



(51) МПК
A61K 47/68 (2017.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 47/68 (2021.08); *C07K 16/28* (2021.08); *A61P 35/00* (2021.08)

(21)(22) Заявка: 2019113758, 30.09.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
30.09.2017

Дата регистрации:
21.12.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
08.10.2016 CN 201610876568.9

(43) Дата публикации заявки: 09.11.2020 Бюл. № 31

(45) Опубликовано: 21.12.2021 Бюл. № 36

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 08.05.2019

(86) Заявка РСТ:
CN 2017/104706 (30.09.2017)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2018/064964 (12.04.2018)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЧЖУ, И (CN),
 ВАН, Иси (CN),
 ЧЖО, Ши (CN),
 ЛИ, Цзе (CN),
 ЧЭНЬ, Лань (CN),
 ВАНЬ, Вэйли (CN),
 ЮЙ, Юнго (CN)

(73) Патентообладатель(и):

СЫЧУАНЬ БАЙЛИ ФАРМ КО., ЛТД. (CN)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2015/157595 A1, 15.10.2015. RU
2557319 C2, 20.07.2015. RU 2553566 C2,
20.06.2015. US 2016067351 A1, 10.03.2016. WO
2016131769 A2, 25.08.2016. RU 2580038 C2,
10.04.2016.

(54) КОНЬЮГАТ "ЦИСТЕИН-МОДИФИЦИРОВАННОЕ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ
СРЕДСТВО" И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к конъюгату «цистеин-модифицированное антитело-лекарственное средство» с участками встраивания цистеина в положение 205 и/или положение 206 (система нумерации по Kabat) легкой цепи антитела и/или положение 439 (система нумерации по Kabat) тяжелой цепи. Встраивая цистеин (C) в тяжелую цепь и/или легкую цепь целевого антитела в конкретный участок встраивания и осуществляя

сайт-специфическую конъюгацию с помощью свободной тиоловой группы (-SH) сайт-специфически встроенного цистеина и линкера, конъюгированного с высокоактивным низкомолекулярным цитотоксином, получают конъюгат «цистеин-модифицированное антитело-лекарственное средство» с хорошей гомогенностью. 2 н. и 7 з.п. ф-лы, 28 ил., 5 табл., 32 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 47/68 (2017.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

A61K 47/68 (2021.08); C07K 16/28 (2021.08); A61P 35/00 (2021.08)(21)(22) Application: **2019113758, 30.09.2017**(24) Effective date for property rights:
30.09.2017Registration date:
21.12.2021

Priority:

(30) Convention priority:
08.10.2016 CN 201610876568.9(43) Application published: **09.11.2020 Bull. № 31**(45) Date of publication: **21.12.2021 Bull. № 36**(85) Commencement of national phase: **08.05.2019**(86) PCT application:
CN 2017/104706 (30.09.2017)(87) PCT publication:
WO 2018/064964 (12.04.2018)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**ZHU, Yi (CN),
WANG, Yixi (CN),
ZHUO, Shi (CN),
LI, Jie (CN),
CHEN, Lan (CN),
WAN, Weili (CN),
YU, Yongguo (CN)**

(73) Proprietor(s):

SICHUAN BAILI PHARM CO., LTD. (CN)**(54) "CYSTEINE-MODIFIED ANTIBODY-DRUG" CONJUGATE AND ITS PRODUCTION METHOD**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to a "cysteine-modified antibody-drug" conjugate with sites of cysteine embedding in a position 205 and/or a position 206 (Kabat numbering system) of an antibody light chain and/or a position 439 (Kabat numbering system) of a heavy chain. A "cysteine-modified antibody-drug" conjugate with good homogeneity is obtained by embedding cysteine (C) in the heavy chain and/or the

light chain of the target antibody in the specific embedding site and performing site-specific conjugation using a free thiol group (-SH) of site-specific embedded cysteine and a linker conjugated with highly active low-molecular cytotoxin.

EFFECT: obtaining "cysteine-modified antibody-drug" conjugates.

9 cl, 28 dwg, 5 tbl, 32 ex

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Настоящая заявка представляет собой заявку на национальном этапе по международной заявке № PCT/CN2017/104706, поданной 30 сентября 2017 года, по которой испрашивают приоритетное преимущество по патентной заявке Китая № 201610876568.9, поданной 8 октября 2016 года, полное описание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к терапевтическим соединениям и способам их получения, и, в частности, к конъюгатам «цистеин-модифицированное антитело-цитотоксин» и способам их получения.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Конъюгаты «антитело-лекарственное средство» (ADC) представляют большой интерес в области таргетной терапии. Два лекарственных средства, адцетрис и кадсила, одобрены для продажи в США и продемонстрировали хорошую клиническую эффективность. Более 50 лекарственных средств на основе ADC проходят стадию клинических испытаний.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к конъюгатам «цистеин-модифицированное антитело-цитотоксин» (TDC), способам получения конъюгатов «антитело-цитотоксин» и способам их применения.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к конъюгатам «цистеин-модифицированное антитело-цитотоксин». В одном из вариантов осуществления участок встраивания цистеина включает один или более из следующих трех участков встраивания или положений встраивания в целевых антителах: положение 205 легкой цепи (система нумерации по Kabat, где окружающая аминокислотная последовательность содержит GLSSPCVTKSF, при этом C представляет собой встроенный цистеин), положение 206 легкой цепи (система нумерации по Kabat, где окружающая аминокислотная последовательность содержит GLSSPVCTKSF, при этом C представляет собой встроенный цистеин) и положение 439 тяжелой цепи (система нумерации по Kabat, где окружающая аминокислотная последовательность содержит YTQKSLCCLSPGK, при этом C представляет собой встроенный цистеин).

Антитело, содержащее одну или более из указанных выше мутаций с инсерцией цистеина, сохраняет способность к связыванию с антигеном, присущую родительскому антителу (аффинность). В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к сайт-специфическому соединению конъюгата «антитело-цитотоксин» (TDC) по тиоловой группе цистеина с использованием конъюгата «линкер-лекарственное средство» (т.е. линкер-цитотоксин), где тиоловая группа принадлежит цистеину, встроенному в положение 205 или/и положение 206 легкой цепи или/и положение 439 тяжелой цепи.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к конъюгату «цистеин-модифицированное антитело-цитотоксин», содержащему антитело, включающее сайт-специфически встроенный цистеин, где участок встраивания цистеина содержит один или более участков, выбранных из следующих трех участков встраивания: положение 205 константной области каппа/лямбда-легкой цепи (система нумерации по Kabat), положение 206 константной области каппа/лямбда-легкой цепи (система нумерации по Kabat) или положение 439 константной области тяжелой цепи антитела IgG (система нумерации по Kabat).

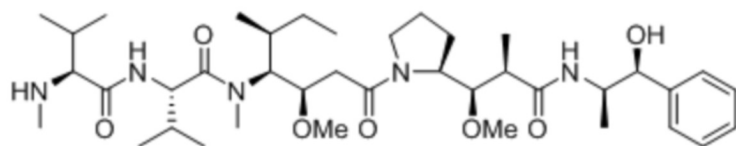
Аминокислотная последовательность, окружающая участок встраивания цистеина,

включает одну или более из следующих трех последовательностей: LC-205ins: GLSSPCVTKS; LC-206ins: GLSSPVCTKSF или HC-439ins: TQKSLSCLSPGK.

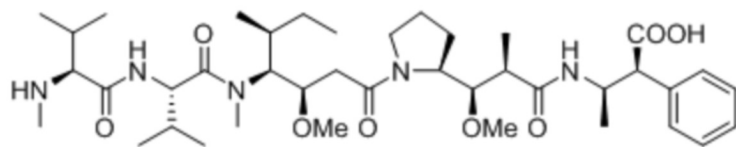
В одном из вариантов осуществления высокоактивный цитотоксин конъюгируют с помощью линкера со свободной тиоловой группой из модифицированного цистеина, встроенного в конкретные участки встраивания цистеина антитела, где легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность GLSSPCVTKSF или GLSSPVCTKSF, и тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность TQKSLSCLSPGK, и где С является цистеином, встроенным в положение 205 легкой цепи, положение 206 легкой цепи или положение 439 тяжелой цепи антитела.

В одном из вариантов осуществления легкая цепь антитела имеет изотип каппа (κ) или лямбда (λ). В одном из вариантов осуществления тяжелая цепь антитела имеет изотип IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В одном из вариантов осуществления встроенный цистеин содержит тиоловую группу (-SH). В одном из вариантов осуществления тиоловая группа (-SH) способна к химической конъюгации.

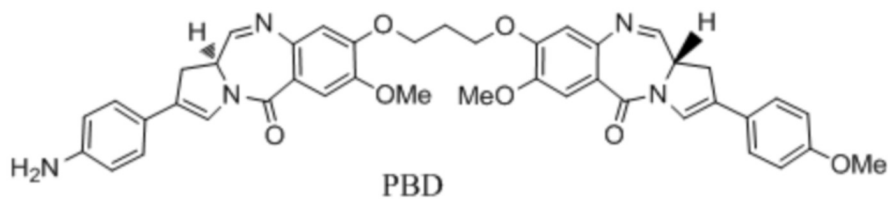
В одном из вариантов осуществления низкомолекулярный, высокоактивный цитотоксин сайт-специфически соединяют со свободной тиоловой группой встроенного цистеина с помощью линкера; низкомолекулярный высокоактивный цитотоксин может включать, в качестве неограничивающих примеров, MMAE, MMAF, PBD, SN-38, Dox и их производные. Формулы примеров цитотоксинов, MMAE, MMAF, PBD, SN-38, Dox, представлены ниже:



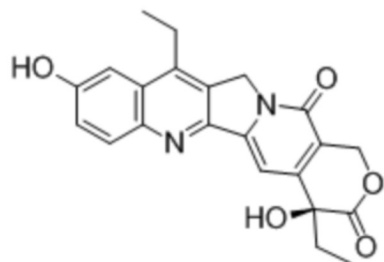
MMAE



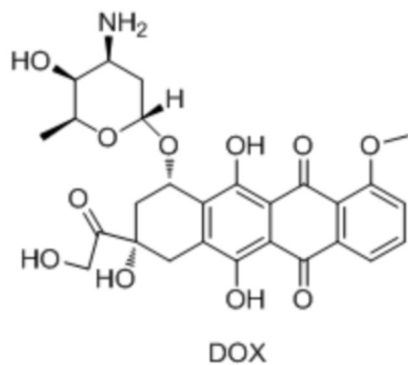
MMAF



PBD



SN-38



15 В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к способам получения конъюгатов «цистеин-модифицированное антитело-цитотоксин». В одном из вариантов осуществления способ включает стадии: восстановления антитела с помощью восстановителя (такого как DTT, ТСЕР и т.п.) для получения восстановленного антитела, удаления защитной группы из встроенного цистеина антитела для получения свободной тиоловой группы; удаления восстановителя и защитной группы посредством катионообменной хроматографии или ультрафильтрации; окисления восстановленного антитела с помощью окислителя (такого как ДНАА, CuSO_4) для повторного образования межцепочечных дисульфидных связей антитела; добавления конъюгата «линкер-лекарственное средство» (т.е. линкер-цитотоксин) для конъюгации со свободной тиоловой группой модифицированного цистеина и удаления неконъюгированного конъюгата «линкер-лекарственное средство» посредством катионообменной хроматографии или ультрафильтрации.

Список аминокислот:

25

Название	Символ и аббревиатура
Аланин	A и Ala
Аргинин	R и Arg
Аспарагин	N и Asn
Аспарагиновая кислота	D и Asp
30 Цистеин	C и Cys
Глутамин	Q и Gln
Глутаминовая кислота	E и Glu
Глицин	G и Gly
Гистидин	H и His
Изолейцин	I и Ile
35 Лейцин	L и Leu
Лизин	K и Lys
Метионин	M и Met
Фенилаланин	F и Phe
Пролин	P и Pro
Серин	S и Ser
40 Треонин	T и Thr
Триптофан	W и Trp
Тирозин	Y и Tyr
Валин	V и Val

45 SEQ ID NO: 6 Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи (каппа)LC-Cys205_{in}sc

>LC-Cys205_{in}sc-каппа

TVAAPS^VFIFPPSDEQLKSGTASV^VCLLNNFY^PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSK^DSTY^SLS^STL^TLSKADY^EKHK^VYACEV^THQGL^SSP^CVTK^SFN^RGEC

где **C** в GLSSPVCTKSFN является положением сайт-специфической конъюгации. В одном из вариантов осуществления цистеин сайт-специфически конъюгируют с mc-vc-PAВ-нагрузкой.

SEQ ID NO: 8 Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи (каппа) LC-Cys206insc

>LC-Cys206ins-каппа

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVCTKSFNRGEC

где **C** в GLSSPVCTKSFN является положением сайт-специфической конъюгации. В одном из вариантов осуществления цистеин сайт-специфически конъюгируют с mc-vc-PAВ-нагрузкой.

SEQ ID NO: 10 Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи (Fc) IgG1-Fc-Cys439ins

>IgG1-Fc-Cys439ins

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTEPAAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYIT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

где **C** в TQKSLSLSPGK является положением сайт-специфической конъюгации. В одном из вариантов осуществления цистеин сайт-специфически конъюгируют с mc-vc-PAВ-нагрузка.

SEQ ID NO: 12 Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи (каппа) LC-V205C

>LC-V205C-Каппа

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPCTKSFNRGEC

где **C** в GLSSPCTKSFN является положением сайт-специфической конъюгации. В одном из вариантов осуществления цистеин сайт-специфически конъюгируют с mc-vc-PAВ-нагрузкой.

В настоящем описании представлен новый конъюгат «цистеин-модифицированное антитело-цитотоксин» (TDC), который обладает значительными преимуществами по сравнению с не-сайт-специфически конъюгированным ADC, включая, в качестве неограничивающих примеров, хорошую гомогенность и низкую частоту побочных эффектов. Доклинические исследования подтверждали, что эти новые конъюгаты антител значительно превосходят не-сайт-специфически конъюгированные ADC.

Цели и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из следующего подробного описания предпочтительных вариантов осуществления и сопутствующих чертежей.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Изложенные выше и другие признаки настоящего изобретения будут более очевидными из следующего описания и формулы изобретения вместе с сопутствующими чертежами. На представленных чертежах изображены лишь некоторые варианты осуществления, приведенные в соответствии с описанием, и, таким образом, не следует истолковывать их как ограничение объема настоящего изобретения, изобретение будет описано более подробно с помощью сопутствующих чертежей, на которых:

Фигура 1 является иллюстрацией, на которой показаны результаты теста по детекции

и измерению 2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAВ-ММАЕby способом НИС-ВЭЖХ, как описано в примере 25;

5 Фигура 2 является иллюстрацией, на которой показаны результаты теста по детекции и измерению 2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ способом НИС-ВЭЖХ, как описано в примере 25;

Фигура 3 является иллюстрацией, на которой показаны результаты теста по детекции и измерению 2A1-НС-Cys439ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ способом НИС-ВЭЖХ, как описано в примере 25;

10 Фигура 4 является иллюстрацией, на которой показаны результаты теста по детекции и измерению 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ способом НИС-ВЭЖХ, как описано в примере 25;

Фигура 5 является иллюстрацией, на которой показаны результаты теста по детекции и измерению 4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ способом НИС-ВЭЖХ, как описано в примере 25;

15 Фигура 6 является иллюстрацией, на которой показаны результаты теста по детекции и измерению 4E1-НС-Cys439ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ способом НИС-ВЭЖХ, как описано в примере 25;

20 Фигура 7 является иллюстрацией, на которой показаны результаты теста по детекции и измерению 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ способом НИС-ВЭЖХ, как описано в примере 25;

Фигура 8 является иллюстрацией, на которой показаны результаты теста по детекции и измерению 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ способом НИС-ВЭЖХ, как описано в примере 25;

25 Фигура 9 является иллюстрацией, на которой показаны результаты теста по детекции и измерению соотношения токсин/антитело для 4D3-НС-Cys439ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ способом RP-ВЭЖХ, как описано в примере 26.

