



(51) МПК

A61K 47/68 (2017.01)

C07K 16/28 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 47/6803 (2019.05); A61K 47/6899 (2019.05); C07K 16/2863 (2019.08); C07K 2317/24 (2019.08)

(21)(22) Заявка: 2017115812, 18.11.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
18.11.2015Дата регистрации:
23.01.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
19.11.2014 US 62/081,914

(43) Дата публикации заявки: 19.12.2018 Бюл. № 35

(45) Опубликовано: 23.01.2020 Бюл. № 3

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 19.06.2017(86) Заявка РСТ:
US 2015/061310 (18.11.2015)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/081584 (26.05.2016)Адрес для переписки:
119019, Москва, Гоголевский б-р, 11, этаж 3,
"Гоулинг ВЛГ (Интернэшнл) Инк.", Лыу
Татьяна Нгоковна

(72) Автор(ы):

ХАТЧИНС Бенджамин М. (US)

(73) Патентообладатель(и):

ИММУНОДЖЕН, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2014/134483 A2, 04.09.2014. WO
2012/112687 A1, 23.08.2012. US 2011003969 A1,
06.01.2011. US 2012282282 A1, 08.11.2012. RU
2011153288 A, 20.07.2013.

RU 2711930 C2

RU

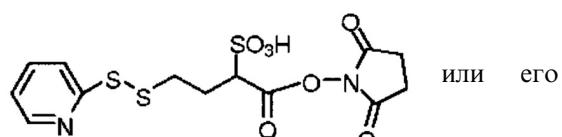
2711930

C2

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЬЮГАТОВ АГЕНТА, СВЯЗЫВАЮЩЕГОСЯ С КЛЕТКАМИ, И
ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО АГЕНТА

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к способу получения коньюгата агента, связывающегося с клетками, и цитотоксического агента. Цитотоксический агент приводят в контакт с бифункциональным сшивающим реагентом, представленным структурной ф



олью, в буферном растворе, содержащем буферный агент, причем буферный раствор имеет высокую буферную емкость и молярное отношение буферного агента к бифункциональному сшивающему реагенту составляет от 2:1 до 8:1. Получают смесь,

R U 2 7 1 1 9 3 0 C 2

R U 2 7 1 1 9 3 0 C 2

содержащую соединение цитотоксического агента с линкером. Полученное соединение приводят в контакт с агентом, связывающимся с клетками, в растворе, имеющем pH от 4 до 9. Получают вторую смесь, содержащую конъюгат агента,

связывающегося с клетками, и цитотоксического агента. Изобретение приводит к значительному уменьшению фрагментации антитела и увеличивает стабильность полученных конъюгатов. 69 з.п. ф-лы, 2 табл., 2 пр.

R U 2 7 1 1 9 3 0 C 2

RUSSIAN FEDERATION



(19) RU (11) 2 711 930⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.
A61K 47/68 (2017.01)
C07K 16/28 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 47/6803 (2019.05); A61K 47/6899 (2019.05); C07K 16/2863 (2019.08); C07K 2317/24 (2019.08)

(21)(22) Application: 2017115812, 18.11.2015

(24) Effective date for property rights:
18.11.2015

Registration date:
23.01.2020

Priority:

(30) Convention priority:
19.11.2014 US 62/081,914

(43) Application published: 19.12.2018 Bull. № 35

(45) Date of publication: 23.01.2020 Bull. № 3

(85) Commencement of national phase: 19.06.2017

(86) PCT application:
US 2015/061310 (18.11.2015)

(87) PCT publication:
WO 2016/081584 (26.05.2016)

Mail address:
119019, Moskva, Gogolevskij b-r, 11, etazh 3,
"Gouling VLG (Interneshnl) Ink.", Lyu Tatyana
Ngokovna

(72) Inventor(s):
HUTCHINS Benjamin M. (US)

(73) Proprietor(s):
IMMUNOGEN, INC. (US)

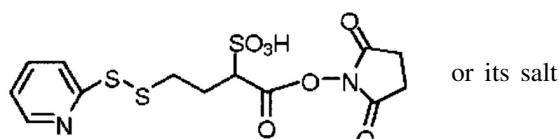
R U 2 7 1 1 9 3 0 C 2

(54) METHOD OF PRODUCING CONJUGATES OF CELL-BINDING AGENT AND CYTOTOXIC AGENT

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology, particularly to a method of producing a conjugate of a cell-binding agent and a cytotoxic agent. Cytotoxic agent is brought into contact with a bifunctional cross-linking reagent represented by structural formula



in a buffer solution containing a buffer agent, wherein

the buffer solution has a high buffer capacity and the molar ratio of the buffer to the bifunctional cross-linking reagent ranges from 2:1 to 8:1. Mixture containing a cytotoxic agent compound with a linker is obtained. Obtained compound is brought into contact with a cell-binding agent in a solution having pH from 4 to 9. Second mixture containing a conjugate of a cell-binding agent and a cytotoxic agent are obtained.

EFFECT: invention leads to considerable reduction of antibody fragmentation and increases stability of prepared conjugates.

70 cl, 2 tbl, 2 ex

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

В данной заявке заявляется приоритет согласно кодексу США, раздел 35, § 119 (e) по дате подачи предварительной заявки на патент США №62/081914, поданной 19 ноября 2014 г., полное содержание которой, включая все графические материалы, 5 формулы, описание, формулу изобретения и перечни последовательностей, включено в данный документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Конъюгаты антитела и лекарственного средства (ADC), которые эффективны для 10 лечения рака и других заболеваний, обычно состоят из трех отдельных элементов: агента, связывающегося с клетками; линкера; и цитотоксического агента. Традиционный способ присоединения агента, связывающегося с клетками, такого как антитела, к цитотоксическому агенту, включает две различные стадии реакции. На первой стадии 15 реакции антитело приводят в контакт с бифункциональным сшивающим реагентом, чтобы получить модифицированное линкером антитело. Модифицированное антитело затем необязательно очищают от избытка линкерного реагента или гидролизованного 20 линкерного реагента. На второй стадии реакции антитело, модифицированное линкером, приводят в контакт с цитотоксическим агентом, содержащим реакционноспособную группу, такую как тиол, для получения конъюгата антитела и цитотоксического агента, который снова очищают на дополнительной стадии очистки. В этом традиционном способе может потребоваться две стадии очистки, которые понижают общий выход и делают процесс трудоемким и неэкономичным для крупномасштабного производства ADC.

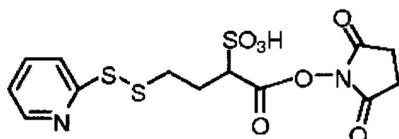
Как альтернативный вариант, цитотоксический агент вначале может вступать в 25 реакцию с бифункциональным сшивающим реагентом с образованием соединения цитотоксического агента с линкером, которое затем вступает в реакцию с агентом, связывающимся с клетками, с образованием конъюгата агента, связывающегося с клетками, и цитотоксического агента (реакция конъюгации). Цитотоксический агент, бифункциональный сшивающий реагент и полученное соединение цитотоксического 30 агента с линкером, являются, как правило, гидрофобными соединениями и имеют низкую растворимость в воде. По этой причине для повышения растворимости соединения цитотоксического агента с линкером при проведении реакции конъюгации необходимо наличие некоторого количества органического растворителя. С другой 35 стороны, присутствие большого количества органического растворителя может иметь отрицательное влияние на стабильность антитела. Следовательно, способ, известный в данной области техники, может быть ограничен маломасштабным производством конъюгатов агента, связывающегося с клетками, и цитотоксического агента, когда используются низкие концентрации агентов, связывающихся с клетками, цитотоксических агентов и/или бифункциональных сшивающих реагентов.

С учетом изложенного выше существует необходимость в разработке улучшенных 40 способов получения конъюгатов агента, связывающегося с клетками, и цитотоксического агента, характеризующихся высокой стабильностью антитела, которые подходят для крупномасштабного производства.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем изобретении предложены новые способы, которые пригодны для 45 крупномасштабного производства конъюгатов антитела и лекарственного средства (ADC). Способы включают стадии, на которых:

(а) цитотоксический агент приводят в контакт с бифункциональным сшивающим реагентом, представленным следующей структурной формулой:



5 или его солью, в буферном растворе, содержащем буферный агент, для получения первой смеси, содержащей соединение цитотоксического агента с линкером, причем буферный раствор имеет высокую буферную емкость; и

10 (b) соединение цитотоксического агента с линкером в первой смеси из стадии (a) приводят в контакт с агентом, связывающимся с клетками, в растворе, имеющем pH от 4 до 9, для получения второй смеси, содержащей конъюгат агента, связывающегося с клетками, и цитотоксического агента.

15 Неожиданно было обнаружено, что когда для реакции на стадии (a) используется буферный раствор с высокой буферной емкостью, полученный конъюгат агента, связывающегося с клетками, характеризуется значительно меньшей фрагментацией антитела по сравнению с конъюгатами, полученными с использованием в реакции на стадии (a) буферного раствора с низкой буферной емкостью. Дополнительно, в реакции конъюгации (т.е. стадия (b) способов по настоящему изобретению) можно использовать высокие концентрации агента, связывающегося с клетками (например, антитела), что делает способ более экономичным для крупномасштабного производства. Кроме того, 20 по сравнению со способом, известным в данной области техники, в растворе для конъюгации необходимы более низкие количества органического растворителя (например, диметилацетамида (ДМАА)), что может увеличивать стабильность антитела и полученных конъюгатов.

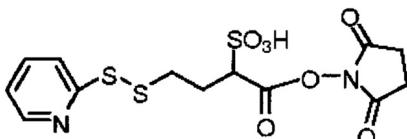
25 Способы по настоящему изобретению обеспечивают конъюгаты агента, связывающегося с клетками, и цитотоксического агента с высокой чистотой и/или стабильностью. В частности, способы по настоящему изобретению уменьшают фрагментацию антитела по сравнению со способами, описанными ранее в данной области техники.

30 Настоящее изобретение также относится к конъюгатам агента, связывающегося с клетками, и цитотоксического агента, полученным с использованием способов, описанных в данном документе.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

35 В настоящем изобретении предложен новый способ получения конъюгата агента, связывающегося с клетками, и цитотоксического агента. Способ включает стадии, на которых:

(а) цитотоксический агент приводят в контакт с бифункциональным сшивающим реагентом, представленным следующей структурной формулой:



sSPDB

45 или его солью, в буферном растворе, содержащем буферный агент, для получения первой смеси, содержащей соединение цитотоксического агента с линкером, причем буферный раствор имеет высокую буферную емкость; и

(b) соединение цитотоксического агента с линкером в первой смеси, полученной на

стадии (а), приводят в контакт с агентом, связывающимся с клетками, в растворе, имеющем pH от 4 до 9, для получения второй смеси, содержащей конъюгат агента, связывающегося с клетками, и цитотоксического агента.

При использовании в данном документе, «соль» относится к производному

5 соединений, описанных в данном документе, причем исходное соединение модифицировано так, что образуются соли присоединения кислоты или основания. Конкретнее, соль относится к производному, когда исходное соединение модифицировано путем приведения в контакт исходного соединения с неорганическим или органическим основанием, таким как гидроксид щелочного металла или алкиламин.

10 В одном варианте реализации изобретения соль представляет собой соль натрия. Как альтернативный вариант, соль представляет собой соль триалкиламмония, например соль N,N-дизопропилэтиламмония.

В одном варианте реализации изобретения агент, связывающийся с клетками, (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) подвержен фрагментации.

15 При использовании в данном документе, «фрагментация» относится к разрыву ковалентной связи в белке (например, антителе). В одном варианте реализации изобретения фрагментация относится к восстановлению внутрицепочечных дисульфидных связей в присутствии свободного тиола. Фрагментация может также включать расщепление главной цепи белка и фрагментацию или модификацию боковых

20 цепей (см., например, Vlasak, J. and Ionescu, R. Fragmentation of monoclonal antibodies. mAbs 3:3, 253-263, May/June 2011). Типовые антитела или антигенсвязывающие фрагменты, которые подвержены фрагментации, включают, но не ограничиваясь ими, IgG4, антитела, содержащие легкую цепь лямбда, Fab или F(ab')₂. Фрагментацию можно

25 идентифицировать с использованием методов разделения, основанных главным образом на размере молекулы, или методов разделения, включающих химические свойства аминокислотных боковых цепей. Методы разделения, основанные главным образом на размере молекулы, включают, но не ограничиваясь ими, эксклюзационную хроматографию (ЭХ), электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН-ПААГ-электрофорез) и капиллярный электрофорез с

30 ДСН (КЭ-ДСН). Методы разделения, включающие химические свойства аминокислотных боковых цепей, включают, но не ограничиваясь ими, жидкостную хроматографию, такую как обращенно-фазовая ВЭЖХ, ВЭЖХ с гидрофобными взаимодействиями, катионообменная ВЭЖХ, жидкостная экспресс-хроматография белков (ЖЭХБ), сверхвысокоэффективная жидкостная хроматография (СВЭЖХ) и т.д.

35 В некоторых вариантах реализации изобретения буферный раствор, используемый на стадии (а) настоящего способа, имеет высокую буферную емкость. При использовании в данном документе, «буферная емкость» относится к способности буферного раствора предотвращать значительные изменения pH реакционной смеси после добавления кислоты или основания.

40 В одном варианте реализации изобретения буферный раствор содержит молярный избыток буферного агента по отношению к бифункциональному сшивающему реагенту. В другом варианте реализации изобретения молярное отношение буферного агента к бифункциональному сшивающему реагенту в буферном растворе составляет от 1,1:1 до 50:1; от 1,2:1 до 30:1; от 1,3: 1 до 25:1; или от 1,5:1 до 12,5:1. Конкретнее, молярное отношение буферного агента к бифункциональному сшивающему реагенту составляет от 2:1 до 8:1. Еще конкретнее, молярное отношение буферного агента к бифункциональному сшивающему реагенту составляет от 4:1 до 6:1. В другом более конкретном варианте реализации изобретения молярное отношение буферного агента

к бифункциональному сшивающему реагенту составляет 5:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения буферный раствор на стадии (а) способов по настоящему изобретению имеет pH от 4 до 9. Конкретнее, pH составляет от 4,5 до 8,5, от 5,0 до 8,5, от 5,5 до 8,5, от 6,0 до 8,5, от 6,5 до 8,5, от 7,0 до 8,5, от 7,1 до 8,5, от 7,2 до 8,5, от 7,3 до 8,5, от 7,4 до 8,5, от 7,5 до 8,5, от 7,5 до 8,4, от 7,5 до 8,3, от 5,0 до 6,5, от 5,0 до 6,0 или от 5,5 до 6,5. В одном конкретном варианте реализации изобретения pH составляет от 7,5 до 8,5 (например, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4 или 8,5). В другом конкретном варианте реализации изобретения pH составляет от 7,9 до 8,5, от 8,0 до 8,4 или от 8,1 до 8,3. Еще конкретнее, pH составляет 8,2. Как альтернативный вариант, pH составляет от 4,5 до 5,5 (например, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4 или 5,5). Как другой альтернативный вариант, pH составляет от 4,7 до 5,3, от 4,8 до 5,2 или от 4,9 до 5,1. Еще конкретнее, pH составляет 5,0.

