



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.26

(21) Номер заявки
201591465

(22) Дата подачи заявки
2014.02.07

(51) Int. Cl. **C07K 16/30** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

(54) СПЕЦИФИЧНЫЕ УЧАСТКИ ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ АНТИТЕЛ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИММУНОКОНЬЮГАТОВ

(31) 61/762,563

(32) 2013.02.08

(33) US

(43) 2015.12.30

(86) PCT/US2014/015393

(87) WO 2014/124316 2014.08.14

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НОВАРТИС АГ (CH)

(72) Изобретатель:
**Гайерстангер Бернхард Хуберт, Оу
Вэйцзя, Уно Тецуо (US)**

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

(56) Anonymous: "www.bioinf.org.uk: Dr. Andrew C.R. Martin's Group at UCL", 25 February 2014, (2014-02-25), XP055122195, Retrieved from the Internet: URL:http://www.bioinf.org.uk/abs/, [retrieved on 2014-06-06], the whole document

WO-A2-2006034488

WO-A1-2009092011

VOYNOV VLADIMIR ET AL. "Design and application of antibody cysteine variants", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, ACS, WASHINGTON, DC, US, vol. 21, no. 2, 17 February 2010, (2010-02-17), pages 385-392, XP002598497, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/BC900509S, [retrieved on 2010-01-21], cited in the application, Abstract; page 386, first paragraph, page 390, figure 4

WO-A2-2010141902

JAGATH R JUNUTULA1 ET AL. "Site-specific conjugation of a cytotoxic drug to an antibody improves the therapeutic index", INTERNET CITATION, 2008, pages 1-8, XP007905289, ISSN: 1087-0156, Retrieved from the Internet: URL:http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1480, [retrieved on 2008-07-24], cited in the application, Abstract, page 3, first paragraph

STEPHEN C. ALLEY ET AL. "Contribution of Linker Stability to the Activities of Anticancer Immunoconjugates", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 19, no. 3, 1 March 2008 (2008-03-01), pages 759-765, XP055037546, ISSN: 1043-1802, DOI: 10.1021/bc7004329, cited in the application, Abstract; page 761, figure 1

W. OU ET AL. "Site-specific protein modifications through pyrroline-carboxy-lysine residues", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 108, no. 26, 28 June 2011, (2011-06-28), pages 10437-10442, XP055122289, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1105197108, Abstract; page 10438

LYONS A. ET AL. "SITE-SPECIFIC ATTACHMENT TO RECOMBINANT ANTIBODIES VIA INTRODUCED SURFACE CYSTEINE RESIDUES", PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 3, no. 8, 1 January 1990 (1990-01-01), pages 703-708, XP001000052, ISSN: 0269-2139, cited in the application, Abstract, page 707, table 1

US-A1-2012009621

WO-A1-2013093809

WO-A1-2013185115

(57) Изобретение предоставляет специфичные участки для модификации антител или фрагментов антител посредством замены по меньшей мере одной нативной аминокислоты в константной области исходных антитела или фрагмента антитела на цистеин, который может применяться в качестве участка присоединения для полезной нагрузки или комбинации линкер-полезная нагрузка.

Область техники, к которой относится изобретение

Вследствие важности антител для различных терапевтических применений, существует потребность в надежных способах для селективной модификации антител, чтобы ввести улучшенные свойства или дополнительные функции. Изобретение предоставляет специфичные участки для присоединения фрагментов к антителам для получения модифицированных антител, таких как для применения при получении конъюгатов антител - лекарственное средство (ADC). Селективные участки конъюгации расположены в константных областях антитела и, таким образом, являются применимыми для различных антител.

Предшествующий уровень техники

Значение способов модификации антител является хорошо известным, и было разработано много способов для конъюгации антител, чтобы присоединить различные фрагменты "полезной нагрузки". Многие из этих способов основаны на природной распространенности специфичных реакционноспособных аминокислотных остатков в антителе, таких как лизин и цистеин, которые могут применяться для присоединения полезной нагрузки. Однако, полагаться на нативные аминокислоты не всегда желательно, поскольку расположение и количество присоединенной полезной нагрузки зависит от числа и положения этих реакционноспособных аминокислот: слишком много или слишком мало таких остатков создают трудности для эффективного управления загрузкой полезной нагрузки на антитело. В дополнение, размещение реакционноспособных аминокислот может затруднять достижение полной конъюгации, приводя к гетерогенным продуктам во время конъюгации. Гетерогенность фармацевтического активного ингредиента, например, обычно является нежелательной, поскольку она делает непредсказуемым введение лекарственного средства гетерогенной популяции субъектов: значительно более предпочтительным является вводить гомогенный продукт, и значительно более трудно полностью охарактеризовать и предсказать поведение гетерогенного продукта. Сайт-специфичная конъюгация цитотоксического лекарственного средства с антителом через, например, сконструированные остатки цистеина приводит к гомогенным иммуноконъюгатам, которые проявляют улучшенный терапевтический индекс (Junutula et al. (2008) *Nat Biotechnol.* 26(8):925-932)).

