

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201991268** (13) **A2**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2019.10.31

(51) Int. Cl. *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2012.03.29

(54) **ПОЛУЧЕНИЕ КОНЬЮГАТОВ "МАЙТАНСИНОИД-АНТИТЕЛО" ОДНОСТАДИЙНЫМ СПОСОБОМ**

(31) **61/468,997**

(32) **2011.03.29**

(33) **US**

(62) **201391398; 2012.03.29**

(71) Заявитель:
ИММУНОДЖЕН, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Ли Синьфан, Уорфул Джаред М. (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение описывает одностадийный способ получения конъюгата "связывающий клетку агент - цитотоксический агент", включающий приведение связывающего клетку агента в контакт с цитотоксическим агентом с образованием первой смеси, включающей связывающий клетку агент и цитотоксический агент, и приведение в контакт первой смеси, включающей связывающий клетку агент и цитотоксический агент, с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи и включающем линкер, в растворе, имеющем рН от приблизительно 4 до приблизительно 9, с получением второй смеси, включающей конъюгат "связывающий клетку агент - цитотоксический агент", при этом связывающий клетку агент химически соединен посредством линкера с цитотоксическим агентом, несвязанный цитотоксический агент и побочные продукты реакции. Затем в некоторых случаях вторую смесь подвергают очистке с получением очищенного конъюгата "связывающий клетку агент - цитотоксический агент".

A2

201991268

201991268

A2

**ПОЛУЧЕНИЕ КОНЪЮГАТОВ «МАЙТАНСИНОИД-АНТИТЕЛО» ОДНОСТАДИЙНЫМ
СПОСОБОМ**

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке истребуется преимущество в отношении Предварительной Заявки на Патент США №61/468997 от 29 марта 2011 г., которая включена в данный документ посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Конъюгаты "антитело-препарат" (КАП), которые используют в лечении рака и других заболеваний, обычно состоят из трех различных элементов: связывающего клетку агента; линкера; и цитотоксического агента. Стандартный способ конъюгации связывающего клетку агента, такого как антитело, с цитотоксическим агентом включает две различных стадии реакции с антителом. На первой стадии реакции (стадия модификации) антитело реагирует с гетеробифункциональным линкером с получением модифицированного линкером антитела. Затем в некоторых случаях продукт модифицированного антитела очищают от избытка линкера или гидролизованного реагента линкера. На второй стадии реакции (стадия конъюгации) модифицированное линкером антитело реагирует с цитотоксическим агентом, содержащим реакционную группу, такую как тиол, для получения конъюгата "антитело-цитотоксический агент", который снова очищают в дополнительной стадии очистки.

Способы, которые были ранее описаны для производства конъюгатов "антитело-цитотоксический агент", являются сложными по той причине, что они усложнены стадиями, являющимися трудоемкими для проведения или получения иммуноконъюгатов, являющимися менее чистыми или менее стабильными, чем оптимально требуемые. Таким образом, желательным является модификация или упразднение одной или нескольких стадий производства при улучшении качества продукта, такого как чистота и/или стабильность.

На основании вышеизложенного, существует потребность в

научной разработке улучшенного способа получения конъюгата «связывающий клетку агент-цитотоксический агент», имеющего по существу высокую степень чистоты, который можно получить, избежав трудоемких стадий и снизив время и стоимость для пользователя. Изобретение описывает подобный способ. Эти и другие преимущества изобретения, а также дополнительные характеристики изобретения станут очевидными из представленного в данном документе описания изобретения.

КРАТКАЯ СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение описывает способ получения конъюгата «связывающий клетку агент-цитотоксический агент», включающий стадию приведения связывающего клетку агента в контакт с цитотоксическим агентом с образованием первой смеси, включающей связывающий клетку агент и цитотоксический агент, и затем приведение в контакт первой смеси, включающей связывающий клетку агент и цитотоксический агент, с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи и включающем линкер, в растворе, имеющем pH от приблизительно 4 до приблизительно 9, с получением смеси, включающей (i) конъюгат «связывающий клетку агент-цитотоксический агент», при этом связывающий клетку агент химически соединен посредством линкера с цитотоксическим агентом, (ii) несвязанный цитотоксический агент, и (iii) побочные продукты реакции. Способ может дополнительно включать стадию очистки смеси для получения очищенного конъюгата «связывающий клетку агент-цитотоксический агент».

Способы по данному изобретению описывают конъюгат «связывающий клетку агент-цитотоксический агент» с высокой чистотой и/или стабильностью. Для получения конъюгата с высокой чистотой и/или стабильностью важно, чтобы вначале цитотоксический агент был приведен в контакт со связывающим клетку агентом с образованием смеси, включающей связывающий клетку агент и цитотоксический агент, перед приведением смеси в контакт с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи.

Данное изобретение также включает конъюгат «связывающий клетку агент-цитотоксический агент», полученный в соответствии с

описанными в данном документе способами.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение описывает одностадийный способ получения конъюгата «связывающий клетку агент-цитотоксический агент». Способ включает приведение связывающего клетку агента (например, антитела) в контакт с цитотоксическим агентом с образованием первой смеси, включающей связывающий клетку агент и цитотоксический агент, и затем приведение в контакт первой смеси, включающей связывающий клетку агент и цитотоксический агент, с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи и включающим линкер, в растворе, имеющем рН от приблизительно 4 до приблизительно 9, для получения второй смеси, включающей конъюгат «связывающий клетку агент-цитотоксический агент», несвязанный цитотоксический агент и побочные продукты реакции, при этом связывающий клетку агент химически соединен посредством линкера с цитотоксическим агентом. Затем вторую смесь подвергают очистке с получением очищенного конъюгата «связывающий клетку агент-цитотоксический агент».

В одном варианте воплощения изобретения приведение в контакт осуществляют при обеспечении связывающего клетку агента, затем приведение связывающего клетку агента в контакт с цитотоксическим агентом с образованием первой смеси, включающей связывающий клетку агент и цитотоксический агент, и затем приведение в контакт первой смеси, включающей связывающий клетку агент и цитотоксический агент, с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи. Например, в одном варианте воплощения изобретения связывающий клетку агент подается в реакционном сосуде, цитотоксический агент добавляют в реакционный сосуд (обеспечивая, тем самым, приведение в контакт со связывающим клетку агентом), и затем к смеси, включающей связывающий клетку агент и цитотоксический агент, добавляют бифункциональный реагент, образующий перекрестные связи (обеспечивая, тем самым, приведение в контакт смеси, включающей связывающий клетку агент и цитотоксический агент). В одном варианте воплощения изобретения связывающий клетку агент

подаётся в реакционном сосуде, и цитотоксический агент добавляют в реакционный сосуд непосредственно после внесения связывающего клетку агента в сосуд. В другом варианте воплощения изобретения связывающий клетку агент подаётся в реакционном сосуде, и цитотоксический агент добавляют в реакционный сосуд спустя интервал во времени после внесения связывающего клетку агента в сосуд (например, приблизительно 5 минут, приблизительно 10 минут, приблизительно 20 минут, приблизительно 30 минут, приблизительно 40 минут, приблизительно 50 минут, приблизительно 1 час, приблизительно 1 день или более после внесения связывающего клетку агента в сосуд). Цитотоксический агент может быть добавлен быстро (т.е. в течение короткого интервала во времени, такого как приблизительно 5 минут, приблизительно 10 минут) или медленно (например, посредством насоса).

Затем смесь, включающая связывающий клетку агент и цитотоксический агент, может быть приведена в контакт с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи, непосредственно после приведения связывающего клетку агента в контакт с цитотоксическим агентом или немного позже (например, от приблизительно 5 минут до приблизительно 8 часов или более) после приведения связывающего клетку агента в контакт с цитотоксическим агентом. Например, в одном варианте воплощения изобретения бифункциональный реагент, образующий перекрестные связи, добавляют к смеси, включающей связывающий клетку агент и цитотоксический агент, непосредственно после добавления цитотоксического агента в реакционный сосуд, включающий связывающий клетку агент. С другой стороны, затем смесь, включающая связывающий клетку агент и цитотоксический агент, может быть приведена в контакт с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи, спустя приблизительно 5 минут, приблизительно 10 минут, приблизительно 20 минут, приблизительно 30 минут, приблизительно 1 час, приблизительно 2 часа, приблизительно 3 часа, приблизительно 4 часа, приблизительно 5 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 7 часов, приблизительно 8 часов или более после приведения связывающего клетку агента в контакт с цитотоксическим агентом.

В другом варианте воплощения изобретения цитотоксический агент и бифункциональный реагент добавляют в течение нескольких циклов (например, 1, 2, 3, 4, 5 или более циклов). Например, изобретение описывает способ, состоящий из стадий: а) приведения связывающего клетку агента в контакт с цитотоксическим агентом с образованием первой смеси, включающей связывающий клетку агент и цитотоксический агент; и затем приведение первой смеси в контакт с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи и включающем линкер, в растворе, имеющем рН от приблизительно 4 до приблизительно 9, для получения второй смеси, включающей конъюгат «связывающий клетку агент-цитотоксический агент», несвязанный цитотоксический агент и побочные продукты реакции, при этом связывающий клетку агент химически соединен посредством линкера с цитотоксическим агентом; б) приведение второй смеси в контакт с цитотоксическим агентом с образованием третьей смеси; и затем приведение третьей смеси в контакт с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи, при рН от приблизительно 4 до приблизительно 9 с получением четвертой смеси; и в) очистка четвертой смеси с получением очищенного конъюгата «связывающий клетку агент-цитотоксический агент». В одном варианте воплощения изобретения стадию б) проводят после интервала во времени (например, приблизительно 1 час, приблизительно 2 часа, приблизительно 3 часа или более) после стадии а). В другом варианте воплощения изобретения стадия б) может быть повторена несколько раз (например, 1, 2, 3, 4 или более раз) перед проведением стадии в). Дополнительная стадия б) может быть проведена после интервала во времени (например, приблизительно 1 час, приблизительно 2 часа, приблизительно 3 часа или более) после начальной стадии б).

В другом варианте воплощения изобретения бифункциональный реагент, образующий перекрестные связи, добавляют перед полным добавлением цитотоксического агента. Например, в одном варианте воплощения изобретения цитотоксический агент добавляют к связывающему клетку агенту непрерывно в течение интервала во времени (например, в течение приблизительно 5 минут, приблизительно 10 минут, приблизительно 30 минут, приблизительно

1 часа, приблизительно 2 часов, приблизительно 3 часов или более) с образованием смеси, включающей связывающий клетку агент и цитотоксический агент. Перед завершением добавления цитотоксического агента в смесь, включающую связывающий клетку агент и цитотоксический агент, добавляют бифункциональный реагент, образующий перекрестные связи, при условии, что в любое время цитотоксический агент находится в молярном избытке в сравнении с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи. В одном варианте воплощения изобретения бифункциональный реагент, образующий перекрестные связи, добавляют непрерывно в течение временного интервала (например, в течение приблизительно 5 минут, приблизительно 10 минут, приблизительно 30 минут, приблизительно 1 часа, приблизительно 2 часов, приблизительно 3 часов или более).

После того, как смесь, содержащая связывающий клетку агент и цитотоксический агент, будет приведена в контакт с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи, реакции дадут произойти в течение приблизительно 1 часа, приблизительно 2 часов, приблизительно 3 часов, приблизительно 4 часов, приблизительно 5 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 7 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 9 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 11 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 13 часов, приблизительно 14 часов, приблизительно 15 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 17 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 19 часов, приблизительно 20 часов, приблизительно 21 часа, приблизительно 22 часов, приблизительно 23 часов, приблизительно 24 часов или более (например, приблизительно 30 часов, приблизительно 35 часов, приблизительно 40 часов, приблизительно 45 часов или приблизительно 48 часов).

Приведение связывающего клетку агента в контакт с цитотоксическим агентом и затем с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи, (т.е. стадия реакции) происходит в растворе, имеющем рН от приблизительно 4 до приблизительно 9 (например, приблизительно 4, приблизительно 4,5, приблизительно 5, приблизительно 5,5, приблизительно 6, приблизительно 6,5,

приблизительно 7, приблизительно 7,5, приблизительно 8, приблизительно 8,5 или приблизительно 9). В одном варианте воплощения изобретения стадия реакции происходит в растворе, имеющем рН приблизительно 6 или менее (например, от приблизительно 4 до приблизительно 6, от приблизительно 4 до приблизительно 5,5 или от приблизительно 4,5 до приблизительно 5,5).

В другом варианте воплощения изобретения способ по изобретению включает приведение связывающего клетку агента в контакт с цитотоксическим агентом и затем с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи, в растворе, имеющем рН приблизительно 6 или более (например, от приблизительно 6 до приблизительно 9, от приблизительно 6 до приблизительно 7, от приблизительно 7 до приблизительно 9, от приблизительно 7 до приблизительно 8,5, от приблизительно 7,5 до приблизительно 8,5, от приблизительно 7,5 до приблизительно 8,0, от приблизительно 8,0 до приблизительно 9,0, или от приблизительно 8,5 до приблизительно 9,0). Например, способ по изобретению включает приведение связывающего клетку агента в контакт с цитотоксическим агентом и затем с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи, в растворе, имеющем рН приблизительно 6,0, приблизительно 6,1, приблизительно 6,2, приблизительно 6,3, приблизительно 6,4, приблизительно 6,5, приблизительно 6,6, приблизительно 6,7, приблизительно 6,8, приблизительно 6,9, приблизительно 7,0, приблизительно 7,1, приблизительно 7,2, приблизительно 7,3, приблизительно 7,4, приблизительно 7,5, приблизительно 7,6, приблизительно 7,7, приблизительно 7,8, приблизительно 7,9, приблизительно 8,0, приблизительно 8,1, приблизительно 8,2, приблизительно 8,3, приблизительно 8,4, приблизительно 8,5, приблизительно 8,6, приблизительно 8,7, приблизительно 8,8, приблизительно 8,9 или приблизительно 9,0. В специфическом варианте воплощения изобретения способ по изобретению включает приведение связывающего клетку агента в контакт с цитотоксическим агентом и бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи, в растворе, имеющем рН приблизительно 7,8 (например, рН от 7,6 до

8,0 или рН от 7,7 до 7,9).

Способ по изобретению включает проведение одностадийной реакции (т.е. приведение связывающего клетку агента в контакт с цитотоксическим агентом и затем с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи) при любой подходящей температуре, известной в науке. Например, одностадийная реакция может возникнуть при приблизительно 20°C или менее (например, от приблизительно -10°C (при условии, что раствор защищен от замораживания, например, присутствием органического растворителя, используемого для растворения цитотоксического агента и бифункционального реагента, образующего перекрестные связи) до приблизительно 20°C, от приблизительно 0°C до приблизительно 18°C, от приблизительно 4°C до приблизительно 16°C), при комнатной температуре (например, от приблизительно 20°C до приблизительно 30°C или от приблизительно 20°C до приблизительно 25°C), или при повышенной температуре (например, от приблизительно 30°C до приблизительно 37°C). В одном варианте воплощения изобретения приведение связывающего клетку агента в контакт с цитотоксическим агентом и бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи, происходит при температуре от приблизительно 16°C до приблизительно 24°C (например, приблизительно 16°C, приблизительно 17°C, приблизительно 18°C, приблизительно 19°C, приблизительно 20°C, приблизительно 21°C, приблизительно 22°C, приблизительно 23°C, приблизительно 24°C или приблизительно 25°C).