Можно использовать любой пригодный буферный агент, известный в данной области техники. Пригодные буферные агенты включают, например, но не ограничиваясь ими, цитратный буферный агент, ацетатный буферный агент, сукцинатный буферный агент и фосфатный буферный агент. В одном варианте реализации изобретения буферный агент выбран из группы, состоящей из HEPPSO (N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-гидроксипропансульфоновая кислота)), POPSO (дигидрат пиперазин-1,4-бис-(2-гидроксипропансульфоновой кислоты)), HEPES (4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновая кислота), EPPS (4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-пропансульфоновая кислота), TES (N-[три(гидроксиметил)метил]-2-аминоэтансульфоновая кислота), MES (2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота) и их комбинации. Конкретнее, буферный агент представляет собой EPPS.

В некоторых вариантах реализации изобретения буферный раствор может дополнительно содержать инертную соль для поддержания ионной силы буферного раствора. В одном варианте реализации изобретения буферный раствор дополнительно содержит хлорид натрия.

В некоторых вариантах реализации изобретения буферный раствор на стадии (а) содержит органический растворитель. Конкретнее, органический растворитель представляет собой диметилацетамид (ДМАА). В одном варианте реализации изобретения буферный раствор на стадии (а) содержит смесь воды и органического растворителя. Конкретнее, буферный раствор на стадии (а) содержит смесь воды и ДМАА. Органический растворитель (например, ДМАА) может присутствовать в количестве 1%-99%, 5%-99%, 10%-99%, 20%-99%, 30%-99%, 40%-99%, 50%-99%, 60%-99%, 70%-99%, 80%-99%, 90%-99% от объема буферного раствора. В одном варианте реализации изобретения органический растворитель (например, ДМАА) присутствует в количестве 50%-90%, 55%-85%, 60%-80% или 65%-75% от объема буферного раствора. В более конкретном варианте реализации изобретения органический растворитель (например, ДМАА) присутствует в количестве 70% от объема буферного раствора.

В некоторых вариантах реализации изобретения в реакции на стадии (а) используют эквивалентное молярное количество цитотоксического агента и бифункциональному сшивающего реагента. В некоторых вариантах реализации изобретения в реакции на стадии (а) используют молярный избыток цитотоксического агента по отношению к бифункциональному сшивающему реагенту. В одном варианте реализации изобретения молярное отношение цитотоксического агента к бифункциональному сшивающему реагенту составляет от 1,01:1 до 20:1, от 1,1:1 до 20:1, от 1,1:1 до 10:1, от 1,1:1 до 5:1, от 1,1:1 до 4:1, от 1,1:1 до 3:1, от 1,1:1 до 2:1, от 1,1:1 до 1,5: 1, от 1,1:1 до 1,4:1 или от 1,1:1 до 1,3:1. Конкретнее, молярное отношение цитотоксического агента к

бифункциональному сшивающему реагенту составляет 1,2:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения в реакции на стадии (а) используют молярный избыток бифункционального сшивающего реагента по отношению к цитотоксическому агенту. В одном варианте реализации изобретения молярное 5 отношение бифункционального сшивающего агента к цитотоксическому агенту составляет от 1,01:1,1,1:1 до 20:1, от 1,1:1 до 10:1, от 1,1:1 до 5:1, от 1,1:1 до 4:1, от 1,1:1 до 3:1, от 1,1:1 до 2:1, от 1,1:1 до 1,5: 1, от 1,1:1 до 1,4:1 или от 1,1:1 до 1,3:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения реакцию на стадии (а) способов по настоящему изобретению проводят смешиванием цитотоксического агента с 10 бифункциональным сшивающим реагентом sSPDB в буферном растворе, описанном выше. Реакции дают продолжаться в течение от 2 минут до 1 недели, от 1 часа до 48 часов, от 1 часа до 36 часов, от 1 часа до 24 часов, от 5 часов до 20 часов, от 5 часов до 15 часов, от 6 часов до 14 часов, от 4 часов до 8 часов, от 5 часов до 7 часов, от 1 часа до 5 часов, от 1 часа до 4 часов, от 1 часа до 2 часов или от 2 часов до 5 часов. В одном 15 варианте реализации изобретения реакции дают продолжаться в течение 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов и т.д.

Реакцию на стадии (а) можно проводить при любой пригодной температуре. В одном варианте реализации изобретения реакцию можно проводить при температуре от 10°C 20 до 50°C, от 10°C до 40°C или от 10°C до 30°C. В другом варианте реализации изобретения реакцию можно проводить при температуре от 15°C до 25°C, от 16°C до 24°C, от 17°C до 23°C, от 18°C до 22°C или от 19°C до 21°C. Еще в одном варианте реализации изобретения реакцию можно проводить при 15°C, 16°C, 17°C, 18°C, 19°C, 20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C или 25°C. Как альтернативный вариант, реакцию можно проводить 25 при низкой температуре, такой как менее чем 10°C или менее чем 0°C (при условии, что не допускают замерзания раствора, например, за счет присутствия органического растворителя, используемого для растворения цитотоксического агента и/или бифункционального сшивающего реагента). В одном варианте реализации изобретения реакцию можно проводить при температуре от -10°C до 0°C, от 0°C до 10°C или от 0°C 30 до 5°C.

В некоторых вариантах реализации изобретения первую смесь, полученную при приведении в контакт цитотоксического агента и бифункционального сшивающего реагента на стадии (а) способов по настоящему изобретению, можно хранить в течение продолжительного периода времени (как, например, в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 35 дней, 5 дней, 6 дней, 1 недели, 2 недель, 3 недель, 1 месяца, 2 месяцев, 3 месяцев, 4 месяцев, 5 месяцев, 6 месяцев, 1 года, 2 лет или 5 лет) до приведения в контакт с агентом, связывающимся с клетками. Первую смесь можно хранить в замороженном состоянии при низкой температуре (например, ниже 10°C, ниже 5°C или ниже 0°C или при температуре от -10°C до 0°C, от 0°C до 10°C или от 0°C до 5°C). Как альтернативный 40 вариант, первую смесь можно хранить при комнатной температуре или при температуре от 10°C до 25°C, от 15°C до 25°C или от 20°C до 25°C после завершения реакции на стадии (а).

В некоторых вариантах реализации изобретения первая смесь содержит соединение цитотоксического агента с линкером и примеси, такие как непрореагировавший 45 цитотоксический агент, непрореагировавший бифункциональный сшивающий реагент и побочные продукты реакции, такие как гидролизованный бифункциональный сшивающий реагент и/или димер цитотоксических агентов.

В некоторых вариантах реализации изобретения первая реакционная смесь не очищена

в значительной степени перед приведением соединения цитотоксического агента с линкером в первой смеси в контакт с агентом, связывающимся с клетками, на стадии (b) способов по настоящему изобретению. При использовании в данном документе, термин «очищенный в значительной степени» означает, что менее 50%, менее 40%,

5 менее 30%, менее 20%, менее 10%, менее 9%, менее 8%, менее 7%, менее 6%, менее 5%, менее 4%, менее 3%, менее 2% или менее 1% примесей (таких как непрореагировавший цитотоксический агент, непрореагировавший бифункциональный сшивающий реагент и побочные продукты реакции, такие как гидролизованный бифункциональный сшивающий реагент и/или димер цитотоксических агентов) удалено до того, как

10 соединение цитотоксического агента с линкером в первой реакционной смеси вступит в реакцию с агентом, связывающимся с клетками, на стадии (b) способов по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах реализации изобретения первая смесь, полученная на стадии (a) способов по настоящему изобретению, приводят в контакт с агентом, связывающимся 15 с клетками, в растворе (например, буферном растворе для конъюгации), имеющем pH от 4 до 9, от 5 до 9, от 5,5 до 9, от 6 до 9, от 6,3 до 9 или от 6,3 до 8,7, от 6,4 до 8,6, от 6,5 до 8,5, от 7,3 до 8,7 или от 7,4 до 8,6, для получения второй смеси, содержащей конъюгат агента, связывающегося с клетками, и цитотоксического агента. Конкретнее, раствор имеет pH от 7,5 до 8,5 (например, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4 или 20 8,5). В другом более конкретном варианте реализации изобретения раствор имеет pH от 7,9 до 8,5, от 8,0 до 8,4 или от 8,1 до 8,3. В еще более конкретном варианте реализации изобретения раствор имеет pH 8,2. В другом конкретном варианте реализации изобретения раствор имеет pH от 6,5 до 7,5 (например, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 или 7,5).

25 В некоторых вариантах реализации изобретения раствор на стадии (b) содержит буферный агент. Можно использовать любой пригодный буферный агент, известный в данной области техники. Пригодные буферные агенты включают, например, но не ограничиваясь ими, нитратный буферный агент, ацетатный буферный агент, сукцинатный буферный агент и фосфатный буферный агент. В одном варианте реализации изобретения 30 буферный агент выбран из группы, состоящей из HEPPSO (N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-гидроксипропансульфоновая кислота)), POPSO (дигидрат пиперазин-1,4-бис-(2-гидроксипропансульфоновой кислоты)), HEPES (4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновая кислота), EPPS (4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-пропансульфоновая кислота), TES (N-[три(гидроксиметил)метил]-2-аминоэтансульфоновая кислота), MES 35 (2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота) и их комбинации. Конкретнее, буферный агент представляет собой EPPS. Раствор может дополнительно содержать инертную соль для поддержания ионной силы буферного раствора. В одном варианте реализации изобретения буферный раствор дополнительно содержит хлорид натрия.

40 В некоторых вариантах реализации изобретения раствор на стадии (b) способов по настоящему изобретению дополнительно содержит органический растворитель. Конкретнее, органический растворитель представляет собой диметилацетамид (DMAA). В одном варианте реализации изобретения раствор на стадии (b) содержит смесь воды и органического растворителя. Конкретнее, раствор на стадии (b) содержит смесь воды и DMAA. Органический растворитель (например, DMAA) может присутствовать в 45 количестве 1%-99%, 1%-90%, 1%-80%, 1%-70%, 1%-60%, 1%-50%, 1%-40%, 1%-30%, 1%-25%, 2%-20%, 2%-15%, 2%-10%, 2,5%-7,5%, 3%-7%, 4%-6% или 4,5%-5,5% от объема раствора. Конкретнее, органический растворитель (например, DMAA) присутствует в количестве 5% от объема раствора.

В некоторых вариантах реализации изобретения на стадии (b) способов по настоящему изобретению первую смесь вводят в реакцию с агентом, связывающимся с клетками, путем добавления водного раствора, содержащего агент, связывающийся с клетками, к первой смеси, полученной на стадии (a) способов по настоящему изобретению. Как 5 альтернативный вариант, первую смесь, полученную на стадии (a), добавляют к водному раствору, содержащему агент, связывающийся с клетками. В некоторых вариантах реализации изобретения в первой смеси, полученной на стадии (a), перед приведением в контакт с агентом, связывающимся с клетками, изменяют pH.

В одном варианте реализации изобретения pH первой смеси изменяют так, чтобы

10 она имела pH, равный pH водного раствора, содержащего агент, связывающийся с клетками, до приведения в контакт с агентом, связывающимся с клетками.

В некоторых вариантах реализации изобретения реакцию на стадии (b) проводят с высокой концентрацией агента, связывающегося с клетками. В одном варианте реализации изобретения концентрация агента, связывающегося с клетками, в растворе 15 на стадии (b) составляет от 5 г/л до 100 г/л. Конкретнее, концентрация составляет от 5 г/л до 50 г/л, от 5 г/л до 40 г/л, от 10 г/л до 40 г/л, от 10 г/л до 30 г/л или от 15 г/л до 25 г/л. В более конкретном варианте реализации изобретения концентрация составляет от 15 г/л до 25 г/л, от 18 г/л до 22 г/л или от 19 г/л до 21 г/л. В еще более конкретном варианте реализации изобретения концентрация составляет 20 г/л.

20 В некоторых вариантах реализации изобретения в способах по настоящему изобретению используют избыточное количество бифункционального сшивающего реагента по отношению к агенту, связывающемуся с клетками. В одном варианте реализации изобретения молярное отношение бифункционального сшивающего реагента к агенту, связывающемуся с клетками, находится в диапазоне от 1 до 20, от 2 до 10, от 25 3 до 8 или от 3 до 6. В другом варианте реализации изобретения молярное отношение бифункционального сшивающего реагента к агенту, связывающемуся с клетками, составляет от 3,5 до 5, например 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 или 5,0.

25 В некоторых вариантах реализации изобретения реакции на стадии (b) дают продолжаться в течение от 5 часов до 48 часов, от 10 часов до 48 часов, от 10 часов до 30 часов, от 15 часов до 25 часов. В конкретном варианте реализации изобретения реакции на стадии (b) дают продолжаться в течение от 8 часов до 24 часов, от 12 часов до 20 часов, от 14 часов до 18 часов или от 15 часов до 17 часов. В более конкретном варианте реализации изобретения реакции на стадии (b) дают продолжаться в течение 35 16 часов. В другом варианте реализации изобретения реакции на стадии (b) дают продолжаться в течение от 14 часов до 30 часов, от 18 часов до 26 часов, от 20 часов до 24 часов или от 19 часов до 23 часов. В более конкретном варианте реализации изобретения реакции на стадии (b) дают продолжаться в течение 22 часов.

30 Реакцию на стадии (b) можно проводить при любой пригодной температуре. В одном варианте реализации изобретения реакцию можно проводить при температуре от 10°C до 50°C, от 10°C до 40°C или от 10°C до 30°C. В другом варианте реализации изобретения реакцию можно проводить при температуре от 15°C до 25°C, от 16°C до 24°C, от 17°C до 23°C, от 18°C до 22°C или от 19°C до 21°C. Еще в одном варианте реализации изобретения реакцию можно проводить при 15°C, 16°C, 17°C, 18°C, 19°C, 20°C, 21°C, 45 22°C, 23°C, 24°C или 25°C. Как альтернативный вариант, реакцию можно проводить при низкой температуре, такой как менее чем 10°C или менее чем 0°C (при условии, что не допускают замерзания раствора, например, за счет присутствия органического растворителя, используемого для растворения цитотоксического агента и/или

бифункционального сшивающего реагента). В одном варианте реализации изобретения реакцию можно проводить при температуре от -10°C до 0°C, от 0°C до 10°C или от 0°C до 5°C.

В некоторых вариантах реализации изобретения способы по настоящему изобретению

5 дополнительно включают стадию гашения после стадии (b). В одном варианте реализации изобретения гашение достигается за счет быстрого изменения pH второй смеси, полученной на стадии (b), до низкого значения (например, pH меньше или равен 6,5, меньше или равен 6,0, меньше или равен 5,5, меньше или равен 5,4, меньше или равен 5,3, меньше или равен 5,2, меньше или равен 5,1, меньше или равен 5,0). В одном 10 варианте реализации изобретения pH второй смеси доводят до pH, составляющего от 4,0 до 6,5, от 4,5 до 6,0, от 4,5 до 5,5, от 4,6 до 5,4, от 4,7 до 5,3, от 4,8 до 5,2 или от 4,9 до 5,1. В более конкретном варианте реализации изобретения pH второй смеси доводят до pH 5,0. pH второй смеси можно изменять добавлением кислоты ко второй смеси. Конкретнее, pH второй смеси можно изменять добавлением уксусной кислоты ко второй 15 смеси.

В другом варианте изобретения гашение достигается путем добавления одного или более гасящих агентов ко второй смеси для гашения непрореагировавшего цитотоксического агента и/или непрореагировавшего бифункционального сшивающего реагента. При использовании в данном документе, термин «гасящий агент» относится 20 к реагенту, который реагирует со свободным цитотоксическим агентом и/или бифункциональным сшивающим реагентом.