Фигура 10 является иллюстрацией, на которой показаны результаты теста по детекции и измерению агрегации антитела-основы TDC 4D3 способом SEC-ВЭЖХ, как описано в примере 27;

30 Фигура 11 является иллюстрацией, на которой показаны результаты теста по детекции и измерению агрегации антитела-основы TDC 4D3-LC-Cys205ins способом SEC-ВЭЖХ, как описано в примере 27;

35 Фигура 12 является иллюстрацией, на которой показаны результаты теста по детекции и измерению агрегации антитела-основы TDC 4D3-LC-Cys206ins способом SEC-ВЭЖХ, как описано в примере 27;

Фигура 13 является иллюстрацией, на которой показаны результаты теста по детекции и измерению агрегации антитела-основы TDC 4D3-НС-Cys439ins способа SEC-ВЭЖХ, как описано в примере 27;

40 Фигура 14 является иллюстрацией, на которой показаны результаты теста из примера 28;

Фигура 15 является иллюстрацией, на которой показаны результаты теста из примера 29, где показано измерение аффинности антигена с-met и антитела 4E1 и TDC 4E1-LC-Cys205ins-MVPM, 4E1-LC-Cys206ins-MVPM и 4E1-НС-Cys439ins-MVPM;

45 Фигура 16 является иллюстрацией, на которой показаны результаты теста из примера 29, где показано измерение аффинности антигена Trop2 и антитела 4D3 и TDC 4D3-LC-Cys205ins-MVPM, 4D3-LC-Cys206ins-MVPM и 4D3-НС-Cys439ins-MVPM;

На фигуре 17 показана IC₅₀ для цитотоксичности ADC против злокачественных клеток, где ADC представляют собой 2A1-LC-V205C-mc-vc-PAВ-ММАЕ, 2A1-LC-

Cys205ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ, 2А1-LС-Cys206ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ и 2А1-НС-Cys439ins-mc-vc-PAВ-ММА, и злокачественные клетки представляют собой EGFRwt-гиперэкспрессирующие клетки плоскоклеточной карциномы человека А431;

На фигуре 18 показана IC₅₀ для цитотоксичности ADC против злокачественных клеток, где ADC представляют собой 2А1-LС-V205С-mc-vc-PAВ-ММАЕ, 2А1-LС-Cys205ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ, 2А1-LС-Cys206ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ и 2А1-НС-Cys439ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ, и злокачественные клетки представляют собой EGFRvIII-гиперэкспрессирующую линию клеток глиомы человека U87-EGFRvIII;

На фигуре 19 показана IC₅₀ для цитотоксичности ADC против злокачественных клеток, где ADC представляют собой 4Е1-LС-Cys205ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ, 4Е1-LС-Cys206ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ, 4Е1-НС-Cys439ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ и 4Е1, и злокачественные клетки представляют собой C-met-высокоэкспрессирующую линию клеток глиомы U87-MG;

На фигуре 20 показана IC₅₀ для цитотоксичности ADC против злокачественных клеток, где ADC представляют собой D3-LС-Cys205ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ, 4D3-LС-Cys206ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ, 4D3-НС-Cys439ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ и 4D3, и злокачественные клетки представляют собой trop2-высокоэкспрессирующую линию клеток рака поджелудочной железы ВХРС-3;

Фигура 21 является иллюстрацией, на которой показаны результаты теста по измерению стабильности в плазме человека в случае 4D3-LС-Cys205ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ;

Фигура 22 является иллюстрацией, на которой показаны результаты теста по измерению стабильности в плазме человека в случае 4D3-LС-Cys206ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ;

Фигура 23 является иллюстрацией, на которой показаны результаты теста по измерению стабильности в плазме человека в случае 4D3-НС-Cys439ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ;

Фигура 24 является иллюстрацией, на которой показаны результаты теста по измерению стабильности в плазме человека в случае 4Е1-LС-Cys205ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ;

Фигура 25 является иллюстрацией, на которой показаны результаты теста по измерению стабильности в плазме человека в случае 4Е1-LС-Cys206ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ;

Фигура 26 является иллюстрацией, на которой показаны результаты теста по измерению стабильности в плазме человека в случае 4Е1-НС-Cys439ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ;

Фигура 27 является иллюстрацией, на которой показаны результаты теста по измерению фармакодинамического эффекта в случае 4D3-LС-Cys205ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ, 4D3-LС-Cys206ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ, 4D3-НС-Cys439ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ и родительского антитела 4D3 у несущих опухоль мышей; и

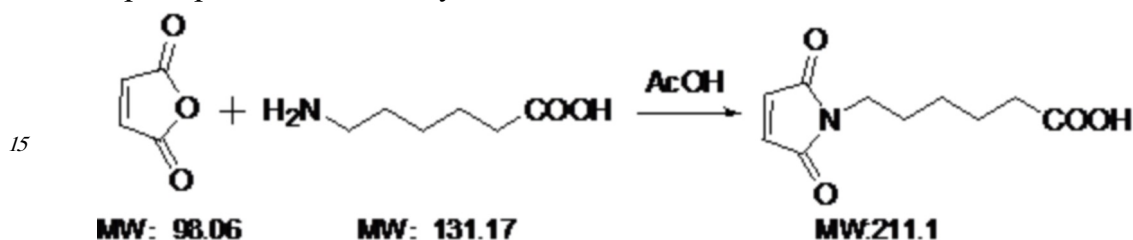
Фигура 28 является иллюстрацией, на которой показаны результаты теста по измерению фармакодинамического эффекта в случае 4D3-LС-Cys205ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ, 4D3-LС-Cys206ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ, 4D3-НС-Cys439ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ, 4D3-НС-Cys439ins-mc-vc-PAВ-ММАЕ и родительского антитела 4D3 у несущих опухоль мышей.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

В следующем подробном описании приведены ссылки на сопутствующие чертежи,

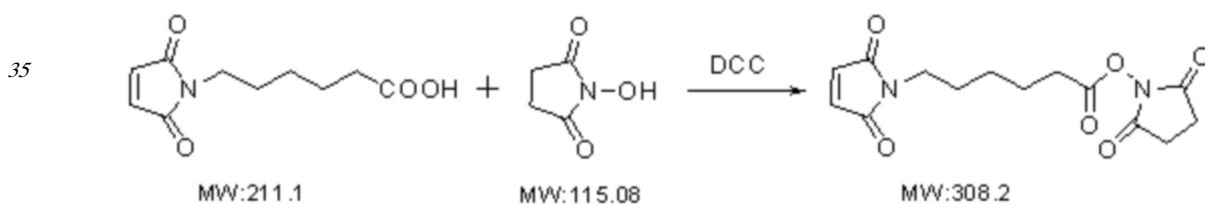
являющиеся его частью. На чертежах схожими символами, как правило, указаны схожие компоненты, если контекст не указывает на иное. Иллюстративные варианты осуществления, представленные в подробном описании, чертежах и формуле изобретения, не являются ограничивающими. Можно использовать другие варианты осуществления и можно осуществлять изменения без отклонения от сущности или объема изобретения, описанного в настоящей заявке. Следует понимать, что аспекты настоящего изобретения, в целом, описываемые в настоящей заявке и проиллюстрированные на фигурах, можно размещать, заменять, комбинировать, разделять и планировать в различных конфигурациях, все из которых конкретно предусмотрены в настоящем описании.

Пример 1: Синтез и получение mc



6-аминокапроновую кислоту (3,9 г, 0,03 моль) и малеиновый ангидрид (3,5 г, 0,036 моль) добавляли к ледяной уксусной кислоте (30 мл). После перемешивания при 120°C в течение 4-6 ч. реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры. Большую часть уксусной кислоты удаляли посредством концентрирования в вакууме при 60°C. Полученную коричневатую-желтую вязкую жидкость наливали в воду, а затем экстрагировали этилацетатом (20 мл × 3) и объединяли органические слои. Органические слои промывали водой и солевым раствором, сушили безводным сульфатом натрия, фильтровали и выпаривали в вакууме для получения коричнево-желтого маслянистого вещества, которое перемешивали в 50 мл воды, и белых твердых веществ, осаждающихся из раствора, белые твердые вещества фильтровали и сушили продукт при пониженном давлении и 50°C, 5,08 г, выход 80%. Мр: 89-92°C. m/z: 212,2 [M+H]⁺. ¹H ЯМР (400Mz, DMSO): 13,21 (ш.с., 1H, COOH), 6,75 (с, 2H, COCH=CHCO), 3,63 (т, 2H, J=7,2 Гц, NCH₂CH₂), 2,42 (т, 2H, J=7,4 Гц, CH₂COOH), 1,52-1,68 (м, 4H, NCH₂CH₂CH₂CH₂), 1,30-1,42 (м, 2H, NCH₂CH₂CH₂CH₂).

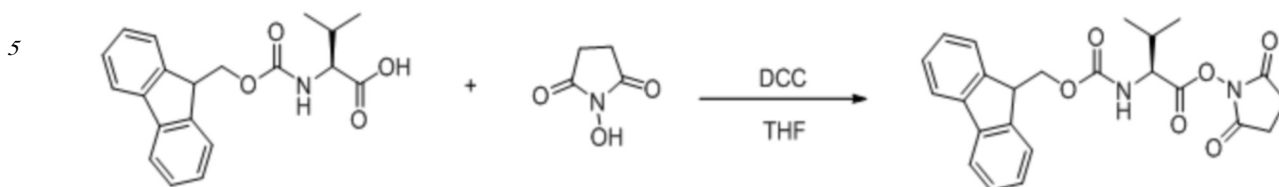
Пример 2: Синтез и получение Mc-OSu



40 В атмосфере азота к раствору смеси MC (4,7 г, 22 ммоль) и HOSu (25 г, 22 ммоль) в ацетонитриле (50 мл) при 0°C медленно добавляли DCC (4,5 г, 22 ммоль), растворенный в 25 мл ацетонитрила. Реакционный раствор реагировал при 0°C в течение 2 часов, а затем ему позволяли реагировать при комнатной температуре в течение ночи. После фильтрования фильтрационный осадок промывали ацетонитрилом (10 мл×3). Фильтрат концентрировали до высушивания при пониженном давлении. Полученное маслянистое вещество сушили при пониженном давлении и комнатной температуре в течение 6 ч. для получения 6,4 г светло-коричневого твердого вещества, выход 95% (для использования непосредственно на следующей стадии без очистки). m/z: 309,2 [M+H]⁺

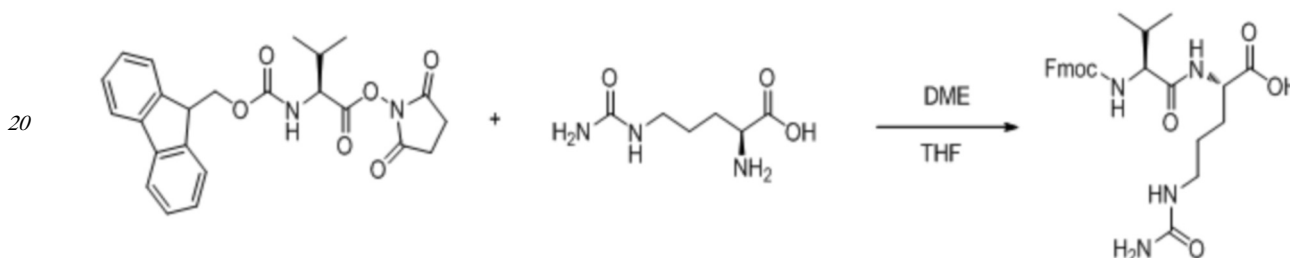
^1H NMR (400Mz, CDCl_3): 1~2 (м, 6H, $\text{CCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}$), 2,68 (т, 2H, CH_2CO), 2,95 (с, 4H, $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), 3,68 (т, 2H, CH_2N), 6,81 (с, 2H, $\text{CH}=\text{CH}$).

Пример 3: Синтез и получение Fmoc-Val-OSu



10 К раствору смеси Fmoc-Val (10 г) и HOSu (3,4 г) в THF (100 мл) при 0°C медленно добавляли DCC (6 г), растворенный в 50 мл ацетонитрила. Реакционный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов. Осуществляли фильтрацию и промывали фильтрационный осадок THF. Прозрачное маслянистое вещество получали посредством концентрирования фильтратов при пониженном давлении. Маслянистое вещество использовали непосредственно на следующей стадии без дальнейшей очистки. m/z :437,4 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

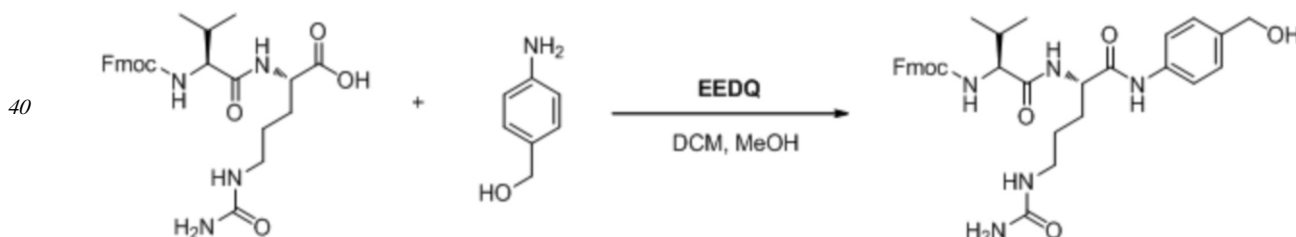
Пример 4: Синтез и получение Fmoc-vc



25 К раствору Cit (4,0 г) в THF (20 мл) добавляли 60 мл водного раствора гидрокарбоната натрия (содержащего NaHCO_3 , 2 г, 1,05 экв.). В смесь добавляли раствор Fmoc-Val-OSu (22,35 ммоль) в DME (60 мл). После перемешивания при комнатной температуре в течение 24 часов в реакционную смесь добавляли 15% водный раствор лимонной кислоты (110 мл), а затем дважды экстрагировали с помощью EtOAc. Объединенные органические фазы концентрировали в вакууме для получения белого твердого вещества.

30 К белому материалу добавляли 100 мл метил-трет-бутилового эфира, смесь перемешивали, фильтровали и сушили фильтрационный осадок при пониженном давлении и 40°C в течение 4 ч. для получения 4,83 г продукта, выход 65%. m/z : 497,6 $(\text{M}+\text{H})^+$ ^1H NMR (400Mz, DMSO): 0,92 (6H, м), 1,35 ~ 1,65 (4H, м), 2,10 (1H, м), 3,01(2H, к), 3,99 (1H, т), 4,01 -4,45 (2H, м), 4,45 (2H, т), 5,46 (2H, ш.с.), 6,03(1H, т), 7,20-8,02 (8H, м), 8,25 (1H, д).

Пример 5: Синтез и получение Fmoc-vc-PAВОН

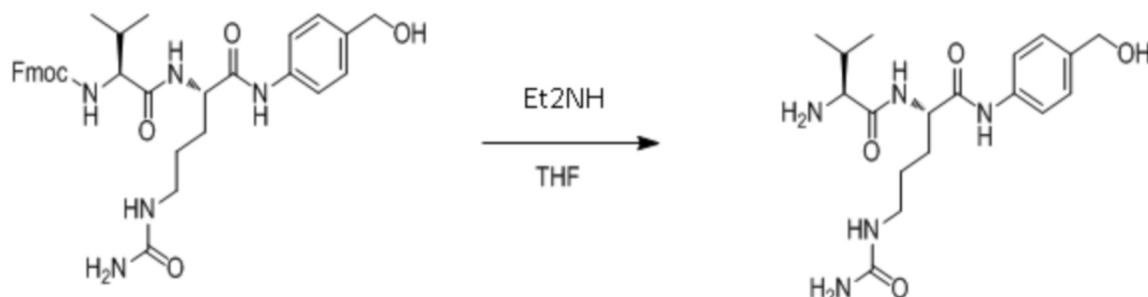


45 К раствору Fmoc-vc (2 г, 4,2 ммоль) и PAВОН(1,04 г, 2 экв.) в DCM/MeOH (2/1) (60 мл) добавляли EEDQ (2,0 г, 2 экв.) при 0°C . После перемешивания в течение 10 мин к смеси после частичного растворения медленно добавляли раствор (S)-1-фенилэтанамина (17,5 г, 144,2 ммоль) в MeOH (200 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 дней в темноте. После завершения реакции смесь

концентрировали в вакууме при 40°C для получения белого твердого вещества. Белое твердое вещество собирали, промывали метил-трет-бутиловым эфиром (100 мл) и фильтровали. Фильтрационный осадок промывали метил-трет-бутиловым эфиром и полученное белое твердое вещество сушили при пониженном давлении и 40°C для

5 получения 2,2 г белого твердого вещества, и выход 88%. m/z : 602,6 (M+H)⁺. ¹HNMR (400Mz, DMSO): 0,95 (6H, м), 1,45~1,69 (4H, м), 2,10 (1H, м), 3,11(2H, м), 3,99 (1H, м), 4,30 (2H, д), 4,05~4,66 (2H, м), 4,55 (2H, д), 5,21 (1H, т), 5,51 (2H, ш.с.), 6,11(1H, т), 7,09 -8,10 (12H, м), 8,21 (1H, д), 10,51(1H, ш.с.).

10 Пример 6: Синтез и получение vc-PAВОН

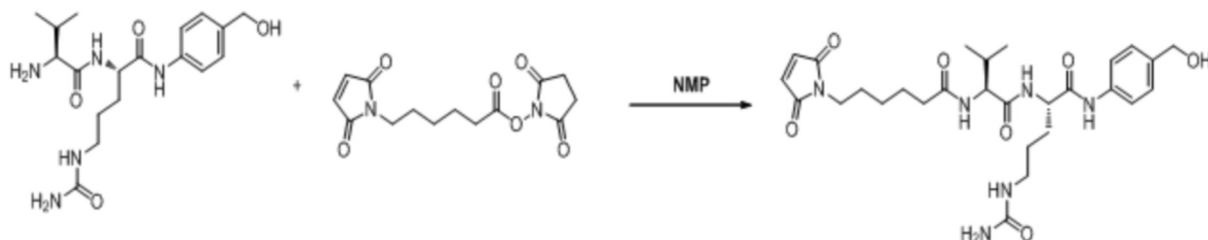


К раствору Fmoc-vc-PAВОН (490 мг, 0,815 ммоль) в THF (10 мл) добавляли диэтиламин (2 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч.

20 К полученному продукту добавляли 20 мл DCM, смесь перемешивали и из реакционного раствора осаждали кристаллическое вещество. Кристаллическое вещество фильтровали и промывали фильтрационный осадок DCM, полученное твердое вещество сушили при пониженном давлении для получения 277 мг. Выход составлял 90%. m/z : 380,2 (M+H)⁺

25 ¹HNMR (400Mz, DMSO): 0,89 (6H, м), 1,31~1,61 (4H, м), 1,82 (1H, м), 2,86 (1H, м), 2,89(2H, д), 4,38 (2H, д), 4,44 (1H, м), 5,01 (1H, ш.с.), 5,35 (2H, ш.с.), 5,84 (1H, ш.с.), 7,14 (2H, д), 7,42 (2H, д), 8,08 (1H, ш.с.), 9,88 (1H, ш.с.).