В другом варианте воплощения изобретения приведение связывающего клетку агента в контакт с цитотоксическим агентом и затем с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи, происходит при температуре приблизительно 15°C или менее (например, от приблизительно -10°C до приблизительно 15°C, или от приблизительно 0°C до приблизительно 15°C). В этом отношении способ по изобретению включает приведение связывающего клетку агента в контакт с цитотоксическим агентом и затем с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи, при температуре приблизительно 15°C, приблизительно 14°C, приблизительно 13°C, приблизительно 12°C, приблизительно 11°C,

приблизительно 10°C , приблизительно 9°C , приблизительно 8°C ,
приблизительно 7°C , приблизительно 6°C , приблизительно 5°C ,
приблизительно 4°C , приблизительно 3°C , приблизительно 2°C ,
приблизительно 1°C , приблизительно 0°C , приблизительно -1°C ,
приблизительно -2°C , приблизительно -3°C , приблизительно -4°C ,
приблизительно -5°C , приблизительно -6°C , приблизительно -7°C ,
приблизительно -8°C , приблизительно -9°C или приблизительно $-$
 10°C , при условии, что раствор защищен от замораживания,
например, присутствием органического растворителя (-ей),
используемого для растворения бифункционального реагента,
образующего перекрестные связи. В одном варианте воплощения
изобретения способ по изобретению включает приведение
связывающего клетку агента в контакт с цитотоксическим агентом и
затем с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные
связи, при температуре от приблизительно -10°C до приблизительно
 15°C , от приблизительно 0°C до приблизительно 15°C , от
приблизительно 0°C до приблизительно 10°C , от приблизительно 0°C
до приблизительно 5°C , от приблизительно 5°C до приблизительно
 15°C , от приблизительно 10°C до приблизительно 15°C или от
приблизительно 5°C до приблизительно 10°C . В другом варианте
воплощения изобретения способ по изобретению включает приведение
связывающего клетку агента в контакт с цитотоксическим агентом и
затем с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные
связи, при температуре приблизительно 10°C (например, при
температуре от приблизительно 8°C до 12°C или при температуре от
 9°C до 11°C).

В одном варианте воплощения изобретения способ по
изобретению включает приведение связывающего клетку агента в
контакт с цитотоксическим агентом и затем с бифункциональным
реагентом, образующим перекрестные связи, в растворе, имеющем
высокий pH (например, приблизительно 7 или выше), при низкой
температуре (например, приблизительно 15°C или менее). Например,
в одном варианте воплощения изобретения способ по изобретению
включает приведение связывающего клетку агента в контакт с
цитотоксическим агентом и затем с бифункциональным реагентом,
образующим перекрестные связи, в растворе, имеющем pH

приблизительно 7,5 при температуре приблизительно 15°C, в растворе, имеющем рН приблизительно 7,8 при температуре приблизительно 10°C, в растворе, имеющем рН приблизительно 8,2 при температуре приблизительно 0°C, или в растворе, имеющем рН приблизительно 8,5 при температуре приблизительно 0°C. В другом варианте воплощения изобретения способ по изобретению включает приведение связывающего клетку агента в контакт с цитотоксическим агентом и затем с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи, в растворе, имеющем рН от 7,0 до 8,5 (например, рН от 7,5 до 8,0) при температуре от 5°C до 15°C.

В одном варианте воплощения изобретения способ по изобретению дополнительно включает стадию гашения для гашения любого непрореагированного цитотоксического агента и/или непрореагированного бифункционального реагента, образующего перекрестные связи. Стадию гашения проводят перед очисткой конъюгата «связывающий клетку агент-цитотоксический агент». Например, способ по изобретению включает (а) приведение связывающего клетку агента в контакт с цитотоксическим агентом с образованием смеси, включающей связывающий клетку агент и цитотоксический агент, и затем приведение в контакт смеси, включающей связывающий клетку агент и цитотоксический агент, с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи и включающим линкер, в растворе, имеющем рН от приблизительно 4 до приблизительно 9, для получения смеси, включающей (i) конъюгат «связывающий клетку агент-цитотоксический агент», при этом связывающий клетку агент химически соединен посредством линкера с цитотоксическим агентом, (ii) несвязанный цитотоксический агент, и (iii) побочные продукты реакции, (б) гашение смеси, полученной на стадии (а) для гашения любого непрореагированного цитотоксического агента и/или непрореагированного бифункционального реагента, образующего перекрестные связи, и (в) очистку смеси для получения очищенного конъюгата «связывающий клетку агент-цитотоксический агент».

В одном варианте воплощения изобретения смесь гасят путем приведение смеси в контакт с гасящим агентом. В контексте данного изобретения «гасящий агент» обозначает реагент, которые

реагирует с несвязанным цитотоксическим агентом и/или бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи.

В одном варианте воплощения изобретения для гарантии того, что в цитотоксическом агенте погашена любая непрореагировавшая группа (такая как тиол), может использоваться малеимид или галоацетил в качестве гасящих агентов, таких как 4-малеимидомасляная кислота, 3-малеимидопропионовая кислота, N-этилмалеимид, йодоацетамид или йодоацетамидопропионовая кислота. Стадия гашения может помочь предотвратить димеризацию цитотоксического агента, в частности, цитотоксического агента, имеющего непрореагировавшую тиоловую группу (такого как DM1). Димеризованный цитотоксический агент может быть трудно удалить. Стадия гашения также может свести к минимуму любую нежелательную реакцию взаимодействия тиол-дисульфид с дисульфидными группами нативного антитела. После гашения полярными, заряженными тиол-гасящими реагентами (такими как 4-малеимидомасляная кислота или 3-малеимидопропионовая кислота), избыточный, непрореагировавший цитотоксический агент преобразовывают в полярный, заряженный, водорастворимый аддукт, который может быть легко отделен от ковалентно-присоединенного конъюгата в ходе стадии очистки. Также может использоваться гашение неполярными и нейтральными тиол-гасящими реагентами.

В одном варианте воплощения изобретения смесь гасят приведением смеси в контакт с гасящим реагентом, который реагирует с непрореагировавшим бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи. Например, к смеси могут быть добавлены нуклеофилы для гашения любого непрореагировавшего бифункционального реагента, образующего перекрестные связи. Нуклеофил, предпочтительно, является нуклеофилом, содержащим аминогруппу, таким как лизин, таурин и гидроксилламин.

В предпочтительном варианте воплощения изобретения реакции (т.е. приведение связывающего клетку агента в контакт с цитотоксическим агентом и затем с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи) дают произойти перед приведением смеси в контакт с гасящим реагентом. В этом отношении, гасящий реагент добавляют к смеси от приблизительно 1 часа до

приблизительно 48 часов (например, приблизительно 1 час, приблизительно 2 часа, приблизительно 3 часа, приблизительно 4 часа, приблизительно 5 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 7 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 9 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 11 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 13 часов, приблизительно 14 часов, приблизительно 15 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 17 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 19 часов, приблизительно 20 часов, приблизительно 21 час, приблизительно 22 часа, приблизительно 23 часа, приблизительно 24 часа, или от приблизительно 25 часов до приблизительно 48 часов) после того, как смесь, включающая связывающий клетку агент и цитотоксический агент, была приведена в контакт с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи.

Способ по изобретению в некоторых случаях может включать добавление сахарозы к стадии реакции (т.е. приведение связывающего клетку агента в контакт с цитотоксическим агентом и затем с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи) для повышения растворимости и восстановления конъюгатов «связывающий клетку агент-цитотоксический агент». Желательно добавление сахарозы в концентрации от приблизительно 0,1% (в/о) до приблизительно 20% (в/о) (например, приблизительно 0,1% (в/о), 1% (в/о), 5% (в/о), 10% (в/о), 15% (в/о) или 20% (в/о)). Предпочтительно, сахарозу добавляют в концентрации от приблизительно 1% (в/о) до приблизительно 10% (в/о) (например, приблизительно 0,5% (в/о), приблизительно 1% (в/о), приблизительно 1,5% (в/о), приблизительно 2% (в/о), приблизительно 3% (в/о), приблизительно 4% (в/о), приблизительно 5% (в/о), приблизительно 6% (в/о), приблизительно 7% (в/о), приблизительно 8% (в/о), приблизительно 9% (в/о), приблизительно 10% (в/о) или приблизительно 11% (в/о)). Кроме того, стадия реакции также может включать добавление буферного агента. Может использоваться любой подходящий буферный агент, известный в науке. Подходящие буферные агенты включают, например, цитратный буфер, ацетатный буфер, сукцинатный буфер и фосфатный буфер. В одном варианте воплощения изобретения буферный агент выбирают из

группы, состоящей из HEPPSO (N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-гидроксипропансульфоновая кислота)), POPSO (пиперазин-1,4-бис-(2-гидрокси-пропансульфоновая кислота) дегидрат), HEPEP (4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновая кислота), HEPPS (EPPS) (4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-пропансульфоновая кислота), TES (N-[трис(гидроксиметил)метил]-2-аминоэтансульфоновая кислота) и их комбинации.

После стадии реакции конъюгат «связывающий клетку агент-цитотоксический агент» подвергают стадии очистки. В этом отношении конъюгат «связывающий клетку агент-цитотоксический агент» может быть очищен от других компонентов смеси (например, несвязанного цитотоксического агента и побочных продуктов реакции) с использованием фильтрации тангенциальными потоками (ФТП), представляющей собой способ фильтрации тангенциальными потоками на основе мембраны, неадсорбционной хроматографии, адсорбционной хроматографии, адсорбционной фильтрации, избирательной преципитации или любого другого подходящего способа очистки, а также их комбинаций. В одном варианте воплощения изобретения конъюгат «связывающий клетку агент-цитотоксический агент» очищают с использованием одной стадии очистки (например, ФТП). Предпочтительно, конъюгат очищают и включают в соответствующую композицию с использованием одной стадии очистки (например, ФТП). В другом варианте воплощения изобретения конъюгат «связывающий клетку агент-цитотоксический агент» очищают с использованием двух последовательных стадий очистки. Например, в начале конъюгат может быть очищен избирательной преципитацией, адсорбционной фильтрацией, адсорбционной хроматографией или неадсорбционной хроматографией, а затем очищен ФТП. Специалисту в данной области станет очевидно, что очистка конъюгата «связывающий клетку агент-цитотоксический агент» позволяет выделить стабильный конъюгат, включающий связывающий клетку агент, химически соединенный с цитотоксическим агентом.

Для очистки могут использоваться любые подходящие системы ФТП, включая систему по типу Pellicon (Millipore, Billerica, MA), касетную систему Sartocoon (Sartorius AG, Edgewood, NY) и

систему по типу Centrasette (Pall Corp., East Hills, NY).

Для очистки может использоваться любая подходящая адсорбционная хроматографическая смола. Предпочтительные адсорбционные хроматографические смолы включают гидроксипатитовую хроматографию, гидрофобную хроматографию с индукционным зарядом (HCIC), хроматографию с гидрофобным взаимодействием (HIC), ионообменную хроматографию, ионообменную хроматографию с комбинированным режимом, аффинную хроматографию с иммобилизованным металлом (IMAC), лигандную хроматографию с красителем, аффинную хроматографию, хроматографию с обращенными фазами и их комбинации. Примеры подходящих гидроксипатитовых смол включают керамический гидроксипатит (СНТ тип I и тип II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), гидроксипатит HA Ultrogel (Pall Corp., East Hills, NY) и керамический фторпатит (СФТ тип I и тип II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Примером подходящей смолы HCIC является смола MEP Hypercel (Pall Corp., East Hills, NY). Примеры подходящих смол HIC включают смолы бутил-сефароза, гексил-сефароза, фенил-сефароза и октил-сефароза (все производства GE Healthcare, Piscataway, NJ), а также смолы Macro-prep метил и Macro-Prep t-бутил (Biorad Laboratories, Hercules, CA). Примеры подходящих ионообменных смол включают смолы SP-Sepharose, CM-Sepharose и Q-Sepharose (все производства GE Healthcare, Piscataway, NJ) и смолу Unosphere S (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Примеры подходящих ионообменных смол смешанного режима включают смолу Bakerbond ABx (JT Baker, Phillipsburg NJ). Примеры подходящих смол IMAC включают хелатную сефарозную смолу (GE Healthcare, Piscataway, NJ) и смолу Profinity IMAC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Примеры подходящих лигандных смол с красителем включают голубую сефарозную смолу (GE Healthcare, Piscataway, NJ) и смолу Affigel Blue (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Примеры подходящих аффинных смол включают смолу сефарозы и белка А (например, MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, NJ), при этом связывающий клетку агент является антителом, и лектин-аффинные смолы, например, лектин-сефарозная смола Lentil (GE Healthcare, Piscataway, NJ), при этом связывающий клетку агент содержит

соответствующие сайты связывания лектина. С другой стороны, может использоваться антитело, специфическое к связывающему клетку агенту. Такое антитело может быть иммобилизировано, например, смолой Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Примеры подходящих смол с обращенными фазами включают смолы C4, C8 и C18 (Grace Vydac, Hesperia, CA).

Для очистки может использоваться любая подходящая неадсорбционная хроматографическая смола. Примеры подходящих неадсорбционных хроматографических смол включают, но не ограничиваются, смолы SEPHADEX™ G-25, G-50, G-100, SEPHACRYL™ (например, S-200 и S-300), смолы SUPERDEX™ (например, SUPERDEX™ 75 и SUPERDEX™ 200), смолы BIO-GEL® (например, P-6, P-10, P-30, P-60 и P-100), и другие, известные специалисту в данной области.

В одном варианте воплощения изобретения способ по изобретению дополнительно включает стадию выдержки для высвобождения нестабильно связанных линкеров от связывающих клетку агентов. Стадия выдержки включает удерживание смеси перед очисткой конъюгата «связывающий клетку агент-цитотоксический агент» (например, после стадии реакции, между стадией реакции и стадией гашения или после стадии гашения). Например, способ по изобретению включает (а) приведение связывающего клетку агента в контакт с цитотоксическим агентом с образованием смеси, включающей связывающий клетку агент и цитотоксический агент; и затем приведение в контакт смеси, включающей связывающий клетку агент и цитотоксический агент, с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи и включающим линкер, в растворе, имеющем рН от приблизительно 4 до приблизительно 9, для получения смеси, включающей (i) конъюгат «связывающий клетку агент-цитотоксический агент», при этом связывающий клетку агент химически соединен посредством линкера с цитотоксическим агентом, (ii) несвязанный цитотоксический агент, и (iii) побочные продукты реакции, (б) удерживание смеси, полученной на стадии (а), для высвобождения нестабильно связанных линкеров от связывающего клетку агента, и (в) очистку смеси для получения очищенного конъюгата «связывающий клетку агент-цитотоксический агент».

В другом варианте воплощения изобретения способ по изобретению включает (а) приведение связывающего клетку агента в контакт с цитотоксическим агентом с образованием смеси, включающей связывающий клетку агент и цитотоксический агент; и затем приведение в контакт смеси, включающей связывающий клетку агент и цитотоксический агент, с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи и включающим линкер, в растворе, имеющем рН от приблизительно 4 до приблизительно 9, для получения смеси, включающей (i) конъюгат «связывающий клетку агент-цитотоксический агент», при этом связывающий клетку агент химически соединен посредством линкера с цитотоксическим агентом, (ii) несвязанный цитотоксический агент, и (iii) побочные продукты реакции, (б) гашение смеси, полученной на стадии (а), для гашения любого непрореагированного цитотоксического агента и/или непрореагированного бифункционального реагента, образующего перекрестные связи, (в) удерживание смеси, полученной на стадии (б), для высвобождения нестабильно связанных линкеров от связывающего клетку агента, и (г) очистку смеси для получения очищенного конъюгата «связывающий клетку агент-цитотоксический агент».

С другой стороны, стадия выдержки может проводиться после очистки конъюгата «связывающий клетку агент-цитотоксический агент» с последующей дополнительной стадией очистки.

В предпочтительном варианте воплощения изобретения реакции (т.е. приведение связывающего клетку агента в контакт с цитотоксическим агентом и затем с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи) дают завершиться до стадии выдержки. В этом отношении, стадия выдержки может проводиться от приблизительно 1 часа до приблизительно 48 часов (например, приблизительно 1 час, приблизительно 2 часа, приблизительно 3 часа, приблизительно 4 часа, приблизительно 5 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 7 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 9 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 11 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 13 часов, приблизительно 14 часов, приблизительно 15 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 17 часов, приблизительно

18 часов, приблизительно 19 часов, приблизительно 20 часов, приблизительно 21 час, приблизительно 22 часа, приблизительно 23 часа, приблизительно 24 часа, или от приблизительно 24 часов до приблизительно 48 часов) после того, как смесь, включающая связывающий клетку агент и цитотоксический агент, была приведена в контакт с бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи.