В одном варианте реализации изобретения для обеспечения того, что каждая непрореагировавшая группа (такая как тиол) в цитотоксическом агенте погашена, можно применять малеимидные или галогенацетамидные гасящие реагенты, такие как 25 4-малеимидомасляная кислота, 3-малеимидопропионовая кислота, N-этилмалеимид, йодацетамид или йодацетамидпропионовая кислота. Стадия гашения может способствовать предотвращению димеризации цитотоксического агента, в частности цитотоксического агента, имеющего непрореагировавшую тиольную группу (такого как DM1). Димеризованный цитотоксический агент может быть сложно удалить. Стадия 30 гашения также может уменьшать любые нежелательные реакции обмена тиол-дисульфид с дисульфидными группами природного антитела. При гашении полярными заряженными тиол-гасящими агентами (такими как 4-малеимидомасляная кислота или 3-малеимидопропионовая кислота) избыточный непрореагировавший цитотоксический агент превращается в полярный заряженный водорастворимый аддукт, который легко 35 отделить от ковалентно-связанного конъюгата на стадии очистки. Также можно использовать гашение неполярными или нейтральными тиол-гасящими реагентами.

В одном варианте реализации изобретения смесь гасят путем приведения смеси в контакт с гасящим реагентом, который реагирует с непрореагировавшим бифункциональным сшивающим реагентом. Например, для гашения любого 40 непрореагировавшего бифункционального сшивающего реагента к смеси можно добавлять нуклеофилы. Нуклеофил предпочтительно представляет собой нуклеофил, содержащий аминогруппу, такой как лизин, таурин и гидроксиламин.

В некоторых вариантах реализации изобретения реакции на стадии (b) дают продолжаться до завершения перед стадией гашения, т.е. перед изменением pH и/или 45 приведением второй смеси в контакт с гасящим агентом, описанным выше.

После реакции на стадии (b) конъюгат агента, связывающегося с клетками, и цитотоксического агента подвергают очистке. В этом отношении конъюгат агента, связывающегося с клетками, и цитотоксического агента можно очищать от других

компонентов смеси (например, свободного бифункционального сивающего реагента, свободного цитотоксического агента и побочных продуктов реакции) с использованием тангенциально-поточного фильтрования (TFF), которое представляет собой процесс фильтрования тангенциальным потоком через мембрану, неадсорбционной

5 хроматографии, адсорбционной хроматографии, адсорбционного фильтрования, селективного осаждения или любого другого пригодного способа очистки, а также их комбинаций.

В одном варианте реализации изобретения конъюгат агента, связывающегося с клетками, и цитотоксического агента очищают с использованием одной стадии очистки

10 (например, TFF). Конъюгат предпочтительно очищают и переводят в подходящий состав с использованием одной стадии очистки (например, TFF). В другом варианте реализации изобретения конъюгат агента, связывающегося с клетками, и цитотоксического агента очищают с использованием двух последовательных стадий очистки. Например, конъюгат можно вначале очищать с помощью селективного 15 осаждения, адсорбционного фильтрования, адсорбционной хроматографии или неадсорбционной хроматографии, а затем с использованием TFF. Специалисту в данной области техники понятно, что очистка конъюгата агента, связывающегося с клетками, и цитотоксического агента позволяет выделить стабильный конъюгат, содержащий агент, связывающийся с клетками, химически присоединенный к цитотоксическому 20 агенту.

Для очистки можно использовать любые пригодные системы TFF, в том числе систему типа Pellicon (Millipore, Биллера, Массачусетс), систему Sartocon Cassette (Sartorius AG, Эджвуд, Нью-Йорк) и систему типа Centrasette (Pall Corp., Ист Хиллс, Нью-Йорк).

Для очистки можно использовать любую пригодную смолу для адсорбционной

25 хроматографии. Предпочтительные смолы для адсорбционной хроматографии включают смолы для гидроксиапатитной хроматографии, гидрофобной хроматографии с индукцией заряда (HCIC), хроматографии с гидрофобными взаимодействиями (HIC), ионообменной хроматографии, ионообменной хроматографии с комбинированным режимом работы, металлаффинной хроматографии (IMAC), хроматографии с использованием красителя 30 в качестве лиганда, аффинной хроматографии, обращенно-фазовой хроматографии и их комбинаций. Примеры пригодных гидроксиапатитных смол включают керамический гидроксиапатит (СНТ типа I и типа II, Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния), гидроксиапатит НА Ultrogel (Pall Corp., Ист Хиллс, Нью-Йорк) и керамический фторапатит (CFT типа I и типа II, Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния). Пример 35 пригодной смолы для HCIC представляет собой смолу МЕР Hypercel (Pall Corp., Ист Хиллс, Нью-Йорк). Примеры пригодных смол для HIC включают смолы Butyl-Sepharose, Hexyl-Sepharose, Phenyl-Sepharose и Octyl Sepharose (все производства GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси), а также смолы Macro-prep Methyl и Macro-Prep t-Butyl (Biorad Laboratories, Геркулес, Калифорния). Примеры пригодных ионообменных смол включают 40 смолы SP- Sepharose, CM-Sepharose и Q-Sepharose (все производства GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси) и смолу Unosphere S (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния). Примеры пригодных ионообменников с комбинированным режимом работы включают смолу Bakerbond ABx (JT Baker, Филлипсберг, Нью-Джерси). Примеры пригодных смол для IMAC включают смолу Chelating Sepharose (GE Healthcare, 45 Пискатауэй, Нью-Джерси) и смолу Profinity IMAC (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния). Примеры пригодных смол с красителем в качестве лиганда включают смолу Blue Sepharose (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси) и смолу Affi-gel Blue (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния). Примеры пригодных аффинных смол

включают смолу Protein A Sepharose (например, MabSelect, GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси), если агент, связывающийся с клетками, представляет собой антитело, и смолы с лектином, например смолу Lentil Lectin Sepharose (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси), если у агента, связывающегося с клетками, имеются соответствующие лектин-связывающие участки. Как альтернативный вариант, можно использовать антитело, специфичное к агенту, связывающемуся с клетками. Такое антитело можно иммобилизовать, например, на смолу Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси). Примеры пригодных смол для обращенно-фазовой хроматографии включают смолы C4, C8 и C18 (Grace Vydac, Хесперия, Калифорния).

Для очистки можно использовать любую пригодную смолу для неадсорбционной хроматографии. Примеры пригодных смол для неадсорбционной хроматографии включают, но не ограничиваясь ими, смолы SEPHADEX™ G-25, G-50, G-100, SEPHACRYL™ (например, S-200 и S-300), смолы SUPERDEX™ (например, SUPERDEX™ 75 и SUPERDEX™ 200), смолы BIO-GEL® (например, P-6, P-10, P-30, P-60 и P-100) и другие, известные специалистам в данной области техники.

Конъюгаты агента, связывающегося с клетками, и цитотоксического агента, полученные с помощью способов по настоящему изобретению, обладают значительной чистотой и стабильностью. В одном аспекте изобретения конъюгат агента, связывающегося с клетками, и цитотоксического агента, обладающий значительной чистотой, имеет одну или более следующих характеристик: (а) менее чем 25%-ую, менее чем 20%-ую, менее чем 15%-ую (например, менее чем или составляет 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1%) фрагментацию антитела, (б) более чем 90% (например, более чем или составляет 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%), предпочтительно более чем 95%, конъюгатов являются мономерными, (с) содержание неконъюгированного линкера в препарате конъюгата составляет менее чем около 10% (например, менее чем или около 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или 0%) (по отношению к общему количеству линкера), (д) менее чем 10% конъюгатов перекрестно сшиты (например, менее чем или около 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или 0%), (е) содержание свободного цитотоксического агента в препарате конъюгата составляет менее чем около 2% (например, менее чем или около 1,5%, 1,4%, 1,3%, 1,2%, 1,1%, 1,0%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1% или 0%) (моль/моль по отношению к общему количеству цитотоксического агента) и/или (ф) отсутствует значительное увеличение содержания свободного цитотоксического агента при хранении (например, через около 1 недели, около 2 недель, около 3 недель, около 1 месяца, около 2 месяцев, около 3 месяцев, около 4 месяцев, около 5 месяцев, около 6 месяцев, около 1 года, около 2 лет, около 3 лет, около 4 лет или около 5 лет). «Значительное увеличение» содержания свободного цитотоксического агента означает, что после определенного периода хранения (например, около 1 недели, около 2 недель, около 3 недель, около 1 месяца, около 2 месяцев, около 3 месяцев, около 4 месяцев, около 5 месяцев, около 6 месяцев, около 1 года, около 2 лет, около 3 лет, около 4 лет или около 5 лет) увеличение содержания свободного цитотоксического агента составляет менее чем около 0,1%, около 0,2%, около 0,3%, около 0,4%, около 0,5%, около 0,6%, около 0,7%, около 0,8%, около 0,9%, около 1,0%, около 1,1%, около 1,2%, около 1,3%, около 1,4%, около 1,5%, около 1,6%, около 1,7%, около 1,8%, около 1,9%, около 2,0%, около 2,2%, около 2,5%, около 2,7%, около 3,0%, около 3,2%, около 3,5%, около 3,7% или около 4,0%.

При использовании в данном документе, термин «неконъюгированный линкер» относится к агенту, связывающемуся с клетками, который ковалентно связан с

бифункциональным сшивающим реагентом, причем агент, связывающийся с клетками, не связан ковалентно с цитотоксическим агентом посредством линкера бифункционального сшивающего реагента (т.е. «неконъюгированный линкер» можно представить как СВА-Л, где СВА представляет агент, связывающийся с клетками, а Л 5 представляет бифункциональный сшивающий реагент. В отличие от этого, конъюгат агента, связывающегося с клетками, и цитотоксического агента можно представить как СВА-Л-Д, где Д представляет цитотоксический агент).

В одном варианте реализации изобретения среднее молярное отношение цитотоксического агента к агенту, связывающемуся с клетками (т.е. DAR), в конъюгате 10 агента, связывающегося с клетками, и цитотоксического агента составляет от около 1 до около 10, от около 2 до около 7, от около 3 до около 5, от около 2,5 до около 4,5 (например, около 2,5, около 2,6, около 2,7, около 2,8, около 2,9, около 3,0, около 3,1, около 3,3, около 3,4, около 3,5, около 3,6, около 3,7, около 3,8, около 3,9, около 4,0, около 4,1, около 4,2, около 4,3, около 4,4, около 4,5), от около 3,0 до около 4,0, от около 15 3,2 до около 4,2 или от около 4,5 до 5,5 (например, около 4,5, около 4,6, около 4,7, около 4,8, около 4,9, около 5,0, около 5,1, около 5,2, около 5,3, около 5,4 или около 5,5).

АГЕНТ, СВЯЗЫВАЮЩИЙСЯ С КЛЕТКАМИ

Для использования в способах по настоящему изобретению агент, связывающийся 20 с клетками, может представлять собой любой пригодный агент, который связывается с клеткой, как правило и предпочтительно клеткой животного (например, клеткой человека). Агент, связывающийся с клетками, предпочтительно представляет собой пептид или полипептид. Пригодные агенты, связывающиеся с клетками, включают, например, антитела (например, моноклональные антитела и их фрагменты), интерфероны (например, альфа, бета, гамма), лимфокины (например, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-25 4, ИЛ-6), гормоны (например, инсулин, ТВГ (тиротропин-высвобождающий гормон), МСГ (меланоцитостимулирующий гормон), стероидные гормоны, такие как андрогены и эстрогены), факторы роста и колониестимулирующие факторы, такие как EGF, TGF-альфа, FGF, VEGF, Г-КСФ, М-КСФ и ГМ-КСФ (Burgess, Immunology Today 5:155-158 (1984)), молекулы переноса биогенных веществ (например, трансферрин), витамины 30 (например, фолат) и любой другой агент или молекулу, которая специфически связывается с молекулой-мишенью на поверхности клетки.

Если агент, связывающийся с клетками, представляет собой антитело, оно связывается с антигеном, который представляет собой полипептид или гликотоп и может 35 представлять собой трансмембранный молекулу (например, рецептор) или лиганд, такой как фактор роста. Типовые антигены включают молекулы, такие как ренин; гормон роста, в том числе гормон роста человека и гормон роста крупного рогатого скота; фактор, высвобождающий гормон роста; паратиреоидный гормон; тиреостимулирующий гормон; липопротеины; альфа-1-антитрипсин; А-цепь инсулина; В-цепь инсулина; проинсулин; фолликулостимулирующий гормон; кальцитонин; 40 лютеинизирующий гормон; глюкагон; факторы свертывания крови, такие как фактор vmc, фактор IX, тканевой фактор (ТФ) и фактор фон Виллебранда; факторы против свертывания крови, такие как белок С; предсердный натрийуретический фактор; легочный сурфактант; активатор плазминогена, такой как урокиназа или моча человека или тканевой активатор плазминогена (т-PA); бомбезин; тромбин; гемопоэтический 45 фактор роста; фактор некроза опухолей альфа и бета; энкефалиназа; RANTES (регулируемый активацией, экспрессируемый и секретируемый нормальными Т-клетками); макрофагальный белок воспаления человека (MIP-1-альфа); сывороточный альбумин, такой как человеческий сывороточный альбумин; мюллерова ингибирующая

субстанция; А-цепь релаксина; В-цепь релаксина; прорелаксин; пептид, связанный с мышечным гонадотропином; белок микробов, такой как бета-лактамаза; ДНКаза; IgE; антиген, связанный с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA), такой как CTLA-4; ингибин; активин; фактор роста эндотелия сосудов (VEGF); рецепторы к гормонам или 5 факторам роста; белок А или D; ревматоидный фактор; нейротрофический фактор, такой как нейротрофический фактор мозга (BDNF), нейротрофин-3, -4, -5 или -6 (NT-3, NT4, NT-5 или NT-6) или фактор роста нервов, такой как NGF-бета; фактор роста тромбоцитов (PDGF); фактор роста фибробластов, такой как aFGF и bFGF; эпидермальный фактор роста (EGF); трансформирующий фактор роста (TGF), такой 10 как TGF-альфа и TGF-бета, в том числе TGF-бета 1, TGF-бета 2, TGF-бета 3, TGF-бета 4 или TGF-бета 5; инсулиноподобный фактор роста-І и -ІІ (IGF-І и IGF-ІІ); des(1-3)-IGF-І (IGF-І мозга); белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста; EpCAM; GD3; FLT3; PSMA; PSCA; MUC1; MUC16; STEAP; CEA; TENB2; рецепторы EphA, рецепторы EphB; рецептор фолиевой кислоты; FOLR1; мезотелин; крипто (сгурто); $\alpha_{\sqrt{\beta}}$; интегрины; 15 VEGF, VEGFR; EGFR; рецептор фактора роста фибробластов (FGFR) (например, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4); трансферриновый рецептор; IRTA1; IRTA2; IRTA3; IRTA4; IRTA5; белки CD, такие как CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD26, CD28, CD30, CD33, CD36, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD55, CD56, CD59, CD70, CD79, CD80, CD81, CD103, CD105, CD134, CD137, CD138, 20 CD152, или антитело, которое связывается с одним или более опухолевыми специфическими антигенами или рецепторами на поверхности клеток, описанное в публикации заявки на патент США №2008/0171040 или публикации заявки на патент США №2008/0305044, которые включены в полном объеме посредством ссылки; эритропоэтин; остеоиндуктивные факторы; иммунотоксины; костный 25 морфогенетический белок (BMP); интерферон, такой как интерферон-альфа, -бета и -гамма; колониестимулирующие факторы (КСФ), например М-КСФ, ГМ-КСФ и Г-КСФ; интерлейкины (ИЛ), например от ИЛ-1 до ИЛ-10; супероксиддисмутаза, рецепторы Т-клеток; поверхностные белки мембранны; фактор ускорения распада; вирусные антигены, такие как, например, участок оболочки ВИЧ; транспортные белки; 30 хоминг-рецепторы; адрессины; регуляторные белки; интегрины, такие как CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 и VCAM; опухолевый специфический антиген, такой как рецептор HER2, HER3 или HER4; эндоглин; с-Met; IGF1R; простатические антигены, такие как PCA3, PSA, PSGR, NGEP, PSMA, PSCA, TMEFF2 и STEAP1; LGR5; B7H4; и фрагменты любых из вышеупомянутых полипептидов.

