



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ЗАЯВКА НА ИЗОБРЕТЕНИЕ**

(21)(22) Заявка: 2021106673, 17.07.2015

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
24.07.2014 US 62/028,679(62) Номер и дата подачи первоначальной заявки,  
из которой данная заявка выделена:  
2017105428 20.02.2017

(43) Дата публикации заявки: 25.11.2021 Бюл. № 33

Адрес для переписки:

101000, Москва, ул. Мясницкая, 13, стр. 5, ООО  
"Союзпатент", С.Б. Фелициной

(71) Заявитель(и):

**ДЖЕНЕНТЕК, ИНК. (US)**

(72) Автор(ы):

**ФРАНКЛИН, Джейм (US),  
ЛИНЬ, Синь, Синь (US),  
ГОРРЕЛЛ, Джеффри (US),  
ТАЛЛИ, Тимоти (US),  
ХАТЧИНСОН, Мэттью (US),  
БЕКТЭЛ, Черити Такер (US)**(54) **СПОСОБЫ КОНЬЮГАЦИИ АГЕНТА С ТИОЛЬНЫМ КОМПОНЕНТОМ В БЕЛКЕ, КОТОРЫЙ СОДЕРЖИТ ПО МЕНЬШЕЙ МЕРЕ ОДНУ ТРИСУЛЬФИДНУЮ СВЯЗЬ**(57) **Формула изобретения**

1. Способ конъюгации агента к тиольному компоненту в белке, который содержит по меньшей мере одну дисульфидную связь и по меньшей мере одну трисульфидную связь, включающий этапы:

(а) восстановления по меньшей мере одной сульфидной связи в выделенном белке для образования композиции, содержащей реактивный сульфид и восстановленный белок, содержащий по меньшей мере одну тиольную группу;

(b) снижения содержания реактивного сульфида композиции и,

(c) конъюгации агента по меньшей мере с одной тиольной группой восстановленного белка для образования конъюгата белок-агент.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что этап восстановления включает по меньшей мере частичное восстановление по меньшей мере одной сульфидной связи путем приведения выделенного белка в контакт с восстанавливающим агентом.

3. Способ по п. 1, отличающийся тем, что выделенный белок содержит по меньшей мере 4 дисульфидные связи.

4. Способ по п. 1, отличающийся тем, что выделенный белок содержит по меньшей мере 2 трисульфидные связи.

5. Способ по п. 1, отличающийся тем, что перед этапом восстановления от около 1% до около 20% сульфидных связей в выделенном белке являются трисульфидными связями.

6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что перед этапом восстановления от около 5% до около 7% сульфидных связей в выделенном белке являются трисульфидными связями.

7. Способ по п. 1, отличающийся тем, что этап восстановления проводят в

неденатурирующих условиях.

8. Способ по п. 1, отличающийся тем, что восстанавливающий агент представляет собой по меньшей мере один из дитиотреитола (DTT), бета-меркаптоэтанола ( $\beta$ ME), трис(2-карбоксиэтил)фосфина (TCPEP), цистеина, L-цистеина, восстановленного глутатиона (GSH) и L-GSH.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что восстанавливающий агент представляет собой TCPEP.

10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что TCPEP смешивают с выделенным белком с заданным молярным соотношением между TCPEP и выделенным белком.

11. Способ по п. 10, отличающийся тем, что заданное молярное соотношение между TCPEP и выделенным белком включает молярный избыток TCPEP.

12. Способ по п. 1, отличающийся тем, что этап восстановления включает приведение выделенного белка в контакт с химическим восстанавливающим агентом в концентрации от около 0,1 до около 8 мМ.

13. Способ по п. 1, отличающийся тем, что этап восстановления проводят при pH ниже чем pH около 7,0.

14. Способ по п. 13, отличающийся тем, что этап восстановления проводят при pH от около 4,5 до около 6,5.

15. Способ по п. 14, отличающийся тем, что этап восстановления проводят при pH около 5,5.

16. Способ по п. 14, отличающийся тем, что этап восстановления проводят при pH около 6,5.

17. Способ по п. 1, отличающийся тем, что перед этапом восстановления pH выделенного белка доводят до pH от около pH 5,0 до около pH 8,0.

18. Способ по п. 1, отличающийся тем, что происходит восстановление около 100% трисульфидных связей в белке.