Стадия выдержки включает выдерживание раствора при подходящей температуре (например, от приблизительно 0°C до приблизительно 37°C) в течение подходящего периода времени (например, от приблизительно 1 часа до приблизительно 1 недели, от приблизительно 1 часа до приблизительно 24 часов, от приблизительно 1 часа до приблизительно 8 часов или от приблизительно 1 часа до приблизительно 4 часов) для высвобождения нестабильно связанных линкеров от связывающего клетку агента, при этом стабильно связанные линкеры по существу не высвобождаются от связывающих клетку агентов. В одном варианте воплощения изобретения стадия выдержки включает содержание раствора при температуре приблизительно 20°C или менее (например, от приблизительно 0°C до приблизительно 18°C, от приблизительно 4°C до приблизительно 16°C), при комнатной температуре (например, от приблизительно 20°C до приблизительно 30°C или от приблизительно 20°C до приблизительно 25°C), или при повышенной температуре (например, от приблизительно 30°C до приблизительно 37°C). В одном варианте воплощения изобретения стадия выдержки включает содержание раствора при температуре от приблизительно 16°C до приблизительно 24°C (например, приблизительно 15°C, приблизительно 16°C, приблизительно 17°C, приблизительно 18°C, приблизительно 19°C, приблизительно 20°C, приблизительно 21°C, приблизительно 22°C, приблизительно 23°C, приблизительно 24 °C или приблизительно 25°C). В другом варианте воплощения изобретения стадия выдержки включает содержание раствора при температуре от приблизительно 2°C до приблизительно 8°C (например, приблизительно 0°C, приблизительно 1°C, приблизительно 2°C, приблизительно 3°C, приблизительно 4°C, приблизительно 5°C, приблизительно 6°C, приблизительно 7°C,

приблизительно 8°C , приблизительно 9°C или приблизительно 10°C). В другом варианте воплощения изобретения стадия выдержки включает содержание раствора при температуре приблизительно 37°C (например, приблизительно 34°C , приблизительно 35°C , приблизительно 36°C , приблизительно 37°C , приблизительно 38°C , приблизительно 39°C или приблизительно 40°C).

Длительность стадии выдержки зависит от температуры и pH, при которых проводят стадию выдержки. Например, длительность стадии выдержки может быть по существу снижена проведением стадии выдержки при повышенной температуре, при этом максимальная температура ограничена стабильностью конъюгата "связывающий клетку агент-цитотоксический агент". Стадия выдержки может включать выдерживание раствора в течение от приблизительно 1 часа до приблизительно 1 дня (например, приблизительно 1 час, приблизительно 2 часа, приблизительно 3 часа, приблизительно 4 часа, приблизительно 5 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 7 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 9 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 14 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 18 часов, приблизительно 20 часов, приблизительно 22 часов или приблизительно 24 часов), от приблизительно 10 часов до приблизительно 24 часов, от приблизительно 12 часов до приблизительно 24 часов, от приблизительно 14 часов до приблизительно 24 часов, от приблизительно 16 часов до приблизительно 24 часов, от приблизительно 18 часов до приблизительно 24 часов, от приблизительно 20 часов до приблизительно 24 часов, от приблизительно 5 часов до приблизительно 1 недели, от приблизительно 20 часов до приблизительно 1 недели, от приблизительно 12 часов до приблизительно 1 недели (например, приблизительно 12 часов, приблизительно 16 часов, приблизительно 20 часов, приблизительно 24 часов, приблизительно 2 дней, приблизительно 3 дней, приблизительно 4 дней, приблизительно 5 дней, приблизительно 6 дней или приблизительно 7 дней) или от приблизительно 1 дня до приблизительно 1 недели.

В одном варианте воплощения изобретения стадия выдержки

включает выдерживание раствора при температуре от приблизительно 2°C до приблизительно 8°C в течение периода, по меньшей мере, от приблизительно 12 часов до недели. В другом варианте воплощения изобретения стадия выдержки включает содержание раствора при температуре от приблизительно 2°C до приблизительно 8°C в течение ночи (например, от приблизительно 12 до приблизительно 24 часов, предпочтительно, приблизительно 20 часов).

Значение pH для стадии выдержки, предпочтительно, составляет от приблизительно 4 до приблизительно 10. В одном варианте воплощения изобретения значение pH для стадии выдержки составляет приблизительно 4 или более, но не менее 6 (например, от 4 до 5,9), или приблизительно 5 или более, но не менее 6 (например, от 5 до 5,9). В другом варианте воплощения изобретения значения pH для стадии выдержки варьируют от приблизительно 6 до приблизительно 10 (например, от приблизительно 6,5 до приблизительно 9, от приблизительно 6 до приблизительно 8). Например, значения pH для стадии выдержки могут составлять приблизительно 6, приблизительно 6,5, приблизительно 7, приблизительно 7,5, приблизительно 8, приблизительно 8,5, приблизительно 9, приблизительно 9,5 или приблизительно 10.

В специфических вариантах воплощения изобретения стадия выдержки может включать инкубацию смеси при 25°C и pH приблизительно 6-7,5 в течение от приблизительно 12 часов до приблизительно 1 недели, инкубацию смеси при 4°C и pH приблизительно 4,5-5,9 в течение от приблизительно 5 часов до приблизительно 5 дней, или инкубацию смеси при 25°C и pH приблизительно 4,5-5,9 в течение от приблизительно 5 часов до приблизительно 1 дня.

Изобретение описывает способ получения композиций стабильных конъюгатов, включающих связывающий клетку агент, химически соединенный с цитотоксическим агентом, при этом композиции по существу не содержат нестабильных конъюгатов. В этом отношении изобретение описывает способ получения конъюгата "связывающий клетку агент-цитотоксический агент" по существу с высокой чистотой и стабильностью. Такие композиции могут использоваться

для лечения заболеваний по причине высокой чистоты и стабильности конъюгатов. Композиции, включающие связывающий клетку агент, такой как антитело, химически соединены с цитотоксическим агентом, таким как майтансиноид, описаны, например, в патенте США № 7374762, полное содержание которого включено сюда во всей своей полноте посредством ссылки. В одном аспекте изобретения конъюгат «связывающий клетку агент-цитотоксический агент» по существу высокой чистоты обладает одной или несколькими следующим характеристиками: (а) более чем приблизительно 90% (например, более чем или равно чем приблизительно 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%), предпочтительно, более чем приблизительно 95% видов конъюгата являются мономерными, (б) уровень неконъюгированного линкера в композиции конъюгата составляет менее чем приблизительно 10% (например, менее чем или равно приблизительно 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или 0%) (относительно общего содержания линкера), (в) менее чем 10% видов конъюгата связаны перекрестными связями (например, менее чем или равно приблизительно 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% или 0%), (г) уровень несвязанного цитотоксического агента в композиции конъюгата составляет менее чем приблизительно 2% (например, менее чем или равно приблизительно 1,5%, 1,4%, 1,3%, 1,2%, 1,1%, 1,0%, 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1% или 0%) (моль/моль относительно общего содержания цитотоксического агента), и/или (д) отсутствие по существу повышения уровня несвязанного цитотоксического агента при хранении (например, спустя приблизительно 1 неделю, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели, приблизительно 1 месяц, приблизительно 2 месяца, приблизительно 3 месяца, приблизительно 4 месяца, приблизительно 5 месяцев, приблизительно 6 месяцев, приблизительно 1 год, приблизительно 2 года, приблизительно 3 года, приблизительно 4 года или приблизительно 5 лет). «По существу повышение» уровня несвязанного цитотоксического агента обозначает, что после определенного периода хранения (например, приблизительно 1 неделю, приблизительно 2 недели, приблизительно 3 недели, приблизительно 1 месяц, приблизительно 2 месяца,

приблизительно 3 месяца, приблизительно 4 месяца, приблизительно 5 месяцев, приблизительно 6 месяцев, приблизительно 1 год, приблизительно 2 года, приблизительно 3 года, приблизительно 4 года или приблизительно 5 лет), увеличение уровня несвязанного цитотоксического агента составляет менее чем приблизительно 0,1%, приблизительно 0,2%, приблизительно 0,3%, приблизительно 0,4%, приблизительно 0,5%, приблизительно 0,6%, приблизительно 0,7%, приблизительно 0,8%, приблизительно 0,9%, приблизительно 1,0%, приблизительно 1,1%, приблизительно 1,2%, приблизительно 1,3%, приблизительно 1,4%, приблизительно 1,5%, приблизительно 1,6%, приблизительно 1,7%, приблизительно 1,8%, приблизительно 1,9%, приблизительно 2,0%, приблизительно 2,2%, приблизительно 2,5%, приблизительно 2,7%, приблизительно 3,0%, приблизительно 3,2%, приблизительно 3,5%, приблизительно 3,7% или приблизительно 4,0%.

В контексте данного изобретения термин «неконъюгированный линкер» обозначает связывающий клетку агент, который ковалентно присоединен к бифункциональному реагенту, образующему перекрестные связи, при этом связывающий клетку агент нековалентно присоединен к цитотоксическому агенту посредством линкера бифункционального реагента, образующего перекрестные связи (т.е. «неконъюгированный линкер» может быть представлен CBA-L, при этом CBA является связывающим клетку агентом, а L является бифункциональным реагентом, образующим перекрестные связи. В отличие от этого, конъюгат «связывающий клетку агент-цитотоксический агент» может быть представлен как CBA-L-D, где D является цитотоксическим агентом).

В одном варианте воплощения изобретения среднее молярное соотношение цитотоксического агента и связывающего клетку агента в конъюгате «связывающий клетку агент-цитотоксический агент» составляет от приблизительно 1 до приблизительно 10, от приблизительно 2 до приблизительно 7, от приблизительно 3 до приблизительно 5, от приблизительно 2,5 до приблизительно 4,5 (например, приблизительно 2,5, приблизительно 2,6, приблизительно 2,7, приблизительно 2,8, приблизительно 2,9, приблизительно 3,0, приблизительно 3,1, приблизительно 3,3,

приблизительно 3,4, приблизительно 3,5, приблизительно 3,6, приблизительно 3,7, приблизительно 3,8, приблизительно 3,9, приблизительно 4,0, приблизительно 4,1, приблизительно 4,2, приблизительно 4,3, приблизительно 4,4, приблизительно 4,5), от приблизительно 3,0 до приблизительно 4,0, от приблизительно 3,2 до приблизительно 4,2, или от приблизительно 4,5 до 5,5 (например, приблизительно 4,5, приблизительно 4,6, приблизительно 4,7, приблизительно 4,8, приблизительно 4,9, приблизительно 5,0, приблизительно 5,1, приблизительно 5,2, приблизительно 5,3, приблизительно 5,4 или приблизительно 5,5).

Данное изобретение описывает более эффективный способ получения композиции стабильных конъюгатов, включающих связывающий клетку агент, химически соединенный с цитотоксическим агентом. В одном варианте воплощения изобретения в сравнении с традиционным способом получения конъюгатов "связывающий клетку агент и цитотоксический агент", для достижения подобного среднего молярного соотношения цитотоксического агента к связывающему клетку агенту в конъюгатах требуется меньшее количество цитотоксического агента.

Связывающий клетку агент может быть любым подходящим агентом, который связывается с клеткой, обычно и предпочтительно животной клеткой (например, клеткой человека). Связывающий клетку агент, предпочтительно, является пептидом или полипептидом. Подходящие связывающие клетку агенты включают, например, антитела (например, моноклональные антитела и их фрагменты), интерфероны (например, альфа, бета, гамма), лимфокины (например, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-6), гормоны (например, инсулин, ТРГ (тиреотропин-рилизинг гормон), МСГ (меланоцит-стимулирующий гормон), стероидные гормоны, такие как андрогены и эстрогены), факторы роста и колониестимулирующие факторы, такие как ЭФР, ФНО-альфа, ФФР, ФРЭС, К-КСФ, М-КСФ и ГМ-КСФ (Burgess, Immunology Today 5: 155-158 (1984)), питательно-транспортные молекулы (например, трансферрин), витамины (например, фолат) и любые другие агенты или молекулу, которые специфически связываются с молекулой-мишенью на поверхности клетки.

Если связывающий клетку агент является антителом, он

связывается с антигеном, представленным полипептидом или гликопротеином, и может быть трансмембранной молекулой (например, рецептором) или лигандом, таким как фактор роста. Типичные антигены включают молекулы, такие как ренин; гормон роста, включая гормон роста человека и бычий гормон роста; рилизинг-фактор гормона роста; паратгормон; тиреоид-стимулирующий гормон; липопротеины; альфа-1-антитрипсин; инсулина А-цепь; инсулина В-цепь; проинсулин; фолликулостимулирующий гормон; кальцитонин; лютеинизирующий гормон; глюкагон; факторы свертывания, такие как фактор vmc, фактор IX, тканевой фактор (TF) и фактор фон-Виллебранда; факторы антикоагуляции, такие как протеин С; предсердный натрийуретический фактор; сурфактант легкого; активатор плазминогена, такой как урокиназа или мочевиная человека или активатор плазминогена тканевого типа (t-PA); бомбезин; тромбин; гематопоетический фактор роста; фактор некроза опухоли-альфа и -бета; энкефалиназу; RANTES (фактор регуляции активации здоровой экспрессии и секреции Т-клеток); воспалительный белок макрофагов человека (MIP-1-альфа); сывороточный альбумин, такой как человеческий сывороточный альбумин; мюллерова ингибирующая субстанция; релаксина А-цепь; релаксина В-цепь; прорелаксин; мышинный гонадотропин-связанный пептид; микробный белок, такой как бета-лактамаза; ДНКаза; IgE; цитотоксический Т-лимфоцитарный связанный антиген (CTLA), такой как CTLA-4; ингибин; активин; фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС); рецепторы к гормонам или факторам роста; белок А или D; ревматоидные факторы; нейротрофический фактор, такой как нейротрофический фактор, полученный из кости (BDNF), нейротрофин-3, -4, -5 или -6 (NT-3, NT4, NT-5 или NT-6) или ростовой фактор нервов, такой как NGF-β; тромбоцитарный фактор роста (PDGF); фактор роста фибробластов, такой как aFGF и bFGF; эпидермальный фактор роста (ЭФР); трансформирующий фактор роста (ТФР), такой как ТФР-альфа и ТФР-бета, включая ТФР-β1, ТФР-β2, ТФР-β3, ТФР-β4 или ТФР-β5; инсулиноподобный фактор роста-I и -II (IGF-I и IGF-II); дез(1-3)-IGF-I (мозговой IGF-I); белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста; ЕрсАМ; GD3; FLT3;

PSMA; PSCA; MUC1; MUC16; STEAP; CEA; TENB2; EphA рецепторы; EphB рецепторы; фолатный рецептор; FOLR1; мезотелин; крипто; альфа_vбета₆; интегрины; ФПЭС; VEGFR; EGFR; рецептор трансферрина; IRTA1; IRTA2; IRTA3; IRTA4; IRTA5; CD белки, такие как CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD11, CD14, CD19, CD20, CD21, CD22, CD25, CD26, CD28, CD30, CD33, CD36, CD37, CD38, CD40, CD44, CD52, CD55, CD56, CD59, CD70, CD79, CD80, CD81, CD103, CD105, CD134, CD137, CD138, CD152 или антитело, которое связывается с одним или несколькими опухолеассоциированными антигенами или рецепторами клеточных поверхностей, описанных в публикации заявки на патент США №2008/0171040 или публикации заявки на патент США №2008/0305044, которые включены сюда во всей своей полноте посредством ссылки; эритропоэтин; остеоиндуктивные факторы; иммунотоксины; морфогенетический белок кости (BMP); интерферон, такой как интерферон-альфа, -бета и -гамма; колониестимулирующие факторы (КСФ), такие как, М-КСФ, ГМ-КСФ и Г-КСФ; интерлейкины (ИЛ), например, от ИЛ-1 до ИЛ-10; супероксиддисмутаза; Т-клеточные рецепторы; поверхностные мембранные белки; комплементзависимый стимулятор гемолиза; вирусный антиген, такой как, например, фрагмент капсида ВИЧ; транспортные белки; «хоминг»-рецепторы; адрессины; регуляторные белки; интегрины, такие как CD11a, CD11b, CD11c, CD18, ICAM, VLA-4 и VCAM; опухолеассоциированный белок, такой как HER2, HER3 или HER4 рецептор; эндоглин; c-Met; IGF1R; простат-антигены, такие как PCA3, PSA, PSGR, NGER, PSMA, PSCA, TMEFF2 и STEAP1; LGR5; V7H4; и фрагменты любого из вышеперечисленных полипептидов.