35 Дополнительно, ГМ-КСФ, который связывается с миелоидными клетками, можно использовать в качестве агента, связывающегося с пораженными клетками при остром миелогенном лейкозе. ИЛ-2, который связывается с активированными Т-клетками, можно использовать для профилактики отторжения трансплантата, для лечения и профилактики реакции «трансплантат против хозяина» и для лечения острого Т- 40 клеточного лейкоза. МСГ, который связывается с меланоцитами, можно использовать для лечения меланомы, как антитела, направленные на меланомы. Фолиевую кислоту можно использовать для воздействия на рецептор фолиевой кислоты, который экспрессируется на опухолях яичников и других опухолях. Эпидермальный фактор роста можно использовать для воздействия на плоскоклеточный рак, такой как рак 45 легких и рак головы и шеи. Соматостатин можно использовать для воздействия на нейробластомы и опухоли других типов.

На рак молочной железы и яичек с успехом можно воздействовать эстрогеном (или аналогами эстрогена) или андрогеном (или аналогами андрогена), соответственно, в

качестве агентов, связывающихся с клетками.

Термин «антитело», при использовании в данном документе, относится к любому иммуноглобулину, любому фрагменту иммуноглобулина, такому как Fab, Fab', F(ab')2, dsFv, sFv, миниантителам, диателам, триотелам, тетрателам (Parham, J. Immunol., 131:

5 2895-2902 (1983); Spring et al. J. Immunol., 113: 470-478 (1974); Nisonoff et al. Arch. Biochem. Biophys., 89: 230-244 (1960), Kim et al., Mol. Cancer Ther., 7: 2486-2497 (2008), Carter, Nature Revs., 6: 343-357 (2006)), или химерному иммуноглобулину, который может связываться с антигеном на поверхности клетки (например, который содержит гипервариабельный участок (CDR)). В качестве агента, связывающегося с клетками, можно использовать 10 любое пригодное антитело. Специалисту в данной области техники понятно, что выбор подходящего антитела будет зависеть от клеточной популяции, на которую воздействуют. В этом отношении, выбор подходящего антитела для использования в композиции изобретения будет определяться типом и количеством молекул на 15 поверхности клеток (т.е. антигенов), которые селективно экспрессируются в конкретной клеточной популяции (как правило и предпочтительно, в пораженной клеточной популяции). Профили экспрессии на поверхности клеток известны для большого количества типов клеток, включая различные типы опухолевых клеток, или, если неизвестны, могут быть определены с использованием обычных методов молекулярной биологии и гистохимии.

20 Антитело может быть поликлональным или моноклональным, но наиболее предпочтительно оно представляет собой моноклональное антитело. При использовании в данном документе, «поликлональные» антитела относятся к неоднородным популяциям молекул антител, как правило, содержащихся в сыворотке иммунизированных животных. «Моноклональные» антитела относятся к однородным 25 популяциям молекул антител, которые специфичны к конкретному антигену. Моноклональные антитела, как правило, вырабатываются одним клоном В-лимфоцитов («В-клеток»). Моноклональные антитела можно получить с помощью различных способов, известных специалистам в данной области техники, включая стандартный метод гибридом (см., например, Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol., 5: 511-519 (1976), 30 Harlow and Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988), и C.A. Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York, N.Y. (2001)). Вкратце, гибридомный метод получения моноклональных антител, как правило, включает введение любому пригодному животному, как правило и предпочтительно, мыши, антигена (т.е. «иммуногена»). Затем животное умерщвляют, а В-клетки, выделенные 35 из его селезенки, сливают с клетками миеломы человека. Получают гибридную клетку (т.е. «гибридому»), которая пролиферирует неопределенно долго и постоянно секretирует антитела с желаемой специфичностью *in vitro* в высоких концентрациях. Для идентификации гибридомных клеток, которые вырабатывают антитела с желаемой специфичностью, можно использовать любой подходящий метод, известный в данной 40 области техники. Такие методы включают, например, иммуноферментный анализ (ИФА), вестерн-блоттинг и радиоиммунологический анализ. Проводят скрининг популяции гибридом для выделения индивидуальных клонов, каждый из которых секretирует отдельный вид антител к антигену. Поскольку каждая гибридома представляет собой клон, полученный от слияния с одной В-клеткой, все молекулы 45 антител, которые она вырабатывает, идентичны по структуре, включая их антигенсвязывающий участок и изотип. Моноклональные антитела также можно получить с использованием других пригодных методов, включая метод EBV-гибридомы (см., например, Haskard and Archer, J. Immunol. Methods, 74(2): 361-67 (1984), и Roder et

al., *Methods Enzymol.*, 121: 140-67 (1986)), экспрессирующие системы бактериофаговых векторов (см., например, Huse et al., *Science*, 246:1275-81 (1989)), или фаговый дисплей библиотек, включающих фрагменты антител, такие как Fab и scFv (одноцепочечная вариабельная область) (см., например, патенты США №5885793 и 5969108 и публикации международных патентных заявок WO 92/01047 и WO 99/06587).

Моноклональное антитело можно выделить из или получить от любого пригодного животного, но предпочтительно его получают от млекопитающего, более предпочтительно - мыши или человека, а наиболее предпочтительно - человека. Способы получения антител от мышей хорошо известны специалистам в данной области техники и описаны в данном документе. Что касается антител человека, специалист в данной области техники понимает, что поликлональные антитела можно выделить из сыворотки людей, вакцинированных или иммунизированных соответствующим антигеном. Как альтернативный вариант, антитела человека можно получить адаптацией известных способов получения антител человека от других животных, таких как мыши (см., например, патенты США №5545806, 5569825 и 5714352 и публикацию заявки на патент США №2002/0197266 A1).

Несмотря на то, что человеческие антитела идеально подходят для терапевтических применений у людей, их, а особенно человеческие моноклональные антитела, как правило, сложнее получить, чем мышиные моноклональные антитела. Однако мышиные моноклональные антитела вызывают быстрый иммунный ответ организма-хозяина при введении людям, что может уменьшать терапевтический или диагностический потенциал конъюгата антитела и цитотоксического агента. Для преодоления этих осложнений моноклональное антитело предпочтительно не должно распознаваться как «чужеродное» иммунной системой человека.

Поэтому для получения антитела можно использовать фаговый дисплей. В связи с этим, фаговые библиотеки, кодирующие антигенсвязывающие вариабельные (V) домены антител, можно получить с использованием стандартных методов молекулярной биологии и технологий рекомбинантных ДНК (см., например, Sambrook et al. (eds.), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)). Выбирают фаги, кодирующие вариабельную область с желаемой специфичностью, для специфического связывания с желаемым антигеном, и воссоздают полное человеческое антитело, содержащее выбранный вариабельный домен. Последовательности нукleinовых кислот, кодирующие воссозданное антитело, вводят в подходящую клеточную линию, такую как клетку миеломы, используемую для получения гибридомы, так что клеткой секретируются человеческие антитела, обладающие характеристиками моноклональных антител (см., например, Janeway et al., supra, Huse et al., supra, и патент США №6265150). Как альтернативный вариант, моноклональные антитела можно получить от мышей, которые являются трансгенными по специфическим генам человеческих тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина. Такие способы известны в данной области техники и описаны, например, в патентах США №5545806 и 5569825, и в Janeway et al., supra.

Антитело наиболее предпочтительно представляет собой гуманизированное антитело. При использовании в данном документе, «гуманизированное» антитело представляет собой такое антитело, в котором гипервариабельные участки (CDR) мышного моноклонального антитела, образующие антигенсвязывающие петли антитела, привиты к остову молекулы человеческого антитела. Вследствие подобия остовов мышного и человеческого антител, как правило, в данной области техники считают, что это подход дает моноклональное антитело, которое антигенно-идентично человеческому антителу,

но связывается с тем же антигеном, что и мышью моноклональное антитело, из которого были получены последовательности CDR. Способы получения гуманизированных антител хорошо известны в данной области техники и подробно описаны, например, в Janeway et al., supra, патентах США №5225539, 5585089 и 5693761, 5 европейском патенте №0239400 B1 и патенте Соединенного Королевства №2188638. Гуманизированные антитела также можно получить с использованием метода изменения поверхности антител, описанного в патенте США №5639641 и в Pedersen et al., J. Mol. Biol., 235: 959-973 (1994). Хотя антитело, применяемое в конъюгате композиции изобретения, наиболее предпочтительно представляет собой гуманизированное 10 моноклональное антитело; человеческое моноклональное антитело и мышью моноклональное антитело, описанные выше, также находятся в пределах объема изобретения.

Фрагменты антител, которые обладают по меньшей мере одним антигенсвязывающим участком и таким образом распознают и связываются с по меньшей мере одним антигеном или рецептором, присутствующим на поверхности целевой клетки, также находятся в пределах объема изобретения. В связи с этим, разнообразные фрагменты антител, которые сохраняют способность распознавать и связывать антигены, может давать протеолитическое расщепление неповрежденной молекулы антитела. Например, ограниченное расщепление молекулы антитела протеазой папаином, как правило, дает 20 три фрагмента, два из которых идентичны и обозначаются как фрагменты Fab, поскольку они сохраняют антигенсвязывающую активность исходной молекулы антитела. Расщепление молекулы антитела ферментом пепсином обычно дает два фрагмента антител, один из которых сохраняет оба антигенсвязывающих плеча молекулы антитела и, следовательно, обозначается как фрагмент F(ab')₂. Восстановление 25 фрагмента F(ab')₂ дитиотреитолом или меркаптоэтиламином дает фрагмент, обозначаемый как фрагмент Fab'. Одноцепочный фрагмент вариабельной области (sFv) антитела, который состоит из усеченного фрагмента Fab, содержащего вариабельный (V) домен тяжелой цепи антитела, присоединенный к V-домену легкой цепи антитела посредством синтетического пептида, может быть получен с 30 использованием обычных технологий рекомбинантных ДНК (см., например, Janeway et al., supra). Подобным образом с использованием технологии рекомбинантных ДНК можно получить стабилизированные дисульфидной связью фрагменты вариабельной области (dsFv) (см., например, Reiter et al., Protein Engineering, 7: 697-704 (1994)). Однако фрагменты антител в контексте данного изобретения не ограничены этими 35 иллюстративными типами фрагментов антител. Можно использовать любой пригодный фрагмент антитела, которые распознает и связывается с требуемым рецептором на поверхности клетки или антигеном. Фрагменты антител дополнительно описаны, например, в Parham, J. Immunol., 131:2895-2902 (1983), Spring et al., J. Immunol., 113:470-478 (1974), и Nisonoff et al., Arch. Biochem. Biophys., 89: 230-244 (1960). Связывание 40 антитела с антигеном можно анализировать с использованием любого пригодного метода, известного в данной области техники, такого как, например, радиоиммунологический анализ (РИА), ИФА, вестерн-блоттинг, иммунопреципитация и исследования конкурентного ингибиции (см., например, Janeway et al., supra и публикацию заявки на патент США №2002/0197266 A1).

45 Дополнительно, антитело может представлять собой химерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Под «химерным» понимают, что антитело содержит по меньшей мере два иммуноглобулина или их фрагмента, полученных от или извлеченных из по меньшей мере двух различных видов (например, два различных

иммуноглобулина, например константная область человеческого иммуноглобулина, объединенная с вариабельной областью мышного иммуноглобулина). Антитело также может представлять собой доменное антитело (dAb) или его антигенсвязывающий фрагмент, такое как, например, антитело верблюда (см., например, Desmyter et al., *Nature Struct. Biol.*, 3: 752, (1996)) или антитело акулы, такое как, например, новый антигенный рецептор (IgNAR) (см., например, Greenberg et al., *Nature*, 374: 168 (1995), и Stanfield et al., *Science*, 305: 1770-1773 (2004)).

В контексте данного изобретения можно использовать любое пригодное антитело.

Например, моноклональное антитело J5 представляет собой мышное антитело IgG2a, которое специфично к антигенному маркеру острого лимфобластного лейкоза (CALLA) (Ritz et al., *Nature*, 283: 583-585 (1980)), и его можно использовать для воздействия на клетки, которые экспрессируют CALLA (например, клетки острого лимфобластного лейкоза). Моноклональное антитело MY9 представляет собой мышное антитело IgG1, которое специфически связывается с антигеном CD33 (Griffin et al., *Leukemia Res.*, 8: 521 (1984)), и его можно использовать для воздействия на клетки, которые экспрессируют CD33 (например, клетки острого миелогенного лейкоза (ОМЛ)).

Подобным образом моноклональное антитело анти-B4 (также именуемое как B4) представляет собой мышное антитело IgG1, которое связывается с антигеном CD19 на В-клетках (Nadler et al., *J. Immunol.*, 131: 244-250 (1983)), и его можно использовать для воздействия на В-клетки или пораженные клетки, которые экспрессируют CD19 (например, клетки неходжкинской лимфомы или клетки хронического лимфобластного лейкоза). N901 представляет собой мышное моноклональное антитело, которое связывается с антигеном CD56 (молекула адгезии нервных клеток), находящимся на клетках нейроэндокринного происхождения, включая клетки мелкоклеточной опухоли легких, и которое можно использовать в конъюгате для воздействия лекарственных средств на клетки нейроэндокринного происхождения. У антител J5, MY9 и B4 предпочтительно изменяют поверхность или их гуманизируют перед использованием в составе конъюгата. Изменение поверхности или гуманизация антител описана, например, в Roguska et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:969-73 (1994).

Дополнительно, моноклональное антитело C242 связывается с антигеном CanAg (см., например, патент США №5552293), и его можно использовать для воздействия конъюгата на опухоли, экспрессирующие CanAg, такие как колоректальный рак, рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легких и рак желудка. HuC242 представляет собой антитело, гуманизированное из моноклонального антитела C242 (см., например, патент США №5552293). Гибридома, из которой получают HuC242, депонирована в ECACC, идентификационный номер 90012601. HuC242 может быть получен с использованием методики привития CDR (см., например, патенты США №5585089, 5693761 и 5693762) или технологии изменения поверхности (см., например, патент США №5639641). HuC242 можно использовать для воздействия конъюгата на клетки опухоли, экспрессирующие антиген CanAg, такие как клетки колоректального рака, рака поджелудочной железы, немелкоклеточного рака легких и рака желудка.

