



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 39/12 (2021.08); A61K 39/39 (2021.08); A61K 39/395 (2021.08); A61K 39/42 (2021.08); A61K 47/60 (2021.08); A61K 47/60 (2021.08); A61P 35/00 (2021.08); C07D 213/71 (2021.08); C07D 498/14 (2021.08); C07K 16/46 (2021.08)

(21)(22) Заявка: 2016130501, 02.06.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.06.2010

Дата регистрации:
27.01.2022

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
03.06.2009 US 61/183.774

Номер и дата приоритета первоначальной заявки,
из которой данная заявка выделена:
2011153288 03.06.2009

(43) Дата публикации заявки: 07.12.2018 Бюл. № 34

(45) Опубликовано: 27.01.2022 Бюл. № 3

Адрес для переписки:
109012, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
"Союзпатент"

(72) Автор(ы):

КЕЛЛОГ Бренда А. (US),
СИНГХ Раджиева (US),
ЧАРИ Рави В. Дж. (US)

(73) Патентообладатель(и):

ИММЬЮНОДЖЕН, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 2008171865 A1, 17.07.2008. US
20040192900 A1, 30.09.2004. US 2008279868 A1,
13.11.2008. LUNDBERG P. et al.: "Click Assisted
One-Pot Multi-Step Reactions in Polymer Science:
Accelerated Synthetic Protocols", Macromolecular
rapid communications, 2008, v. 29: 998-1001.
ERICKSON H. et al.: "Antibody-maytansinoid
conjugates are activated in (см. прод.)

(54) СПОСОБЫ КОНЬЮГАЦИИ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии, в частности к способу получения конъюгата. Изобретение раскрывает вариант конъюгации антитела и цитотоксического агента через бифункциональный линкер, причем цитотоксический агент предварительно связывают с линкером, после чего реакционная смесь используется без очищения для присоединения к антителу. Способ, описанный в изобретении,

обладает преимуществом для приготовления стабильно связанных конъюгатов с эффекторными или репортерными группами. Этот способ конъюгации дает высокий выход конъюгатов высокой чистоты и гомогенности без межцепочечных поперечных сшивок и инактивированных остатков линкера. 18 з.п. ф-лы, 1 табл., 25 ил., 8 пр.

(56) (продолжение):

targeted cancer cells by lysosomal degradation and linker-dependent intracellular processing", Cancer Res, 2006, v. 66 (8): 4426-33. US 2007196275 A1, 23.08.2007. US 2006024317 A1, 02.02.2006. WO 03092623 A2, 13.11.2003. WO 02098883 A1, 12.12.2002. ФЕДОСЕЕНКО М.В. и др.: "Эпоха конъюгированных вакцин: международный опыт успешного применения." Педиатрическая фармакология, 2008, 5 (6): 8-14.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)*A61K 31/5365* (2006.01)*A61K 47/68* (2017.01)*A61K 51/10* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 39/12 (2021.08); *A61K 39/39* (2021.08); *A61K 39/395* (2021.08); *A61K 39/42* (2021.08); *A61K 47/60* (2021.08); *A61K 47/60* (2021.08); *A61P 35/00* (2021.08); *C07D 213/71* (2021.08); *C07D 498/14* (2021.08); *C07K 16/46* (2021.08)

(21)(22) Application: **2016130501, 02.06.2010**(24) Effective date for property rights:
02.06.2010Registration date:
27.01.2022

Priority:

(30) Convention priority:

03.06.2009 US 61/183.774Number and date of priority of the initial application,
from which the given application is allocated:
2011153288 03.06.2009(43) Application published: **07.12.2018 Bull. № 34**(45) Date of publication: **27.01.2022 Bull. № 3**

Mail address:

109012, Moskva, ul. Ilinka, 5/2, OOO "Soyuzpatent"

(72) Inventor(s):

KELLOG Brenda A. (US),
SINGKH Radzhieva (US),
CHARI Ravi V. Dzh. (US)

(73) Proprietor(s):

IMMYUNODZHEN, INK. (US)(54) **CONJUGATION METHODS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: present invention relates to the field of biotechnology, in particular to a method for producing a conjugate. The invention discloses an option of conjugation of an antibody and a cytotoxic agent through a bifunctional linker, wherein the cytotoxic agent is preliminarily bound to the linker, after which the reaction mixture is used without purification to bind to the antibody. The method

described in the invention has an advantage for the preparation of stably bound conjugates with effector and reporter groups.

EFFECT: this conjugation method provides for high yield of conjugates of high purity and homogeneity without inter-chain cross-linking and inactivated linker residues.

19 cl, 1 tbl, 25 dwg, 8 ex

Заявлен приоритет предварительной заявки США номер 61/183,774, поданной 3 июня 2009, полное описание которой включено в данный документ в качестве ссылки.

Область техники

Это изобретение относится к новому способу конъюгации эффекторной группы (напр., цитотоксичного агента) или репортерной группы (напр., радиоактивной метки) со связывающимся с клеткой агентом, таким как антитело или его фрагмент, с помощью биофункционального линкера. Более конкретно, это изобретение относится к новому способу конъюгации эффекторной группы (напр., майтансиноид) или репортерной группы (напр., радиоактивной метки) со связывающимся с клеткой агентом (напр., антителом или его фрагментом) при посредстве биофункционального линкера, таким образом, что способ исключает этапы, которые приводят к образованию нежелательных гидролизированных молекул или нежелательных поперечно-сшитых молекул, образовавшихся в результате внутримолекулярных или межмолекулярных реакций.

Уровень техники

Конъюгаты связывающихся с клетками агентов, таких как антитела, с эффекторными группами, такими как маленькие цитотоксичные агенты или цитотоксичные белки, представляют огромный интерес для развития антираковой терапии (Richart, A. D., and Tolcher, A. W., 2007, Nature Clinical Practice, 4, 245-25). Эти конъюгаты являются опухолеспецифичными благодаря высокой специфичности отобранных антител против антигенов, экспрессирующихся на клеточной поверхности опухолевых клеток. При специфичном связывании с опухолевой клеткой, конъюгат антитела с цитотоксичным агентом проникает внутрь и разрушается внутри раковой клетки-мишени, таким образом высвобождая активный цитотоксичный агент, который ингибирует жизненно важные клеточные функции, такие как динамику микротрубочек или репликацию ДНК, что приводит к гибели раковой клетки. В связывании антител с цитотоксичными агентами принимают участие различные линкеры, с целью обеспечить доставку агента внутрь клетки путем интернализации и процессирования конъюгата, в то же время поддерживая желаемую стабильность конъюгата в плазме. Эти линкеры включают дисульфидные линкеры, разработанные с различными степенями стерического несоответствия, влияющими на кинетику их восстановления внутриклеточным тиолом, расщепляемые пептидные линкеры, такие как валин-цитруллиновое соединение, и нерасщепляемые линкеры, такие как тиоэфирное соединение (Widdison, W., et al., J. Med. Chem., 2006, 49, 4392-4408; Erickson, H., et al, Cancer Res., 2006, 66, 4426-4433).

Конъюгаты связывающихся с клетками агентов, таких как антитела, с метками или репортерными группами, полезны для применения для иммуносцинтиграфии опухолей у пациентов с раком, применения в иммунологических анализах для диагностики различных болезней, терапии рака с использованием связанных с радиоактивными нуклидами конъюгатов, и применения в аффинной хроматографии для очистки биоактивных агентов, таких как белки, пептиды и олигонуклеотиды. Метки репортерных групп, которые конъюгируют со связывающимся с клетками агентами, включают флуорофоры и аффинные метки, такие как биотин.

Традиционный способ конъюгации связывающихся с клетками агентов, таких как антитела (Ат), с эффекторной группой (напр., цитотоксичным агентом) или репортерной группой (напр., радиоактивной меткой) посредством нерасщепляемого соединения (такого как тиоэфирное соединение) состоит из двух различных этапов реакций с антителом и требует использования этапа очистки. В первом реакционном этапе антитело реагирует с гетеробифункциональным линкером, несущим две различные химически активные группы (например, X и Y). Например, в одном подходе, реакция

химически активных остатков антител (таких как остатки аминокислоты лизин) с X реактивной группой (такой как N -гидроксисукцинимидный сложный эфир) гетеробифункционального реагента приводит к образованию линкера с Y реактивной группой из одного или более химически активных остатков антитела (такой как остаток аминокислоты лизин). Первично модифицированный продукт антитела должен быть очищен от избытка линкера или гидролизованного реагента линкера перед переходом на следующий этап. На втором этапе реакции модифицированное линкером антитело, содержащее Y-реактивную группу (такую как малеимид или галоацетамид) реагирует с эффектором, таким как эффекторная группа (C) (напр., цитотоксичный агент), содержащим химически активную группу, такую как тиол, для создания конъюгата антитело-эффектор, который снова очищают на дополнительном этапе очистки (см., напр., патент США 5,208,020, 5,416,064, или 5,024,834). Таким образом, при вышеописанном способе необходимы по крайней мере два этапа очистки.

Другой подход, который включает два этапа реакции и очистки для конъюгации антитела с эффекторной или репортерной группой, использует реакцию остатков тиола в антителе (образованных благодаря модификации антитела с тиол-образующими реагентами, такими как 2-иминотиолан, или благодаря мутагенезу для включения чужеродных цистеиновых остатков, или благодаря расщеплению нативных дисульфидных связей) с гомобифункциональным линкером Y-L-Y, содержащим Y-реактивные группы (такие как малеимид или галоацетамид).

Основным препятствием для включения химически активной группы Y, такой как малеимид (или галоацетамид) в антитело или пептид является склонность химически активных малеимидных (или галоацетамидных) групп подвергаться внутри- или межмолекулярной реакции с нативными остатками гистидина, лизина, тирозина или цистеина в антителе или пептиде (Papini, A. et al., *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1992, 39, 348-355; Ueda, T. et al., *Biochemistry*, 1985, 24, 6316-6322), и водной инактивации Y-малеимидной группы. Нежелаемая внутри- или межмолекулярная реакция малеимидных (или галоацетамидных) групп Y, включенных в антитело с нативными остатками гистидина, лизина или цистеина в антителе, и водная инактивация Y-малеимидной группы перед второй реакцией с эффекторной или репортерной группой C приводят к образованию поперечно-сшитых белков или гетерогенных конъюгатов и снижают эффективность второй реакции с эффекторной или репортерной группой C. Гетерогенный продукт конъюгации - поперечно-сшитый белок или пептид, образовавшийся вследствие нежелаемой реакции первично включенной группы Y (такой как малеимидная группа) с нативными группами в антителе или пептидах (таких как гистидин, лизин, тиозин или цистеин) или с неактивными остатками малеимида, образованными при водной инактивации, может обладать худшей активностью и стабильностью, чем желаемый гомогенный продукт конъюгации.

Способы конъюгации антител с тиол-содержащими цитотоксичными агентами благодаря дисульфидным связям описаны выше (см., напр., патенты США 5,208,020, 5,416,064, 6,441,163, Патент США Публикация No. 2007/0048314 A1). Эти способы включают первичную реакцию антитела с гетерофункциональным реагентом, за которой следует вторая реакция с тиол-содержащим цитотоксичным агентом. Альтернативный способ описан в патенте США 6,441,163 B1, в котором связанный с дисульфидом химически активный сложный эфир цитотоксического агента вначале очищается и затем реагирует с антителом, но это включает дополнительную реакцию и этап очищения из-за содержащего тиоловую группу цитотоксического агента перед этапом реакции с антителом.

Следующее препятствие для современного способа создания конъюгатов со связывающимся с клетками агентами - необходимость двух этапов очищения, которые понижают общий выход и также делают способ громоздким и сравнительно дорогим.

Учитывая вышеизложенное, в данной области техники существует потребность в разработке улучшенных способов приготовления композиций конъюгатов связывающегося с клетками агента и препарата, которые обладают высокой степенью чистоты и при их приготовлении можно исключить трудоемкие этапы, что сокращает время и делает способ более экономным. Изобретение предоставляет такой способ. Эти и другие преимущества изобретения, а также дополнительные особенности изобретения, будут раскрыты в описании изобретения, предоставляемого здесь.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение описывает способ конъюгации для создания нерасщепляемых, соединенных тиэфирной связью конъюгатов с формулой C-L-CBA, где C представляет собой эффекторную или репортерную молекулу (напр., цитотоксичный агент или радиоактивную метку), L - линкер и CBA - связывающийся с клеткой агент (напр., антитело или его фрагмент), путем использования прямой реакции тиол-содержащего цитотоксичного агента (напр., майтансиноида) с гетеро- или гомо-бифункциональным реагентом (напр., расщепляемым или нерасщепляемым линкером), за которой следует смешивание неочищенной реакционной смеси со связывающимся с клеткой агентом (напр., антителом или его фрагментом), тем самым создавая нерасщепляемый соединенный тиэфирной связью конъюгат путем способа, являющегося более эффективным, дающего больший выход и сравнительно более экономичного. Другое важное преимущество состоит в том, что такой способ конъюгации дает соединенный тиэфирной связью нерасщепляемый конъюгат, не имеющий внутри цепочки поперечно-сшитых белков или инактивированных остатков (напр., остатков малеимида или галоацетида). Новые способы, раскрытые в этой заявке, могут применяться для приготовления любого конъюгата, представленного вышеупомянутой формулой.

Краткое описание фигур

На Фигуре 1 показана конъюгация антитела с реакционной смесью майтансиноида DM1 (или DM4) и Малеимида-PEG_n-NHS линкера

На Фигуре 2 показан SDS-PAGE в восстанавливающих условиях Ат-(PEG₄-Mal)-DM4 конъюгатов, приготовленных с использованием способа, описанного в этом изобретении, по сравнению с конъюгатами, приготовленными с использованием традиционного 2-этапного способа. Каждая дорожка с образцом содержала 10 мкг белка; гель был окрашен кумасси голубым (Coomassie blue). Дорожки 1 и 2 содержали маркеры молекулярной массы. Дорожка 3 содержала конъюгат, приготовленный традиционным двухэтапным способом с 6.1 DM4 на Ат. Дорожка 4 содержала конъюгат, приготовленный способом, описанным в этом изобретении, и содержащий 6.2 DM4 на Ат.

На Фигуре 3 показан белковый LabChip электрофорез конъюгата Ат-(PEG₄-Mal)-DM4, приготовленного с использованием способа, описанного в этом изобретении, по сравнению с конъюгатом, приготовленным с использованием традиционного 2-этапного способа. А. Белковый LabChip электрофорез в восстанавливающих условиях (Agilent 2100 Bioanalyzer/Agilent Protein 230 kit) Ат-(PEG₄-Mal)-DM4 конъюгатов. Дорожка 1: маркер молекулярной массы; дорожка 2: Ат-PEG₄-Mal-DM4, 6.2 D/Ab, синтезированный с использованием способа, описанного в этом изобретении; дорожка 3: Ат-PEG₄-Mal-DM4, 6.1 D/Ат, синтезированный с использованием 2 этапного способа конъюгации; дорожка

4: неконъюгированное Ат (0,24 микрограмма общего белка на каждую дорожку). Полосы верхнего маркера, системного пика и нижнего маркера представляют дополнительные маркеры, добавленные из кита. В. Количественный анализ белковых полос из белкового LabChip электрофореза.

5 На Фигуре 4 показан MS конъюгата Ат-(PEG4-Mal)-DM4, приготовленного с использованием способа, описанного в этом изобретении, по сравнению с конъюгатом, приготовленным с использованием традиционного 2-этапного способа. А. MS конъюгата, приготовленного по традиционному двухэтапному способу с 6.1 DM4 на Ат. Вследствие значительной гетерогенности конъюгата MS пики невозможно хорошо
10 различить. В. MS конъюгата, приготовленного по способу, описанному в этом изобретении, и содержащего 6.2 DM4 на Ат. Вследствие гомогенности конъюгата,, MS пики хорошо различимы.

На Фигуре 5 показано связывание конъюгата анти-CanAg антитело-PeG4-Mal-DM1 с 6.7 DM1 на антитело (приготовленного с использованием способа, описанного в этом
15 изобретении) по сравнению со связыванием немодифицированного антитела против CanAg антиген-экспрессирующих COLO205 клеток. Связывание было измерено в единицах флуоресценции.

На Фигуре 6 показана цитотоксичность in vitro конъюгата анти-CanAg Антитело-PEG4-Mal-DM1 с 6.7 DM1 на антитело (приготовленного с использованием способа, описанного в этом изобретении) против CanAg антиген-экспрессирующих COLO205
20 клеток. Конъюгат был добавлен к COLO205 клеткам и после 5 дней непрерывной инкубации с конъюгатом жизнеспособность клеток была подсчитана с использованием WST-оценки. Контрольный эксперимент для демонстрации специфичности конъюгата был проведен с использованием избытка неконъюгированных анти CanAg антител для
25 блокирования связывания и цитотоксичности конъюгата против раковых клеток-мишеней.

На Фигуре 7 показана конъюгация антитела с реакционной смесью DM1 (или DM4) и Малеимид-сульфо-NHS линкером.

На Фигуре 8 показан SDS-PAGE в восстанавливающих условиях конъюгата Ат-(сульфо-Mal)-DM1, приготовленного с использованием способа, описанного в этом
30 изобретении, по сравнению с конъюгатом, приготовленным с использованием традиционного 2-этапного способа. Каждая дорожка с образцом содержала 10 мкг белка; гель был окрашен кумасси голубым. Дорожка 1 содержала маркер молекулярной массы. Дорожки 3 и 5 содержали конъюгаты, приготовленные по способу, описанному
35 в этом изобретении, и содержащие 3.6 и 5.6 DM1 на Ат, соответственно. Дорожки 2 и 4 содержали конъюгаты, приготовленные по традиционному двухэтапному способу и содержащие 4.0 и 5.7 DM1 на Ат, соответственно.

На Фигуре 9 показан белковый LabChip электрофорез конъюгата Ат-(сульфо- Mal)-DM1, приготовленного с использованием способа, описанного в этом изобретении,
40 по сравнению с конъюгатом, приготовленным с использованием традиционного 2-этапного способа. А. Белковый LabChip электрофорез в восстанавливающих условиях (Agilent 2100 Bioanalyzer/Agilent Protein 230 kit) Ат-(сульфо-Mal)-DM1 конъюгатов. Дорожка 1: маркер молекулярной массы; дорожка 2: некогъюгировавшее Ат; дорожка 3: Ат-сульфо- Mal -DM1, 5.7 D/Ат, синтезированный с использованием 2-этапного
45 способа конъюгации; дорожка 4: Ат-сульфо- Mal-DM1, 5.6 D/Ат, синтезированный с использованием способа, описанного в этом изобретении; 0,22 микрограмма общего белка, помещенного в лунку. Полосы верхнего маркера, системного пика и нижнего маркера представляют дополнительные маркеры, добавленные из набора. В.

Количественный анализ белковых полос из белкового LabChip электрофореза.

На Фигуре 10 показано LC-MS сравнение конъюгата Антитело-(Сульфо-Mal)-DM1, приготовленного по способу, описанному в этом изобретении, и конъюгата, приготовленного по традиционному двухэтапному способу конъюгации. А. MS конъюгата с 3.6 DM1/Ab, приготовленного с использованием способа, описанного в этом изобретении, показывает гомогенный конъюгат с 1-6 DM1-несущим дискретным конъюгатными пиками. В. MS конъюгата с 4.0 DM1/Ab, приготовленного по традиционному двухэтапному способу конъюгации. MS для конъюгата, приготовленного по традиционному двухэтапному способу, показывает пики, соответствующие конъюгатам, и конъюгаты с гидролизованнми или поперечно-сшитыми линкерами (такие как конъюгат с 2 DM1, плюс один L, 2L и 3L), указывающие на гетерогенный продукт.

На Фигуре 11 показано связывание анти-CanAg антитело-сульфо-Mal-DM1 конъюгата с 5.6 DM4 на антитело (приготовленного с использованием способа, описанного в этом изобретении) по сравнению со связыванием немодифицированного антитела против CanAg антиген-экспрессирующих COLO205 клеток. Связывание было измерено в единицах флуоресценции.

На Фигуре 12 показана цитотоксичность *in vitro* конъюгата анти-CanAg Антитело-сульфо-Mal-DM1 с 5.6 DM4 на антитело (приготовленного с использованием способа, описанного в этом изобретении) против CanAg антиген-экспрессирующих COLO205 клеток. Конъюгат был добавлен к COLO205 клеткам и после 5 дней непрерывной инкубации с конъюгатом жизнеспособность клеток была оценена с использованием WST-8 оценки. Контрольный эксперимент для демонстрации специфичности конъюгата был проведен с использованием избытка неконъюгированных анти CanAg антител для блокирования связывания и цитотоксичности конъюгата против раковых клеток-мишеней.

На Фигуре 13 показана конъюгация антитела с реакционной смесью DM1 или DM4) и сульфо-NHS SMCC линкер.

На Фигуре 14 показан SDS-PAGE в восстанавливающих условиях Ат-(SMCC)-DM1 конъюгата, приготовленного с использованием способа, описанного в этом изобретении, по сравнению с конъюгатом, приготовленным с использованием традиционного 2-этапного способа. Каждая дорожка с образцом содержала 10 микрограмм общего белка; гель был окрашен кумасси голубым (Coomassie blue). Дорожка 1 содержит маркер молекулярной массы, дорожка 2 содержит неконъюгированное Ат, дорожка 3 содержит конъюгат, приготовленный по традиционному двухэтапному способу с 3.1 DM1 на Ат и дорожка 4 содержит конъюгат, приготовленный по способу, описанному в этом изобретении с 3.1 DM1 на Ат.

На Фигуре 15 показан белковый LabChip электрофорез конъюгата Ат-(SMCC)-DM1, приготовленного с использованием способа, описанного в этом изобретении, по сравнению с конъюгатом, приготовленным с использованием традиционного 2-этапного способа. А. Белковый LabChip электрофорез в восстанавливающих условиях (Agilent 2100 Bioanalyzer/Agilent Protein 230 kit) Ат-SMCC-DM1 конъюгатов. Дорожка 1: маркер молекулярной массы; дорожка 2: Ат-SMCC-DM1, 3.1 D/Ат, синтезированный с использованием способа, описанного в этом патенте; дорожка 3: неконъюгированное Ат; дорожка 4: Ат-SMCC-DM1, 3.1 D/Ат, синтезированный с использованием 2-этапного способа конъюгации; (0,24 микрограмма общего белка на каждую дорожку). Полосы верхнего маркера, системного пика и нижнего маркера представляют дополнительные маркеры, добавленные из набора. В. Количественный анализ белковых полос из

белкового LabChip электрофореза.

На Фигуре 16 показано LC-MS сравнение конъюгата Антитело-(SMCC)-DM1, приготовленного по способу, описанному в этом изобретении, с конъюгатом, приготовленным по традиционному двухэтапному способу конъюгации. А. MS конъюгата, приготовленного по последовательному двухэтапному способу с 3.1 DM1 на Ат. Каждый основной пик конъюгата имеет связанные боковые пики, возникающие из-за присутствия гидролизованных и поперечно-сшитых линкерных фрагментов. В. MS конъюгата, приготовленного по способу, описанному в этом изобретении с 3.1 DM1 на Ат. Вследствие гомогенности конъюгата MS пики были хорошо различимы.

На Фигуре 17 показаны предполагаемые механизмы межцепочечного поперечного сшивания и инактивации малеимида во время конъюгации при традиционном 2-этапном способе.

На Фигуре 18 показан SDS PAGE в невозстанавливающих условиях конъюгата Ат-(сульфо-Mal)-DM4, приготовленного с использованием способа, описанного в этом изобретении, и погашение свободного DM4 тиола (после первичной реакции соединения DM4+NHS-сульфо-Mal гетеробифункциональный агент) с использованием 4-малеимидомасляной кислоты перед реакцией конъюгации с антителом. Каждый образец содержал 10 мкг белка; гель был окрашен кумасси голубым (Coomassie blue).. Дорожки 1 и 5 содержали маркеры молекулярной массы. Дорожка 2 содержала одно Ат. Дорожка 3 содержала конъюгат, приготовленный по способу, описанному в этом изобретении без добавления 4-малеимидомасляной кислоты. Дорожка 4 содержала конъюгат, приготовленный по способу, описанному в этом изобретении с добавлением 4-малеимидомасляной кислоты после первичного DM4+NHS-Сульфo-Mal гетеробифункционального реагента (предшествующего этапу конъюгации с антителом).

На Фигуре 19 показано приготовление конъюгата антитела с дисульфидной связью с использованием реакционной смеси DM1 (или DM4) и SPDB линкера.

На Фигуре 20 показано приготовление конъюгата антитело-майтансиноид как с дисульфидным, так и с нерасщепляемым PEG4-Mal линкерами путем конъюгации антитела с неочищенной реакционной смесью DM1 (или DM4) и SPDB и NHS-PEG₄-Mal линкерами.

На Фигуре 21 показан MS конъюгата антитело-майтансиноид как с дисульфидным, так и с нерасщепляемым PEG4-Mal линкерами (приготовленного путем конъюгации антитела с неочищенной реакционной смесью DM1, или DM4, и SPDB и NHS-PEG₄-Mal линкерами).

На Фигуре 22 показана конъюгация антитела с реакционной смесью DM1 (или DM4) и SMCC линкером.

На Фигуре 23 показан MS конъюгата антитело -SMCC-DM1, приготовленного с использованием SMCC по способу, описанному в этом изобретении, содержащего в среднем 3.1 DM1 на антитело.