Кроме того, ГМ-КСФ, который связывается с миелоидными клетками, может использоваться в качестве связывающего клетку агента относительно клеток, пораженных острым миелоидным лейкозом. ИЛ-2, который связывается с активированными Т-клетками, может использоваться для профилактики отторжения трансплантата, для лечения и предотвращения заболевания трансплантат против хозяина, и для лечения острого Т-клеточного лейкоза. MSH, который связывается с меланоцитами, может использоваться для лечения меланомы, как и антитела к меланомам.

Фолиевая кислота может использоваться для связывания фолатного рецептора, экспрессированного на опухолях яичников и других опухолях. Эпидермальный фактор роста может использоваться для связывания с плоскоклеточными видами рака, такими как рак легких и головы и шеи. Соматостатин может использоваться при нейроblastомах и опухолях других типов.

Рак грудной железы и яичек может с успехом пролечиваться эстрогеном (или аналогами эстрогена) или андрогеном (или аналогами андрогена), соответственно, в виде связывающих клетку агентов.

Термин «антитело» в контексте данного изобретения обозначает любой иммуноглобулин, любой фрагмент иммуноглобулина, такой как Fab, Fab', F(ab')₂, dsFv, sFv, минитела, диатела, тритела, тетратела (Parham, *J. Immunol.*, 131: 2895-2902 (1983); Spring et al. *J. Immunol.*, 113: 470-478 (1974); Nisonoff et al. *Arch. Biochem. Biophys.*, 89: 230-244 (1960), Kim et al., *Mol. Cancer Ther.*, 7: 2486-2497 (2008), Carter, *Nature Revs.*, 6: 343-357 (2006)), или химеры иммуноглобулинов, которые могут связываться с антигеном на поверхности клеток (например, которые содержат определяющий комплементарность участок (CDR)). В качестве связывающего клетку агента может использоваться любое подходящее антитело. Специалисту в данной области станет очевидно, что выбор соответствующего антитела будет зависеть от популяции клеток-мишеней. В этом отношении тип и количество молекул на поверхности клетки (т.е. антигенов), которые избирательно экспрессируются отдельной популяцией клеток (обычно и предпочтительно популяцией больных клеток), будут направлять выбор соответствующего антитела для использования в композиции по изобретению. Профили экспрессии клеточной поверхности известны для целого ряда типов клеток, включая типы опухолевых клеток, или, если не известны, они могут быть определены с использованием стандартных способов молекулярной биологии и гистохимии.

Антитело может быть поликлональным или моноклональным, однако предпочтительно оно представляет собой моноклональное антитело. В контексте данного изобретения «поликлональные»

антитела обозначают гетерогенные популяции молекул антител, обычно содержащихся в сыворотке иммунизированных животных. «Моноклональное» антитело обозначает гомогенные популяции молекул антител, специфических к отдельному антигену. Моноклональные антитела обычно вырабатываются отдельным клоном В-лимфоцитов («В-клеток»). Моноклональные антитела могут быть получены с использованием целого ряда способов, известных специалисту в данной области, включая стандартный способ гибридомы (см., например, Köhler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 5: 511-519 (1976), Harlow and Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988), и С.А. Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)). Краткое описание: способ гибридомы для получения моноклональных антител обычно включает инъекцию любому подходящему животному, обычно и предпочтительно мыши, антигена (т.е. «иммуногена»). Животное впоследствии умерщвляют, и В-клетки, выделенные из его селезенки, сливают с клетками миеломы человека. Получают гибридную клетку (т.е. «гибридому»), которая пролиферирует неограниченно долго и непрерывно секретирует высокие титры антитела с требуемой специфичностью *in vitro*. Любой соответствующий способ, известный в науке, может использоваться для идентификации клеток гибридомы, вырабатывающих антитело с требуемой специфичностью. Такие способы включают, например, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), вестерн-блоттинг и радиоиммуноанализ. Популяцию клеток гибридомы подвергают скринингу для выделения отдельных клонов, каждый из которых секретирует отдельные виды антител к антигену. Принимая во внимание, что каждая гибридома является клоном, полученным при слиянии отдельной В-клетки, все молекулы антител, которые она вырабатывает, являются идентичными по структуре, включая их антигенсвязывающий участок и изотип. Моноклональные антитела также могут быть получены с использованием других подходящих способов, включая способ EBV-гибридома (см., например, Haskard and Archer, *J. Immunol. Methods*, 74(2): 361-67 (1984) и Roder et al., *Methods Enzymol.*, 121: 140-67 (1986)), системы экспрессии вектора бактериофага (см., например, Huse et

al., *Science*, 246: 1275-81 (1989)) или библиотеки фаговых дисплеев, включающие фрагменты антител, такие как Fab и scFv (одноцепочечный переменный участок) (см., например, патенты США № 5885793 и 5969108, и публикации заявок на международные патенты WO 92/01047 и WO 99/06587).

Моноклональное антитело может быть выделено из или выработано в любом подходящем животном, но предпочтительно оно вырабатывается в млекопитающем, более предпочтительно, мышши или человеке, и более предпочтительно, человеке. Способы получения антитела у мышшей известны специалисту в данной области и описаны в тексте данной заявки. Относительно антител человека, специалисту в данной области станет очевидно, что поликлональные антитела могут быть выделены из сыворотки субъектов-людей, вакцинированных или иммунизированных соответствующим антигеном. С другой стороны, антитела человека могут быть получены путем адаптации известных способов для получения антител человека у видов животных, за исключением человека (см., например, патенты США № 5545806, 5569825 и 5714352, и публикацию заявки на патент США № 2002/0197266 A1).

Будучи идеальным выбором для терапевтического применения у человека, антитела человека, в частности, моноклональные антитела человека, обычно более трудно получить, чем моноклональные антитела мышши. Мышинные моноклональные антитела, однако, индуцируют быстрый ответ хозяина на антитело при введении человеку, что может снизить терапевтический или диагностический потенциал конъюгата "антитело-цитотоксический агент". Чтобы обойти такие осложнения, моноклональное антитело предпочтительно не распознается в качестве «инородного» иммунной системой человека.

Для этого фаговая библиотека может использоваться для получения антитела. В этом отношении, фаговые библиотеки, кодирующие антигенсвязующие переменные домены (V) антител, могут быть получены с использованием стандартных способов молекулярной биологии и рекомбинации ДНК (см., например, Sambrook et al. (eds.), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

(2001)). Фаг, кодирующий переменный участок с требуемой специфичностью, выбирают на предмет специфического связывания с требуемым антигеном, и собирают полное антитело человека, включающее выбранный переменный домен. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих восстановленное антитело, вводят в подходящую линию клеток, такую как клетки миеломы, используемые для выработки антитела, такие как антитела человека, имеющие характеристики моноклональных антител, секретируемых клеткой (см., например, Janeway et al., *выше*, Huse et al., *выше*, и патент США № 6265150). С другой стороны, моноклональные антитела могут быть получены у мышей, являющихся трансгенными относительно специфических генов тяжелых и легких цепей иммуноглобулина человека. Такие способы известны в науке и описаны, например, в патентах США № 5545806 и 5569825 и Janeway et al., *выше*.

Более предпочтительно, антитело является гуманизированным антителом. В контексте данного изобретения «гуманизированное» антитело является антителом, в котором определяющие комплементарность участки (CDR) мышиного моноклонального антитела, образующие антигенсвязывающие петли антитела, привиты на каркасном участке молекулы антитела человека. Благодаря сходству каркасных участков антител мыши и человека, общепринято в науке, что такой способ позволяет получить моноклональное антитело, являющееся антигенно-идентичным антителу человека, которое связывается с одним и тем же антигеном, что и моноклональное антитело, из которого получены последовательности CDR. Способы получения гуманизированных антител хорошо известны в науке и описаны подробно, например, в Janeway et al., *выше*, патентах США № 5225539, 5585089 и 5693761, европейском патенте № 0239400 B1 и патенте Великобритании № 2188638. Гуманизированные антитела также могут быть получены с использованием способа изменения поверхности антитела, описанного в патенте США № 5639641 и Pedersen et al., *J. Mol. Biol.*, 235: 959-973 (1994). В то время как антитело, участвующее в конъюгате композиции по изобретению, более предпочтительно является гуманизированным моноклональным антителом, моноклональное антитело человека и моноклональное

антитело мыши, как это описано выше, могут также охватываться данным изобретением.

Фрагменты антитела, имеющие, по меньшей мере, один антигенсвязывающий сайт, и, следовательно, распознающие и связывающие, по меньшей мере, один антиген или рецептор, присутствуют на поверхности клетки-мишени, и также включены в объем данного изобретения. В этом отношении протеолитическое расщепление интактной молекулы антитела может привести к образованию целого ряда фрагментов антитела, которые сохраняют способность распознавать и связывать антигены. Например, ограниченное расщепление молекулы антитела протеазой папаином обычно приводит к образованию трех фрагментов, два из которых являются идентичными и обозначаются как фрагменты Fab, поскольку они сохраняют антигенсвязывающую активность молекулы исходного антитела. Расщепление молекулы антитела ферментом пепсин обычно приводит к образованию двух фрагментов антитела, один из которых сохраняет антигенсвязывающие участки молекулы антитела и, следовательно, обозначается как фрагмент $F(ab')_2$. Редукция фрагмента $F(ab')_2$ дитиотреитолом или меркаптоэтиламином приводит к образованию фрагмента, обозначаемого фрагментом Fab'. Одноцепочечный фрагмент переменного участка (sFv) антитела, который состоит из разветвленного фрагмента Fab, включающего переменный домен антитела (V) тяжелой цепи, присоединенный к домену V легкой цепи антитела посредством синтетического пептида, может быть получен с использованием стандартных способов рекомбинации ДНК (см., например, Janeway et al., *выше*). Подобным образом, фрагменты переменных участков, стабилизированных дисульфидными связями (dsFv), могут быть получены с использованием способов рекомбинации ДНК (см., например, Reiter et al., *Protein Engineering*, 7: 697-704 (1994)). Фрагменты антитела в контексте изобретения, однако, не ограничены данными типичными типами фрагментов антител. Может использоваться любой подходящий фрагмент антитела, который распознает и связывает требуемый рецептор клеточной поверхности или антиген. Фрагменты антитела дополнительно описаны, например, в Parham, *J. Immunol.*, 131: 2895-2902 (1983), Spring et al., *J.*

Immunol., 113: 470-478 (1974), и Nisonoff et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 89: 230-244 (1960). Связывание антитело-антиген может быть оценено с использованием любого подходящего способа, известного в науке, такого как, например, радиоиммуноанализ (РИА), ИФА, вестерн-блоттинг, иммунопреципитация и анализы конкурентного связывания (см., например, Janeway et al., *выше*, и публикацию заявки на патент США № 2002/0197266 A1).

Кроме того, антитело может быть химерным антителом или его антигенсвязующим фрагментом. Под «химерным» понимают антитело, которое включает, по меньшей мере, два иммуноглобулина или фрагмента, полученных или выработанных, по меньшей мере, двумя отдельными видами (например, два разных иммуноглобулина, таких как константный участок иммуноглобулина человека, скомбинированный с переменным участком иммуноглобулина мыши). Антитело также может быть доменным антителом (dAb) или его антигенсвязующим фрагментом, таким как, например, антитело верблюдовых (см., например, Desmyter et al., *Nature Struct. Biol.*, 3: 752, (1996)), или антителом акул, таким как, например, новый рецептор антигена (IgNAR) (см., например, Greenberg et al., *Nature*, 374: 168 (1995), и Stanfield et al., *Science*, 305: 1770-1773 (2004)).

В контексте изобретения может использоваться любое подходящее антитело. Например, моноклональное антитело J5 является мышинным антителом IgG2a, специфичным к общему антигену острого лимфобластного лейкоза (CALLA) (Ritz et al., *Nature*, 283: 583-585 (1980)), и может использоваться для связывания клеток, экспрессирующих CALLA (например, клетки острого лимфобластного лейкоза). Моноклональное антитело MY9 является мышинным антителом IgG1, которое специфически связывается с антигеном CD33 (Griffin et al., *Leukemia Res.*, 8: 521 (1984)), и может использоваться для связывания клеток, экспрессирующих CD33 (например, клетки острого миелогенного лейкоза (ОМЛ)).

Подобным образом, моноклональное антитело к B4 (также обозначается как B4) является мышинным антителом IgG1, которое связывается с антигеном CD19 на В-клетках (Nadler et al., *J. Immunol.*, 131: 244-250 (1983)), и может использоваться для

связывания В-клеток, экспрессирующих CD19 (например, клетки неходжкинской лимфомы и клетки хронического лимфобластного лейкоза). N901 является мышиным моноклональным антителом, которое связывается с антигеном CD56 (адгезионная молекула нейронных клеток), находящимся на клетках нейроэндокринного происхождения, включая мелкоклеточную опухоль легкого, и такое антитело может использоваться в конъюгате для доставки препаратов к клеткам нейроэндокринного происхождения. У антител J5, MY9 и B4 предпочтительно изменяют поверхность или гуманизируют перед использованием как части конъюгата. Изменение поверхности или гуманизация антител описаны, например, в Roguska et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 969-73 (1994).

Кроме того, моноклональное антитело C242 связывается с антигеном CanAg (см., например, патент США No.5552293) и может использоваться для доставки конъюгата к опухолям, экспрессирующим CanAg, таким как колоректальный рак, рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легкого и рак желудка. HuC242 является гуманизированной формой моноклонального антитела C242 (см., например, патент США №5552293). Гибридома, из которой производят HuC242, находится в ЕСАСС под идентификационным номером 90012601. HuC242 может быть получено с использованием способа прививания CDR (см., например, патенты США № 5585089, 5693761 и 5693762) или способа изменения поверхности (см., например, патент США № 5639641). HuC242 может использоваться для доставки конъюгата к опухолевым клеткам, экспрессирующим антиген CanAg, таким как, например, клетки колоректального рака, рака поджелудочной железы, немелкоклеточного рака легкого и рака желудка.

Для связи с клетками рака яичников и рака предстательной железы в конъюгате может использоваться антитело к MUC1 в качестве связывающего клетку агента. Антитела к MUC1 включают, например, антитело к HMFG-2 (см., например, Taylor-Papadimitriou et al., *Int. J. Cancer*, 28: 17-21 (1981)), hCTM01 (см., например, van Hof et al., *Cancer Res.*, 56: 5179-5185 (1996)) и DS6. Клетки рака предстательной железы также могут быть связаны конъюгатом с использованием антитела к простатспецифическому

антигену (PSMA) в качестве связывающего клетку агента, такого как J591 (см., например, Liu et al., *Cancer Res.*, 57: 3629-3634 (1997)). Кроме того, раковые клетки, экспрессирующие антиген Her2, такие как клетки рака молочной железы, предстательной железы и яичников, могут быть связаны конъюгатом с использованием антител к Her2, например, трастузумаба, в качестве связывающего клетку агента. Клетки, которые экспрессируют рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) и его варианты, такие как мутант с делецией по типу III, EGFRvIII, могут быть связаны конъюгатом с использованием антител к EGFR. Антитела к EGFR описаны в публикациях международных патентах № PCT/US11/058385 и PCT/US11/058378. Антитела к EGFRvIII описаны в патентах США № 7736644 и 7628986, и публикациях заявок на патенты США 2010/0111979, 2009/0240038, 2009/0175887, 2009/0156790 и 2009/0155282. Антитела к IGF-IR, связывающиеся с рецептором инсулиноподобного фактора роста, такие как антитела, описанные в патенте США № 7982024, также могут использоваться в конъюгате. Антитела, связывающиеся с CD27L, Cripto, CD138, CD38, EphA2, интегринами, CD37, фолатом, CD20, PSGR, NGER, PSCA, TMEFF2, STEAP1, эндоглином и Her3, также могут использоваться в конъюгате.

