, при этом в антитело вводили до трех различных вставок цистеина и конъюгировали со структурой «лекарственное средство-линкер». Типовые профили HIC, SEC, LC-MS и CE-SDS для ADC DAR 6, v35074-MTvcСоединение 1, приведены на Фиг. 16-18.

[00273] Для ADC v33943-MTvcСоединение 1 и v35074-MTvcСоединение 1 значения DAR, рассчитанные с помощью HIC, были меньше ожидаемых из-за присутствия пиков совместного элюирования. Для других ADC, содержащих анти-сMet, однако, значение DAR, рассчитанное с помощью HIC, было близким к целевому значению DAR. Измерение DAR с помощью LC-MS, является более прямым подходом и оно должно отражать результаты, наиболее близкие к абсолютным значениям. За исключением v33952-MTvcСоединение 1, все остальные ADC, содержащие анти-сMet, продемонстрировали по меньшей мере 99% мономера при анализе UPLC-SEC. Дальнейшая оптимизация этапа окисления v33952 должна снизить количество LMWS, поскольку это антитело продемонстрировало образование > 10% LMWS перед добавлением структуры «лекарственное средство-линкер». Прогон CE-SDS в неденатурирующих условиях продемонстрировал более высокую долю полуантител по сравнению с полноразмерными антителами для этого варианта.

[00274] Для сайт-специфических конъюгаций DAR 4 на основной цепи антитела анти-FR α , все ADC выглядели как >99% мономеров при анализе UPLC-SEC. Согласно HIC, для этих ADC наблюдался только один пик. Как конъюгированные, так и неконъюгированные антитела имели очень схожее время элюирования, оценки значений DAR с помощью HIC были менее точными, чем расчеты DAR с помощью LC-MS. Четыре из шести ADC продемонстрировали DAR 4 по данным LC-MS. Вариант v34456, конъюгированный либо с MC-GGFG-Камптотецин 1, либо с MC-GGFG-*Камптотецин 2, продемонстрировал ~25% неспецифической конъюгации, которую можно уменьшить при дальнейшей оптимизации.

Таблица 17.2: Биофизические свойства ADC, содержащих анти-сMet (DAR 4 и DAR 6)

Целевое значение DAR	ADC	HIC		UPLC-SEC			DAR (LC-MS)
		DA R	RRT	Моно мер %	HMW S %	LMW S %	
DAR 4	v33943-MTvcСоединение 1	3,2	1,28	100	0	0	4,0

	v33948- MTvcСоединение 1	4,0	1,21	100	0	0	3,9
	v33952- MTvcСоединение 1	3,9	1,26	88	1	11	4,0
	v33955- MTvcСоединение 1	4,0	1,11	100	0	0	4,0
	v33959- MTvcСоединение 1	4,0	1,13	99	1	0	4,0
	v33961- MTvcСоединение 1	4,0	1,08	99	1	0	3,8
DAR 6	v35073- MTvcСоединение 1	6,0	1,16	99	1	1	5,9
	v35074- MTvcСоединение 1	5,4	1,31	99	1	0	5,9

Таблица 17.3: Биофизические свойства ADC, содержащих анти-FR α (DAR 4)

Положения вставки цистеина	ADC	HIC		UPLC-SEC			DAR (LC- MS)
		DAR [#]	RRT	Мономер %	HMWS %	LM WS %	
H_T299.5 L_126.5	v34218-MC-GGFG- Камптотецин 1	4,0	1,22	99	1	0	4,0
	v34218-MC-GGFG- Камптотецин 2	4,0	1,11	99	1	0	4,0
	v34218-MC-GGFG- *Камптотецин 2	4,0	1,07	99	1	0	4,0
H_T299.5 L_46.5	v34456-MC-GGFG- Камптотецин 1	4,0	1,17	100	0	0	4,4
	v34456-MC-GGFG- Камптотецин 2	4,0	1,07	100	0	0	4,0
	v34456-MC-GGFG- *Камптотецин 2	4,0	1,06	99	1	0	4,3

Наблюдался только один пик при анализе HIC

ПРИМЕР 18: ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ *IN VITRO* DAR-НАСТРОЕННЫХ ADC, СОДЕРЖАЩИХ ANTI-FR α

[00275] Способность ADC, полученных в Примерах 16 и 17 и содержащих анти-FR α (DAR 2 и DAR 4), ингибировать рост клеток (цитотоксичность) сравнивали со стохастическими ADC DAR 4 в 3D-анализе цитотоксичности, как описано ниже, с использованием линий раковых клеток, экспрессирующих FR α . JEG-3 (плацентарная хориокарцинома) и T-47D (карцинома молочной железы).

[00276] Вкратце, 3000 клеток/лунку высевали в 384-луночные планшеты со сверхнизким прикреплением (ULA), центрифугировали при 200 г в течение 2 минут и инкубировали в стандартных условиях культивирования в течение 3 дней, чтобы обеспечить образование сфероидов (1 сфероид/лунку). Через 3 дня сфероиды обрабатывали титратом тестируемого образца, приготовленного в полной питательной среде, и инкубировали в стандартных условиях культивирования в течение 6 дней. После инкубации во все лунки вносили 3D реагент CellTiter-Glo[®] (Promega Corporation, Мэдисон, штат Висконсин). Планшеты инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 1 часа и количественно определяли люминесценцию с помощью многорежимного считывателя изображений клеток BioTek Cytation 5 (Agilent Technologies, Inc., Санта-Клара, штат Калифорния). На основе пустых лунок (без добавления тестируемого образца), рассчитывали процентные значения цитотоксичности и строили график зависимости от концентрации тестируемого образца с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Сан-Диего, штат Калифорния).

[00277] Результаты приведены в Таблице 18.1. Сайт-специфичные ADC DAR 4 демонстрировали сравнимую 3D цитотоксичность *in vitro* с сопоставимыми по полезной нагрузке стохастическими ADC DAR 4 против сфероидов JEG-3 и T-47D. Сайт-специфичные ADC DAR 2 продемонстрировали логарифмически меньшую эффективность, чем сопоставимые по полезной нагрузке ADC DAR 4 против сфероидов JEG-3 и T-47D, как и ожидалось, из-за более низкой нагрузки лекарственным средством на ADC DAR 2.

[00278] Сайт-специфичные и стохастические ADC DAR 4, включая Камптотецин 2, продемонстрировали аналогичную эффективность с сопоставимым по полезной нагрузке стохастическим ADC DAR 8 против сфероидов JEG-3 и T-47D.

[00279] Сайт-специфичные и стохастические ADC DAR 4, включая Камптотецин 1, продемонстрировали аналогичную эффективность с сопоставимым по полезной нагрузке стохастическим ADC DAR 8 против сфероидов JEG-3 с высокой экспрессией FR α . В сфероидах T-47D с более низкой экспрессией FR α , ADC DAR 4 продемонстрировали дозозависимый ответ на лекарственную нагрузку, при этом сопоставимый по полезной нагрузке стохастический ADC DAR 8 продемонстрировал в 3-9 раз более высокую активность.

Таблица 18.1: Цитотоксичность DAR-настроенных ADC in vitro

Тестируемый образец	DAR	Положение вставки	3D EC50 (нМ)	
			JEG-3 Сфероид	T-47D Сфероид
v30384-MT-GGFG-Камптотецин 1	8,0	стохастический	0,45	2,24
v30384-MT-GGFG-Камптотецин 2	8,0	стохастический	0,71	0,73
v36675-MT-GGFG-Камптотецин 1	3,5	стохастический	0,78	19,75
v36675-MT-GGFG-Камптотецин 2	4,2	стохастический	0,66	0,80
v34217-MC-GGFG-Камптотецин 1	2,0	H_T299.5	9,40	15,57
v34217-MC-GGFG-Камптотецин 2	2,0		12,31	15,75
v34218-MC-GGFG-Камптотецин 1	4,0	H_T299.5+L_K1 26.5	0,79	9,51
v34218-MC-GGFG-Камптотецин 2 [#]	4,0		1,06	0,82
v34456-MC-GGFG-Камптотецин 1 [#]	4,4	H_T299.5+L_P40 .5	0,68	7,37
v34456-MC-GGFG-Камптотецин 2 [#]	4,0		1,02	0,57
DXd1 (без полезной нагрузки)	-	-	1,09	1,54
Камптотецин 1 (без полезной нагрузки)	-	-	1,80	1,56
Камптотецин 2 (без полезной нагрузки)	-	-	2,12	0,64

[#]ADC содержали более 1 моль%/DAR без токсина, что измерено с помощью RP-LCMS.

[00280] Описания всех патентов, заявок на патенты, публикаций и элементов баз данных, упомянутые в данном описании, тем самым конкретно включены в полный объем в той же степени, как если бы каждый отдельный патент, заявка на патент, публикация и элемент базы данных были специально и отдельно указаны для включения в виде ссылки.

[00281] Предполагается, что модификации конкретных вариантов осуществления, описанные в данном документе, которые могут быть очевидны специалистам в данной области техники, должны быть включены в рамки объема следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Сконструированная с цистеином конструкция антитела, содержащая домен VH, домен VL и домен Fc, область Fc, содержащую домен CH2 и/или домен CH3,

конструкцию антитела, содержащую одну или большее количество мутаций со вставкой цистеина, выбранных из следующих:

- (a) вставка остатка цистеина между положениями 39 и 40 в домене VL;
- (b) вставка остатка цистеина между положениями 40 и 41 в домене VL;
- (c) вставка остатка цистеина между положениями 126 и 127 в домене CL;
- (d) вставка остатка цистеина между положениями 148 и 149 в домене CL;
- (e) вставка остатка цистеина между положениями 149 и 150 в домене CL;
- (f) вставка остатка цистеина между положениями 9 и 10 в домене VH;
- (g) вставка остатка цистеина между положениями 169 и 170 в домене CH1;
- (h) вставка остатка цистеина между положениями 237 и 238 в домене CH2;
- (i) вставка остатка цистеина между положениями 295 и 296 в домене CH2, и
- (j) вставка остатка цистеина между положениями 299 и 300 в домене CH2,

при этом нумерация аминокислот в доменах VL, CL, VH и CH1 представляет собой нумерацию по Kabat, а нумерация аминокислот в домене CH2 представляет собой нумерацию EU, и

при этом конструкция антитела основана на иммуноглобулине G (IgG).

2. Сконструированная с цистеином конструкция антитела по п. 1, отличающаяся тем, что температура плавления (T_m) домена сконструированной с цистеином конструкции антитела, содержащей мутацию со вставкой цистеина, находится в пределах от 0°C до 8°C от T_m того же домена в соответствующей конструкции исходного антитела, в которой отсутствует мутация со вставкой цистеина.

3. Сконструированная с цистеином конструкция антитела по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что конструкция антитела содержит одну мутацию со вставкой цистеина.

4. Сконструированная с цистеином конструкция антитела по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что конструкция антитела содержит две мутации со вставкой цистеина.

5. Сконструированная с цистеином конструкция антитела по п. 4, отличающаяся тем, что две мутации со вставкой цистеина являются симметричными мутациями.

6. Сконструированная с цистеином конструкция антитела по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что конструкция антитела содержит три мутации со вставкой цистеина.

7. Сконструированная с цистеином конструкция антитела по п. 6, отличающаяся тем, что две из трех мутаций со вставкой цистеина являются симметричными мутациями.

8. Сконструированная с цистеином конструкция антитела по п. 3, 6 или 7, отличающаяся тем, что каждая мутация со вставкой цистеина независимо выбрана из следующих мутаций:

- (a) вставка остатка цистеина между положениями 9 и 10 в домене VH;

- (b) вставка остатка цистеина между положениями 40 и 41 в домене VL;
- (c) вставка остатка цистеина между положениями 237 и 238 в домене CH2, и
- (d) вставка остатка цистеина между положениями 299 и 300 в домене CH2.

9. Сконструированная с цистеином конструкция антитела по п. 3, отличающаяся тем, что мутация со вставкой цистеина выбрана из следующих мутаций:

- (a) вставка остатка цистеина между положениями 9 и 10 в домене VH;
- (b) вставка остатка цистеина между положениями 237 и 238 в домене CH2, и
- (c) вставка остатка цистеина между положениями 299 и 300 в домене CH2.

10. Сконструированная с цистеином конструкция антитела по п. 1 или 2, отличающаяся тем, что конструкция антитела содержит четыре или шесть мутаций со вставкой цистеина.

11. Сконструированная с цистеином конструкция антитела по п. 10, отличающаяся тем, что мутации со вставкой цистеина выбраны из следующих мутаций:

- (a) вставка остатка цистеина между положениями 40 и 41 в домене VL;
- (b) вставка остатка цистеина между положениями 126 и 127 в домене CL;
- (c) вставка остатка цистеина между положениями 9 и 10 в домене VH;
- (d) вставка остатка цистеина между положениями 237 и 238 в домене CH2, и
- (e) вставка остатка цистеина между положениями 299 и 300 в домене CH2.

12. Сконструированная с цистеином конструкция антитела по любому из пп. 1-11, отличающаяся тем, что конструкция антитела содержит домен VH или домен VH и домен VL.

13. Сконструированная с цистеином конструкция антитела по п. 12, отличающаяся тем, что конструкция антитела содержит один или большее количество антигенсвязывающих доменов, по меньшей мере один из антигенсвязывающих доменов, содержащий домен VH или домен VH и домен VL.

14. Сконструированная с цистеином конструкция антитела по п. 13, отличающаяся тем, что конструкция антитела содержит два антигенсвязывающих домена.

15. Сконструированная с цистеином конструкция антитела по п. 14, отличающаяся тем, что конструкция антитела является биспецифичной.

16. Сконструированная с цистеином конструкция антитела по любому из пп. 13-15, отличающаяся тем, что по меньшей мере один из антигенсвязывающих доменов связывается с опухолеассоциированным антигеном.

17. Сконструированная с цистеином конструкция антитела по любому из пп. 1-16, отличающаяся тем, что конструкция антитела содержит область Fc.

18. Сконструированная с цистеином конструкция антитела по любому из пп. 1-17, отличающаяся тем, что конструкция антитела основана на IgG1.

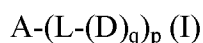
19. Сконструированная с цистеином конструкция антитела по любому из пп. 1-18, отличающаяся тем, что IgG представляет собой человеческий IgG.

20. Сконструированная с цистеином конструкция антитела по любому из пп. 1-19, отличающаяся тем, что конструкция антитела содержит гетеродимерную область Fc.

21. Сконструированная с цистеином конструкция антитела по п. 20, отличающаяся тем, что гетеродимерная область Fc содержит модифицированный домен CH3, содержащий аминокислотные мутации, которые способствуют образованию гетеродимерной Fc вместо гомодимерной Fc.

22. Конъюгат, содержащий сконструированную с цистеином конструкцию антитела по любому из пп. 1-21 и один или большее количество активных агентов, конъюгированных с каждым из одного или большего количества вставленных остатков цистеина.

23. Конъюгат, имеющий Формулу (I):



где:

A представляет собой сконструированную с цистеином конструкцию антитела;

L представляет собой линкер;

D представляет собой активный агент;

q представляет собой целое число от 1 до 4, и

p представляет собой целое число от 1 до 8,

при этом сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит домен VH, домен VH и домен VL, область Fc или их комбинацию, область Fc, содержащую домен CH2 и/или домен CH3, и

при этом сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит одну или большее количество мутаций со вставкой цистеина, выбранных из следующих:

- (a) вставка остатка цистеина между положениями 39 и 40 в домене VL;
- (b) вставка остатка цистеина между положениями 40 и 41 в домене VL;
- (c) вставка остатка цистеина между положениями 126 и 127 в домене CL;
- (d) вставка остатка цистеина между положениями 148 и 149 в домене CL;
- (e) вставка остатка цистеина между положениями 149 и 150 в домене CL;
- (f) вставка остатка цистеина между положениями 9 и 10 в домене VH;
- (g) вставка остатка цистеина между положениями 169 и 170 в домене CH1;
- (h) вставка остатка цистеина между положениями 237 и 238 в домене CH2;
- (i) вставка остатка цистеина между положениями 295 и 296 в домене CH2, и
- (j) вставка остатка цистеина между положениями 299 и 300 в домене CH2,

при этом нумерация аминокислот в доменах VL, CL, VH и CH1 представляет собой нумерацию по Kabat, а нумерация аминокислот в домене CH2 представляет собой нумерацию EU,

при этом сконструированная с цистеином конструкция антитела основана на иммуноглобулине G (IgG), и

при этом каждый D связан со вставленным остатком цистеина через L.

24. Конъюгат по п. 23, отличающийся тем, что конъюгат имеет формулу (II):



где:

A представляет собой сконструированную с цистеином конструкцию антитела;

L представляет собой линкер;

D представляет собой активный агент, и

p является целым числом от 1 до 8.

25. Конъюгат по любому из пп. 22-24, отличающийся тем, что активный агент представляет собой диагностический агент или маркирующий агент.

26. Конъюгат по любому из пп. 22-24, отличающийся тем, что активный агент представляет собой терапевтический агент.

27. Композиция, содержащая конъюгат по любому из пп. 22-26 и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

28. Способ лечения заболевания или нарушения у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение эффективного количества конъюгата по п. 26.

29. Конъюгат по п. 28 для применения в терапии.

30. Применение конъюгата по п. 28 при производстве лекарственного средства для лечения субъекта, нуждающегося в этом.

31. Способ получения конъюгата по любому из пп. 22-26, включающий помещение сконструированной с цистеином конструкции антитела в восстанавливающие условия, так что тиоловая группа одного или большего количества вставленных остатков цистеина восстанавливается, и введение в реакцию структуры «линкер, реагирующий с тиолом-активный агент» с конструкцией антитела в условиях, которые обеспечивают образование связи между линкером и восстановленным тиолом.

32. Способ получения конъюгата «антитело-лекарственное средство», имеющего заранее определенное соотношение лекарственного средства к антителу (DAR), включающий:

(i) обеспечение сконструированной с цистеином конструкции антитела, содержащей домен VH, домен VH и домен VL, область Fc или их комбинацию, область Fc, содержащую домен CH2 и/или домен CH3, а также

конструкцию антитела, содержащую одну или большее количество мутаций со вставкой цистеина, выбранных из следующих:

- (a) вставка остатка цистеина между положениями 39 и 40 в домене VL;
- (b) вставка остатка цистеина между положениями 40 и 41 в домене VL;
- (c) вставка остатка цистеина между положениями 126 и 127 в домене CL;
- (d) вставка остатка цистеина между положениями 148 и 149 в домене CL;
- (e) вставка остатка цистеина между положениями 149 и 150 в домене CL;
- (f) вставка остатка цистеина между положениями 9 и 10 в домене VH;
- (g) вставка остатка цистеина между положениями 169 и 170 в домене CH1;
- (h) вставка остатка цистеина между положениями 237 и 238 в домене CH2;
- (i) вставка остатка цистеина между положениями 295 и 296 в домене CH2, и
- (j) вставка остатка цистеина между положениями 299 и 300 в домене CH2, и

(ii) введение в реакцию сконструированной с цистеином конструкции антитела со структурой «лекарственное средство-линкер» с получением конъюгата «антитело-

лекарственное средство»;

при этом заранее определенное значение DAR равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8, а сконструированная с цистеином конструкция антитела содержит такое же количество мутаций со вставкой цистеина, что и заранее определенное значение DAR,

при этом нумерация аминокислот в доменах VL, CL, VH и CH1 представляет собой нумерацию по Kabat, а нумерация аминокислот в домене CH2 представляет собой нумерацию EU, и

при этом сконструированная с цистеином конструкция антитела основана на иммуноглобулине G (IgG).