На Фигуре 24 показано приготовление конъюгата антитела с дисульфидной связью с использованием реакционной смеси DM1 (или DM4) и SSNPB линкера.

На Фигуре 25 показана конъюгация антитела с реакционной смесью DM1 (или DM4) и гетеробифункциональным линкером с алифатической линейной углеродной цепью.

Детальное описание изобретения

Некоторые варианты воплощений изобретения детально описаны не будут, их примеры иллюстрируются в прилагаемых структурах и формулах. При том, что изобретение будет описано в сопровождении перечисленных вариантов воплощения это не означает, что изобретение ими ограничивается. Напротив, подразумевается, что

изобретение покрывает все альтернативы, модификации и эквиваленты, которые можно включить в пределы притязаний настоящего изобретения, как определено объемом формулы изобретения. Специалист в данной области узнает многие способы и материалы, подобные или равноценные тем, что описаны здесь, которые можно

использовать при осуществлении на практике данного изобретения.
 Это изобретение описывает новый способ конъюгации тиол-содержащего эффектора (напр., цитотоксичного агента) или репортерной группы (напр., радиоактивной метки) со связывающимся с клеткой агентом (напр., антителом), в котором тиоловая группа, содержащая эффектор или репортер, вначале реагирует с бифункциональным линкерным реагентом в органическом, водном, или смешанном органическом/водном растворителе, после чего следует реакция с неочищенной реакционной смесью со связывающимся с клетками агентом в органическом, водном, или смешанном органическим/водном растворителях.

Сокращения

Сокращения, использованные в описаниях Схем и Примеров, следующие:

C=Эффектор или репортерная группа (напр., цитотоксичный агент или радиоактивная метка)

L=Линкер (напр., расщепляемый или нерасщепляемый линкер)

X=амин-реактивная группа (например, N-гидроксисукцимидный эфир (NHS сложный эфир), сульфо-NHS эфир, p-нитрофенола эфир, тетрафлюоросульфат фенил эфир, 1-гидрокси-2-нитро-бензол-4-сульфокислоты эфир)

Y=Малеимид, или галоацетамид (йодацетамид, бромацетамид)

Yb - химически активная смешанная дисульфидная группа (напр., 2-пиридилдитио, 4-пиридилдитио, 2-нитро-пиридилдитио, 5-нитро-пиридилдитио, 2-карбокси-5-нитро-пиридилдитио)

X'=амидное соединение

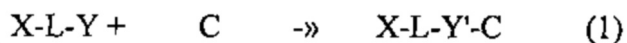
Y'=тиоэфирное ($R-S-R^1$) или селеноэфирное ($R-Se-R^1$) соединение

Yb'=дисульфидное ($R-S-S-R^1$) соединение.

В одном варианте воплощения настоящего изобретения описан способ приготовления связанного тиоэфирным линкером конъюгата связывающегося с клеткой агента с эффекторной или репортерной молекулой, способ включает в себя следующие этапы: а) контакт с гетеробифункциональным линкером формулы X-L-Y с тиол-содержащей эффекторной или репортерной молекулой C (например, а майтансиноид или радионуклид) в водном растворителе, органическом растворителе или смешанных органических/водных реакционных смесях, в результате чего получается промежуточный продукт с формулой X-L-Y'-C; б) смешивание реакционной смеси без очистки со связывающимся с клетками агентом, таким как антитело (Ат) для образования конъюгата с формулой Ат-(X'-L-Y'-C)_m, где L - замещенная или незамещенная линейная, разветвленная или цикличная алкильная, алкенильная, или алкинильная группа, несущая 1-10 атомов углерода, простая или замещенная арильная единица (заместитель выбирается из алкил, алкокси, галоген, нитро, флюоро, карбокси, сульфат, фосфат, amino, карбонил, пиперидино) или полиэтиленгликоль содержащая единица (предпочтительно 1-500 PEG спейсер, или более предпочтительно 1-24 PEG спейсер, или еще более предпочтительно 2-8 PEG спейсер); X и Y - амин- или тиол-реактивная группа, такая как N-гидроксисукцинимидный эфир и maleimide или галоацетамид; Ат - антитело; m - число от 1 до 20; X' - модифицированный X сайт (напр., амидное соединение) реакции с антителом; Y' - модифицированный Y сайт (напр., тиоэфирное

соединение) реакции с, например, цитотоксичным агентом или радиоактивной меткой эффекторной или репортерной группы; и с) очистка конъюгата путем тангенциальной поточной фильтрации, диализа или хроматографии (напр., гелевая фильтрация, ионообменная хроматография, хроматография с гидрофобным взаимодействием) или комбинация из этого. Предпочтительно, Y - тиол-реактивная группа, выбранная из малеимида или галоацетамида. Предпочтительно, L - линейная или разветвленная алкильная группа с 1-6 атомами углерода или 2-8 PEG спейсером. Предпочтительно, C - цитотоксичный агент, выбранный из майтансиноида, а CC-1065 аналога, таксана, а ДНК-связывающего агента, и более предпочтительно это майтансиноид.

Эта реакционная последовательность представлена в формулах 1 и 2:



Ат + X-L-Y'-C (неочищенное после реакции 1) → Ат-(X'-L-Y'-C)_m (2) не включает никакой очистки промежуточного продукта X-L-Y'-C, и таким образом дает преимущество прямого смешивания его с антителом (неочищенный промежуточный продукт добавляется к антителу или антитело добавляется к неочищенному промежуточному продукту), тем самым делая способ предпочтительным для конъюгации, поскольку он исключает необходимость трудоемкого этапа очистки. Важно, что этот способ дает на выходе гомогенный конъюгат без поперечных сшивок между цепочками белка или инактивированных малеимидных остатков, в противоположность этому при традиционной двухэтапной реакции и последующей очистке наблюдаются поперечные сшивки между цепочками белка и инактивированные малеимидные остатки.

Реакция 1 может быть осуществлена при высоких концентрациях гетерофункционального линкера, X-L-Y, и эффекторная или репортерная группа C в водном растворителе, органическом растворителе или органических/водных реакционных смесях приводит к ускорению реакции по сравнению с более низкими концентрациями в водных растворителях для конъюгатов, приготовленных в ходе традиционной двухэтапной реакции и соответствующей очистки.

Промежуточный продукт X-L-Y'-C, образующийся в реакции 1, можно хранить неочищенном в замороженном виде, при низких температурах в водном растворителе с подходящим низким pH (напр., pH~4-6), в органических растворителях, или в смешанных органических/водных реакционных смесях, или в лиофилизированном виде, в течение долгого периода, и можно позднее смешивать с раствором антитела для заключительной реакции конъюгации при более высоком уровне pH около 4-9, что добавляет преимущества такой последовательности реакций. Промежуточный продукт можно разводить, как указано, органическим растворителем или водным буфером, или смесью органического растворителя и водного буфера перед тем, как смешивать со связывающимся с клеткой агентом. Термин "около", используемый здесь в связи с численным значением, следует понимать как относящийся ко всем таким значениям, включая все числовые значения и незначительные их отклонения. Реакция промежуточного продукта X-L-Y'-C с антителом должна проводиться при значениях pH в промежутке от около 4 до около pH 9, предпочтительно при pH в промежутке от около 5 до 8,7, более предпочтительно при pH в промежутке от около 6,5 до около 8,5, при таких значениях pH как 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, и 8.5, в таком диапазоне значений pH или незначительных от них отклонениях. Буферы, используемые для реакции антитела с промежуточным продуктом X-L-Y'-C при предпочтительных значениях pH от около 6.5 до 8.5 являются такими

буферами с величинами pK_a , входящими в этот промежуток значений pH , как фосфатный и HEPES буфер. Эти предпочтительные буферы не должны обладать первичными или вторичными аминогруппами, или другими химически активными группами, которые могут реагировать с линкером X (таким как N-гидроксисукцимидный эфир).

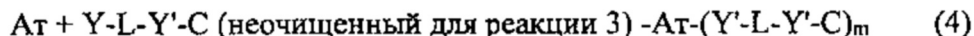
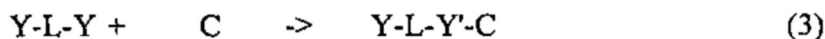
5 Стихиометрический или слабый избыток C по сравнению с гетеробифункциональным линкером X-L-Y используется в первой реакции для гарантии того, что вся Y группа (такая как малеимид) прореагировала, перед тем как неочищенная смесь добавляется к антителу. Может быть сделана необязательная дополнительная обработка погашающим реагентом (таким как 4-малеимидомасляная кислота, 3-
10 малеимидопропионовая кислота, или N-этилмалеимид, или йодацетамид, или йодацетамидопропионовая кислота) для гарантии того, что весь непрореагировавший C инактивирован перед тем, как сделают смесь с антителом, чтобы минимизировать всю нежелательную тиол-дисульфидную внутрищепочечную реакцию с нативными дисульфидными группами антитела. После погашения полярно заряженными тиол-
15 блокирующими реагентами (такими как 4-малеимидомасляная кислота или 3-малеимидопропионовая кислота), избыточный непрореагировавший C превращается в полярно заряженный аддукт, который легко можно отделить от ковалентно связанного конъюгата. Необязательно, конечная реакционная смесь 2, до очистки, обрабатывается нуклеофилами, такими как аминогруппа, содержащая нуклеофилы (напр., лизин, таурин, гидроксиламин) для блокирования всего непрореагировавшего линкера (X-L-Y'-C).

Альтернативный способ для реакции антитела с неочищенной первичной реакционной смесью майтансиноидов (DMx) и гетеробифункционального линкера включает смешивание первичной реакционной смеси DMx и гетеробифункционального линкера (перед завершением DMx-линкерной реакции) с антителом при низком pH ($pH \sim 5$), после
25 чего следует добавление буфера или основания для увеличения pH до около 6.5-8.5 для реакции конъюгации.

Этот новый способ применяется для приготовления конъюгата антитела с цитотоксичным препаратом майтансиноид. Конъюгаты антитело-майтансиноид, приготовленные с использованием этого способа, кратко описанного в реакционной
30 последовательности 1-2, неожиданно оказались значительно более гомогенными по сравнению с конъюгатами, приготовленными по традиционной двухэтапной реакции и соответствующей очистке, основываясь на характеристике конъюгатов на SDS-PAGE в восстанавливающих условиях, белковом LabChip электрофорезе, и масс-спектрометрии. Способ конъюгации, описанный в этом изобретении, который включает
35 последовательность реакций 1-2, также не требует никакого промежуточного этапа очистки и, следовательно, значительно более удобен, чем традиционный двухэтапный способ.

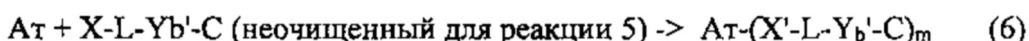
Во втором варианте воплощения изобретения, способ приготовления соединенного тиэфирной связью конъюгата связывающегося с клеткой агента с эффекторной или
40 репортерной молекулой описывается, включая следующие этапы: а) контакт гомобифункционального линкера с формулой Y-L-Y с тиол- или амин-содержащей эффекторной или репортерной группой C (такой как цитотоксичный агент) в водном растворителе, органическом растворителе или смешанных водных/органических реакционных смесях для получения Y-L-Y'-C, б) смешивание реакционной смеси без
45 очистки с антителом в водном растворе или водной/органической смеси для получения конъюгата с формулой AT-(Y'-L-Y'-C)_m, где L определено выше; Y - тиол- или амин-реактивная группа, такая как малеимид или галоцетамид, или N-гидроксисукцимид или сульфо N-гидроксисукцимид; Ат - антитело; m - число от 1 до 20; Y' - модифицированный

Y сайт (такой как тиоэфирный или амидный линкер) для реакции с антителом или модифицированным Y-сайтом (таким как тиоэфирная или амидная связь) для реакции с цитотоксичным агентом или эффекторной или репортерной группой и с) очистка конъюгата при помощи тангенциальной проточной фильтрации, диализа или хроматографии (гелевая фильтрация, ионообменная хроматография, хроматография гидрофобных взаимодействий) или их комбинация. Реакционная последовательность представлена в формулах 3 и 4:

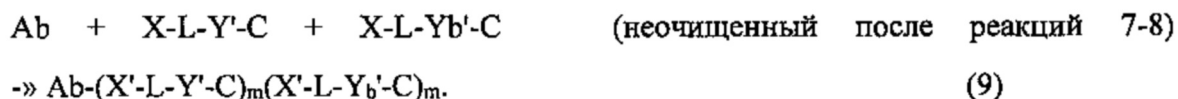
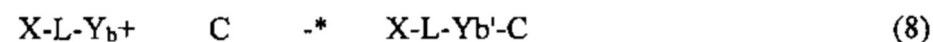
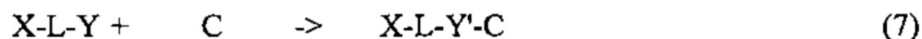


не включает никакой очистки промежуточного продукта Y-L-Y'-C, и, следовательно, является выгодным способом конъюгации.

В третьем варианте воплощения способ приготовления соединенного тиоэфирной связью конъюгата связывающегося с клеткой агента с эффекторной или репортерной молекулой описывается, включая следующие этапы: а) контакт гетеробифункционального линкера с формулой X-L-Yb с эффекторной или репортерной группой C (такой как цитотоксичный агент) в водном растворителе, органическом растворителе или смешанных водных/органических реакционных смесях для получения промежуточного продукта X-L-Yb'-C; б) смешивание реакционной смеси без очистки с антителом в водном растворе или водной/органической смеси для получения конъюгата с формулой At-(X'-L-Yb'-C)_m, где L определено выше; Y_b - химически активный дисульфид, такой как пиридилдисульфид или нитропиридил дисульфид, X - аминокреактивная группа, такая как N - гидроксисукцинимидный эфир или сульфо-N-гидроксисукцинимидный эфир; At - антитело; m - число от 1 до 20; Y_b - модифицированный Y сайт (такой как амидный линкер) для реакции с антителом; Yb - модифицированный Yb-сайт (дисульфидный) для реакции с цитотоксичным агентом или эффекторной или репортерной группой; и в) очистка конъюгата при помощи тангенциальной проточной фильтрации, диализа или хроматографии (гелевая фильтрация, ионообменная хроматография, хроматография гидрофобных взаимодействий) или их комбинация. Реакционная последовательность представлена в формулах 5 и 6:



В четвертом варианте воплощения способ приготовления конъюгатов антитела с эффекторной или репортерной группами с двумя типами линкеров - нерасщепляемым (тиоэфирный линкер) и расщепляемым (дисульфидный линкер) описывается, включая следующие этапы: а) контакт X-L-Y и X-L-Yb линкеров с цитотоксичным агентом C для получения промежуточных соединений с формулой X-L-Y'-C и X-L-Yb'-C, б) смешивание реакционных смесей без очистки с антителом или последовательно, или одновременно, как показано в реакционной формуле 7-9:



с получением конъюгата $At-(X'-L-Y'-C)_m(X'-L-Yb'-C)_m-$, где определения X, L, Y', C, Yb', и m даны выше, и m' - число от 1 до 20; и в) очистка конъюгата производится путем тангенциальной поточной фильтрации, диализа или хроматографии (напр., гелевая фильтрация, ионообменная хроматография, хроматография с гидрофобным взаимодействием) или их комбинации. Эти два линкерных эффекторных промежуточных продукта (X-L-Y'-C и X-L-Yb'-C) смешиваются без очистки с антителом в различной последовательности (вначале X-L-Y'-C, затем X-L-Yb'-C, или вначале X-L-Yb'-C, затем X-L-Y'-C, или одновременно) в различных пропорциях.

Реакции 1,3, 5 и 7-8 можно проводить при высоких концентрациях бифункционального линкера (X-L-Y, X-L-Yb или Y-L-Y) и эффекторной или репортерной группы C в водном растворителе, органическом растворителе или органических/водных реакционных смесях, что приводит к ускорению реакции по сравнению с более низкими концентрациями в водных растворителях для конъюгата, приготовленного в ходе традиционной двухэтапной реакции и соответствующей очистки, где растворимость реагентов ограничена.

Промежуточные продукты X-L-Y'-C, или Y-L-Y'-C, или X-L-Yb'-C, получаемые в реакциях 1,3, 5, и 7-8 можно хранить в неочищенном замороженном виде, при низких температурах в водном растворителе с подходящим pH, в органических растворителях, или в смешанных органических/водных реакционных смесях, или в лиофилизированном виде, в течение долгого периода, и можно позднее смешивать с раствором антитела для заключительной реакции конъюгации, что добавляет преимущества такой последовательности реакций.

Стехиометрический или слабый избыток C по сравнению с гетеробифункциональным линкером X-L-Y или Y-L-Y, или X-L-Yb используется в первой реакции для гарантии того, что вся Y группа (такая как малеимид) прореагировала, перед тем как неочищенная смесь добавляется к антителу. Может быть сделана необязательная дополнительная обработка блокирующим реагентом (таким как 4-малеимидомасляная кислота или 3-малеимидопропионовая кислота, или N-этилмалеимид, или йодацетамид, или йодуксусная кислота) для гарантии того, что весь непрореагировавшая группа (такая как тиол) в C инактивирована перед тем, как сделают смесь с антителом, чтобы минимизировать всю нежелательную тиол-дисульфидную реакцию обмена с нативными дисульфидными группами антитела. Погашение избыточного C с использованием полярно заряженных тиол-блокирующих реагентов, после первичной реакции C с бифункциональным линкером, превращает избыточный C в очень полярный растворимый в воде аддукт, который легко отделяется от ковалентно связанного конъюгата путем гелевой фильтрации, диализа или TFF. Заключительный продукт конъюгации не содержит нековалентно связанного C. Необязательно, конечные реакционные смеси 2, 4, 6 и 9 до очистки обрабатываются нуклеофилами, такими как аминокислоты, содержащая нуклеофилы (напр., лизин, таурин, гидроксилламин) для блокирования всего непрореагировавшего линкера (X-L-Y'-C, Y-L-Y'-C, или X-L-Yb'-C).

Альтернативный способ реакции антитела с неочищенной первичной реакционной смесью DMx и бифункционального линкера включает смесь первичной реакционной смеси DMx и бифункционального линкера (для завершения реакции DMx-линкер) с антителом при низком pH (pH~5), за чем следует добавление буфера или основания для повышения pH до около 6,5-8,5 для реакции конъюгации.

Множественные копии более чем одного типа эффектора могут конъюгировать с

антителом при добавлении двух или более промежуточных соединений линкер-эффектор, без очистки, к антителу или последовательно, или одновременно.

ЭФФЕКТОРНАЯ(ЫЕ) ГРУППА(Ы)

Термины Эффекторная группа или Эффекторная молекула являются взаимозаменяемыми и термин «Эффекторная(ые) группа(ы)» или «Эффекторная(ые) молекула(ы)», используемый здесь, включает цитотоксические агенты. В определенном отношении может быть желательно, чтобы эффекторные группы или молекулы прикреплялись спейсерами различной длины для уменьшения потенциального стерического препятствия. Множественные копии более чем одного типа эффектора могут конъюгировать с антителом путем добавления двух или более линкер-эффекторных промежуточных продуктов, образовавшихся от двух или более различных эффекторов, без очистки, с антителом или последовательно, или одновременно.

Цитотоксичные агенты, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают химиотерапевтические агенты или структурные аналоги химиотерапевтических агентов. «Химиотерапевтический агент» - это химическое соединение, применяемое в лечении рака. Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (CYTOXAN™); алкил сульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан, азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метилмеламины, включая алтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентифосфорамид и триметилмеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; СС-1065 (включая его адозелезиновые, карзелезиновые и бизелезиновые синтетические аналоги); криптофицины (особенно криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги, KW-2189 и СВИ-TMI); элеутеробин; панкратистатин; саркодистин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, мехлоретамин оксид гидрохлорид, мелфалан, новембичин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин, нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорохотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как энединовые антибиотики (напр., калихемицин, особенно калихемицин гамма 1 и калихемицин тета 1, см., напр., Angew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186 (1994); динемидин, включая динемидин А; эсперамидин; а также неокарциностаин хромофор и родственные хромопротеин эндиновые антибиотики хромомофоры), аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, ацазерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин; хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин (включая морфолино-доксорубицин, цианоморфолино-доксорубицин, 2-пирролино-доксорубицин и деоксидоксорубицин), эпирабицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, нитомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пурамицин, квеламицин, родорабицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, циностаин, зорабицин; анти-метаболиты, такие как метотрексат и 5-флюороурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероприн, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флюдарабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиюганин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидеоксиуридин, доксифлюоридин, эноцитабин, флоксуридин, 5-FU; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпителиостанол, мепитиостан, тестолактон; анти-адреналы, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; заменители фолиевой

кислоты, такие как фролиновая кислота; ацеглатон; алдофосфамида гликозид; аминолевулиновая кислота; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфомитин; ацетат эллиптиниума; эпотилон; этоглоуид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; майтансиноиды, такие как майтансин и ансамитоцины; митогуазон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; 5 пирарубицин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK®; разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманиум; тенуазониевая кислота; триазиквон; 2, 2', 2''-трихлортриэтиламин; трихотесцены (особенно Т-2 токсин, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; 10 пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ара-С"); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, напр. паклитаксел (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) и доксетаксел (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптоурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; 15 митоксантрон; винкристин; винорелбин; навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифлюорометиломитин (DMFO); ретиноевая кислота; капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого вышеуказанного вещества. Также в это определение включены антигормональные агенты, которые регулируют или 20 ингибируют действие гормонов на опухоль, такие как антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, 4(5)имидазолы, ингибирующие ароматазу, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон, и торемифен (Фастерон); и анти-андрогены, такие как флутамид, nilутамид, бикалутамид, деуполид, и гозерелин; siRNA и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные 25 любого вышеуказанного вещества. Другие химиотерапевтические агенты, которые можно использовать в настоящем изобретении, раскрыты в Публикации США №20080171040 или в Публикации США №20080305044 и включены сюда в виде ссылки на полный текст.

В предпочтительном варианте воплощения, химиотерапевтические цитотоксичные 30 агенты являются чрезвычайно низкомолекулярными цитотоксичными агентами. «Низкомолекулярный препарат» широко используется здесь в отношении органических, неорганических или органометаллических соединений, которые могут иметь молекулярную массу, например, от 100 до 1500, более предпочтительно от 120 до 1200, 35 желательно от 200 до 1000 и обычно имеют молекулярную массу менее чем 1000. Низкомолекулярные цитотоксичные агенты изобретения охватывают олигопептиды и другие биомолекулы, имеющие молекулярную массу менее чем 1000. Низкомолекулярные цитотоксичные агенты, хорошо изученные в данной области, такие как WO 05058367A2, Заявка на Европейский Патент №. 85901495 и 8590319, и в Патенте США №. 4,956,303, в числе других и включены сюда в виде ссылки на полный 40 текст.

Предпочтительными низкомолекулярными цитотоксичными агентами являются те, которые способны соединиться со связывающимся с клетками агентом. Изобретение включает как известные цитотоксичные агенты, так и те, которые могут стать известными. Особенно предпочтительные низкомолекулярные цитотоксичные агенты 45 включают цитотоксичные агенты.

Цитотоксичный агент может быть любым веществом, которое приводит к гибели клетки или вызывает гибель клетки, или каким-то образом уменьшает жизнеспособность клетки, где каждый цитотоксичный агент включает в себя тиоловый компонент.

Предпочтительными цитотоксичными агентами являются соединения майтансиноида, соединения таксана, соединения СС-1065, соединения даунорубицина и доксорубицина, димеры пирролобензодиазепина, калихимицины, ауристатины и их аналоги и производные, некоторые из которых описаны ниже.

5 Другие цитотоксичные агенты, которые необязательно являются низкомолекулярными, такие как миРНК, также охватываются в пределах настоящего изобретения. Например, миРНК может связываться с кросслинкерами настоящего изобретения по способам, обычно используемым для модификации олигонуклеотидов (см., например, Публикации Патента США 20050107325 и 20070213292). Таким образом
10 миРНК в своей 3' или 5'-фосфорамидной форме реагирует с одним концом кросслинкера, несущего гидроксильную функцию, создавая эфирную связь между миРНК и кросслинкером. Подобная реакция миРНК фосформаида с кросслинкером, несущим терминальную аминогруппу, приводит к образованию связи кросслинкера с миРНК через амин. миРНК детально раскрыты в Публикации Патента США Номера:
15 20070275465, 20070213292, 20070185050, 20070161595, 20070054279, 20060287260, 20060035254, 20060008822, 20050288244, 20050176667, которые включены сюда в виде ссылки на полный текст.

Майтансиноиды

Майтансиноиды, которые можно использовать в настоящем изобретении, хорошо
20 известны в области и могут быть выделены из природных источников в соответствии с известными способами или приготовлены синтетически в соответствии с известными способами.

Примеры подходящих майтансиноидов включают майтансинол и аналоги майтансинола. Примеры подходящих аналогов майтансинола включают те, у которых
25 есть модифицированное ароматическое кольцо, и те, у которых есть модификации в других позициях.

Конкретные примеры подходящих аналогов майтансинола, имеющих модифицированное ароматическое кольцо, включают:

- (1) С-19-дехлоро (Патент США No. 4,256,746) (приготовлен путем ЛАН редукции
30 анзамитоцина Р2);
- (2) С-20-гидрокси (или С-20-деметил) +/-С-19-дехлоро (Патент США Nos. 4,361,650 и 4,307,016) (приготовлен путем деметилирования с использованием *Streptomyces* или *Actinomyces* или дехлорирования с использованием ЛАН); и
- (3) С-20-деметокси, С-20-ацилокси (-OCOR), +/-дехлоро (Патент США No. 4,294,757)
35 (приготовлен путем ацилирования с использованием ацил хлоридов).