Для воздействия на клетки рака яичников и рака предстательной железы в конъюгате в качестве агента, связывающегося с клетками, можно использовать антитело к MUC1. Антитела к MUC1 включают, например, антитело к HMFG-2 (см., например, Taylor-Papadimitriou et al., *Int. J. Cancer*, 28: 17-21 (1981)), hCTMO1 (см., например, van H of et al., *Cancer Res.*, 56: 5179-5185 (1996)) и DS6. На клетки рака предстательной железы также можно воздействовать конъюгатом с использованием антитела к простатическому специальному мембранныму антигену (ПСМА) в качестве агента, связывающегося

с клетками, такого как J591 (см., например, Liu et al., *Cancer Res.*, 57: 3629-3634 (1997)). Кроме того, на раковые клетки, которые экспрессируют антиген Her2, такие как клетки рака молочной железы, предстательной железы и яичников, можно воздействовать конъюгатом с использованием антител к Her2, например трастузумаба, в качестве 5 агента, связывающегося с клетками. На клетки, которые экспрессируют рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) и его варианты, такие как делеционный мутант III типа, EGFRvIII, можно воздействовать конъюгатом с использованием антител к EGFR. Антитела к EGFR описаны в международных патентных заявках № PCT/US11/058385 и PCT/US 11/058378. Антитела к EGFRvIII описаны в патентах США №7736644 10 и 7628986 и публикациях заявок на патенты США 2010/0111979, 2009/0240038, 2009/0175887, 2009/0156790 и 2009/0155282. Также в конъюгате можно использовать антитела 15 к IGF-IR, которые связываются с рецептором инсулиноподобного фактора роста, такие как описанные в патенте США №7982024. Также в конъюгате можно использовать антитела, которые связываются с CD27L, Cripto, CD138, CD38, EphA2, интегринами, CD37, фолатом, CD20, PSGR, NGEП, PSCA, TMEFF2, STEAP1, эндоглином и Her3.

В одном варианте реализации изобретения антитело выбрано из группы, состоящей из huN901, huMy9-6, huB4, huC242, антитела к HER2 (например, трастузумаба), биватузумаба, сибротузумаба, ритуксимаба, huDS6, антител к мезотелину, описанных в публикации международной патентной заявки WO 2010/124797 (таких как MF-T), 20 антител к крипто (cripto), описанных в публикации заявки на патент США 2010/0093980 (таких как huB3F6), антител к CD138, описанных в публикации заявки на патент США 2007/0183971 (таких как huB-B4), антител к EGFR, описанных в международных патентных заявках № PCT/US 11/058385 и PCT/US 11/058378 (таких как EGFR-7), антител к EGFRvIII, описанных в патентах США №7736644 и 7628986 и публикациях заявок на 25 патенты США 2010/0111979, 2009/0240038, 2009/0175887, 2009/0156790 и 2009/0155282, гуманизированных антител EphA2, описанных в публикациях международных патентных заявок WO 2011/039721 и WO 2011/039724 (таких как 2H11R35R74); антител к CD38, описанных в публикации международной патентной заявки WO 2008/047242 (таких как hu38SB19), антител к рецептору фолиевой кислоты, описанных в публикации 30 международной патентной заявки WO 2011/106528 и публикации заявки на патент США 2012/0009181 (например, huMov19); антител к IGF1R, описанных в патентах США №5958872, 6596743 и 7982024; антител к CD37, описанных в публикации заявки на патент США 2011/0256153 (например, huCD37-3); антител к интегрину $\alpha_6\beta_1$, описанных в 35 публикации заявки на патент США 2006/0127407 (например, CNT095); и антител к Her3, описанных в публикации международной патентной заявки WO 2012/019024. В одном варианте реализации изобретения агент, связывающийся с клетками, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с FGFR2 (например, которые описаны в US 2014/030820, полное содержание которого включено в 40 данный документ посредством ссылки). В другом варианте реализации изобретения агент, связывающийся с клетками, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с FGFR2 и FGFR4 (например, которые описаны в US 2014/301946, полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки).

Еще в одном варианте реализации изобретения агент, связывающийся с клетками, 45 связывается с человеческим FGFR3 (SEQ ID №: 11). Конкретнее, агент, связывающийся с клетками, связывается с человеческим FGFR3 (SEQ ID №11) и содержит CDRH1, имеющий последовательность GYMFTSYGIS (SEQ ID №1), CDRH2, имеющий

последовательность **WVSTYNGDTNYAQKFQG** (SEQ ID №2), CDRH3, имеющий последовательность **VLGYYDSIDGYYYGMDV** (SEQ ID №3), CDRL1, имеющий последовательность **GGNNIGDKSVH** (SEQ ID №4), CDRL2, имеющий

⁵ последовательность **LDTERPS** (SEQ ID №5), и CDRL3, имеющий последовательность **QVWDSGSDHVV** (SEQ ID №6). Еще конкретнее, агент, связывающийся с клетками, дополнительно содержит вариабельную тяжелую аминокислотную последовательность:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYMFTSYGISWVRQAPGQGLEWMG

¹⁰ **WVSTYNGDTNYAQKFQGRVTVTTDTSTSTAYMELRSLRSEDTAVYYCARVLGYY**
DSIDGYYYGMDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID №7) и вариабельную легкую аминокислотную последовательность:

QSVLTQPPSLSVAPGKTATFTCGGNNIGDKSVHWYRQKPGQAPVLVMYLD

¹⁵ **TERPSGIPERMSGNSFGNTATLTITRVEAGDEADYYCQVWDSGSDHVVFGGGTKLT**
VLG (SEQ ID №8).

В другом более конкретном варианте реализации изобретения агент, связывающийся с клетками, дополнительно содержит легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №: 10, и тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID №: 9. В другом варианте реализации изобретения агент, связывающийся с клетками, дополнительно содержит две легких цепи, причем каждая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID №: 10, и две тяжелых цепи, причем каждая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID №: 9.

²⁵ Особенно предпочтительные антитела представляют собой гуманизированные моноклональные антитела, описанные в данном документе. Примеры включают, но не ограничиваясь ими, huN901, huMy9-6, huB4, huC242, гуманизированное моноклональное антитело к Нег2 (например, трастузумаб), биватузумаб, сибротузумаб, CNT095, huDS6 и ритуксимаб (см., например, патенты США №5639641 и 5665357, предварительную заявку на патент США №60/424,332 (которая связана с патентом США №7557189), публикацию международной (PCT) патентной заявки WO 02/16401, Pedersen et al., supra, Roguska et al., supra, Liu et al., supra, Nadler et al., supra, Colomer et al., Cancer Invest., 19: 49-56 (2001), Heider et al., Eur. J. Cancer, 31A: 2385-2391 (1995), Welt et al., J. Clin. Oncol., 12: 1193-1203 (1994), и Maloney et al., Blood, 90: 2188-2195 (1997)). В ³⁰ данной области техники известны другие гуманизированные моноклональные антитела, и их можно применять в данном изобретении.

В одном варианте реализации изобретения агент, связывающийся с клетками, представляет собой huMy9-6 или другие родственные антитела, которые описаны в патентах США №7342110 и 7557189 (включены в данный документ посредством ссылки).

⁴⁰ В другом варианте реализации изобретения агент, связывающийся с клетками, представляет собой антитело к рецептору фолиевой кислоты, описанное в предварительных заявках на патенты США №61/307797, 61/346595, 61/413172 и в заявке на патент США №13/033723 (опубликованной как US 2012-0009181 A1). Содержание всех этих заявок включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

⁴⁵ В другом варианте реализации изобретения агент, связывающийся с клетками, представляет собой гуманизированное антитело к рецептору фолиевой кислоты или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с человеческим рецептором фолиевой кислоты 1 (FOLR1), причем антитело содержит: (а) тяжелую цепь

CDR1, содержащую GYFMN; тяжелую цепь CDR2, содержащую RIHPYDGDTFYNQXaa₁Xaa₂Xaa₃; и тяжелую цепь CDR3, содержащую YDGSRAMDY; и (b) легкую цепь CDR1, содержащую KASQSVSFAGTSLMH; легкую цепь CDR2, содержащую RASNLEA; и легкую цепь CDR3, содержащую QQSREYPYT; где Xaa₁ 5 выбран из K, Q, H и R; Xaa₂ выбран из Q, H, N и R; и Xaa₃ выбран из G, E, T, S, A и V. Последовательность тяжелой цепи CDR2 предпочтительно содержит RIHPYDGDTFYNQKFQG.

В другом варианте реализации изобретения антитело к рецептору фолиевой кислоты

10 представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается человеческим рецептором фолиевой кислоты 1, содержащий тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность

QVQLVQSGAEVVKGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGR

15 IHPYDGDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYD

GSRAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY

FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI

CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD

20 TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST

YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY

TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD

25 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

В другом варианте реализации изобретения антитело к рецептору фолиевой кислоты представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, кодируемый плазмидной ДНК, депонированной в ATCC 7 апреля 2010 г. и имеющей номера ATCC PTA-10772 и PTA-10773 или 10774.

30 В другом варианте реализации изобретения антитело к рецептору фолиевой кислоты представляет собой гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи, по меньшей мере на около 90%, 95%, 99% или 100% идентичный

QVQLVQSGAEVVKGASVKISCKASGYTFTGYFMNWVKQSPGQSLEWIGR

35 HPYDGDTFYNQKFQGKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAM

DYWGQGTTVTVSS, и вариабельный домен легкой цепи, по меньшей мере на около

90%, 95%, 99% или 100% идентичный

40 DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRLLIYRASN

LEAGVPDRFSGSGSKTDFTLNISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTLEIKR;

или

45 DIVLTQSPLSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWYHQKPGQQPRL

LIYRASNLEAGVPDRFSGSGSKTDFLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPY

TFGGGTLEIKR.

Хотя агент, связывающийся с клетками, предпочтительно представляет собой антитело, он также может представлять собой молекулу, отличную от антитела.

Пригодные молекулы, не являющиеся антителами, включают, например, интерфероны (например, альфа-, бета- или гамма-интерферон), лимфокины (например, интерлейкин-2 (ИЛ-2), ИЛ-3, ИЛ-4 или ИЛ-6), гормоны (например, инсулин), факторы роста (например, EGF, TGF-альфа, FGF и VEGF), колониестимулирующие факторы (например, Г-КСФ, М-КСФ и ГМ-КСФ (см., например, Burgess, *Immunology Today*, 5: 155-158 (1984)), соматостатин и трансферрин (см., например, O'Keefe et al., *J. Biol. Chem.*, 260: 932-937 (1985)). Например, ГМ-КСФ, который связывается с миелоидными клетками, можно использовать в качестве агента, связывающегося с клетками, для воздействия на клетки острого миелогенного лейкоза. Дополнительно, ИЛ-2, который связывается с

активированными Т-клетками, можно использовать для профилактики отторжения трансплантата, для лечения и профилактики реакции «трансплантат против хозяина» и для лечения острого Т-клеточного лейкоза. Эпидермальный фактор роста (EGF) можно использовать для воздействия на плоскоклеточный рак, такой как рак легких и рак головы и шеи. Соматостатин можно использовать для воздействия на клетки нейробластомы и опухолевые клетки других типов.

ЦИТОТОКСИЧЕСКИЙ АГЕНТ

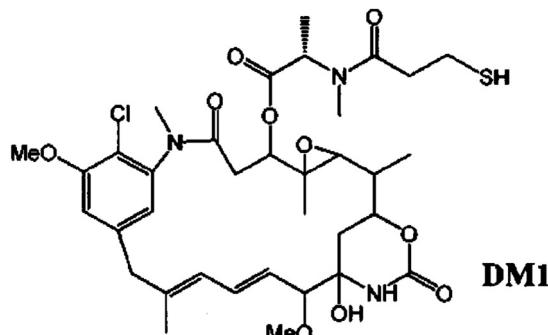
«Цитотоксический агент», при использовании в данном документе, относится к любому соединению, которое приводит к смерти клетки, вызывает смерть клетки или уменьшает выживаемость клетки. Пригодные цитотоксические агенты включают, например, майтанзиноиды и способные конъюгировать ансамитоцины (см., например, международную патентную заявку № PCT/US 11/59131, поданную 3 ноября 2011 г.), таксоиды, СС-1065 и аналоги СС-1065, и доластатин и аналоги доластатина. В конкретном варианте реализации изобретения цитотоксический агент представляет собой майтанзиноид, в том числе майтанзинол и аналоги майтанзинола. Майтанзиноиды представляют собой соединения, которые ингибируют образование микротрубочек и являются высокотоксичными для клеток млекопитающих. Примеры пригодных аналогов майтанзинола включают те, у которых есть модифицированное ароматическое кольцо, и те, у которых есть модификации в других положениях. Такие майтанзиноиды описаны, например, в патентах США №4256746, 4294757, 4307016, 4313946, 4315929, 4322348, 4331598, 4361650, 4362663, 4364866, 4424219, 4371533, 4450254, 5475092, 5585499, 5846545 и 6333410.

Примеры аналогов майтанзинола, имеющих модифицированное ароматическое кольцо, включают: (1) С-19-дехлоро (патент США №4256746) (полученный восстановлением ансамитоцина Р2 с помощью LAH), (2) С-20-гидрокси (или С-20-деметил)+/-С-19-дехлоро (патенты США №4361650 и 4307016) (полученный деметилированием с использованием *Streptomyces* или *Actinomyces* или дехлорированием с использованием LAH) и (3) С-20-деметокси, С-20-ацилокси (-OCOR), +/-дехлоро (патент США №4294757) (полученный ацилированием с использованием ацилхлоридов).

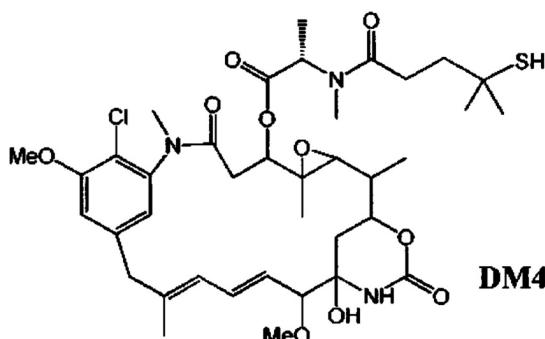
Примеры аналогов майтанзинола, имеющих модификации в положениях, отличных от ароматического кольца, включают: (1) С-9-SH (патент США №4424219) (полученный по реакции майтанзинола с H₂S или P₂S₅), (2) С-14-алкоксиметил (деметокси/CH₂OR) (патент США №4331598), (3) С-14-гидроксиметил или ацилоксиметил (CH₂OH или CH₂OAc) (патент США №4450254) (полученные с помощью *Nocardia*), (4) С-15-гидрокси/ацилокси (патент США №4364866) (полученные путем превращения майтанзинола под действием *Streptomyces*), (5) С-15-метокси (патенты США №4313946 и 4315929) (изолированный из *Trewia nudiflora*), (6) С-18-N-деметил (патенты США 4362663 и 4322348) (полученный деметилированием майтанзинола с помощью *Streptomyces*), и (7)

4,5-дезокси (патент США №4371533) (полученный восстановлением майтанзинола трихлоридом титана /LAH).