19. Способ по п. 1, отличающийся тем, что после этапа восстановления от около 4 до около 8 молей тиольных компонентов доступны для конъюгации с агентом на каждый моль восстановленного выделенного белка.

20. Способ по п. 1, отличающийся тем, что этап снижения включает доведение pH композиции до pH от около 5,0 до около 6,0.

21. Способ по п. 20, отличающийся тем, что pH композиции доводят до pH около 5,5.

22. Способ по п. 1, отличающийся тем, что этап снижения включает удаление жидкой среды из композиции и замещение жидкой среды заместительной жидкой средой.

23. Способ по п. 22, отличающийся тем, что жидкая среда включает буфер.

24. Способ по п. 1, отличающийся тем, что этап снижения включает:

(a) обеспечение ассоциации восстановленного белка в композиции с твердой подложкой; и

(b) замещение по меньшей мере 90% композиции заместительным раствором, в котором отсутствует реактивный сульфид.

25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что твердая подложка включает по меньшей мере один элемент из фильтрующей мембраны, избирательно проницаемой мембраны и хроматографической смолы.

26. Способ по п. 1, отличающийся тем, что этап снижения включает смешивание композиции на этапе восстановления со скоростью, достаточной для восстановления содержащихся в композиции реактивных сульфидов.

27. Способ по п. 26, отличающийся тем, что смешивание включает перемешивание композиции при повышенной скорости, превышающей оптимальную скорость смешивания для восстановления сульфидных связей в выделенном белке.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что смешивание при повышенной скорости включает повышение скорости смешивания на этапе восстановления в течение времени, меньшего, чем полное время реакции для этапа восстановления.

29. Способ по п. 1, отличающийся тем, что этап снижения включает приведение раствора в контакт с источником азота.

30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что источник азота включает газообразный азот.

31. Способ по п. 29, отличающийся тем, что приведение в контакт включает газирование композиции газообразным азотом.

32. Способ по п. 29, отличающийся тем, что приведение в контакт включает барботаж композиции по меньшей мере одним газом из азота, воздуха и аргона.

33. Способ по п. 29, отличающийся тем, что приведение в контакт осуществляют в течение времени от около 1 мин до около 240 мин.

34. Способ по п. 29, отличающийся тем, что приведение в контакт включает барботаж композиции газообразным азотом при скорости от около 10 кубических сантиметров в минуту до около 60 кубических сантиметров в минуту.

35. Способ по п. 29, отличающийся тем, что приведение в контакт включает смешивание композиции в присутствии газообразного азота при скорости, которая по меньшей мере на 200% превышает оптимальную скорость смешивания для этапа восстановления.

36. Способ по п. 29, отличающийся тем, что приведение в контакт осуществляют при рН от около 5,0 до около 8,0.

37. Способ по п. 29, отличающийся тем, что приведение в контакт осуществляют при температуре от около 4°C до около 40°C.

38. Способ по п. 29, отличающийся тем, что приведение в контакт осуществляют при температуре от около 15°C до около 40°C.

39. Способ по п. 29, отличающийся тем, что приведение в контакт осуществляют при температуре около 20°C.

40. Способ по п. 29, отличающийся тем, что приведение в контакт осуществляют при температуре около 30°C.

41. Способ по п. 29, отличающийся тем, что соотношение между площадью поверхности и объемом композиции составляет около 2.

42. Способ по п. 29, отличающийся тем, что приведение в контакт включает подачу газообразного азота по трубкам на стенку реакционного сосуда, содержащего композицию.

43. Способ по п. 29, отличающийся тем, что приведение в контакт включает погружение в композицию барботажного камня, при этом барботажный камень имеет диаметр от около 1 см до около 1 метра.

44. Способ по п. 29, отличающийся тем, что приведение в контакт включает внесение в композицию газообразного азота во время этапа восстановления в течение времени, которое меньше времени проведения этапа восстановления.

45. Способ по п. 29, отличающийся тем, что приведение в контакт осуществляют в закрытом реакционном сосуде.

46. Способ по п. 29, отличающийся тем, что приведение в контакт осуществляют в открытом реакционном сосуде, при этом реактивные сульфиды удаляются из композиции.

47. Способ по п. 29, отличающийся тем, что приведение в контакт включает барботаж сосуда, содержащего композицию, по меньшей мере одним газом из азота, аргона и воздуха.