Конкретные примеры подходящих аналогов майтансинола, имеющих модификации в других позициях, включают:

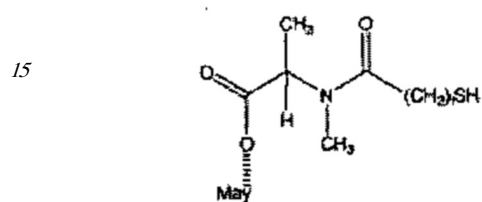
- (1) С-9-SH (Патент США No. 4,424,219) (приготовлен путем реакции майтансинола с H₂S или P₂S₅);
- 40 (2) С-14-алкоксиметил (деметокси/CH₂OR) (Патент США No. 4,331,598);
- (3) С-14-гидроксиметил или ацилоксиметил (CH₂OH или CH₂OAc) (Патент США No. 4,450,254) (приготовлен из *Nocardia*);
- (4) С-15-гидрокси/ацитокси (Патент США No. 4,364,866) (приготовлен путем трансформирования майтансинола *Streptomyces*);
- 45 (5) С-15-метокси (Патент США Nos. 4,313,946 и 4,315,929) (выделен из *Trewia nudiflora*);
- (6) С-18-N-деметил (Патент США Nos. 4,362,663 и 4,322,348) (приготовлен путем деметилирования майтансинола *Streptomyces*); и
- (7) 4,5-деокси (Патент США No. 4,371,533) (приготовлен с помощью трихлорида

титаниума/ЛАН редукции майтансинола).

Синтезы тиол-содержащих майтансиноидов, используемых в настоящем изобретении, полностью раскрыты в Патенте США Nos. 5,208,020, 5,416,064, и Заявке на Патент США.

Предполагается, что будут использоваться все майтансиноиды с тиоловым компонентом в С-3 позиции, С-14 позиции, С-15 позиции или С-20 позиции. С-3 позиция предпочтительна и С-3 позиция майтансинола особенно предпочтительна. Также предпочтительны N-метил-аланин-содержащий С-3 тиоловый компонент майтансиноид, и N-метил-цистеин-содержащий С-3 тиоловый компонент майтансиноид, и их аналоги.

Конкретные примеры производных N-метил-аланин-содержащего С-3 тиоловый компонент майтансиноида, используемых в данном изобретении, представлены формулами M1, M2, M3, M6 и M7.

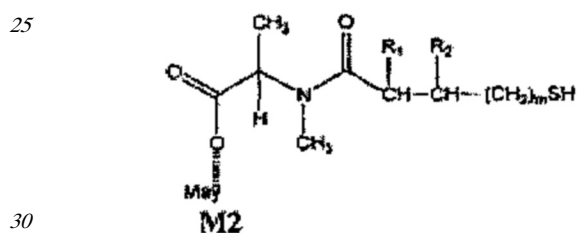


20 M1

где:

1 - значение от 1 до 10;

а May - майтансиноид.

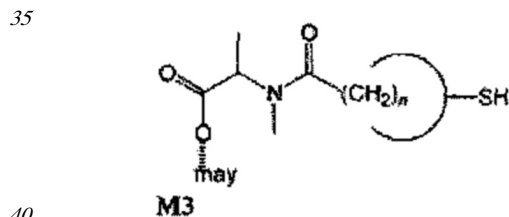


где

R1 и R2 - H, CH3 или CH2CH3, и могут быть одинаковы или различны;

m - 0, 1, 2 или 3; и

May i- майтансиноид.

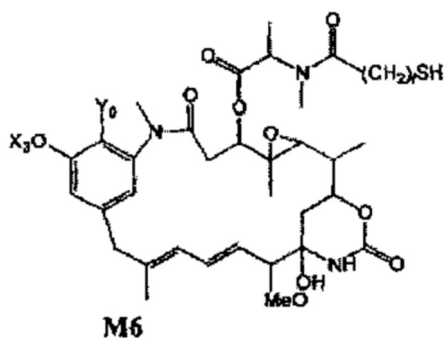


где:

n - значение от 3 до 8; и

May - майтансиноид.

45

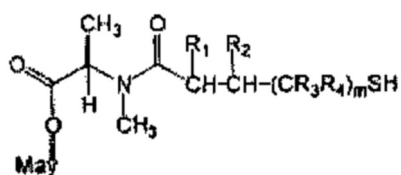


где:

1-1,2 или 3;

Y₀ - Cl или H; и

X₃ - H или CH₃.



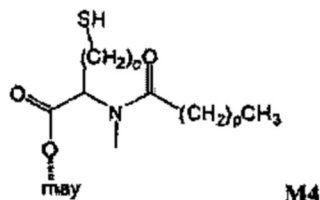
M7

где:

R₁, R₂, R₃, R₄ - H, CH₃ или CH₂CH₃, и могут быть одинаковыми или различными;

m - 0, 1, 2 или 3; и May - майтансиноид.

Специфичные примеры N-метил-цистеин-содержащих C-3 тиол компоненты дериватов майтансиноида, используемых в настоящем изобретении, представлены формулами M4 и M5.



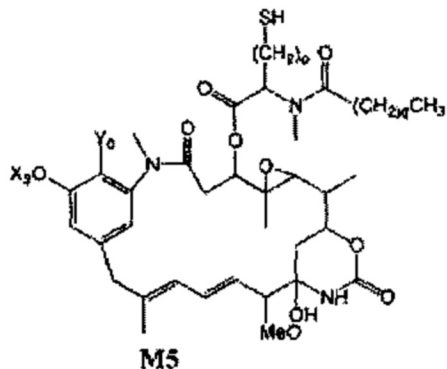
M4

где:

o-1,2 или 3;

p - значение от 0 до 10, и

May - майтансиноид



M5

где:

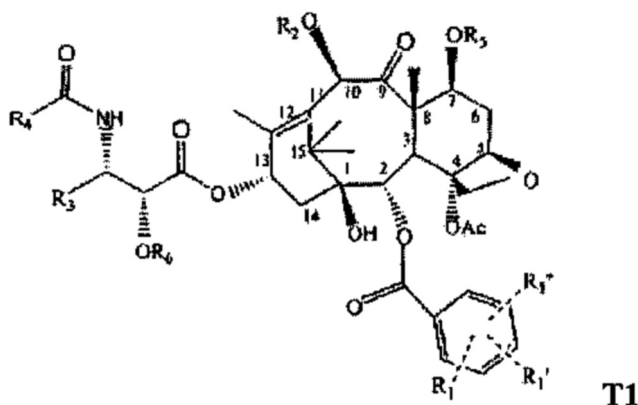
о-1,2 или 3;
 q - значение от 0 до 10;
 Y₀ - Cl или H; и
 X₃ - H или CH₃.

Предпочитаемыми майтансиноидами являются те, которые описаны в Патентах США № 5,208,020; 5,416,064; 6,333,410; 6,441,163; 6,716,821; RE39,151 и 7,276,497.

Таксаны

Цитотоксичным агентом в соответствии с настоящим изобретением может быть также таксан.

Таксаны, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, модифицированы и содержат тиоловый компонент. Некоторые таксаны, используемые в настоящем изобретении, имеют формулу T1, показанную ниже:



Предпочитаемыми таксоидами являются те, которые раскрыты в Патентах США № 6,340,701; 6,372,738; 6,436,931; 6,596,757; 6,706,708; 7,008,942; 7,217,819 и 7,276,499.

СС-1065 аналоги

Цитотоксичный агент, в соответствии с настоящим изобретением, может также быть аналогом СС-1065.

В соответствии с настоящим изобретением, аналоги СС-1065 содержат А субъединицу и В или В-С субъединицу. Предпочитаемые СС-1065 аналоги описаны в Патентах США Nos. 5,475,092; 5,595,499; 5,846,545; 6,534,660; 6,586,618; 6,756,397 и 7,049,316.

Аналоги Даунорубицина/Доксорубицина

Цитотоксичный агент в соответствии с настоящим изобретением может также быть аналогом даунорубицина или аналогом доксорубицина.

Аналоги даунорубицина и доксорубицина в настоящем изобретении могут быть модифицированы для содержания тиолового компонента. Модифицированные аналоги доксорубицина/даунорубицина настоящего изобретения, которые имеют тиоловый компонент, описаны в WO 01/38318. Модифицированные аналоги доксорубицина/даунорубицина могут быть синтезированы в соответствии с известными способами {см., напр., Патент США No. 5,146,064}.

Ауристатин включает ауристатин Е, ауристатин ЕВ (АЕВ), ауристатин ЕFP (АЕFP), монометил ауристатин Е (ММАЕ), описанные в Патенте США No. 5,635,483, Int. J. Oncol. 15:367-72 (1999); Molecular Cancer Therapeutics, vol. 3, No. 8, pp. 921-932 (2004); Заявка США Номер 11/134826. Публикация Патента США Nos. 20060074008, 2006022925.

Цитотоксичные агенты в соответствии с настоящим изобретением включают димеры пирролобензодиазепина, известные в области (Патент США Nos 7,049,311; 7,067,511; 6,951,853; 7,189,710; 6,884,799; 6,660,856).

Аналоги и производные

Специалисты в области цитотоксичных агентов легко поймут, что каждый цитотоксичный агент, описанный здесь, можно модифицировать таким образом, что получившееся в результате соединения все еще будет сохранять специфичность и/или активность первоначального соединения. Специалисты также поймут, что множество подобных соединений можно использовать вместо цитотоксичных агентов, описанных здесь. Таким образом, цитотоксичные агенты настоящего изобретения включают аналоги и производные соединений, описанных здесь.

РЕПОРТЕРНАЯ(ЫЕ) ГРУППА(Ы)

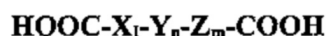
Термины Репортерная группа или Репортерная молекула являются взаимозаменяемыми и термин "Репортерная(ые) группа(ы)" или "Репортерная(ые) молекула(ы)", используемый здесь, относится к веществам, которые доставляются к специфическому веществу или клеткам благодаря участку реагента со специфическим сродством, применяемым в диагностических или терапевтических целях, примерами являются радиоизотопы, парамагнитные контрастные агенты и антираковые агенты. Различные метки или репортерные группы используются в иммуносцинтиграфии опухолей у пациентов со злокачественным новообразованием, в иммунологическом анализе для диагностики различных болезней, терапии рака с использованием конъюгатов с радионуклидами, и аффинной хроматографии для очистки биоактивных агентов, таких как белки, пептиды и олигонуклеотиды. Метки или репортерные группы, которые конъюгируют со связывающимися с клетками агентами, включают флюорофоры, и аффинные метки, такие как биотин. Ссылки на такую репортерную группу можно найти в публикации США номер 2007/0092940. Репортерные группы, включающие, например, биотин или флюоресцин, можно также присоединить к компоненту PEG конъюгата. Некоторое количество подходящих репортерных групп известно специалистам в области, напр., Патент США No. 4,152,411 и Hirschfeld Патент США No. 4,166,105, Патент США No. 5,223,242, Патент США No. 5,501,952, публикация США 20090136940, которые включены сюда в виде ссылки на полный текст.

ЛИНКЕРЫ

Конъюгаты можно приготовить способами *in vitro*. Чтобы соединить препарат со связывающимся с клеткой агентом, используется линкерная группа. Подходящие линкерные группы хорошо известны специалистам в области и включают нерасщепляемые или расщепляемые линкеры. Нерасщепляемым линкером является любой химический компонент, который способен образовать стабильную ковалентную связь между цитотоксичным агентом и связывающимся с клеткой агентом. Нерасщепляемые линкеры хорошо устойчивы к расщеплению, вызванному кислотой, расщеплению, вызванному светом, расщеплению, вызванному пептидазой, расщеплению, вызванному эстеразой, и расщеплению дисульфидной связи. Примеры нерасщепляемых линкеров включают линкеры, имеющие N-сукцинимидил эфир, N-сульфосукцинимидил эфирную группу, основанный на малеимиде или галоацетиле компонент для реакции с препаратом, репортерную группу или связывающийся с клеткой агент. К поперечно-сшитым реагентам, включающим основанный на малеимиде компонент, относятся N-сукцинимидил 4-(малеимидометил)циклогексанкарбоксилат (SMCC), N-сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбокси-(6-амидокапроат), который является "длинноцепочечным" аналогом SMCC (LC-SMCC), N-сукцинимидил эфир к-малеимидоундеканоидной кислоты (KMUA), N-сукцинимидил эфир у-малеимидобутировой кислоты (GMBS), N-гидроксисукцимидиновый эфир s-малеимидокапроновой кислоты (EMCS), m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид

эфир (MBS), N-(α-малеимидоадетокси)-сукцинимид эфир (AMAS), сукцинимидил -6-(p-малеимидопропионамидо)гексаноат (SMPH), N-сукцинимидил 4-(p-малеимидофенил)-бутират (SMPB), и N-(p-малеимидофенил)изоцианат (PMPI). К соединенным кросс-связями реагентам относится основанный на галоацетиле компонент, включая N-сукцинимидил-4-(йодацетил)-аминобензоат (SIAB), N-сукцинимидил йодацетат (SIA), N-сукцинимидил бромацетат (SBA), и N-сукцинимидил 3-(бромацетамидо)пропионат (SBAP).

Другие поперечно-сшитые реагенты, у которых отсутствует атом серы, формирующие нерасщепляемые линкеры, также могут использоваться в способе исследования. Такие линкеры могут быть производными от компонентов, основанных на дикарбоксильной кислоте. Подходящие основанные на α, ω дикарбоксильной кислоте компоненты включают, но не ограничиваются, α, ω - дикарбоксильными кислотами, общая формула которых показана ниже:



где X - линейная или разветвленная алкильная, алкенильная или алкинильная группа, содержащая от 2 до 20 атомов углерода, Y - циклоалкильная или циклоалкенильная группа, несущая от 3 до 10 атомов углерода, Z - замещенная или незамещенная ароматическая группа, несущая от 6 до 10 атомов углерода, или замещенная или незамещенная гетероциклическая группа, где гетеро атом - N, O или S, и где I, m, и n либо 0, либо 1, при условии, что I, тип все одновременно не равняются нулю.

Многие из нерасщепляемых линкеров, раскрытых здесь, детально описаны в Патенте США Публикация номер 20050169933.

Расщепляемыми линкерами являются линкеры, которые можно расщепить при мягких условиях, то есть в условиях, при которых активность цитотоксического агента не проявляется. Многие известные линкеры попадают в эту категорию и описаны ниже.

Кислото-лабильными линкерами являются линкеры, расщепляемые при кислой pH. Например, определенные внутриклеточные компартменты, такие как эндосомы и лизосомы, имеют щелочную pH (pH 4-5) и предоставляют условия, подходящие для расщепления кислото-лабильных линкеров.

Линкеры, которые являются фотоллабильными, используются на поверхности тела и во многих полостях тела, которые доступны для света. Кроме того, инфракрасный свет может проникнуть в ткань.

Некоторые линкеры можно расщепить пептидазами. Только определенные пептиды являются легко расщепляемыми внутри или вне клетки, см., напр., Trouet et al., 79 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 626-629 (1982), Umemoto et al. 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989), и расщепляемое лизосомной гидролазой соединение валин-цитруллин (Патент США 6,214,345 B1). Кроме того, сюда относятся пептиды, состоящие из альфа-аминокислот и пептидных связей, которые химически являются амидными связями между карбоксилатом одной аминокислоты и альфа-аминогруппой второй аминокислоты. Другие амидные связи, такие как связь между карбоксилатом и эпсилон-аминогруппой лизина, не рассматриваются как пептидные связи и считаются нерасщепляемыми.

Некоторые линкеры могут расщепляться эстеразами. Снова только некоторые эфиры могут расщепляться эстеразами, присутствующими внутри или вне клетки. Эфиры образуются при конденсации карбоксильной кислоты и спирта. Простыми эфирами являются эфиры, образованные простыми спиртами, такими как алифатические спирты, и низкоатомные циклические и низкоатомные ароматические спирты. Например, в настоящем изобретении не обнаружено эстераз, которые расщепляют эфир C-3

майтансина, поскольку спиртовой компонент эфира, мایتансинол, очень большой и сложный.

Предпочитаемые расщепляемые линкерные молекулы включают, например, N-сукцимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) (см., напр., Carlsson et al, Biochem. J., 173:125-131 (1978)), N-сукцимидил 4-(2-пиридилдитио)бутанат (SPDB) (см., напр., U.S. Patent 4,563,304), N-сукцимидил 1 4-(2-пиридилдитио)пентанат (SPP) (см., напр., CAS Registry number 341498-08-6), и другие кросс-линкеры, такие как описанные в Патенте США 6,913,748, который включен сюда в виде ссылки на полный текст.

Другие линкеры, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают заряженные линкеры или гидрофобные линкеры, описанные в Заявках на Патент США №№12/433,604 и 12/433,668 соответственно, которые включены сюда в виде ссылки на полный текст.

СВЯЗЫВАЮЩИЕСЯ С КЛЕТКАМИ АГЕНТЫ

Связывающимися с клетками агентами, используемыми в этом изобретении, являются белки (напр., иммуноглобулиновые и неиммуноглобулиновые белки), которые специфически связываются с целевыми антигенами на раковых клетках. Эти связывающиеся с клетками агенты включают:

- антитела, включающие:

- антитела с измененной поверхностью (Патент США №. 5,639,641);

- гуманизированные или полностью человеческие антитела (Гуманизированные или полностью человеческие антитела избираются из, но не ограничиваются, huMy9-6, huB4, huC242, huN901, DS6, CD38, IGF-IR, CNTO 95, B-B4, трастузумаб, биватузумаб, зибротузумаб, и ритуксимаб (см, напр, Патенты США №№5,639,641, 5,665,357 и 7,342,110, Заявка на Международный Патент WO 02/16,401, публикация США номер 20060045877, публикация США номер 20060127407, публикация США номер 20050118183, Pedersen et al, (1994) J. Mol. Biol. 235, 959-973, Roguska et al., (1994) Proceedings of the National Academy of Sciences, Vol 91, 969-973, Colomer et al., Cancer Invest., 19: 49-56 (2001), Heider et al, Eur. J. Cancer, 31 A: 2385-2391 (1995), WeltetaL, J. Clin. Oncol, 12: 1193-1203 (1994) и Maloney et al., Blood, 90: 2188-2195 (1997)); и

- фрагменты антител, такие как sFv, Fab, Fab', и F(ab')₂, которые предпочтительно связываются с клетками-мишенями (Parham, J. Immunol. 131:2895-2902 (1983); Spring et al, J. Immunol. 113:470-478 (1974); Nisonoff et al, Arch. Biochem. Biophys. 89:230-244 (1960));

Дополнительные связывающиеся с клетками агенты включают другие связывающиеся с клетками белки и полипептиды, включающие, но не ограничивающиеся:

- Белки с анкириновым повтором (DARPin; Zahnd et al., J. Biol. Chem., 281,46, 35167-35175, (2006); Binz, H.K., Amstutz, P. & Pluckthun, A. (2005) Nature Biotechnology, 23, 1257-1268) или белки с анкиринподобными повторами, или синтетические пептиды описаны, например, в публикации США номер 20070238667; Патенте США №7,101,675; WO/2007/147213; WO/2007/062466);

- интерфероны (напр., α, β, γ);

- лимфокины, такие как IL-2, IL-3, IL-4, IL-6;

- гормоны, такие как инсулин, TRH (тиротропин-релизинг-гормон), MSH (меланоцитстимулирующий гормон), стероидные гормоны, такие как андрогены и эстрогены, и

- факторы роста и колониестимулирующие факторы, такие как EGF, TGF-α, IGF-1, G-CSF, M-CSF and GM-CSF (Burgess, Immunology Today 5:155-158 (1984)).

Если связывающийся с клетками агент является антителом, он связывается с антигеном, представляющим собой полипептид, который может быть трансмембранной

молекулой (напр., рецептором) или лигандом, таким как фактор роста. Примеры антигенов включают молекулы, такие как ренин; гормон роста, включая человеческий гормон роста и бычий гормон роста; рилизинг-фактор гормона роста; паратиреоидный гормон; тиреотропный гормон; липопротеины; альфа-1-антитрипсин; инсулина цепь А; инсулина цепь В; проинсулин; фолликулостимулирующий гормон; кальцитонин; лютеинизирующий гормон; глюкагон; факторы коагуляции, такие как фактор vms, фактор IX, тканевой фактор (TF) и фактор фон Виллебранда; антикоагуляционные факторы, такие как белок С; предсердный натрийуретический фактор; легочный сурфактант; плазмогенный активатор, такой как урокиназа или тканевой активатор плазминогена (t-PA); бомбезин; тромбин; гемопоэтический фактор роста; фактор некроза опухолей- α и β ; энкефалиназа; RANTES (регуляция активности экспрессии и секреции нормальных Т-клеток); человеческий воспалительный белок макрофагов (MIP-1-альфа); сывороточный альбумин, такой как человеческий сывороточный альбумин; мюллеров ингибирующий фактор, релаксина цепь А; релаксина цепь В; прорелаксин; мышинный связанный с гонадотропином пептид; микробный белок, такой как бета-лактамаза; ДНКаза; IgE; цитотоксичный лимфоцит-связанный антиген (CTLA), такой как CTLA-4; ингибин; активин; фактор роста эндотелия сосудов (VEGF); рецепторы для гормонов или факторов роста; белок А или D; ревматоидные факторы; нейротрофический фактор, такой нейротрофический фактор костного происхождения (BDNF), нейротрофин-3, -4, -5, или -6 (NT-3, NT4, NT-5, или NT-6), или фактор роста нервов, такой как NGF- β ; фактор роста тромбоцитов (PDGF); фактор роста фибробластов, такой как aFGF и bFGF; эпидермальный фактор роста (EGF); трансформирующий фактор роста (TGF) такой как TGF-альфа и TGF-бета, включая TGF-бета1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, или TGF- β 5; инсулинподобный фактор роста- I и II (IGF-I и IGF-II); des(1-3)-IGF-I (мозговой IGF-I), инсулинподобный фактор роста связывающие белки; CD белки, такие как CD3, CD4, CD8, CD 19, CD20 и CD40; эритропоэтин; остеининдуцирующие факторы; иммунотоксины; костные морфогенетические белки (BMP); интерферон, такой как интерферон-альфа, -бета и -гамма; колониестимулирующий фактор (CSFs), напр., M-CSF, GM-CSF и G-CSF; интерлейкины (ILs), напр., от IL-1 до IL-10; пероксиддисмутаза; рецепторы Т-клеток; поверхностные белки мембраны; стимулятор гемолиза; вирусный антиген, такой как, например, часто оболочки HIV; транспортные белки; «хоминг»-рецепторы; адресины; регуляторные белки; интегрины такие как CD1 la, CD1 lb, CD1 lc, CD 18, 1C AM, VLA-4 и VCAM, альфа-V субъединица гетеродимерного рецептора интегрин человека; опухолевый антиген, такой как HER2, HER3 или HER4 рецептор; и фрагменты любого из вышеперечисленных полипептидов.

Предпочитаемые антигены для антител, охваченных в настоящем изобретении, включают CD белки, такие как CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34 и CD46; члены рецепторного семейства ErbB, такие как EGF рецептор, HER2, HER3 или HER4 рецептор; молекулы клеточной адгезии, такие как LFA-1, Mac1, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, альфа4/бета7 интегрин, и альфа v/бета3 интегрин, включающий или альфа, или бета субъединицы (напр., анти-CD 1 la, анти-CD 18 или анти-CD 1 lb антитела); факторы роста, такие как VEGF; тканевой фактор (TF); TGF- β ; альфа интерферон (альфа-IFN); интерлейкин, такой как IL-8; IgE; антигены групп крови Apo2, рецептор смерти; flk2/flt3 рецептор; рецептор ожирения (OB); mpl рецептор; CTLA-4; белок С и т.д. Наиболее предпочитаемыми мишенями являются IGF-IR, CanAg, EGF-R, EphA2, MUC1, MUC16, VEGF, TF, CD 19, CD20, CD22, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, CD138, CA6, Her2/neu, CRIPTO (белок, вырабатываемый в значительном количестве большинством

раковых клеток опухоли молочной железы человека), альфа v/бета3 интегрин, альфа у/бета5 интегрин, TGF- (3, CD1 la, CD 18, Apo2 и C24).

Техники моноклональных антител позволяют производить специфические связывающиеся с клетками агенты в форме моноклональных антител. В области
 5 чрезвычайно хорошо известны техники создания моноклональных антител, вырабатываемых иммунизированными мышами, крысами, хомяками или любыми другими млекопитающими к представляющим интерес антигенам, таким как интактная клетка-мишень, антигенам, изолированным от клетки-мишени, целым вирусам, ослабленным целым вирусам и вирусным белкам, таким как белки вирусной оболочки.
 10 Могут также использоваться сенсibilизированные клетки человека. Другим способом создания моноклональных антител является использование библиотеки фагов sFv (одноцепочечный вариabельный регион), особенно человеческого sFv (см., напр., Griffiths et al, U.S. патент №5,885,793; McCafferty et al., WO 92/01047; Liming et al., WO 99/06587.)

Выбор подходящих связывающихся с клетками агентов - вопрос предпочтения,
 15 которое зависит от определенной клеточной популяции, являющейся мишенью, но в основном предпочитают моноклональные антитела и их фрагменты, которые избирательно связываются с клетками-мишенями, если подходящие антитела доступны.