В одном варианте воплощения изобретения антитело выбирают из группы, состоящей из huN901, huMy9-6, huB4, huC242, антитела к HER2 (например, трастузумаб), биватузумаба, сибротузумаба, ритуксимаба, huDS6, антител к мезотелину, описанных в публикациях заявки на международный патент WO 2010/124797 (такое как MF-T), антител к крипто, описанных в публикации заявки на патент США 2010/0093980 (такое как huB3F6), антител к CD138, описанных в публикации заявки на патент США 2007/0183971 (такое как huB-B4), антител к EGFR, описанных в заявках на международный патент № PCT/US11/058385 и PCT/US11/058378 (такое как EGFR-7), антител к EGFRvIII, описанных в патентах США № 7736644 и 7628986 и публикациях заявки на патент США 2010/0111979, 2009/0240038, 2009/0175887, 2009/0156790 и 2009/0155282, гуманизированных антител EphA2, описанных в публикациях заявок на международный патент WO 2011/039721 и WO

2011/039724 (такое как 2H11R35R74); антител к CD38, описанных в публикации заявки на международный патент WO 2008/047242 (такое как hu38SB19), антител к фолату, описанных в публикации заявки на международный патент WO 2011/106528 и публикации заявки на патент США 2012/0009181 (например, huMov19); антител к IGF1R, описанных в патентах США № 5958872, 6596743 и 7982024; антител к CD37, описанных в публикации заявки на патент США 2011/0256153 (например, huCD37-3); антител к интегрину $\alpha\beta_6$, описанных в публикации заявки на патент США 2006/0127407 (например, CNT095); и антител к Her3, описанных в публикации заявки на международный патент WO 2012/019024.

В частности, предпочтительные антитела являются описанными здесь гуманизированными моноклональными антителами. Примеры включают, но не ограничиваются, huN901, huMy9-6, huB4, huC242, гуманизированное моноклональное антитело к Her2 (например, трастузумаб), биватузумаб, сибротузумаб, CNT095, huDS6 и ритуксимаб (см., например, патенты США №5639641 и 5665357, временную заявку на патент США №60/424332 (которая относится к патенту США №7557189), публикацию заявки на международный патент (PCT) №WO 02/16401, Pedersen et al., *выше*, Roguska et al., *выше*, Liu et al., *выше*, Nadler et al., *выше*, Colomer et al., *Cancer Invest.*, 19: 49-56 (2001), Heider et al., *Eur. J. Cancer*, 31A: 2385-2391 (1995), Welt et al., *J. Clin. Oncol.*, 12: 1193-1203 (1994), и Maloney et al., *Blood*, 90: 2188-2195 (1997)). В науке известны и другие гуманизированные моноклональные антитела, которые могут использоваться в связи с изобретением.

В одном варианте воплощения изобретения связывающий клетку агент является гуманизированным антифолатным антителом или его антигенсвязующим фрагментом, который специфически связывается с рецептором фолата человека 1, при этом антитело включает: (а) CDR1 тяжелой цепи, включающий GYFMN; CDR2 тяжелой цепи, включающий RHPYDGDTFYNQXaa₁FXaa₂Xaa₃; и CDR3 тяжелой цепи, включающий YDGSRAMDY; и (б) CDR1 легкой цепи, включающий KASQSVSFAGTSLMH; CDR2 легкой цепи, включающий RASNLEA; и CDR3 легкой цепи, включающий QQSREYPYT; при этом Xaa₁ выбирают из K,

Q, H и R; Хаа₂ выбирают из Q, H, N и R; и Хаа₃ выбирают из G, E, T, S, A и V. Предпочтительно, последовательность CDR2 тяжелой цепи включает RHPYDGDTFYNQKFQG.

В другом варианте воплощения изобретения антифолатное антитело является гуманизированным антителом или его антигенсвязующим фрагментом, который специфически связывается с рецептором фолата человека 1 и включает тяжелую цепь с аминокислотной последовательностью

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQKF
Q GKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR
TPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
.

В другом варианте воплощения изобретения антифолатное антитело является гуманизированным антителом или его антигенсвязующим фрагментом, кодируемым плазмидной ДНК, включенной в АТСС 7 апреля 2010 г. под номерами АТСС №РТА-10772 и РТА-10773 или 10774.

В одном варианте воплощения изобретения антифолатное антитело является гуманизированным антителом или его антигенсвязующим фрагментом, включающим переменный домен тяжелой цепи, который, по меньшей мере, на 90%, 95%, 99% или 100% идентичен

QVQLVQSGAEVVKPGASVKISCKASGYTFTGYFMNWKQSPGQSLEWIGRIHPYDGDTFYNQKF
Q GKATLTVDKSSNTAHMELLSLTSEDFAVYYCTRYDGSRAMDYWGQGT TTVTVSS, и
переменный домен легкой цепи, который, по меньшей мере, на 90%, 95%, 99% или 100% идентичен
DIVLTQSPSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPD
RFGSGSKTDFTLNISPVAEADAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKR; или
DIVLTQSPSLAVSLGQPAIISCKASQSVSFAGTSLMHWHYHQKPGQQPRLLIYRASNLEAGVPD
RFGSGSKTDFTLTISPVEAEDAATYYCQQSREYPYTFGGGTKLEIKR.

В то время как связывающий клетку агент предпочтительно является антителом, связывающий клетку агент также может быть

молекулой, не являющейся антителом. Такие подходящие молекулы, не являющиеся антителом, включают, например, интерфероны (например, альфа, бета или гамма интерферон), лимфокины (например, интерлейкин 2 (ИЛ-2), ИЛ-3, ИЛ-4 или ИЛ-6), гормоны (например, инсулин), факторы роста (например, ЭФР, ФНО-альфа, ФФР или ФРЭС), колониестимулирующие факторы (например, Г-КСФ, М-КСФ и ГМ-КСФ (см., например, Burgess, *Immunology Today*, 5: 155-158 (1984)), соматостатин и трансферрин (см., например, O'Keefe et al., *J. Biol. Chem.*, 260: 932-937 (1985)). Например, ГМ-КСФ, который связывается с миелоидными клетками, может использоваться в качестве связывающего клетку агента для связывания клеток, пораженных острым миелоидным лейкозом. Кроме того, ИЛ-2, который связывается с активированными Т-клетками, может использоваться для профилактики отторжения трансплантата, для лечения и предотвращения заболевания трансплантат против хозяина, и для лечения острого Т-клеточного лейкоза. Эпидермальный фактор роста (ЭФР) может использоваться для связывания с плоскоклеточными видами рака, такими как рак легких и рак головы и шеи. Соматостатин может использоваться для связывания клеток нейробластомы и клеток опухолей других типов.

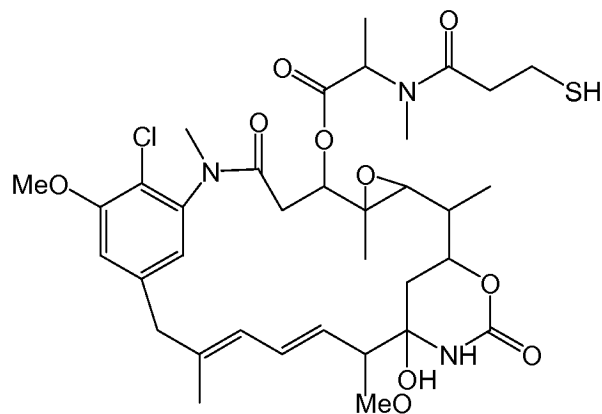
Конъюгат может включать любые подходящие цитотоксические агенты. В контексте данного изобретения «цитотоксический агент» обозначает любое соединение, которое приводит к смерти клетку, индуцирует смерть клетки или снижает жизнеспособность клетки. Подходящие цитотоксические агенты включают, например, майтансиноиды и конъюгируемые ансамиитоцины (см., например, заявку на международный патент № PCT/US11/59131 от 3 ноября 2011 г.), таксоиды, СС-1065 и аналоги СС-1065, а также доластатин и аналоги доластатина. В предпочтительном варианте воплощения изобретения цитотоксический агент является майтансиноидом, включая майтансинол и аналоги майтансинола. Майтансиноиды являются соединениями, ингибирующими образование микротрубочек и являющимися чрезвычайно токсичными для клеток млекопитающих. Примеры подходящих аналогов майтансинолов включают соединения, имеющие модифицированное ароматическое кольцо, и соединения, имеющие модификации в других положениях. Такие майтансиноиды

описаны, например, в патентах США № 4256746, 4294757, 4307016, 4313946, 4315929, 4322348, 4331598, 4361650, 4362663, 4364866, 4424219, 4371533, 4450254, 5475092, 5585499, 5846545 и 6333410.

Примеры аналогов майтансинола с модифицированным ароматическим кольцом включают: (1) С-19-дехлор (патент США № 4256746) (получен восстановлением ЛАН ансамитоцина Р2), (2) С-20-гидрокси (или С-20-деметил) +/-С-19-дехлор (патенты США № 4361650 и 4307016) (получены путем деметилирования с использованием *Streptomyces* или *Actinomyces* или дехлоринацией с использованием ЛАН) и (3) С-20-деметокси, С-20-ацилокси (-OCOR), +/-дехлор (патент США № 4294757) (получен путем ацилирования с использованием ацилхлоридов).

Примеры аналогов майтансинола, имеющих модификации в положениях, отличных от ароматического кольца, включают: (1) С-9-SH (патент США № 4424219) (получены путем реакции майтансинола с H₂S или P₂S₅), (2) С-14-алкоксиметил (деметокси/CH₂OR) (патент США № 4331598), (3) С-14-гидроксиметил или ацилоксиметил (CH₂OH или CH₂OAc) (патент США № 4450254) (получен из *Nocardia*), (4) С-15-гидрокси/ацилокси (патент США № 4364866) (получен конверсией майтансинола *Streptomyces*), (5) С-15-метокси (патенты США № 4313946 и 4315929) (выделен из *Trewia nudiflora*), (6) С-18-N-деметил (патенты США № 4362663 и 4322348) (получен деметилированием майтансинола *Streptomyces*) и (7) 4,5-дезоксид (патент США № 4371533) (получен восстановлением трихлорида титана/ЛАН майтансинола).

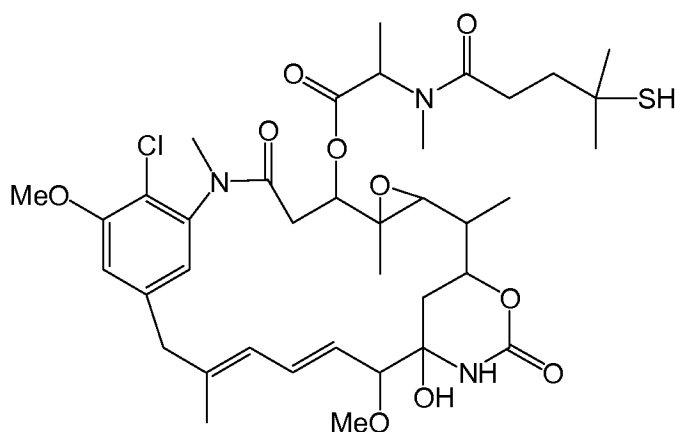
В предпочтительном варианте воплощения изобретения конъюгат в качестве цитотоксического агента использует тиолсодержащий майтансиноид DM1, также известный как N^{2'}-деацетил-N^{2'}-(3-меркапто-1-оксипропил)-майтансин. Структура DM1 представлена формулой (I):



(I)

В другом предпочтительном варианте воплощения изобретения конъюгат в качестве цитотоксического агента использует тиолсодержащий майтансиноид DM4, также известный как N^{2'}-деацетил-N^{2'}-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)-майтансин.

Структура DM4 представлена формулой (II):

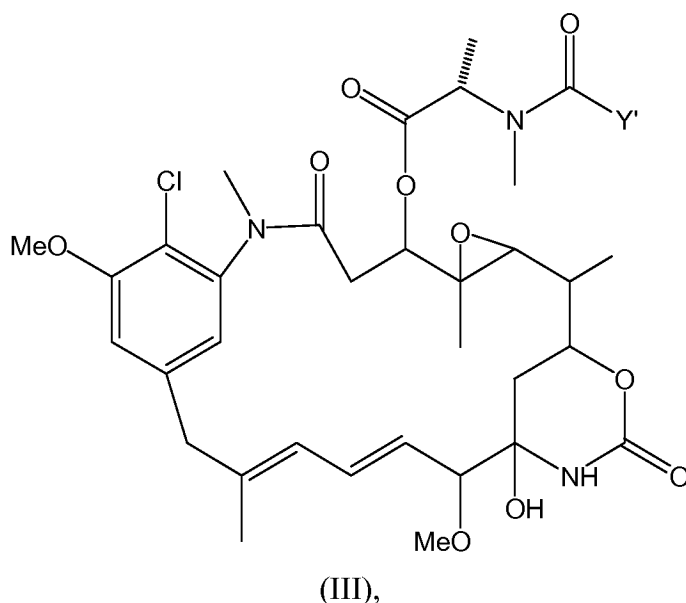


(II)

Другие майтансиноиды могут использоваться в контексте изобретения, включая, например, тиол- и дисульфид-содержащие майтансиноиды, несущие моно- или диалкильные замены на атоме углерода, несущем атом серы. В частности, преимущественным является майтансиноид, имеющий в С-3 положении (а) С-14 гидроксиметил, С-15 гидроксид или С-20 десметил функциональность, и (б) ацилированную аминокислотную боковую цепь с ацильной группой, несущей блокированную сульфгидрильную группу, при этом атом углерода ацильной группы, несущей тиоловую функциональность, имеет одну или две замены, и указанные замены представлены CH₃, C₂H₅, линейным или разветвленным алкилом или

алкенилом, имеющем от 1 до 10 атомов углерода, циклическим алкилом или алкенилом, имеющем от 3 до 10 атомов углерода, фенилом, замещенным фенилом, или гетероциклическим ароматическим или гетероциклоалкильным радикалом, и, кроме того, одна из замен может быть представлена H, и при этом ацильная группа имеет длину линейной цепи, по меньшей мере, три атома углерода между карбонилем и атомом серы.

Дополнительные майтансиноиды для использования в контексте изобретения включают соединения, представленные формулой (III):



при этом Y' является

$(CR_7R_8)_1 (CR_9=CR_{10})_p (C\equiv C)_q A_o (CR_5R_6)_m D_u (CR_{11}=CR_{12})_r (C\equiv C)_s B_t (CR_3R_4)_n CR_1 R_2 SZ,$

при этом R₁ и R₂ каждый являются независимым образом CH₃, C₂H₅, линейным алкилом или алкенилом, имеющем от 1 до 10 атомов углерода, разветвленным или циклическим алкилом или алкенилом, имеющем от 3 до 10 атомов углерода, фенилом, замещенным фенилом или гетероциклическим ароматическим или гетероциклоалкильным радикалом, и при этом R₂ также может быть H,

при этом A, B, D являются циклоалкилом или циклоалкенилом, имеющем 3-10 атомов углерода, простым или замещенным арилом, или гетероциклическим ароматическим или гетероциклоалкильным радикалом,

при этом R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ и R₁₂ каждый являются независимым образом H, CH₃, C₂H₅, линейным алкилом или

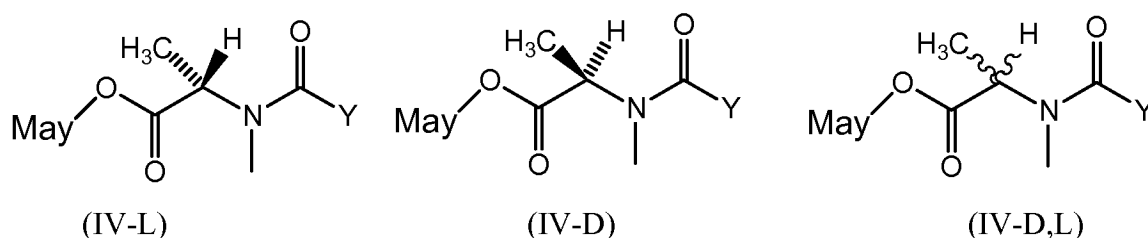
алкенилом, имеющем от 1 до 10 атомов углерода, разветвленным или циклическим алкилом или алкенилом, имеющем от 3 до 10 атомов углерода, фенилом, замещенным фенилом или гетероциклическим ароматическим или гетероциклоалкильным радикалом,

при этом l, m, n, o, p, q, r, s и t каждый являются независимым образом нулем или целым числом от 1 до 5, при условии, что, по меньшей мере, два l, m, n, o, p, q, r, s и t не являются нулем в любой момент времени, и

при этом Z является H, SR или COR , при этом R является линейным алкилом или алкенилом, имеющем от 1 до 10 атомов углерода, разветвленным или циклическим алкилом или алкенилом, имеющем от 3 до 10 атомов углерода, или простым или замещенным арилом, или гетероциклическим ароматическим или гетероциклоалкильным радикалом.