33. Способ по п. 32, отличающийся тем, что заранее определенное значение DAR равно 2.

34. Способ по п. 32, отличающийся тем, что заранее определенное значение DAR равно 1 или 3.

35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что мутации со вставкой цистеина выбраны из следующих:

- (а) вставка остатка цистеина между положениями 9 и 10 в домене VH;
- (b) вставка остатка цистеина между положениями 40 и 41 в домене VL;
- (с) вставка остатка цистеина между положениями 237 и 238 в домене CH2, и
- (d) вставка остатка цистеина между положениями 299 и 300 в домене CH2.

36. Способ по п. 32, отличающийся тем, что заранее определенное значение DAR равно 4 или 6.

37. Способ по п. 36, отличающийся тем, что мутации со вставкой цистеина выбраны из следующих:

- (а) вставка остатка цистеина между положениями 40 и 41 в домене VL;
- (b) вставка остатка цистеина между положениями 126 и 127 в домене CL;
- (с) вставка остатка цистеина между положениями 9 и 10 в домене VH;
- (d) вставка остатка цистеина между положениями 237 и 238 в домене CH2, и
- (e) вставка остатка цистеина между положениями 299 и 300 в домене CH2.

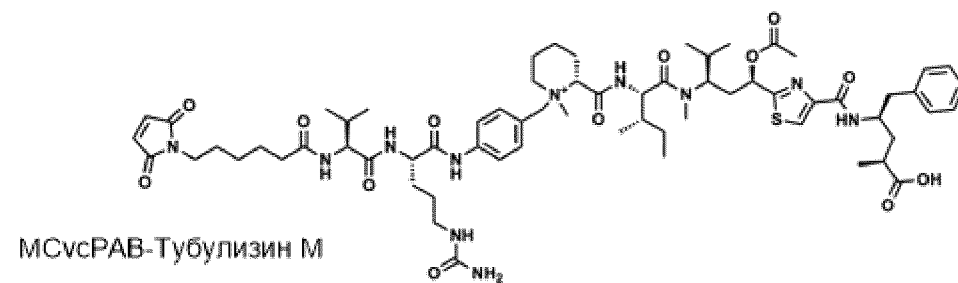
38. Полинуклеотид или набор полинуклеотидов, кодирующих сконструированную с цистеином конструкцию антитела по любому из пп. 1-21.

39. Вектор, содержащий один или больше количество полинуклеотидов, кодирующих сконструированную с цистеином конструкцию антитела по любому из пп. 1-21.

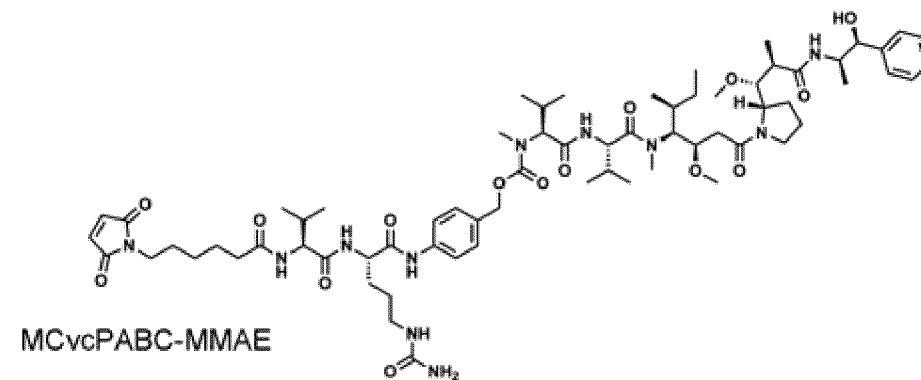
40. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 39.

По доверенности

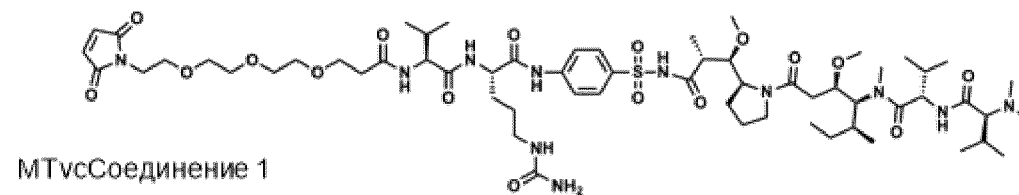
A.



B.

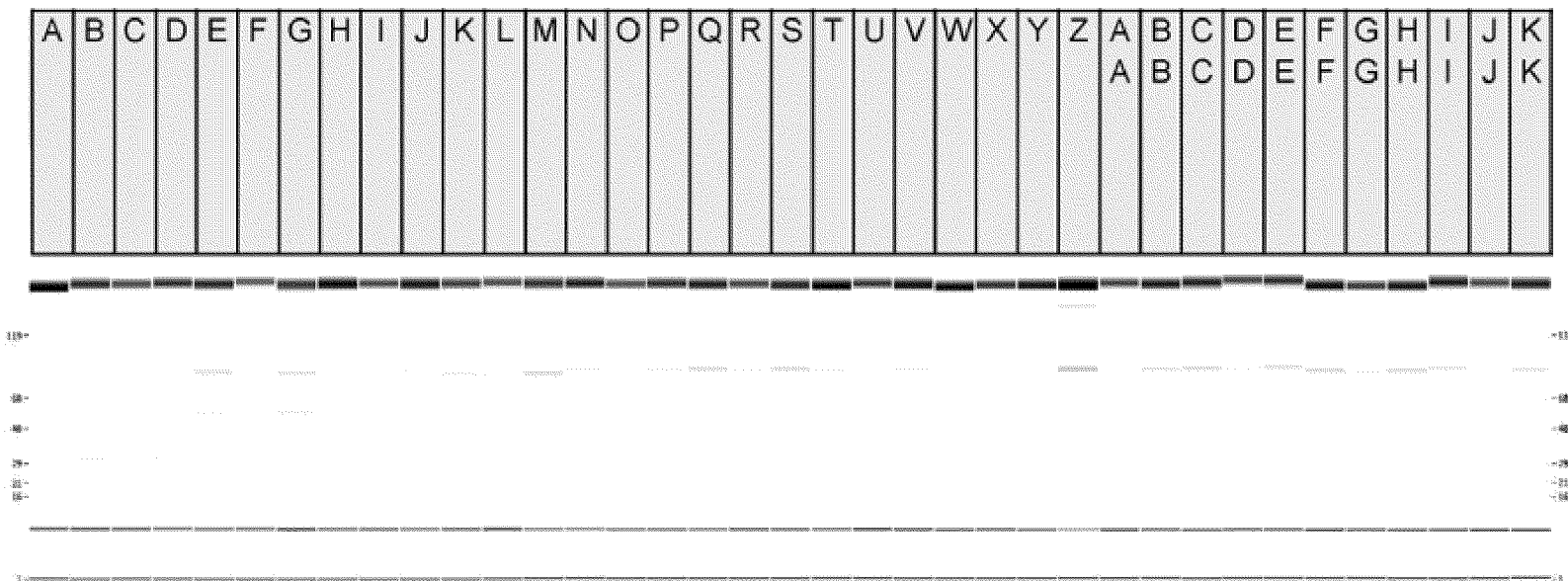


C.



ФИГ. 1

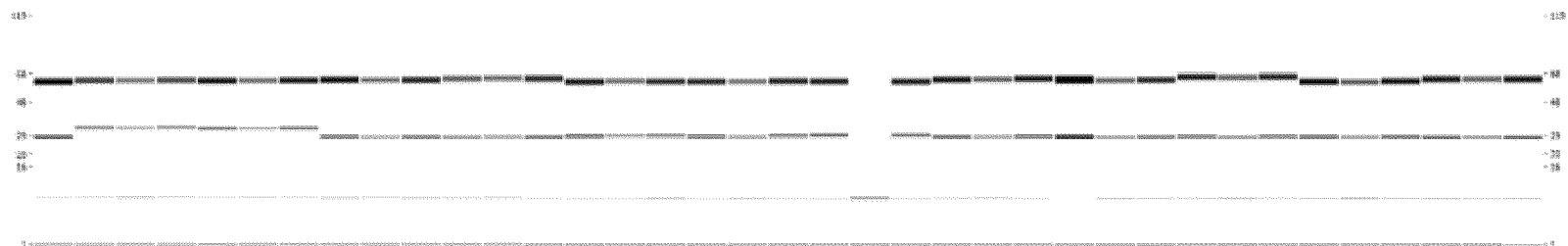
A.



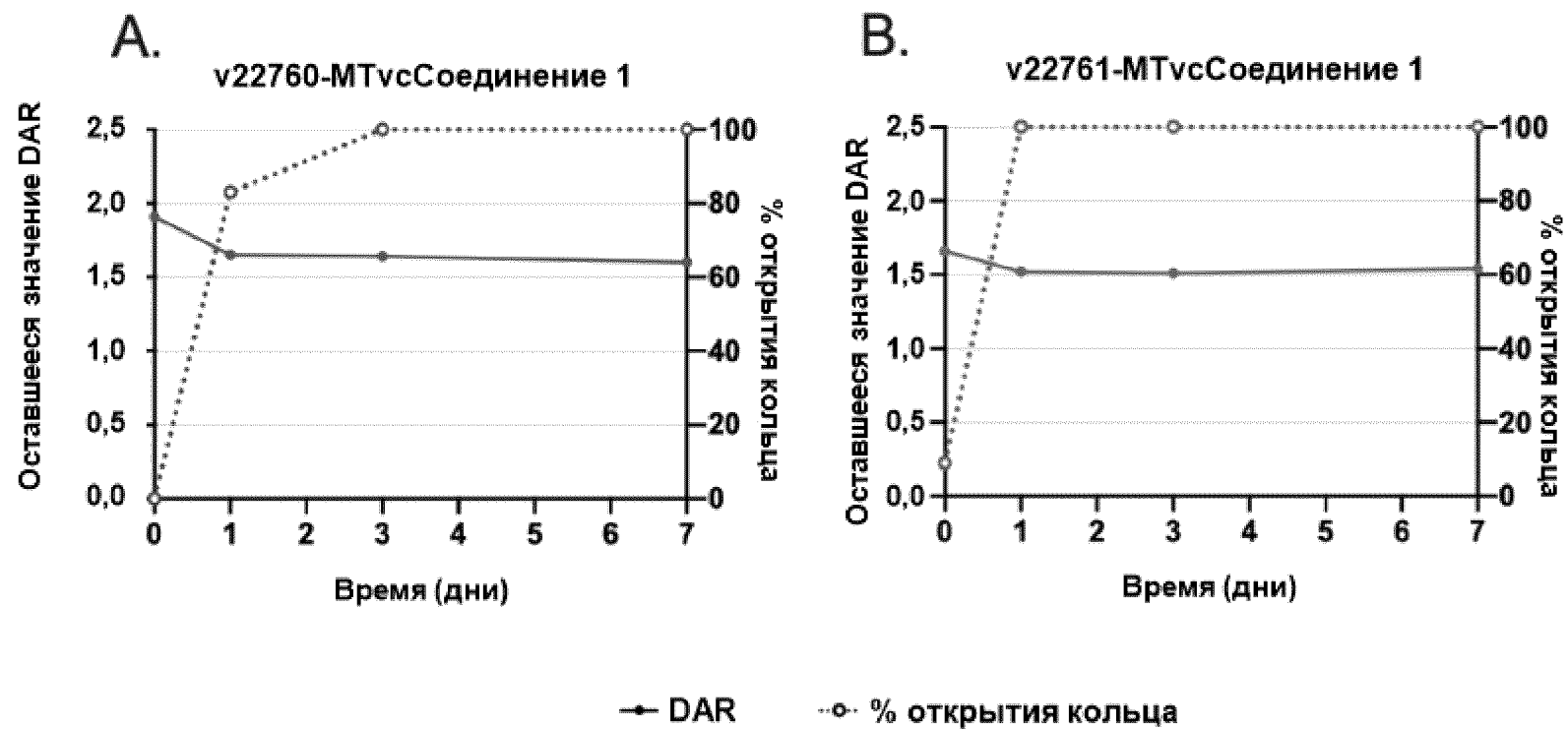
Фиг. 2

B.

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
																										A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K



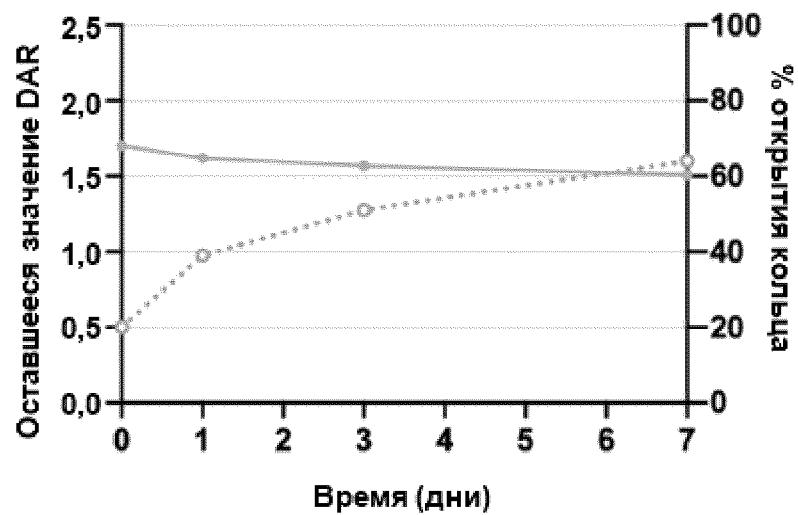
Фиг. 2 (продолж.)



Фиг. 3

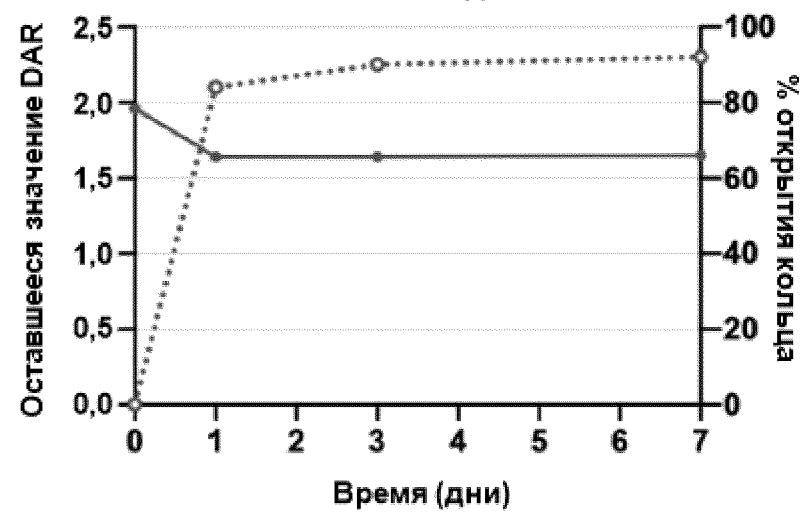
C.

v22765-MTvcСоединение 1



D.

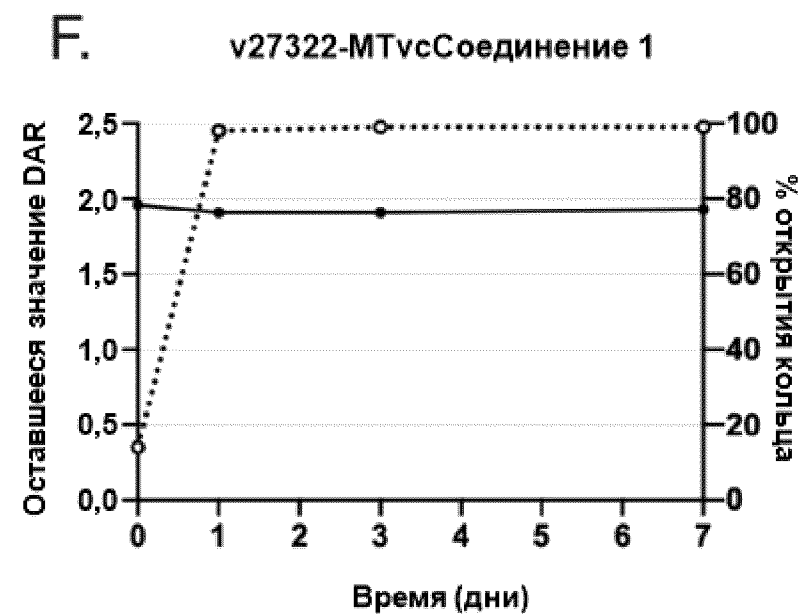
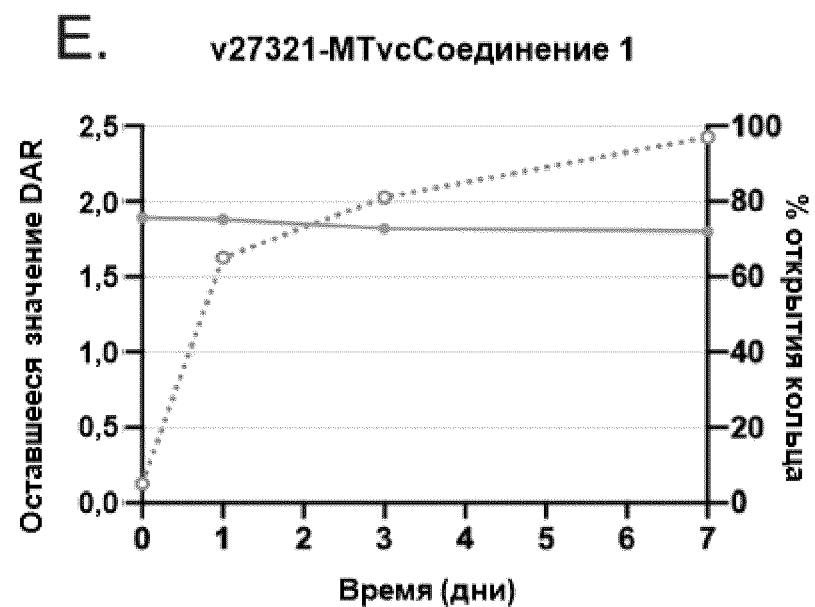
v22768-MTvcСоединение 1



—●— DAR

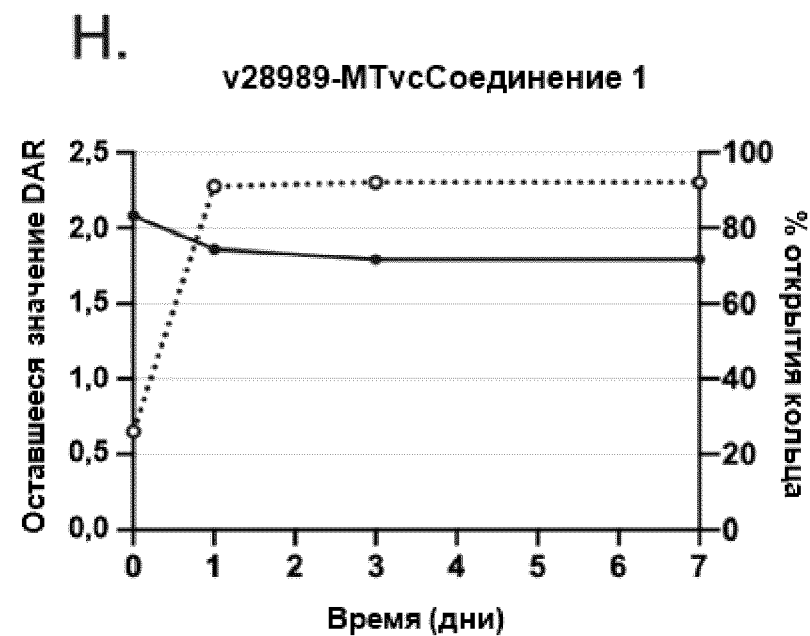
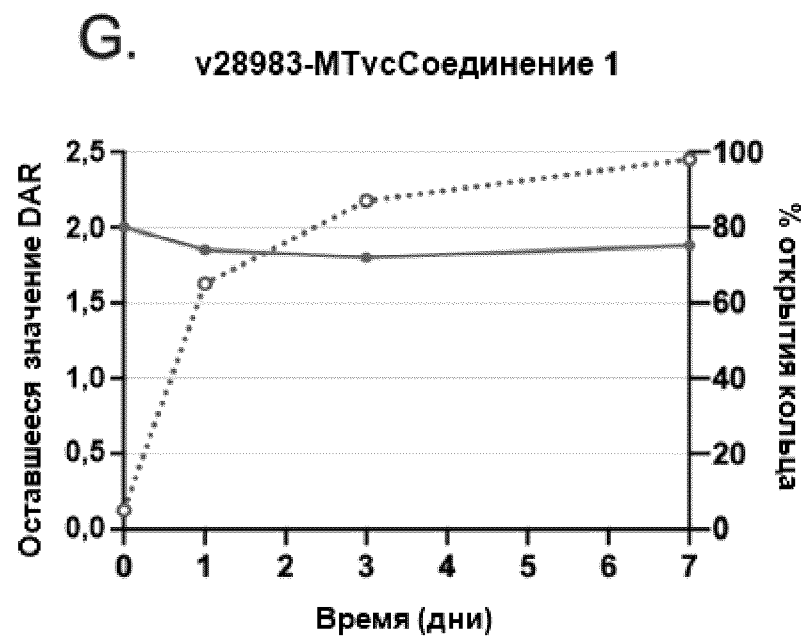
·····○····· % открытия кольца

Фиг. 3 (продолж.)