Например, моноклональное антитело My9 является мышинным IgG_{2a} антителом, которое специфично к CD33 антигену, обнаруженному в клетках Острой Миелоидной
 20 Лейкемии (AML) (Roy et al. Blood 77:2404-2412 (1991)) и может быть использовано в лечении пациентов с AML. Подобным образом моноклональное антитело анти-B4 является мышинным IgG₁, который связывается с CD 19 антигеном клеток В (Nadler et al, J. Immunol. 131:244-250 (1983)) и может быть использован, если клетками-мишенями
 25 являются В-клетки или больные клетки, которые экспрессируют этот антиген, такие как при неходжкинской лимфоме или хронической лимфобластической лейкемии. Подобным образом антитело N901 является мышинным моноклональным IgG₁ антителом, которое связывается с CD56, обнаруженным в клетках мелкоклеточной карциномы легких и на клетках других опухолей нейроэндокринного происхождения
 30 (Roy et al. J. Nat. Cancer Inst. 88:1136-1145 (1996)), huC242 антитело, которое связывается с CanAg антигеном, Trastuzumab, которое связывается с HER2/neu, и анти-EGF рецептор антитело, которое связывается с рецептором EGF.

СПОСОБЫ ОЧИСТКИ

[118] Конъюгат, то есть конечный продукт, в настоящем изобретении очищается для
 35 удаления всех непрореагировавших или неконъюгировавших эффекторных или репортерных молекул, или непрореагировавшего линкера или неконъюгировавшего, гидролизованного линкера. Способом очистки может быть тангенциальная поточная фильтрация (TFF, также известная как фильтрация в перекрестном потоке, ультрафильтрация или диафильтрация), гелевая фильтрация, адсорбционная
 40 хроматография, селективное осаждение, или их комбинация. Способы адсорбционной хроматографии включают ионообменную хроматографию, гидроксиапатитовую хроматографию, хроматографию гидрофобного взаимодействия (HIC), гидрофобную индукционную хроматографию (HCIC), смешанную ионообменную хроматографию, аффинную хроматографию с использованием иммобилизованных металлов (IMAC),
 45 аффинной хроматографии на сорбентах, содержащих биоспецифические красители (dye-Ligand chromatography), аффинную хроматографию, обращено-фазовую хроматографию. Например, конъюгат Ат-(X'-L-Y'-C)_m, описанный в формуле 2, очищен из непрореагировавшего С или непрореагировавшего/гидролизованного линкера X-L-Y

или X-L-Y'-C. Подобным образом очищаются конъюгаты, описанные в формуле 4, 6 и 9. Такие способы очистки известны специалистам в области и их можно найти, например, в Публикации США №2007/0048314.

НЕЖЕЛАЕМЫЙ ГИДРОЛИЗОВАННЫЙ ЛИНКЕР ИЛИ ПОПЕРЕЧНАЯ 5 СШИВКА БЕЛКА В КОНЬЮГАТЕ

Традиционные способы конъюгации используют первичную реакцию белка с гетеробифункциональным линкером с химически активным малеимидом или остатком галоацетамида, у которой есть два основных недостатка (i), продукт конъюгации может
10 содержать гидролизованный линкер, вследствие водной инактивации соединенного с антителом линкера до реакции с эффекторной или репортерной молекулой; и (ii) меж или внутрицепочечные поперечные сшивки в конъюгате, вследствие реакции малеимидной (или галоацетамидной) группы с нативными остатками гистидина, лизина, тирозина или цистеина в белке или пептиде (A. Papini et al., Int. J. Pept. Protein Res., 1992, 39, 348-355; T. Ueda et al., Biochemistry, 1985, 24, 6316-6322). Такие межцепочечные
15 поперечные сшивки в антителе приводят к различным нерасщепляемым ковалентным связям между тяжелой и легкой цепями, или между двумя тяжелыми цепями, которые будут видимы при SDS-PAGE анализе в восстанавливающих условиях как полосы более высокой молекулярной массы, чем ожидаемые полосы тяжелой и легкой цепи. Такие межцепочечные или внутрицепочечные поперечные сшивки в антителе также будут
20 видимы на MS как пики аберрантных масс, отличные от ожидаемых масс антитела вместе со связанными репортерными или эффекторными группами. В отличие от традиционного способа конъюгации, описанный в этой заявке способ приводит к образованию конъюгатов с высокой гомогенностью без существенных цепочечных поперечных сшивок или гидролизованного линкера.

25 Все источники, цитируемые здесь и в последующих примерах, включены сюда в качестве ссылки на полный текст.

ПРИМЕРЫ

Для иллюстрации изобретения включены следующие примеры. Следует понимать, что эти Примеры не ограничивают изобретение.

30 Пример 1. Конъюгация антитела с цитотоксичным агентом DM1/DM4 с использованием гетеробифункционального линкера Малеимид-PEG_n-NHS по этому способу (Фигура 1) по сравнению с традиционным двухэтапным способом.

Исходные растворы DM1 [N²-деацетил-N²-(3-меркапто-1-оксопропил)-майтансин],
35 или DM4 [N²-деацетил-N²-(4-меркапто-4-метил-1-оксопентил)майтансин] (DM_x) тиол и Малеимид -PEG_n-NHS бифункциональный линкер были приготовлены в N,N-диметилацетамиде (DMA) в концентрациях 30-60 мМ. Линкер и DM_x тиол были смешаны в содержащем 50% DMA по объему 200 мМ сукцинатном буфере, 2 мМ EDTA, pH 5.0, молярное соотношение DM_x к линкеру составляло 1.6:1 и конечная концентрация DM_x
40 была равна 15 мМ. После смешивания реакционная смесь была оставлена на 1-4 ч и затем аликвота реакционной смеси была разведена в 10 раз и его коэффициент поглощения оценивался при 302-320 нм для определения присутствия всего оставшегося непрореагировавшего малеимида с использованием коэффициента поглощения (E) малеимида 302 нм=620 М⁻¹ см⁻¹, и 320 нм ~ 450 М⁻¹ см⁻¹. (Дополнительный обратно
45 фазовый HPLC анализ замороженной аликвоты реакционной смеси был осуществлен позже с мониторингом поглощения при 302 нм и 252 нм для подтверждения полного исчезновения линкера малеимида и образования желаемого реагента линкер-DM_x во время добавления реакционной смеси к антителу). Когда малеимид больше не

обнаруживался в УФ, аликвота реакционной смеси была добавлена без очистки к раствору антитела в фосфатном буфере (pH 7.5) при заключительных условиях конъюгации 4 мг/мл Ат, 90% фосфатный буфер /10% DMA, pH 7.5. Реакция конъюгации протекала при комнатной температуре в течение 2 ч. Конъюгат Ат-DMx был очищен от избыточного низкомолекулярного DMx и линкерных реагентов с использованием G25 гель-фильтрационных колонок, уравновешенных в фосфатном буфере pH 7.5, или используя тангенциальную поточную фильтрацию (TFF). Конъюгационная смесь в дальнейшем была оставлена при 4°C в течение 2 дней в pH 7.5 буфере, чтобы прошла диссоциация всех DMx частиц, соединенных с антителом нековалентными или лабильными связями. Конъюгат затем подвергался в течение одной ночи диализу в pH 5.5 буфере гистидин/глицин и затем фильтровался через 0,22 мкм фильтр для конечного хранения. Число молекул DMx на молекулу антитела (в среднем) в конечном конъюгате было оценено путем определения поглощения конъюгата при 252 и 280 нм с использованием известных коэффициентов поглощения для DMx и антитела на этих двух волнах.

Некоторые различные условия реакции были использованы для первичной реакции DMx тиола с гетеробифункциональным реагентом малеимид-PEG₄-NHS: 50% DMA/50% водный 200 мМ сукцинатный буфер pH 5.0, 2 мМ EDTA (по объему); or 60% DMA/40% 200 мМ сукцинатный буфер pH 5.0, 2 мМ EDTA (по объему); или 100% DMA с 1,5 молярными эквивалентами органического основания (например, N,N'-диизопропил этилламин, DIPEA, или 4-метилморфолин) на моль DM4 тиола.

В одной серии экспериментов молярный эквивалент соотношения DMx к малеимид-PEG₄-NHS линкеру (очищенному Pierce Endogen) варьировал от 1,2 до 2,4, и время реакции составляло 30 мин. Число DMx/Ат, оцененное по очищенному конъюгату, было подсчитано как функция добавленных эквивалентов DMx на линкер. В условиях 1,2-2,0 эквивалентов DM1/Линкер образовывался конъюгат с одинаковым соотношением DMx/Ат, что показывает, что нежелательная реакция DMx тиола с NHS эфирным концом линкера не является значимой проблемой. Число поперечных сшивок, имеющееся в конечном конъюгате, также анализировалось SDS PAGE в восстанавливающих условиях, что показало, что присутствие поперечно сшитых контаминатов значительно уменьшается с возрастанием соотношения DM1/линкер.

Необязательный этап погашения с использованием реагентов малеимида или галоацетамида (таких как малеимидомасляная кислота, или малеимидопропионовая кислота, или N-этилмалеимид, или иодоацетамид, или иодоуксусная кислота) был проведен после завершения первичной реакции DMx и гетеробифункционального линкера (до добавления реакционной смеси к антителу) для погашения избыточной DMx тиоловой группы для того чтобы превратить какие-либо нежелательные реакции DMx тиола с антителом.

Альтернативный способ реакции антитела с неочищенной первичной реакционной смесью DMx и гетеробифункционального линкера включал смешивание реакционной смеси DMx и гетеробифункционального линкера (перед завершением реакции DMx-линкер) с антителом при низком pH (pH~5), после чего следовало добавление буфера или основания для повышения pH до 6,5-8,5 для реакции конъюгации.

Конъюгат антитело -PEG4-Mal-DM1 или DM4 был сделан по традиционному двухэтапному способу конъюгации для сравнения со способом конъюгации, описанном в этом изобретении. Гуманизированное антитело в концентрации 8 мг/мл в pH 7,5 фосфатном буфере (50 мМ фосфат калия, 50 мМ хлорид натрия, 2 мМ EDTA, pH 7,5) и 5% DMA были модифицированы с избытком гетеробифункционального линкерного

реагента малеимид-PEG4-NHS (очищен Pierce Endogen). После 2 ч при 25°C модифицированное антитело было очищено в геле путем G25 хроматографии для удаления избыточного непрореагировавшего, несоединившегося линкера. Возврат очищенного Ат был определен при поглощении в УФ при 280 нм. Число связавшихся малеимидных групп в модифицированном Ат было определено с использованием 5 маленькой аликвоты модифицированного антитела путем добавления известного количества тиола (такого как 2-меркаптоэтанол), добавленного в избытке по сравнению с малеимидом, для реакции с малеимидными остатками в модифицированном антителе, и затем оставшийся тиол оценивался по Элману с использованием реагента DTNB 10 (коэффициент поглощения at 412 нм=14150 M⁻¹ см⁻¹; Riddles, P. W. et al., *Methods Enzymol.*, 1983, 91, 49-60; Singh, R., *Bioconjugate Chem.*, 1994, 5, 348-351). Конъюгация модифицированного Ат с DM1 или DM4 тиолом была осуществлена при концентрации Ат 2,5 мг/мл в реакционной смеси, состоящей из 95% фосфатного буфера pH 7,5 (50 mM фосфата калия, 50 mM хлорида натрия, 2 mM EDTA, pH 7,5) и 5% DMA. Избыток 1,7 15 молярных эквивалентов DM1 или DM4 тиола был добавлен на моль связанного малеимида Ат. После того как реакция была оставлена на одну ночь при 25°C, конъюгат был стерильно профильтрован с использованием 0,22 мкм фильтра и очищен в геле от избытка непрореагировавшего DM1 или DM4 в G25 колонках, уравновешенных в фосфатном буфере pH 7,5 (50 mM фосфата калия, 50 mM хлорида натрия, 2 mM EDTA, pH 7,5). Очищенный конъюгат был оставлен при 4°C в течение 2 дней в фосфатном 20 буфере с pH 7,5 (50 mM фосфат калия, 50 mM хлорид натрия, 2 mM EDTA, pH 7,5) чтобы прошла диссоциация всех частиц DM1 или DM4, соединенных с антителом нековалентными или лабильными связями. Конъюгат затем подвергнулся в течение одной ночи диализу в pH 5,5 буфере гистидин/глицин и затем фильтровался через 0,22 25 мкм фильтр для конечного хранения. Число молекул DM1 или DM4 на молекулу Ат (в среднем) в конечном конъюгате было оценено путем определения поглощения конъюгата при 252 и 280 нм с использованием известных коэффициентов поглощения для DM1/DM4 и Ат на этих двух длинах волн.

SDS-PAGE в восстанавливающих условиях был проведен с конъюгатом и образцами 30 антител с использованием NuPage электрофорезной системы с 4-12% Bis Tris Gel (Invitrogen). Денатурированные нагреванием и восстановленные образцы были помещены по 10 мкг на дорожку. SDS-PAGE в восстанавливающих условиях конъюгатов, приготовленных с использованием способа, описанного в этом изобретении, показал в качестве основных полос только ожидаемые полосы тяжелой и легкой цепи (50 кДа 35 и 25 кДа соответственно) (Фиг. 2). Напротив, конъюгаты, приготовленные по традиционному двухэтапному способу, показали нежелательные поперечно-сшитые полосы с молекулярным весом 75, 100, 125 и 150 кДа, предположительно соответствующие поперечным сшивкам между цепями у частиц HL, H2, H2L и H2L2 соответственно (Фиг. 2).

Белковый LabChip электрофорезный анализ (в условиях восстановления) антитело-PEG4-Mal-DM4 конъюгата, приготовленный по способу, описанному в этом изобретении, 40 показал ожидаемые полосы тяжелой и легкой цепи в процентном соотношении 58% и 30% (от общего белка), тогда как подобный анализ для неконъюгировавших антител показал 65 и 30% соответственно (Фигура 3). Напротив, конъюгат, приготовленный с использованием традиционного двухэтапного способа, показал тяжелые и легкие 45 полосы только на 16% и 8% соответственно, а основные полосы высокой молекулярной массы в промежутке 94-169 кДа предположительно появились из-за межцепочечных поперечных сшивок. На основании оценки белкового LabChip анализа, конъюгат,

приготовленный по способу, описанному в этой заявке, намного превосходит конъюгат, полученный с использованием традиционного двухэтапного способа (Фигура 3).

MS анализ конъюгатов, приготовленных по способу, описанному в этом изобретении, показал дискретные пики конъюгата DMx-антитело для антитела, несущего
 5 возрастающее число молекул майтансиноида на молекулу антитела (Фигура 4).
 Напротив, MS конъюгата, полученный с использованием традиционного 2-этапного способа, был почти неразличим из-за предполагаемой негомогенности продуктов конъюгации, вероятно, возникшей из-за поперечно-сшитого или инактивированного малеимидного линкера. Следовательно, основываясь на MS, конъюгат, приготовленный
 10 с использованием способа, описанного в этом изобретении, намного превосходит конъюгат, синтезированный по традиционному двухэтапному способу.

Связывание конъюгата анти-CanAg Ar-PEG4-Mal-DM1, приготовленного по способу, описанному в этом изобретении, было оценено по проточной цитометрии с использованием антиген-экспрессирующих COLO205 клеток, и было обнаружено, что
 15 эта величина подобна связыванию неконъюгировавших антител, что подтверждает, что конъюгация не оказывает вредного влияния на связывание антитела (Фигура 5).
 Цитотоксическая активность анти-CanAg At-PEG4-Mal-DM1 конъюгата, приготовленного по способу, описанному в этом изобретении, была оценена *in vitro* с использованием COLO205 клеток рака толстой кишки, экспрессирующих CanAg антиген
 20 (Фигура 6). Антиген-экспрессирующие раковые клетки были высеяны в количестве около 1000 клеток на лунку в 96-луночные плашки в культуральной клеточной среде, содержащей эмбриональную бычью сыворотку, и подвергались действию различных концентраций At-DMx конъюгата. После 5 дней воздействия конъюгата, жизнеспособные клетки, оставшиеся в каждой лунке, были подсчитаны с использованием WST-8 оценки
 25 (Dojindo Molecular Technologies). Как показано на Фигуре 6, анти-CanAg Ar-PEG4-Mal-DM1 конъюгат, приготовленный с использованием этого способа, был сильнодействующим в низкой концентрации по отношению к CanAg антиген-экспрессирующим COLO205 клеткам рака толстой кишки. Цитотоксичность анти-CanAg At-PEG₄-Mal-DM1 конъюгата, приготовленного по способу, описанному в этом
 30 изобретении, была специфична для COLO205 клеток, поскольку ее можно было блокировать при добавлении при добавлении избыточного, неконъюгировавшего антитела.

Пример 2. Конъюгация антитела с цитотоксичным агентом DM1/DM4 с использованием малеимид-сульфо-NHS линкера (Фигура 7) по сравнению с
 35 традиционным двухэтапным способом.

Исходные растворы DMx тиола и малеимид-сульфо-NHS гетеробифункционального линкера были добавлены в N,N-диметилацетамид (DMA) в концентрации 30-60 mM. Линкер и DMx тиол были смешаны вместе в содержащем 40% DMA по объему 200 mM сукцинатном буфере, 2 mM EDTA, pH 5.0, соотношение DMx к линкеру составляло 1.6,
 40 и конечная концентрация DMx была равна 15 mM. После смешивания реакционная смесь была оставлена на 1-4 ч и затем аликвота реакционной смеси была разведена в 10 раз и с коэффициентом погашения, оцененным при 302-320 нм, для определения завершения реакции и отсутствия малеимида (Дополнительный обратно фазовый HPLC анализ замороженной аликвоты реакционной смеси был осуществлен позже с
 45 мониторингом поглощения при 302 нм и 252 нм для подтверждения полного исчезновения линкера малеимида и образования желаемого реагента линкер-DMx во время добавления реакционной смеси к антителу). Когда в UV малеимид больше не обнаруживался, аликвота реакционной смеси была добавлена без очистки к раствору

антитела в фосфатном буфере (pH 7.5) при заключительных условиях конъюгации 4 мг/мл Ат, 90% фосфатный буфер /10% DMA, pH 7.5. Реакция конъюгации протекала при комнатной температуре в течение 2 ч. Конъюгат Ат-DMx был очищен от избыточного низкомолекулярного DMx и непроконъюгировавших линкерных продуктов с использованием G25 гель-фильтрационных колонок, уравновешенных в фосфатном буфере pH 7.5, или используя тангенциальную поточную фильтрацию. Конъюгат в дальнейшем при 4°C в течение 2 дней в буфере pH 7.5, чтобы прошла диссоциация всех DMx частиц, соединенных с антителом нековалентными или лабильными связями. Конъюгат затем подвергался диализу в течение ночи в буфере гистидин/глицин pH 5.5 и затем фильтровался через 0,22 мкм фильтр для конечного хранения. Число молекул DMx на молекулу Ат (в среднем) в конечном конъюгате было оценено путем определения поглощения конъюгата при 252 и 280 нм с использованием известных коэффициентов поглощения для DM1/DM4 и Ат на этих двух длинах волн.

Для сравнения, Ат-сульфо-Mal-DMx конъюгаты были приготовлены с использованием традиционного 2-этапного способа. Антитело (Ат) в концентрации 8 мг/мл в фосфатном буфере pH 7.5/5% DMA буфере было модифицировано избыточным бифункциональным малеимид-сульфо-NHS линкером. Реакция проходила при 20°C в течение 2 ч, и затем модифицированные Ат были очищены от избыточного непрореагировавшего линкера с использованием G25 хроматографии. Восстановление очищенного Ат был определен анализом поглощения в УФ при 280 нм. Число связавшихся малеимидных групп в модифицированном Ат было определено с использованием маленькой аликвоты модифицированного антитела путем добавления известного количества тиола (такого как 2-меркаптоэтанол), добавленного в избытке по сравнению с малеимидом, для реакции с малеимидными остатками в модифицированном антителе, и затем оставшийся тиол подсчитывался по способу Элмана с использованием реагента DTNB. (коэффициент поглощения TNB тиолата на 412 нм $14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; Riddles, P. W. et al, *Methods Enzymol.*, 1983, 91, 4.9-60; Singh, R., *Bioconjugate Chem.*, 1994, 5, 348-351). Конъюгация модифицированного Ат с DMx была осуществлена при концентрации Ат 2,5 мг/мл в 95% pH 7.5 фосфатном буфере /5% DMA (объемное содержание), с 1,7 молярных эквивалентов DMx тиол добавленных на моль связанного малеимида в Ат. Реакция была оставлена на 8-24 ч при 18°C и конъюгат был отделен от избыточного, непрореагировавшего DMx путем G25 гель-проникающей хроматографии. После очистки конъюгат был оставлен при 4°C в течение 2 дней в буфере pH 7.5, чтобы прошла диссоциация всех DMx частиц, соединенных с антителом нековалентными или лабильными связями. Конъюгат затем подвергался в течение одной ночи диализу в буфере гистидин/глицин pH 5,5 и затем фильтровался через 0,22 мкм фильтр для конечного хранения. Число молекул DMx на молекулу Ат (в среднем) в конечном конъюгате было оценено путем определения поглощения конъюгата при 252 и 280 нм с использованием известных коэффициентов поглощения для DMx и Ат на этих двух длинах волн.

SDS-PAGE в восстанавливающих условиях был проведен с конъюгатом и образцами антител (10 мкг на дорожку) с использованием NuPage электрофорезной системы с 4-12% Bis Tris Gel и NuPAGE MOPS SDS электродным буфером (Фигура 8). Полосы в геле с молекулярной массой 75, 125 и 150 кДа указывали на наличие частиц (H1, H2L и H2L2 соответственно) с поперечными сшивками между цепями. Сравнение Ат-сульфо-Mal-DM1 конъюгатов с ~ 4 DM1/Ab (дорожка 3, по этому способу, и дорожка 2, по традиционному 2-этапному способу конъюгации, соответственно) и ~ 6 DM1/Ат (дорожка 5, по этому способу, и дорожка 4, по традиционному 2-этапному способу

конъюгации, соответственно) четко показали, что конъюгаты, сделанные по способу, описанному в этом изобретении (дорожки 3 и 5), имеют намного меньшую долю высокомолекулярных поперечно-сшитых частиц, чем конъюгаты, сделанные по традиционному 2-этапному способу (дорожки 2 и 4).

5 Белковый LabChip электрофорезный анализ (в условиях восстановления) конъюгата антитело-сульфо-Mal-DM1, приготовленного по способу, описанному в этом изобретении, показал полосы тяжелой и легкой цепи в процентном соотношении 70% и 28% (от общего белка), тогда как подобный анализ для неконъюгировавших антител показал 70 и 30% соответственно (Фигура 9). Напротив, конъюгат, приготовленный с
10 использованием традиционного двухэтапного способа, показал тяжелые и легкие полосы только на 53% и 23% соответственно, а основные полосы высокой молекулярной массы в промежутке 99-152 кДа предположительно появились из-за межцепочечного поперечного сшивания. На основании оценки белковых LabChip анализов, конъюгат, приготовленный по способу, описанному в этой заявке, намного превосходит конъюгат,
15 полученный с использованием традиционного двухэтапного способа (Фигура 9).

Конъюгаты Ат-сульфо-mal-DM1 с подобными присоединенными препаратами, сделанные по способу, описанному в этом изобретении, и по традиционному двухэтапному способу сравнивались в эксклюзионных LC/MS анализах (Фигура 10). Конъюгаты, сделанные по способу, описанному в этом изобретении, показывали
20 желаемый MS спектр, содержащий лишь ожидаемое распределение пиков с массой, равной Ат-(линкер-DMx)_n. В случае конъюгатов, сделанных с использованием традиционного двухэтапного способа, основные пики в спектре все содержали один или более гидролизованных или поперечно-сшитых линкерных фрагментов в дополнение к ожидаемым долям Ат-(линкер-DMx)_n. Предполагаемый механизм возникновения
25 межцепочечных поперечных сшивок или водной инактивации малеимида в традиционной 2-этапной реакционной последовательности показан на Фигуре 17, где включенный остаток малеимида (или галоацетамида) от первичной реакции антитела с гетеробифункциональным линкером может реагировать с внутримолекулярными (или
30 межмолекулярными) остатками гистидина, лизина, тирозина или цистеина, что приводит к возникновению межцепочечных поперечных сшивок или к тому, что первоначально образовавшие связь остатки малеимида (или галоацетамида) могут стать
35 инактивированными (так, при гидролитическом расщеплении малеимидного кольца или при добавлении воды к малеимиду) и, следовательно, становятся бесполезны для быстрой реакции с тиол-несущей эффекторной или репортерной группой. Таким образом, LC-MS анализ четко показывает, что способ, описанный в этом изобретении, обладает преимуществом для создания гомогенных конъюгатов, у которых гидролизованных или поперечно-сшитых линкерных фрагментов, прикрепленных к антителу, мало или они отсутствуют.