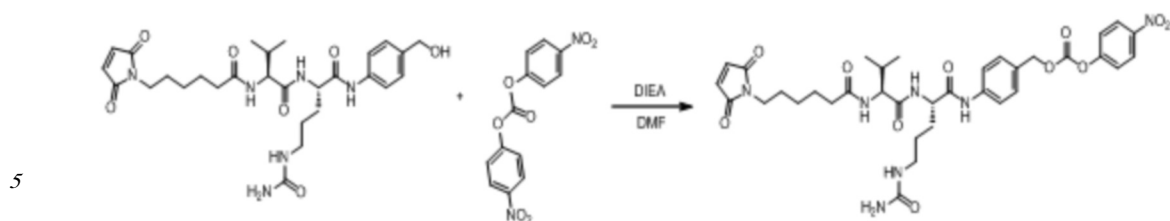
30 Пример 7: Синтез и получение mc-vc-PAВОН



40 VP-PAВОН(205 мг, 0,54 ммоль) и MC-OSu (184 мг, 1,1 экв.) добавляли к 10 мл NMP и перемешивали реакционную смесь при комнатной температуре в течение 24 ч. После завершения реакции смесь концентрировали в вакууме при 40°C. К полученному маслянистому веществу добавляли метил-трет-бутиловый эфир (20 мл) и перемешивали для кристаллизации. После фильтрования кристаллического вещества и промывки фильтрационного осадка метил-трет-бутиловым эфиром получали 310 мг продукта.

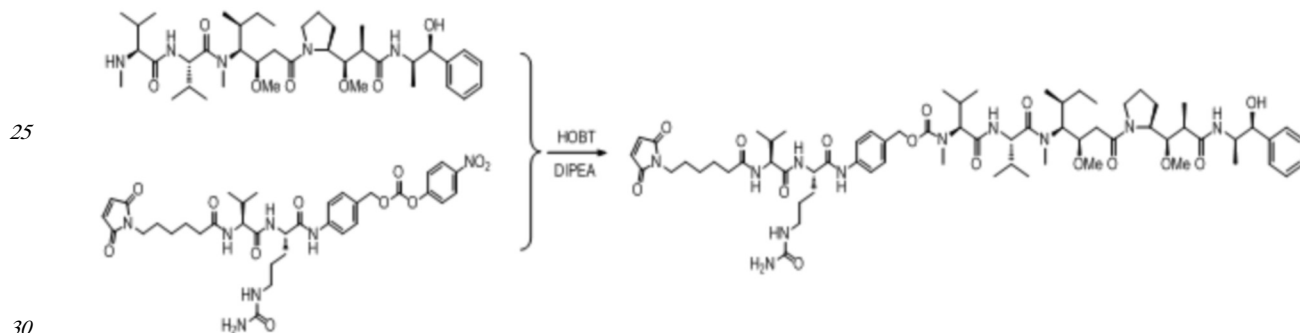
Выход составляет 100%. m/z : 573,3 (M+H)⁺ ¹HNMR (400Mz, DMSO): 0,89 (6H, м), 1,15-1,99 (10H, м), 2,11(1H, м), 2,31 (2H, т), 3,21(2H, м), 3,53 (2H, т), 4,32 (1H, т), 4,51 (1H, м), 4,59 (2H, ш.с.), 5,24 (1H, ш.с.), 5,56 (2H, ш.с.), 6,20(1H, ш.с.), 7,12(2H, с), 7,23(2H, д), 7,58 (2H, д), 7,94 (1H, д), 8,1 7 (1H, д), 10,21 (1H, ш.с.)

45 Пример 8: Синтез и получение mc-vc-PAВ-PNP



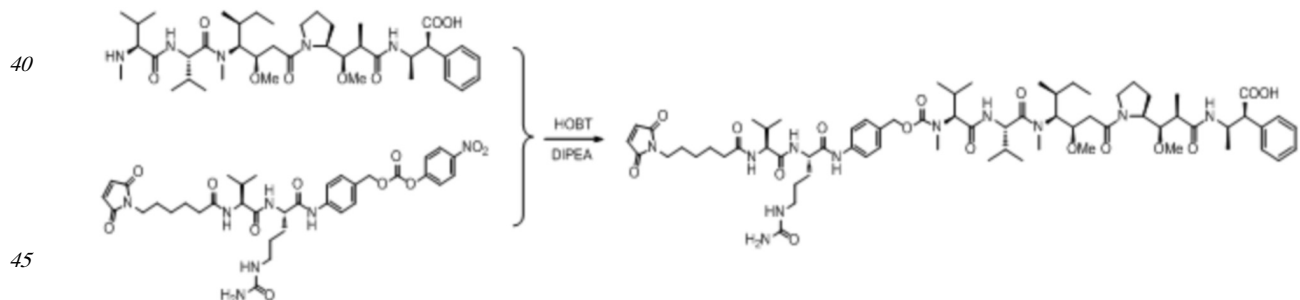
В атмосфере азота к раствору *mc-vc-PAVOH* (166,0 мг, 0,294 ммоль) в безводном пиридине (5 мл) медленно добавляли PNP (179 мг, 3 экв.), растворенный в DCM (5 мл), при 0°C. После перемешивания при приблизительно 0°C в течение 10 мин убрали ледяную баню и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч. После завершения реакции добавляли EA (70 мл) и 15% водный раствор лимонной кислоты (100 мл) и разделяли и выделяли органический слой. Органический слой последовательно промывали лимонной кислотой, водой, соевым раствором, сушили безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали фильтрат при пониженном давлении для получения светлого желтоватого маслянистого продукта. Добавление метил-трет-бутилового эфира для кристаллизации приводило к получению белого твердого вещества (86 мг). Выход составлял 40%. m/z : 738(M+H)⁺ ¹HNMR (400Mz, CDCl₃/CD₃OD): 0,84 (6H, м), 1,11-1,84 (10H, м), 2,05 (1H, м), 2,15 (2H, т), 3,09 (2H, м), 3,32 (2H, т), 4,12 (1H, м), 4,38 (1H, м), 5,15 (2H, с), 6,61 (2H, с), 6,84 (1H, д), 7,61 (1H, д), 7,21 (2H, д), 7,50 (2H, д), 7,61 (2H, д), 8,18 (2H, д), 9,59 (1H, ш.с.)

Пример 9: Синтез и получение *mc-vc-PAV-MMAE*

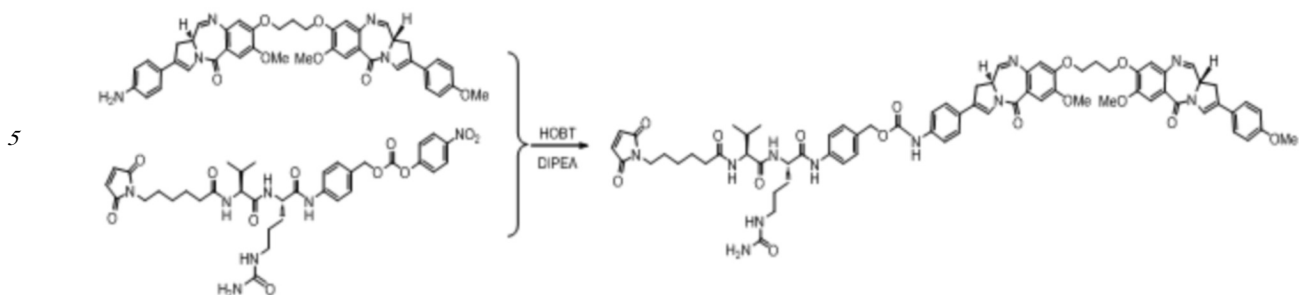


20 мг *mc-vc-PAV-PNP* (1,5 экв.) и 3 мг HOBt добавляли к 2 мл DMF. После перемешивания при комнатной температуре в течение минуты добавляли 13 мг MMAE, 0,5 мл пиридина и 25 мкл DIEA. Реакционный раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 2 дней. После завершения реакции реакционный раствор очищали с помощью препаративной колонки и желаемые компоненты собирали, концентрировали и лиофилизировали для получения приблизительно 10 мг продукта, выход составлял приблизительно 42%. m/z : 1317,1 (M+H)⁺.

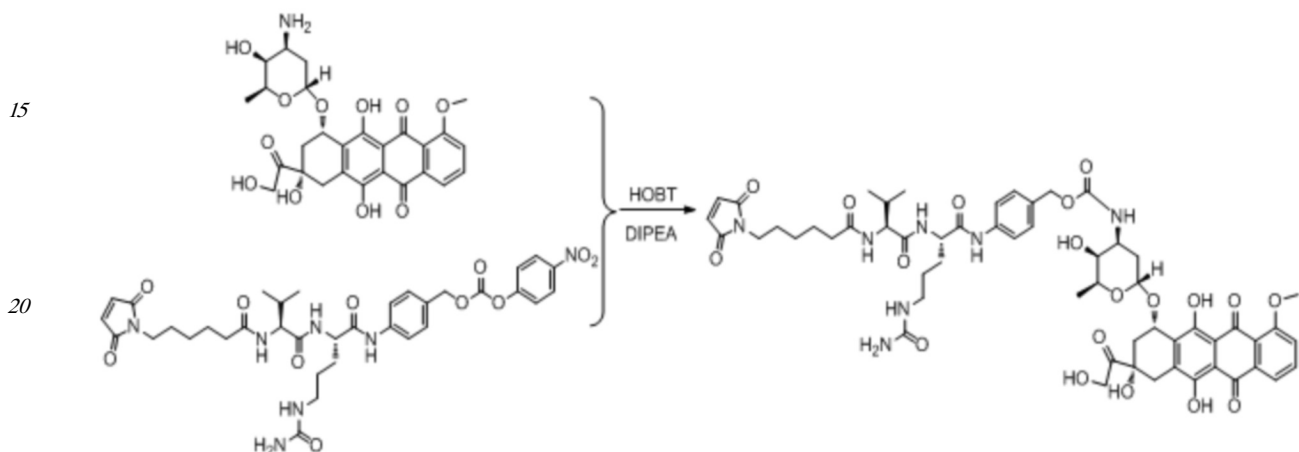
Пример 10: Синтез и получение *mc-vc-PAV-MMAF*



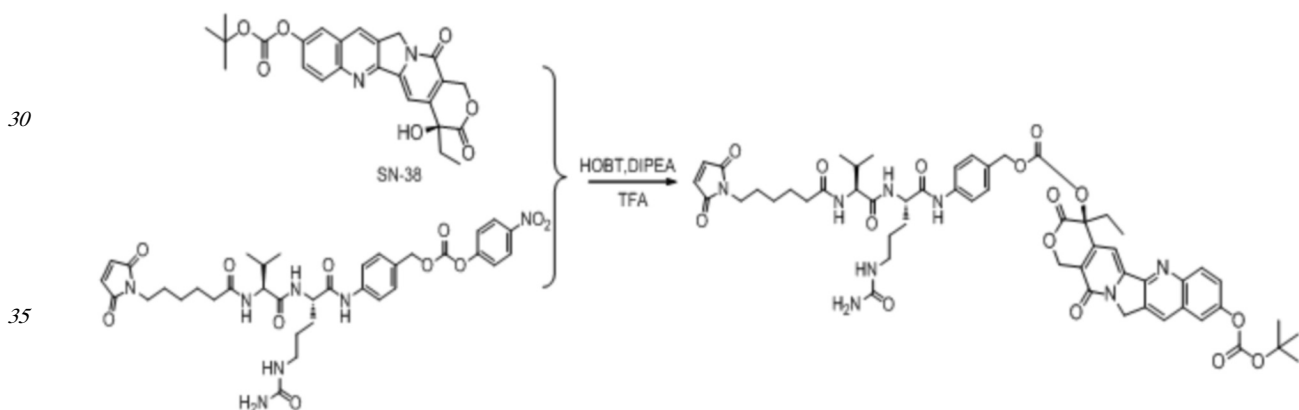
Осуществляли стадии из примера 9, получали приблизительно 12,5 мг *mc-vc-PAV-MMAF*, выход составлял 45,2%.

Пример 11: Синтез и получение mc-vc-PAВ-PBD

Осуществляли стадии из примера 9, получали приблизительно 9,5 мг mc-vc-PAВ-PBD. Выход составлял 32,5%. m/z : 1325,4 (M+H)+.

Пример 12: Синтез и получение mc-vc-PAВ-DOX

Осуществляли стадии из примера 9, получали приблизительно 11,2 мг mc-vc-PAВ-DOX. Выход составлял 38,9%. m/z : 1143,2 (M+H)+.

Пример 14: Синтез и получение mc-vc-PAВ-SN-38

100 мг 10-O-Вос-SN-38 растворяли в 10 мл сухого дихлорметана, к растворителю добавляли 25,6 мг (1 экв.) DMAP, по каплям добавляли раствор трифосгена в дихлорметане при 0°C (62 мг трифосгена растворяли в 2 мл дихлорметана) и продолжали реакцию при 0°C в течение 12 ч. Дихлорметан удаляли при пониженном давлении. Неочищенные продукты растворяли в 10 мл сухого DMF, затем добавляли 144 мг mc-vc-PAВОН и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 ч. 41 мг mc-vc-PAВ-SN-38 выделяли посредством отделения жидкой фазы препарата, и общий выход в двух стадиях составлял 19,7%. m/z : 1063,2(M+H)+.

40

45

Пример 15: Экспрессия и очистка целевого антитела

Целевое антитело экспрессировали с использованием клеток Freestyle™ 293-F (Invitrogen) в суспензионной культуре. За день до трансфекции клетки высевали при

плотности 6×10^5 клетки/мл во встряхиваемой колбе емкостью 1 л, содержащей 300 мл полной среды F17 (экспрессионной среды Freestyle™ F17, Gibco), выращивали в течение ночи при встряхивании при 37°C, 5% CO₂, 120 об/мин в клеточном инкубаторе. На

5 следующий день осуществляли трансфекцию плазмиды для экспрессии антитела с использованием PEI, где соотношение плазмиды:PEI составляло 2:1. Через день после трансфекции добавляли питательную среду TN1 в количестве 2,5% (об./об.), продолжали культивирование в течение 4 дней и собирали супернатант посредством центрифугирования.

10 Собранный супернатант экспрессирующих клеток элюировали с помощью колонки для аффинной хроматографии белков (Mabselect Sure LX, GE) и 0,1 М лимонной кислоты (pH 3,0), захваченное антитело обрабатывали 1 М Трис-НСl (pH 9,0) и доводили до pH 7,0 при 1/10 (об./об.). Удаляли примеси, такие как мультимеры и эндотоксин, с помощью колонки для гель-фильтрации SEC (Superdex 200, GE) и одновременно буфер для антитела

15 заменяли PBS (pH 7,4), образец с целевым пиком поглощения УФ при 280 нм собирали и концентрировали до 2 мг/мл с помощью центрифужной пробирки для ультрафильтрации (30 KD, Pall Corporation). Целевой мономер антитела (POI%), полученный этим способом, составлял более 90%, и его хранили для последующих экспериментов.

20 Пример 16: Синтез и получение TDC 2A1-НС-Cys439ins-mc-vc-РАВ-ММАЕ посредством конъюгации/соединения антитела 2A1-НС-Cys439ins и mc-vc-РАВ-ММАЕ

Антитело 2A1-НС-Cys439ins, экспрессируемое клетками, очищали с помощью смолы с протеином А, такой как Mabselect Sure, элюировали раствором с низким pH и нейтрализовали посредством добавления раствора Трис непосредственно после элюции

25 при низком pH, раствор заменяли буфером Трис-НСl с pH 7,5. Соединение mc-vc-РАВ-ММАЕ, представляющее собой белый порошок, растворяли в DMA для последующего использования. Для удаления защитной группы на мутантном остатке цистеина сначала восстанавливали антитело. 1 М водный раствор DTT добавляли к раствору антитела 2A1-НС-Cys439ins при молекулярном соотношении 1:40, смесь равномерно смешивали

30 и проводили реакцию при 20°C в течение 2 часов. По истечении времени реакции pH образца доводили до 5,0, и DTT и защитную группу в смеси удаляли посредством катионообменной хроматографии, например, с помощью смолы SP Sepharose F.F. Затем к образцу добавляли раствор ДНАА при молекулярном соотношении 1:20 и проводили реакцию при 25°C в течение 4 часов в темноте для повторного образования

35 межцепочечных дисульфидных связей. Затем добавляли раствор mc-vc-РАВ-ММАЕ для соединения mc-vc-РАВ-ММАЕ с встроенным или мутантным цистеином в антителе, смесь тщательно смешивали и проводили реакцию при 25°C в течение 2 часов. После завершения реакции mc-vc-РАВ-ММАЕ, к которому не было присоединено антитело, удаляли посредством катионообменной хроматографии, например, с помощью SP Sepharose F.F., для получения образца TDC 2A1-НС-Cys439ins-mc-vc-РАВ-ММАЕ.