—●— DAR -○- % открытия кольца

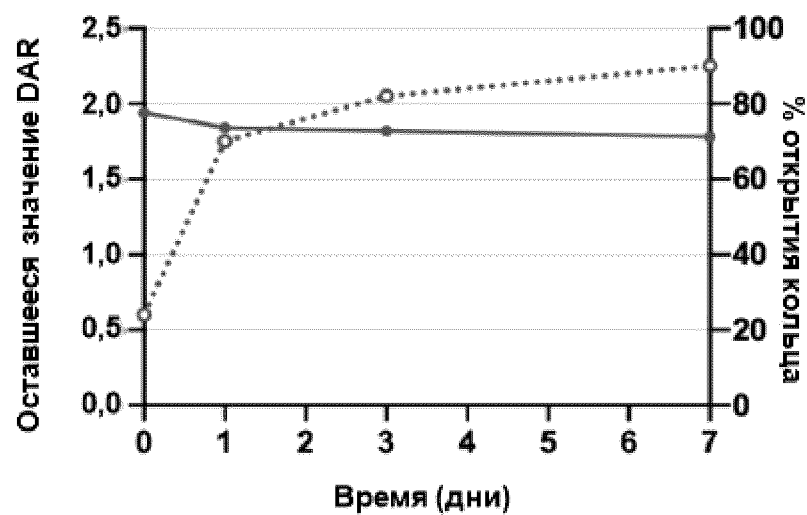
Фиг. 3 (продолж.)



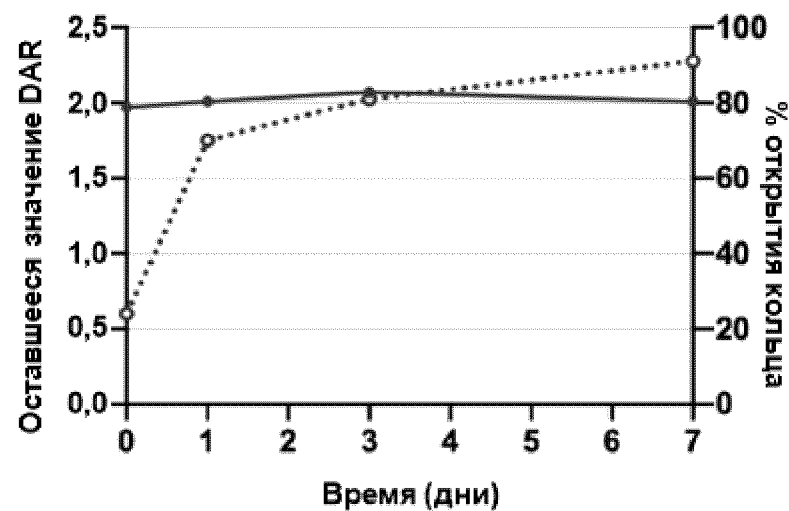
—●— DAR ...○... % открытия кольца

Фиг. 3 (продолж.)

I. v28993-MTvcСоединение 1

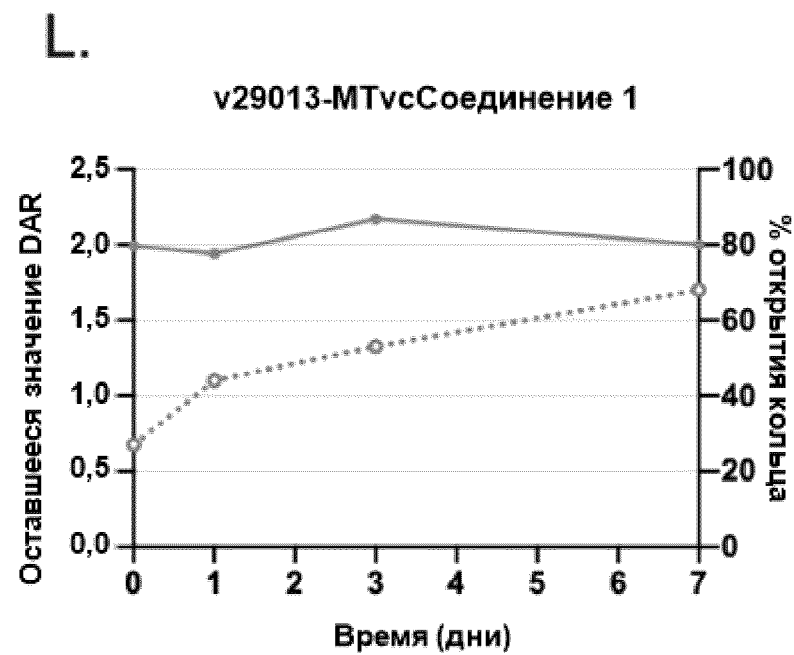
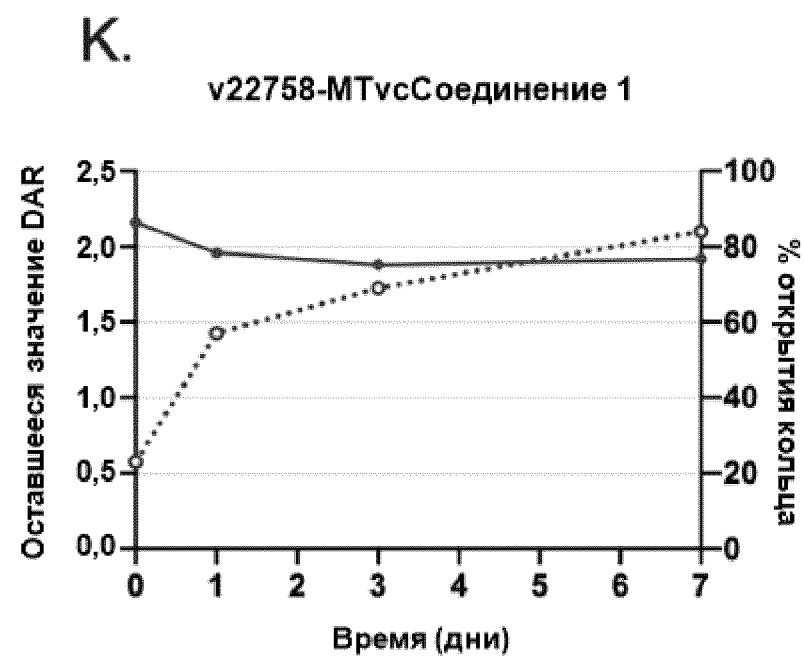


J. v29001-MTvcСоединение 1



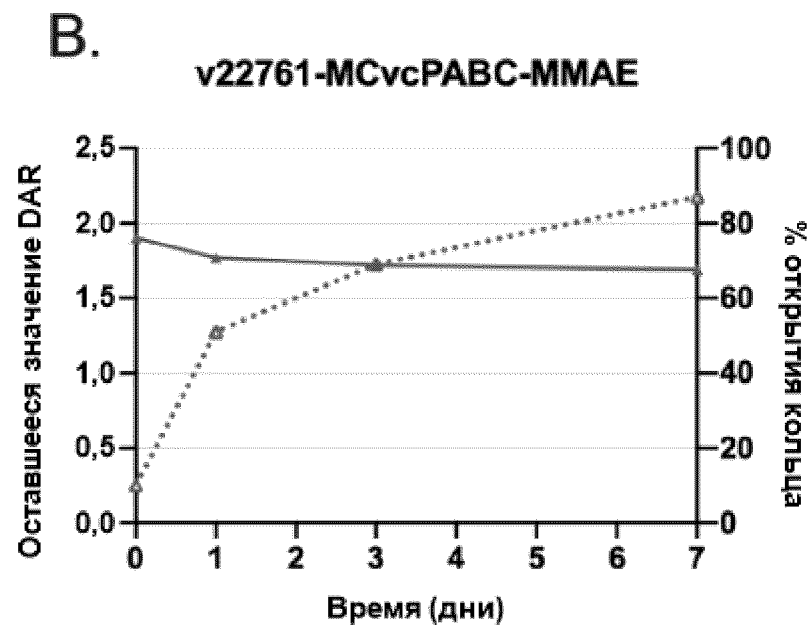
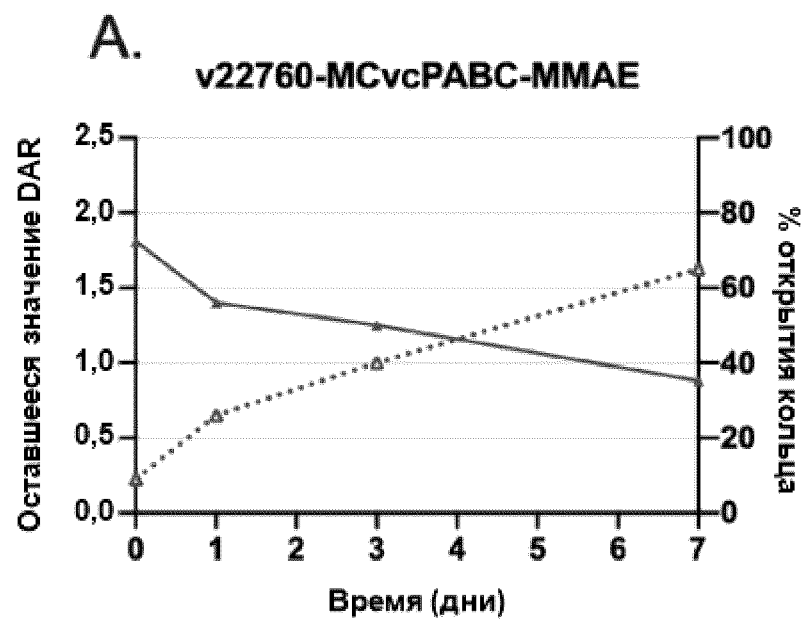
—●— DAR ···○··· % открытия кольца

Фиг. 3 (продолж.)



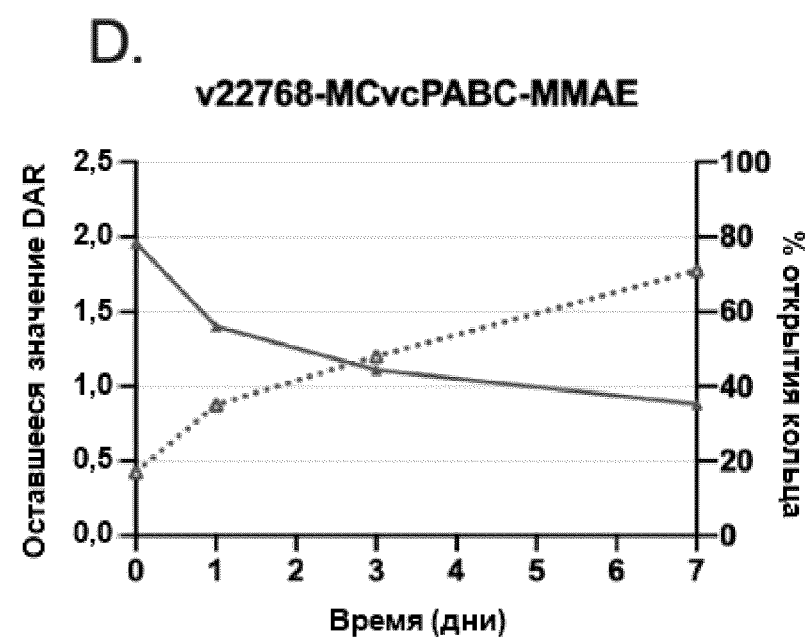
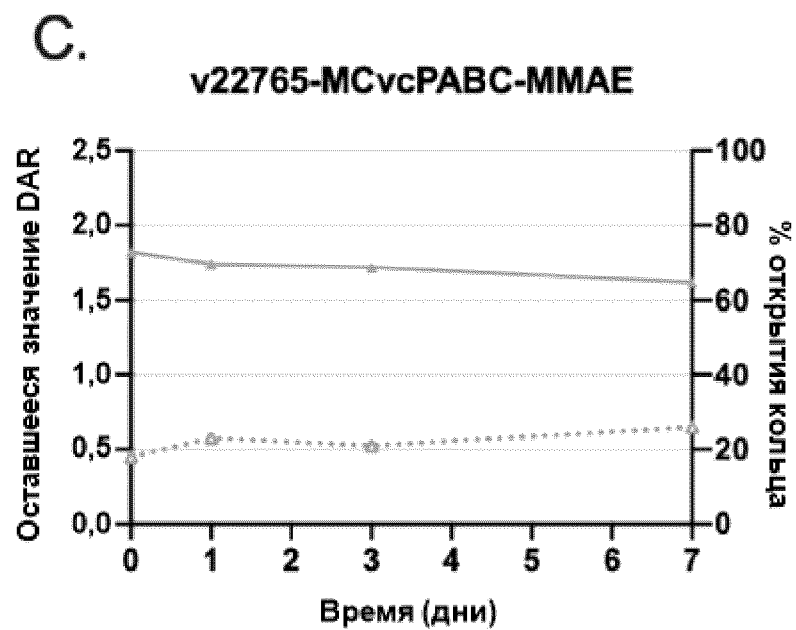
—●— DAR ···○··· % открытия кольца

Фиг. 3 (продолж.)



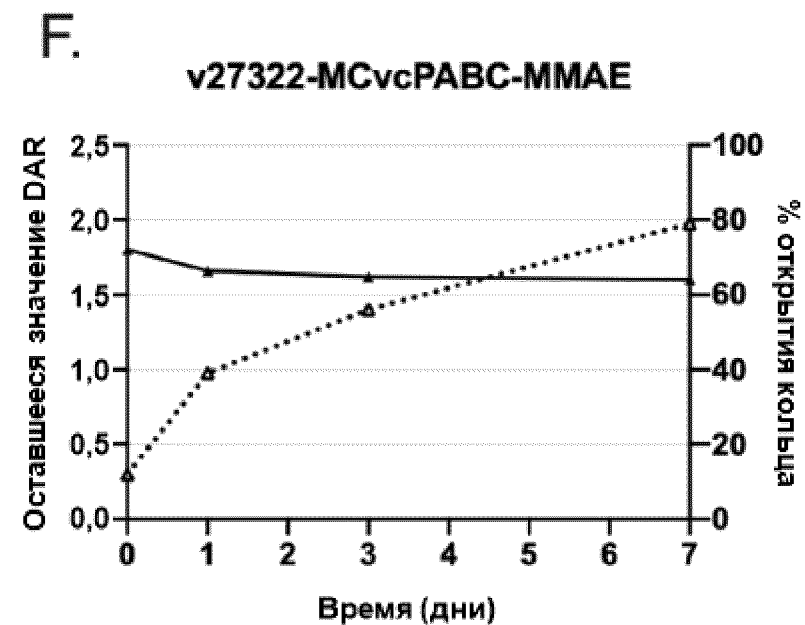
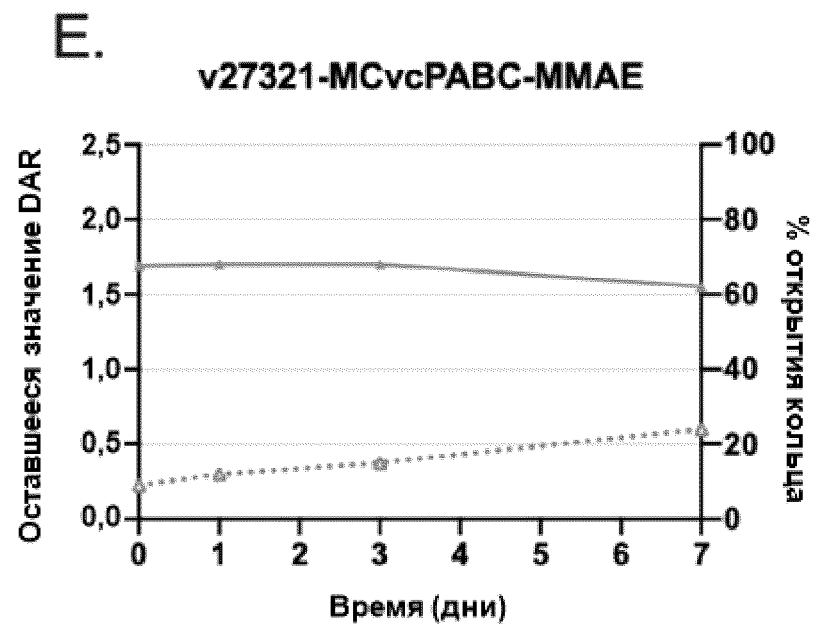
—●— DAR ···○··· % открытия кольца