40 Связывание анти-CanAg Ат-PEG4-Mal-DM1 конъюгата с 5,6 майтансиноида, приходящегося на молекулу антитела (в среднем), приготовленного по способу, описанному в этом изобретении, было оценено по проточной цитометрии с использованием антиген-экспрессирующих COLO205 клеток, и было обнаружено, что это значение такое же, как у неконъюгировавших антител, что подтверждает, что
45 конъюгация не оказывает вредное влияние на связывание антителом антигена-мишени (Фигура 11). Цитотоксическая активность анти-CanAg Ат-Сульфo-Mal-DM1 конъюгата, приготовленного по способу, описанному в этом изобретении, была оценена *in vitro* с использованием COLO205 клеток рака толстой кишки, экспрессирующих CanAg антиген (Фигура 12). Антиген-экспрессирующие раковые клетки были высеваны в количестве

около 1000 клеток на лунку в 96-луночные плашки в культуральной клеточной среде, содержащей эмбриональную бычью сыворотку, и подвергались действию различных концентраций Ат-DMx конъюгата. После 5 дней воздействия конъюгата оставшиеся жизнеспособные клетки были подсчитаны с использованием WST-8 оценки (Dojindo Molecular Technologies). Как показано на Фигуре 12, анти-CanAg Ат-сульфо-Mal-DM1 конъюгат, приготовленный с использованием этого способа, был сильнодействующим в низкой концентрации по отношению к CanAg антиген-экспрессирующим COLO205 клеткам рака толстой кишки. Цитотоксичность этого конъюгата была специфична, поскольку ее можно было блокировать при добавлении при добавлении избыточного, неконъюгировавшего антитела.

Альтернативный способ конъюгации с использованием способа, описанного в этом изобретении, включал этап погашения с использованием малеимидного или галоацетамидного реагентов (таких как 4-малеимидомасляная кислота, или 3-малеимидопропионовая кислота, или N-этилмалеимид, или иодоацетамид, или иодоуксусная кислота) после завершения первичной DMx и гетеробифункциональной линкерной реакции (перед добавлением реакционной смеси к антителу) для погашения избыточной DMx тиоловой группы для того чтобы предотвратить любую нежелательную реакцию DMx тиол с антителом. В конкретном примере последующее завершение первичной реакции DMx и гетеробифункционального линкера (перед добавлением реакционной смеси к антителу), 4-малеимидомасляная кислота была добавлена для погашения избыточной DMx тиол группы для того чтобы предотвратить какую-либо нежелательную реакцию DMx тиола с антителом во время реакции конъюгации. К реакционной смеси DM4 и сульфо-Mal-NHS гетеробифункционального реагента, которая содержала избыток DM4 (3 мМ), через завершением желаемого DM4 тиол связывания с малеимидной группой гетеробифункционального реагента, двукратный молярный избыток 4-малеимидомасляной кислоты (6 мМ) был добавлен к реакционной смеси при комнатной температуре на 20 минут для погашения DM4, оставшегося после первичной реакции связывания. Без очистки реакционной смеси аликвота была смешана с раствором антитела в фосфатном буфере (pH 7.5) при заключительных условиях конъюгации 4 мг/мл Ат, 90% водного фосфатного буфера /10% DMA, pH 7.5. Реакция конъюгации протекала при комнатной температуре в течение 2 ч. Конъюгат антитело- DM4 был очищен от избыточного низкомолекулярного DM4 и линкерных реагентов с использованием G25 гель-фильтрационных колонок, уравновешенных в фосфатном буфере pH 7.5. Конъюгационную смесь в дальнейшем оставили при 4°C в течение 2 дней в буфере pH 7.5, чтобы прошла диссоциация всех DMx частиц, соединенных с антителом нековалентными или лабильными связями. Конъюгат затем подвергался в течение одной ночи диализу в буфере гистидин/глицин pH 5.5 и затем фильтровался через 0,22 мкм фильтр для конечного хранения. Число молекул DMx на молекулу Ат (в среднем) в конечном конъюгате было оценено путем определения поглощения конъюгата на 252 и 280 нм с использованием известных коэффициентов поглощения для DMx и антитела на этих двух длинах волн. Образцы конъюгата анализировались при помощи SDS PAGE в невозстанавливающих условиях с использованием NuPage электрофорезной системы с 4 -12% Bis Tris Gel (Invitrogen). Денатурированные нагреванием образцы помещались в количестве 10 мкг на дорожку. SDS-PAGE в невозстанавливающих условиях конъюгата, приготовленного с использованием способа, описанного в этом изобретении (без погашения) подтвердил наличие полосы легкой цепи (~25 кДа) и полосы половины антитела (тяжелая-легкая цепь; ~75 kDa) (Фигура 18). С другой стороны, конъюгат, приготовленный с использованием способа, описанного в этом

изобретении, который был обработан 4-малеимидомасляной кислотой (для кэширования избыточного DMx тиола), имел значительно меньшее количество этих нежелательных полос (на уровнях, сравнимых с образцом немодифицированного антитела). Другое преимущество погашения первичной реакционной смеси DMx и

5 гетеробифункционального реагента (перед конъюгацией с антителом) тиол-погашающими реагентами, такими как 4-малеимидомасляная кислота, состоит в том, что во время реакции конъюгации антитела нет «свободных» частиц DMx (DM1 или DM4) и, следовательно, конечный конъюгат после очистки не содержит «свободных» или неконъюгировавших частиц DMx. DMx-аддукт с 4-малеимидомасляной кислотой
10 (или другими полярными тиол-погашающими реагентами) лучше растворим в воде, чем DMx и, следовательно, его можно легче отделить от ковалентно связанного конъюгата антитело-DMx.

Пример 3. Конъюгация антитела с майтансиноидом (DM1/DM4) с использованием сульфо-NHS-SMCC линкера (Фигура 13).

15 Исходные растворы DM1 или DM4 тиола и сульфо-SMCC гетеробифункционального линкера с сульфо-NHS группой (производство Pierce Endogen; Фигура 13) были приготовлены в (DMA) в концентрациях 30-60 mM. Линкер и DM1 или DM4 тиол были смешаны в содержащем 40% DMA по объему водном 200 mM сукцинатном буфере, 2 mM EDTA, pH 5.0, соотношение DMx к линкеру составляло 1,6 и конечная концентрация
20 DMx составляла 6 mM. После смешивания реакционная смесь была оставлена на 1-4 ч и затем аликвота реакционной смеси была разведена в 10, чтобы измерить ее поглощение при 302-320 нм для определения того, весь ли малеимид прореагировал (Дополнительный обратный фазовый HPLC анализ замороженной аликвоты реакционной смеси была осуществлена позже с мониторингом поглощения при 302 нм и 252 нм для
25 подтверждения полного исчезновения линкера малеимида и образования желаемого реагента сульфо-NHS-линкер-Mal-DMx во время добавления реакционной смеси к антителу). Когда в У.Ф. малеимид больше не обнаруживался, аликвота реакционной смеси была добавлена без очистки к раствору антитела в фосфатном буфере (pH 7,5) при заключительных условиях конъюгации 4 мг/мл Ат, 90% фосфатный буфер (водный)
30 /10% DMA (по объему), pH 7,5. Реакция конъюгации протекала при комнатной температуре в течение 2 ч. Конъюгат Ат-DMx был очищен от избыточного непрореагировавшего реагента и избыточного DMx с использованием G25 гель-фильтрационных колонок, уравновешенных в фосфатном буфере pH 7.5 (водном). Конъюгационная смесь в дальнейшем была оставлена на 2 дня при 4°C в pH 7.5 буфере,
35 чтобы прошла диссоциация всех DMx частиц, соединенных с антителом нековалентными или лабильными связями. Конъюгат затем подвергался в течение одной ночи диализу в буфере гистидин/глицин pH 5,5 и затем фильтровался через 0,22 мкм фильтр для конечного хранения. Число молекул DMx на молекулу антитела (в среднем) в конечном конъюгате было оценено путем определения поглощения конъюгата при 252 и 280 нм
40 с использованием известных коэффициентов поглощения для DMx и антитела на этих двух волнах.

Для сравнения, конъюгаты Ат-SMCC-DMx сульфо-Mal-DMx были приготовлены с использованием традиционного 2-этапного способа. Антитело (Ат) в концентрации 8 мг/мл в 95% фосфатном буфере pH 6,5/5% DMA буфере было модифицировано
45 избыточным бифункциональным сульфо-SMCC линкером с сульфо-NHS группой (производство Pierce Endogen). Реакция проходила при 25°C в течение 2 ч, и затем модифицированные Ат были очищены от избыточного непрореагировавшего линкера с использованием G25 хроматографии. Восстановление очищенного Ат был определен

при поглощении в У.Ф. при 280 нм. Число связавшихся малеимидных групп в модифицированном Ат было определено с использованием маленькой аликвоты модифицированного антитела путем добавления известного количества тиола (такого как 2-меркаптоэтанол), добавленного в избытке по сравнению с малеимидом, для реакции с малеимидными остатками в модифицированном антителе, и затем оставшийся тиол подсчитывался по способу Элмана с использованием реагента DTNB. (коэффициент поглощения TNB тиолата 412 нм=14150 M⁻¹ см⁻¹; Riddles, P. W. et al, Methods Enzymol., 1983, 91, 4,9-60; Singh, R., Bioconjugate Chem., 1994, 5, 348-351). Конъюгация модифицированного Ат с DM1 или DM4 была осуществлена при концентрации Ат 2,5 мг/мл в 95% фосфатном буфере pH 6,5/5% DMA (объемное содержание), с 1,7 молярных эквивалентов DM1 или DM4 тиол, добавленных на моль связанного малеимида в Ат. Реакция была оставлена на 8-24 ч при 18°C и конъюгат был отделен от избыточного, непрореагировавшего DM1 (или DM4) путем G25 хроматографии. После очистки конъюгат был оставлен при 4°C на 2 дня в буфере pH 6,5, чтобы прошел гидролиз всех слабо соединенных DM1/DM4 частиц. Конъюгат затем подвергался в течение одной ночи диализу в буфере гистидин/глицин pH 5,5 и затем фильтровался через 0,22 мкм фильтр для окончательного хранения. Число молекул DMx на молекулу антитела (в среднем) в конечном конъюгате было оценено путем определения поглощения конъюгата при 252 и 280 нм с использованием известных коэффициентов поглощения для DMx и антитела на этих двух длинах волн.

SDS-PAGE в восстанавливающих условиях был проведен с конъюгатом и образцами антител (10 мкг на дорожку) с использованием NuPage электрофорезной системы (Invitrogen) с NuPage 4-12% Bis Tris Gel и NuPAGE MOPS SDS электродным буфером (Фигура 14). Полосы в геле с молекулярной массой 75, 125 и 150 кДа указывали наличие частиц (H1, H2L и H2L2 соответственно) с межцепочечными поперечными сшивками. Сравнение Ат- SMCC-DM1 конъюгатов с 3.1 D/Ат (дорожка 4, по этому способу, и дорожка 3, по традиционному 2-этапному способу конъюгации, соответственно) четко показало, что конъюгаты, сделанные по способу, описанному в этом изобретении (дорожка 4), имеют намного меньшую долю высокомолекулярных поперечно-сшитых частиц, чем конъюгаты, сделанные по традиционному 2-этапному способу (дорожка 3).

Белковый LabChip электрофорезный анализ (в условиях восстановления) конъюгата антитело- SMCC-DM1, приготовленного по способу, описанному в этом изобретении, показал полосы тяжелой и легкой цепи в процентном соотношении 67% и 30% (от общего белка), тогда как подобный анализ неконъюгировавших антител показал 68 и 30% соответственно (Фигура 15). Напротив, конъюгат, приготовленный с использованием традиционного двухэтапного способа, показал тяжелые и легкие полосы только на 54% и 24% соответственно, а основные полосы высокой молекулярной массы в промежутке 96-148 кДа предположительно появились из-за межцепочечных поперечных сшивок. На основании оценки белковых LabChip анализов, конъюгат, приготовленный по способу, описанному в этой заявке, намного превосходит конъюгат, полученный с использованием традиционного двухэтапного способа из-за отсутствия межцепочечных поперечных сшивок (Фигура 15).

Конъюгаты Ат-SMCC-DM1 с аналогичными прикрепленными препаратами, сделанные по способу, описанному в этом изобретении, и по традиционному двухэтапному способу, сравнивались при помощи эксклюзионного LC/MS анализа (Фигура 16). Конъюгат, сделанный по способу, описанному в этом изобретении, показывает желаемый MS спектр, содержащий только ожидаемое распределение пиков

с маской, равной массе Ат-(линкер-DMx)_n. В случае конъюгата, сделанного с использованием традиционного двухэтапного способа, спектр показывает гетерогенную смесь частиц, которая включает желаемые частицы Ат-(линкер-DMx)_n, а также добавочные частицы, содержащие инактивированный малеимид и поперечно-сшитые линкерные фрагменты. Предполагаемые механизмы возникновения внутрицепочечных поперечных сшивок и малеимидной инактивации при традиционной 2-этапной реакционной последовательности показаны на Фигуре 17, где присоединенный малеимид (или остаток галоацетамида) от первичной реакции антитела с гетеробифункциональным линкером может реагировать с внутримолекулярными (или межмолекулярными) гистидином, лизином, тирозином или цистеином, что приводит к образованию межцепочечных поперечных сшивок, или же первоначально присоединенный остаток малеимида (или галоацетамида) может стать инактивированным при гидролизе или гидратации малеимидного остатка до реакционного этапа с тиол-несущим DM1 или DM4 (DMx) агентом. Таким образом LC-MS анализ четко показывает, что способ, описанный в этом изобретении, обладает преимуществом для получения гомогенного конъюгата, у которого мало или отсутствуют инактивированный малеимид или поперечно-сшитые фрагменты линкера, присоединенные к антителу.

Пример 4. Конъюгация антитела с DM1/DM4 (DMx) с расщепляемыми дисульфидными линкерами по этому способу (Фигура 19).

Исходные растворы, содержащие DM1 или DM4 тиол (DM_x) и гетеробифункциональный линкер 4-(2-пиридилдитио)масляная кислота-N-гидроксисукцимидный эфир (SPDB), были приготовлены в DMA в концентрациях 30-60 mM. Линкер и DMx тиол были смешаны в содержащем 50% DMA по объему 200 mM сукцинатном буфере, 2 mM EDTA, pH 5,0, соотношение DMx к линкеру составляло 1.6:1 и конечная концентрация DMx была равна 8 mM. После смешивания реакционная смесь была оставлена на 1 ч при комнатной температуре и затем аликвота реакционной смеси была добавлена к водному раствору антитела в фосфатном буфере (pH 7,5) при заключительных условиях конъюгации 4 мг/мл Ат, 90% фосфатный буфер (водный) /10% DMA (по объему), pH 7,5. Реакция конъюгации протекала при комнатной температуре в течение 2 ч. Конъюгат Ат-DMx был очищен от избыточного непрореагировавшего реагента и избыточного DMx с использованием G25 гель-фильтрационных колонок, уравновешенных в фосфатном буфере pH 7,5 (водном). Конъюгационная смесь в дальнейшем была оставлена при 4°C в течение 2 дней в pH 7,5 буфере, чтобы прошла диссоциация всех DMx частиц, соединенных с антителом нековалентными или лабильными связями. Конъюгат затем подвергался в течение одной ночи диализу в буфере гистидин/глицин pH 5.5 и затем фильтровался через 0,22 мкм фильтр для финального хранения. Число молекул DMx на молекулу антитела (в среднем) в конечном конъюгате было оценено путем определения поглощения конъюгата при 252 и 280 нм с использованием известных коэффициентов поглощения для DMx и антитела на этих двух длинах волн.

Пример 5. Приготовление антитело-DM1/DM4 (Ат-DMx) конъюгата с дисульфидными и нерасщепляемыми линкерами с использованием этого способа (Фигура 20).

Исходные растворы, содержащие DM1 или DM4 тиол и NHS-PEG_n-Малеимид гетеробифункциональный линкер были приготовлены в iN,N-диметилацетарниде (DMA) в концентрациях 30-60 mM. NHS-PEG_n-Малеимид линкер и DMx тиол были смешаны в DMA содержащем 40% по объему 200 mM сукцинатном буфере, 2 mM EDTA, pH 5,0, соотношение DMx к линкеру составляло 1.6:1 и конечная концентрация DMx была

равна 8 мМ. Реакционная смесь была оставлена на 2 ч при комнатной температуре. В отдельной параллельной реакции SPDB линкер и DMx тиол были смешаны вместе и реагировали подобным образом в условиях, используемых для NHS-PEG4-малеимид реакции, за исключением того, что время реакции составляло 1 ч. После завершения

5 обеих реакций и без очистки одинаковые объемы PEG4-Mal-DM4 смеси и SPDB-DM4 смеси были соединены. Аликвоты комбинированных реакционных смесей были добавлены без очистки к раствору антител в фосфатном буфере (pH 7,5) при заключительных условиях конъюгации 4 мг/мл Ат, 90% фосфатный буфер (водный) /10% DMA (по объему), pH 7,5. Реакция конъюгации протекала при комнатной

10 температуре в течение 2 ч. Конъюгат Ат-DMx был очищен от избыточного непрореагировавшего реагента и избыточного DMx с использованием G25 гель-фильтрационных колонок, уравновешенных в фосфатном буфере pH 7,5 (водном). Конъюгационная смесь была оставлена при 4°C в течение 2 дней в pH 7,5 буфере, чтобы прошла диссоциация всех DMx частиц, соединенных с Ат нековалентными или

15 лабильными связями. Конъюгат затем подвергнулся в течение одной ночи диализу в буфере гистидин/глицин pH 5,5 и затем фильтровался через 0,22 мкм фильтр для финального хранения. Число молекул DMx на молекулу антитела (в среднем) в конечном конъюгате было оценено путем определения поглощения конъюгата при 252 и 280 нм с использованием известных коэффициентов поглощения для DMx и антитела на этих

20 двух длинах волн.

Ат-(смешанный SPDB и PEG₄-Mal линкер)-DMx конъюгат, сделанный по способу, описанному в этом изобретении, тестировался для определения процента включения расщепляемых линкеров по сравнению с нерасщепляемыми линкерами в Ат путем

25 сравнения DMx на антитело (D/A) соотношения до и после DTT (дифиотриэтол) воздействия на конъюгат для восстановления дисульфидных линкеров. Для того чтобы поддержать pH реакции на уровне 7,5 во время DTT восстановления, конъюгат вначале подвергли диализу в 250 мМ HEPES буфере pH 7,5. Конъюгат затем восстанавливали путем реакции с 25 мМ DTT в течение 20 мин при 37°C. После DTT реакции,

30 освобожденные DMx и DTT были отделены от реакционной смеси с использованием G25 гель-фильтрационных колонок, уравновешенных в 250 мМ HEPES буфере pH 7.5. Среднее число DMx молекул на молекулу Ат в очищенном продукте было оценено путем определения коэффициента поглощения конъюгата при 252 280 нм и с использованием известного коэффициента поглощения для DMx и антитела при этих

35 двух длинах волн. Соотношение между D/A DTT-обработанного конъюгата и D/A не обработанного DTT конъюгата было использовано для расчета процента DMx, присоединенного к Ат посредством нерасщепляемой связи. Два дополнительных образца, Ат-SPDB-DM4 и Ат-PEG4-Mal-DM4 конъюгаты, были обработаны DTT в качестве позитивных и негативных контролей, соответственно. Сравнивая соотношение D/A до и после обработки DTT, контрольный нерасщепляемый Ат-PEG4-Mal-DM4

40 конъюгат показал, что практически все линкерные связи оказались нерасщепляемыми (93%) как ожидалось. Ат-(смешанный SPDB и PEG4Mal линкер)-DMx конъюгат, содержащий как нерасщепляемые, так и дисульфидные линкеры, полученный по способу, описанному в этом изобретении, имел на 41% меньше DMx, расщепленных воздействием DTT, относительно количества DMx потери у Ат-SPDB-DMx конъюгата, который

45 содержал только расщепляемые линкеры. Это демонстрирует, что Ат-(смешанный SPDB и PEG4-Mal)-DMx конъюгат, сделанный по способу, описанному в этом исследовании, состоял из приблизительно 40% нерасщепляемых и 60% расщепляемых линкеров. Изменяя первоначальное соотношение нерасщепляемых и расщепляемых

линкерных реагентов, конъюгаты антитела с майтансиноидом или другими эффекторами можно готовить с различным соотношением нерасщепляемых и расщепляемых линкеров. Фигура 21 показывает масс-спектр дегликозилированного конъюгата, описанного выше, который содержит антитело с в среднем 3,5 молекулы майтансиноида на молекулу антитела, связанные как дисульфидными линкерами (SPDB), так и нерасщепляемыми линкерами (PEG). MS показывает дискретные конъюгатные частицы, несущие как расщепляемые, так и нерасщепляемые линкеры (Фигура 21). Например, пик конъюгата, обозначенный D2-PEG-SPDB, несет одну дисульфидно связанную и одну нерасщепляемо тиэфирно связанную молекулы майтансиноида; пик конъюгата, обозначенный D3-PEG-2SPDB, несет две дисульфидно-связанные и одну нерасщепляемо тиэфирно-связанную молекулы майтансиноида; а пик конъюгата, обозначенный D3-2PEG-SPDB, несет одну дисульфидно-связанную и две нерасщепляемо тиэфирно-связанные молекулы майтансиноида.

Пример 6. Конъюгация антитела с майтансиноидом с использованием SMCC линкера (Фигура 22).

Исходные растворы, содержащие DM1 тиол и SMCC гетеробифункциональный линкер (Pierce) были приготовлены в DMA в концентрациях 30-60 mM. Линкер и DM1 тиол были смешаны в содержащем 50% DMA по объему 200 mM сукцинатном буфере, 2 mM EDTA, pH 5,0, соотношение DMx к линкеру составляло 1.4:1 в молярном эквиваленте и конечная концентрация DMx составляла от 1 до 6 mM. После смешивания реакционная смесь была оставлена на 4 ч при комнатной температуре и затем аликвота реакционной смеси была разведена в 10 раз для измерения поглощения при 302-320 нм для определения, весь ли малеимид прореагировал с тиолом. Когда малеимид больше не присутствовал в У.Ф., аликвота реакции была добавлена в водный раствор антител в фосфатном буфере (pH 7,5-8,5) при заключительных условиях конъюгации 2,5 мг/мл Ат, 70-80% фосфатный буфер (водный) /30-20% DMA (по объему). Реакция конъюгации протекала при комнатной температуре в течение 3 ч. Конъюгат Ат-DM1 был очищен от избыточного непрореагировавшего или гидролизованного реагента с использованием G25 гель-фильтрационных колонок, уравновешенных в фосфатном буфере pH 7,4 (водном). Конъюгат затем подвергался в течение одной ночи диализу в фосфатном буфере pH 7,4 и затем фильтровался через 0,22 мкм фильтр для финального хранения. Число молекул DMx на молекулу антитела (в среднем) в конечном конъюгате было оценено путем определения поглощения конъюгата при 252 и 280 нм с использованием известных коэффициентов поглощения для DMx и антитела на этих двух длинах волн. Подобным образом можно приготовить конъюгаты антител с DM4 тиолом и SMCC. Эти конъюгаты антитела с DM1 или DM4, использующие SMCC линкер, содержат тиоэфирный нерасщепляемый линкер.

Ат-SMCC-DM1 конъюгат, сделанный по способу, описанному в этом изобретении, был охарактеризован с помощью MS анализа дегликозилированного конъюгата (Фигура 23). Конъюгат, сделанный по способу, описанному в этом изобретении, показывает желаемый MS спектр, содержащий ожидаемое распределение пиков с массой, эквивалентной Ат-(линкер-DM1)_n.

Пример 7. Конъюгация антитела с майтансиноидом с использованием гетеробифункциональных дисульфид-содержащих линкеров (SSNPB, SPP).

Дисульфид содержащие гетеробифункциональные линкеры SSNPB (N-сульфосукцинимидил-4-(5-нитро-2-пиридилдитио)бутират) и SPP (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат) можно использовать для приготовления дисульфидно-связанных конъюгатов антитело-майтансиноид по способу, подобному тому, который

описан для SPDB линкера в Примере 4. Структура дисульфид-связанного конъюгата, приготовленного с использованием SPDB (Фигура 19) идентична структуре конъюгата, приготовленного с использованием SSNPB (Фигура 24). MS дисульфид-связанного конъюгата, приготовленного с использованием SPDB, показывает дискретные пики с массами, соответствующими различному числу молекул майтансиноида, присоединенных к антителу.

Пример 8. Конъюгация антитела с майтансиноидом, содержащем нерасщепляемые линкеры с линейной алкил-углеродной цепью.

Конъюгаты, содержащие нерасщепляемый линкер с линейной алкил-углеродной цепью, были приготовлены с использованием реакционной смеси майтансиноида и гетеробифункциональных линкеров с линейной алкил-углеродной цепью, так же как в способе, описанном для SMCC линкера в примере 6. Например, конъюгаты гуманизированного антитела с DM1 были приготовлены с использованием BMPS (N-[β-малеимидопропилокси]сукцинимидного эфира) или GMBS (N-[γ-малеимидобутирилоксисукцинимидного эфира) линкера, как показано на Фигуре 26. Первичная реакционная смесь, содержащая BMPS или GMBS (8 мМ) и DM1 тиол (10,4 мМ) в 60% DMA/40% (по объему) 200 мМ сукцинатном буфере, pH 5, показала полную реакцию половины малеимида (основываясь на ослаблении поглощения малеимида при 302-320 нм) через 15 мин. Эта реакционная смесь была добавлена в двух порциях за 30 мин, к раствору гуманизированного антитела 2,5 мг/мл в 80% водном EPPS буфере, pH 8,1, содержащем 20% DMA (по объему) с общим линкером, добавленным в 8-молярном эквиваленте к антителу. Смесь конъюгата была очищена в геле после 4 ч и подвергнута 2 циклам диализа. Конъюгаты с соотношением DM1/антитело 3,8 и 5,1 были приготовлены с 71-75% возвратом, и высоким % мономеров (96,2-97,6%). Эти конъюгаты, приготовленные с GMBS или BMPS, показали отсутствие непроконъюгировавшего свободного препарата при HISEP HPLC анализе. Подобные конъюгаты, содержащие нерасщепляемые линкеры с линейными алкильными цепями можно приготовить, используя AMAS (N-β[-малеимидоацетоксисукцинимидный эфир) или EMCS (N-[β-малеимидокаприлокси]сукцинимидный эфир) или сульфо-N-гидроксисукцинимидные эфиры (сульфо-GMBS, сульфо-EMCS) как показано на Фигуре 25. В Таблице 1 показан % мономеров для определенных конъюгатов, приготовленных по способу, описанному в этом изобретении, которые все показывают высокий % мономеров при эксклюзионном гель-хроматографическом анализе. Для сравнения показан также % мономеров для конъюгатов, приготовленных по традиционному двухэтапному способу конъюгации (при первичной реакции антитела с гетеробифункциональным линкером, за которой следует реакция с майтансиноида тиолом).