40 Пример 17: Синтез и получение образца TDC 2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-РАВ-ММАЕ посредством конъюгации/соединения антитела 2A1-LC-Cys205ins и mc-vc-РАВ-ММАЕ

Антитело 2A1-LC-Cys205ins, экспрессируемое клетками, очищали с помощью смолы с протеином А, такой как Mabselect Sure, элюировали раствором с низким pH и нейтрализовали посредством добавления раствора Трис непосредственно после элюции

45 при низком pH, раствор заменяли буфером Трис-НСl с pH 7,5. Соединение mc-vc-РАВ-ММАЕ, представляющее собой белый порошок, растворяли в DMA для последующего использования. Для удаления защитной группы на мутантном остатке цистеина сначала восстанавливали антитело. 1 М водный раствор DTT добавляли к раствору антитела

2A1-LC-Cys205ins при молекулярном соотношении 1:40, смесь равномерно смешивали и проводили реакцию при 20°C в течение 2 часов. По истечении времени реакции pH образца доводили до 5,0 и DTT и защитную группу в смеси удаляли посредством катионообменной хроматографии, например, с помощью смолы SP Sepharose F.F. Затем к образцу добавляли раствор ДНАА при молекулярном соотношении 1:20 и проводили реакцию при 25°C в течение 4 часов в темноте для повторного образования межцепочечных дисульфидных связей. Затем добавляли раствор mc-vc-РАВ-ММАЕ для соединения mc-vc-РАВ-ММАЕ с встроенным или мутантным цистеином в антителе, смесь тщательно смешивали и проводили реакцию при 25°C в течение 2 часов. После завершения реакции mc-vc-РАВ-ММАЕ, к которому не было присоединено антитело, удаляли посредством катионообменной хроматографии, например, с помощью SP Sepharose F.F., для получения образца TDC 2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-РАВ-ММАЕ.

Пример 18: Синтез и получение образца TDC 2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-РАВ-ММАЕ посредством конъюгации/соединения антитела 2A1-LC-Cys206ins и mc-vc-РАВ-ММАЕ

Антитело 2A1-LC-Cys206ins, экспрессируемое клетками, очищали с помощью смолы с протеином А, такой как Mabselect Sure, элюировали раствором с низким pH и нейтрализовали посредством добавления раствора Трис непосредственно после элюции при низком pH, раствор заменяли буфером Трис-НСl с pH 7,5. Соединение mc-vc-РАВ-ММАЕ, представляющее собой белый порошок, растворяли в DMA для последующего использования. Для удаления защитной группы на мутантном остатке цистеина сначала восстанавливали антитело. 1 М водный раствор DTT добавляли к раствору антитела 2A1-LC-Cys206ins при молекулярном соотношении 1:40, смесь равномерно смешивали и проводили реакцию при 20°C в течение 2 часов. По истечении времени реакции pH образца доводили до 5,0, и DTT и защитную группу в смеси удаляли посредством катионообменной хроматографии, например, с помощью смолы SP Sepharose F.F. Затем к образцу добавляли раствор ДНАА при молекулярном соотношении 1:20 и проводили реакцию при 25°C в течение 4 часов в темноте для повторного образования межцепочечных дисульфидных связей. Затем добавляли раствор mc-vc-РАВ-ММАЕ для соединения mc-vc-РАВ-ММАЕ с встроенным или мутантным цистеином в антителе, смесь тщательно смешивали и проводили реакцию при 25°C в течение 2 часов. После завершения реакции mc-vc-РАВ-ММАЕ, к которому не было присоединено антитело, удаляли посредством катионообменной хроматографии, например, с помощью SP Sepharose F.F., для получения образца TDC 2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-РАВ-ММАЕ.

Пример 19: Синтез и получение образца TDC 4D3-НС-Cys439ins-mc-vc-РАВ-ММАЕ посредством конъюгации/соединения антитела 4D3-НС-Cys439ins и mc-vc-РАВ-ММАЕ

Антитело 4D3-НС-Cys439ins, экспрессируемое клетками, очищали с помощью смолы с протеином А, такой как Mabselect Sure, элюировали раствором с низким pH и нейтрализовали посредством добавления раствора Трис непосредственно после элюции при низком pH, раствор заменяли буфером Трис-НСl с pH 7,5. Соединение mc-vc-РАВ-ММАЕ, представляющее собой белый порошок, растворяли в DMA для последующего использования. Для удаления защитной группы на мутантном остатке цистеина сначала восстанавливали антитело. 1 М водный раствор DTT добавляли к раствору антитела 4D3-НС-Cys439ins при молекулярном соотношении 1:40, смесь равномерно смешивали и проводили реакцию при 20°C в течение 2 часов. По истечении времени реакции pH образца доводили до 5,0 и DTT и защитную группу в смеси удаляли посредством катионообменной хроматографии, например, с помощью смолы SP Sepharose F.F.

Затем к образцу добавляли раствор ДНАА при молекулярном соотношении 1:20 и проводили реакцию при 25°C в течение 4 часов в темноте для повторного образования

межцепочечных дисульфидных связей. Затем добавляли раствор mc-vc-РАВ-ММАЕ для соединения mc-vc-РАВ-ММАЕ с встроенным или мутантным цистеином в антителе, смесь тщательно смешивали и проводили реакцию при 25°C в течение 2 часов. После завершения реакции mc-vc-РАВ-ММАЕ, к которому не было присоединено антитело, удаляли посредством катионообменной хроматографии, например, с помощью SP Sepharose F.F., для получения образца TDC 4D3-НС-Cys439ins-mc-vc-РАВ-ММАЕ.

Пример 20: Синтез и получение образца TDC 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-РАВ-ММАЕ посредством конъюгации/соединения антитела 4D3-LC-Cys205ins и mc-vc-РАВ-ММАЕ

Антитело 4D3-LC-Cys205ins, экспрессируемое клетками, очищали с помощью смолы с протеином А, такой как Mabselect Sure, элюировали раствором с низким рН и нейтрализовали посредством добавления раствора Трис непосредственно после элюции при низком рН, раствор заменяли буфером Трис-НСl с рН 7,5. Соединение mc-vc-РАВ-ММАЕ, представляющее собой белый порошок, растворяли в DMA для последующего использования. Для удаления защитной группы на мутантном остатке цистеина сначала восстанавливали антитело. 1 М водный раствор DTT добавляли к раствору антитела 4D3-LC-Cys205ins при молекулярном соотношении 1:40, смесь равномерно смешивали и проводили реакцию при 20°C в течение 2 часов. По истечении времени реакции рН образца доводили до 5,0 и DTT и защитную группу в смеси удаляли посредством катионообменной хроматографии, например, с помощью смолы SP Sepharose F.F. Затем к образцу добавляли раствор ДНАА при молекулярном соотношении 1:20 и проводили реакцию при 25°C в течение 4 часов в темноте для повторного образования межцепочечных дисульфидных связей. Затем добавляли раствор mc-vc-РАВ-ММАЕ для соединения mc-vc-РАВ-ММАЕ с встроенным или мутантным цистеином в антителе, смесь тщательно смешивали и проводили реакцию при 25°C в течение 2 часов. После завершения реакции mc-vc-РАВ-ММАЕ, к которому не было присоединено антитело, удаляли посредством катионообменной хроматографии, например, с помощью SP Sepharose F.F., для получения образца TDC 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-РАВ-ММАЕ.

Пример 21: Синтез и получение образца TDC 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-РАВ-ММАЕ посредством конъюгации/соединения антитела 4D3-LC-Cys206ins и mc-vc-РАВ-ММАЕ

Антитело 4D3-LC-Cys206ins, экспрессируемое клетками, очищали с помощью смолы с протеином А, такой как Mabselect Sure, элюировали раствором с низким рН и нейтрализовали посредством добавления раствора Трис непосредственно после элюции при низком рН, раствор заменяли буфером Трис-НСl с рН 7,5. Соединение mc-vc-РАВ-ММАЕ, представляющее собой белый порошок, растворяли в DMA для последующего использования. Для удаления защитной группы на мутантном остатке цистеина сначала восстанавливали антитело. 1 М водный раствор DTT добавляли к раствору антитела 4D3-LC-Cys206ins при молекулярном соотношении 1:40, смесь равномерно смешивали и проводили реакцию при 20°C в течение 2 часов. По истечении времени реакции рН образца доводили до 5,0 и DTT и защитную группу в смеси удаляли посредством катионообменной хроматографии, например, с помощью смолы SP Sepharose F.F. Затем к образцу добавляли раствор ДНАА при молекулярном соотношении 1:20 и проводили реакцию при 25°C в течение 4 часов в темноте для повторного образования межцепочечных дисульфидных связей. Затем добавляли раствор mc-vc-РАВ-ММАЕ для соединения mc-vc-РАВ-ММАЕ с встроенным или мутантным цистеином в антителе, смесь тщательно смешивали и проводили реакцию при 25°C в течение 2 часов. После завершения реакции mc-vc-РАВ-ММАЕ, к которому не было присоединено антитело, удаляли посредством катионообменной хроматографии, например, с помощью SP Sepharose F.F., для получения образца TDC 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-РАВ-ММАЕ.

Пример 22: Синтез и получение образца TDC 4E1-NC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE посредством конъюгации/соединения антитела 4E1-NC-Cys439ins и mc-vc-PAB-MMAE

Антитело 4E1-NC-Cys439ins, экспрессируемое клетками, очищали с помощью смолы с протеином А, такой как Mabselect Sure, элюировали раствором с низким рН и
5 нейтрализовали посредством добавления раствора Трис непосредственно после элюции при низком рН, раствор заменяли буфером Трис-НСl с рН 7,5. Соединение mc-vc-PAB-MMAE, представляющее собой белый порошок, растворяли в DMA для последующего использования. Для удаления защитной группы на мутантном остатке цистеина сначала восстанавливали антитело. 1 М водный раствор DTT добавляли к раствору антитела
10 4E1-NC-Cys439ins при молекулярном соотношении 1:40, смесь равномерно смешивали и проводили реакцию при 20°C в течение 2 часов. По истечении времени реакции рН образца доводили до 5,0 и DTT и защитную группу в смеси удаляли посредством катионообменной хроматографии, например, с помощью смолы SP Sepharose F.F. Затем к образцу добавляли раствор ДНАА при молекулярном соотношении 1:20 и проводили
15 реакцию при 25°C в течение 4 часов в темноте для повторного образования межцепочечных дисульфидных связей. Затем добавляли раствор mc-vc-PAB-MMAE для соединения mc-vc-PAB-MMAE с встроенным или мутантным цистеином в антителе, смесь тщательно смешивали и проводили реакцию при 25°C в течение 2 часов. После завершения реакции mc-vc-PAB-MMAE, к которому не было присоединено антитело,
20 удаляли посредством катионообменной хроматографии, например, с помощью SP Sepharose F.F., для получения образца TDC 4E1-NC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE.

Пример 23: Синтез и получение образца TDC 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE посредством конъюгации/соединения антитела 4E1-LC-Cys205ins и mc-vc-PAB-MMAE

Антитело 4E1-LC-Cys205ins, экспрессируемое клетками, очищали с помощью смолы
25 с протеином А, такой как Mabselect Sure, элюировали раствором с низким рН и нейтрализовали посредством добавления раствора Трис непосредственно после элюции при низком рН, раствор заменяли буфером Трис-НСl с рН 7,5. Соединение mc-vc-PAB-MMAE, представляющее собой белый порошок, растворяли в DMA для последующего использования. Для удаления защитной группы на мутантном остатке цистеина сначала
30 восстанавливали антитело. 1 М водный раствор DTT добавляли к раствору антитела 4E1-LC-Cys205ins при молекулярном соотношении 1:40, смесь равномерно смешивали и проводили реакцию при 20°C в течение 2 часов. По истечении времени реакции рН образца доводили до 5,0 и DTT и защитную группу в смеси удаляли посредством катионообменной хроматографии, например, с помощью смолы SP Sepharose F.F. Затем
35 к образцу добавляли раствор ДНАА при молекулярном соотношении 1:20 и проводили реакцию при 25°C в течение 4 часов в темноте для повторного образования межцепочечных дисульфидных связей. Затем добавляли раствор mc-vc-PAB-MMAE для соединения mc-vc-PAB-MMAE с встроенным или мутантным цистеином в антителе, смесь тщательно смешивали и проводили реакцию при 25°C в течение 2 часов. После
40 завершения реакции mc-vc-PAB-MMAE, к которому не было присоединено антитело, удаляли посредством катионообменной хроматографии, например, с помощью SP Sepharose F.F., для получения образца TDC 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE.

Пример 24: Синтез и получение образца TDC 4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE посредством конъюгации/соединения антитела 4E1-LC-Cys206ins и mc-vc-PAB-MMAE

Антитело 4E1-LC-Cys206ins, экспрессируемое клетками, очищали с помощью смолы
45 с протеином А, такой как Mabselect Sure, элюировали раствором с низким рН и нейтрализовали посредством добавления раствора Трис непосредственно после элюции при низком рН, раствор заменяли буфером Трис-НСl с рН 7,5. Соединение mc-vc-PAB-

ММАЕ, представляющее собой белый порошок, растворяли в DMA для последующего использования. Для удаления защитной группы на мутантном остатке цистеина сначала восстанавливали антитело. 1 М водный раствор DTT добавляли к раствору антитела 4E1-LC-Cys20bins при молекулярном соотношении 1:40, смесь равномерно смешивали и проводили реакцию при 20°C в течение 2 часов. По истечении времени реакции pH образца доводили до 5,0 и DTT и защитную группу в смеси удаляли посредством катионообменной хроматографии, например, с помощью смолы SP Sepharose F.F. Затем к образцу добавляли раствор ДНАА при молекулярном соотношении 1:20 и проводили реакцию при 25°C в течение 4 часов в темноте для повторного образования межцепочечных дисульфидных связей. Затем добавляли раствор mc-vc-РАВ-ММАЕ для соединения mc-vc-РАВ-ММАЕ с встроенным или мутантным цистеином в антителе, смесь тщательно смешивали и проводили реакцию при 25°C в течение 2 часов. После завершения реакции mc-vc-РАВ-ММАЕ, к которому не было присоединено антитело, удаляли посредством катионообменной хроматографии, например, с помощью SP Sepharose F.F., для получения образца TDC 4E1-LC-Cys20bins-mc-vc-РАВ-ММАЕ.

Пример 25: Измерение соотношения токсин:антитело (DAR, соотношение лекарственного средства и антитела) посредством HIC-ВЭЖХ

Образец TDC анализировали посредством высокоэффективной жидкостной хроматографии с гидрофобными взаимодействиями и из соответствующей площади пика вычисляли соотношение лекарственное средство:антитело (DAR, также известное как соотношение токсин:антитело). Один конкретный способ подробно описан далее:

Колонка: Proteomix® HICBu⁺NP5 (5 мкм, 4,6×35 мм);

Подвижная фаза: Буфер А: 2 М сульфат аммония, 0,025 М фосфатный буфер, pH 7; буфер В: 0,025 М фосфатный буфер, pH 7; буфер С: 100% изопропанол;

Буфер А использовали для уравнивания, буфер В и буфер С использовали для градиентной элюции, детекцию осуществляли при 25°C и длинах волн 214 нм и 280 нм. Учитывая данные, представленные на фигурах 1-3, вычисленное DAR для сайт-специфического присоединения составляло от 1,6 до 1,7, что свидетельствует об исключительной однородности или гомогенности соединения. Учитывая данные, представленные на фигурах 4-6, вычисленное DAR для сайт-специфического присоединения составляло от 1,6 до 1,95, что свидетельствует об исключительной однородности или гомогенности соединения. Учитывая данные, представленные на фигурах 7-8, вычисленное DAR для сайт-специфического присоединения составляло от 1,6 до 1,9, что свидетельствует об исключительной однородности или гомогенности соединения.

Пример 26: Измерение соотношения токсин:антитело (DAR, соотношение лекарственного средства и антитела) посредством RP-ВЭЖХ

Соотношение токсина и антитела измеряли посредством RP-ВЭЖХ. Образцы, обработанные DTT, анализировали посредством обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с гидрофобными взаимодействиями, и из соответствующей площади пика вычисляли DAR. Один конкретный способ подробно описан далее:

Колонка: Proteomix RP-1000 (5 мкм, 4,6×100 мм)

Подвижная фаза: Буфер А: 0,1% водный раствор TFA; буфер В: 0,1% раствор ацетонитрила.

Подвижную фазу А и подвижную фазу В использовали для элюции в пропорциональном градиенте при 80°C, измерение осуществляли при длинах волн 214 нм и 280 нм. Учитывая данные, представленные на фигуре 9, вычисленное DAR для

сайт-специфического присоединения составляло 1,82, что свидетельствует об исключительной однородности или гомогенности соединения.

Таблица I: Эффективность присоединения в соответствии с DAR в случае ADR TDC 2A1-LC-V205C-mc-vc-PAB-MMAE, TDC 2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE, TDC 2A1-LC-Cys206ins--mc-vc-PAB-MMAE, 2A1-NC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4E1-NC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC, 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4D3-NC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE

	Соединения	DAR
	TDC 2A1-LC-V205C-mc-vc-PAB-MMAE	1,81
	TDC 2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE	1,72
	TDC 2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE	1,65
	TDC 2A1-NC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE	1,74
	TDC 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE	1,92
	TDC 4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE	1,64
	TDC 4E1-NC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE	1,75
	TDC 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE	1,81
	TDC 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE	1,74
	TDC 4D3-NC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE	1,82

В таблице I показано, что эффективность присоединения для сайт-специфических соединений TDC при модификации в виде мутации с инсерцией цистеина является однородно высокой (теоретический максимум составляет 2,0) с $DAR \geq 1,6$.

Пример 27: Измерение агрегации антитела-основы TDC посредством SEC-ВЭЖХ

Образцы антитела-основы TDC хранили при 37°C и их агрегацию анализировали посредством SEC-ВЭЖХ в дни 0, 7, 21 и 29, соответственно. Один конкретный способ подробно описан далее:

Хроматографические колонки: TSKgel SuperSW mAb HR (7,8 мм×30см),

Подвижная фаза: 0,1 М сульфат натрия, 0,1 М фосфатный буфер, pH 6,7,

Измерения осуществляли при 25°C, 280 нм.

Как показано на фигурах 10-13, SEC-ВЭЖХ использовали для детекции и измерения агрегации антитела-основы TDC 4D3, 4D3-LC-Cys205ins, 4D3-LC-Cys206ins и 4D3-NC-Cys439ins. Образцы хранили при 37°C в течение 4 недель, и содержание агрегатов оставалось, по существу, неизменным.