Фиг. 4



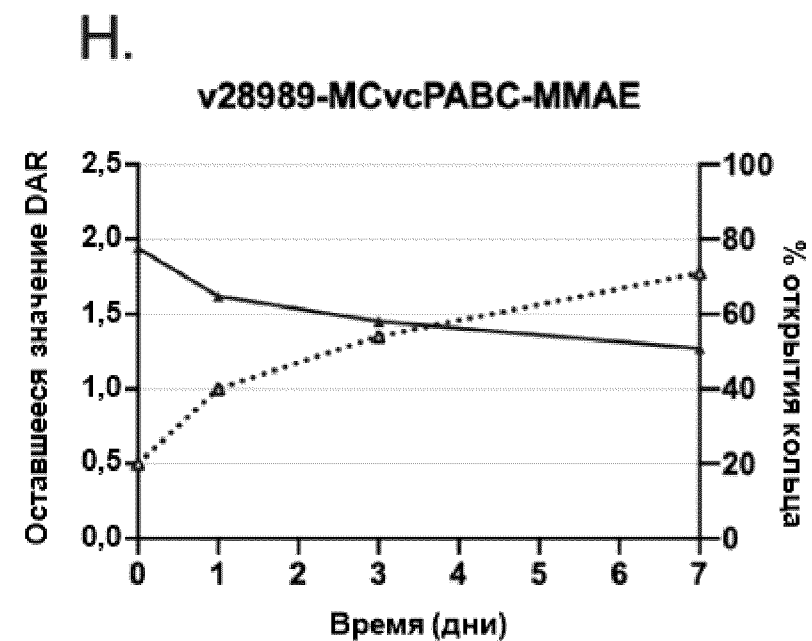
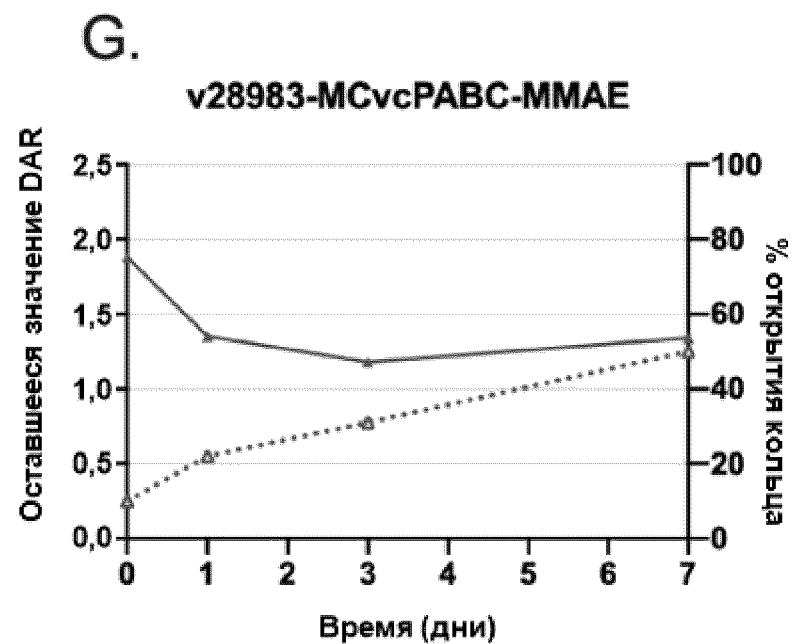
—●— DAR ···○··· % открытия кольца

Фиг. 4 (продолж.)



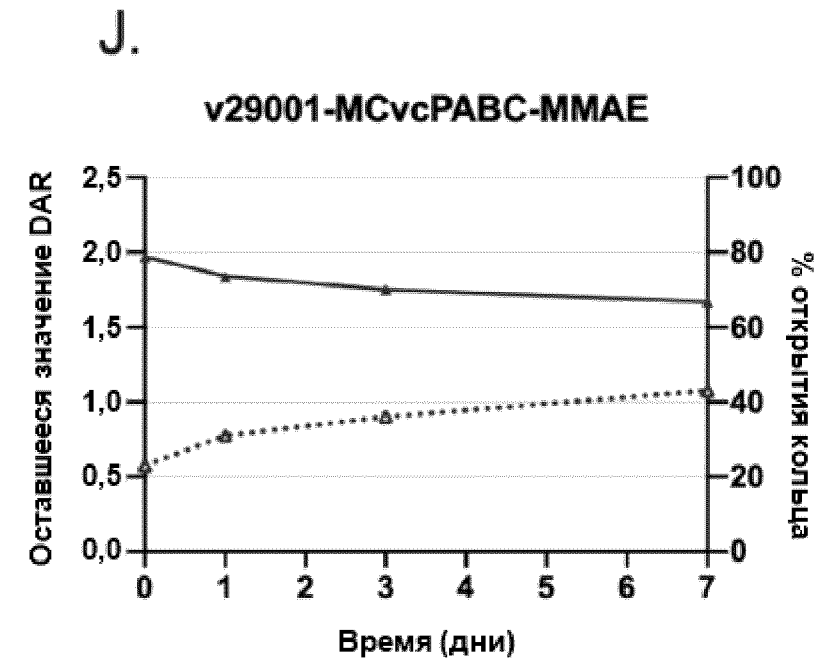
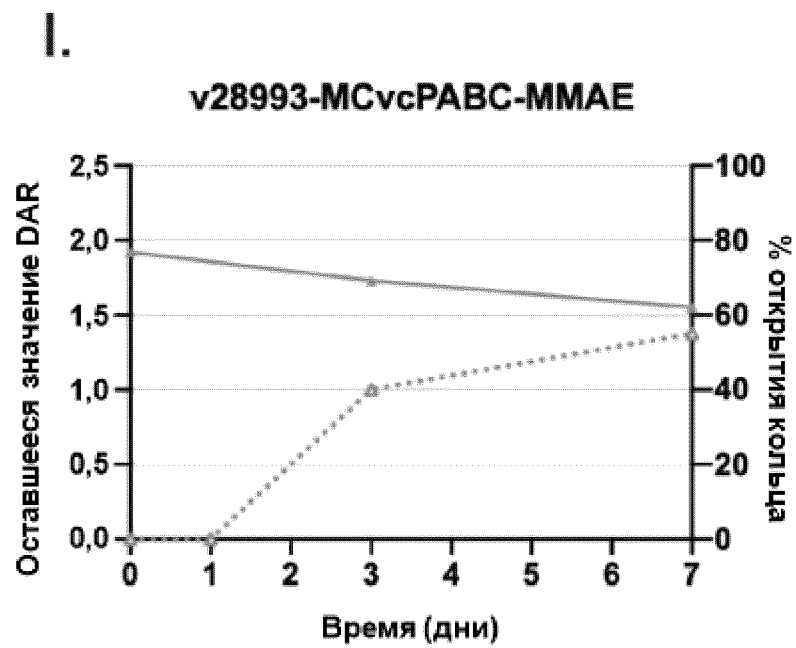
—●— DAR ...○... % открытия кольца

Фиг. 4 (продолж.)



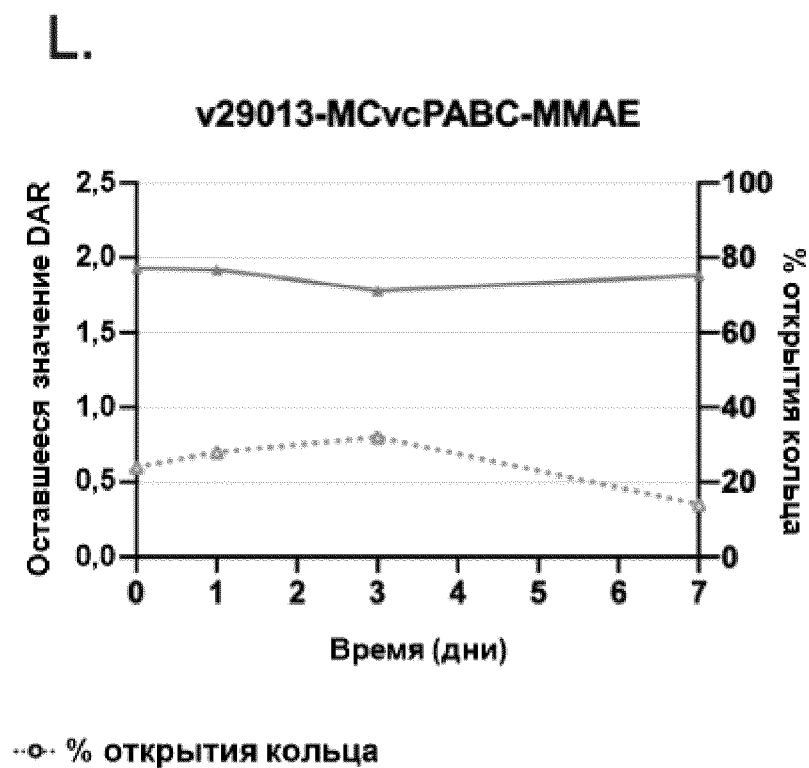
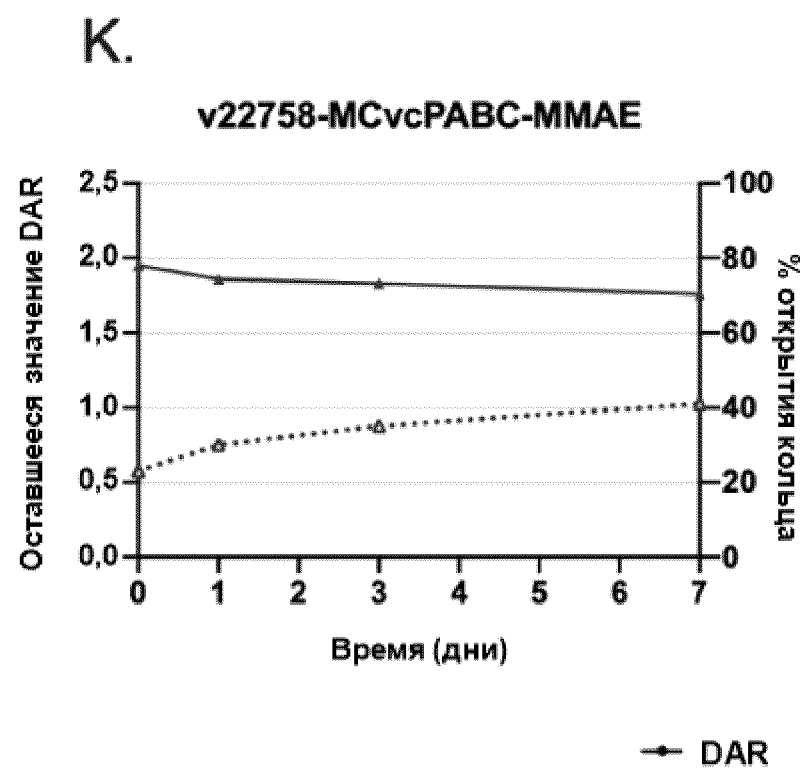
—△— DAR ...○... % открытия кольца

Фиг. 4 (продолж.)

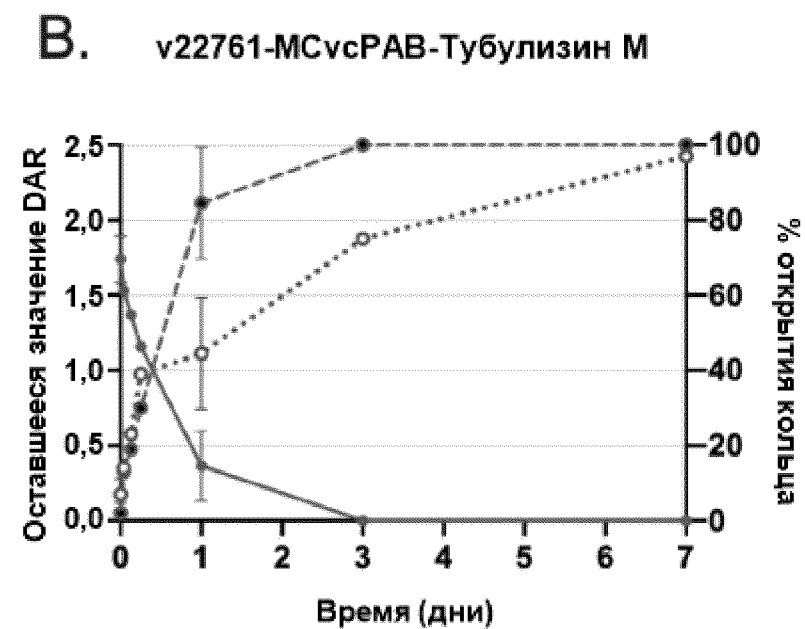
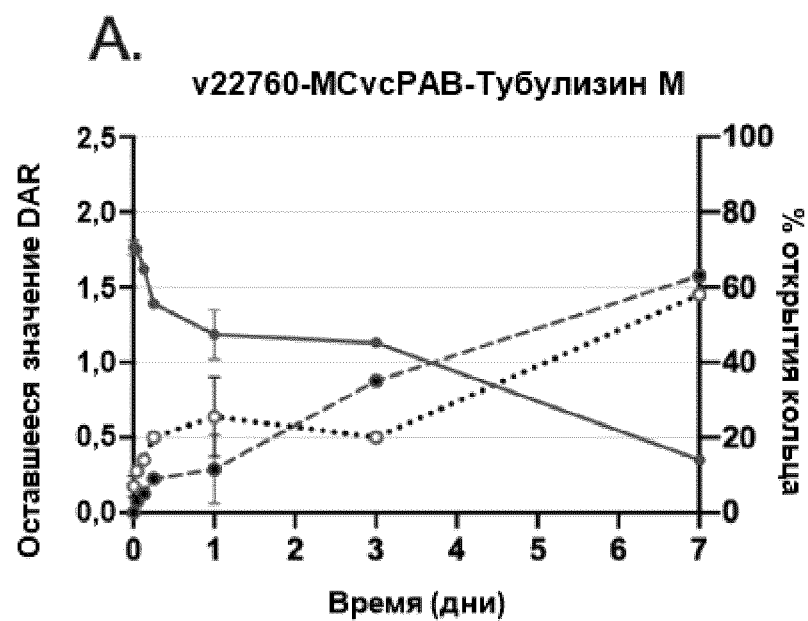


—●— DAR ···○··· % открытия кольца

Фиг. 4 (продолж.)



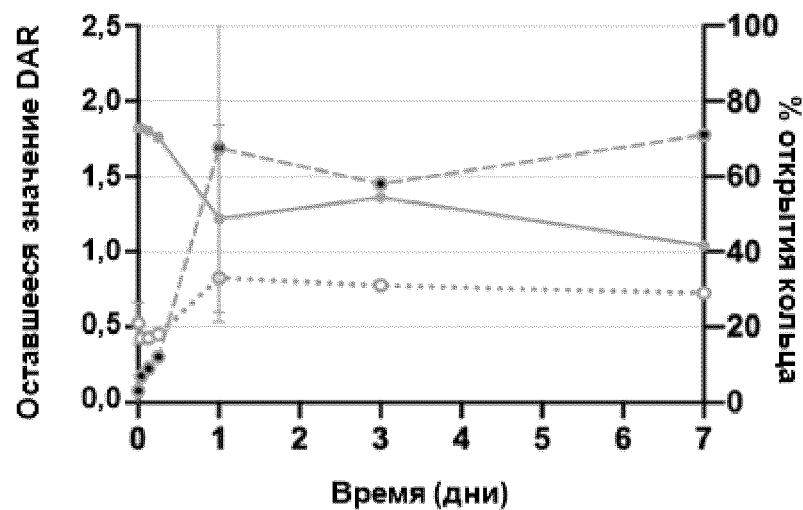
Фиг. 4 (продолж.)



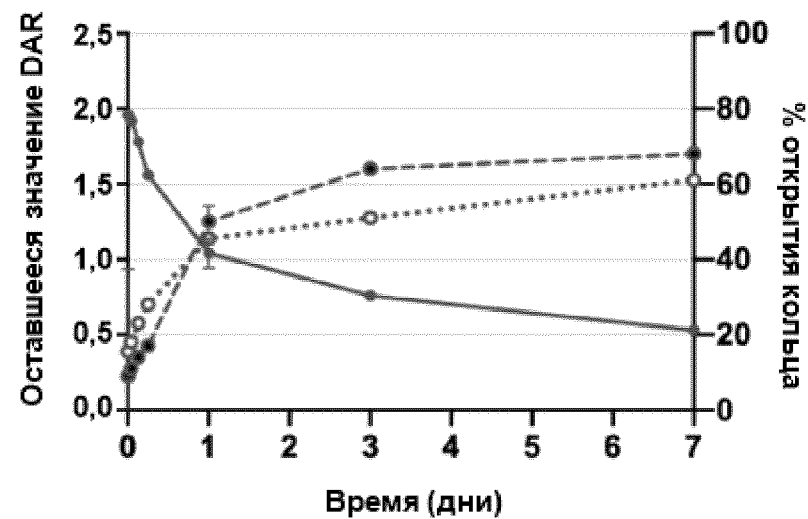
—●— DAR ···○··· % открытия кольца

Фиг. 5

C. v22765-MCvcPAB-Тубулизин М



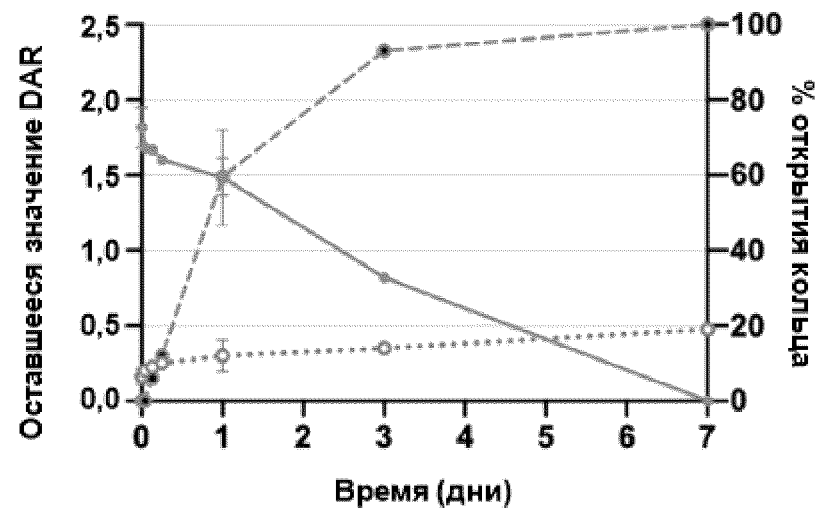
D. v22768-MCvcPAB-Тубулизин М



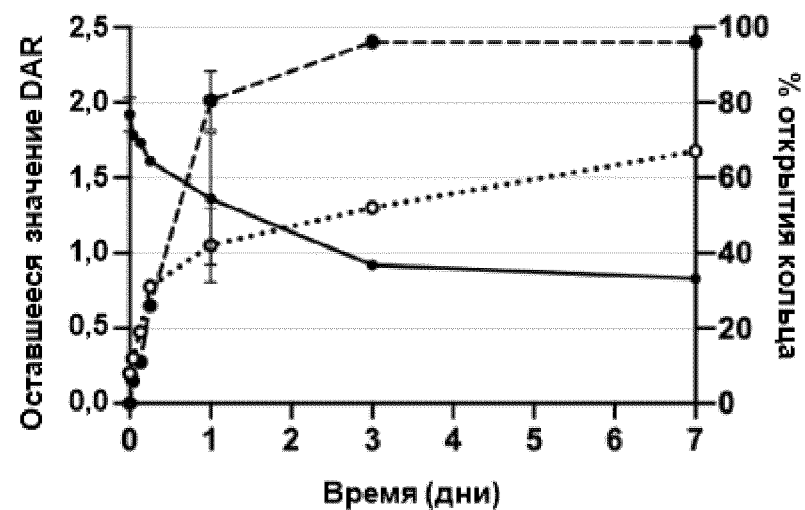
—●— DAR ···○··· % открытия кольца

Фиг. 5 (продолж.)