Таблица 1. % мономеров для определенных конъюгатов, сделанных по способу, описанному в этой заявке, по сравнению с традиционным двухэтапным способом

Конъюгат	D/A	Способ конъюгации	% мономеров
Ab-PEG ₄ -Mal-DM1	6,6	это изобретение	99,0
Ab-PEG ₄ -Mal-DM1	6,8	Двухэтапный	98,0
Ab-Сульфо-Mal-DM1	3,6	это изобретение	99,0
Ab-Сульфо-Mal-DM1	4,0	Двухэтапный	96,7
Ab-SMCC-DM1	4,0	это изобретение	98,6
Ab-SMCC-DM1	3,8	Двухэтапный	97,0
Ab-PEG ₄ -Mal-DM4	6,2	это изобретение	96,9
Ab-PEG ₄ -Mal-DM4	6,1	Двухэтапный	84,5
Ab-SPDB-DM4	4,1	это изобретение	99,4
Ab-SPDB-DM4	3,9	двухэтапный, в одном реакционном сосуде	95,7

(57) Формула изобретения

1. Способ получения очищенного конъюгата в растворе, где конъюгат содержит цитотоксичный агент, содержащий тиоловую группу, соединенную с антителом, включающий этапы:

(а) контактирование цитотоксичного агента с гетеробифункциональным линкерным реагентом для ковалентного присоединения линкера к цитотоксичному агенту и приготовления таким образом неочищенной первой смеси, содержащей цитотоксичный агент, связанный с линкером,

(б) конъюгацию антитела с цитотоксичным агентом, связанным с линкером, путем реакции неочищенной первой смеси со связывающимся с антителом для приготовления второй смеси, и

(в) воздействие на вторую смесь путем тангенциальной поточной фильтрации, диализа, гелевой фильтрации, адсорбционной хроматографии, селективного осаждения или их комбинации для получения очищенного конъюгата.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что этап (б) выполняют в растворе с pH от около 4 до около 9.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что вторая смесь на этапе (б) по большей части свободна от нежелательных поперечно-сшитых гидролизованных частиц, образовавшихся в результате внутримолекулярных или межмолекулярных реакций.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что цитотоксичный агент является майтансиноидом.

5. Способ по п. 4, отличающийся тем, что майтансиноид является DM1.

6. Способ по п. 4, отличающийся тем, что майтансиноид является DM4.

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что антитело является моноклональным антителом.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что антитело является человеческим или гуманизированным моноклональным антителом.

5 9 Способ по п. 1, отличающийся тем, что антитело является MY9, анти-B4, C242, или антителом, которое связывается с антигеном, выбранным из группы EpCAM, CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD11, CD19, CD20, CD22, CD26, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD44, CD56, CD79, CD105, CD138, EphA рецепторами, EphB рецепторами, EGFR, EGFRvIII, HER2, HER3, мезотелином, крипто, альфа_vбета₃, альфа_vбета₅, альфа_vбета₆ интегрином.

10 10. Способ по п. 8, отличающийся тем, что человеческое или гуманизированное антитело является huMy9-6, huB4, huC242, huN901, DS6, CNTO 95, B-B4, трастузумабом, пертузумабом, биватузумабом, зибротузумабом, ритуксимабом, или человеческим или гуманизированным антителом, которое связывается с антигеном, выбранным из группы, состоящей из рецептора EphA2, CD38 и IGF-IR.

15 11. Способ по п. 1, отличающийся тем, что линкер является расщепляемым или нерасщепляемым линкером.

12. Способ по п. 2, отличающийся тем, что pH раствора на стадии (b) составляет от примерно 5 до примерно 8.7.

20 13. Способ по п. 2, отличающийся тем, что pH раствора на стадии (b) составляет от примерно 6.5 до примерно 8.5.

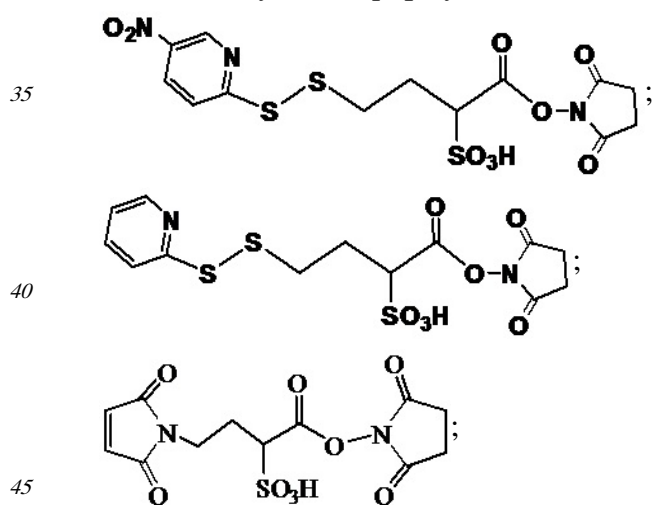
14. Способ по п. 4, где используется избыточное количество майтансиноида относительно гетеробифункционального линкерного реагента.

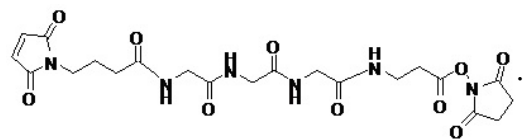
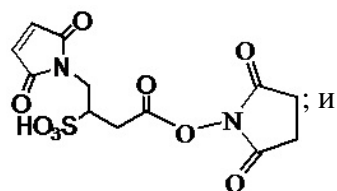
25 15. Способ по п. 4, где способ дополнительно включает этап гашения избыточного майтансиноида в неочищенной первой смеси с помощью реагента для гашения между этапами (a) и (b).

16. Способ по п. 15, где реагент для гашения выбран из группы, состоящей из 4-малеимидомасляной кислоты, 3-малеимидопропионовой кислоты, N-этилмалеимида, йодацетамида и йодацетамидопропионовой кислоты.

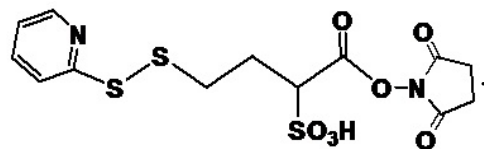
30 17. Способ по п. 1, где гетеробифункциональный линкерный реагент представлен N-гидроксисукцинимидным сложным эфиром.

18. Способ по п. 17, где гетеробифункциональный линкерный реагент представлен одной из следующих формул:





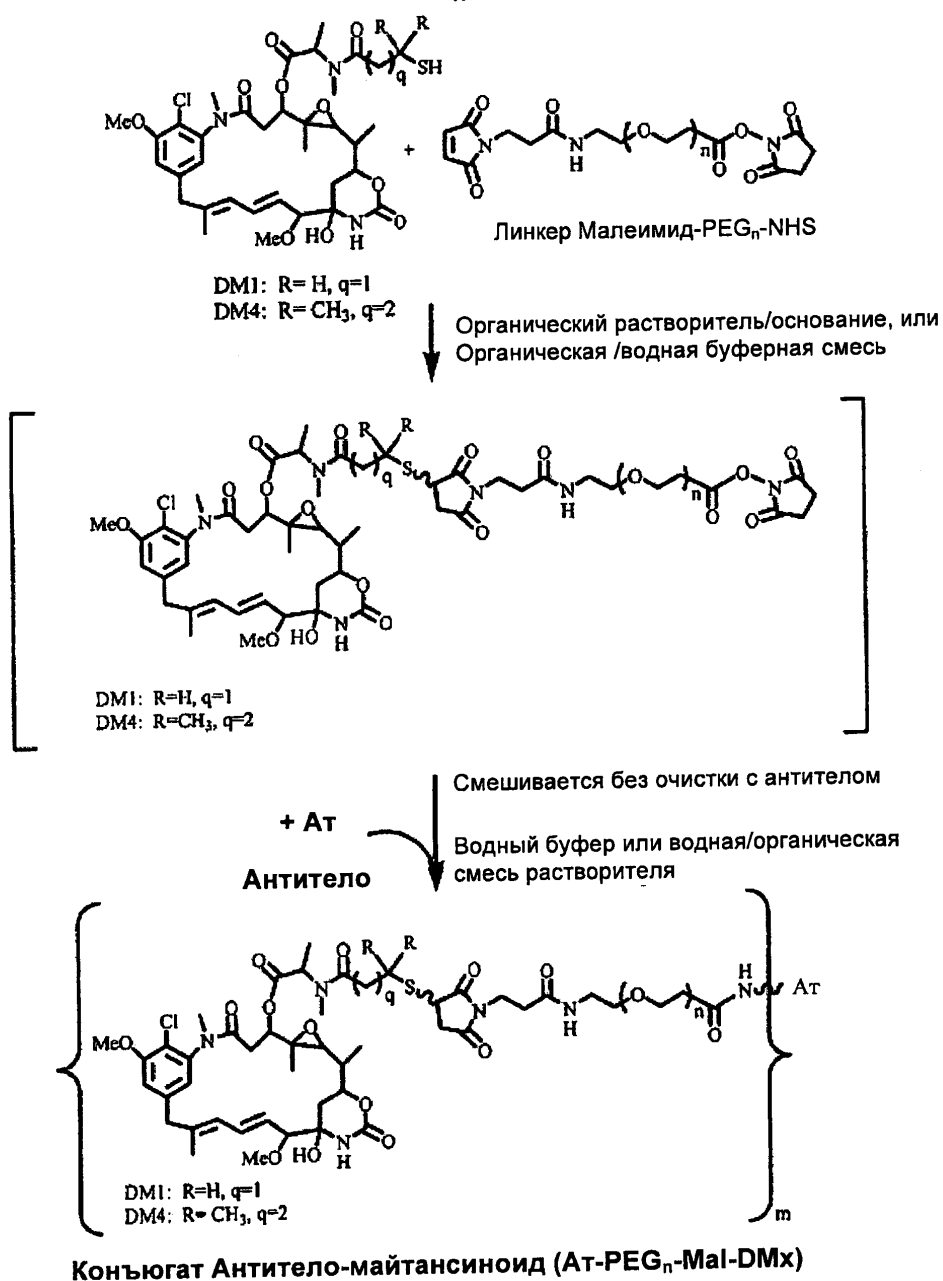
19. Способ по п. 17, где гетеробифункциональный линкерный реагент представлен следующей формулой:



1/25

ФИГ. 1

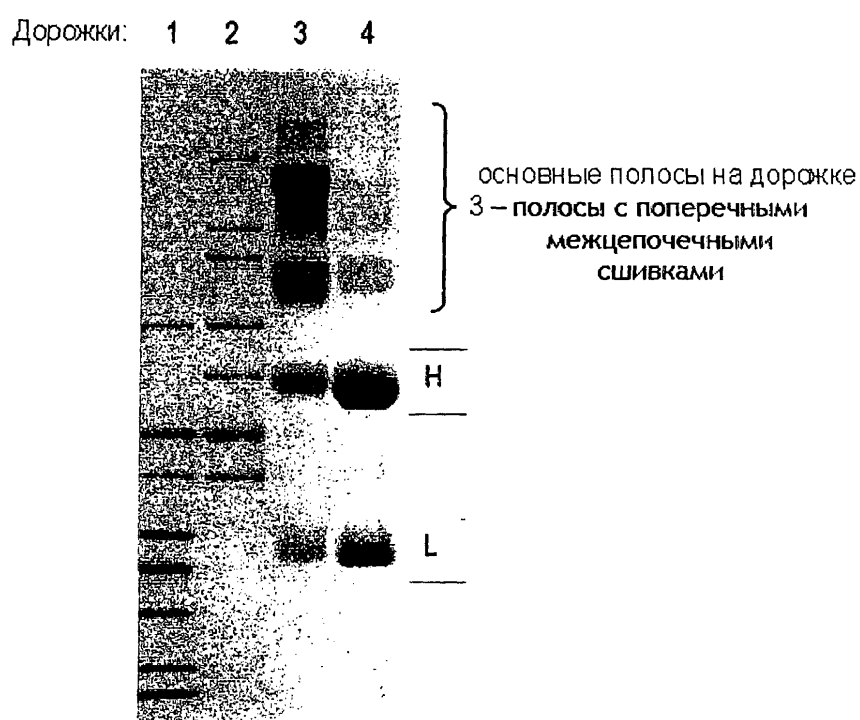
Конъюгация антитела с реакционной смесью DM1 (или DM4) и
Малеимид-PEG_n-NHS линкера



2/25

ФИГ. 2

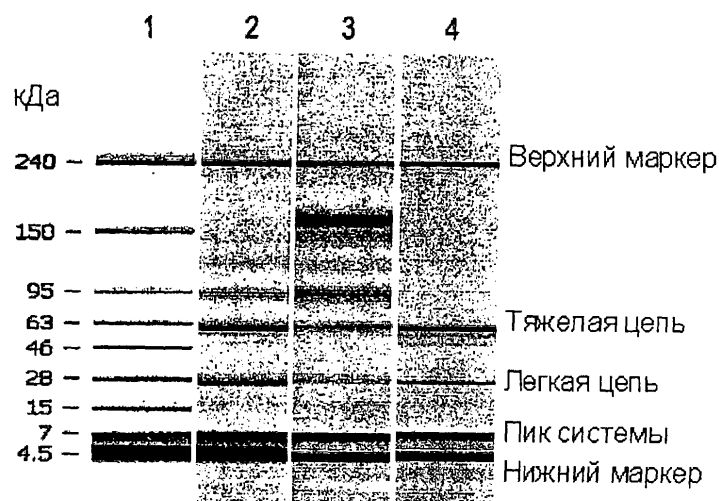
SDS-PAGE в восстанавливающих условиях конъюгата АТ-(PEG₄-Mal)-DM4
приготовленного с использованием метода, описанного в этом
изобретении, по сравнению с конъюгатом, приготовленным с
использованием традиционного 2-этапного метода.



3/25

ФИГ. 3А

Белковый LabChip электрофорез Антитело-(PEG₄-Mal)-DM4 конъюгата, приготовленного с использованием метода, описанного в этом изобретении, по сравнению с конъюгатом, приготовленным с использованием традиционного 2-этапного метода.



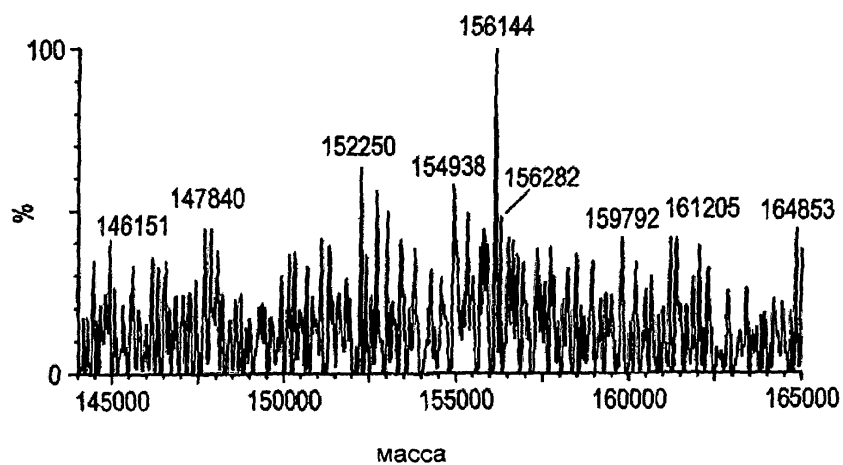
ФИГ. 3В

		% от общей массы белка, внесенного в карман дорожки		
	Полоса MW (кДа)	Неконъюгированное Ат	Ат-PEG ₄ -Mal-DM4 Этот способ	Ат-PEG ₄ -Mal-DM4 2 Этап
Легкая цепь	17	1	2	1
	27	30	30	8
Тяжелая цепь	56	4	2	-
	61	65	58	16
	94	-	6	26
	122	-	2	7
	147	-	-	12
	169	-	-	31

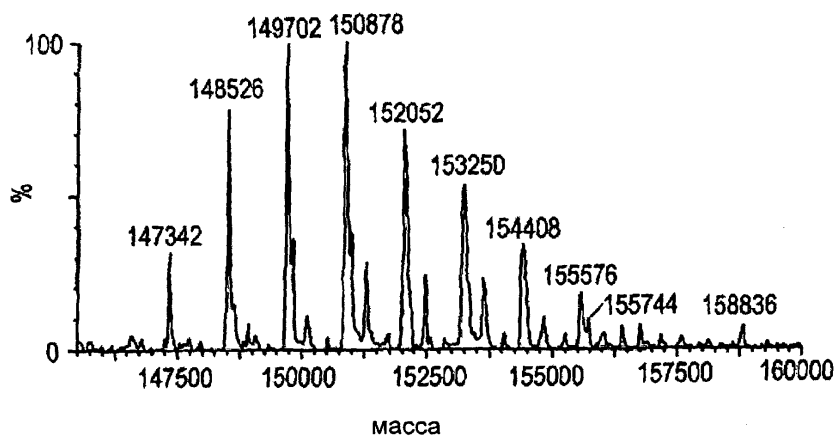
4/25

ФИГ. 4А

MS конъюгата Антитело-(PEG4-Mal)-DM4, приготовленного с использованием метода, описанного в этом изобретении, по сравнению с конъюгатом, приготовленным с использованием традиционного 2-этапного метода (образцы дегликозирированного конъюгата анализировались по MS).



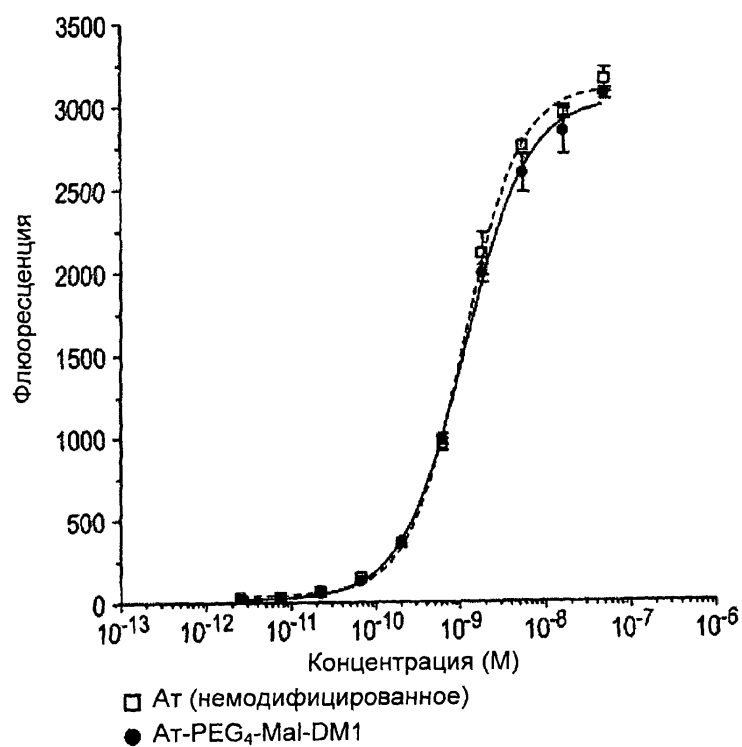
ФИГ. 4В



5/25

ФИГ. 5

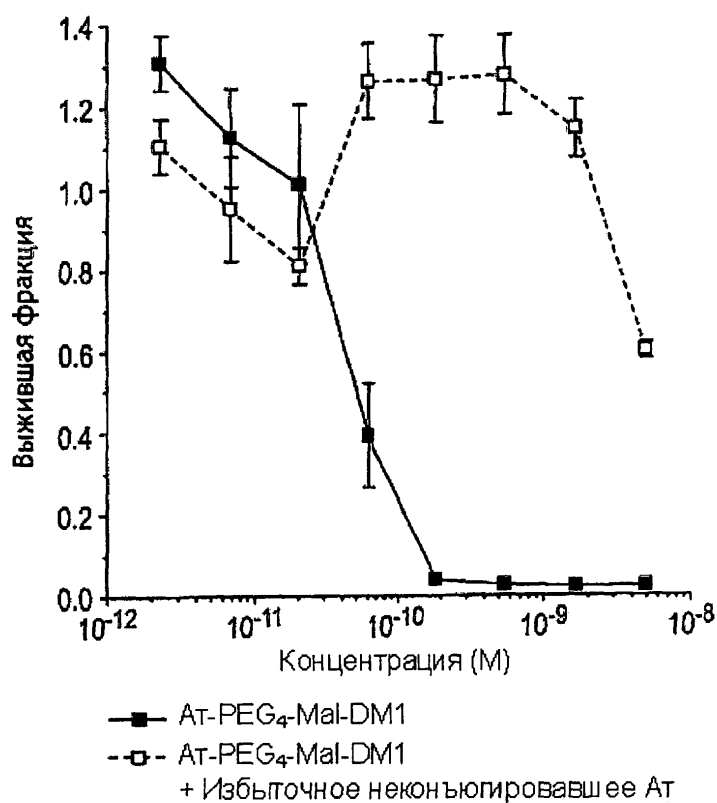
Связывание конъюгата анти-CanAg антитело-PEG₄-Mal-DM1 с 6.7 DM1 на антитело (приготовлен с использованием метода, описанного в этом изобретении по сравнению со связыванием немодифицированного антитела к CanAg антиген-экспрессирующим COLO205 клеткам



6/25

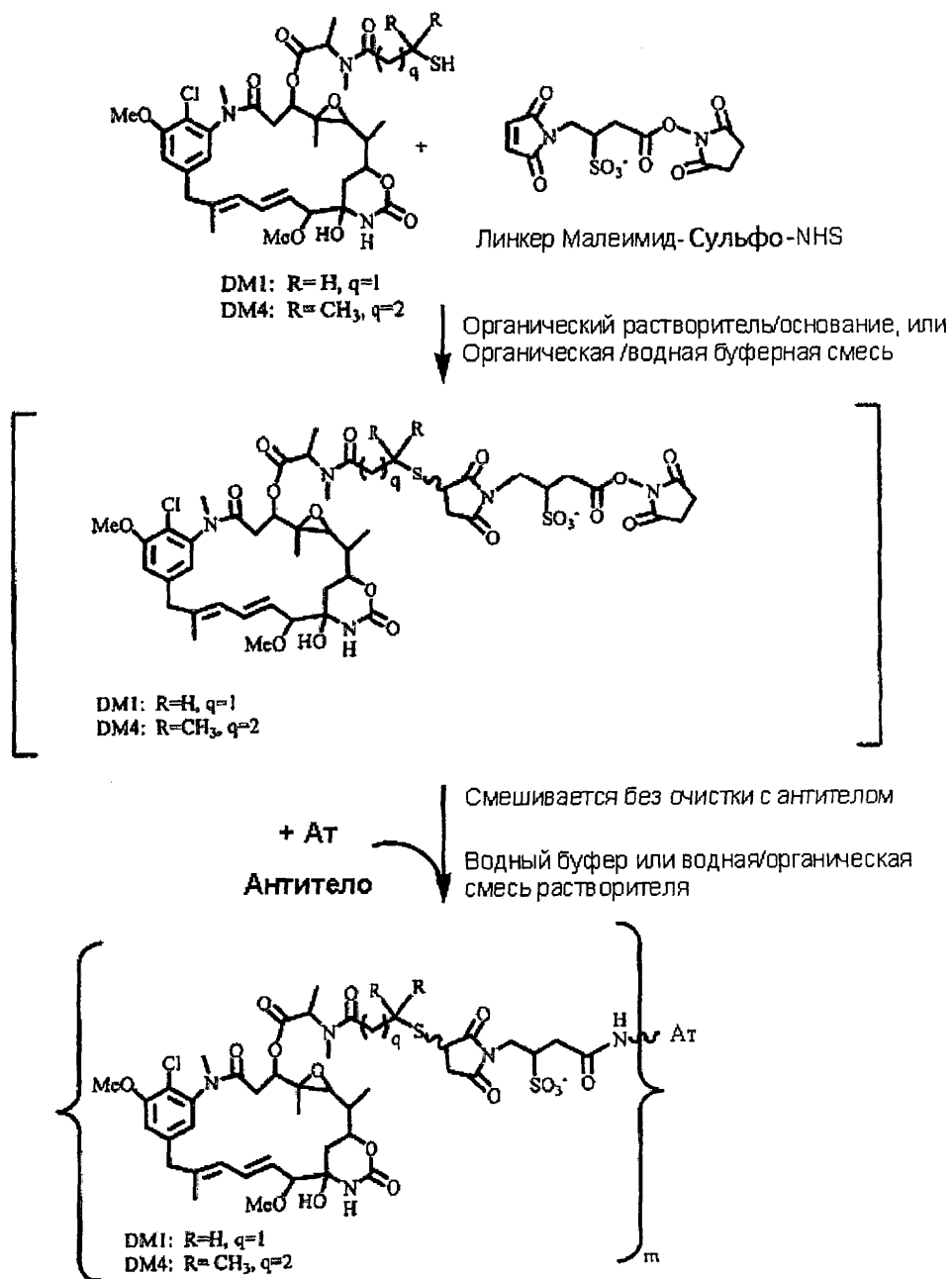
ФИГ. 6

In vitro цитотоксичность конъюгата анти-CanAg Антитело-PEG₄-Mal-DM1 с 6,7 DM1 на антитело (приготовлен с использованием метода, описанного в этом изобретении) по отношению к CanAg антиген-экспрессирующим COLO205 клеткам.