Используя тот же способ детекции и измерения, измеряли агрегацию следующих TDC: TDC 2A1-LC-V205C-mc-vc-PAB-MMAE, TDC 2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE, TDC 2A1-LC-Cys206ins--mc-vc-PAB-MMAE, 2A1-NC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE 4E1-NC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC, 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4D3-NC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC. Результаты представлены в таблице II

Таблица II: содержание целевого мономера TDC в случае TDC 2A1-LC-V205C-mc-vc-PAB-MMAE, TDC 2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE, TDC 2A1-LC-Cys206ins--mc-vc-PAB-MMAE и 2A1-NC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4E1-NC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE TDC, 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE, 4D3-NC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE

	Соединение	POI%
10	TDC 2A1-LC-V205C-mc-vc-PAB-MMAE	96,0%
	TDC 2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE	90,0%
	TDC 2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE	90,4%
15	TDC 2A1-NC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE	90,0%
	TDC 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE	98,18%
	TDC 4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE	94,34%
	TDC 4E1-NC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE	95,77%
20	TDC 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE	97,27%
	TDC 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE	96,06%
	TDC 4D3-NC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE	96,98%

25 Как показано в таблице II, содержание целевого мономера соединения TDC, соединенного посредством встроенного цистеина, составляет более 90%.

30 Пример 28: Измерение аффинностей антител-основ, подвергнутого сайт-специфическому мутагенезу и инсерционному мутагенезу для встраивания цистеина, и родительских антител к EGFRvIII, аффинностей антител 4E1 к c-met, аффинностей антител 4D3 к Trop2

Относительные аффинности 2A1-LC-V205C, 2A1-LC-Cys205ins, 2A1-LC-Cys206ins, 2A1-NC-Cys439ins и 2A1 к EGFRvIII сравнивали посредством непрямого ELISA. Конкретные стадии являлись следующими:

35 Покрытый рекомбинантным антигеном EGFRvIII-His*6 планшет блокировали желатином из рыбьей кожи; антитела 2A1, 2A1-LC-V205C, 2A1-LC-Cys205ins, 2A1-LC-Cys206ins и 2A1-NC-Cys439ins соответствующим образом разводили с использованием 4-кратного градиента всего с 11 концентрациями, при этом наибольшая концентрация составляла 10 мкг/мл; осуществляли инкубацию с HRP-меченым вторичным антителом; 40 после окрашивания ТМВ определяли и измеряли поглощение при 450 нм. Строили график результатов измерения поглощения при A450 относительно концентрации. Мутантные антитела 2A1-LC-V205C, 2A1-LC-Cys205ins, 2A1-LC-Cys206ins и 2A1-NC-Cys439ins, подвергнутые сайт-специфическому мутагенезу или инсерции цистеина, сохраняли аффинности к EGFRvIII, схожие с 2A1, о чем свидетельствуют близкие значения EC₅₀; эти результаты свидетельствуют о том, что сайт-специфический мутагенез 45 V205C легкой цепи антитела 2A1, инсерционная мутация в положении 205 легкой цепи антитела, инсерционная мутация в положении 206 легкой цепи антитела или инсерционная мутация в положении 439 тяжелой цепи антитела не влияют на аффинность

к антигену EGFRvIII.

Как показано на фигуре 14, антитела 2A1-LC-V205C, 2A1-LC-Cys205ins, 2A1-LC-Cys206ins, 2A1-NC-Cys439ins сохраняют аффинность 2A1 к антигену EGFRvIII.

Пример 29: Измерение аффинностей антител-основ, подвергнутых сайт-специфическому мутагенезу и инсерционному мутагенезу для встраивания цистеина и соединенных с токсином/лекарственным средством, против когнатных антигенов, аффинностей антител 4E1 к c-met, аффинностей антител 4D3 к Trop2

Относительные аффинности 4E1-LC-Cys205ins-MVPM, 4E1-LC-Cys206ins-MVPM, 4E1-NC-Cys439ins-MVPM и 4E1 к C-met сравнивали посредством непрямого ELISA.

Конкретные стадии являлись следующими:

Покрытый рекомбинантным антигеном C-met-His*6 планшет блокировали желатином из рыбьей кожи; TDC 4E1-LC-Cys205ins-MVPM, 4E1-LC-Cys206ins-MVPM, 4E1-NC-Cys439ins-MVPM и антитело 4E1 соответствующим образом разводили с использованием 4-кратного градиента всего с 11 концентрациями, при этом наибольшая концентрация составляла 10 мкг/мл; осуществляли инкубацию с HRP-меченым вторичным антителом; после окрашивания ТМВ определяли и измеряли поглощение при 450 нм. Строили график результатов измерения поглощения при А450 относительно концентрации, и результаты свидетельствовали о том, что антитела, имеющие сайт-специфическую мутацию с инсерцией цистеина, TDC4E1-LC-Cys205ins-MVPM, 4E1-LC-Cys206ins-MVPM и 4E1-NC-Cys439ins-MVPM, сохраняли свои аффинности связывания с C-met, схожую с 4E1, на что указывают близкие значения EC_{50} ; это свидетельствует о том, что инсерционная мутация в положении 205 или 206 легкой цепи 4E1 или в положении 439 тяжелой цепи 4E1 не влияет на аффинность связывания соответствующего TDC с антигеном c-met.

Относительные аффинности 4D3-LC-Cys205ins-MVPM, 4D3-LC-Cys206ins-MVPM, 4D3-NC-Cys439ins-MVPM и 4D3 к Trop2 сравнивали посредством непрямого ELISA. Конкретные стадии являлись следующими:

Покрытый рекомбинантным антигеном Trop2-His*6 планшет блокировали желатином из рыбьей кожи; TDC 4D3-LC-Cys205ins-MVPM, 4D3-LC-Cys206ins-MVPM, 4D3-NC-Cys439ins-MVPM и антитело 4D3 соответствующим образом разводили с использованием 4-кратного градиента всего с 11 концентрациями, при этом наибольшая концентрация составляла 10 мкг/мл; осуществляли инкубацию с HRP-меченым вторичным антителом; после окрашивания ТМВ определяли и измеряли поглощение при 450 нм. Строили график результатов измерения поглощения при А450 относительно концентрации. TDC4D3-LC-Cys205ins-MVPM, 4D3-LC-Cys206ins-MVPM и 4D3-NC-Cys439ins-MVPM сохраняли свои аффинности связывания с Trop2, схожие с 4D3, на что указывают близкие значения EC_{50} ; что свидетельствует о том, что инсерционная мутация в положении 205 или 206 легкой цепи 4D3 или в положении 439 тяжелой цепи 4D3 не влияет на аффинность связывания соответствующего TDC с антигеном Trop2.

Как показано на фигуре 15, антитела 4E1-LC-Cys205ins-MVPM, 4E1-LC-Cys206ins-MVPM, 4E1-NC-Cys439ins-MVPM сохраняли аффинность 4E1 к антигену c-met.

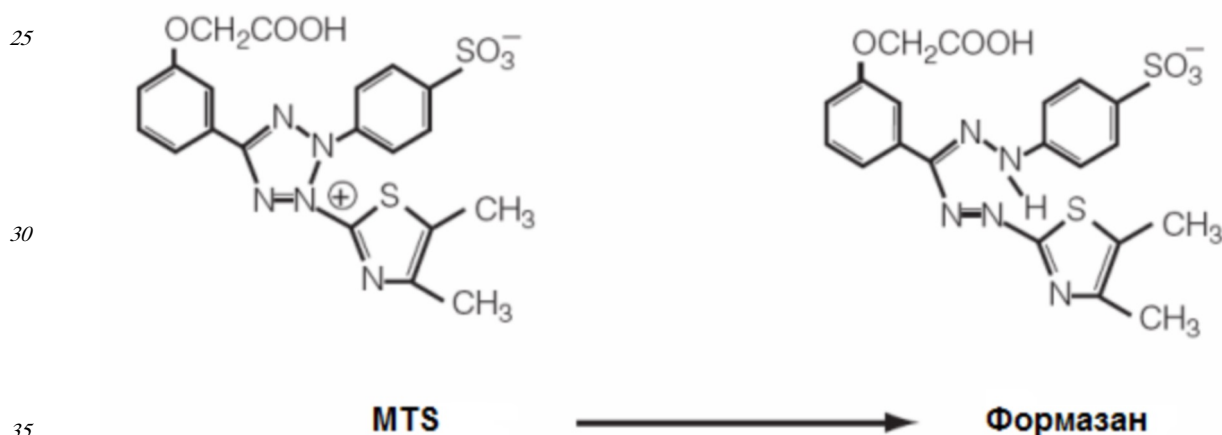
Как показано на фигуре 16, антитела 4D3-LC-Cys205ins-MVPM, 4D3-LC-Cys206ins-MVPM, 4D3-NC-Cys439ins-MVPM сохраняли аффинность 4D3 к антигену Trop2.

Пример 30: Тестирование цитотоксичности и фармацевтической эффективности

Цитотоксическую активность TDC определяли с помощью следующего эксперимента: TDC отдельно добавляли в среды для культивирования опухолевых клеток человека, в которых гиперэкспрессировался EGFR или экспрессировался EGFRvIII, и измеряли жизнеспособность клеток через 72 часа культивирования клеток. В настоящем описании

клеточные анализы *in vitro* использовали для определения жизнеспособности клеток, цитотоксичности и TDC-индуцированного апоптоза.

Эффективность *in vitro* конъюгата «антитело-цитотоксин» определяли посредством анализа пролиферации клеток. В одном из вариантов осуществления анализ пролиферации клеток CellTiter 96® AQueous One Solution является коммерчески доступным (Promega Corp., Madison, WI). Анализ пролиферации клеток (а) представляет собой детекцию реагента, в которой колориметрию используют для определения количества жизнеспособных клеток в экспериментах, касающихся пролиферации клеток и цитотоксичности. Этот реагент содержит новое соединение тетразолия [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2H-тетразолий, внутренняя соль; MTS] и связующее вещество для электронного взаимодействия (этосульфат феназина; PES). PES имеет повышенную химическую стабильность, что позволяет смешивать его с MTS с получением стабильного раствора. Этот удобный режим "одного раствора" основан на первом поколении анализа CellTiter 96® AQueous, в котором связующее вещество для электронного взаимодействия PMS и раствор MTS поставляют отдельно. MTS (реагент Оуэна) биологически восстанавливается клетками до окрашенного формазанового продукта, растворимого непосредственно в среде (фигура 1). Это преобразование, вероятнее всего, происходит под действием NADPH или NADH, продуцируемых под действием дегидрогеназы в метаболически активных клетках. Для детекции небольшое количество реагента CellTiter 96® AQueous One Solution просто добавляют в лунку со средой для культивирования, инкубируют в течение 1-4 часов, а затем считывают поглощение при 490 нм с помощью микроспектрофотометра для чтения планшетов.



Количество формазанового продукта, определяемого при 490 нм, прямо пропорционально количеству жизнеспособных клеток в культуре. Т.к. гипертиреотидный продукт MTS растворим в средах для культивирования тканей, анализ CellTiter 96® AQueous One Solution включает меньше стадий, чем способ МТТ или INT.

40 В настоящем описании А431 (EGFR-гиперэкспрессирующие клетки), U87-EGFRVIII (стабильную линию клеток с мутантным EGFR), U87-MG (линию клеток глиобластомы с высокоэкспрессируемым c-Met) и ВХРС-3 (линию клеток рака поджелудочной железы с высокой экспрессией Trop2) используют в качестве исследовательских систем для тестирования эффективности лекарственного средства *in vitro*. В 96-луночный планшет высевали клетки при концентрации 6000 клеток/лунку и через 24 часа добавляли антитело. Исходная концентрация различных TDC, соответствующих линиям клеток А431 и U87-EGFRVIII, составляла 10 мкМ, которые последовательно разводили в соответствии с 5-кратным градиентом. Исходные концентрации различных TDC,

соответствующих линиям клеток U87-MG и ВХРС-3, составляли 1 мкМ, который последовательно разводили в соответствии с 5-кратным градиентом. Анализ MTS на жизнеспособность клеток осуществляли через 72 часа обработки

Таблица III: Определение IC₅₀ для цитотоксичности TDC, ADC в отношении EGFRwt-гиперэкспрессирующей линии клеток A431 и стабильной линии клеток, экспрессирующей EGFRvIII, U87-EGFRvIII

	Соединения	MTS				
		A431	U87MG-EGFRvIII	U87-MG	ВХРС-3	
10	Антитело 2A1	2A1	>10 мкМ	>10 мкМ	/	/
		2A1-LC-V205C	>10 мкМ	>10 мкМ	/	/
		2A1-LC-Cys205ins	>10 мкМ	>10 мкМ	/	/
		2A1-LC-Cys206ins	>10 мкМ	>10 мкМ	/	/
		2A1-NC-Cys439ins	>10 мкМ	>10 мкМ	/	/
15	Сайт-специфическое присоединение (TDC)	2A1-LC-V205C-mc-vc-PAB-MMAE	92,16 нМ	296,11 нМ	/	/
		2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE	133,67 нМ	492,14 нМ	/	/
		2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE	179,26 нМ	457,48 нМ	/	/
		2A1-NC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE	26,62 нМ	118,52 нМ	/	/
	Антитело 4E1	4E1	/	/	>1 мкМ	/
20	Сайт-специфическое присоединение (TDC)	4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE	/	/	120,50нМ	/
		4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE	/	/	79,57нМ	/
		4E1-NC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE	/	/	7,41нМ	/
	Антитело 4D3	4D3	/	/	/	>1 мкМ
25	Сайт-специфическое присоединение (TDC)	4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE	/	/	/	0,38 нМ
		4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE	/	/	/	0,45 нМ
		4D3-NC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE	/	/	/	0,23 нМ

Данные из таблицы III свидетельствуют о том, что TDC 2A1-LC-V205C-mc-vc-PAB-MMAE, TDC 2A1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE, TDC 2A1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE и TDC 2A1-NC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE имеют сравнимую цитотоксическую активность в отношении EGFRwt-гиперэкспрессирующей линии клеток A431 и стабильной линии клеток, экспрессирующей EGFRvIII, U87-EGFRvIII, и активность TDC с инсерцией в положении 439 немного выше, чем у TDC с инсерцией в положении 205 и 206.

Наблюдали некоторую корреляцию между цитотоксической активностью и положением присоединения в случае TDC 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE, TDC 4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE и TDC 4E1-NC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE в клетках U87-MG. Активность TDC с инсерцией в положении 439 была немного лучше, чем у мутантов с инсерцией в положении 205 и 206. Активность TDC была значимо лучше, чем у родительского антитела.

Цитотоксические активности TDC 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAB-MMAE, TDC 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAB-MMAE и TDC 4D3-NC-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE в отношении линии клеток рака поджелудочной железы ВХРС-3 были сравнимыми или схожими друг с другом, и активность TDC мутанта с инсерцией в положении 439 была немного лучше, чем у TDC с инсерцией в положении 205 и 206, и активность TDC была значимо лучше, чем у родительского антитела.

Пример 31: Тестирование стабильности в плазме

Брали некоторое количество образца ADC, добавляли к плазме человека, из которой удаляли IgG человека, использовали 2 пробирки для каждого ADC, инкубировали на

водяной бане при 37°C, инкубировали в течение 0 ч, 72 ч, брали образцы ADC, добавляли 100 мкл протеина А (MabSelect SuRe™ LX, кат. № 10221479 GE, промытого PBS), встряхивали в течение 2 ч с помощью вертикальной мешалки и подвергали стадиям промывки и элюции для получения ADC после инкубации. Образцы, подвергнутые инкубации в течение некоторого времени, подвергали НИС-ВЭЖХ и RP-ВЭЖХ для определения стабильности образцов в плазме.

На фигурах 21-23 показаны результаты тестирования стабильности в плазме человека для TDC 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAВ-MMAE, TDC 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAВ-MMAE и TDC 4D3-НС-Cys439ins-mc-vc-PAВ-MMAE. Способом детекции 4D3-НС-Cys439ins-mc-vc-PAВ-MMAE являлась RP-ВЭЖХ; способом детекции TDC 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAВ-MMAE и 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc являлась НИС-ВЭЖХ.

На фигурах 24-26 показаны результаты тестирования стабильности в плазме человека для TDC 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAВ-MMAE, TDC 4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAВ-MMAE и TDC 4E1-НС-Cys439ins-mc-vc-PAВ-MMAE. Способом детекции являлась НИС-ВЭЖХ.

Таблица IV: Результаты тестирования стабильности TDC в плазме (вычисленной по изменению DAR)

	Соединение	DAR	
		37°C, 0 ч.	37°C, 72 ч.
Сайт-специфическое присоединение (TDC)	TDC 4E1-LC-Cys205ins-mc-vc-PAВ-MMAE	1,89	1,77
	TDC 4E1-LC-Cys206ins-mc-vc-PAВ-MMAE	1,81	1,62
	TDC 4E1-НС-Cys439ins-mc-vc-PAВ-MMAE	1,85	1,83
	TDC 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAВ-MMAE	1,86	1,71
	TDC 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAВ-MMAE	1,76	1,52
	TDC 4D3-НС-Cys439ins-mc-vc-PAВ-MMAE	1,81	1,80

Указанные выше TDC были стабильными после инкубации при 37°C в течение 72 часов в образцах плазмы человека и имели хорошие свойства, касающиеся образования лекарственного средства. Для сравнения, TDC с инсерционными мутациями в положении 439 имели лучшую стабильность, после них следовали TDC с инсерционными мутациями в положениях 205 и 206.