Е. v27321-MCvcPAB-Тубулизин М



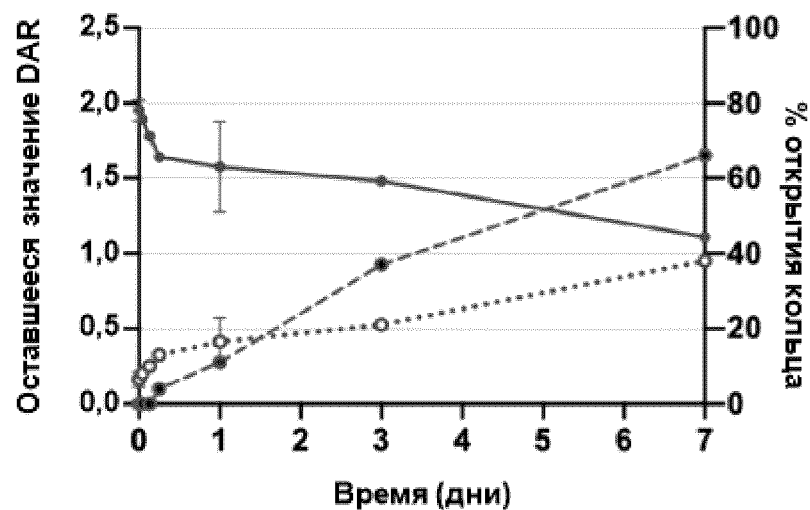
Ф. v27322-MCvcPAB-Тубулизин М



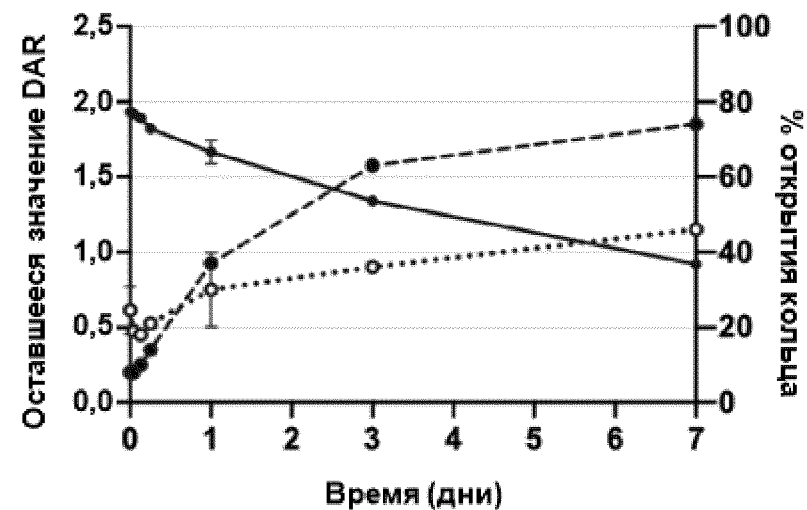
—●— DAR - - -○- - % открытия кольца

Фиг. 5 (продолж.)

G. v28983-MCvcPAB-Тубулизин М

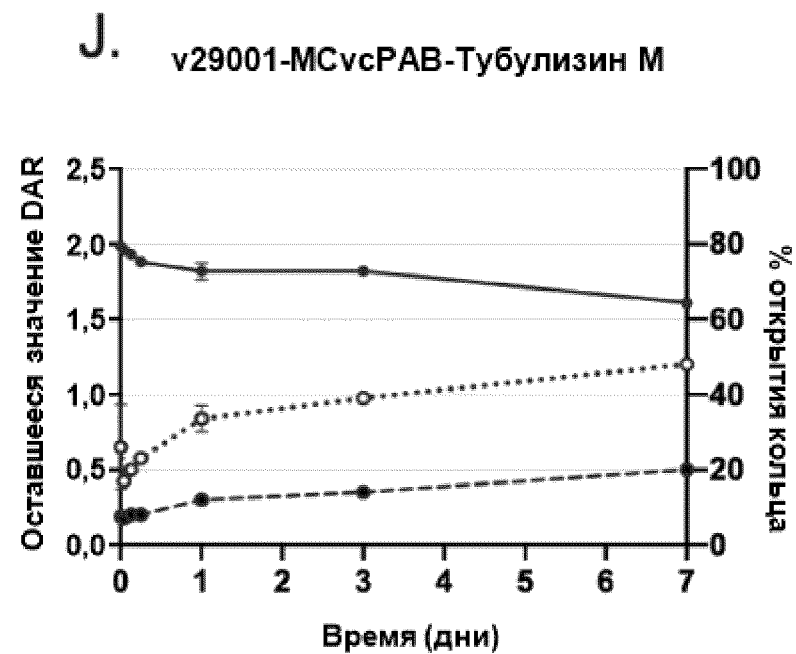
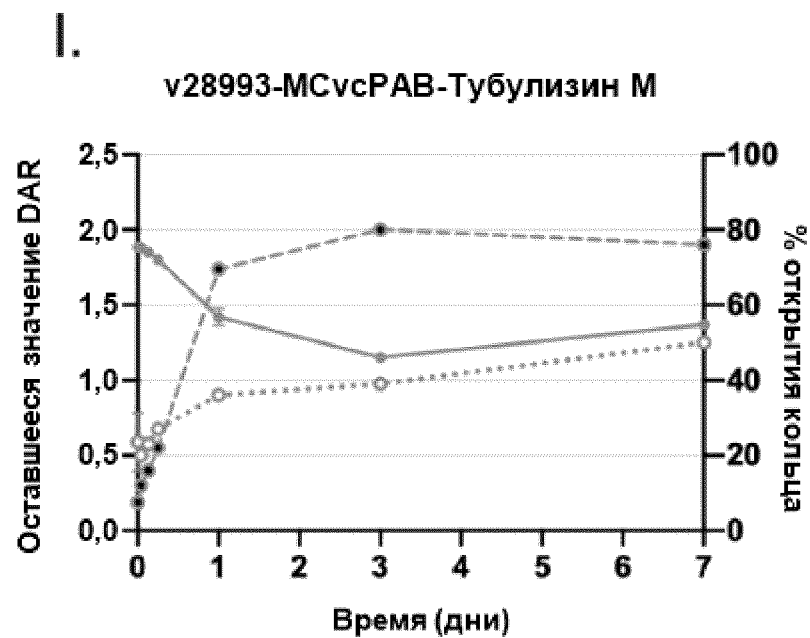


H. v28989-MCvcPAB-Тубулизин М



—●— DAR -○- % открытия кольца

Фиг. 5 (продолж.)

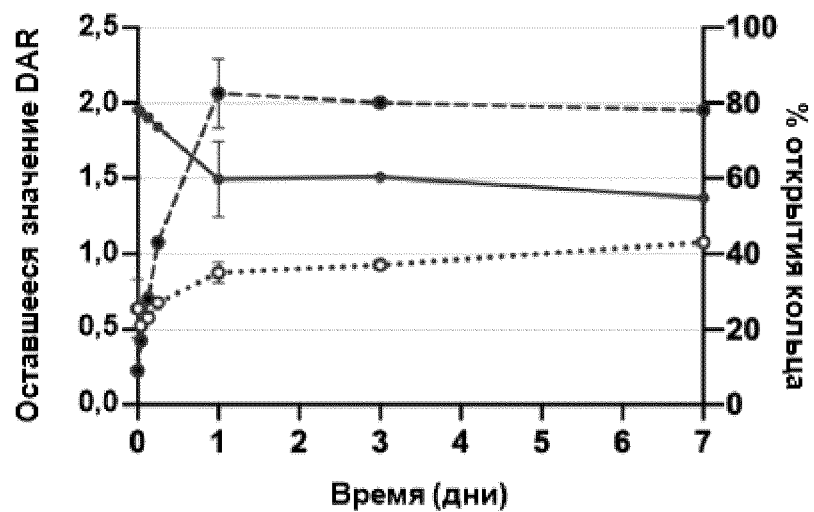


—●— DAR ···○··· % открытия кольца

Фиг. 5 (продолж.)

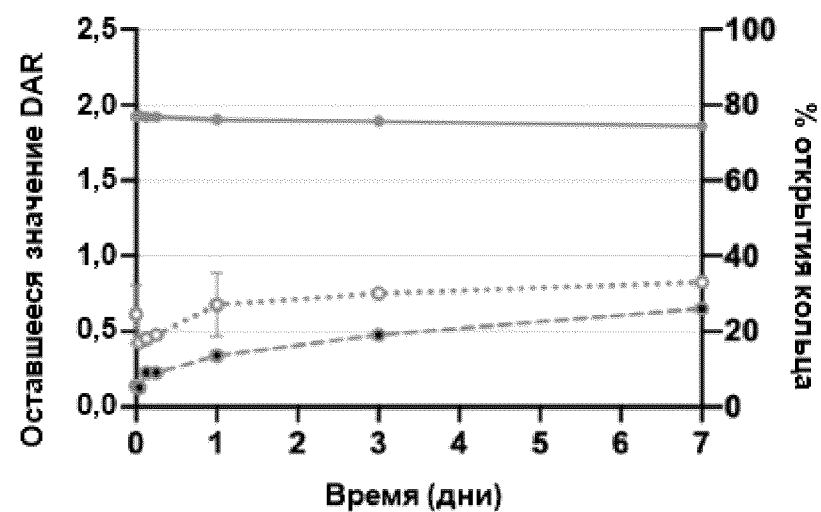
К.

v22758-MCvcPAB-Тубулизин М



Л.

v29013-MCvcPAB-Тубулизин М

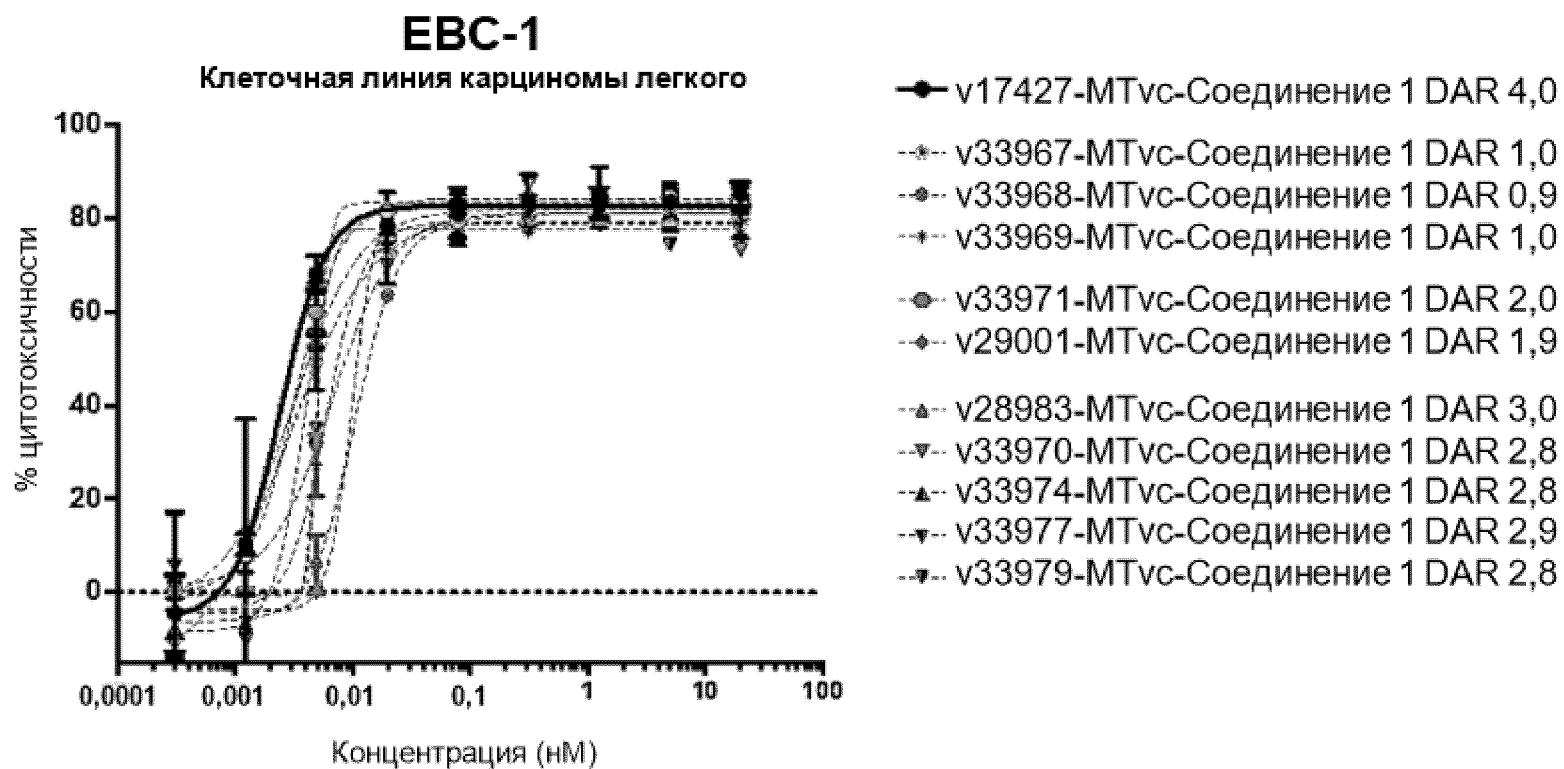


—●— DAR

·····○····· % открытия кольца

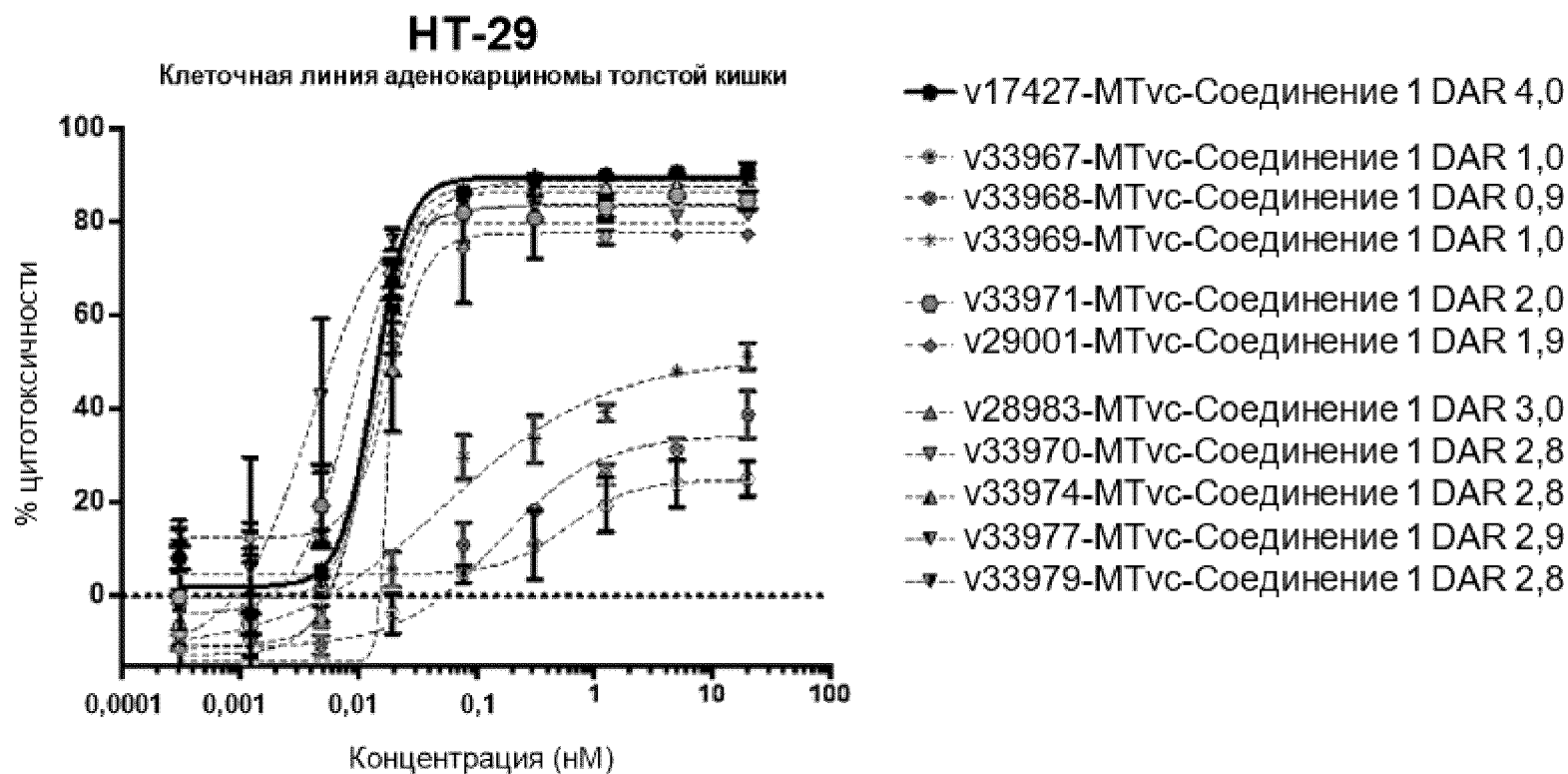
Фиг. 5 (продолж.)

A.