Были сконструированы антитела, для добавления некоторых остатков, подобных цистеину в специфичные положения, где эти остатки могут применяться для конъюгации (Lyons et al. (1990) *Protein Eng.*, 3:703-708), но значение специфичных замен может варьировать с некоторыми антителами, так как сконструированный цистеин может препятствовать складчатости антител и окислению надлежащих внутримолекулярных дисульфидных связей (Vouyou et al. (2010) *Bioconjug. Chem.* 21 (2):385-392).

Поскольку сконструированные цистеины в антителах, экспрессированных в клетках млекопитающих, являются модифицированными через дисульфидные связи с глутатионом (GSH) и/или цистеином в время их биосинтеза (Chen et al. (2009) *mAbs* 1:6, 563-571), модифицированные цистеин(ы) в продукте конъюгата антитело-лекарственное средство, как он первоначально экспрессируется являются неактивными по отношению к тиол-реакционноспособным реагентам. Активация сконструированных цистеина (цистеинов) требует восстановления GSH и/или цистеинового аддукта (которое обычно приводит к восстановлению всех межцепочечных дисульфидных связей антитела), с последующим повторным окислением и повторным образованием нативной, межцепочечной дисульфидной связи перед конъюгацией (Junutula et al. (2008) *Nat. Biotechnol.* 26(8):925-32). Некоторые из участков, где вводился цистеин, препятствуют процессу повторного окисления и в последующем приводят к нежелательным, негомогенным продуктам конъюгации. Следовательно, является важным идентифицировать участки в антителе, где введенный цистеин не препятствует процессу повторного окисления перед конъюгацией с тиол-реакционноспособным реагентом, таким как малеимид или бром-, хлор- или йод-ацетамидные группы.

Конъюгация остатков цистеина с бром-ацетамидом, йод-ацетамидом или хлор-ацетамидом приводит к образованию стабильной тиоэфирной связи. (Alley et al. (2008) *Bioconjug Chem.* 19(3):759-65). Однако, обычная химия является менее эффективной, чем химия конъюгации с малеимидом. Поскольку образование таких тиол-малеимидных связей является популярным и высокоэффективным способом применения, когда полезную нагрузку или линкер присоединяют к цистеину, существует потребность в идентификации участков в антителе для замены на цистеин, где малеимидные связи могут применяться. Более важным является то, что сайт-специфичные конъюгированные иммуноконъюгаты могут проявлять улучшенный терапевтический индекс, таким образом, остается потребность в идентификации специфичных привилегированных участков для замены на цистеин в антителах, которые обеспечивают эффективное образование конъюгации полезных нагрузок с антителами, и, которые обеспечивают конъюгаты, имеющие высокую стабильность. Настоящее изобретение предоставляет такие привилегированные участки для замены на цистеин, которые дают улучшенные антитела для целей конъюгации, и иммуноконъюгаты, содержащие такие улучшенные антитела.

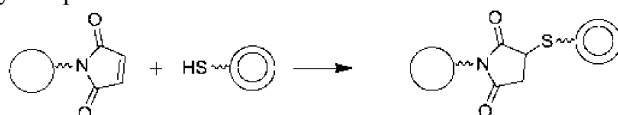
Сущность изобретения

Данное изобретение предоставляет специфичные участки в константной области антитела или фрагмента антитела, на которых может выполняться замена нативной аминокислоты на цистеин ("Cys") в исходном антителе или фрагменте антитела, чтобы обеспечить остаток Cys для присоединения химического фрагмента (например, полезной нагрузки/фрагмента лекарственного средства) для образования иммуноконъюгата с хорошей эффективностью и стабильностью. Изобретение дополнительно предоставляет сконструированные антитела или фрагменты антител, имеющие один или более остатков Cys на одном или более из этих специфичных участков, а также иммуноконъюгаты, полученные из таких сконструированных антител или фрагментов антител.