Пример 32: Тестирования фармацевтической эффективности у несущих опухоль мышей

Как представлено в настоящем описании, разрабатывали модель несущих опухоль ВХРС-3 мышей для оценки эффективности TDC и родительских антител *in vivo*. В одном из вариантов осуществления 3×10^6 клеток ВХРС-3 подкожно инъецировали в спину безтимусным мышам BALB/c Nude возрастом 4-8 недель и, когда средний размер опухоли у мышей достигал 400-500 мм³, их случайным образом распределяли по группам, по 5 мышей в каждую группу. В день 0 и день 7 TDC 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAВ-MMAE, TDC 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAВ-MMAE и TDC 4D3-НС-Cys439ins-mc-vc-PAВ-MMAE вводили в однократной внутривенной дозе 5 мг/кг, а родительское антитело 4D3 вводили в дозе 5 мг/кг. Данные А включают средний объем опухоли \pm SE во время измерения, и данные В включают среднюю массу тела мыши во время измерения \pm SE.

На фигуре 27 показаны результаты тестирования эффективности у несущих опухоль мышей в случае TDC 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAВ-MMAE, TDC 4D3-LC-Cys206ins-mc-vc-PAВ-MMAE, TDC 4D3-НС-Cys439ins-mc-vc-PAВ-MMAE и 4D3. TDC демонстрировали значительный противоопухолевый эффект *in vivo* по сравнению с родительскими антителами.

На фигуре 28 показаны результаты тестирования эффективности у несущих опухоль мышей в случае TDC 4D3-LC-Cys205ins-mc-vc-PAВ-MMAE TDC, 4D3-LC-Cys206ins-mc-

vc-PAB-MMAE, TDC 4D3-НС-Cys439ins-mc-vc-PAB-MMAE и родительского антитела 4D3. Не наблюдали значимого изменения массы тела мышей, что подтвердило, что TDC не имеют токсичности или имеют незначительную активность *in vivo*.

Изобретение не ограничено объемом конкретных вариантов осуществления, представленных в описании вариантов осуществления, предназначенных для иллюстрирования нескольких аспектов изобретения, и любые варианты осуществления, являющиеся функциональными эквивалентами, входят в объем изобретения. Фактически, различные модификации изобретения очевидны специалистам в этой области и входят в объем формулы изобретения.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Таблица V: аминокислоты

Название	Символ или аббревиатура
Аланин	A или Ala
Аргинин	R или Arg
Аспарагин	N или Asn
Аспарагиновая кислота	D или Asp
Цистеин	C или Cys
Глутамин	Q или Gln
Глутаминовая кислота	E или Glu
Глицин	G или Gly
Гистидин	H или His
Изолейцин	I или Ile
Лейцин	L или Leu
Лизин	K или Lys
Метионин	M или Met
Фенилаланин	F или Phe
Пролин	P или Pro
Серин	S или Ser
Треонин	T или Thr
Триптофан	W или Trp
Тирозин	Y или Tyr
Валин	V или Val

SEQ ID NO: 1 Последовательность ДНК константной области тяжелой цепи (Fc) >IgG1-Fc

GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCT
 CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG
 ACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGT
 CCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG
 CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
 TGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCGTGC
 CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAACCCAAG
 GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG
 CCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA
 ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
 CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
 TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG
 CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAA
 GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG
 TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGT
 GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG

GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC
 ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AAA

SEQ ID NO: 2 Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи (Fc)

5 >IgG1-Fc

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
 LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
 10 LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 3 Последовательность ДНК константной области легкой цепи (каппа)

>LC-каппа

ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT
 15 CTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG
 TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT CACA
 GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCA
 AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG
 AGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

20 SEQ ID NO: 4 Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи (каппа)

>LC-каппа

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
 QDSKDYSLSSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

25 SEQ ID NO: 5 Последовательность ДНК константной области легкой цепи 2A1-LC-Cys205ins (каппа)

>LC-Cys205ins-каппа

ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT
 CTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG
 30 TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT CACA
 GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCA
 AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG
 AGCTCGCCCTGCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

35 SEQ ID NO: 6 Аминокислотная последовательность константная область легкой цепи (каппа) LC-Cys205ins

>LC-Cys205ins-каппа

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
 QDSKDYSLSSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPCVTKSFNRGEC

40 где C в GLSSPCVTKSFN является положением сайт-специфической конъюгации. В одном из вариантов осуществления цистеин сайт-специфически конъюгируют с mc-vc-PAВ-нагрузкой.

SEQ ID NO: 7 Последовательность ДНК константной области легкой цепи (каппа) LC-Cys206ins

>LC-Cys206ins-каппа

45 ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT
 CTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG
 TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGT CACA
 GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCA

AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG
AGCTCGCCCGTCTGACACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO: 8 Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи (каппа) LC-Cys206ins

5 >LC-Cys206ins-каппа

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
QDSKDYESTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVCTKSFNRGEC

10 где С в GLSSPVCTKSFN является положением сайт-специфической конъюгации. В одном из вариантов осуществления цистеин сайт-специфически конъюгируют с mc-vc-PAВ-нагрузкой.

SEQ ID NO: 9 Последовательность ДНК константной области тяжелой цепи (Fc) IgG1-Fc-Cys439ins

>IgG1-Fc-Cys439ins

15 GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCT
CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTG
ACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGT
CCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAG
CCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
TGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC
20 CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAACCCAAG
GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG
CCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA
ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
CGTCCCTACCGTCCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
25 TCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG
CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAA
GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGT
GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAG
30 GTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC
ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCTGCTGTCTCCGGGTA

SEQ ID NO: 10 Аминокислотная последовательность константной области тяжелой цепи (Fc) IgG1-Fc-Cys439ins

>IgG1-Fc-Cys439ins

35 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL
40 TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

где С в последовательности TQKSLSLSPGK является положением сайт-специфической конъюгации/присоединения, и его подвергают сайт-специфической конъюгации с mc-vc-PAВ-нагрузкой.

SEQ ID NO: 11 Последовательность ДНК константной области легкой цепи (каппа) LC-V205C

45 >LC-V205C-каппа

ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT
CTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAG

TACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACACA
 GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCA
 AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG
 AGCTCGCCCTGCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

5 SEQ ID NO: 12 Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи (каппа) LC-V205C

>LC-V205C-каппа

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
 QDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPCTKSFNRGEC

10 где С в последовательности GLSSPCTKSFN является положением сайт-специфической конъюгации/присоединения, и его подвергают сайт-специфической конъюгации с mc-vc-PAB-нагрузкой.

SEQ ID NO: 13 Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи (каппа) LC-V205C

15 GLSSPCVTKSF

SEQ ID NO: 14 Аминокислотная последовательность константной области легкой цепи (каппа) LC-V206C

GLSSPVCTKS

SEQ ID NO: 15 Аминокислотная последовательность тяжелой цепи

20 TQKSLSCLSPGK

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> SICHUAN BALI PHARM CO., LTD.

<120> КОНЪЮГАТ «ЦИСТЕИН-МОДИФИЦИРОВАННОЕ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО»
 И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

25 <130> SIBA1001US

<150> PCT/CN2017/104706

<151> 2017-09-30

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

30 <210> 1

<211> 990

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

35 <223> Синтезированная

<400> 1

gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg ccttgggctg cctggtaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgctg 120
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
 40 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 300
 aaatcttggtg acaaaactca cacatgccc cctgtgccag cacctgaact cctgggggga 360
 ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctc 420
 gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgagggtcaa gttcaactgg 480
 45 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
 agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag 600
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 720

ctgaccaaga accagggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccggtggacaa gaggcagggtg 900
cagcaggggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
5 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990
<210> 2
<211> 330
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
10 <220>
<223> Синтезированная
<400> 2
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
15 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
20 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
25 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
30 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
35 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
40 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
45 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

5 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 3
 <211> 321
 <212> ДНК

10 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтезированная
 <400> 3

acgggtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60
 15 actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120
 aagggtgata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180
 aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 240
 cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc 300
 ttcaacaggg gagagtgtta g 321

20 <210> 4
 <211> 106
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

25 <223> Синтезированная
 <400> 4

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 1 5 10 15
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 30 20 25 30
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60

35 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 85 90 95

40 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 5
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

45 <220>
 <223> Синтезированная
 <400> 5

acgggtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60

actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120
aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180
aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 240
cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgccctg cgtcaciaaag 300
5 agcttcaaca ggggagagtg ttag 324
<210> 6
<211> 107
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
10 <220>
<223> Синтезированная
<400> 6
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15
15 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 25 30
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45
20 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95
25 Cys Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105
<210> 7
<211> 324
<212> ДНК
30 <213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Синтезированная
<400> 7
acgggtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60
35 actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120
aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180
aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 240
cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccctg ctgcaciaaag 300
agcttcaaca ggggagagtg ttag 324
40 <210> 8
<211> 107
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность
<220>
45 <223> Синтезированная
<400> 8
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

RU 2762594 C2

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45
 5 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 10 85 90 95
 Val Cys Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105
 <210> 9
 <211> 993
 15 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтезированная
 <400> 9
 20 gctagcacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg 120
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 300
 25 aaatcttggtg acaaaactca cacatgcca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 360
 ccgtcagtct tcctcttccc ccaaaaacc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 420
 gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc gcgaggagga gcagtacaac 540
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
 30 gagtacaagt gcaaggctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggatgag 720
 ctgaccaaga accagggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
 ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
 35 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag 960
 cagaagagcc tctcctgcct gtctccgggt aaa 993
 <210> 10
 <211> 331
 <212> Белок
 40 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Синтезированная
 <400> 10
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 45 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

RU 2 762 594 C2

	35		40		45														
	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser			
	50						55					60							
	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr			
5	65					70				75					80				
	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys			
				85					90					95					
	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys			
				100					105					110					
10	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro			
				115					120					125					
	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys			
	130						135						140						
	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp			
15	145					150				155					160				
	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu			
				165					170					175					
	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu			
				180					185					190					
20	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn			
			195					200					205						
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly			
			210					215					220						
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu			
25	225					230				235					240				
	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr			
				245						250					255				
	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn			
				260					265					270					
30	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe			
			275					280					285						
	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn			
			290					295				300							
	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr			
35	305					310				315					320				
	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Cys	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
				325						330									

<210> 11

<211> 321

40 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 11

45	acgg	tg	gctg	cacc	atctgt	cttca	tcttc	ccgc	catctg	atgag	cagtt	gaaat	ctgga	60
	actg	cctctg	ttgt	gtgc	ctgct	gctga	aataac	ttct	atccca	gagag	gcca	agtac	agtgg	120
	aagg	tg	gata	acgc	ctcca	atcgg	gtaac	tccc	aggaga	gtgt	cacaga	gcagg	acagc	180
	aagg	acag	ca	cctac	agcct	cagc	agcacc	ctgac	gctga	gcaa	agcaga	ctac	gagaaa	240

cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcctg cacaaagagc
 ttcaacaggg gagagtgtta g 321

<210> 12

<211> 106

5 <212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 12

10 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 1 5 10 15

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 15 35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80

20 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 85 90 95

Cys Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 13

25 <211> 11

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

30 <400> 13

Gly Leu Ser Ser Pro Cys Val Thr Lys Ser Phe
 1 5 10

<210> 14

<211> 10

35 <212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 14

40 Gly Leu Ser Ser Pro Val Cys Thr Lys Ser
 1 5 10

<210> 15

<211> 12

<212> Белок

45 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная

<400> 15

и

удаление неконъюгированного линкера-цитотоксина посредством катионообменной хроматографии или ультрафильтрации.