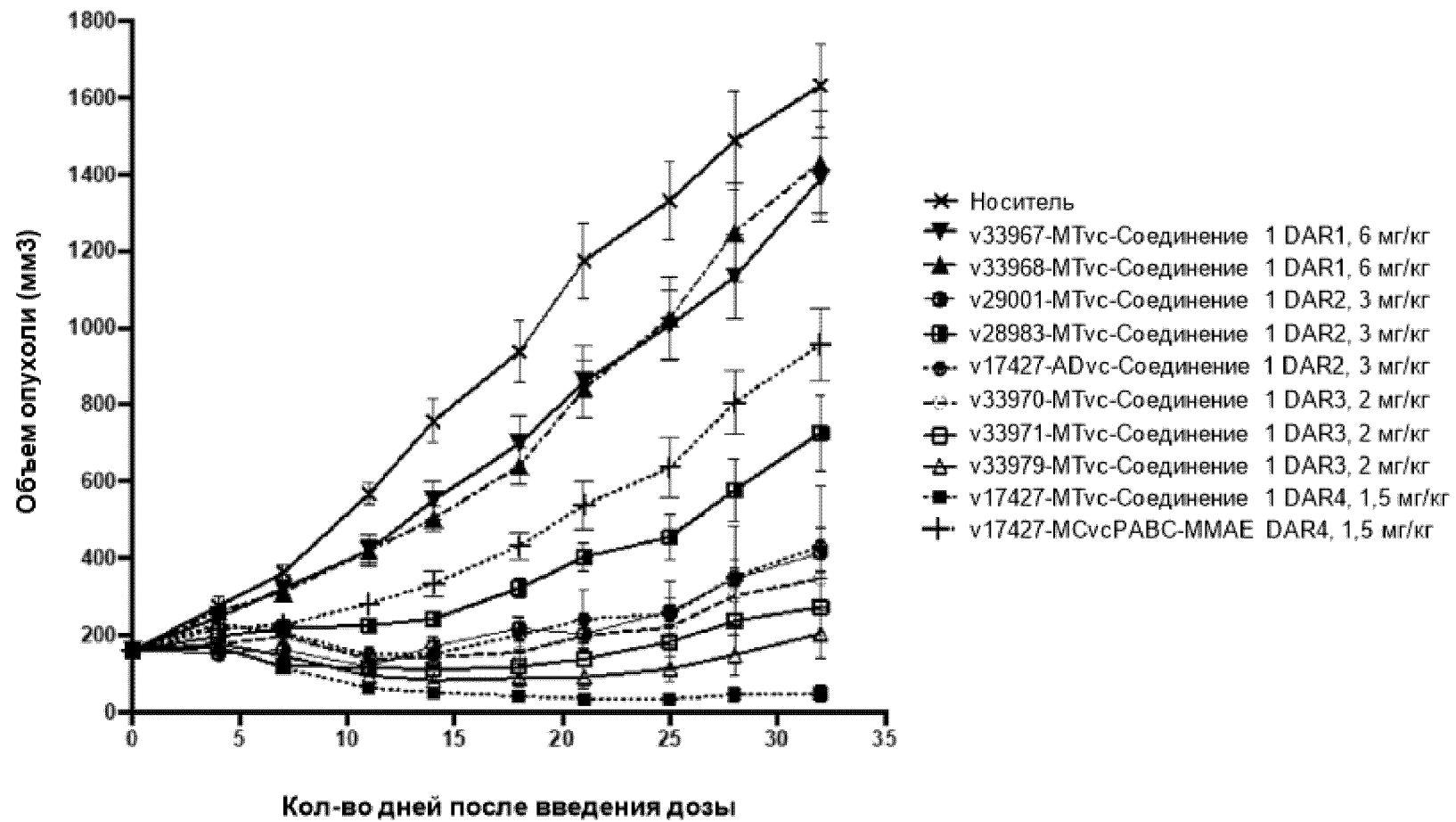
Фиг. 6

В.



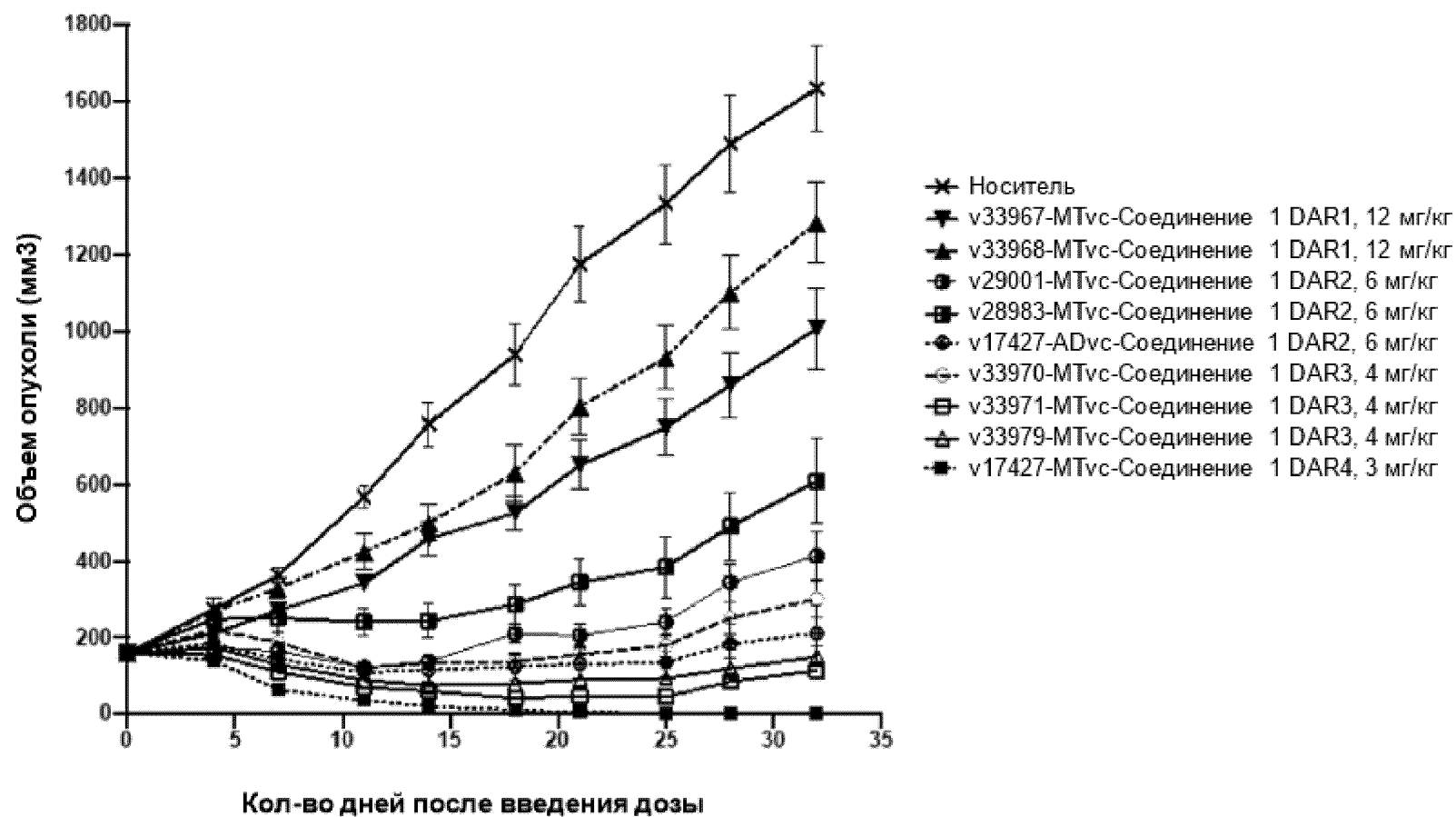
Фиг. 6 (продолж.)

A.



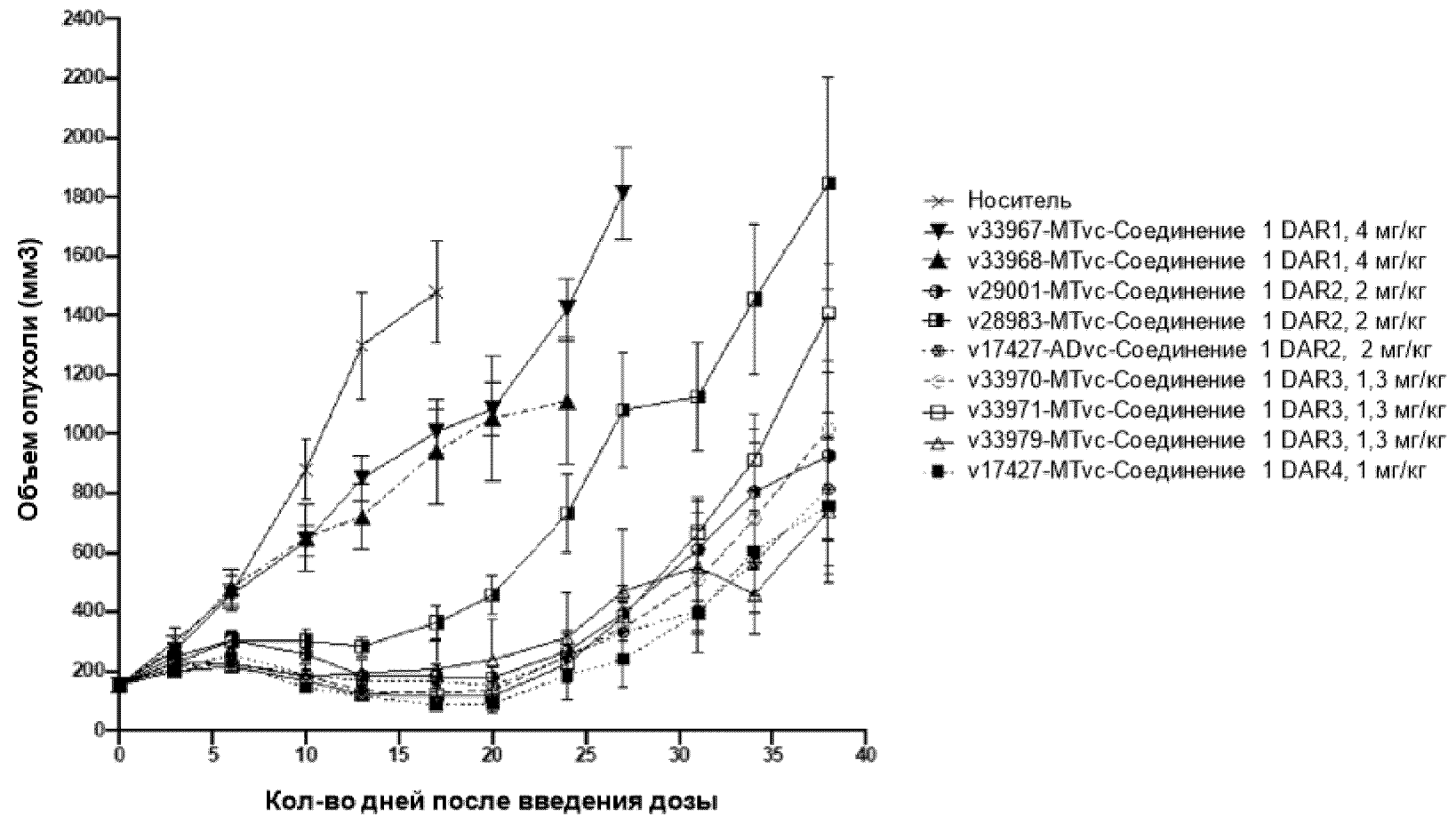
Фиг. 7

В.



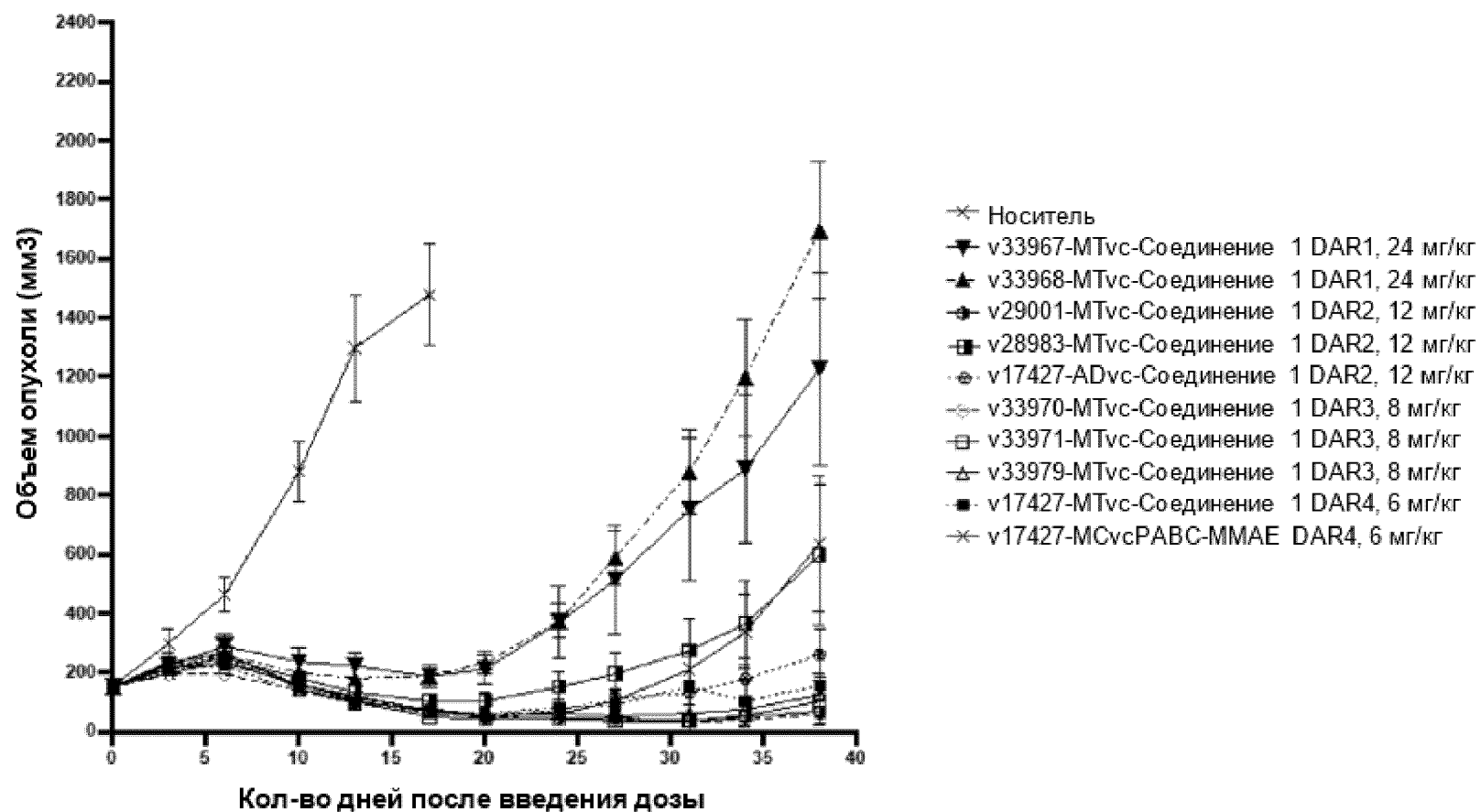
Фиг. 7 (продолж.)

A.



Фиг. 8

В.



Фиг. 8 (продолж.)

	запрос	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
IGHG1*01	Homo sapiens	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
IGHG1*03	Homo sapiens	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
IGHG3*01	Homo sapiens	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
IGHG3*18	Homo sapiens	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
IGHG3*17	Homo sapiens	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
IGHG2*04	Homo sapiens	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
IGHG4*01	Homo sapiens	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
IGHG2*01	Homo sapiens	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
IGHG2*02	Homo sapiens	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH

	запрос	TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
IGHG1*01	Homo sapiens	TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
IGHG1*03	Homo sapiens	TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
IGHG3*01	Homo sapiens	TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRV
IGHG3*18	Homo sapiens	TFPAVLQYSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRV
IGHG3*17	Homo sapiens	TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRV
IGHG2*04	Homo sapiens	TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV
IGHG4*01	Homo sapiens	TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRV
IGHG2*01	Homo sapiens	TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV
IGHG2*02	Homo sapiens	TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVTSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTV

Фиг. 9

	запос	
IGHG1*01	Homo sapiens	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
IGHG3*01	Homo sapiens	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
IGHG3*16	Homo sapiens	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHN
IGHG3*09	Homo sapiens	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHN
IGHG3*11	Homo sapiens	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHN
IGHG3*14	Homo sapiens	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHN
IGHG3*18	Homo sapiens	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHN
IGHG4*01	Homo sapiens	APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
IGHG4*02	Homo sapiens	APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN
IGHG2*01	Homo sapiens	-APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHN
IGHG2*02	Homo sapiens	-APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGMEVHN

	запос	
IGHG1*01	Homo sapiens	AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
IGHG3*01	Homo sapiens	AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
IGHG3*16	Homo sapiens	AKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTK
IGHG3*09	Homo sapiens	AKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTK
IGHG3*11	Homo sapiens	AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTK
IGHG3*14	Homo sapiens	AKTKLREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTK
IGHG3*18	Homo sapiens	AKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTK
IGHG4*01	Homo sapiens	AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
IGHG4*02	Homo sapiens	AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK
IGHG2*01	Homo sapiens	AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
IGHG2*02	Homo sapiens	AKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK

Фиг. 10

	запос	GQPREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
IGHG1*01	Homo sapiens	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
IGHG1*04	Homo sapiens	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
IGHG1*03	Homo sapiens	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
IGHG2*01	Homo sapiens	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
IGHG2*06	Homo sapiens	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKT
IGHG3*15	Homo sapiens	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
IGHG3*17	Homo sapiens	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAMEWESSGQPENNYKT
IGHG4*03	Homo sapiens	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
IGHG3*14	Homo sapiens	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYNT
IGHG4*01	Homo sapiens	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
IGHG3*06	Homo sapiens	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYKT
IGHG3*08	Homo sapiens	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYNT
IGHG3*01	Homo sapiens	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNT
IGHG3*03	Homo sapiens	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNT
IGHG3*13	Homo sapiens	GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYKT
	запос	TPPVLDSDGSFALVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
IGHG1*01	Homo sapiens	TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
IGHG1*04	Homo sapiens	TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
IGHG1*03	Homo sapiens	TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
IGHG2*01	Homo sapiens	TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
IGHG2*06	Homo sapiens	TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
IGHG3*15	Homo sapiens	TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPG
IGHG3*17	Homo sapiens	TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
IGHG4*03	Homo sapiens	TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
IGHG3*14	Homo sapiens	TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPG
IGHG4*01	Homo sapiens	TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG
IGHG3*06	Homo sapiens	TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG
IGHG3*08	Homo sapiens	TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG
IGHG3*01	Homo sapiens	TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG
IGHG3*03	Homo sapiens	TPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG
IGHG3*13	Homo sapiens	TPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQEGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPG

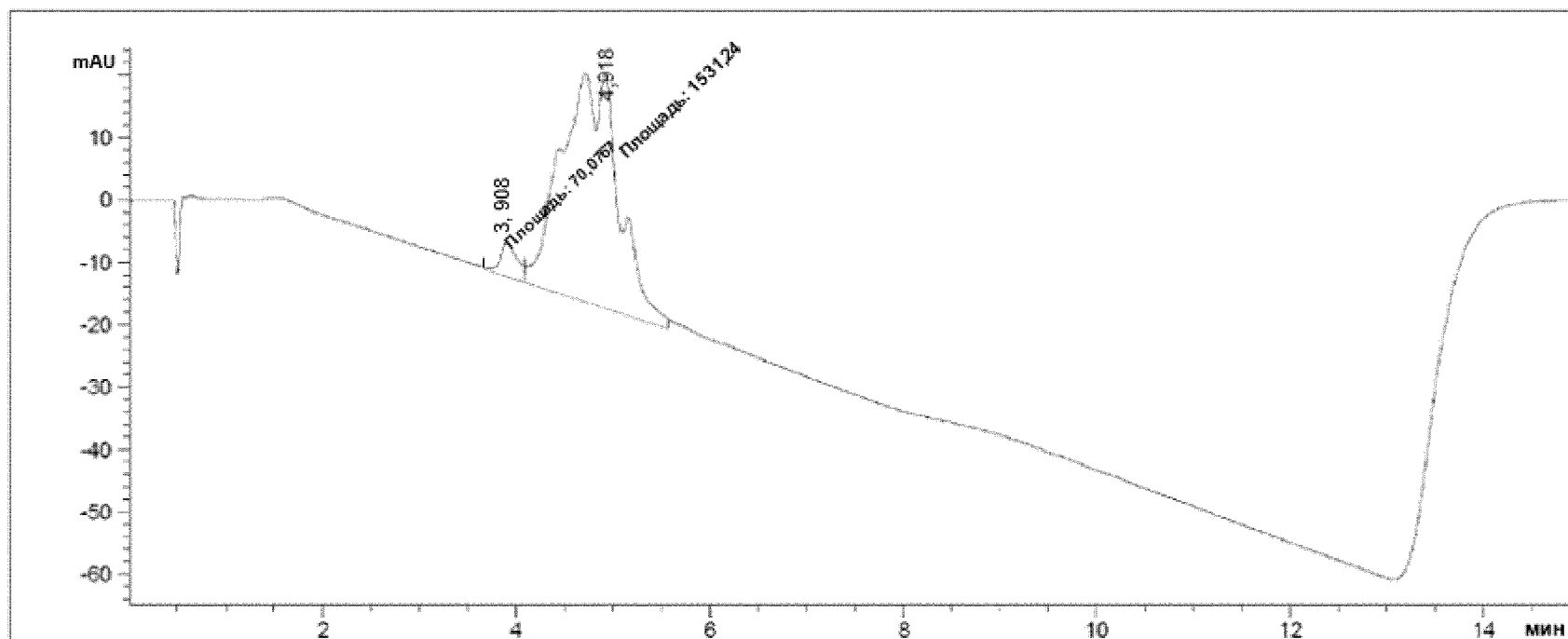
Фиг. 11

запрос	-RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV	DNALQSGNSQES
IGKC*01 Homo sapiens	-RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV	DNALQSGNSQES
IGKC*04 Homo sapiens	-RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV	DNALQSGNSQES
IGKC*05 Homo sapiens	-RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV	DNALQSGNSQES
IGKC*02 Homo sapiens	-RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV	DNALQSGNSQES
IGKC*03 Homo sapiens	-RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV	DNALQSGNSQES
IGLC3*02 Homo sapiens	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGPTVAVWKA	DSSPVKAG-VET
IGLC3*03 Homo sapiens	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA	DSSPVKAG-VET
IGLC6*01 Homo sapiens	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKVAWKA	DGSPVNTG-VET
IGLC2*01 Homo sapiens	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA	DSSPVKAG-VET
IGLC7*01 Homo sapiens	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFYPGAVTVAWKA	DGSPVKVG-VET
IGLC7*03 Homo sapiens	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLVSDFNPGAVTVAWKA	DGSPVKVG-VET
IGLC1*02 Homo sapiens	GQPKANPTVTTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKA	DGSPVKAG-VET

запрос	VTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC-
IGKC*01 Homo sapiens	VTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC-
IGKC*04 Homo sapiens	VTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC-
IGKC*05 Homo sapiens	VTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC-
IGKC*02 Homo sapiens	VTEQESKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYAGEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC-
IGKC*03 Homo sapiens	VTEQESKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC-
IGLC3*02 Homo sapiens	TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTV--EKTVAPTCS
IGLC3*03 Homo sapiens	TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTV--EKTVAPTCS
IGLC6*01 Homo sapiens	TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV--EKTVAPECS
IGLC2*01 Homo sapiens	TTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV--EKTVAPTCS
IGLC7*01 Homo sapiens	TKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCRVTHEGSTV--EKTVAPECS
IGLC7*03 Homo sapiens	TKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCRVTHEGSTV--EKTVAPECS
IGLC1*02 Homo sapiens	TKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTV--EKTVAPTCS

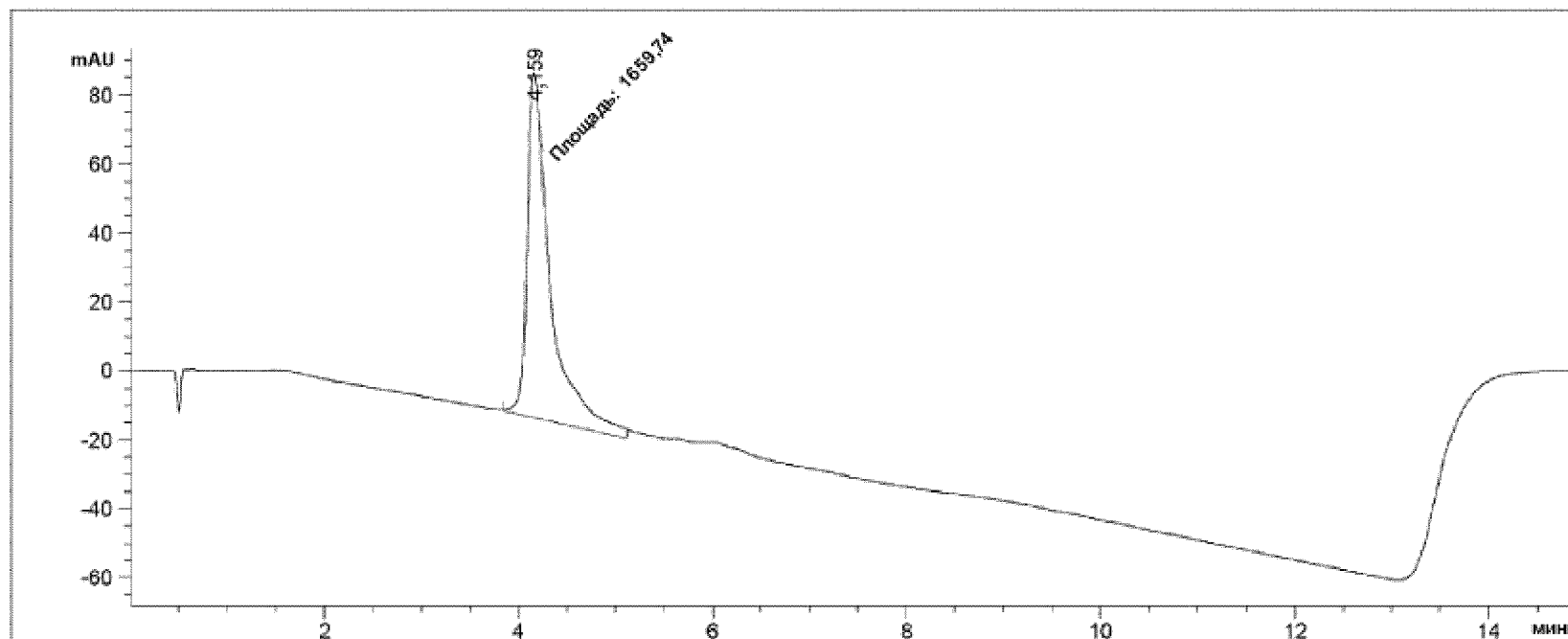
Фиг. 12

A.



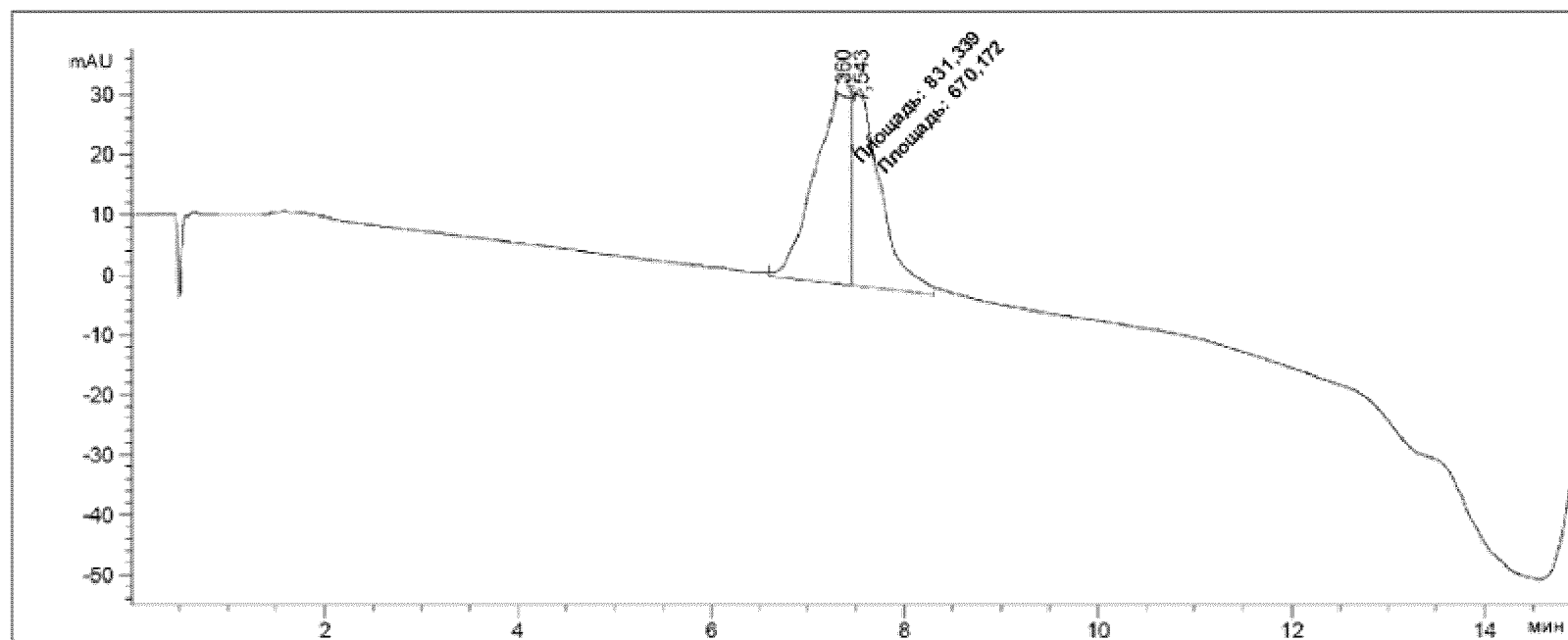
Фиг. 13

В.



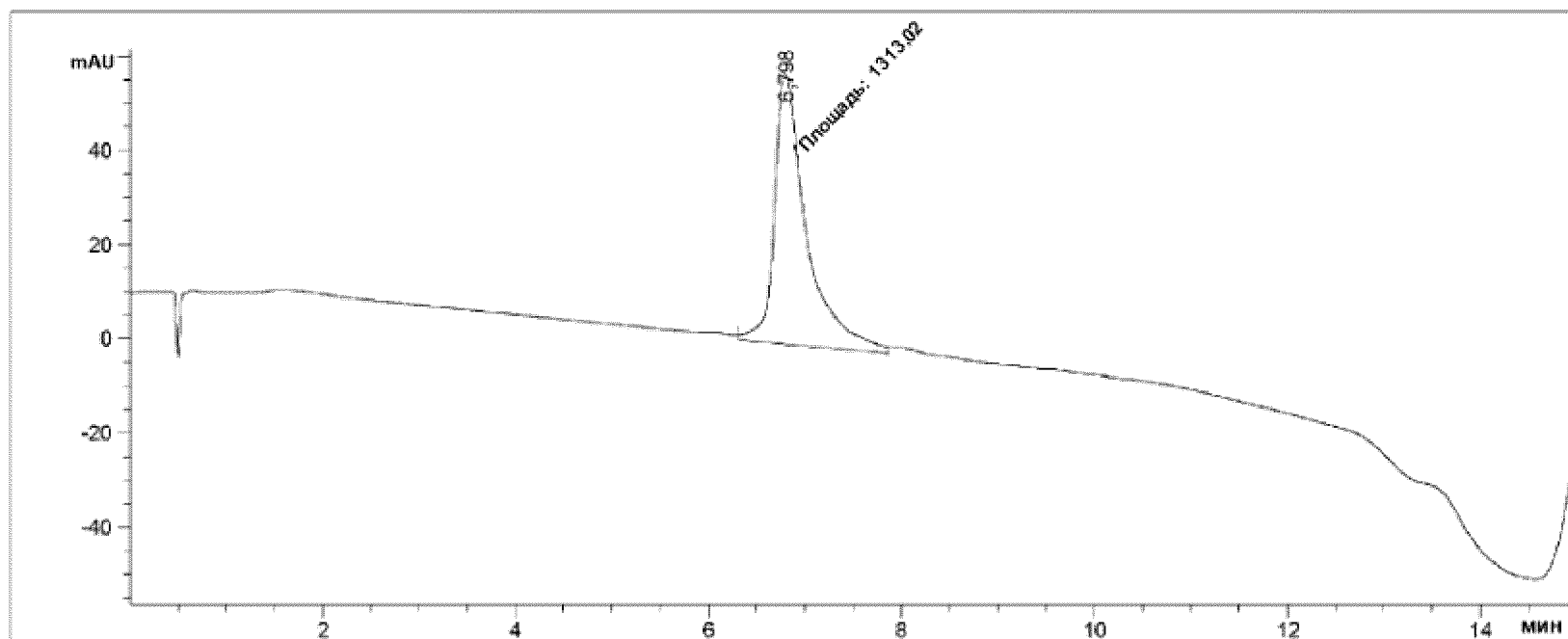
Фиг. 13 (продолж.)

A.



Фиг. 14

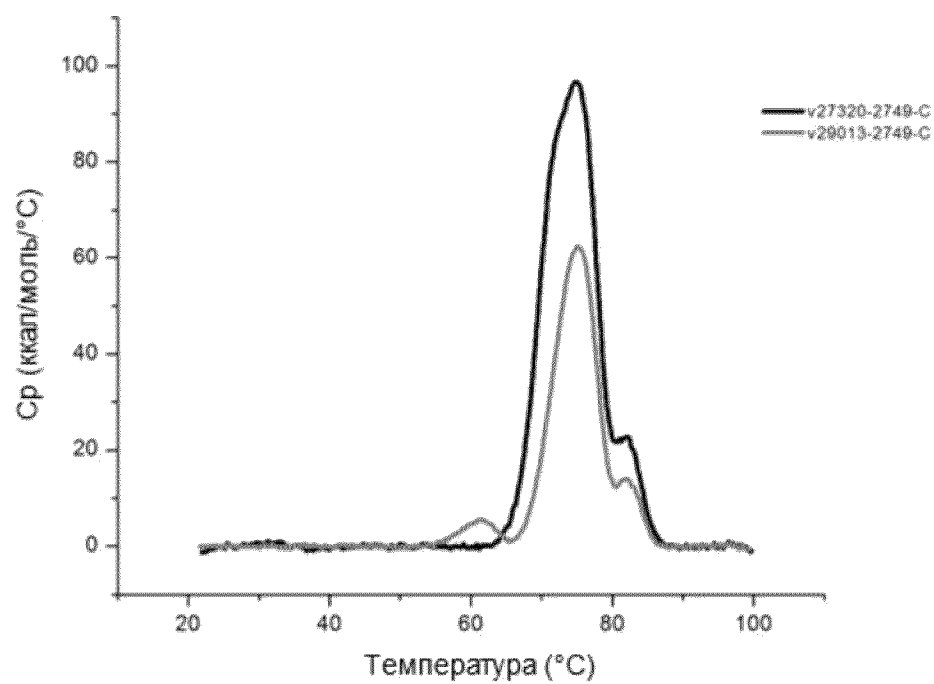
В.



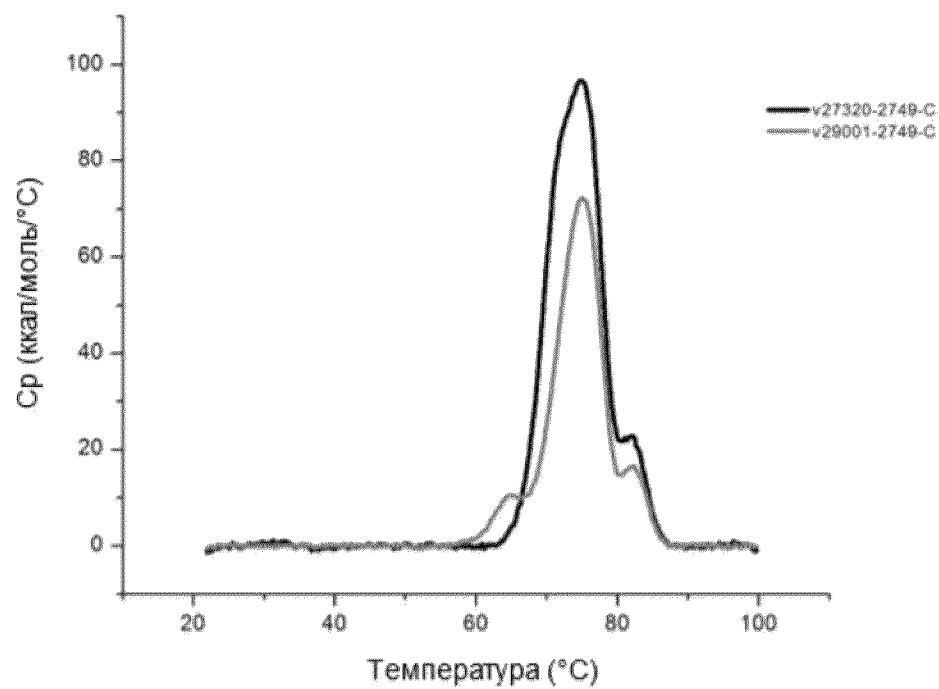
35/42

Фиг. 14 (продолж.)

A.

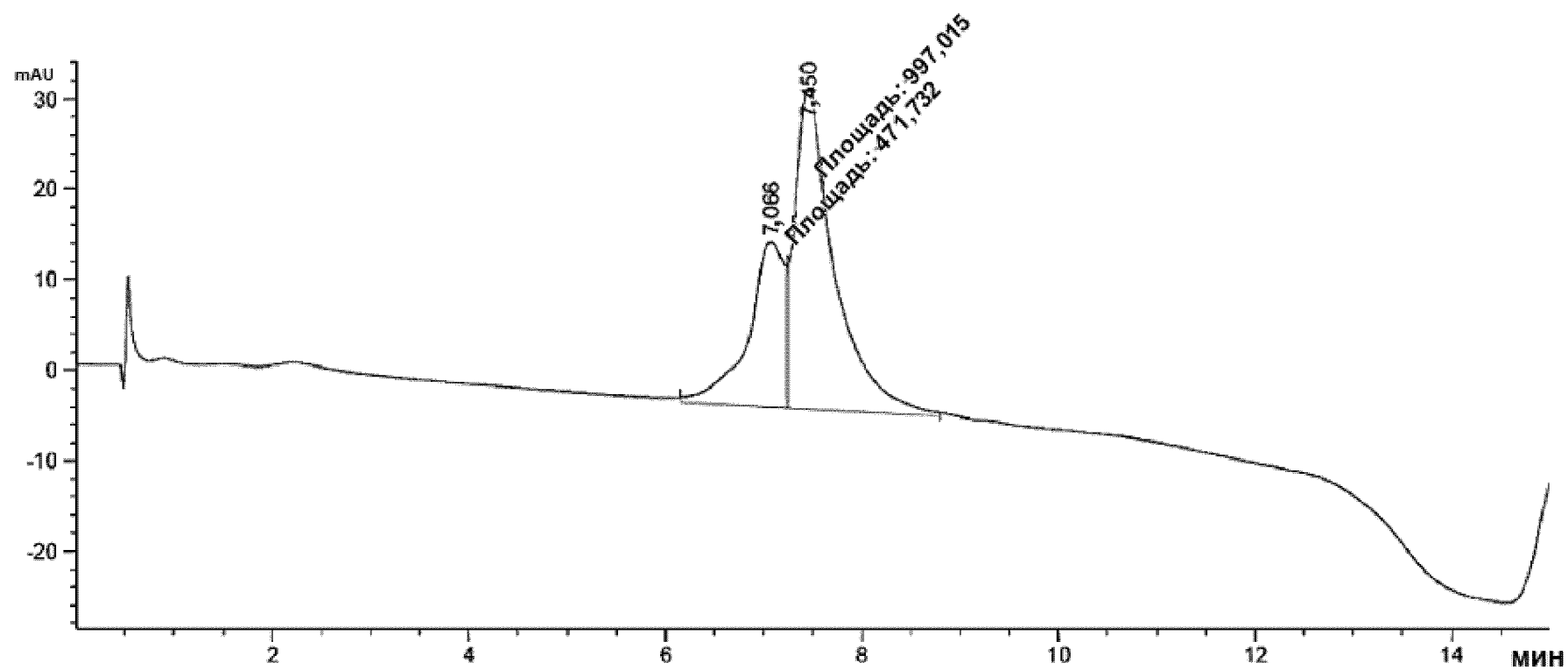


B.