Способы введения Cys в специфичные местоположения антител являются известными в данной области, см., например, WO 2011/005481. Однако, рассматриваемое изобретение раскрывает специфичные участки в константной области антител или фрагментов антител, где замена одного или более нативных аминокислот исходного антитела или фрагмента антитела на Cys предоставляет одно или более из следующих преимуществ: Хорошая реакционная способность для инициации эффективной иммуноконъюгации; пониженная склонность к потере полезной нагрузки, когда применяют линкер конъюгации Cys-малеимид; сниженная тенденция к образованию нежелательных дисульфидных связей, таких как сшивка между антителами или образование ненативных внутримолекулярных дисульфидных связей; и низкая гидрофобность полученного в результате ADC.

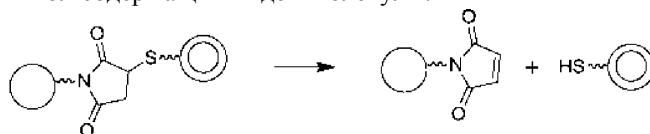
Специфичные привилегированные участки для Cys-замены нативных аминокислот в константной области исходных антител или фрагментов антител выбирают, чтобы обеспечить эффективную конъюгацию, в то же время минимизируя нежелательные эффекты. Сперва, специфичные участки для модификации выбирают так, чтобы замена нативных аминокислот исходного антитела или фрагмента антитела на Cys в одном или более из выбранных местоположений предоставляла антитела или фрагменты антител, которые легко конъюгируются с новым цистеином. Специфичные местоположения выбирают, чтобы они были достаточно поверхностно-доступными для обеспечения реакционной способности сульфгидрила остатка цистеина по отношению к электрофилам в водных растворах. Идентификация подходящих участков для Cys-замены нативных аминокислот исходного антитела или фрагмента антитела включала в себя анализ поверхностной экспозиции нативных аминокислот на основании данных кристаллической структуры. Поскольку участки, описанные в данном документе, являются достаточно доступными и реакционноспособными, они могут применяться для образования иммуноконъюгатов посредством химических реакций, хорошо известных в данной области для модификации природных остатков цистеина. При конъюгации остатков Cys-замены, таким образом, применяют общепринятые способы.

Выбранные участки модификации могут демонстрировать низкую склонность к обратимости конъюгации, когда при конъюгации используют тиол-малеимидные фрагменты. Реакция конъюгации тиол-малеимид часто является высокоселективной и крайне эффективной, и может применяться либо для присоединения полезной нагрузки к тиолу остатка цистеина белка или в качестве линкера где-либо при связывании между белком и полезной нагрузкой. Например, малеимид может присоединяться к белку (например, антителу или фрагменту антитела), и полезная нагрузка, имеющая присоединенный тиол может добавляться к малеимиду с образование конъюгата:



Соответственно, на этой стадии конъюгации, белок (например, антитело или фрагмент антитела) может представлять собой либо одиночный круг или двойной круг; другой может представлять полезную нагрузку. Информация по стабильности иммуноконъюгата здесь специфически относится к конъюгации замененного цистеина посредством реакции с малеимидной группой. В нескольких вариантах осуществления, тиол берется от цистеина в белке (например, антителе или фрагменте антитела), так, что двойной круг представляет белок и одиночный круг представляет полезную нагрузку.

В то время, как реакцию тиол-малеимид часто применяют для получения конъюгатов, обратимость стадии конъюгации, как изображено ниже, может приводить к потере полезной нагрузки или захват полезной нагрузки другим тиол-содержащим видом молекулы:



Сообщалось, что некоторые участки для замены на цистеин обеспечивают более стабильные малеимидные конъюгаты, чем другие, предположительно вследствие того, что местное химическое окружение в некоторых местах на поверхности антитела вокруг нового цистеина может способствовать гидролизу сукцинимидного кольца и, следовательно, препятствовать обратимости связывания тиол-малеимид в иммуноконъюгате (Shen et al. (2012), Nat. Biotechnol. 30(2):184-9). Идентификация преимущественно