В конкретном варианте реализации изобретения цитотоксический агент, который можно использовать в способах по настоящему изобретению, представляет собой тиол-⁵ содержащий майтанзинол DM1, также известный как N^{2'}-деацетил-N^{2'}-(3-меркапто-1-оксопропил)майтанзин. Структура DM1 представлена формулой (I):

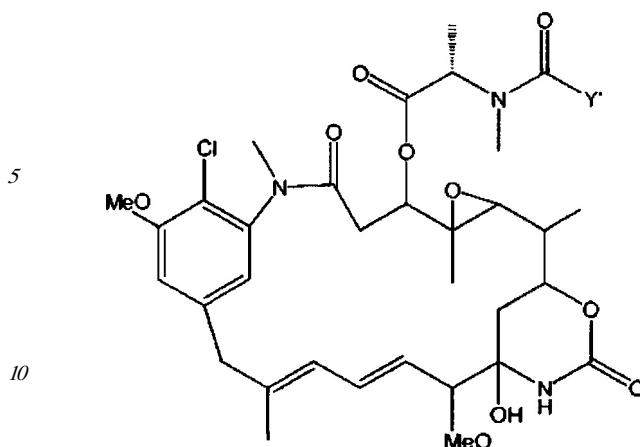


В другом предпочтительном варианте реализации изобретения цитотоксический агент, который можно использовать в способах по настоящему изобретению, представляет собой тиол-содержащий майтанзинол DM4, также известный как ²⁰ N^{2'}-деацетил-N^{2'}-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)майтанзин. Структура DM4 представлена формулой (II):



В контексте настоящего изобретения можно использовать другие майтанзинолы, в том числе, например, тиол- и дисульфид-содержащие майтанзинолы сmono- или ³⁵ dialкильным замещением на атоме углерода, несущем атом серы. Особенно предпочтительным является майтанзинол, имеющий в положении C-3 (a) C-14 гидроксиметильную, C-15 гидроксильную функциональные группы или C-20 десметил, и (b) ацилированную аминокислотную боковую цепь с ацильной группой, несущей затрудненную сульфидрильную группу, причем атом углерода ацильной группы, несущей тиольную функциональную группу, имеет один или два заместителя, при этом ⁴⁰ указанные заместители представляют собой линейный или разветвленный алкил или алкенил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, циклический алкил или алкенил, имеющий от 3 до 10 атомов углерода, фенильный, замещенный фенильный, или гетероциклический ароматический, или гетероциклоалкильный радикал, и дополнительно один из заместителей может представлять собой H, а ацильная группа имеет линейную цепь, ⁴⁵ длиной в по меньшей мере три углеродных атома между карбонильной функциональной группой и атомом серы.

Дополнительные майтанзинолы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают соединения, представленные формулой (III):

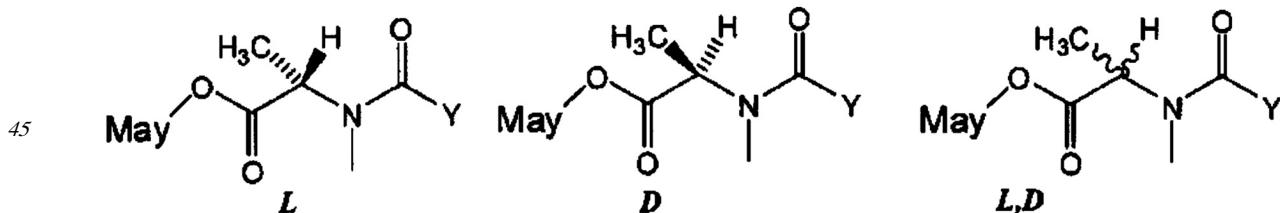


где Y' представляет

$(CR_7R_8)_1(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_qA_0(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C\equiv C)_sB_t(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$, где

каждый из R_1 и R_2 независимо представляет собой линейный алкил или алкенил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, имеющий от 3 до 10 атомов углерода, фенильный, замещенный фенильный, или гетероциклический ароматический, или гетероциклоалкильный радикал, и где R_2 также может представлять собой H , где A , B , D представляют собой циклоалкил или циклоалкенил, имеющий 3-10 атомов углерода, простой или замещенный арильный, или гетероциклический ароматический, или гетероциклоалкильный радикал, где каждый из R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} , R_{11} и R_{12} независимо представляет собой H , линейный алкил или алкенил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, имеющий от 3 до 10 атомов углерода, фенильный, замещенный фенильный, или гетероциклический ароматический, или гетероциклоалкильный радикал, где каждый из 1, m , n , o , p , q , r , s и t независимо равен нулю или целому числу от 1 до 5 при условии, что по меньшей мере два из 1, m , n , o , p , q , r , s и t не равны нулю одновременно, и где Z представляет собой H , SR или COR , где R представляет собой линейный алкил или алкенил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, имеющий от 3 до 10 атомов углерода, или простой или замещенный арильный, или гетероциклический ароматический, или гетероциклоалкильный радикал. Предпочтительные варианты реализации формулы (III) включают соединения формулы (III), где (a) R_1 представляет собой H , R_2 представляет собой метил, и Z представляет собой H , (b) R_1 и R_2 представляют собой метил, и Z представляет собой H , (c) R_1 представляет собой H , R_2 представляет собой метил, и Z представляет собой $-SCH_3$, и (d) R_1 и R_2 представляют собой метил, и Z представляет собой $-SCH_3$.

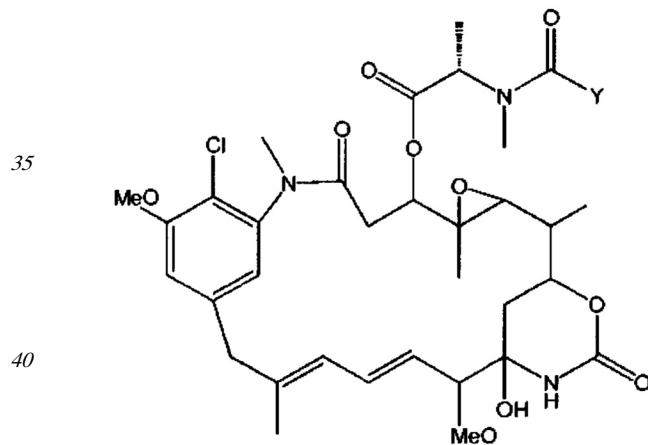
Такие дополнительные майтанзиноиды также включают соединения, представленные формулами (IV-L), (IV-D) или (IV-D,L):



где Y' представляет $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$, где каждый из R_1 и R_2

независимо представляет собой линейный алкил или алкенил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, имеющий от 3 до 10 атомов углерода, фенильный, замещенный фенильный, или гетероциклический ароматический, или гетероциклоалкильный радикал, и где R_2 также может представлять собой H , где каждый из R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 и R_8 независимо представляет собой H , линейный алкил или алкенил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, имеющий от 3 до 10 атомов углерода, фенильный, замещенный фенильный, или гетероциклический ароматический, или гетероциклоалкильный радикал, где каждый из 1, m и n независимо равен целому числу от 1 до 5, и дополнительно n может быть равен нулю, где Z представляет собой H , SR или COR , где R представляет собой линейный или разветвленный алкил или алкенил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, циклический алкил или алкенил, имеющий от 3 до 10 атомов углерода, или простой или замещенный арильный, или гетероциклический ароматический, или гетероциклоалкильный радикал, и где May представляет 15 майтанзиноид с боковой цепью в положении C-3, C-14 гидроксиметильной группой, C-15 гидрокси-группой или без металльной группы в положении C-20. Предпочтительные варианты реализации формул (IV-L), (IV-D) и (IV-D,L) включают соединения формул (IV-L), (IV-D) и (IV-D,L), где (a) R_1 представляет собой H , R_2 представляет собой метил, 20 каждый из R_5 , R_6 , R_7 , R_8 представляет собой H , каждый из 1 и m равен 1, правой 0, и Z представляет собой H , (b) R_1 представляет собой H , R_2 представляет собой метил, каждый из R_5 , R_6 , R_7 , R_8 представляет собой H , 1 и m равны 1, n равен 0, и Z представляет собой H , (c) R_1 представляет собой H , R_2 представляет собой метил, каждый из R_5 , R_6 , 25 R_7 , R_8 представляет собой H , каждый из 1 и m равен 1, n равен 0, и Z представляет собой $-SCH_3$, или (d) R_1 и R_2 представляют собой метил, каждый из R_5 , R_6 , R_7 , R_8 представляет собой H , 1 и m равны 1, n равен 0, и Z представляет собой $-SCH_3$. Цитотоксический агент 30 предпочтительно представлен формулой (IV-L).

Дополнительные предпочтительные майтанзиноиды также включают соединения, представленные формулой (V):



где $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$, где каждый из R_1 и R_2 независимо представляет собой линейный алкил или алкенил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, имеющий от 3 до 10 атомов углерода, фенильный, замещенный фенильный, или гетероциклический ароматический, или гетероциклоалкильный радикал, и где R_2 также может представлять собой H , где каждый

из R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ и R₈ независимо представляет собой H, линейный алкил или алкенил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, разветвленный или циклический алкил или алкенил, имеющий от 3 до 10 атомов углерода, фенильный, замещенный фенильный, или гетероциклический ароматический, или гетероциклоалкильный радикал, где каждый из 1, m и n независимо равен целому числу от 1 до 5, и дополнительно n может быть равен нулю, где Z представляет собой H, SR или COR, где R представляет собой линейный или разветвленный алкил или алкенил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, циклический алкил или алкенил, имеющий от 3 до 10 атомов углерода, или простой или замещенный арильный, или гетероциклический ароматический, или гетероциклоалкильный радикал, и где May представляет майтанзиноид, у которого есть боковая цепь в положении C-3, C-14 гидроксиметил, C-15 гидрокси или отсутствует металльная группа в положении C-20. Предпочтительные варианты реализации формул (IV-L), (IV-D) и (IV-D,L) включают соединения формул (IV-L), (IV-D) и (IV-D,L), где (a) R₁ представляет собой H, R₂ представляет собой метил, каждый из R₅, R₆, R₇, R₈ представляет собой H, каждый из 1 и m равен 1, n равен 0, и Z представляет собой H, (b) R₁ представляет собой H, R₂ представляет собой метил, каждый из R₅, R₆, R₇, R₈ представляет собой H, 1 и m равны 1, n равен 0, и Z представляет собой H, (c) R₁ представляет собой H, R₂ представляет собой метил, каждый из R₅, R₆, R₇, R₈ представляет собой H, каждый из 1 и m равен 1, n равен 0, и Z представляет собой -SCH₃, или (d) R₁ и R₂ представляют собой метил, каждый из R₅, R₆, R₇, R₈ представляет собой H, 1 и m равны 1, n равен 0, и Z представляет собой -SCH₃.

Предпочтительные варианты реализации формулы (V) включают соединения формулы (V), где (a) R₁ представляет собой H, R₂ представляет собой метил, каждый из R₅, R₆, R₇ и R₈ представляет собой H; каждый из 1 и m равен 1; n равен 0; и Z представляет собой H, (b) R₁ и R₂ представляют собой метил; каждый из R₅, R₆, R₇ и R₈ представляет собой H, 1 и m равны 1; n равен 0; и Z представляет собой H, (c) R₁ представляет собой H, R₂ представляет собой метил, каждый из R₅, R₆, R₇ и R₈ представляет собой H, каждый из 1 и m равен 1, n равен 0, и Z представляет собой -SCH₃, или (d) R₁ и R₂ представляют собой метил; каждый из R₅, R₆, R₇ и R₈ представляет собой H, 1 и m равны 1, n равен 0, и Z представляет собой -SCH₃.

В дополнение к майтанзиноидам цитотоксический агент, используемый в конъюгате, может представлять собой таксан или его производное. Таксаны представляют собой ряд соединений, который включает паклитаксел (Taxol.RTM.), цитотоксический природный продукт, и доцетаксел (Taxotere.RTM.), полусинтетическое производное, оба из которых широко применяются при лечении рака. Таксаны представляют собой токсические вещества для митотического веретена, которые ингибируют деполимеризацию тубулина, что приводит к смерти клетки. Хотя доцетаксел и паклитаксел являются эффективными агентами при лечении рака, их противоопухолевая активность ограничена вследствие неспецифической токсичности по отношению к нормальным клеткам. Дополнительно, такие соединения, как паклитаксел и доцетаксел, сами по себе не являются достаточно действенными, чтобы их использовать в конъюгатах агентов, связывающихся с клетками.

Для того, чтобы можно было лучше понять изобретение, описанное в данном документе, ниже изложены примеры. Следует понимать, что эти примеры приведены только в иллюстративных целях, и их не следует толковать как ограничивающие данное

изобретение каким-либо способом.

ПРИМЕРЫ

Пример 1.

Аналитические методы:

5 Концентрации антитела и конъюгата измеряли с использованием определенных экспериментально или рассчитанных коэффициентов экстинкции для компонентов, антитела и DM4, при 252 нм и 280 нм.

10 Мономерные высокомолекулярные соединения определяли с помощью эксклюзионной ВЭЖХ с использованием Tosoh Bioscience TSK G3000SWXL, колонка (7,8×300 мм), размер частиц 5 мкм. Подвижная фаза представляла собой 160 мМ фосфата калия, 212 мМ хлорида калия с pH 7,0, содержащих 15% изопропанола, хроматографирование при скорости потока 0,5 мл/мин, детектирование по поглощению при 280 нм.

15 Фрагменты антител анализировали с помощью Agilent 2100 Bioanalyzer с программным обеспечением 2100 Expert с использованием набора Protein 230 (каталожный номер 5087-1518). Денатурированные образцы готовили путем добавления буферного раствора для денатурации, который дополнительно содержит 1,6 мМ N- этилмалеимида (НЭМ), и образцы нагревают до 70°C в течение 5 минут. Все остальные 20 стадии, в том числе разбавления, внесение образца и маркеров и анализ выполняли в соответствии с инструкциями к набору Agilent Protein 230. Фрагментацию антител в процентах рассчитывали как сумму всех пиков соединений, которые меньше, чем мономеры антитела (за исключением известных артефактов гликозилирования), разделенную на сумму всех пиков, связанных с антителом.

25 Проведение реакции *in situ* (стадия (а) способов по настоящему изобретению) Реакции *in situ* для получения соединений цитотоксического агента с линкером проводили приведением в контакт DM4 (12 мМ) с линкером SPDB или сульфо-SPDB (10 мМ) в 70,0% (объем/объем) ДММА и 30% (объем/объем) одного из четырех исследуемых буферных растворов (200 мМ сукцинат, pH 5,0; 20 мМ сукцинат, pH 5,0; 167 мМ EPPS, 67 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТК, pH 8,2; 20 мМ EPPS, pH 8,2). Смеси 30 встряхивали и инкубировали при 20,0°C в течение 6 часов и использовали сразу же без какой-либо очистки.

35 Получение конъюгата (стадия (б) способов по настоящему изобретению): Смеси для конъюгации готовили смешиванием подходящего количества буфера для конъюгации (50 мМ EPPS, 20 мМ хлорида натрия, 2 мМ ЭДТК, pH 8,2) с рассчитанным количеством ДМАА так, чтобы окончательное содержание ДМАА составляло 2,5% или 10%. Затем к этим смесям добавляли антитело 1, антитело к FOLR1, для которого предварительно производили замену буферного раствора на буферный раствор для конъюгации с помощью гель-фильтрационной хроматографии, так, чтобы получить окончательную целевую концентрацию антитела. Добавляли рассчитанное количество 40 *in situ* реакционной смеси, необходимое для получения отношения майтанзиноида к антителу (MAR), равного от 3 до 4, и реакционные смеси сразу же перемешивали. Реакции конъюгации инкубировали при 20,0°C в течение 22 часов, перемешивая на орбитальном встряхивателе при 160 об/мин. В конце периода инкубирования в реакционных смесях с pH 8,2 изменяли pH добавлением 6,5% (объем/объем) 1 М уксусной кислоты, и их 45 фильтровали через фильтр из ПВДФ с размером пор 0,22 мкм. Отфильтрованные реакционные смеси с измененным pH очищали с помощью гель-фильтрации, и очищенные конъюгаты анализировали с помощью спектроскопии поглощения в УФ/ видимой областях, эксклюзионной высокоеффективной жидкостной хроматографии

(эксклюзионной ВЭЖХ) и КЭ с ДСН в невосстановливающих условиях (GelChip).