Предпочтительные варианты воплощения изобретения по формуле (III) включают соединения по формуле (III), при этом (а) R_1 является H , R_2 является метилом и Z является H , (б) R_1 и R_2 являются метилом и Z является H , (в) R_1 является H , R_2 является метилом и Z является $-SCH_3$, и (г) R_1 и R_2 являются метилом и Z является $-SCH_3$.

Такие дополнительные майтансиноиды также включают соединения, представленные формулой (IV-L), (IV-D) или (IV-D,L):



при этом Y является $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

при этом R_1 и R_2 каждый независимым образом являются CH_3 , C_2H_5 , линейным алкилом или алкенилом, имеющем от 1 до 10 атомов углерода, разветвленным или циклическим алкилом или алкенилом, имеющем от 3 до 10 атомов углерода, фенилом, замещенным фенилом или гетероциклическим ароматическим или гетероциклоалкильным радикалом, и при этом R_2 также может являться H ,

при этом R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 и R_8 каждый независимым образом являются H , CH_3 , C_2H_5 , линейным алкилом или алкенилом, имеющем от 1 до 10 атомов углерода, разветвленным или циклическим алкилом или алкенилом, имеющем от 3 до 10 атомов углерода, фенилом, замещенным фенилом или гетероциклическим ароматическим или гетероциклоалкильным радикалом,

при этом l , m и n каждый независимым образом являются целым числом от 1 до 5, и, кроме того, n может быть нулем,

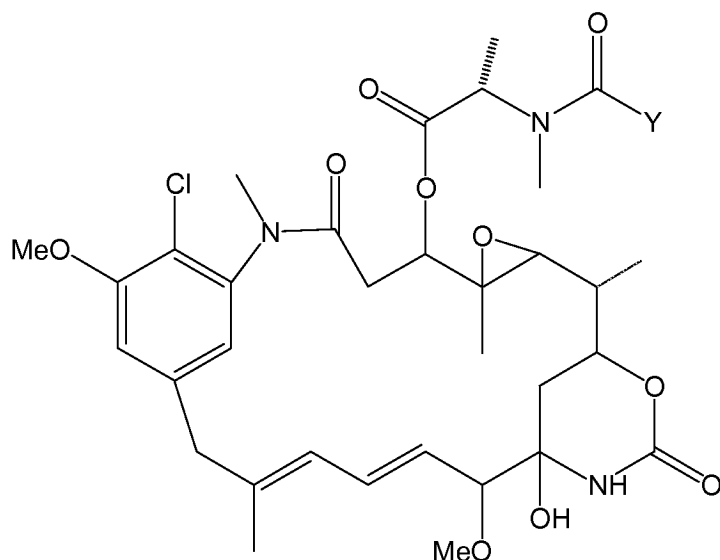
при этом Z является H , SR или COR , при этом R является линейным или разветвленным алкилом или алкенилом, имеющем от 1 до 10 атомов углерода, циклическим алкилом или алкенилом, имеющем от 3 до 10 атомов углерода, или простым или замещенным арилом, или гетероциклическим ароматическим или гетероциклоалкильным радикалом, и

при этом Ma_u является майтансиноидом, несущим боковую цепь в положении C-3, C-14 гидроксиметил, C-15 гидроксид или C-20 десметил.

Предпочтительные варианты воплощения изобретения по формулам (IV-L), (IV-D) и (IV-D,L) включают соединения по формулам (IV-L), (IV-D) и (IV-D,L), при этом (а) R_1 является H , R_2 является метилом, R_5 , R_6 , R_7 и R_8 каждый являются H , l и m каждый являются 1, n является 0, и Z является H , (б) R_1 и R_2 являются метилом, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 каждый являются H , l и m являются 1, n является 0, и Z является H , (в) R_1 является H , R_2 является метилом, R_5 , R_6 , R_7 и R_8 каждый являются H , l и m каждый являются 1, n является 0, и Z является $-SCH_3$, или (г) R_1 и R_2 являются метилом, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 каждый являются H , l и m являются 1, n является 0, и Z является $-SCH_3$.

Предпочтительно, цитотоксический агент представлен формулой (IV-L).

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



(V)

при этом Y является $(CR_7R_8)_1(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

при этом R_1 и R_2 каждый независимым образом являются CH_3 , C_2H_5 , линейным алкилом или алкенилом, имеющем от 1 до 10 атомов углерода, разветвленным или циклическим алкилом или алкенилом, имеющем от 3 до 10 атомов углерода, фенилом, замещенным фенилом или гетероциклическим ароматическим или гетероциклоалкильным радикалом, и при этом R_2 также может являться H,

при этом R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 и R_8 каждый независимым образом являются H, CH_3 , C_2H_5 , линейным алкилом или алкенилом, имеющем от 1 до 10 атомов углерода, разветвленным или циклическим алкилом или алкенилом, имеющем от 3 до 10 атомов углерода, фенилом, замещенным фенилом или гетероциклическим ароматическим или гетероциклоалкильным радикалом,

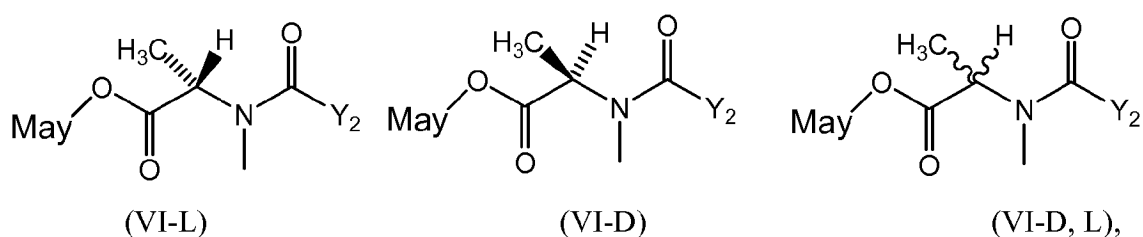
при этом l, m и n каждый независимым образом являются целым числом от 1 до 5, и, кроме того, n может быть нулем, и

при этом Z является H, SR или COR, при этом R является линейным алкилом или алкенилом, имеющем от 1 до 10 атомов углерода, разветвленным или циклическим алкилом или алкенилом, имеющем от 3 до 10 атомов углерода, или простым или замещенным арилом, или гетероциклическим ароматическим или гетероциклоалкильным радикалом.

Предпочтительные варианты воплощения изобретения по формуле (V) включают соединения по формуле (V), при этом (a) R_1 является

H, R₂ является метилом, R₅, R₆, R₇ и R₈ каждый являются H; l и m каждый являются 1; n является 0; и Z является H, (б) R₁ и R₂ являются метилом; R₅, R₆, R₇, R₈ каждый являются H, l и m являются 1; n является 0; и Z является H, (в) R₁ является H, R₂ является метилом, R₅, R₆, R₇ и R₈ каждый являются H, l и m каждый являются 1, n является 0, и Z является -SCH₃, или (г) R₁ и R₂ являются метилом, R₅, R₆, R₇, R₈ каждый являются H, l и m являются 1, n является 0, и Z является -SCH₃.

Дополнительные предпочтительные майтансиноиды также включают соединения, представленные формулой (VI-L), (VI-D) или (VI-D, L):



при этом Y₂ является (CR₇R₈)₁(CR₅R₆)_m(CR₃R₄)_nCR₁R₂SZ₂,

при этом R₁ и R₂ каждый независимым образом являются CH₃, C₂H₅, линейным алкилом или алкенилом, имеющем от 1 до 10 атомов углерода, разветвленным или циклическим алкилом или алкенилом, имеющем от 3 до 10 атомов углерода, фенилом, замещенным фенилом или гетероциклическим ароматическим или гетероциклоалкильным радикалом, и при этом R₂ также может являться H,

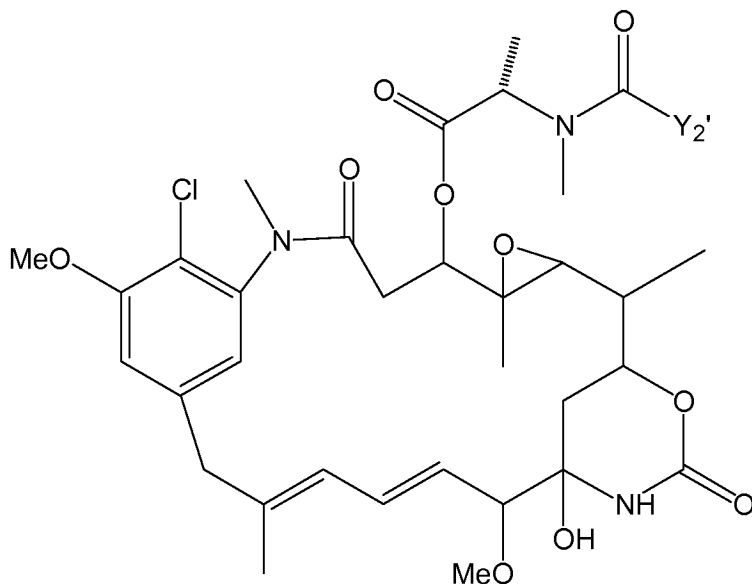
при этом R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ и R₈ каждый независимым образом являются H, CH₃, C₂H₅, линейным циклическим алкилом или алкенилом, имеющем от 1 до 10 атомов углерода, разветвленным или циклическим алкилом или алкенилом, имеющем от 3 до 10 атомов углерода, фенилом, замещенным фенилом или гетероциклическим ароматическим или гетероциклоалкильным радикалом,

при этом l, m и n каждый независимым образом являются целым числом от 1 до 5, и, кроме того, n может быть нулем, и

при этом Z₂ является SR или COR, при этом R является линейным алкилом или алкенилом, имеющем от 1 до 10 атомов углерода, разветвленным или циклическим алкилом или алкенилом, имеющем от 3 до 10 атомов углерода, или простым или замещенным арилом, или гетероциклическим ароматическим или

гетероциклоалкильным радикалом, и при этом Мау является макроциклической кольцевой структурой майтансиноида.

Дополнительные предпочтительные майтансиноиды включают соединения, представленные формулой (VII):



(VII),

при этом Y₂' является

$(CR_7R_8)_1 (CR_9=CR_{10})_p (C\equiv C)_q A_o (CR_5R_6)_m D_u (CR_{11}=CR_{12})_r (C\equiv C)_s B_t (CR_3R_4)_n CR_1 R_2 S Z_2,$

при этом R₁ и R₂ каждый являются независимым образом CH₃, C₂H₅, линейным разветвленным алкилом или алкенилом, имеющим от 1 до 10 атомов углерода, циклическим алкилом или алкенилом, имеющим от 3 до 10 атомов углерода, фенилом, замещенным фенилом или гетероциклическим ароматическим или гетероциклоалкильным радикалом, и при этом R₂ может быть H,

при этом A, B и D каждый являются независимым образом циклоалкилом или циклоалкенилом, имеющим 3-10 атомов углерода, простым или замещенным арилом, или гетероциклическим ароматическим или гетероциклоалкильным радикалом,

при этом R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, R₁₁ и R₁₂ каждый являются независимым образом H, CH₃, C₂H₅, линейным алкилом или алкенилом, имеющим от 1 до 10 атомов углерода, разветвленным или циклическим алкилом или алкенилом, имеющим от 3 до 10 атомов углерода, фенилом, замещенным фенилом или гетероциклическим ароматическим или гетероциклоалкильным радикалом,

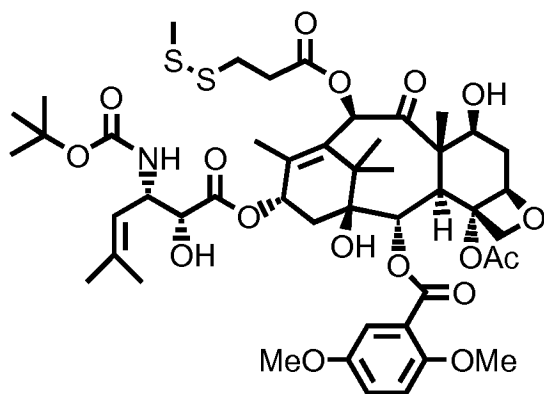
при этом l, m, n, o, p, q, r, s и t каждый являются независимым образом нулем или целым числом от 1 до 5, при условии, что, по меньшей мере, два l, m, n, o, p, q, r, s и t не являются нулем в любой момент времени, и

при этом Z_2 является SR или -COR, при этом R является линейным алкилом или алкенилом, имеющем от 1 до 10 атомов углерода, разветвленным или циклическим алкилом или алкенилом, имеющем от 3 до 10 атомов углерода, или простым или замещенным арилом, или гетероциклическим ароматическим или гетероциклоалкильным радикалом.

Предпочтительные варианты воплощения изобретения по формуле (VII) включают соединения по формуле (VII), при этом R_1 является H и R_2 является метилом.

Кроме майтансиноидов, цитотоксический агент, используемый в конъюгате, может быть таксаном или его производным. Таксаны являются семейством соединений, которые включают паклитаксел (Таксол®), цитотоксический натуральный продукт, и доцетаксел (Таксотер®), полусинтетическое производное, оба из которых используют в лечении рака. Таксаны являются ингибиторами митотического веретена и ингибируют деполимеризацию тубулина, приводя к смерти клетки. В то время как доцетаксел и паклитаксел используют в лечении рака, их противоопухолевая активность ограничена по причине их неспецифической токсичности относительно здоровых клеток. Кроме того, соединения, подобные паклитакселю и доцетакселю, сами по себе не достаточно сильные для использования в конъюгатах связывающих клетку агентов.

Предпочтительный таксан для использования в получении цитотоксического конъюгата является таксаном по формуле (VIII):



(VIII)

Способы синтеза таксанов, которые могут использоваться в контексте изобретения, вместе со способами конъюгации таксанов со связывающими клетку агентами, такими как антитела, описаны подробно в патентах США №№ 5416064, 5475092, 6340701, 6372738, 6436931, 6596757, 6706708, 6716821 и 7390898.

Цитотоксический агент также может быть представлен СС-1065 или его производным. СС-1065 является сильным противоопухолевым антибиотиком, выделенным из культуральной жидкости *Streptomyces zelensis*. СС-1065 приблизительно в 1000 раз сильнее *in vitro*, чем обычно используемые противораковые препараты, такие как доксорубин, метотрексат и винкристин (Bhuyan et al., *Cancer Res.*, 42: 3532-3537 (1982)). СС-1065 и его аналоги описаны в патентах США № 5585499, 5846545, 6340701 и 6372738. Цитотоксическая активность СС-1065 коррелировала с его алкилирующей активностью, а также активностью в связывании ДНК и интеркаляции ДНК. Эти два свойства присущи двум отдельным частям молекулы. В этом отношении алкилирующая активность присуща единице циклопропапирролоиндолу (CPI), и активность связывания ДНК присуща двум единицам пирролоиндола СС-1065.

В науке известно несколько аналогов СС-1065, которые также могут использоваться в качестве цитотоксического агента в конъюгате (см., например, Warpehoski et al., *J. Med. Chem.*, 31: 590-603 (1988)). Была разработана целая серия аналогов СС-1065, в которых молекула CPI замещена молекулой циклопропабензиндола (CBI) (Boger et al., *J. Org. Chem.*, 55: 5823-5833 (1990), и Boger et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1: 115-120 (1991)).

Такие аналоги СС-1065 поддерживают высокую активность *in vitro* исходного препарата без выявления замедленной токсичности у мышей. Подобно СС-1065, такие соединения являются алкилирующими агентами, которые ковалентно связываются с малой бороздкой ДНК для вызова смерти клетки.