ществленных участков для соответствия этому критерию включала в себя введение Cys вместо многих нативных аминокислот, имеющих подходящую поверхностную экспозицию, получая иммуноконъюгаты, содержащие связь тиол-малеимид, и оценку стабильности иммуноконъюгата, чтобы исключить участки, где стабильность конъюгата была снижена местным микроокружением вокруг дестабилизирующих участков. Вследствие этого, химическая реакция, которая может применяться для присоединения линкеров и полезных нагрузок к остаткам Cys-замены, не ограничена проблемами стабильности, ассоциированными с обратимостью тиол-малеимидных конъюгатов, которая обсуждается выше. Ряд методов может применяться для образования конъюгатов по цистеину, включая малеимидную конъюгацию. Участки для замены на цистеин, описанные в данном документе, способствуют стабильности конъюгатного продукта антитела, когда применяют один из наиболее общепринятых способов конъюгации, делая эти участки преимущественными для конструирования антитела, поскольку модифицированное антитело может применяться с использованием хорошо известной и высокоэффективной методологии конъюгации с малеимидом. Выбор участков на основе данного критерия иллюстрируется данными, представленными в табл. 22 и примере 9.

Выбранные участки могут быть расположены таким образом, чтобы минимизировать нежелательное образование дисульфида, которое может препятствовать образованию гомогенного конъюгата. Когда антитела или фрагменты антител, содержащие сконструированные цистеины продуцируются в клетках млекопитающих, остатки Cys обычно присутствуют в виде дисульфидов со свободными Cys аминокислотой или с глутатионом (Chen et al. (2009) mAbs 16, 353-571). Чтобы высвободить остатки Cys для конъюгации с тиол-реакционноспособными группами, антитело или фрагмент антитела необходимо восстановить, разрушая все дисульфидные связи. Антитело или фрагмент антитела затем повторно окисляют при условиях, которые облегчают образование нативных дисульфидов, которые стабилизируют антитело или фрагмент антитела. При повторном окислении, остатки цистеина, которые слишком значительно экспонированы на поверхности антитела или фрагмента антитела, могут образовывать дисульфиды посредством реакции с Cys в еще одном антителе или фрагменте антитела ("дисульфиды между антителами"), или посредством образования нежелательных дисульфидов внутри антитела. Было обнаружено, что остатки цистеина, помещенные на специфичных участках, описанных в данном документе, являются подходящим образом доступными, чтобы быть способными к эффективной конъюгации, но являются достаточно экранированы или подходящим образом позиционированы, чтобы снизить или устранить образование дисульфидных связей между антителами и внутри антител, которые иначе бы возникали во время операций восстановления/повторного окисления, обычно необходимыми, при экспрессировании cys-модифицированных антител. Аналогично, было обнаружено, что после повторного окисления некоторые участки продуцируют негомогенные продукты конъюгации, которые, по-видимому, обусловлены расположением нового остатка Cys, встроенного в конструкцию белка, и специфичные участки, идентифицированные в данном документе, являются участками, где такая гетерогенность минимизирована.

Конъюгирование полезных нагрузок в виде лекарственных средств на участках, где они ограждены от взаимодействий с растворителем, и присоединение может увеличить гидрофобность антитела при присоединении лекарственного средства является предпочтительным, так как снижение гидрофобности белкового лекарственного средства обычно считается благоприятным, поскольку оно может снизить агрегацию и выведение из циркуляции. Выбор участков присоединения, которые приводят к минимальным изменениям в гидрофобности, может быть особенно благоприятным, когда присоединяют 4, 6 или 8 лекарственных средств на антитело, или, когда применяют особенно гидрофобные полезные нагрузки.

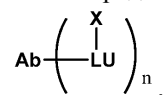
Участки для введения Cys оценивали с использованием этих и дополнительных методов, описанных в Примерах данного документа, что приводило к выбору предпочтительных участков для введения Cys для конструирования антител или фрагментов антитела для введения Cys в качестве участка для конъюгации, особенно для получения ADC. Дополнительные подробности, касающиеся выбора специфичных участков для замены природной аминокислоты антитела на Cys, предоставлены в данном документе.