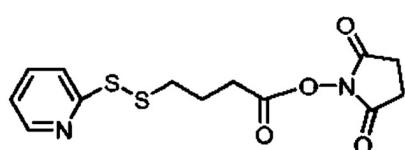
Таблица 1

Условия <i>in situ</i>	Условия конъюгации	Фрагмент (%)		Мономер (%)		Выход (%)		Эффективность связывания	
		sSPDB	SPDB	sSPDB	SPDB	sSPDB	SPDB	sSPDB	SPDB
167 мМ EPPS, pH 8,2	40 г/л 10 % ДМАА	11,2	11,3	95,8	95,3	87,4	89,5	87,1	78,2
	10 г/л 10 % ДМАА	9,5	9,4	96,3	95,7	90,9	89,0	66,9	74,7
	10 г/л 2,5% ДМАА	13,4	11,9	96,7	96,1	90,3	86,7	67,1	60,1
20 мМ EPPS, pH 8,2	40 г/л 10 % ДМАА	15,2	11,1	95,3	95,0	86,8	88,6	88,4	82,1
	10 г/л 10 % ДМАА	13,7	9,3	96,0	95,5	90,5	88,5	67,8	79,4
	10 г/л 2,5% ДМАА	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о

Таблица 2.

Условия <i>in situ</i>	Условия конъюгации	Фрагмент (%)		Мономер (%)		Выход (%)		Эффективность связывания (rMAR/MAR, %)	
		sSPDB	SPDB	sSPDB	SPDB	sSPDB	SPDB	sSPDB	SPDB
200 мМ сукцинат, pH 5,0	40 г/л 10 % ДМАА (26/25)	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
	10 г/л 10 % ДМАА (10/09)	9,1	9,7	96,26	95,74	91,0	89,3	66,1	68,6
	10 г/л 2,5% ДМАА	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
10 мМ сукцинат, pH 5,0	40 г/л 10 % ДМАА	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о
	10 г/л 10 % ДМАА (14/13)	12,1	10,4	96,05	95,42	89,4	87,8	67,1	80,4
	10 г/л 2,5% ДМАА	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о

Как показано в Таблицах 1 и 2, когда для *in situ* реакции sSPDB и DM4 (т.е. для реакции на стадии (а)) используют буферный раствор с высокой буферной емкостью, полученный коньюгат характеризуется значительно меньшей фрагментацией антитела по сравнению с коньюгатами, полученными с использованием буферного раствора с низкой буферной емкостью. В отличие от этого, буферная емкость не оказывает значительного влияния на фрагментацию антитела, когда в качестве бифункционального сшивающего реагента используют SPDB. Структура линкера SPDB показана ниже:



Пример 2.

Антитело 2, антитело к FGFR3, имеющее легкую цепь с аминокислотной последовательностью SEQ ID №: 10 и тяжелую цепь с аминокислотной

последовательностью SEQ ID №: 9, концентрировали до 30 мг/мл и диафильтровали 10 объемами рабочего буферного раствора (50 мМ EPPS, 20 мМ хлорида натрия, 2 мМ ЭДТК, pH 8,2) и дополнительно концентрировали до 45 г/л. DM4 (12 мМ) и сульфо-SPDB (10 мМ) в молярном отношении 1,2 приводили в контакт с сульфо-SPDB и

5 антителом в молярном отношении 4,68 в 167 мМ EPPS, 66,7 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТК, pH 8,2 и 70,0% (объем/объем) ДМАА. Реакцию проводили *in situ* в течение 10±4 часов при 20±3°C, затем добавляли к антителу 2 с ДМАА так, чтобы получить окончательную концентрацию антитела 20 мг/мл в 50 мМ EPPS, 20 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТК, pH 8,2±0,2 и 5,0% ДМАА (объем/объем). Реакцию конъюгации проводили при 20,0±3,0°C в течение

10 16±8 часов. После реакции pH реакционной смеси быстро доводили до 5,0 добавлением 6,5% (объем/объем) 1 М уксусной кислоты. Смесь с измененным pH концентрировали до 20 мг/мл и диафильтровали 16 объемами основного буферного раствора, используемого в составе (10 мМ ацетата, pH 5,0±0,1). Очищенный конъюгат в концентрации 5,0 мг/мл вводили в состав, содержащий 10 мМ ацетата, 9% (масса/объем)

15 сахарозы, 0,01% (масса/объем) полисорбата-20 (твин-20), pH 5,0, с использованием концентрированных исходных растворов сахарозы (45%, масса/объем) и полисорбата-20 (10%, масса/объем).

>

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ИММУНОДЖЕН, ИНК.

<120> СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЬЮГАТОВ АГЕНТА, СВЯЗЫВАЮЩЕГОСЯ С КЛЕТКАМИ, И ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО АГЕНТА

<130> 121162-03020

<150> 62/081914

<151> 2014-11-19

<160> 11

<170> PatentIn версии 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 1

35 Gly Tyr Met Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser

1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

40 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 2

Trp Val Ser Thr Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

45 1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 17

<212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетическая
 5 <400> 3
 Val Leu Gly Tyr Tyr Asp Ser Ile Asp Gly Tyr Tyr Gly Met Asp
 1 5 10 15
 Val
 <210> 4
 10 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетическая
 15 <400> 4
 Gly Gly Asn Asn Ile Gly Asp Lys Ser Val His
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 7
 20 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетическая
 <400> 5
 25 Leu Asp Thr Glu Arg Pro Ser
 1 5
 <210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 30 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетическая
 <400> 6
 Gln Val Trp Asp Ser Gly Ser Asp His Val Val
 35 1 5 10
 <210> 7
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <223> Синтетическая
 <400> 7
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 45 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Met Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Val Ser Thr Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 5 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Leu Gly Tyr Tyr Asp Ser Ile Asp Gly Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 10 115 120 125
 <210> 8
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <223> Синтетическая
 <400> 8
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Leu Ser Val Ala Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 20 Thr Ala Thr Phe Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Asp Lys Ser Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Tyr
 35 40 45
 Leu Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Met Ser Gly Ser
 25 50 55 60
 Asn Phe Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Gly Ser Asp His
 85 90 95
 30 Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105
 <210> 9
 <211> 456
 <212> PRT
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетическая
 <400> 9
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 40 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Met Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 45 Gly Trp Val Ser Thr Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Leu Gly Tyr Tyr Asp Ser Ile Asp Gly Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 5 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 130 135 140
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 10 145 150 155 160
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190
 15 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 195 200 205
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
 210 215 220
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 20 225 230 235 240
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270
 25 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 30 305 310 315 320
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350
 35 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 355 360 365
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 40 385 390 395 400
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430
 45 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 10
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <223> Синтетическая
 <400> 10
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Leu Ser Val Ala Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 10 Thr Ala Thr Phe Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Asp Lys Ser Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Tyr
 35 40 45
 Leu Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Met Ser Gly Ser
 15 50 55 60
 Asn Phe Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Gly Ser Asp His
 85 90 95
 20 Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
 115 120 125
 Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
 25 130 135 140
 Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
 165 170 175
 30 Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
 180 185 190
 Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
 195 200 205
 Ala Pro Ala Glu Cys Ser
 35 210
 <210> 11
 <211> 795
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 11
 Met Gly Ala Pro Ala Cys Ala Leu Ala Leu Cys Val Ala Val Ala Ile
 1 5 10 15
 Val Ala Gly Ala Ser Ser Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val
 20 25 30
 45 Gly Arg Ala Ala Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Glu Leu Val
 35 40 45
 Phe Gly Ser Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Pro Gly Gly
 50 55 60

Gly Pro Met Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly Leu Val
 65 70 75 80
 Pro Ser Glu Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Val Leu Asn Ala
 85 90 95
 5 Ser His Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg Leu Thr Arg
 100 105 110
 Val Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala Pro Ser Ser Gly
 115 120 125
 10 Asp Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Asp Thr
 130 135 140
 Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu Leu
 145 150 155 160
 Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly
 165 170 175
 15 Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser Trp Leu Lys Asn Gly Arg Glu Phe Arg
 180 185 190
 Gly Glu His Arg Ile Gly Gly Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp Ser
 195 200 205
 Leu Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Asn Tyr Thr Cys
 20 210 215 220
 Val Val Glu Asn Lys Phe Gly Ser Ile Arg Gln Thr Tyr Thr Leu Asp
 225 230 235 240
 Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro
 245 250 255
 25 Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys
 260 265 270
 Val Tyr Ser Asp Ala Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Val Glu Val
 275 280 285
 Asn Gly Ser Lys Val Gly Pro Asp Gly Thr Pro Tyr Val Thr Val Leu
 30 290 295 300
 Lys Thr Ala Gly Ala Asn Thr Thr Asp Lys Glu Leu Glu Val Leu Ser
 305 310 315 320
 Leu His Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala
 325 330 335
 35 Gly Asn Ser Ile Gly Phe Ser His His Ser Ala Trp Leu Val Val Leu
 340 345 350
 Pro Ala Glu Glu Glu Leu Val Glu Ala Asp Glu Ala Gly Ser Val Tyr
 355 360 365
 Ala Gly Ile Leu Ser Tyr Gly Val Gly Phe Phe Leu Phe Ile Leu Val
 40 370 375 380
 Val Ala Ala Val Thr Leu Cys Arg Leu Arg Ser Pro Pro Lys Lys Gly
 385 390 395 400
 Leu Gly Ser Pro Thr Val His Lys Ile Ser Arg Phe Pro Leu Lys Arg
 405 410 415
 45 Gln Val Ser Leu Glu Ser Asn Ala Ser Asn Ser Ser Asn Thr Pro Leu
 420 425 430
 Val Arg Ile Ala Arg Leu Ser Ser Gly Glu Gly Pro Thr Leu Ala Asn
 435 440 445

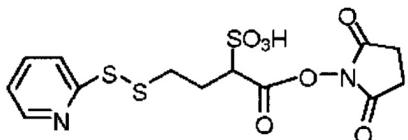
Val Ser Glu Leu Glu Leu Pro Ala Asp Pro Lys Trp Glu Leu Ser Arg
 450 455 460
 Ala Arg Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln
 465 470 475 480
 5 Val Val Met Ala Glu Ala Ile Gly Ile Asp Lys Asp Arg Ala Ala Lys
 485 490 495
 Pro Val Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp Asp Ala Thr Asp Lys
 500 505 510
 10 Asp Leu Ser Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly
 515 520 525
 Lys His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Gly Gly
 530 535 540
 Pro Leu Tyr Val Leu Val Glu Tyr Ala Ala Lys Gly Asn Leu Arg Glu
 545 550 555 560
 15 Phe Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Leu Asp Tyr Ser Phe Asp Thr
 565 570 575
 Cys Lys Pro Pro Glu Glu Gln Leu Thr Phe Lys Asp Leu Val Ser Cys
 580 585 590
 20 Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu Ala Ser Lys Cys Ile
 595 600 605
 His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asp Asn Val
 610 615 620
 Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Val His Asn Leu Asp
 625 630 635 640
 25 Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala
 645 650 655
 Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr His Ser Asp Val Ser Phe
 660 665 670
 30 Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro
 675 680 685
 Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg
 690 695 700
 Met Asp Lys Pro Ala Asn Cys Thr His Asp Leu Tyr Met Ile Met Arg
 705 710 715 720
 35 Glu Cys Trp His Ala Ala Pro Ser Arg Pro Thr Phe Lys Leu Val Glu
 725 730 735
 Asp Leu Asp Arg Val Leu Thr Val Thr Ser Thr Asp Glu Tyr Leu Asp
 740 745 750
 40 Leu Ser Ala Pro Phe Glu Tyr Ser Pro Gly Gly Gln Asp Thr Pro Ser
 755 760 765
 Ser Ser Ser Ser Gly Asp Asp Ser Val Phe Ala His Asp Leu Leu Pro
 770 775 780
 Pro Ala Pro Pro Ser Ser Gly Gly Ser Arg Thr
 785 790 795
 45 <---->

(57) Формула изобретения

1. Способ получения конъюгата агента, связывающегося с клетками, и

цитотоксического агента, включающий стадии, на которых:

(а) цитотоксический агент приводят в контакт с бифункциональным сшивающим реагентом, представленным следующей структурной формулой:



или его солью, в буферном растворе, содержащем буферный агент, для получения 10 первой смеси, содержащей соединение цитотоксического агента с линкером, причем буферный раствор имеет высокую буферную емкость, и молярное отношение буферного агента к бифункциональному сшивающему реагенту составляет от 2:1 до 8:1;

15 (б) соединение цитотоксического агента с линкером в первой смеси, полученной на стадии (а), приводят в контакт с агентом, связывающимся с клетками, в растворе, имеющем pH от 4 до 9, для получения второй смеси, содержащей конъюгат агента, связывающегося с клетками, и цитотоксического агента.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что агент, связывающийся с клетками, подвержен фрагментации.

3. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что цитотоксический агент представляет собой майтанзинойд.

20 4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что цитотоксический агент представляет собой DM4.

5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что агент, связывающийся с клетками, представляет собой антитело к рецептору фолиевой кислоты.

25 6. Способ по п. 1, отличающийся тем, что молярное отношение буферного агента к бифункциональному сшивающему реагенту составляет от 4:1 до 6:1.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что молярное отношение буферного агента к бифункциональному сшивающему реагенту составляет 5:1.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что буферный раствор имеет pH от 4 до 9.

30 9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что буферный раствор имеет pH от 7,5 до 8,5.

10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что буферный раствор имеет pH от 7,9 до 8,5, от 8,0 до 8,4 или от 8,1 до 8,3.

11. Способ по п. 8, отличающийся тем, что буферный раствор имеет pH 8,2.

12. Способ по п. 1, отличающийся тем, что буферный агент выбран из группы, состоящей из цитратного буферного агента, ацетатного буферного агента, сукцинатного буферного агента и фосфатного буферного агента.

35 13. Способ по п. 1, отличающийся тем, что буферный агент выбран из группы, состоящей из HEPPSO (N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-гидроксипропансульфоновая кислота)), POPSO (дигидрат пиперазин-1,4-бис-(2-гидроксипропансульфоновой кислоты)), HEPES (4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновая кислота), EPPS (4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-пропансульфоновая кислота), TES (N-[три(гидроксиметил)метил]-2-аминоэтансульфоновая кислота), MES (2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота) и их комбинации.

40 14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что буферный агент представляет собой EPPS.

45 15. Способ по п. 1, отличающийся тем, что буферный раствор дополнительно содержит хлорид натрия.

16. Способ по п. 1, отличающийся тем, что буферный раствор дополнительно содержит органический растворитель.

17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что органический растворитель представляет собой диметилацетамид (ДМАА).

18. Способ по п. 15 или 16, отличающийся тем, что органический растворитель присутствует в количестве 1-99%, 50-99%, 60-99% или 70-99% от объема буферного

5 раствора.

19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что органический растворитель присутствует в количестве 50-90%, 55-85%, 60-80% или 65-75% от объема буферного раствора.

20. Способ по п. 18, отличающийся тем, что органический растворитель присутствует в количестве 70% от объема буферного раствора.

10 21. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в реакции на стадии (а) используют молярный избыток цитотоксического агента по отношению к бифункциональному сшивающему реагенту.

15 22. Способ по п. 21, отличающийся тем, что молярное отношение цитотоксического агента к бифункциональному сшивающему реагенту составляет от 1,1:1 до 20:1, от 1,1:1 до 10:1, от 1,1:1 до 5:1 или от 1,1:1 до 2:1.

23. Способ по п. 21, отличающийся тем, что молярное отношение цитотоксического агента к бифункциональному сшивающему реагенту составляет от 1,1:1 до 1,3:1.

24. Способ по п. 22, отличающийся тем, что молярное отношение цитотоксического агента к бифункциональному сшивающему реагенту составляет 1,2:1.

20 25. Способ по п. 1, отличающийся тем, что реакцию на стадии (а) проводят от 1 часа до 2 часов.

26. Способ по п. 1, отличающийся тем, что реакцию на стадии (а) проводят от 2 часов до 5 часов.