48. Способ по п. 29, отличающийся тем, что приведение в контакт осуществляют в

присутствии по меньшей мере одного из твина и противоположного агента.

49. Способ по п. 49, отличающийся тем, что твин представляет собой по меньшей мере один из Твин-20 и Твин-80.

50. Способ по п. 49, отличающийся тем, что противоположный агент представляет собой по меньшей мере один из противовспенивателя-А, противовспенивателя-С и полоксамера.

51. Способ по п. 1, отличающийся тем, что выделенный белок представляет собой антитело или фрагмент антитела.

52. Способ по п. 52, отличающийся тем, что фрагмент антитела представляет собой антигенсвязывающий фрагмент.

53. Способ по п. 52, отличающийся тем, что фрагмент антитела представляет собой Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, фрагмент Fv, диатело, одноцепочечное антитело, фрагмент scFv или scFv-Fc.

54. Способ по п. 52, отличающийся тем, что антитело или фрагмент антитела представляет собой антитело IgG.

55. Способ по п. 52, отличающийся тем, что антитело или фрагмент антитела представляет собой человеческое моноклональное антитело.

56. Способ по п. 52, отличающийся тем, что антитело или фрагмент антитела содержит константную область человеческого иммуноглобулина.

57. Способ по п. 52, отличающийся тем, что антитело или фрагмент антитела содержит константную область человеческого IgG.

58. Способ по п. 58, отличающийся тем, что изотипом константной области IgG является IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

59. Способ по п. 59, отличающийся тем, что изотипом константной области IgG является IgG1.

60. Способ по п. 52, отличающийся тем, что сульфидные связи в антителе или фрагменте антитела находятся между тяжелыми и легкими цепями антитела или между тяжелыми цепями антитела, или как между тяжелыми и легкими цепями антитела, так и между тяжелыми цепями антитела.

61. Способ по п. 52, отличающийся тем, что антитело или фрагмент антитела содержит константный домен легкой цепи.

62. Способ по п. 62, отличающийся тем, что константный домен легкой цепи представляет собой константный домен каппа.

63. Способ по п. 52, отличающийся тем, что антитело представляет собой моноклональное антитело IgG1, которое содержит 4 межцепевые сульфидные связи, включающие две сульфидные связи в шарнирной области, соединяющие тяжелые цепи, и одну сульфидную связь между каждой легкой цепью и тяжелой цепью.

64. Способ по п. 1, отличающийся тем, что выделенный белок представляет собой антитело, а этап восстановления приводит к восстановлению только межцепевых дисульфидных связей, но не внутрицепевых связей.

65. Способ по п. 1, отличающийся тем, что агент представляет собой по меньшей мере один терапевтический агент, выбранный из химиотерапевтического агента, нуклеиновой кислоты, цитокина, иммуносупрессанта, радиоизотопа, антибиотика и терапевтического антитела.

66. Способ по п. 66, отличающийся тем, что терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент.

67. Способ по п. 67, отличающийся тем, что химиотерапевтический агент представляет собой по меньшей мере один антитубулиновый агент, выбранный из ауристинина, алкалоида барвинка, подофиллотоксина, таксана, производного баккатина, криптофизина, майтанзиноида, комбретастина и доластатина.

68. Способ по п. 67, отличающийся тем, что химиотерапевтический агент представляет собой по меньшей мере один из ауристатина, агента, связывающегося с малой бороздкой ДНК, агента, алкилирующего малую бороздку ДНК, энедиина, лекситропсина, дуокармицина, таксана, пуромицина, доластатина, майтанзиноида и алкалоида барвинка.

69. Способ по п. 69, отличающийся тем, что химиотерапевтический агент представляет собой доластатин.

70. Способ по п. 70, отличающийся тем, что доластатин представляет собой ауристатин.

71. Способ по п. 71, отличающийся тем, что ауристатин представляет собой MMAE или MMAF.

72. Способ по п. 1, отличающийся тем, что агент содержит линкерный компонент, приспособленный для связывания по меньшей мере одной тиольной группы восстановленного белка с агентом.

73. Способ по п. 74, отличающийся тем, что линкерный компонент представляет собой расщепляемый линкер.

74. Способ по п. 74, отличающийся тем, что линкерный компонент представляет собой нерасщепляемый линкер.