Участки для замены на цистеин расположены в константной области антитела или фрагмента антитела, и их идентифицируют в данном документе с использованием стандартных соглашений по нумерации. Хорошо известно, однако, что части или фрагменты антитела могут применяться для многих целей вместо интактных непротессированных антител, а также то, что антитела могут быть модифицированы различными путями, которые влияют на нумерацию участков в константной области даже, несмотря на то, что они не воздействуют значительно на функционирование константной области. Например, было показано, что введение метки S6 (короткого пептида) в петлевую область антитела, обеспечивает сохранение активности антитела, даже, несмотря на то, что оно изменяет нумерацию многих участков в антителе. Соответственно, в то время, как предпочтительные участки для замены на цистеин, описанные в данном документе, идентифицируют посредством стандартной системы нумерации, основанной на нумерации в интактном антителе, изобретение включает соответствующие участки во фрагментах антител или в антителах, содержащих другие модификации, такие как введение пептидной метки. Соответственно, участки в этих фрагментах или модифицированных антителах являются, таким образом, предпочтительными участками для замены на цистеин во фрагментах или модифицированных антителах, и

ссылки на участки для замены на цистеин посредством номера включают соответствующие участки в модифицированных антителах или фрагментах антител, которые сохраняют функцию соответствующей части непроцессированного антитела.

Соответствующий участок во фрагменте антитела или в модифицированном антителе может легко быть идентифицирован посредством выравнивания сегмента фрагмента антитела или модифицированного антитела с непроцессированным антителом, чтобы идентифицировать участок во фрагменте антитела или в модифицированном антителе, который совпадает с одним из предпочтительных участков цистеиновой замены изобретения. Выравнивание может быть основано на сегменте, достаточно длинном, чтобы обеспечить совпадение сегмента с корректной частью непроцессированного антитела, такой как сегмент из по меньшей мере 20 аминокислотных остатков или по меньшей мере 50 остатков или по меньшей мере 100 остатков или по меньшей мере 150 остатков. При выравнивании можно также учитывать другие модификации, которые могли быть встроены во фрагмент антитела или модифицированное антитело, таким образом, различия в последовательности вследствие сконструированных точечных мутаций в сегменте, используемом для выравнивания, особенно для консервативных замен, смогут быть обеспечены. Таким образом, например, Fc домен может быть удален из антитела, и мог бы содержать аминокислотные остатки, которые соответствуют участкам для замены на цистеин, описанном в данном документе, несмотря на различия в нумерации: можно также ожидать, что участки Fc домена, соответствующие участкам для замены на цистеин изобретения будут преимущественными участками для замены на цистеин в Fc домене, и включены в объем изобретения.

В одном варианте осуществления, изобретение предоставляет иммуноконъюгат формулы (I):



где Ab представляет антитело или фрагмент антитела, содержащие по меньшей мере один остаток цистеина на одном из предпочтительных участков замены на цистеин, выбранном из описанных в данном документе;

LU представляет собой линкерный блок, как описано в данном документе;

X представляет собой полезную нагрузку или фрагмент лекарственного средства;

и n является целым числом от 1 до 16.

Обычно в соединениях формулы (I), LU присоединен к цистеину на одном из участков для замены на цистеин, описанных в данном документе, X представляет собой фрагмент лекарственного средства, такого как лекарственное средство против злокачественных новообразований, и n равно 2-8, когда Ab является антителом, или n может быть равен 1-8, когда Ab является фрагментом антитела.

В варианте осуществления, изобретение предоставляет иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело или фрагмент этого антитела и фрагмент лекарственного средства, где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит замену одной или более аминокислот на цистеин в его константной области, выбранных из положений 121, 124, 152, 171, 174, 258, 292, 333, 360 и 375 тяжелой цепи указанного антитела или фрагмента антитела, и где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU.

В варианте осуществления, изобретение предоставляет иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело или фрагмент этого антитела и фрагмент лекарственного средства, где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит замену одной или более аминокислот на цистеин в его константной области, выбранных из положений 107, 108, 142, 145, 159, 161 и 165 легкой цепи указанного антитела или фрагмента антитела, где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU, и где указанная легкая цепь представляет собой каппа легкую цепь человека.

В аспекте по варианту осуществления, изобретение предоставляет иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело или фрагмент этого антитела и фрагмент лекарственного средства, где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит замену одной или более аминокислот на цистеин в его константной области, выбранных из положений 143, 147, 159, 163, и 168 легкой цепи указанного антитела или фрагмента антитела, где указанные положения нумеруют в соответствии с системой Кабат, и где указанная легкая цепь представляет собой лямбда легкую цепь человека.

В варианте осуществления, изобретение предоставляет модифицированное антитело или фрагмент этого антитела, содержащие замену одной или более аминокислот на цистеин в положениях, описанных в данном документе. Участки для замены на цистеин находятся в константных областях антитела, и, таким образом, являются применимыми к разнообразным антителам, и участки выбирают для обеспечения стабильных и гомогенных конъюгатов. Модифицированное антитело или фрагмент могут иметь две или более замены на цистеин, и эти замены могут применяться в комбинации с другими модификацией антитела и способами конъюгации, как описано в данном документе.