Терапевтическая эффективность аналогов СС-1065 может быть по существу улучшена изменением распределения *in vivo* посредством целенаправленной доставки к месту опухоли, что приводит к сниженной токсичности для других тканей и, следовательно, пониженной системной токсичности. Вследствие этого были получены конъюгаты аналогов и производных СС-1065 со связывающими клетку агентами, которые специфически направлены на опухолевые клетки (см., например, патенты США №№ 5475092, 5585499 и 5846545). Эти конъюгаты обычно обладают высокой мишень-специфической цитотоксичностью *in vitro* и противоопухолевой активностью в моделях опухолевых ксенотрансплантатов у мышей (см., например, Chari et al., *Cancer Res.*, 55: 4079-4084 (1995)).

Способы синтеза аналогов СС-1065 описаны подробно в патентах США № 5475092, 5585499, 5846545, 6534660, 6586618, 6756397 и 7329760.

Такие препараты, как метотрексат, даунорубицин, доксорубицин, винкристин, винбластин, мелфалан, митомицин С, хлорамбуцил, калихеамицин, тубулизин и аналоги тубулизина, дуокармицин и аналоги дуокармицина, доластатин и аналоги доластатина также могут использоваться в качестве цитотоксического агента по изобретению. Доксарубицин и соединения даунорубицина (см., например, патент США №6630579) также могут использоваться в качестве цитотоксических агентов.

Конъюгаты "связывающий клетку агент и цитотоксический агент" могут быть получены способами *in vitro*. Для присоединения цитотоксического агента к антителу используют соединительную группу. Подходящие соединительные группы хорошо известны в науке и включают дисульфидные группы, кислотонеустойчивые группы, фотонеустойчивые группы, пептидаzoneустойчивые группы и эстераzoneустойчивые группы, а также нерасщепляемые соединительные группы. Например, связывающий клетку агент

химически соединен с цитотоксическим агентом посредством химических связей, выбираемых из группы, состоящей из дисульфидных связей, кислотонеустойчивых связей, фотонеустойчивых связей, пептидаzoneустойчивых связей, тиоэфирных связей и эстераzoneустойчивых связей.

В соответствии с изобретением, связывающий клетку агент присоединен к цитотоксическому агенту посредством бифункционального реагента, образующего перекрестные связи. В контексте данного изобретения термин «бифункциональный реагент, образующий перекрестные связи» обозначает реагент, которые обладает двумя реакционными группами, одна из которых способна реагировать со связывающим клетку агентом, в то время как другая способна реагировать с цитотоксическим агентом для связи связывающего клетку агента с цитотоксическим агентом, образуя тем самым конъюгат.

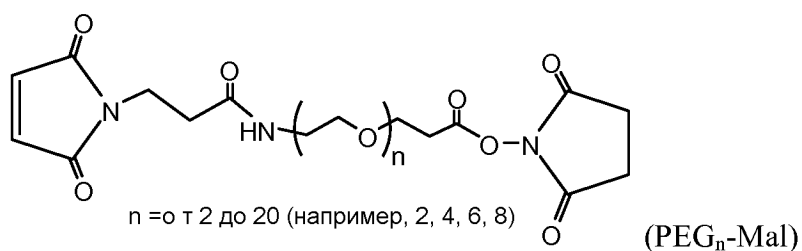
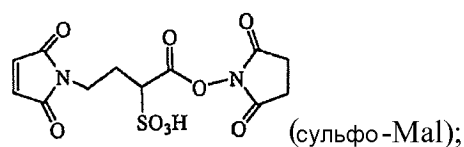
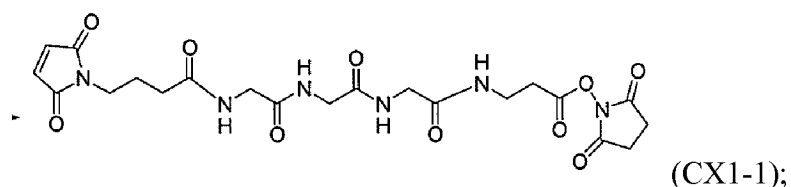
Для использования в изобретении может использоваться любой подходящий бифункциональный реагент, образующий перекрестные связи, при условии, что реагент линкера обеспечивает сохранение терапевтических, например, цитотоксичности, и связующих характеристик цитотоксическому агенту и связывающему клетку агенту, соответственно, без чрезмерной токсичности. Предпочтительно, молекула линкера соединяет цитотоксический агент со связывающим клетку агентом посредством химических связей (как это описано выше), таким образом, цитотоксический агент и связывающий клетку агент являются химическим соединенными (например, ковалентно соединенными) друг с другом.

В одном варианте воплощения изобретения бифункциональный реагент, образующий перекрестные связи, включает нерасщепляемые линкеры. Нерасщепляемый линкер является любой химической молекулой, которая способна связывать цитотоксический агент, такой как майтансиноид, таксан или аналог СС-1065, со связывающим клетку агентом стабильным, ковалентным способом. Таким образом, нерасщепляемые линкеры по существу устойчивы к кислотному расщеплению, расщеплению, индуцированному светом, расщеплению, индуцированному пептидазой, расщеплению, индуцированному эстеразой, и расщеплению дисульфидной связи при

условиях, при которых цитотоксический агент или связывающий клетку агент остаются активными.

Подходящие реагенты, образующие перекрестные связи и нерасщепляемые линкеры между цитотоксическим агентом и связывающим клетку агентом, хорошо известны в науке. В одном варианте воплощения изобретения цитотоксический агент присоединен к связывающему клетку агенту посредством тиоэфирной связи. Примеры нерасщепляемых линкеров включают линкеры, имеющие малеимидо- или галоацетил-основанные молекулы для реакции с цитотоксическим агентом. Такие бифункциональные реагенты, образующие перекрестные связи, хорошо известны в науке (см. публикации заявок на патенты США № 2010/0129314, 2009/0274713, 2008/0050310, 20050169933, 2009/0274713, 2010/0129314 и Pierce Biotechnology Inc. P.O. Box 117, Rockland, IL 61105, USA) и включают, но не ограничиваются, N-сукцинимидил 4-(малеимидометил)циклогексанкарбоксилат (SMCC), N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбокси-(6-амидокапроат), который является «длинноцепочечным» аналогом SMCC (LC-SMCC), κ -малеимидоундекановой кислоты N-сукцинимидиловый эфир (KMUA), γ -малеимидомасляной кислоты N-сукцинимидиловый эфир (GMBS), ϵ -малеимидокапроевой кислоты N-гидроксисукцинимидный эфир (EMCS), m-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидный эфир (MBS), N-(α -малеимидоацетокси)-сукцинимидный эфир (AMAS), сукцинимидил-6-(β -малеимидопропионамидо)гексаноат (SMPH), N-сукцинимидил 4-(p-малеимидофенил)-бутират (SMPB) и N-(p-малеимидофенил)изоцианат (PMPI). Реагенты, образующие перекрестные связи и включающие молекулу галоацетила, включают N-сукцинимидил-4-(йодоацетил)-аминобензоат (SIAB), N-сукцинимидил йодоацетат (SIA), N-сукцинимидил бромацетат (SBA) и N-сукцинимидил 3-(бромацетамидо)пропионат (SBAP), бис-малеидополиэтиленгликоль (BMPEO), BM(PEO)₂, BM(PEO)₃, N-(β -малеимидопропилокси)сукцинимидный эфир (BMPS), 5-малеимидовалериановой кислоты NHS, HBVS, 4-(4-N-малеимидофенил)-масляной кислоты гидразид•HCl (MPBH), сукцинимидил-(4-винилсульфонил)бензоат (SVSB), дитиобис-малеимидозтан (DTME),

1,4-бис-малеимидобутан (BMB), 1,4 бисмалеимидил-2,3-дигидроксибутан (BMDV), бис-малеимидогексан (BMH), бис-малеимидоэтан (BMOE), сульфосукцинимидил 4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC), сульфосукцинимидил (4-йодоацетил) аминобензоат (сульфо-SIAB), m-малеимидобензоил-N-гидроксисульфосукцинимидный эфир (сульфо-MBS), N-(γ-малеимидобутирилокси) сульфосукцинимидный эфир (сульфо-GMBS), N-(ε-малеимидокапроилокси) сульфосукцинимидный эфир (сульфо-EMCS), N-(κ-малеимидоундеканолокси) сульфосукцинимидный эфир (сульфо-KMUS), сульфосукцинимидил 4-(p-малеимидофенил)бутират (сульфо-SMPB) CX1-1, сульфо-Mal и PEG_n-Mal. Предпочтительно, бифункциональный реагент, образующий перекрестные связи, является SMCC.



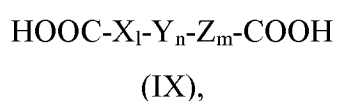
В одном варианте воплощения изобретения соединяющий реагент является расщепляемым линкером. Примеры подходящих расщепляемых линкеров включают дисульфидные линкеры, кислотонеустойчивые линкеры, светонеустойчивые линкеры, пептидаzoneустойчивые линкеры и эстераzoneустойчивые линкеры. Содержащие дисульфид линкеры являются линкерами, расщепляемыми посредством дисульфидного обмена, который может возникать при физиологических условиях. Кислотонеустойчивые линкеры являются линкерами, расщепляемыми при кислом pH. Например, определенные внутриклеточные компартменты, такие как эндосомы и лизосомы,

имеют кислый рН (рН 4-5) и обеспечивают условия, подходящие для расщепления кислотонеустойчивых линкеров. Светонеустойчивые линкеры используют на поверхности тела и в большинстве полостей, доступных для света. Кроме того, инфракрасный свет может проникать через ткань. Пептидаzoneустойчивые линкеры также могут использоваться для расщепления определенных пептидов внутри или снаружи клеток (см., например, Trouet et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79: 626-629 (1982), и Umemoto et al., *Int. J. Cancer*, 43: 677-684 (1989)). В одном варианте воплощения изобретения расщепляемый линкер расщепляется при умеренных условиях, т.е. условиях в клетке, при которых активность цитотоксического агента сохранена.

В другом варианте воплощения изобретения цитотоксический агент присоединен к связывающему клетку агенту посредством дисульфидной связи. Молекула линкера включает реакционную химическую группу, которая реагирует со связывающим клетку агентом. Преимущественными реакционными химическими группами для реакции со связывающим клетку агентом, являются *N*-сукцинимидиловые эфиры и *N*-сульфосукцинимидиловые эфиры. Кроме того, линкерная молекула включает реакционную химическую группу, предпочтительно дитиопиридиловую группу, которая может реагировать с цитотоксическим агентом с образованием дисульфидной связи. Бифункциональные реагенты, образующие перекрестные связи и способные связывать связывающий клетку агент с цитотоксическим агентом посредством дисульфидных связей, известны науке и включают, например, *N*-сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) (см., например, Carlsson et al., *Biochem. J.*, 173: 723-737 (1978)), *N*-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио)бутаноат (SPDB) (см., например, патент США №4563304), *N*-сукцинимидил 4-(2-пиридилдитио)пентаноат (SPP) (см., например, CAS регистрационный номер 341498-08-6) и *N*-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)2-сульфобутаноат (сульфо-SPDB) (см., например, публикацию заявки на патент США № 2009/0274713). Другие бифункциональные реагенты, образующие перекрестные связи, которые могут использоваться для введения дисульфидных групп, известны науке и описаны в патентах США № 6913748, 6716821 и

публикациях заявок на патенты США 2009/0274713 и 2010/0129314, все из которых включены сюда во всей своей полноте посредством ссылки.

В способе по изобретению также могут использоваться и другие реагенты, образующие перекрестные связи, при отсутствии атома серы, который образует нерасщепляемые линкеры. Такие линкеры могут быть получены из молекул на основе дикарбоновой кислоты. Подходящие молекулы на основе дикарбоновой кислоты включают, но не ограничиваются, α,ω -дикарбоновые кислоты по общей формуле (IX):



при этом X является линейной или разветвленной алкильной, алкенильной или алкинильной группой, имеющей от 2 до 20 атомов углерода, Y является циклоалкильной или циклоалкенильной группой, несущей от 3 до 10 атомов углерода, Z является замещенной или незамещенной ароматической группой, несущей от 6 до 10 атомов углерода, или замещенной или незамещенной гетероциклической группой, при этом гетероатом выбирают из N, O или S, и при этом l, m и n каждый являются 0 или 1, при условии, что l, m и n не являются нулем в одно и то же самое время.

Много описанных здесь нерасщепляемых линкеров подробно описано в публикации заявки на патент США № 2005/0169933 A1.

Представленные ниже примеры дополнительно иллюстрируют изобретение, но, конечно же, не должны никоим образом ограничивать объем изобретения.

Пример 1

Гуманизированное антитело CD37-3 реагировало с гетеробифункциональным реагентом SMCC, образующим перекрестные связи, и майтансиноидом DM1 с использованием описанного ранее способа (например, патент США № 5208020), а также одностадийного способа, описанного в тексте данной заявки.

Для описанного ранее способа, huCD37-3 (15 мг/мл) вначале было подвергнуто реакции с SMCC (6,5-кратный молярный избыток в сравнении с количеством антитела) с образованием

модифицированного антитела. Реакцию модификации проводили при 16°C в 50 мМ буфера натрия фосфата (рН 6,9), содержащем 2 мМ ЭДТА в 10% DMA в течение 90 минут. Реакция была погашена 1 М ацетата для коррекции рН до 4,5, и модифицированное антитело было очищено с использованием колонки со смолой Sephadex G-25F с установленным равновесием и элюированием в 20 мМ натрия ацетата (рН 4,5), содержащем 2 мМ ЭДТА. После очистки, модифицированное антитело (при концентрации 5 мг/мл) прореагировало с майтансиноидом DM1 (6,8-кратный молярный избыток в сравнении с количеством антитела; 1,3-кратный молярный избыток в сравнении с измеренным количеством линкера на антителе) с образованием конъюгированного антитела. Реакцию конъюгации проводили при 20°C в 20 мМ буфера натрия ацетата (рН 5,0), содержащем 2 мМ ЭДТА и 5% DMA в течение приблизительно 20 часов. Реакционная смесь затем была очищена с использованием колонки со смолой Sephadex G-25F с установленным равновесием и элюирована в 10 мМ натрия сукцината (рН 5,0).

Для способа по изобретению huCD37-3 (2,5 мг/мл) было смешано с DM1 (6,2-кратный молярный избыток в сравнении с количеством антитела) и затем с SMCC (5,2-кратный молярный избыток в сравнении с количеством антитела). Реакцию проводили при 20°C в 50 мМ EPPS [4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинпропансульфоновая кислота] буфере (рН 8,1), содержащем 2 мМ EDTA и 10% DMA в течение приблизительно 4 часов. Реакция была погашена добавлением 1 М ацетата для корректировки рН до 5,0. Затем реакционную смесь выдерживали при 2 - 8°C в течение приблизительно 20 часов. После выдерживания, реакционная смесь была профильтрована через 0,2 мкм ПВДФ фильтр и очищена, и подвергнута диафильтрации с 10 мМ натрия сукцината (рН 5,0) с использованием фильтрации тангенциальными потоками (ФТП).

Конъюгат, полученный двумя способами, был проанализирован следующим образом: Уф спектроскопия для определения концентрации и нагрузки цитотоксического агента (соотношение майтансиноида к антителу; MAR); масс-спектрометрия для определения уровня неконъюгированного линкера; восстановительный SDS PAGE электрофорез для определения уровня невосстанавливаемых видов;

эксклюзионная ВЭЖХ для определения мономера конъюгата; и стабильность при хранении относительно мономера конъюгата и высвобождения несвязанного майтансиноида.

Соотношение концентрации и майтансиноида к антителу (MAR) было определено измерением поглощаемости конъюгата при проведении спектроскопии при УФ и видимом спектре при 252 и 280 нм и использовании коэффициентов молярной экстинкции DM1 и антитела при двух длинах волн для расчета молярных концентраций антитела и DM1.

Уровень неконъюгированного линкера для конъюгатов был проанализирован масс-спектрометрией: площади пиков отдельных видов конъюгатов (включая конъюгатов с или без неконъюгированных линкеров) были измерены; уровень неконъюгированного линкера был рассчитан по соотношению суммы площадей, содержащих неконъюгированные линкеры (взвешено по количеству линкеров) к сумме площадей всех конъюгированных видов (также взвешены по количеству линкеров).