75. Способ по п. 74, отличающийся тем, что линкерный компонент представляет собой линкер, восприимчивый к расщеплению во внутриклеточных условиях.

76. Способ по п. 74, отличающийся тем, что линкерный компонент представляет собой пептидный линкер, расщепляемый внутриклеточной протеазой.

77. Способ по п. 74, отличающийся тем, что внутриклеточная протеаза представляет собой лизосомную протеазу или эндосомную протеазу.

78. Способ по п. 74, отличающийся тем, что линкерный компонент представляет собой дипептидный линкер.

79. Способ по п. 79, отличающийся тем, что дипептидный линкер представляет собой валин-цитруллиновый (val-cit) или фенилаланин-лизиновый (phe-lys) линкер.

80. Способ по п. 79, отличающийся тем, что дипептидный линкер представляет собой малеимидную функциональную группу, которая реагирует со свободными тиолами с образованием ковалентной связи.

81. Способ по п. 1, отличающийся тем, что конъюгат белок-агент представляет собой один из aCD22-val-cit-MMAE, aCD22-val-cit-MMAF, aLy6E-val-cit-MMAE, aLy6E-val-cit-MMAF, aCD79b-val-cit-MMAE, aCD79b-val-cit-MMAF, aNaPi2b-val-cit-MMAE, aNaPi2b-val-cit-MMAF, aMUC16-val-cit-MMAE, aMUC16-val-cit-MMAF, sSTEAP1 и aETBR.

82. Способ преобразования трисульфидных связей в дисульфидные связи в выделенном антителе, включающий этапы:

(а) восстановления по меньшей мере одного выделенного антитела, содержащего по меньшей мере одну трисульфидную связь, в растворе с помощью ТСЕР при pH от около pH 5,0 до около pH 8;

(b) приведения раствора в контакт с газообразным азотом; и

(с) конъюгации ауристатина или его производного с восстановленным антителом для образования конъюгата антитело-лекарственный препарат (ADC).

83. Способ по п. 83, отличающийся тем, что этап восстановления включает приведение выделенного белка в контакт с химическим восстанавливающим агентом в концентрации от около 0,5 до около 8 мМ.

84. Способ по п. 83, отличающийся тем, что молярное соотношение между ТСЕР и выделенным белком составляет около 3:1.

85. Способ по п. 83, отличающийся тем, что приведение в контакт включает газирование композиции газообразным азотом.

86. Способ по п. 83, отличающийся тем, что приведение в контакт осуществляют в

течение по меньшей мере около 30 минут.

87. Способ по п. 83, отличающийся тем, что приведение в контакт включает барботаж композиции газообразным азотом при скорости около 50 кубических сантиметров в минуту.

88. Способ по п. 83, отличающийся тем, что приведение в контакт включает смешивание композиции в присутствии газообразного азота при скорости, которая на около 300% превышает оптимальную скорость смешивания для этапа восстановления.

89. Способ по п. 83, отличающийся тем, что приведение в контакт осуществляют при рН от около 5,5 до около 7,5.

90. Способ по п. 83, отличающийся тем, что приведение в контакт осуществляют при температуре от около 20°C до около 30°C.

91. Способ по п. 83, отличающийся тем, что соотношение между площадью поверхности и объемом композиции составляет около 2.

92. Способ по п. 83, отличающийся тем, что приведение в контакт включает подачу газообразного азота по трубкам на стенку реакционного сосуда, содержащего композицию.

93. Способ по п. 83, отличающийся тем, что приведение в контакт включает погружение в композицию барботажного камня.

94. Способ по п. 83, отличающийся тем, что приведение в контакт включает внесение газообразного азота в композицию в течение около 30 мин.

95. Способ по п. 83, отличающийся тем, что приведение в контакт осуществляют в закрытом реакционном сосуде.

96. Способ по п. 83, отличающийся тем, что приведение в контакт осуществляют в открытом реакционном сосуде, при этом сульфид водорода удаляется из композиции.

97. Способ по п. 83, отличающийся тем, что приведение в контакт включает барботаж сосуда, содержащего композицию, газообразным азотом.

98. Способ по п. 83, отличающийся тем, что приведение в контакт осуществляют в присутствии по меньшей мере одного из твина и противопенного агента.

99. Способ по п. 99, отличающийся тем, что твин представляет собой по меньшей мере один из Твин-20 и Твин-80.