В варианте осуществления, изобретение предоставляет фармацевтическую композицию, содержащую иммуноконъюгат, раскрытый выше, и способы применения иммуноконъюгатов.

В варианте осуществления, изобретение предоставляет нуклеиновую кислоту, кодирующую моди-

фицированное антитело или фрагмент антитела, описанные в данном документе, имеющие по меньшей мере одну замену на цистеин на участке, описанном в данном документе. Изобретение дополнительно предоставляет клетки-хозяева, содержащие эти нуклеиновые кислоты, и способы применения нуклеиновой кислоты или клеток-хозяев, чтобы экспрессировать и продуцировать антитела или фрагменты, описанные в данном документе.

В варианте осуществления, изобретение предоставляет способ выбора аминокислоты антитела, которая является подходящей для замены на цистеин, чтобы обеспечить хороший участок для конъюгации, включающий в себя:

(1) идентификацию аминокислот в константной области антитела, которые имеют подходящую поверхностную экспозицию, чтобы обеспечить набор первоначальных кандидатных участков;

(2) для каждого первоначального кандидатного участка, экспрессию антитела, где нативную аминокислоту на данном участке заменяют на цистеин;

(3) для каждого экспрессированного антитела, определение того, является ли экспрессированный белок по существу гомогенным после восстановления и повторное окисление, чтобы обеспечить функциональное антитело, имеющее свободный цистеин на первоначальном кандидатном участке,

(4) для каждого экспрессированного белка, который является по существу гомогенным и функциональным, конъюгирование цистеина на первоначальном кандидатном участке с малеимидным фрагментом и определение того, является ли связь тиол-малеимид стабильной на данном участке;

(5) удаление из набора первоначальных кандидатных участков тех участков, для которых экспрессированное антитело не является по существу гомогенным и функциональным, и тех участков, где связь тиол-малеимид является дестабилизированной, чтобы обеспечить набор преимущественных участков для замены на цистеин.

Необязательно, способ дополнительно включает в себя стадию определения температуры плавления для конъюгата каждого преимущественного участка для замены на цистеин, и исключение из набора любых участков, где замена на цистеин и конъюгация вызывают отличие температуры плавления на 5°C или более от температуры плавления нативного антитела.

В варианте осуществления, изобретение предоставляет способ получения иммуноконъюгата, который включает в себя присоединение Линкерного Блока (LU) или комбинации Линкерный Блок-Полезная нагрузка (-LU-X) к остатку цистеина в антителе или фрагменте антитела, где цистеин расположен на участке замены на цистеин, выбранном из положений 121, 124, 152, 171, 174, 258, 292, 333, 360 и 375 тяжелой цепи указанного антитела или фрагмента антитела и положений 107, 108, 142, 145, 159, 161, и 165 легкой цепи указанного антитела или фрагмента антитела, где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU.

Другие аспекты и варианты осуществления изобретения описаны более подробно в данном документе.

1. Иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело или фрагмент этого антитела, где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит замену одной или более аминокислот на цистеин в его константной области на участке, выбранном из положений 121, 124, 152, 171, 174, 258, 292, 333, 334, 360, 375 и 392 тяжелой цепи указанного антитела или фрагмента антитела, и где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU.

2. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 1, где замену одной или более аминокислот на цистеин выбирают из положений 121, 124, 152, 258, 334, 360 и 392.

3. Иммуноконъюгат вариантов осуществления 1 или 2, где указанное антитело или фрагмент антитела содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, 5, 10, 17, 18, 29, 35, 42, 43, 48, 50, 54, 290, 291, 292, 293, 294, и 295.

4. Иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело или фрагмент этого антитела, где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит замену одной или более аминокислот на цистеин в его константной области на участке, выбранном из положений 107, 108, 142, 145, 159, 161 и 165 легкой цепи указанного антитела или фрагмента антитела, где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU, и где указанная легкая цепь представляет собой каппа легкую цепь человека.

5. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 4, где замену одной или более аминокислот на цистеин выбирают из положений 145 или 165.

6. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 4, где указанное антитело или фрагмент антитела содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 61, 62, 69, 71, 75, 76 и 77.

7. Иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело или фрагмент этого антитела, где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит замену одной или более аминокислот на цистеин в его константной области на участке, выбранном из положений 143, 147, 159, 163 и 168 легкой цепи указанного антитела или фрагмента антитела, где указанные положения нумеруют в соответствии с системой Кабат, и где указанная легкая цепь представляет собой лямбда легкую цепь человека.

8. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 7, где указанное антитело или фрагмент антитела содержит последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 92, 94, 96, 97 и 98.

9. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 1, 2 или 3, где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела дополнительно содержит замену одной или более аминокислот на цистеин в его константной области на участке, выбранном из положений 107, 108, 142, 145, 159, 161 и 165 легкой цепи указанного антитела или фрагмента антитела, где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU, и где указанная легкая цепь представляет собой каппа легкую цепь человека.

10. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 1, 2 или 3, где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела дополнительно содержит замену одной или более аминокислот на цистеин в его константной области, выбранных из положений 143, 147, 159, 163 и 168 легкой цепи указанного антитела или фрагмента антитела, где указанные положения легкой цепи нумеруют в соответствии с системой Кабат, и где указанная легкая цепь представляет собой каппа легкую цепь человека.

11. Иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело или фрагмент этого антитела, где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит комбинацию замен из двух или более аминокислот на цистеин в константной области тяжелой цепи в положениях 152 и 375, или в положениях 327 и 375, где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU.

12. Иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело или фрагмент этого антитела где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит комбинацию замен из двух или более аминокислот на цистеин в его константных областях, содержащих положение 107 легкой цепи и 360 тяжелой цепи, где указанная легкая цепь представляет собой каппа цепь, и где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU.

13. Иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело или фрагмент этого антитела, где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит замену одной или более аминокислот на цистеин в его константной области, выбранных из положений 117, 119, 121, 124, 139, 152, 153, 155, 157, 164, 169, 171, 174, 189, 205, 207, 246, 258, 269, 274, 286, 288, 290, 292, 293, 320, 322, 326, 333, 334, 335, 337, 344, 355, 360, 375, 382, 390, 392, 398, 400 и 422 тяжелой цепи указанного антитела или фрагмента антитела, и где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU.

14. Иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело или фрагмент этого антитела, где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит замену одной или более аминокислот на цистеин в его константной области, выбранных из положений 107, 108, 109, 114, 129, 142, 143, 145, 152, 154, 156, 159, 161, 165, 168, 169, 170, 182, 183, 197, 199 и 203 легкой цепи указанного антитела или фрагмента антитела, где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU, и где указанная легкая цепь представляет собой каппа легкую цепь человека.

15. Иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело или фрагмент этого антитела, где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит замену одной или более аминокислот на цистеин, выбранных из положений 143, 145, 147, 156, 159, 163 и 168 в его константной области легкой цепи указанного антитела или фрагмента антитела, где указанные положения нумеруют в соответствии с системой Кабат, и где указанная легкая цепь представляет собой лямбда легкую цепь человека.

16. Иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело или фрагмент этого антитела, где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит комбинацию замен из двух или более аминокислот на цистеин в его константных областях, где комбинации содержат замены в положениях 375 тяжелой цепи антитела и положении 165 легкой цепи антитела, или в положении 334 тяжелой цепи антитела, в положении 165 легкой цепи антитела, и где указанная легкая цепь представляет собой каппа цепь, и где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU.

17. Иммуноконъюгат любых вариантов осуществления 11, 12 и 16, где отношение лекарственного средства к антителу равно приблизительно 4.

18. Иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело или фрагмент этого антитела, где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит комбинацию замен из трех или более аминокислот на цистеин в его константных областях, где комбинации содержат замены, выбранные из

- а) положений 375 и 392 тяжелой цепи антитела и положения 165 легкой цепи антитела,
- б) положений 334 и 375 тяжелой цепи антитела и положения 165 легкой цепи антитела, и
- с) положений 334 и 392 тяжелой цепи антитела и положения 165 легкой цепи антитела,

и, где указанная легкая цепь представляет собой каппа цепь, и где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU.

19. Иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело или фрагмент этого антитела, где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит комбинацию замен из трех или более аминокислот на цистеин в его константных областях, где комбинации содержат замены, выбранные из

- а) положений 152, 375 и 392 тяжелой цепи антитела,
- б) положений 152, 334 и 375 тяжелой цепи антитела, и

с) положений 152, 334 и 392 тяжелой цепи антитела,
и, где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU.