Уровень невосстанавливаемых видов конъюгатов был проанализирован восстановительным гель-электрофорезом SDS: площади пиков отдельного восстановленного вида конъюгата (включая восстановленную легкую цепь, восстановленную тяжелую цепь, легкие цепи, сшитые поперечными связями, легкие и тяжелые цепи, сшитые поперечными связями и т.д.) были измерены; уровень невосстанавливаемых видов был рассчитан по соотношению сумм площадей невосстанавливаемых видов к сумме площадей всех видов.

Уровень мономеров конъюгатов был проанализирован эксклюзионной ВЭЖХ: площади пиков мономеров, димеров, агрегатов и низкомолекулярных видов были измерены с использованием детектора поглощения, установленного на длину волны 252 нм или 280 нм; уровень мономеров был рассчитан по соотношению площади мономеров к общей площади.

Количество несвязанного майтансиноида, присутствующего в конъюгате, было проанализировано двухколоночной ВЭЖХ (колонок HiSep и C18): площади пиков общих несвязанных видов майтансиноидов (элюированных в градиенте и идентифицированных сравнением времени элюирования с известными стандартами) были

измерены с использованием детектора поглощения, установленного на длину волны 252 нм; количество несвязанного майтансиноида было рассчитано с использованием стандартной кривой, полученной по площади пиков известных количеств стандартов.

Как это показано в Таблице 1 ниже, конъюгат, полученный с использованием способа по изобретению, превосходил конъюгат, полученный с использованием описанного ранее способа относительно неконъюгированного линкера, невосстанавливаемых видов и мономера конъюгата. Кроме того, стабильность конъюгата, полученного способом по изобретению, по существу была выше относительно высвобождения несвязанного майтансиноида после хранения в течение пяти месяцев при 4°C. Уровни мономеров конъюгатов, полученных обоими способами, были стабильными.

Таблица 1

Сравнение основных свойств конъюгата CD37-3, полученного способом по изобретению, в сравнении с описанным ранее способом

	Описанный ранее способ	Способ по изобретению
Концентрация конъюгата	3,9	8,1
Соотношение майтансиноида к антителу	4,1	3,4
Неконъюгированный линкер (%)	12	< 1
Невосстанавливаемые виды (%)	9,4	0,9
Мономер конъюгата, (%) (t=0)	97,8	98,9
Мономер конъюгата, (%) (спустя 5 месяцев при 4°C)	97,8	98,4
Несвязанный майтансиноид, (%) (t=0)	0,4	0,2
Несвязанный майтансиноид, (%) (спустя 5 месяцев при 4°C)	3,3	0,5

Результаты экспериментов, отраженные в данном примере,

показывают улучшенный способ получения конъюгатов «связывающий клетку агент-цитотоксический агент», имеющие по существу повышенную чистоту. Кроме улучшений в чистоте и стабильности конъюгатов при использовании способа по изобретению, также имеются улучшения во времени получения и совместимости по причине упразднения двух стадий получения (реакции модификации и очистки модифицированного антитела).

Пример 2

Гуманизированное антитело к фолатному рецептору huMov19 (см. публикацию заявки на патент США №2012/0009181) прореагировало с гетеробифункциональным реагентом сульфо-SPDB, образующим перекрестные связи, и майтансиноидом DM4 с использованием двух описанных ранее способов, а также улучшенного способа, описанного в тексте данной заявки.

Для описанного ранее Способа А (двухстадийный способ, см., Chari et al., патент США №5208020), антитело huMov19 (20 мг/мл) вначале прореагировало с сульфо-SPDB (5,7-кратный молярный избыток относительно количества антитела, растворенного в DMA, диметилацетамиде) с образованием модифицированного антитела. Реакцию модификации проводили при 20°C в 50 мМ EPPS (4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-пропансульфоновая кислота) буфере (pH 8,1), содержащем 5% DMA, в течение 180 минут. Модифицированное антитело было очищено с использованием колонки со смолой Sephadex G-25F с установленным равновесием и элюировано в 50 мМ EPPS (pH 8,1) 2 мМ ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота). После очистки, модифицированное антитело (при концентрации 5,0 мг/мл) прореагировало с майтансиноидом DM4 (растворен в DMA; 9,7-кратный молярный избыток в сравнении с количеством антитела; 1,7-кратный молярный избыток в сравнении с измеренным количеством линкера на антителе) с образованием конъюгированного антитела. Реакцию конъюгации проводили при комнатной температуре в 50 мМ EPPS (pH 8,1), содержащем 2 мМ ЭДТА и 5% DMA в течение приблизительно 18 часов. Затем реакционная смесь была очищена с использованием колонки со смолой Sephadex G-25F с установленным равновесием и элюирована в 10 мМ натрия сукцината (pH 5,0).

Для описанного ранее Способа В (одностадийный способ, см.,

Dai et al., патент США №7811572), антитело huMov19 (10 мг/мл) вначале прореагировало с сульфо-SPDB (4,9-кратный молярный избыток относительно количества антитела, растворенного в DMA) с образованием модифицированного антитела. Реакцию модификации проводили при 20°C в 50 мМ буфера EPPS (pH 7,5), содержащем 2 мМ ЭДТА в 10% DMA в течение 60 минут. Модифицированное антитело не было очищено перед реакцией конъюгации. Вместо этого неочищенное модифицированное антитело прореагировало при концентрации 10 мг/мл с майтансиноидом DM4 (8,3-кратный молярный избыток относительно количества антитела, растворенного в DMA) с образованием конъюгированного антитела. Реакцию конъюгации проводили при комнатной температуре в 50 мМ буфере EPPS (pH 7,5), содержащем 2 мМ ЭДТА и 10% DMA в течение приблизительно 18 часов. Затем реакционная смесь была очищена с использованием колонки со смолой Sephadex G-25F с установленным равновесием и элюирована в 10 мМ натрия сукцината (pH 5,0).

Для способа по изобретению, для которого использовали Sephadex G-25 (Способ С, одностадийный способ) для очистки конъюгата, антитело huMov19 (6,0 мг/мл) было смешано с DM4 (9,7-кратный молярный избыток относительно количества антитела, растворенного в DMA) и затем с сульфо-SPDB (5,7-кратный молярный избыток относительно количества антитела, растворенного в DMA). Реакцию проводили при 20°C в 50 мМ буфере EPPS (pH 8,1), содержащем 2 мМ ЭДТА и 10% DMA в течение приблизительно 20 часов. Затем реакционная смесь была очищена с использованием колонки со смолой Sephadex G-25F с установленным равновесием и элюирована в 10 мМ натрия сукцината (pH 5,0).

Для способа по изобретению, для которого использовали фильтрацию тангенциальными потоками (ФТП) (Способ D, одностадийный способ) для очистки конъюгата, антитело huMov19 (5,0 мг/мл) было смешано с DM4 (10,2-кратный молярный избыток относительно количества антитела, растворенного в DMA) и затем с сульфо-SPDB (6,0-кратный молярный избыток относительно количества антитела, растворенного в DMA). Реакцию проводили при 20°C в 50 мМ буфере EPPS (pH 8,5), содержащем 2 мМ ЭДТА и 10% DMA в течение приблизительно 20 часов. Затем реакционная смесь

была очищена и подвергнута диофилтрации с использованием ФТП в 10 мМ натрия сукцинат (рН 5,0).

Конъюгат, полученный различными способами, был проанализирован следующим образом: УФ спектроскопия (для определения концентрации и соотношения майтансиноида к антителу, MAR); ВЭЖХ с обращенными фазами для определения несвязанного майтансиноида; масс-спектрометрия для определения уровня неконъюгированного линкера и профиля распределения масс; восстановительный электрофорез SDS PAGE для определения уровня невосстанавливаемых видов; невосстановительный электрофорез SDS PAGE для определения уровня фрагментации; эксклюзионная ВЭЖХ для определения мономера конъюгата. Стабильность при хранении была оценена относительно мономера конъюгата и высвобождения несвязанного майтансиноида. Дополнительные подробности способов анализа описаны в Примере 1.

Как это показано в Таблице 2 ниже, конъюгат, полученный с использованием способа по изобретению, превосходил конъюгат, полученный с использованием описанного ранее способа относительно мономера. Конъюгат, полученный с использованием одностадийного и одноэтапного способа, в котором проводили окончательную очистку конъюгата с использованием Sephadex G-25, т.е. Способов В и С, соответственно, имели повышенный уровень несвязанного майтансиноида в сравнении с конъюгатом, полученным с использованием двухстадийного способа, Способа А. Однако при использовании другого финального способа очистки, ФТП (Способ D), уровень несвязанного майтансиноида был очень низким и сопоставимым с уровнем, отмечаемым в ходе двухстадийного способа, при этом оба уровня отмечали после первичной очистки и после хранения при 4°C в течение шести недель. Относительно других важных характеристик конъюгата (например, фрагментации, невосстанавливаемых видов, профиля распределения масс и неконъюгированного линкера), конъюгат, полученный с использованием способа по изобретению, был эквивалентен конъюгату, полученному с использованием описанного ранее способа.

Сравнение основных свойств конъюгата huMov19, полученного по способу по изобретению, в сравнении с описанными ранее способами

Способ	Способ А*	Способ В*	Способ С*	Способ D**
Количество однократных действий	5	4	3	3
Концентрация (мг/мл)	1,0	1,0	1,0	4,2
MAR (УФ)	4	3,8	3,7	3,6
Мономер конъюгата, (%) при t=0	94,8	97,4	98,9	98,6
Мономер конъюгата, (%) при t=6 недель, 4°C	94,4	97,5	98,8	98,1
Несвязанный майтансиноид, (%) при t=0	0,6	6,3	3,1	0,1
Несвязанный майтансиноид, (%) при t=6 недель, 4°C	0,6	5,4	2,7	0,4
Фрагментация невосстанавливаемым gel-chip (%)	10	14	14	12
Невосстанавливаемые виды с использованием восстанавливаемого gel-chip (%)	0,7	0,8	0,7	0,5
Профиль распределения масс (MDP)	Сопоставимый			
Неконъюгированный линкер (MDP)	Не определяется			

* Очищен с использованием G-25

** Очищен с использованием ФТП

Результаты экспериментов, отраженные в данном примере,

показывают улучшенный способ получения конъюгатов «связывающий клетку агент-цитотоксический агент», имеющие по существу повышенную чистоту. Кроме улучшений в чистоте и стабильности конъюгатов при использовании способа по изобретению, также имеются улучшения во времени получения и совместимости по причине элиминации двух стадий получения (реакции модификации и очистки модифицированного антитела).

Пример 3

Данный пример показывает, что описанный здесь одностадийный способ может использоваться для получения конъюгатов с различными линкерами и цитотоксическими агентами майтансиноидами.

Гуманизированное антитело huN901 было смешано с майтансиноидом (DM1 или DM4) и затем с линкером (сульфо-SMCC, SMCC, SPDB или SPP). Реакцию проводили при 20°C в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7,5), содержащем 2 мМ ЭДТА и 10% DMA в течение приблизительно 20-24 часов. Затем реакционная смесь была очищена с использованием колонки со смолой Sephadex G25F с установленным равновесием и элюирована в 10 мМ натрия сукцината (pH 5,0).

Как это показано в Таблице 3 ниже, одностадийная реакция может быть проведена с различными комбинациями линкера и майтансиноида с хорошим выходом конъюгата, соотношением MAR и уровнями мономеров.

Таблица 3

Получение конъюгатов с использованием различных комбинаций линкера и майтансиноида

	Линкер	DMx	MAR конъюгата	Мономер конъюгата (%)
Двухстадийный	SPP	DM1	3,5	96,8
Одностадийный (по изобретению)	SPP	DM1	3,4	97,5
	SPDB	DM1	4,6	97,7
	SMCC	DM4	4,5	95,1
	S-SMCC	DM1	3,5	98,0
	SPDB	DM4	3,8	97,3

Все ссылки, включая публикации, заявки на патенты и патенты, процитированные в тексте данной заявки, включены сюда во всей своей полноте посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая ссылка была представлена отдельным и специальным образом с указанием путем ссылки и в полной своем объеме.

Указатель единственного числа и подобные понятия, используемые в контексте данного изобретения (особенно в контексте представленной ниже формулы изобретения), включают единственное и множественное число, если четко не указано иное или это четко не следует из контекста. Термины «включать», «иметь», «включая» и «содержать» обозначают неограничивающие термины (т.е. обозначают «включая, но не ограничиваясь»), если не указано иное. Указание диапазонов значений в тексте данной заявки служит в качестве способа сокращения обозначения ссылки на каждое отдельное значение, включенное в диапазон, если не указано иное, и каждое отдельное значение включено в текст, как если бы оно было указано отдельным образом. Все описанные здесь способы могут проводиться в любом подходящем порядке, если не указано иное или если иное четко не следует из контекста. Использование любого и всех примеров или типичных терминов (например, «такой как») в тексте данной заявки предназначено только для иллюстрации изобретения и не должно ограничивать объем изобретения, если не указано иное. Ни один термин в тексте заявки не должен рассматриваться как указывающий на любой незаявленный элемент как существенный для практического использования изобретения.

В данном документе описаны предпочтительные варианты воплощения данного изобретения, включая наиболее известный способ осуществления изобретения, известный исследователям. Специалисту в данной области после прочтения представленного выше описания станут очевидными вариации предпочтительных вариантов воплощения изобретения. Исследователи ожидают, что специалисты в данной области будут использовать данные вариации соответствующим образом, кроме того, исследователи предполагают, что изобретение может быть использовано иным способом, чем это описано в данной заявке. В соответствии с этим, данное

изобретение включает все модификации и эквиваленты сущности изобретения, представленной в прилагаемой формуле изобретения в соответствии с действующим законодательством. Более того, любая комбинация описанных выше элементов во всех возможных вариациях охватывается данным изобретением, если иное не будет указано отдельно или если это четко не следует из контекста.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ImmunoGen, Inc.
<120> ПОЛУЧЕНИЕ КОНЬЮГАТОВ «МАЙТАНСИНОИД-АНТИТЕЛО» ОДНОСТАДИЙНЫМ СПОСОБОМ
<130> 710088
<140> PCT/US2012/031243
<141> 2012-03-29
<150> US 61/468,997
<151> 2011-03-29
<160> 11
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Тяжелая цепь CDR1
<400> 1
Gly Tyr Phe Met Asn
1 5

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Тяжелая цепь CDR2

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (14)..(14)
<223> Xaa представляет собой Lys, Gln, His, или Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (16)..(16)
<223> Xaa представляет собой Gln, His, Asn, или Arg

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (17)..(17)
<223> Xaa представляет собой Gly, Glu, Thr, Ser, Ala, или Val
<400> 2
Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Xaa Phe Xaa
1 5 10 15

Xaa

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Тяжелая цепь CDR3

<400> 3

Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Легкая цепь CDR1

<400> 4

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala Gly Thr Ser Leu Met His
1 5 10 15

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Легкая цепь CDR2

<400> 5

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Легкая цепь CDR3

<400> 6

Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь CDR2

<400> 7

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 8

<211> 448

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Тяжелая цепь

<400> 8

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

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

Phe Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His
65 70 75 80

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

Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

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

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

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

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

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

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 9
<211> 117
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Тяжелая цепь переменного домена

<400> 9

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

Ser Val Lys Ile Ser Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Phe
20 25 30

Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45

Arg Ile His Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Gln
50 55 60

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala His Met
65 70 75 80

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

Arg Tyr Asp Gly Ser Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 112
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Легкая цепь переменного домена

<400> 10

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

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile Ser
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 11

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Легкая цепь переменного домена

<400> 11

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

Gln Pro Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala
20 25 30

Gly Thr Ser Leu Met His Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro
35 40 45

Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Asp
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Lys Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95

Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения конъюгата клеточносвязующий агент-цитотоксический агент, включающий этап:

(a) контакт клеточносвязующего агента и цитотоксического агента с образованием первой смеси, включающей клеточносвязующий агент и цитотоксический агент, затем контакт первой смеси с бифункциональным реагентом, образующем перекрестные связи и включающем линкер, в растворе, имеющем pH от приблизительно 4 до приблизительно 9, для получения второй смеси, включающей (i) конъюгат клеточносвязующий агент-цитотоксический агент, при этом клеточносвязующий агент химически соединен посредством линкера с цитотоксическим агентом, (ii) несвязанный цитотоксический агент, и (iii) побочные продукты реакции.

По доверенности