7/25
ФИГ. 7

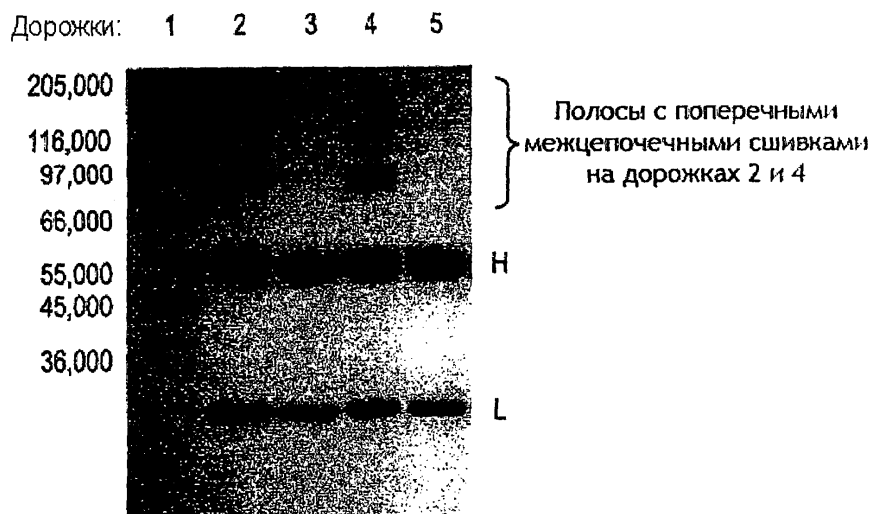
Конъюгация антитела с реакционной смесью DM1 (или DM4) и
Малеимид-Сульфо-NHS линкером



8/25

ФИГ. 8

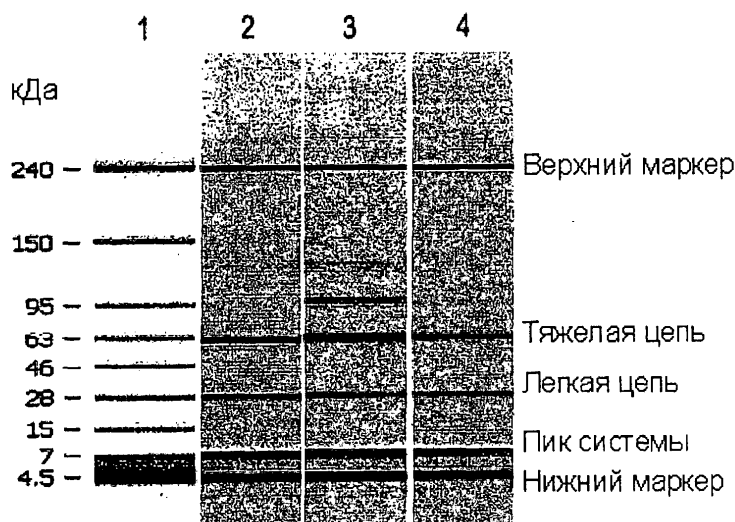
Восстанавливающий SDS-PAGE в восстанавливающих условиях
конъюгата At-(Sulfo-Mal)-DM1,
приготовленного с использованием метода, описанного в этом
изобретении, по сравнению с конъюгатом, приготовленным с
использованием традиционного 2-этапного метода.



9/25

ФИГ. 9А

Белковый LabChip электрофорез конъюгата Антитело-(Сульфо-Mal)-DM1, приготовленного с использованием метода, описанного в этом изобретении, по сравнению с конъюгатом, приготовленным с использованием традиционного 2-этапного метода



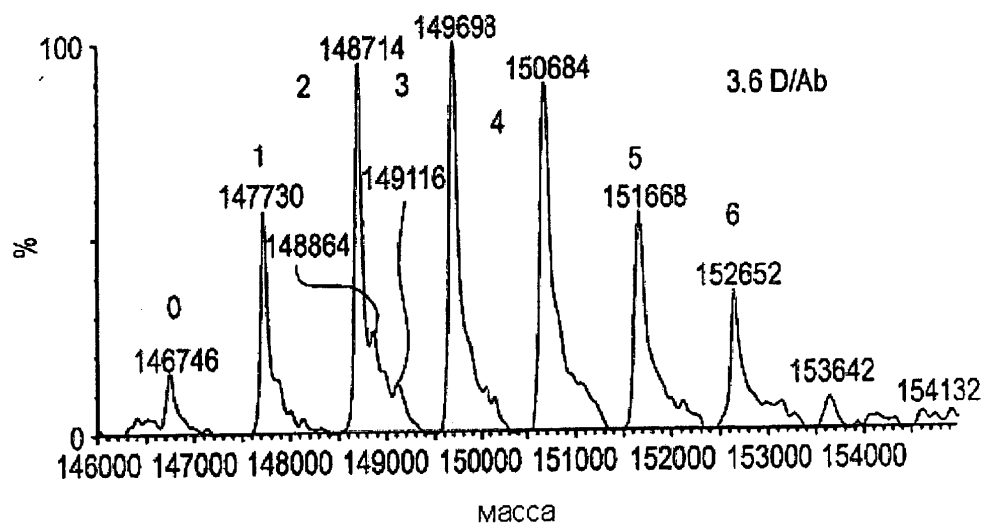
ФИГ. 9В

		% от общей массы белка, внесенного в карман дорожки		
Полоса MW (кДа)		Неконъюгировавшееся Ат	Ат-Sulfo-Mal-DM1 Этот способ	Ат-Sulfo-Mal-DM1 2 Этап
Легкая цепь	18	-	-	1
	29	30	23	28
Тяжелая цепь	62	70	53	70
	99	-	15	1
	130	1	7	1
	152	-	3	-

10/25

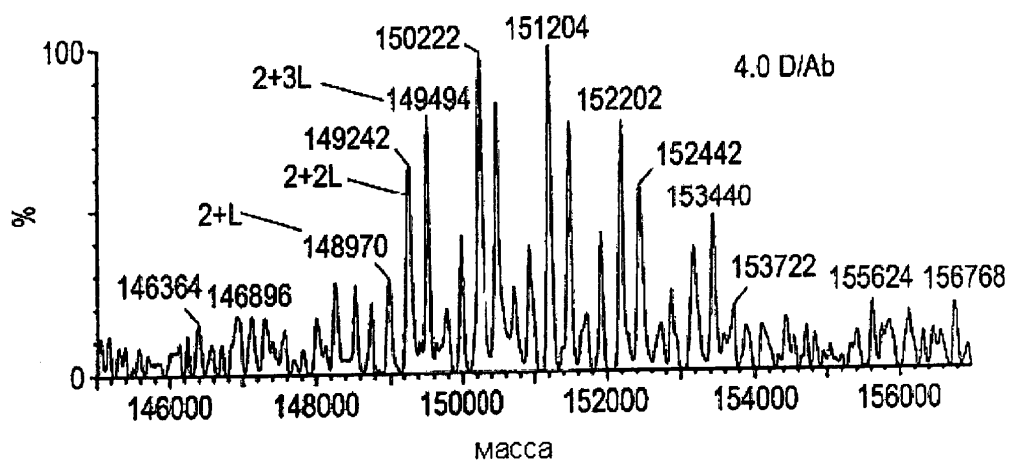
ФИГ. 10А

Конъюгат Ат-(3-Сульфо-Mal)-DM1 (3.6 D/Ат), приготовленный с использованием метода, описанного в этом изобретении



ФИГ. 10В

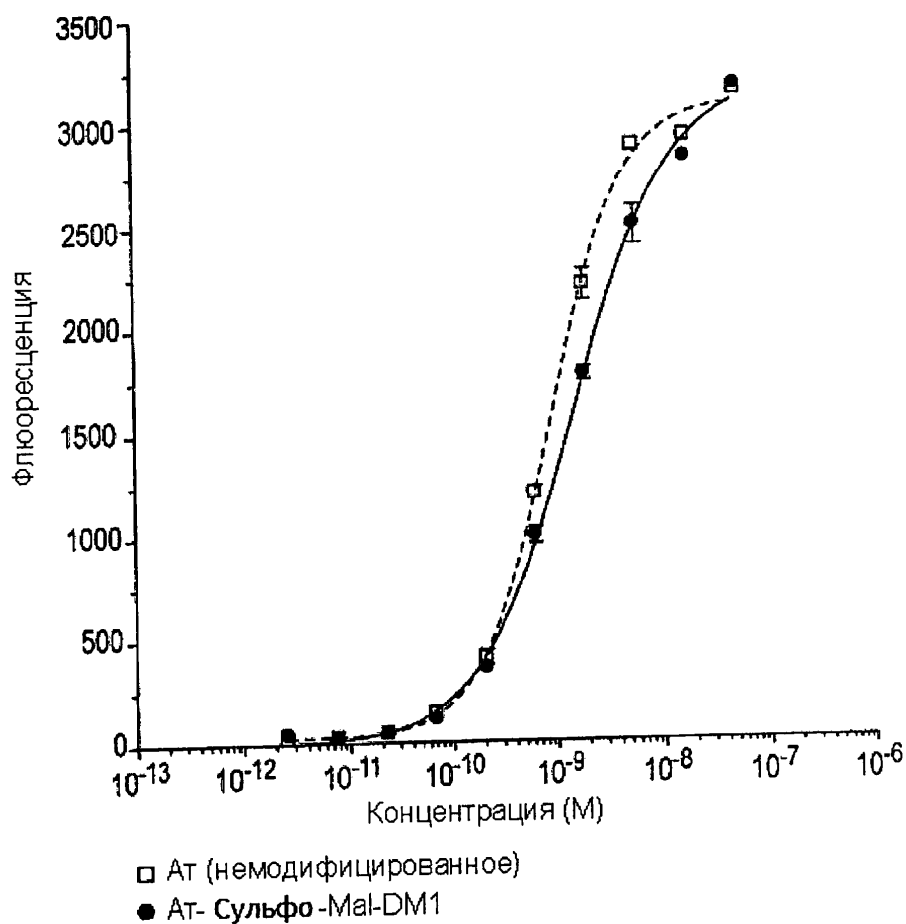
Конъюгат Ат-(3-Сульфо-Mal)-DM1 (4.0 D/Ат) традиционный двухэтапный метод



11/25

ФИГ. 11

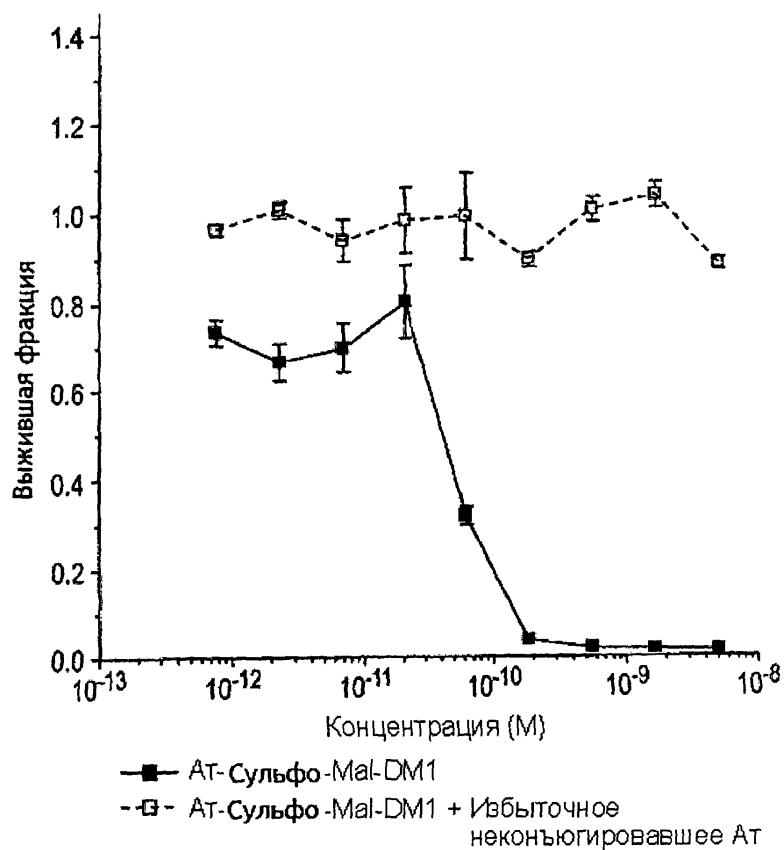
Связывание конъюгата анти-CapAg антитело-Сульфо-Mal-DM1 с 5,6 DM1 на антитело (приготовлен с использованием метода, описанного в этом изобретении) по сравнению со связыванием немодифицированного антитела к CapAg антиген-экспрессирующим COLO205 клеткам



12/25

ФИГ. 12

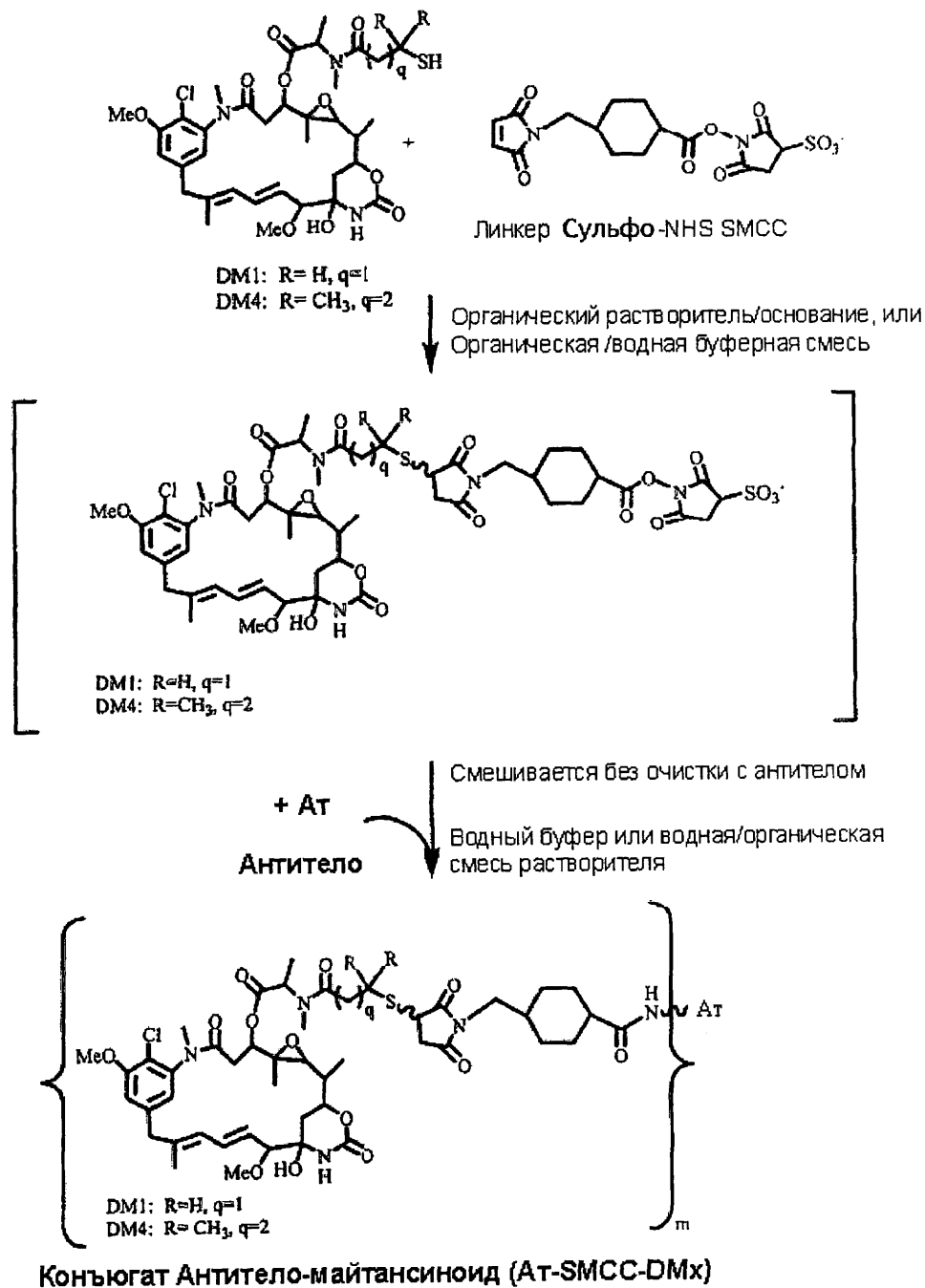
In vitro цитотоксичность конъюгата анти-SapAg Антитело-Сульфо-Mal-DM1 с 5,6 DM1 на антитело (приготовлен с использованием метода, описанного в этом изобретении) по отношению к SapAg антиген-экспрессирующим COLO205 клеткам.



13/25

ФИГ. 13

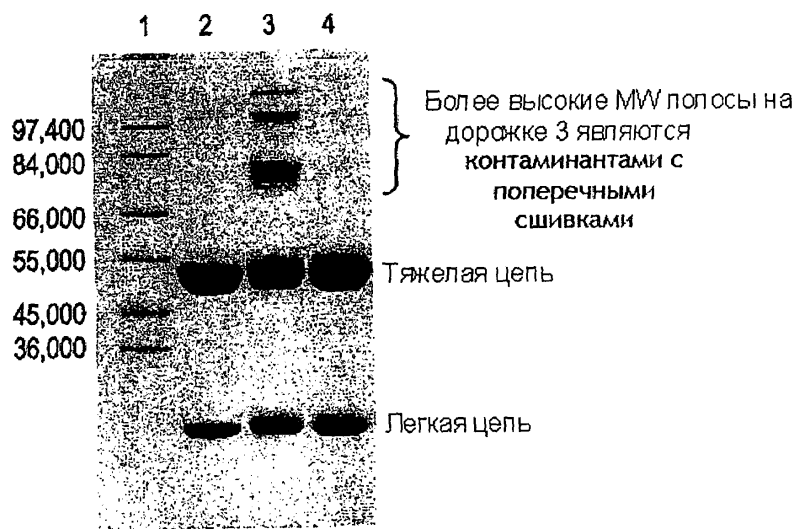
Конъюгация антитела с реакционной смесью DMI (или DM4) и Сульфо-NHS SMCC линкера



14/25

ФИГ. 14

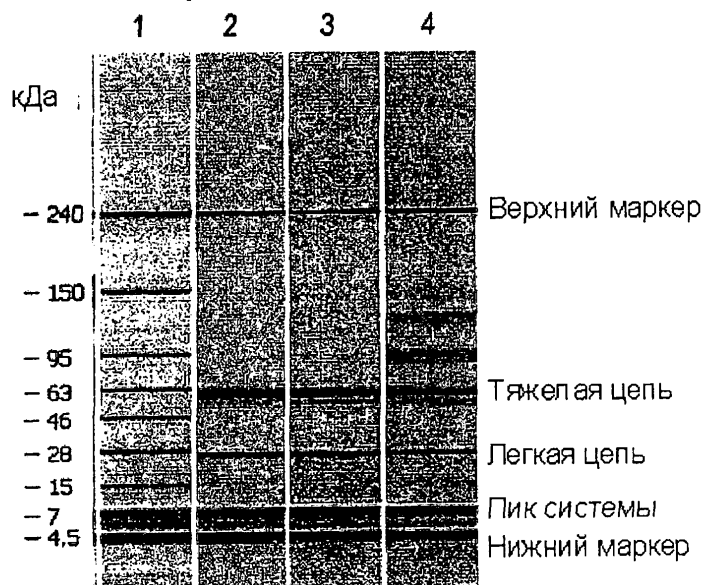
Восстанавливающий SDS-PAGE в восстанавливающих условиях
конъюгата Ат-(SMCC)-DM1,
приготовленного с использованием метода, описанного в этом
изобретении, по сравнению с конъюгатом, приготовленным с
использованием традиционного 2-этапного метода.



15/25

ФИГ. 15А

Белковый LabChip электрофорез конъюгата Антитело-(SMCC)-DM1, приготовленного с использованием метода, описанного в этом изобретении, по сравнению с конъюгатом, приготовленным с использованием традиционного 2-этапного метода



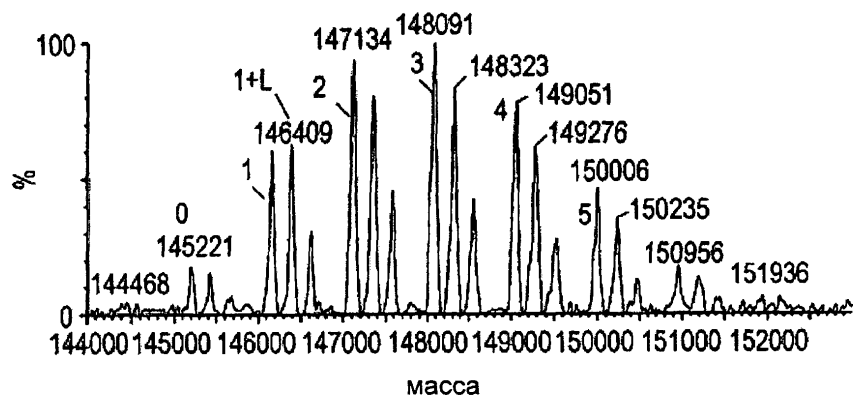
ФИГ. 15В

	Полоса MW (кДа)	% от общей массы белка, внесенного в карман дорожки		
		Ат-SMCC-DM1 Этот способ	Неконъюгировавшее Ат	Ат-SMCC-DM1 2 Этап
Легкая цепь	27	30	30	24
	56	2	2	2
Тяжелая цепь	61	67	68	54
	96	1	-	12
	129	1	-	6
	148	-	-	2

16/25

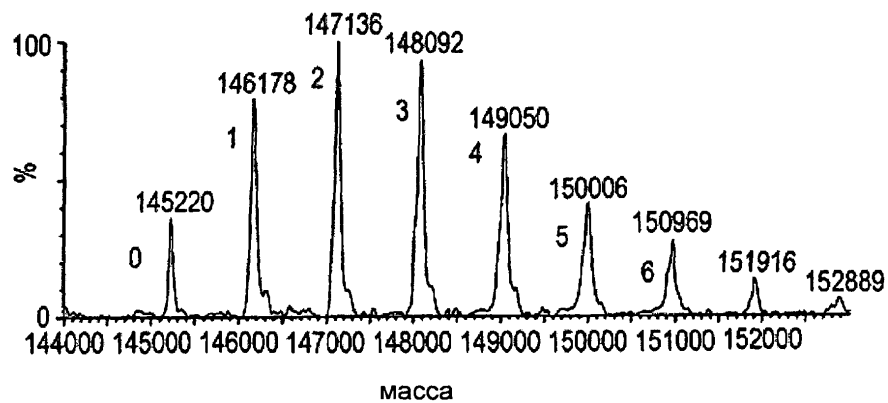
ФИГ. 16А

Конъюгат Ат-SMCC-DM1, 3,1 D/Ат, традиционный двухэтапный метод



ФИГ. 16В

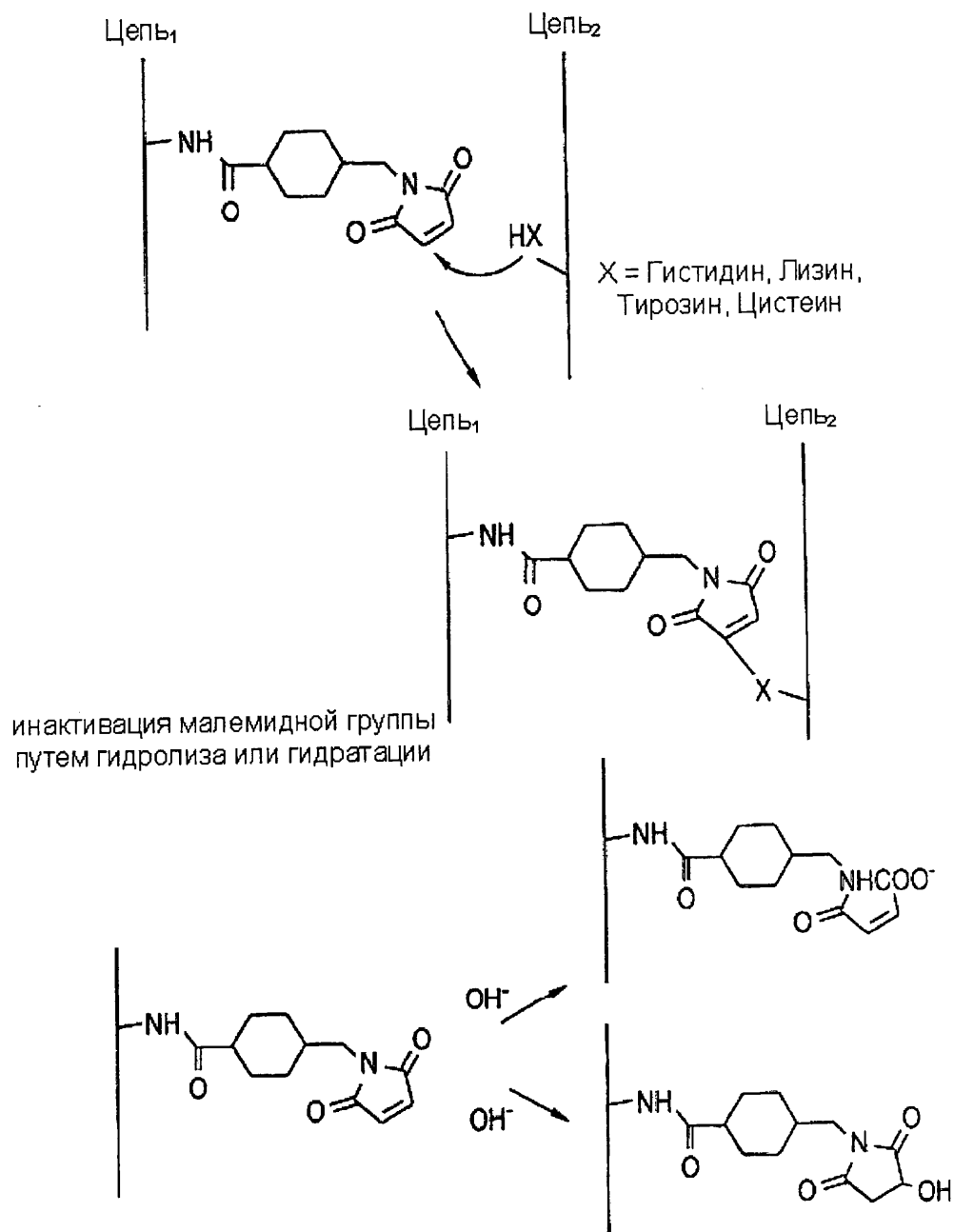
Конъюгат Ат-SMCC-DM1, 3.1 D/Ат, приготовленный с использованием метода, описанного в этом изобретении