5

10

15

20

25

30

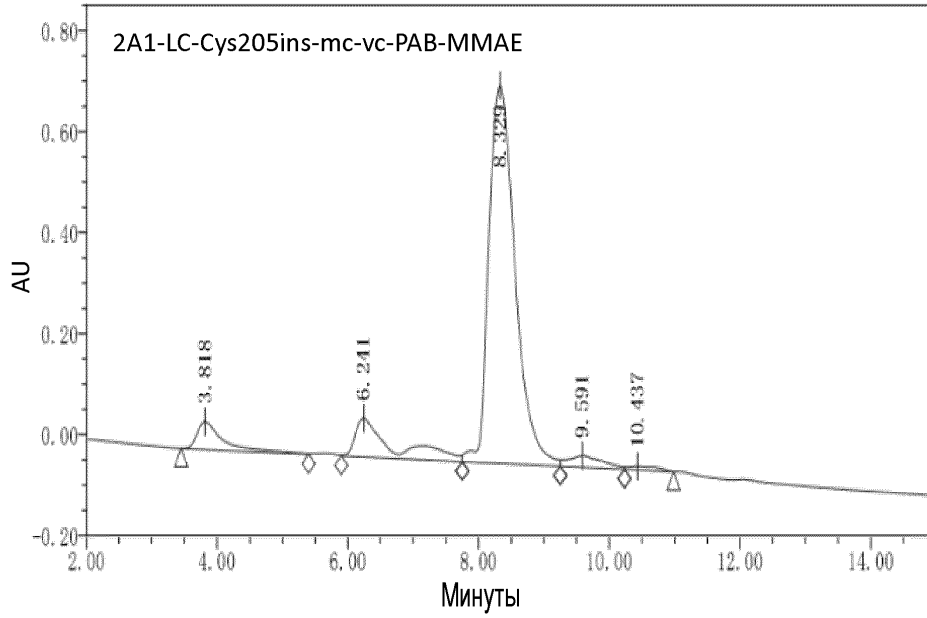
35

40

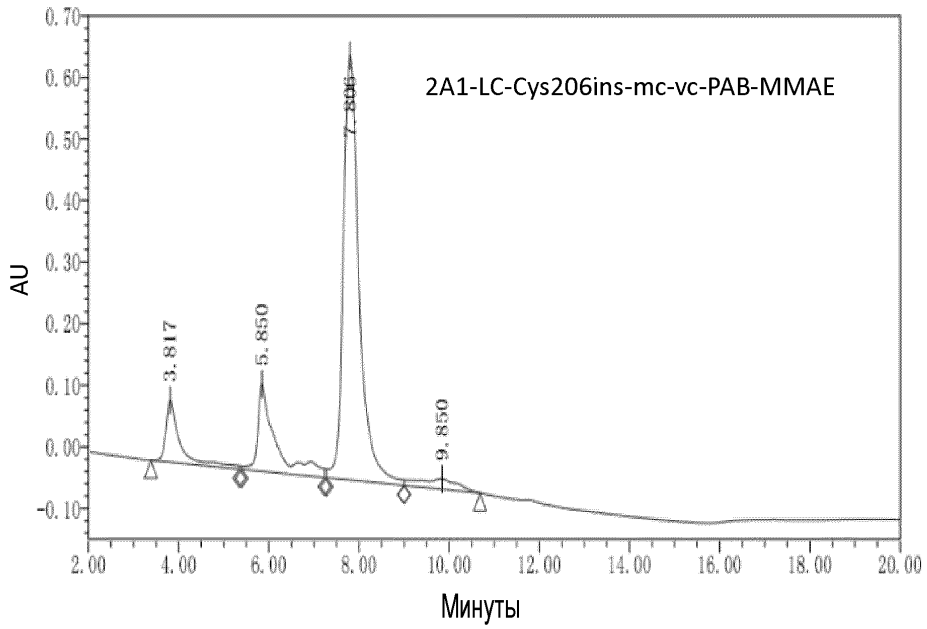
45

1

1/14



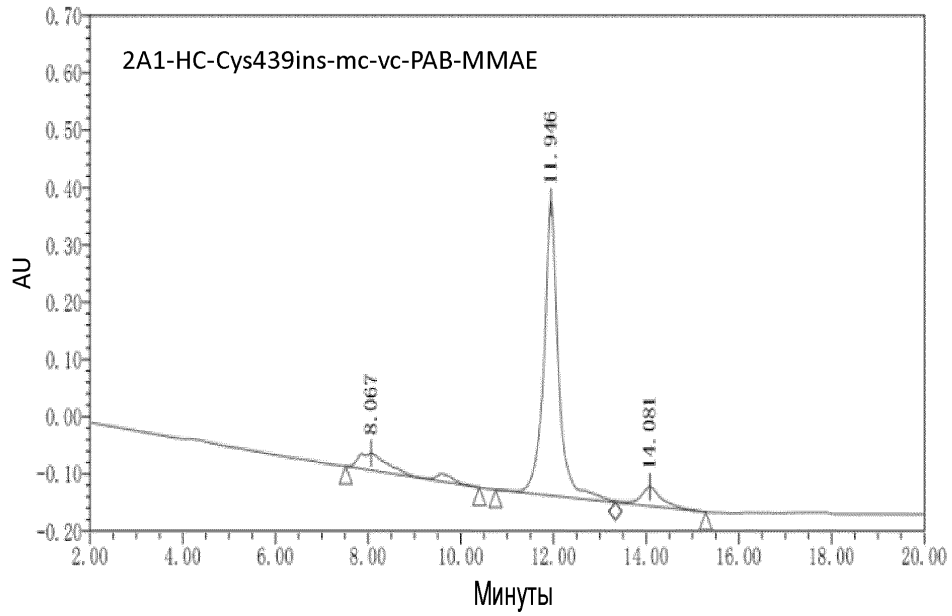
ФИГ. 1



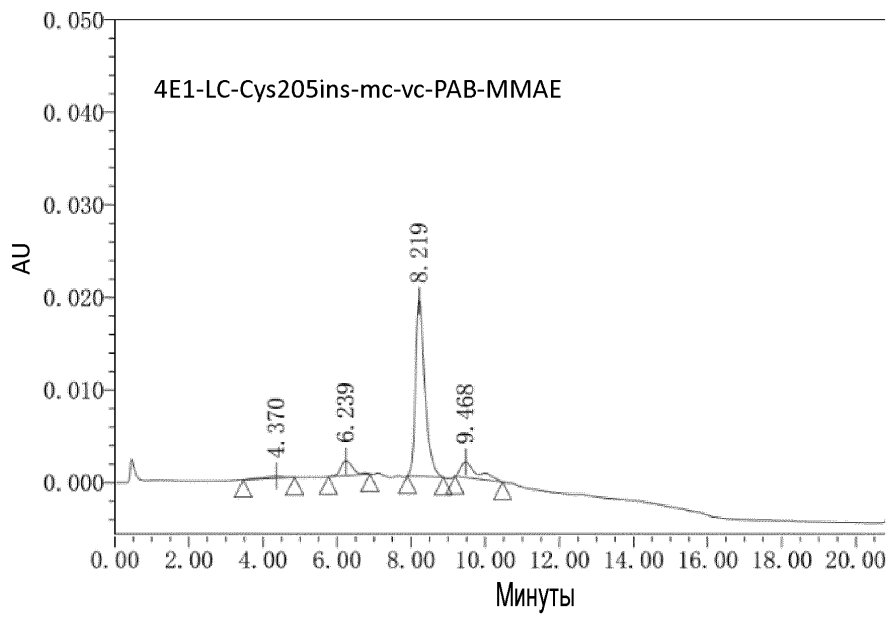
ФИГ. 2

2

2/14

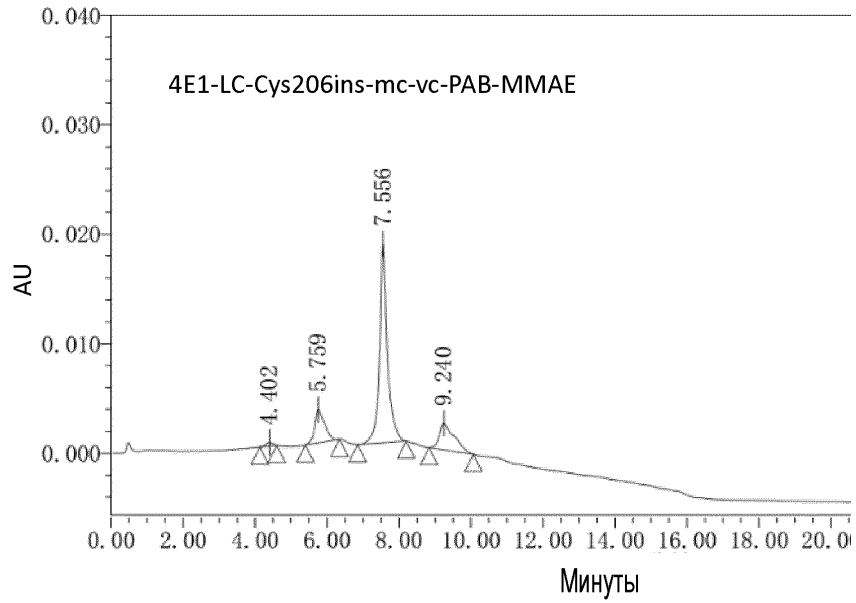


ФИГ. 3

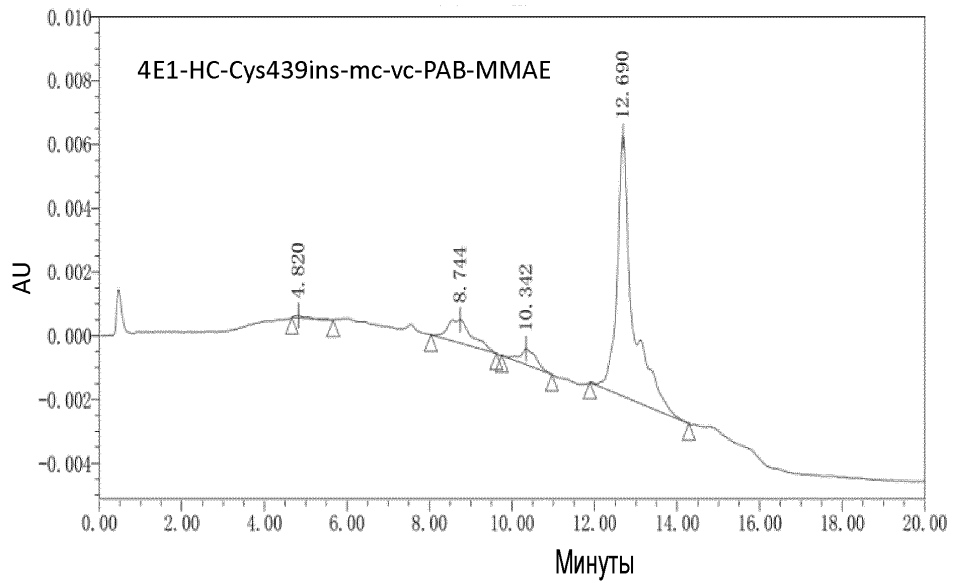


ФИГ. 4

3/14

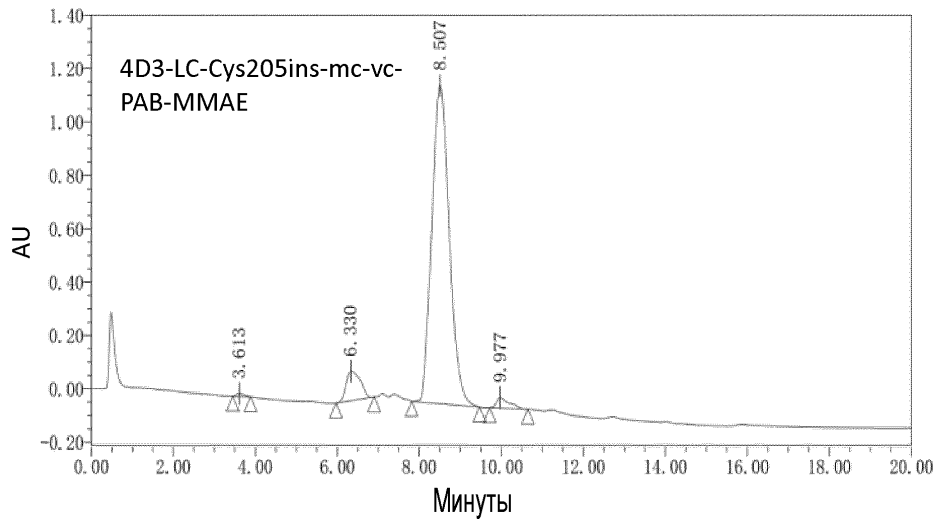


ФИГ. 5

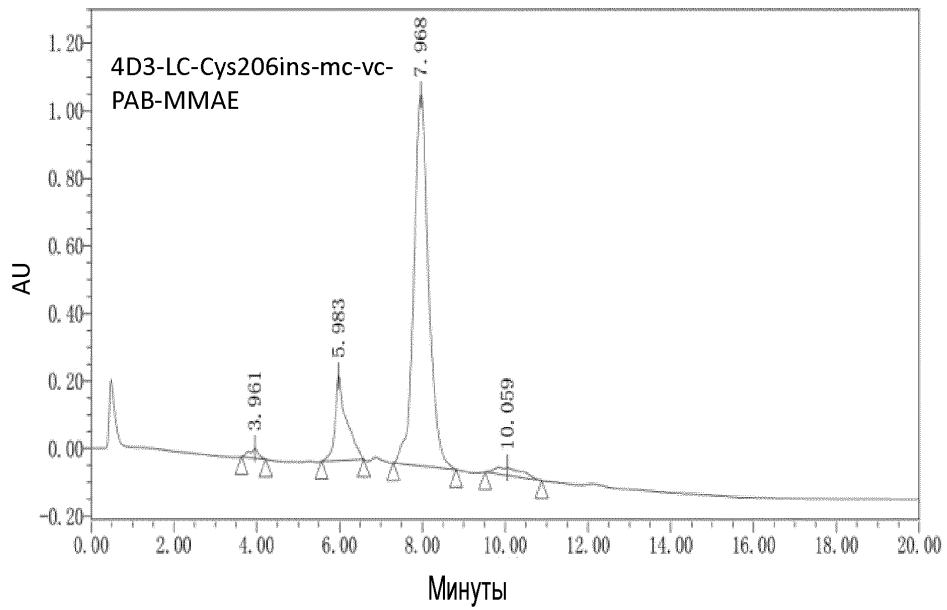


ФИГ. 6

4/14

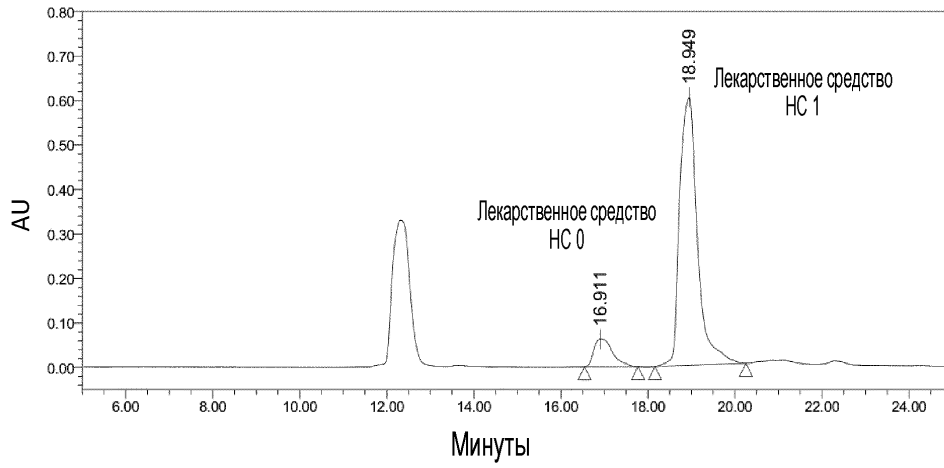


ФИГ.7

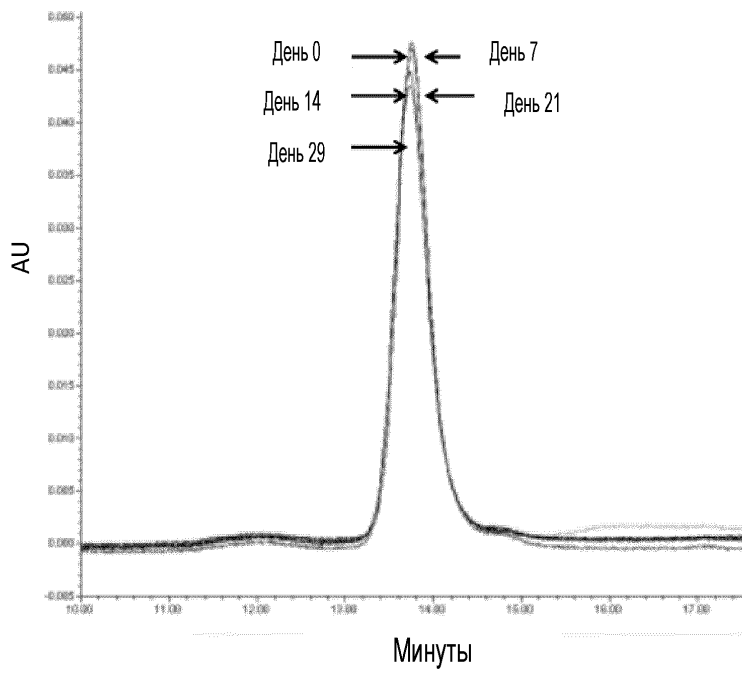


ФИГ.8

5/14

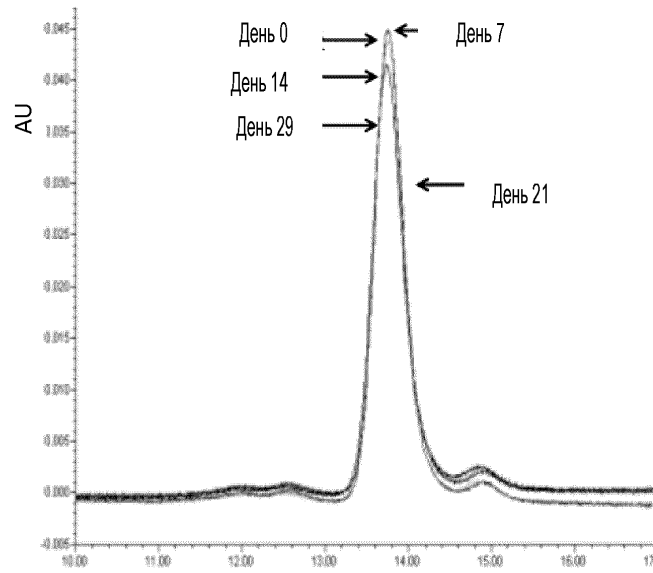


ФИГ. 9

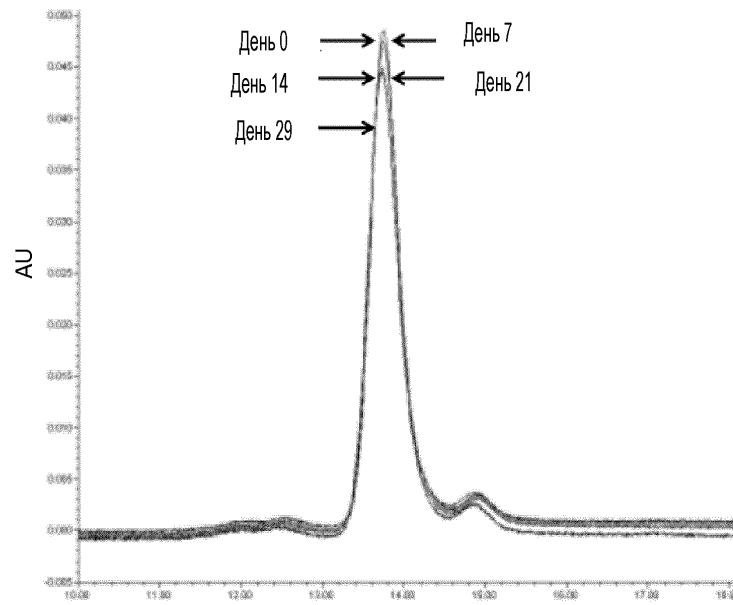


ФИГ. 10

6/14

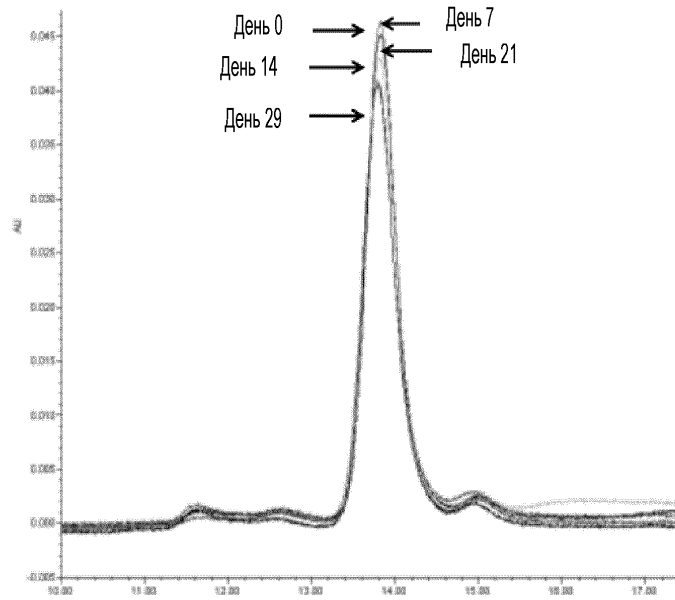


ФИГ. 11



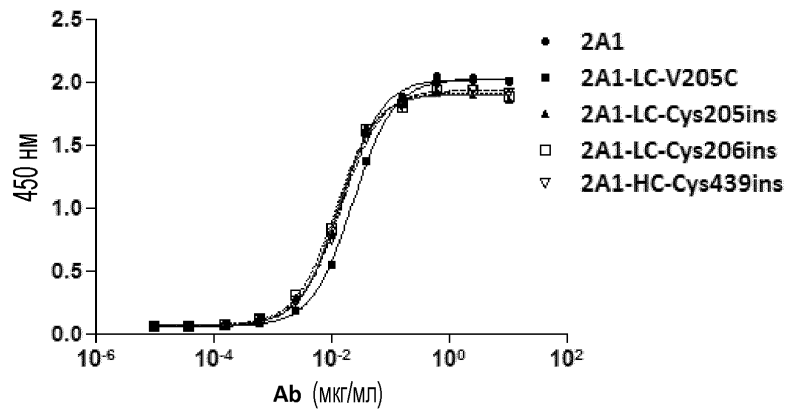
ФИГ. 12

7/14



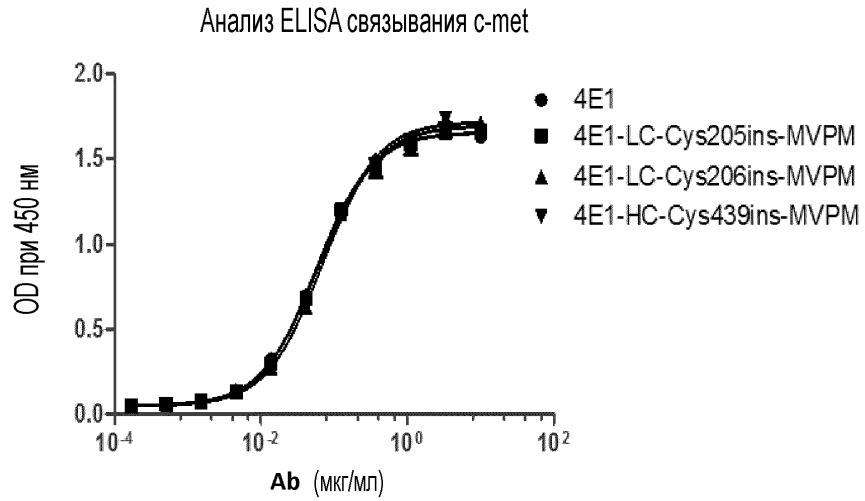
ФИГ. 13

Анализ ELISA связывания EGRF VIII