Фиг. 15

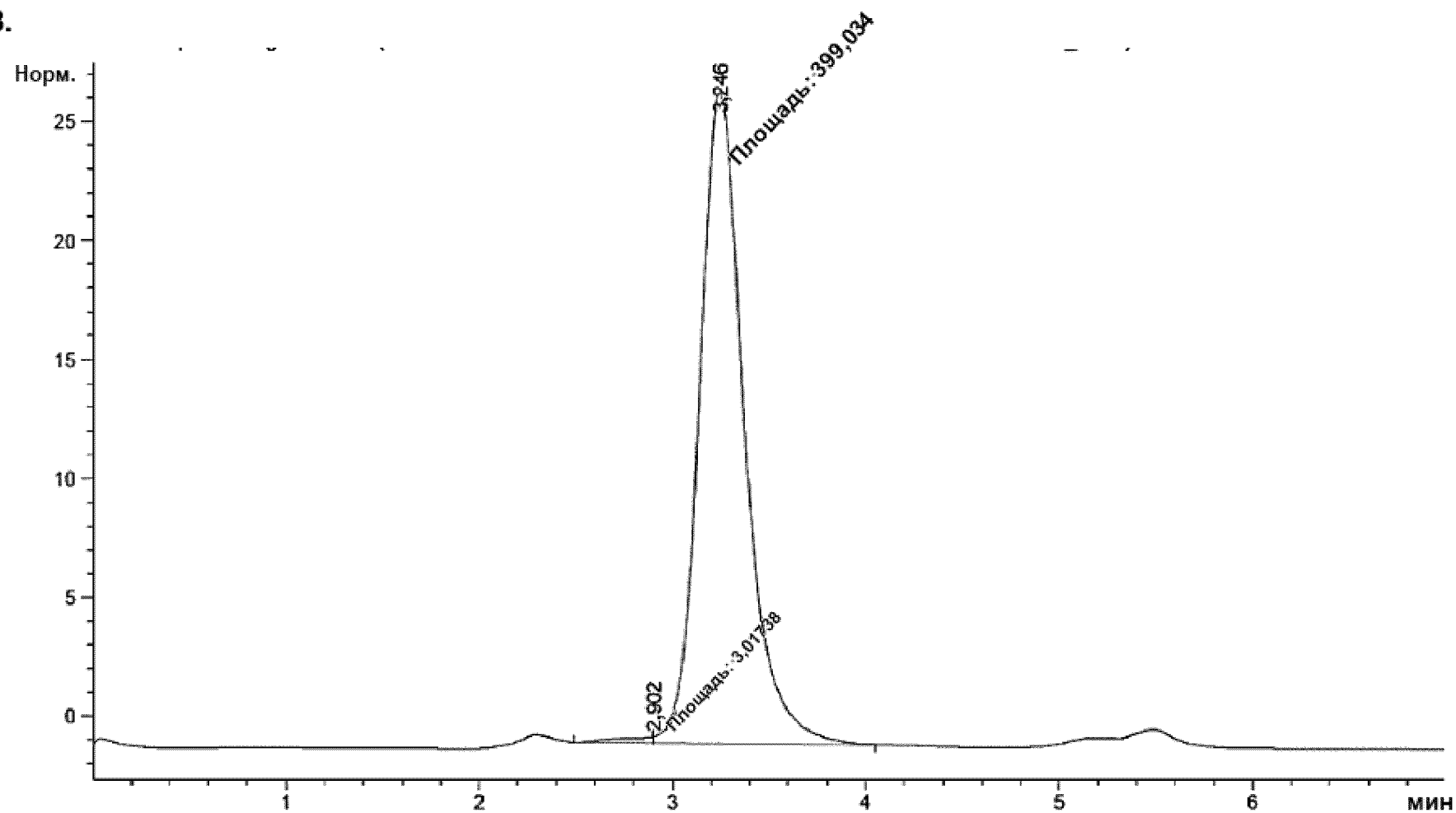
A.



37/42

Фиг. 16

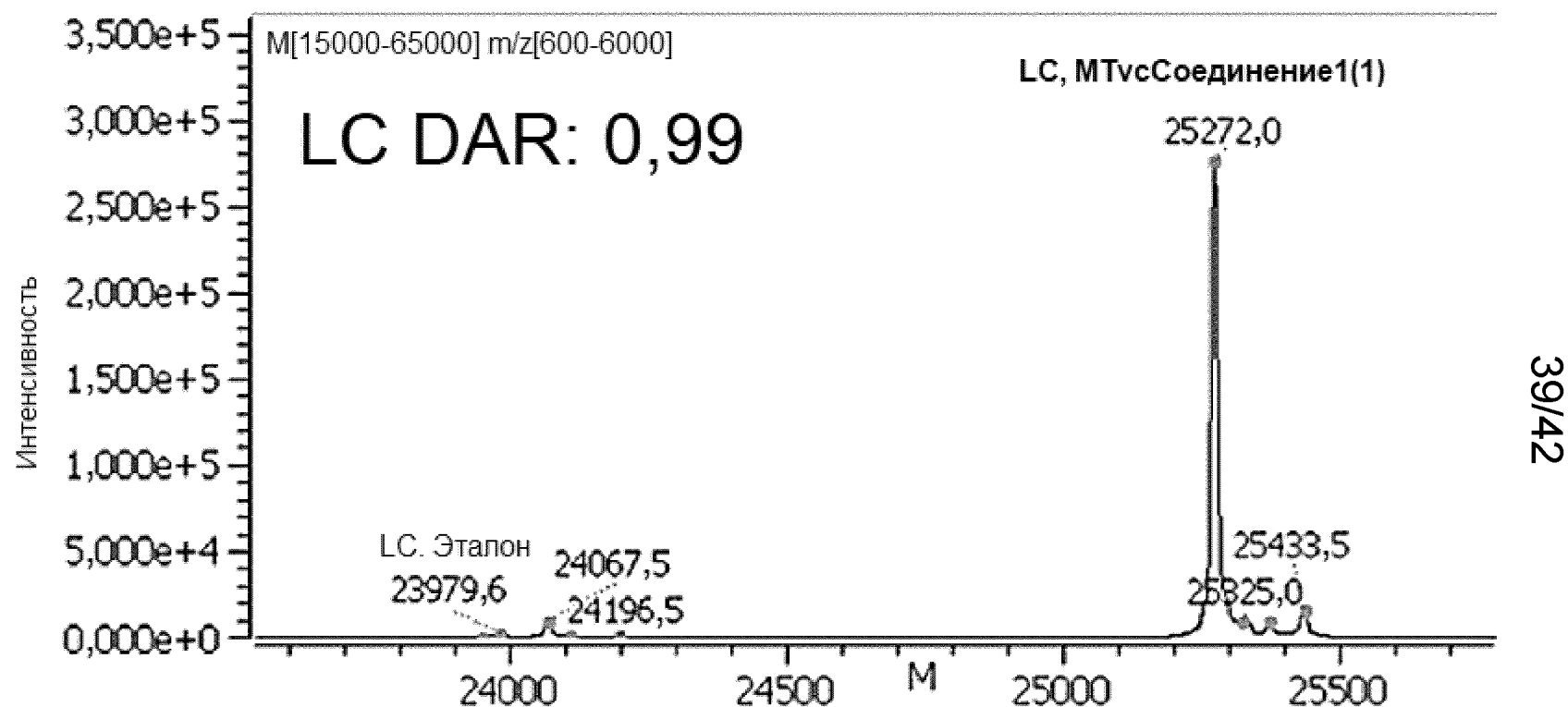
В.



38/42

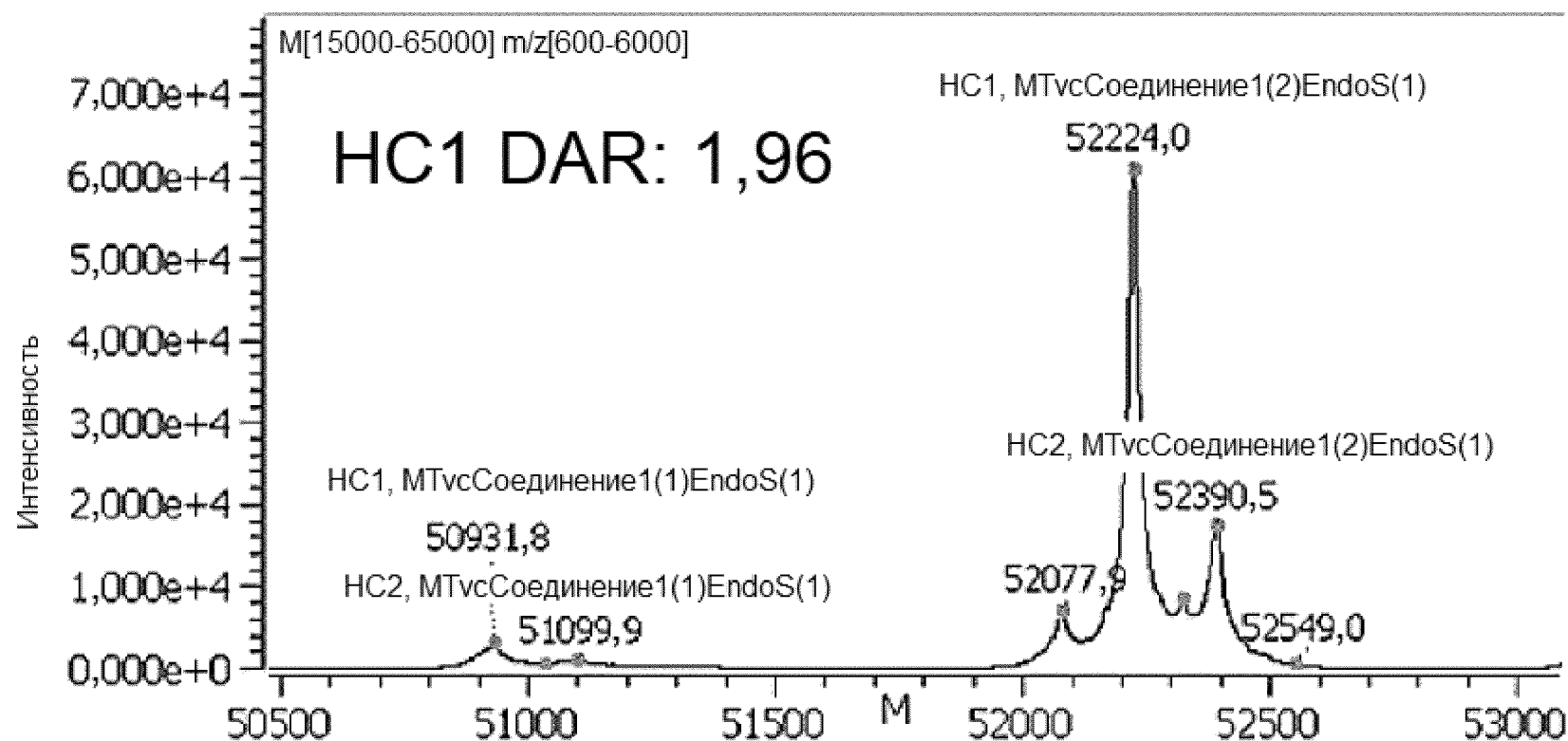
Фиг. 16 (продолж.)

A.



Фиг. 17

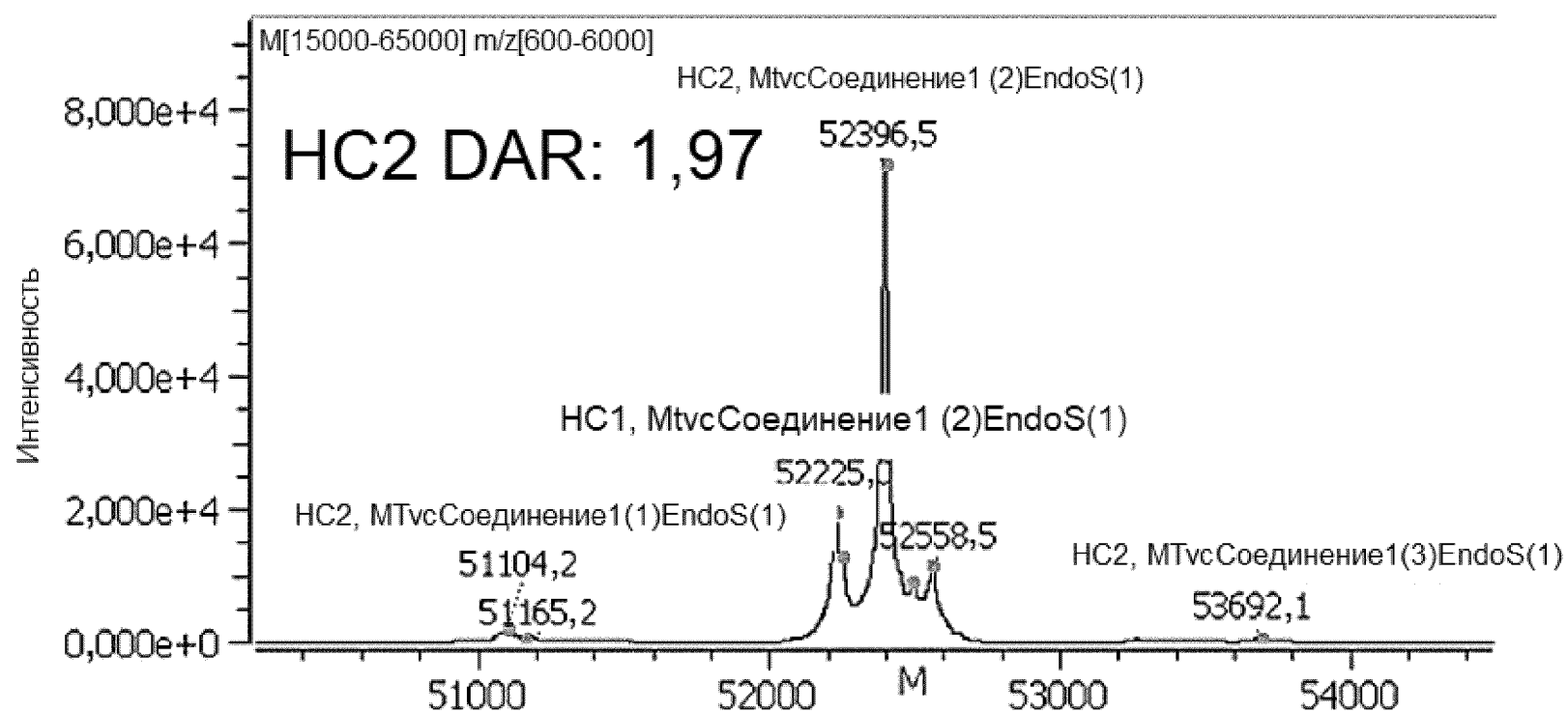
B.



40/42

Фиг. 17 (продолж.)

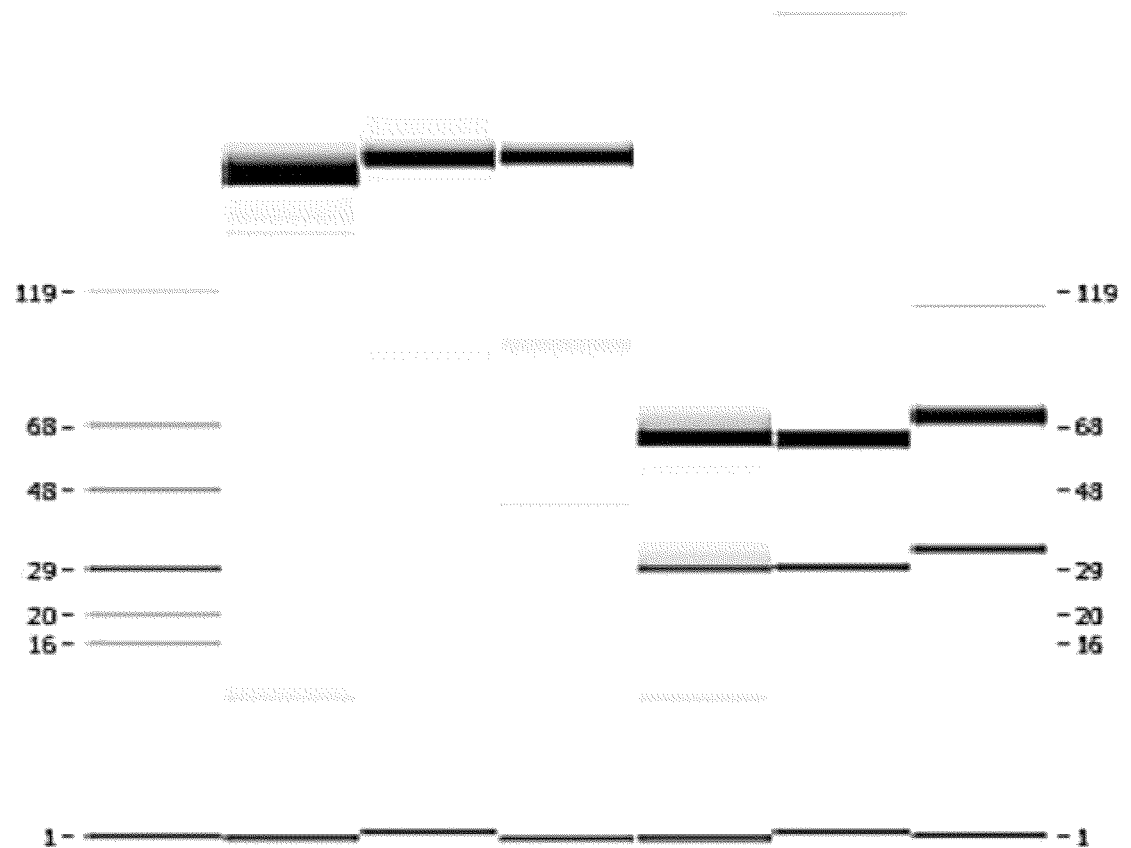
с.



41/42

Фиг. 17 (продолж.)

1 2 3 4 5 6 7



42/42

Фиг. 18