100. Способ по п. 99, отличающийся тем, что противопенный агент представляет собой по меньшей мере один из противовспенивателя-А, противовспенивателя-С и поллоксамера.

101. Способ по п. 83, отличающийся тем, что антитело представляет собой фрагмент антитела.

102. Способ по п. 102, отличающийся тем, что фрагмент антитела представляет собой антигенсвязывающий фрагмент.

103. Способ по п. 103, отличающийся тем, что фрагмент антитела представляет собой Fab, Fab', F(ab)<sub>2</sub>, фрагмент Fv, диатело, одноцепочечное антитело, фрагмент scFv или scFv-Fc.

104. Способ по п. 83, отличающийся тем, что антитело представляет собой антитело IgG.

105. Способ по п. 83, отличающийся тем, что антитело представляет собой человеческое моноклональное антитело.

106. Способ по п. 83, отличающийся тем, что антитело содержит константную область человеческого иммуноглобулина.

107. Способ по п. 83, отличающийся тем, что антитело содержит константную область человеческого IgG.

108. Способ по п. 108, отличающийся тем, что изотипом константной области IgG является IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

109. Способ по п. 109, отличающийся тем, что изотипом константной области IgG является IgG1.

110. Способ по п. 83, отличающийся тем, что сульфидные связи в антителе находятся между тяжелыми и легкими цепями антитела или между тяжелыми цепями антитела, или как между тяжелыми и легкими цепями антитела, так и между тяжелыми цепями антитела.

111. Способ по п. 83, отличающийся тем, что антитело содержит константный домен легкой цепи.

112. Способ по п. 112, отличающийся тем, что константный домен легкой цепи представляет собой константный домен каппа.

113. Способ по п. 83, отличающийся тем, что антитело представляет собой моноклональное антитело IgG1, которое содержит 4 межцепевые сульфидные связи, включающие две сульфидные связи в шарнирной области, соединяющие тяжелые цепи, и одну сульфидную связь между каждой легкой цепью и тяжелой цепью.

114. Способ по п. 83, отличающийся тем, что на этапе восстановления происходит восстановление только межцепевых дисульфидных связей, но не внутрицепевых связей.

115. Способ по п. 83, отличающийся тем, что ауристин представляет собой MMAE или MMAF.

116. Способ по п. 83, отличающийся тем, что терапевтический агент содержит линкерный компонент, приспособленный для связывания по меньшей мере одной тиольной группы антитела с терапевтическим агентом.

117. Способ по п. 117, отличающийся тем, что линкерный компонент представляет собой расщепляемый линкер.

118. Способ по п. 117, отличающийся тем, что линкерный компонент представляет собой нерасщепляемый линкер.

119. Способ по п. 117, отличающийся тем, что линкерный компонент представляет собой линкер, восприимчивый к расщеплению во внутриклеточных условиях.

120. Способ по п. 117, отличающийся тем, что линкерный компонент представляет собой пептидный линкер, расщепляемый внутриклеточной протеазой.

121. Способ по п. 121, отличающийся тем, что внутриклеточная протеаза представляет собой лизосомную протеазу или эндосомную протеазу.

122. Способ по п. 117, отличающийся тем, что линкерный компонент представляет собой дипептидный линкер.

123. Способ по п. 123, отличающийся тем, что дипептидный линкер представляет собой валин-цитруллиновый (val-cit) или фенилаланин-лизиновый (phe-lys) линкер.

124. Способ по п. 123, отличающийся тем, что дипептидный линкер представляет собой малеимидную функциональную группу, которая реагирует со свободными тиолами с образованием ковалентной связи.

125. Способ по п. 83, отличающийся тем, что димер ауристинина или его производного образуется на этапе конъюгации, а способ дополнительно включает отделение ADC от димера для образования очищенного ADC.

126. Способ по п. 83, отличающийся тем, что конъюгат антитело-терапевтический агент представляет собой один из aCD22-val-cit-MMAE, aCD22-val-cit-MMAF, aLy6E-val-cit-MMAE, aLy6E-val-cit-MMAF, aCD79b-val-cit-MMAE, aCD79b-val-cit-MMAF, aNaPi2b-val-cit-MMAE, aNaPi2b-val-cit-MMAF, aMUC16-val-cit-MMAE, a MUC16-val-cit-MMAF, sSTEAP1 и aETBR.