25 27. Способ по п. 1, отличающийся тем, что реакцию на стадии (а) проводят от 5 часов до 20 часов.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что реакцию на стадии (а) проводят от 5 часов до 15 часов.

29. Способ по п. 27, отличающийся тем, что реакцию на стадии (а) проводят от 4 часов до 8 часов или от 5 часов до 7 часов.

30 30. Способ по п. 27, отличающийся тем, что реакцию на стадии (а) проводят 6 часов.

31. Способ по п. 1, отличающийся тем, что реакцию на стадии (а) проводят при температуре от 15°C до 25°C.

32. Способ по п. 31, отличающийся тем, что реакцию на стадии (а) проводят при температуре от 17°C до 23°C, от 18°C до 22°C или от 19°C до 21°C.

35 33. Способ по п. 31, отличающийся тем, что реакцию на стадии (а) проводят при температуре 20°C.

34. Способ по п. 1, отличающийся тем, что раствор на стадии (б) имеет pH 5,0-9,0, 5,5-9,0, 6,0-9,0 или 6,5-9,0.

35. Способ по п. 34, отличающийся тем, что раствор на стадии (б) имеет pH 7,5-8,5.

40 36. Способ по п. 34, отличающийся тем, что раствор на стадии (б) имеет pH 8,0-8,4 или 8,1-8,3.

37. Способ по п. 34, отличающийся тем, что раствор на стадии (б) имеет pH 8,2.

38. Способ по п. 1, отличающийся тем, что раствор на стадии (б) содержит буферный агент, выбранный из группы, состоящей из цитратного буферного агента, ацетатного

45 буферного агента, сукцинатного буферного агента и фосфатного буферного агента.

39. Способ по п. 1, отличающийся тем, что раствор на стадии (б) содержит буферный агент, выбранный из группы, состоящей из HEPPSO (N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-гидроксипропансульфоновая кислота)), POPSO (дигидрат пиперазин-1,4-бис-(2-

гидроксипропансульфоновой кислоты)), HEPES (4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновая кислота), EPPS (4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-пропансульфоновая кислота), TES (N-[три(гидроксиметил)метил]-2-аминоэтансульфоновая кислота), MES (2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота) и их комбинации.

5 40. Способ по п. 39, отличающийся тем, что буферный агент представляет собой EPPS.

41. Способ по п. 1, отличающийся тем, что раствор на стадии (b) дополнительно содержит органический растворитель.

10 42. Способ по п. 41, отличающийся тем, что органический растворитель представляет собой DMAA.

43. Способ по п. 41 или 42, отличающийся тем, что органический растворитель присутствует в количестве 1-25%, 2-20%, 2-15% или 2-10% от объема раствора.

44. Способ по п. 43, отличающийся тем, что органический растворитель присутствует в количестве 2,5-7,5%, 3-7%, 4-6% или 4,5-5,5% от объема раствора.

15 45. Способ по п. 44, отличающийся тем, что органический растворитель присутствует в количестве 5% от объема раствора.

46. Способ по п. 1, отличающийся тем, что концентрация агента, связывающегося с клетками, в растворе на стадии (b) составляет от 5 г/л до 100 г/л.

20 47. Способ по п. 46, отличающийся тем, что концентрация агента, связывающегося с клетками, составляет от 5 г/л до 50 г/л.

48. Способ по п. 46, отличающийся тем, что концентрация агента, связывающегося с клетками, составляет от 10 г/л до 40 г/л.

49. Способ по п. 46, отличающийся тем, что концентрация агента, связывающегося с клетками, составляет от 15 г/л до 25 г/л, от 18 г/л до 22 г/л или от 19 г/л до 21 г/л.

25 50. Способ по п. 49, отличающийся тем, что концентрация агента, связывающегося с клетками, составляет 20 г/л.

51. Способ по п. 1, отличающийся тем, что реакцию на стадии (b) проводят от 10 часов до 30 часов.

30 52. Способ по п. 51, отличающийся тем, что реакцию на стадии (b) проводят от 15 часов до 25 часов.

53. Способ по п. 51, отличающийся тем, что реакцию на стадии (b) проводят от 8 часов до 24 часов, от 12 часов до 20 часов, от 14 часов до 18 часов или от 15 часов до 17 часов.

54. Способ по п. 53, отличающийся тем, что реакцию на стадии (b) проводят 16 часов.

35 55. Способ по п. 51, отличающийся тем, что реакцию на стадии (b) проводят от 18 часов до 26 часов, от 20 часов до 24 часов или от 19 часов до 23 часов.

56. Способ по п. 51, отличающийся тем, что реакцию на стадии (b) проводят 22 часа.

57. Способ по п. 1, отличающийся тем, что реакцию на стадии (b) проводят при температуре от 15°C до 25°C.

40 58. Способ по п. 57, отличающийся тем, что реакцию на стадии (b) проводят при температуре 20°C.

59. Способ по п. 1, отличающийся тем, что молярное отношение бифункционального сшивающего реагента к агенту, связывающемуся с клетками, составляет от 2 до 10.

45 60. Способ по п. 59, отличающийся тем, что молярное отношение бифункционального сшивающего реагента к агенту, связывающемуся с клетками, составляет от 3 до 6.

61. Способ по п. 60, отличающийся тем, что молярное отношение бифункционального сшивающего реагента к агенту, связывающемуся с клетками, составляет от 3,5 до 5.

62. Способ по п. 61, отличающийся тем, что молярное отношение бифункционального

сшивающего реагента к агенту, связывающемуся с клетками, составляет 4,0.

63. Способ по п. 1, отличающийся тем, что способ дополнительно включает стадию гашения реакции на стадии (b) путем изменения pH раствора до 5 или ниже.

64. Способ по п. 1, отличающийся тем, что способ дополнительно включает очистку 5 второй смеси, чтобы получить очищенный конъюгат агента, связывающегося с клетками, и цитотоксического агента.

65. Способ по п. 64, отличающийся тем, что вторую смесь очищают, подвергая смесь 10 тангенциально-поточному фильтрованию, селективному осаждению, адсорбционному фильтрованию, адсорбционному хроматографированию, неадсорбционному хроматографированию или их комбинации.

66. Способ по п. 65, отличающийся тем, что вторую смесь очищают, подвергая смесь тангенциально-поточному фильтрованию.

67. Способ по п. 1, отличающийся тем, что агент, связывающийся с клетками, представляет собой антитело.

68. Способ по п. 67, отличающийся тем, что антитело представляет собой 15 моноклональное антитело.

69. Способ по п. 68, отличающийся тем, что антитело представляет собой гуманизированное моноклональное антитело.

70. Способ по п. 69, отличающийся тем, что антитело выбрано из huN901, huMy9-6, 20 huB4, huC242, трастузумаба, биватузумаба, сибротузумаба, CNT095, huDS6, ритуксимаба, антитела к Her2, антитела к EGFR, антитела к CD27L, антитела к EGFRvIII, антитела к крипто (Cripto), антитела к CD138, антитела к CD38, антитела к EphA2, антитела, нацеленного на интегрин, антитела к CD37, антитела к рецептору фолиевой кислоты, антитела к Her3 и антитела к IGFIR.

25

30

35

40

45

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ИММУНОДЖЕН, ИНК.

<120> СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОНЬОГАТОВ АГЕНТА, СВЯЗЫВАЮЩЕГОСЯ С КЛЕТКАМИ, И ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО АГЕНТА

<130> 121162-03020

<150> 62/081914

<151> 2014-11-19

<160> 11

<170> PatentIn версии 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 1

Gly Tyr Met Phe Thr Ser Tyr Gly Ile Ser
1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 2

Trp Val Ser Thr Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 3

Val Leu Gly Tyr Tyr Asp Ser Ile Asp Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
1 5 10 15

Val

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтетическая

<400> 4

Gly Gly Asn Asn Ile Gly Asp Lys Ser Val His
 1 5 10

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетическая
 <400> 5

Leu Asp Thr Glu Arg Pro Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетическая
 <400> 6

Gln Val Trp Asp Ser Gly Ser Asp His Val Val
 1 5 10

<210> 7
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетическая
 <400> 7

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Met Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Val Ser Thr Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Val Leu Gly Tyr Tyr Asp Ser Ile Asp Gly Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 8
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетическая
 <400> 8
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Leu Ser Val Ala Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Thr Ala Thr Phe Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Asp Lys Ser Val
 20 25 30
 His Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Tyr
 35 40 45
 Leu Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Met Ser Gly Ser
 50 55 60
 Asn Phe Gly Asn Thr Ala Thr Ile Thr Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Gly Ser Asp His
 85 90 95
 Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105
 <210> 9
 <211> 456
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтетическая
 <400> 9
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Met Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Val Ser Thr Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Val Leu Gly Tyr Tyr Asp Ser Ile Asp Gly Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 145 150 155 160

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val
 210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 10
 <211> 214
 <212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтетическая

<400> 10

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Leu Ser Val Ala Pro Gly Lys
 1 5 10 15

Thr Ala Thr Phe Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Asp Lys Ser Val
 20 25 30

His Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Tyr
 35 40 45

Leu Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Met Ser Gly Ser
 50 55 60

Asn Phe Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Arg Val Glu Ala Gly
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Gly Ser Asp His
 85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
 100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
 115 120 125

Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
 130 135 140

Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
 145 150 155 160

Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
 165 170 175

Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
 180 185 190
 Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
 195 200 205
 Ala Pro Ala Glu Cys Ser
 210
 <210> 11
 <211> 795
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 11
 Met Gly Ala Pro Ala Cys Ala Leu Ala Leu Cys Val Ala Val Ala Ile
 1 5 10 15
 Val Ala Gly Ala Ser Ser Glu Ser Leu Gly Thr Glu Gln Arg Val Val
 20 25 30
 Gly Arg Ala Ala Glu Val Pro Gly Pro Glu Pro Gly Gln Glu Leu Val
 35 40 45
 Phe Gly Ser Gly Asp Ala Val Glu Leu Ser Cys Pro Pro Pro Gly Gly
 50 55 60
 Gly Pro Met Gly Pro Thr Val Trp Val Lys Asp Gly Thr Gly Leu Val
 65 70 75 80
 Pro Ser Glu Arg Val Leu Val Gly Pro Gln Arg Leu Val Leu Asn Ala
 85 90 95
 Ser His Glu Asp Ser Gly Ala Tyr Ser Cys Arg Gln Arg Leu Thr Arg
 100 105 110
 Val Leu Cys His Phe Ser Val Arg Val Thr Asp Ala Pro Ser Ser Gly
 115 120 125
 Asp Asp Glu Asp Gly Glu Asp Glu Ala Glu Asp Thr Gly Val Asp Thr
 130 135 140
 Gly Ala Pro Tyr Trp Thr Arg Pro Glu Arg Met Asp Lys Lys Leu Leu
 145 150 155 160
 Ala Val Pro Ala Ala Asn Thr Val Arg Phe Arg Cys Pro Ala Ala Gly
 165 170 175
 Asn Pro Thr Pro Ser Ile Ser Trp Leu Lys Asn Gly Arg Glu Phe Arg
 180 185 190
 Gly Glu His Arg Ile Gly Ile Lys Leu Arg His Gln Gln Trp Ser
 195 200 205
 Leu Val Met Glu Ser Val Val Pro Ser Asp Arg Gly Asn Tyr Thr Cys

210

215

220

Val Val Glu Asn Lys Phe Gly Ser Ile Arg Gln Thr Tyr Thr Leu Asp
 225 230 235 240

Val Leu Glu Arg Ser Pro His Arg Pro Ile Leu Gln Ala Gly Leu Pro
 245 250 255

Ala Asn Gln Thr Ala Val Leu Gly Ser Asp Val Glu Phe His Cys Lys
 260 265 270

Val Tyr Ser Asp Ala Pro His Ile Gln Trp Leu Lys His Val Glu Val
 275 280 285

Asn Gly Ser Lys Val Gly Pro Asp Gly Thr Pro Tyr Val Thr Val Leu
 290 295 300

Lys Thr Ala Gly Ala Asn Thr Thr Asp Lys Glu Leu Glu Val Leu Ser
 305 310 315 320

Leu His Asn Val Thr Phe Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Thr Cys Leu Ala
 325 330 335

Gly Asn Ser Ile Gly Phe Ser His His Ser Ala Trp Leu Val Val Leu
 340 345 350

Pro Ala Glu Glu Glu Leu Val Glu Ala Asp Glu Ala Gly Ser Val Tyr
 355 360 365

Ala Gly Ile Leu Ser Tyr Gly Val Gly Phe Phe Leu Phe Ile Leu Val
 370 375 380

Val Ala Ala Val Thr Leu Cys Arg Leu Arg Ser Pro Pro Lys Lys Gly
 385 390 395 400

Leu Gly Ser Pro Thr Val His Lys Ile Ser Arg Phe Pro Leu Lys Arg
 405 410 415

Gln Val Ser Leu Glu Ser Asn Ala Ser Asn Ser Ser Asn Thr Pro Leu
 420 425 430

Val Arg Ile Ala Arg Leu Ser Ser Gly Glu Gly Pro Thr Leu Ala Asn
 435 440 445

Val Ser Glu Leu Glu Leu Pro Ala Asp Pro Lys Trp Glu Leu Ser Arg
 450 455 460

Ala Arg Leu Thr Leu Gly Lys Pro Leu Gly Glu Gly Cys Phe Gly Gln
 465 470 475 480

Val Val Met Ala Glu Ala Ile Gly Ile Asp Lys Asp Arg Ala Ala Lys
 485 490 495

Pro Val Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys Asp Asp Ala Thr Asp Lys
 500 505 510

Asp Leu Ser Asp Leu Val Ser Glu Met Glu Met Met Lys Met Ile Gly
 515 520 525

Lys His Lys Asn Ile Ile Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr Gln Gly Gly
 530 535 540

Pro Leu Tyr Val Leu Val Glu Tyr Ala Ala Lys Gly Asn Leu Arg Glu
 545 550 555 560

Phe Leu Arg Ala Arg Arg Pro Pro Gly Leu Asp Tyr Ser Phe Asp Thr
 565 570 575

Cys Lys Pro Pro Glu Glu Gln Leu Thr Phe Lys Asp Leu Val Ser Cys
 580 585 590

Ala Tyr Gln Val Ala Arg Gly Met Glu Tyr Leu Ala Ser Lys Cys Ile
 595 600 605

His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Val Leu Val Thr Glu Asp Asn Val
 610 615 620

Met Lys Ile Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Val His Asn Leu Asp
 625 630 635 640

Tyr Tyr Lys Lys Thr Thr Asn Gly Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala
 645 650 655

Pro Glu Ala Leu Phe Asp Arg Val Tyr Thr His Ser Asp Val Ser Phe
 660 665 670

Gly Val Leu Leu Trp Glu Ile Phe Thr Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro
 675 680 685

Gly Ile Pro Val Glu Glu Leu Phe Lys Leu Leu Lys Glu Gly His Arg
 690 695 700

Met Asp Lys Pro Ala Asn Cys Thr His Asp Leu Tyr Met Ile Met Arg
 705 710 715 720

Glu Cys Trp His Ala Ala Pro Ser Arg Pro Thr Phe Lys Leu Val Glu
 725 730 735

Asp Leu Asp Arg Val Leu Thr Val Thr Ser Thr Asp Glu Tyr Leu Asp
 740 745 750

Leu Ser Ala Pro Phe Glu Tyr Ser Pro Gly Gly Gln Asp Thr Pro Ser
 755 760 765

Ser Ser Ser Ser Gly Asp Asp Ser Val Phe Ala His Asp Leu Leu Pro
 770 775 780

Pro Ala Pro Pro Ser Ser Gly Gly Ser Arg Thr
 785 790 795