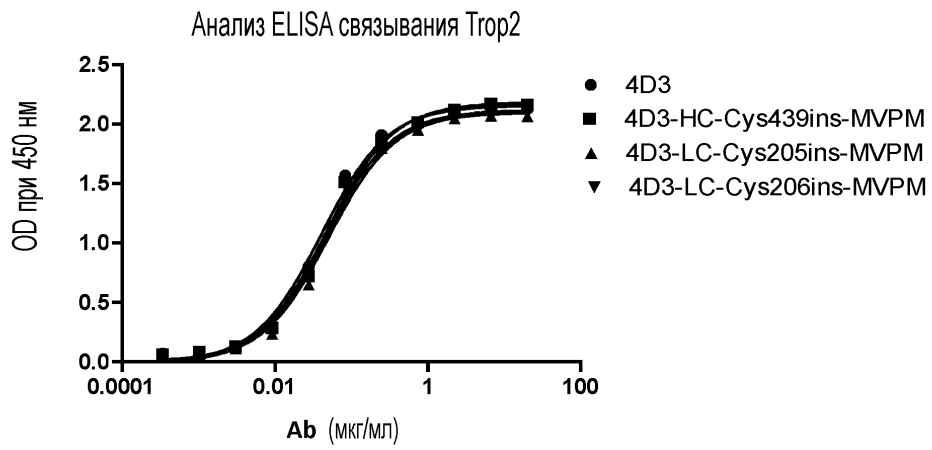


ФИГ. 14

8/14

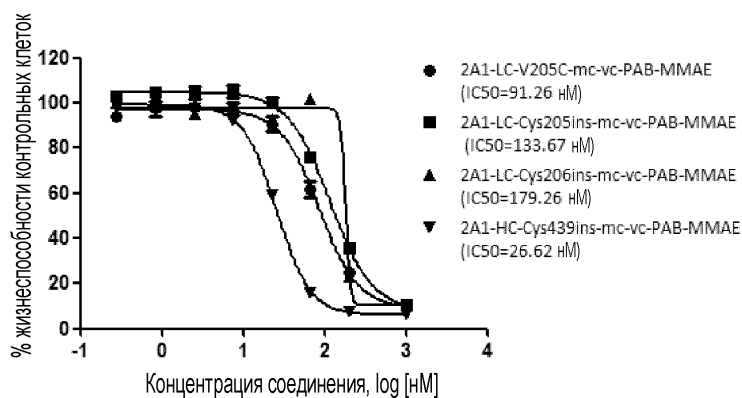


ФИГ. 15

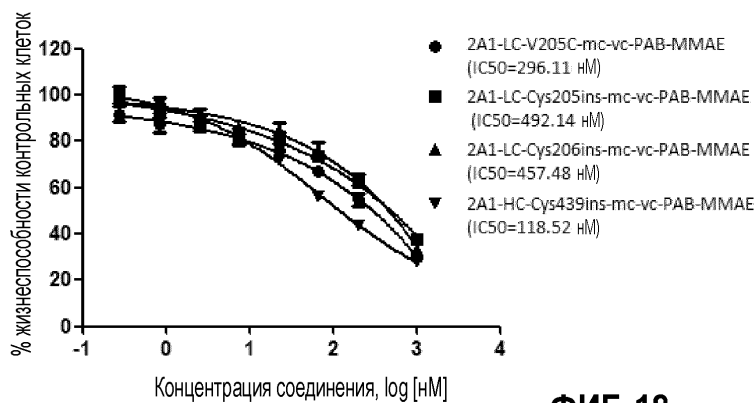


ФИГ. 16

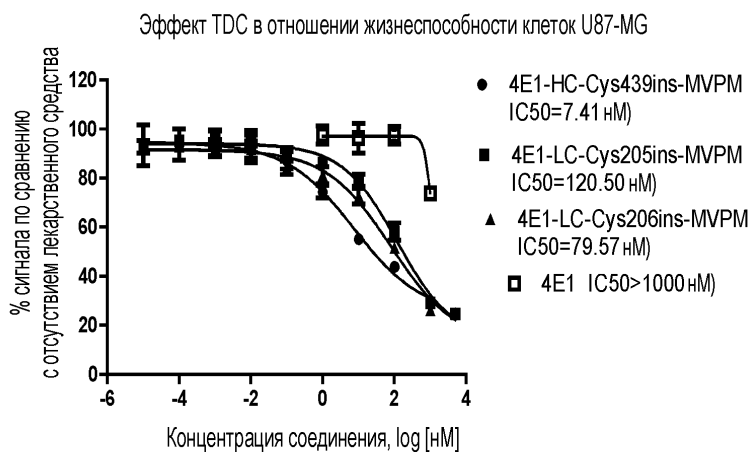
9/14



ФИГ. 17



ФИГ. 18

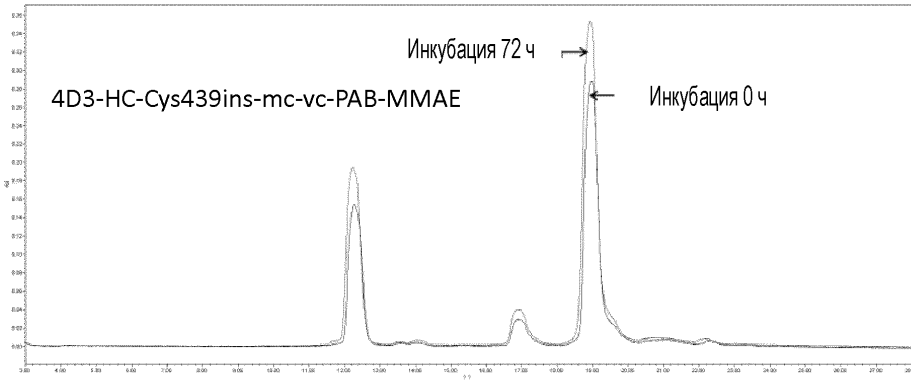


ФИГ. 19

10/14

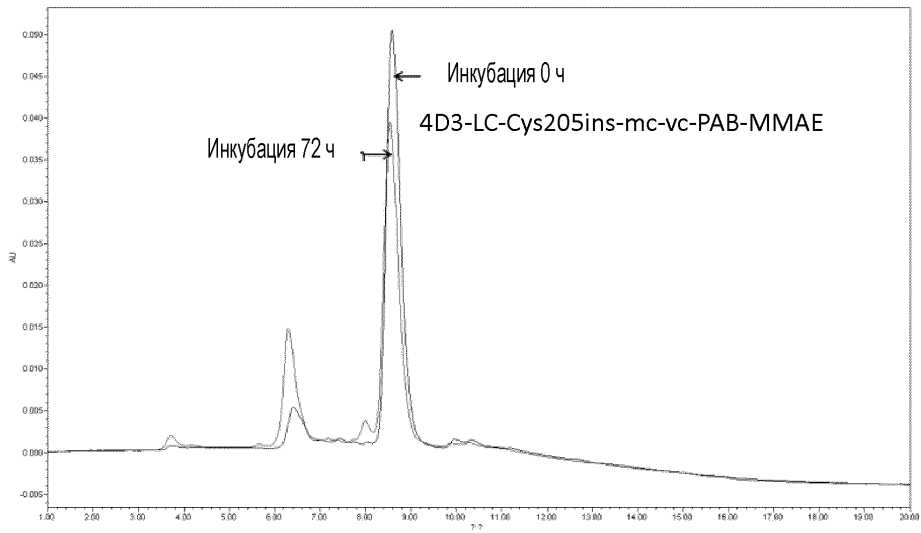


ФИГ. 20

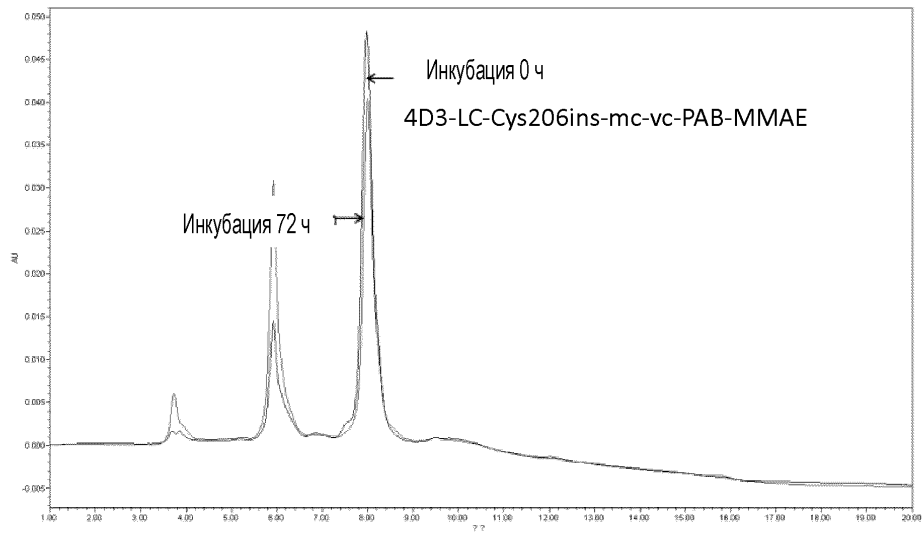


ФИГ. 21

11/14

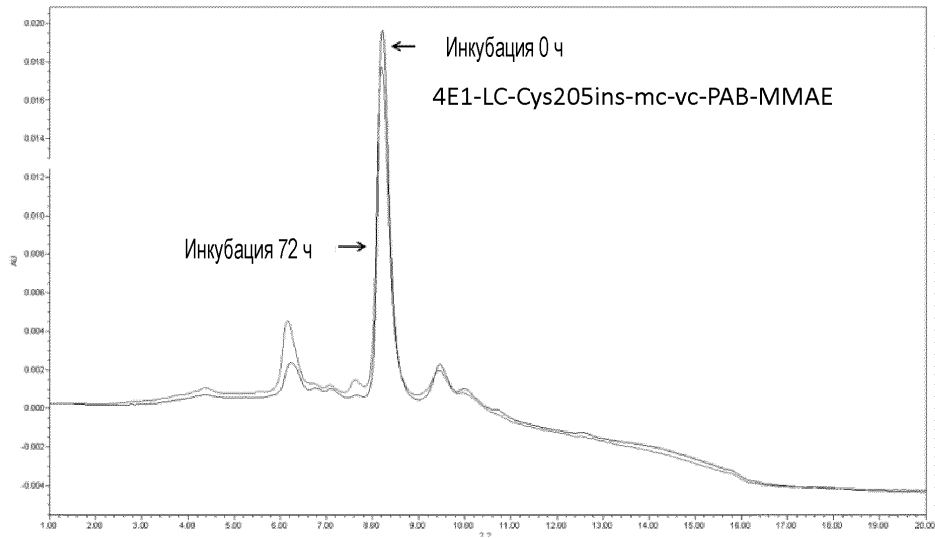


ФИГ. 22

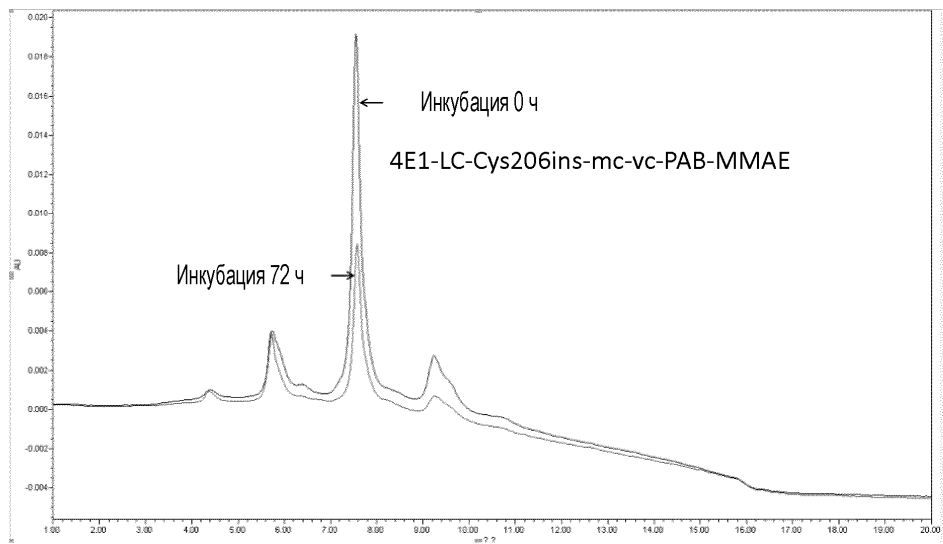


ФИГ. 23

12/14

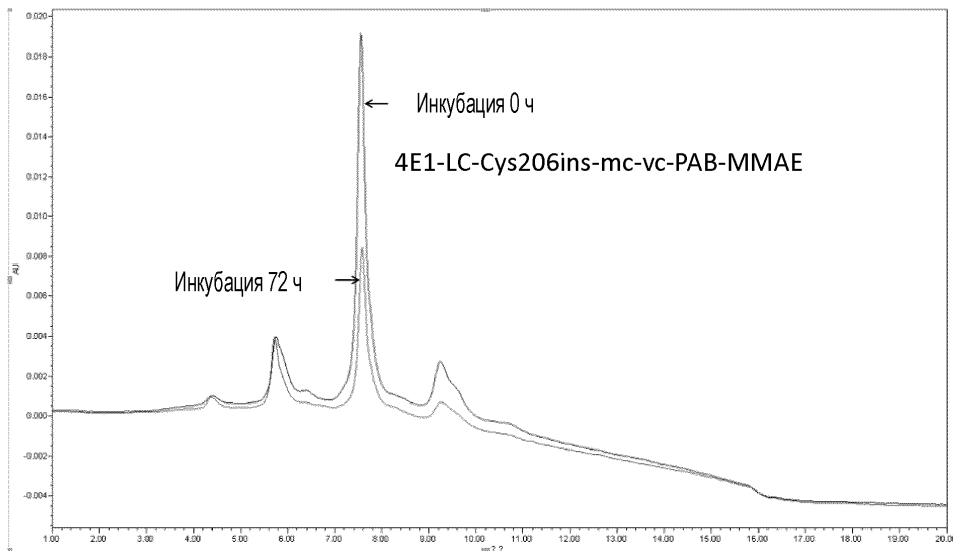


ФИГ. 24



ФИГ. 25

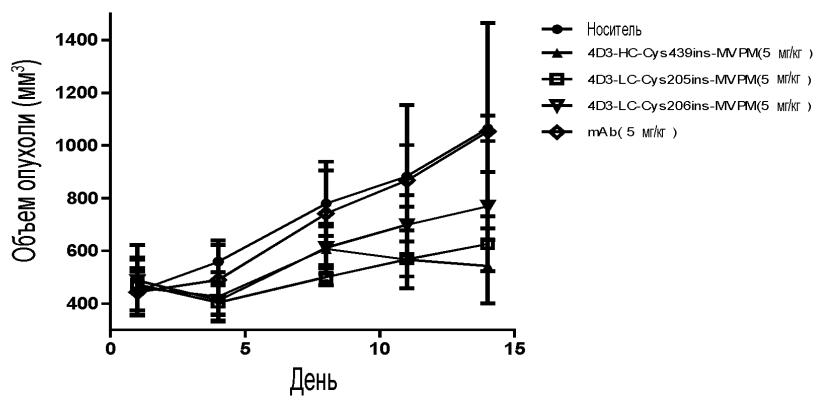
13/14



ФИГ. 26

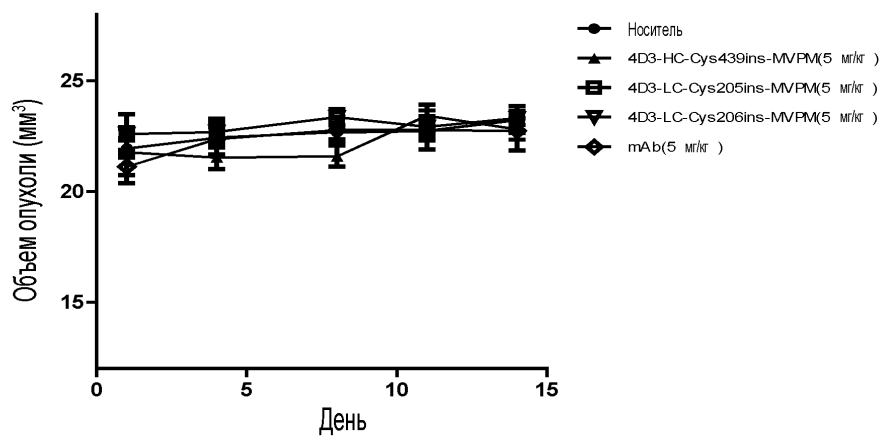
14/14

А. Противоопухолевая активность ADC против Ttop2 в качестве монотерапии при лечении в модели ксенотрансплантата рака поджелудочной железы человека ВХРС-3



ФИГ. 27

В. Изменения массы тела у мышей в разных группах



ФИГ. 28