17/25

ФИГ. 17

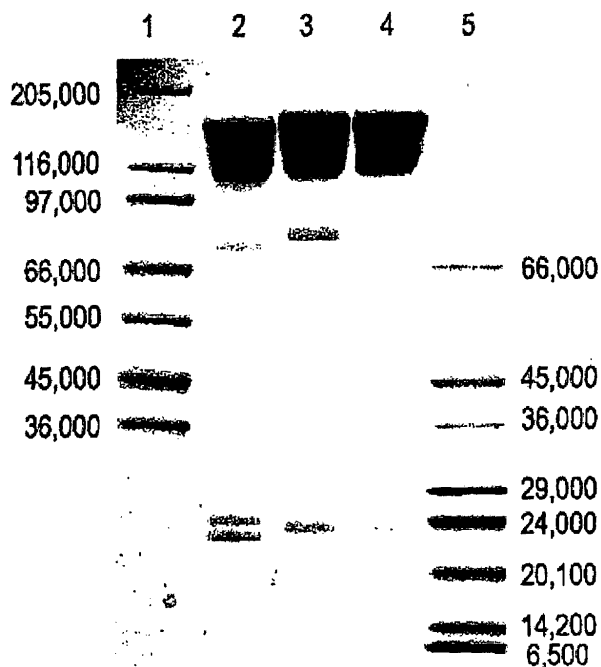
**Предполагаемый механизм для возникновения
межцепочечных поперечных сшивок и
инактивации малеимида во время конъюгации при
традиционном 2-этапном методе**



18/25

ФИГ. 18

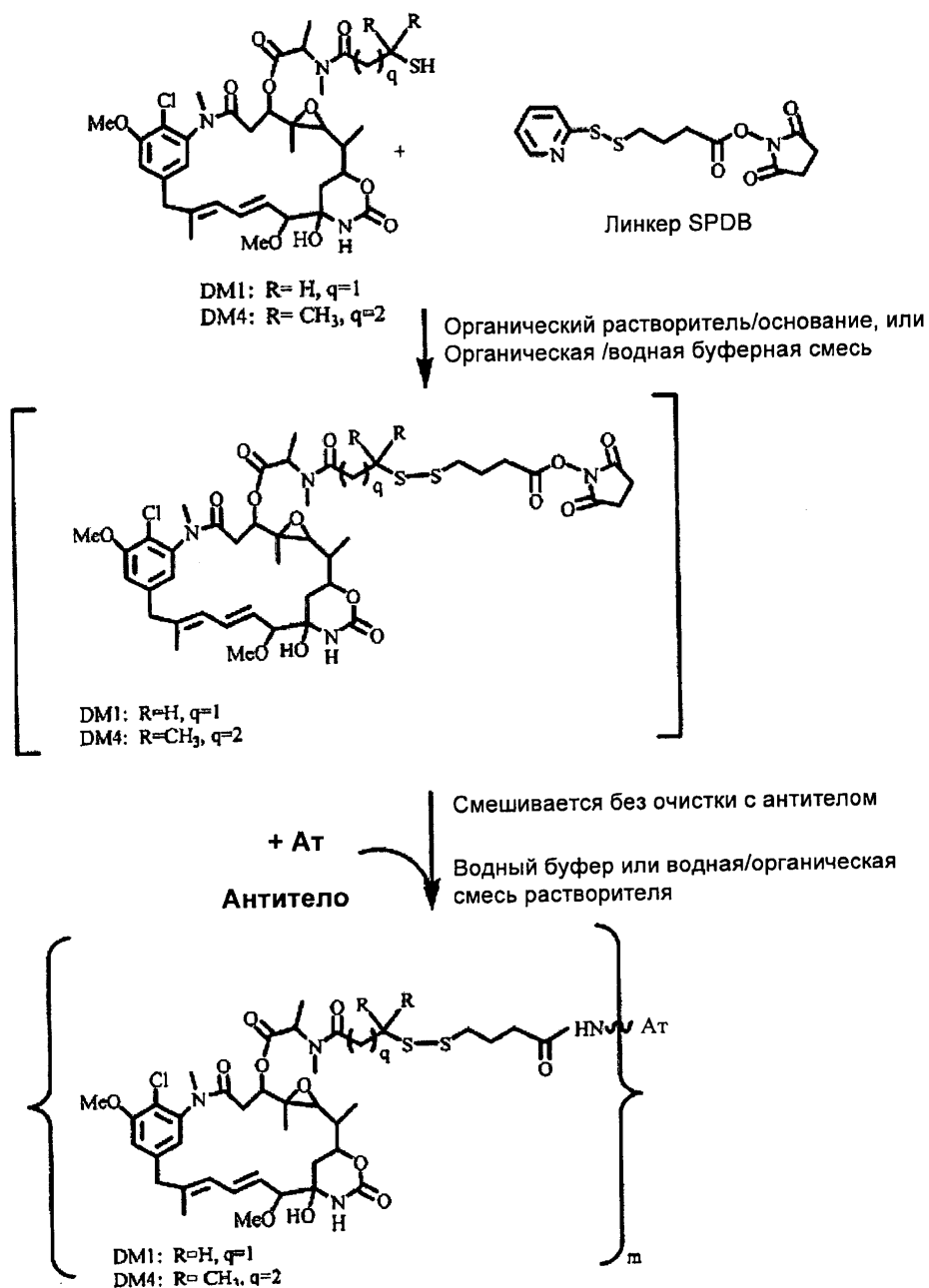
Невосстанавливающий SDS PAGE в невосстанавливающих условиях конъюгата Ат-(Сульфо-Mal)-DM4, приготовленного с использованием метода, описанного в этом исследовании, и погашения свободного DM4 тиола (после первичной реакции связывания DM4 + NHS- Сульфо-Mal гетеробифункциональный реагент) с использованием 4-малеимидомасляной кислоты перед реакцией конъюгации с антителом



19/25

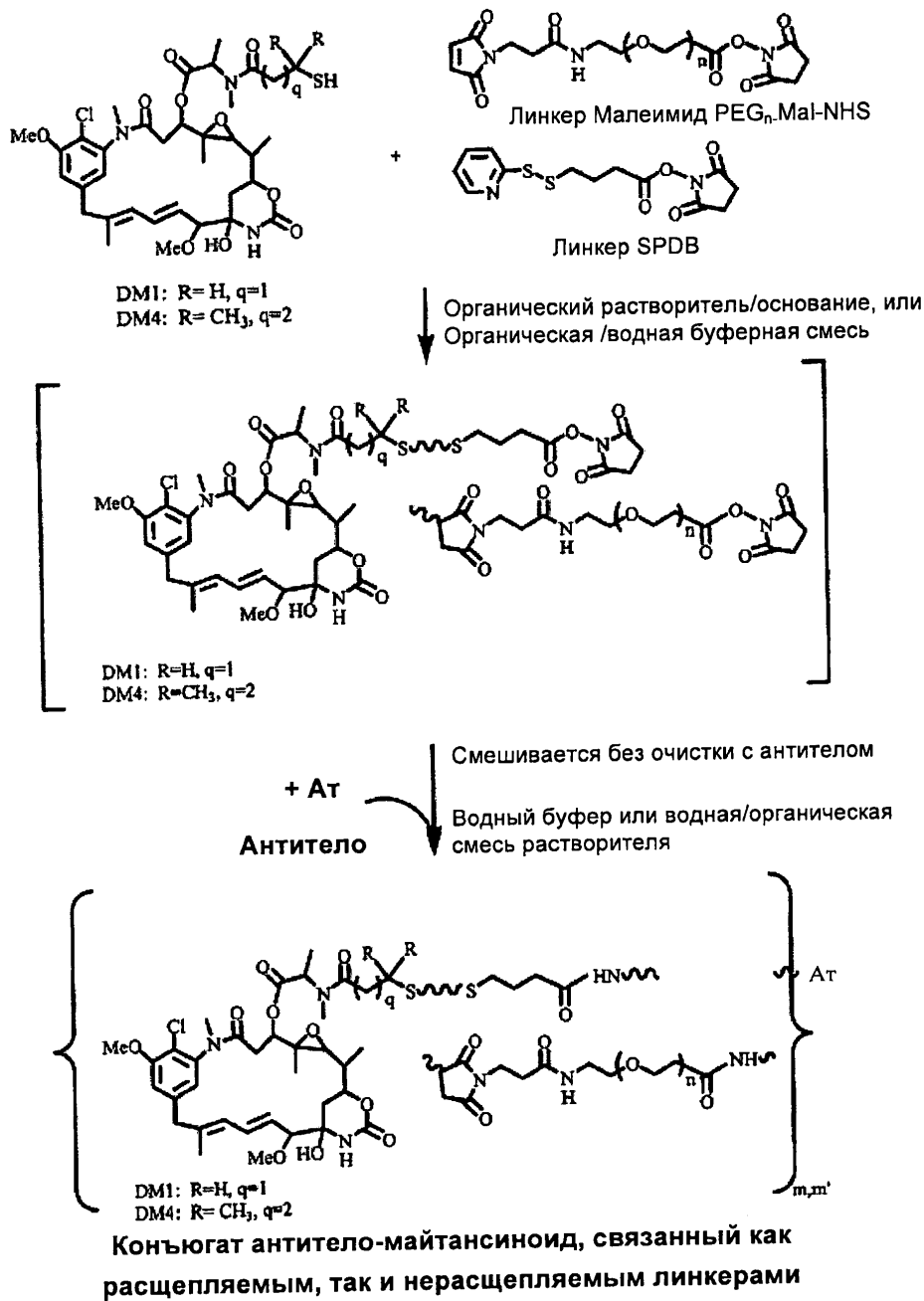
ФИГ. 19

Приготовление дисульфид-связанного конъюгата антитела с использованием реакционной смеси DM1 (или DM4) и SPDB линкера



20/25
ФИГ. 20

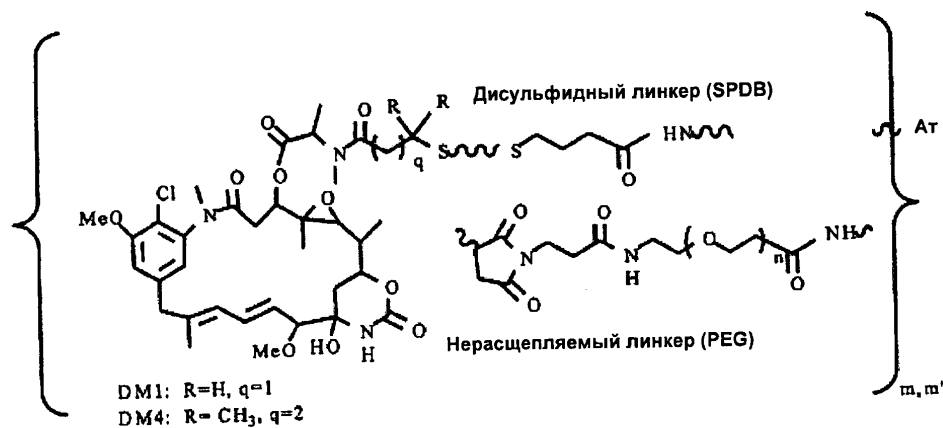
Приготовление конъюгата антитело-майтансиноид как с дисульфидным, так и с нерасщепляемым PEG_n-Mal линкерами путем конъюгации антитела с неочищенной реакционной смесью DM1 (или DM4) и SPDB и NHS-PEG_n-Mal линкерами



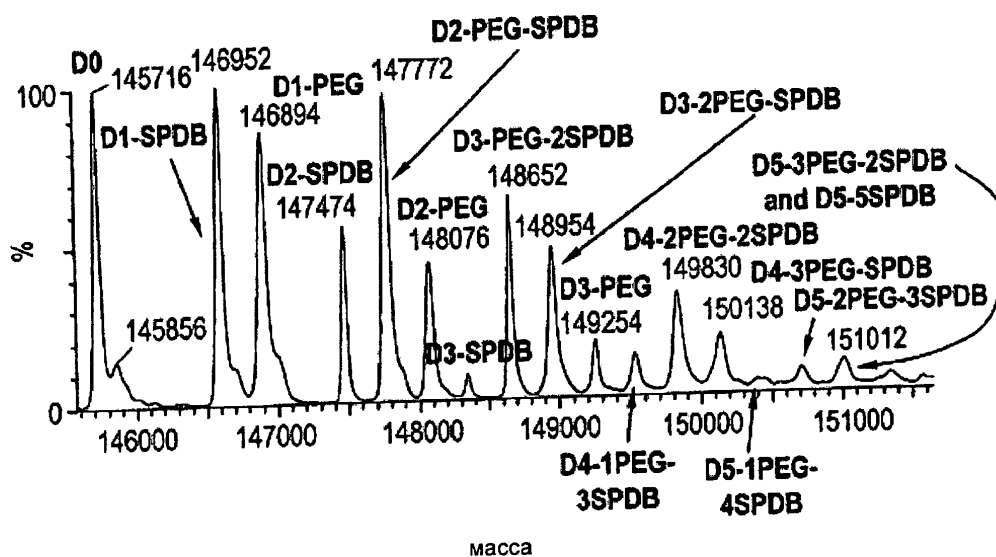
21/25

ФИГ. 21

MS конъюгата антитело-майтансиноид как с дисульфидными, так и с нерасщепляемыми PEG4-Mal линкерами (приготовленный путем конъюгации антитела с неочищенной реакционной смесью DM1 (или DM4) и SPDB и NHS-PEG_n-Mal линкерами). Конъюгат в среднем несет 3.5 молекул мйтансиноида на молекулу антитела



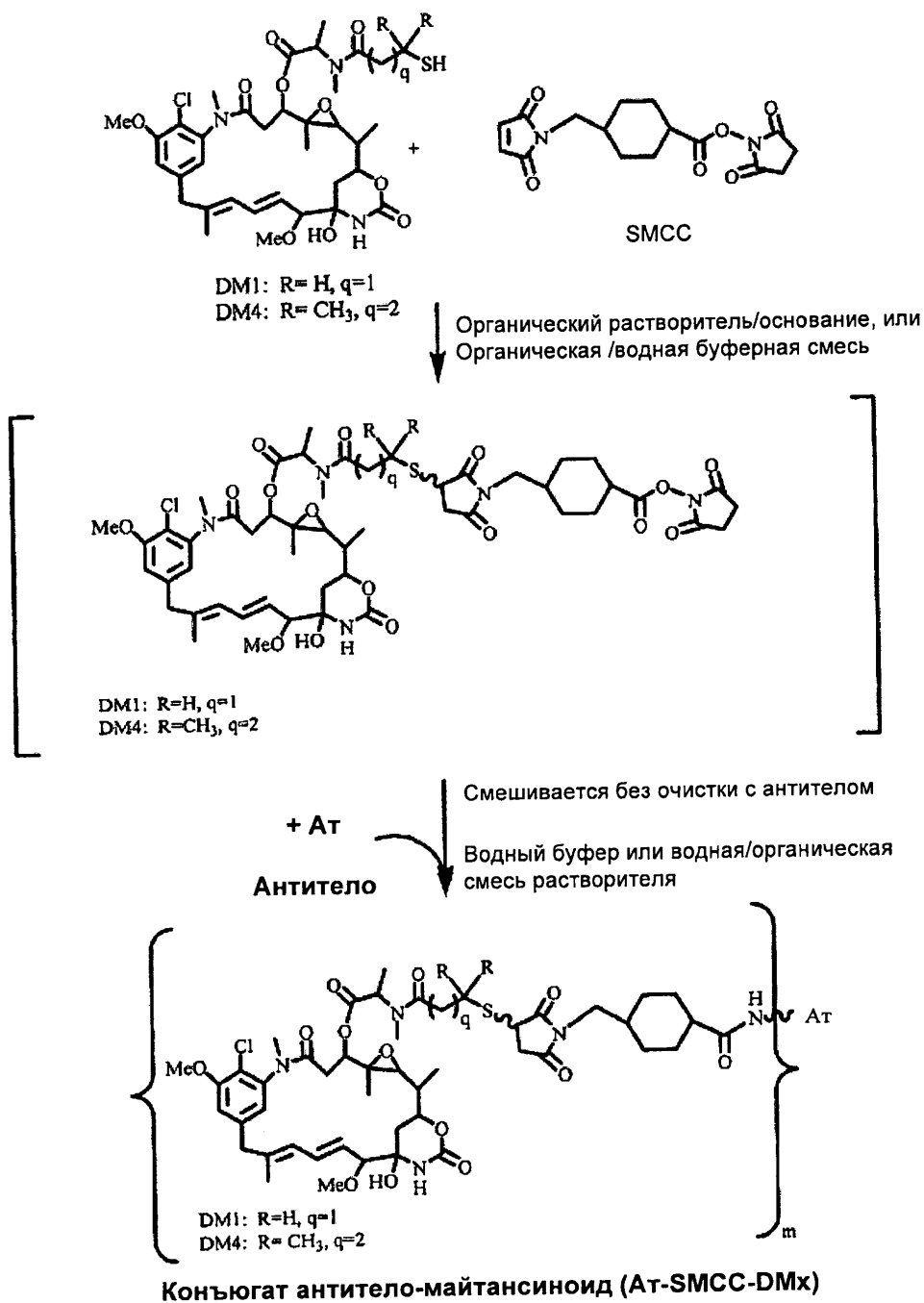
Конъюгат антитело-майтансиноид, связанный как нерасщепляемым, так и расщепляемым линкерами



22/25

ФИГ. 22

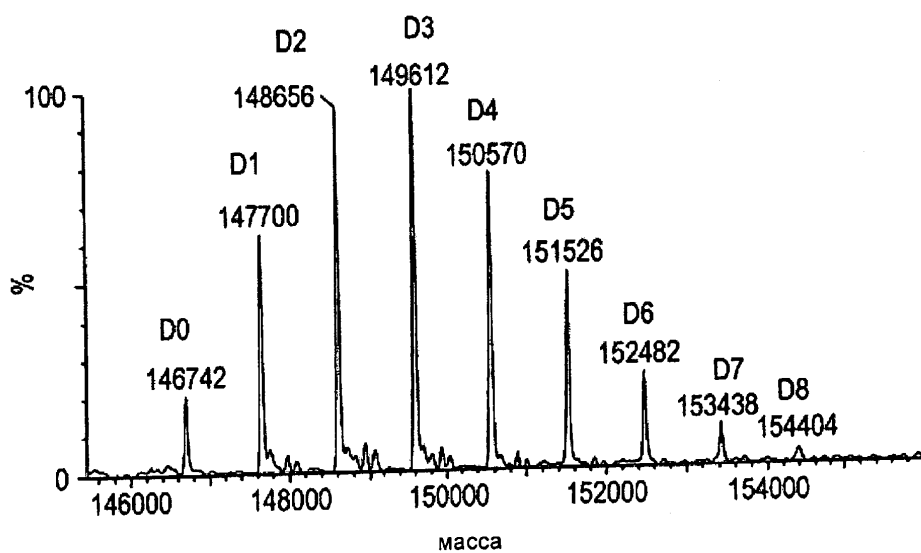
Конъюгация антитела с реакционной смесью DM1 (или DM4) и SMCC линкером



23/25

ФИГ. 23

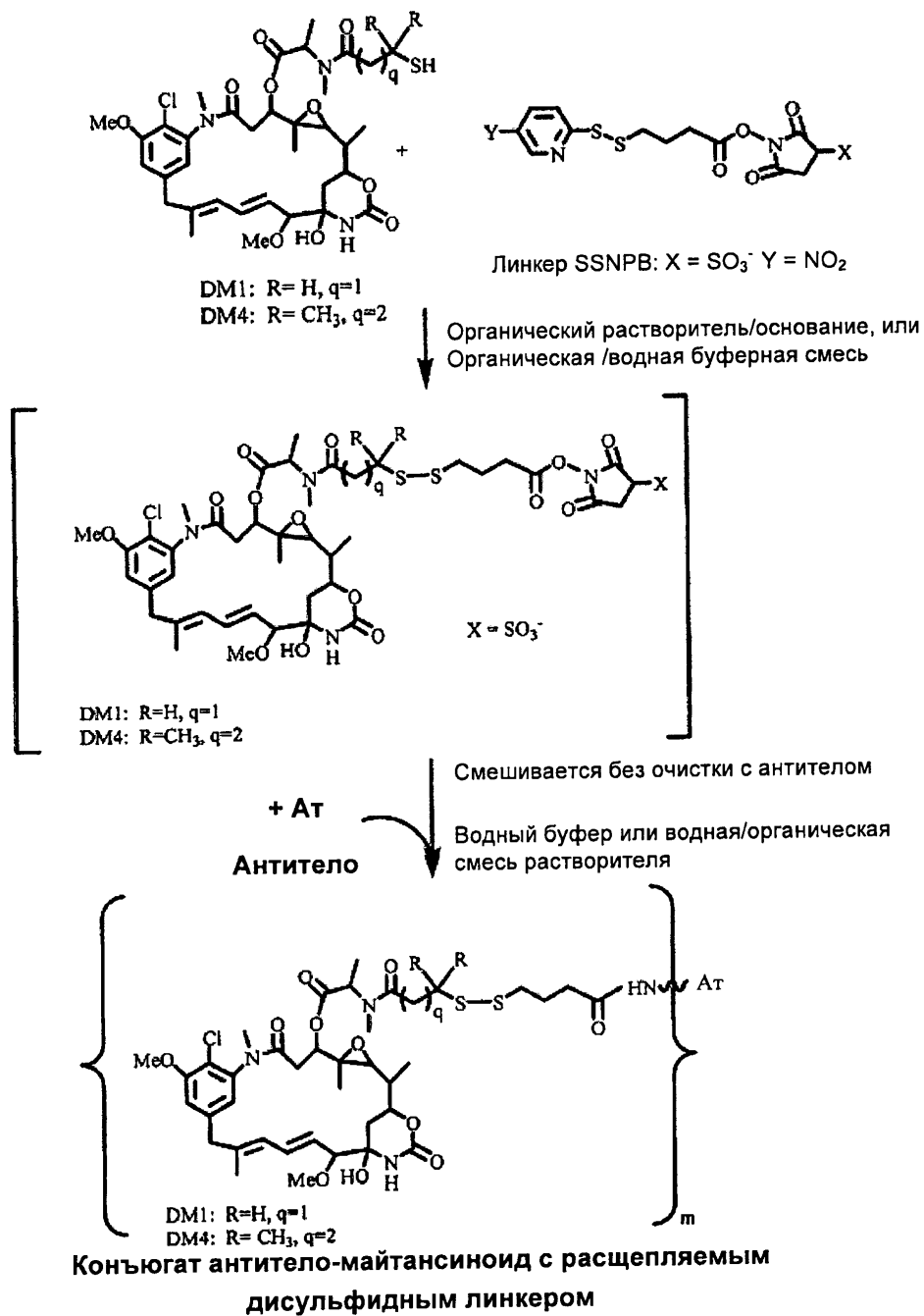
MS конъюгата Антитело-SMCC-DM1, приготовленного с использованием SMCC по методу, описанному в этом изобретении, содержащего в среднем 3,1 DM1 на антитело



24/25

ФИГ. 24

Приготовление дисульфидно-связанного конъюгата антитела с использованием реакционной смеси DM1 (или DM4) и SSNPB



25/25

ФИГ. 25

Конъюгация антитела с реакционной смесью DM1 (или DM4) и
гетеробифункциональным линкером с алифатической линейной
углеродной цепью