20. Иммуноконъюгаты вариантов осуществления 18 или 19, где отношение лекарственного средства к антителу равно приблизительно 6.

21. Иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело или фрагмент этого антитела, где указанное модифицированное антитело или фрагмент этого антитела содержит комбинацию замен из четырех или более аминокислот на цистеин в его константных областях, где комбинации содержат замены в положениях 334, 375, и 392 тяжелой цепи антитела и положении 165 легкой цепи антитела, или в положениях 333, 375, и 392 тяжелой цепи антитела и в положении 165 легкой цепи антитела, и где указанная легкая цепь представляет собой каппа цепь, и где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU.

22. Иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело или фрагмент этого антитела, где указанное модифицированное антитело или фрагмент этого антитела содержит комбинацию замен из четырех или более аминокислот на цистеин в его константных областях, где комбинации содержат замены в положениях 152, 334, 375, и 392 тяжелой цепи антитела, или в положениях 152, 333, 375 и 392 тяжелой цепи антитела, и где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU.

23. Иммуноконъюгаты по варианту осуществления 21 или 22, где отношение лекарственного средства к антителу равно приблизительно 8.

24. Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1-23, дополнительно содержащий фрагмент лекарственного средства.

25. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 24, где фрагмент лекарственного средства присоединяют к модифицированному антителу или фрагменту антитела через серу указанного цистеина и необязательный линкер.

26. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 25, где указанный фрагмент лекарственного средства соединяют с указанной серой указанного цистеина через расщепляемый или нерасщепляемый линкер.

27. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 25, где указанный фрагмент лекарственного средства соединяют с указанной серой указанного цистеина через нерасщепляемый линкер.

28. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 25, где указанный иммуноконъюгат содержит связь тиол-малеимид.

29. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 25, где указанный иммуноконъюгат содержит $-S-CH_2-C(=O)-$ связь или дисульфидную связь.

30. Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 25-29, где указанный фрагмент лекарственного средства представляет собой цитотоксичное средство.

31. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 30, где указанный фрагмент лекарственного средства выбирают из группы, состоящей из таксанов, ДНК-алкилирующих агентов (например, аналогов СС-1065), антрациклинов, аналогов тубулизина, аналогов дуокармицина, ауристатины E, ауристатины F и майтансиноидов.

32. Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1-31, где указанное антитело представляет собой моноклональное антитело.

33. Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1-31, где указанное антитело представляет собой химерное антитело.

34. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 31, где указанное антитело представляет собой гуманизованное или полностью человеческое антитело.

35. Иммуноконъюгат по варианту осуществления 31, где указанное антитело представляет собой биспецифичное или мультиспецифичное антитело.

36. Иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1-32, где указанное антитело или фрагмент антитела специфически связывается с маркером клеточной поверхности, характеристическим для опухоли.

37. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуноконъюгат по любому из вариантов осуществления 1-36.

38. Модифицированное антитело или фрагмент этого антитела, содержащие замену одной или более аминокислот на цистеин в его константной области, выбранных из положений 117, 119, 121, 124, 139, 152, 153, 155, 157, 164, 169, 171, 174, 189, 205, 207, 246, 258, 269, 274, 286, 288, 290, 292, 293, 320, 322, 326, 333, 334, 335, 337, 344, 355, 360, 375, 382, 390, 392, 398, 400 и 422 тяжелой цепи указанного антитела или фрагмента антитела, и где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU.

39. Модифицированное антитело или фрагмент этого антитела, содержащие замену одной или более аминокислот на цистеин в его константной области, выбранных из положений 107, 108, 109, 114, 129, 142, 143, 145, 152, 154, 156, 159, 161, 165, 168, 169, 170, 182, 183, 197, 199 и 203 легкой цепи указанного антитела или фрагмента антитела, где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU, и где указанная легкая цепь представляет собой каппа легкую цепь человека.

40. Модифицированное антитело или фрагмент этого антитела, содержащие замену одной или бо-

лее аминокислот на цистеин в его константной области, выбранных из положений 143, 145, 147, 156, 159, 163 и 168 в его константной области легкой цепи указанного антитела или фрагмента антитела, где указанные положения нумеруют в соответствии с системой Кабат, и где указанная легкая цепь представляет собой лямбда легкую цепь человека.

41. Модифицированное антитело или фрагмент антитела по варианту осуществления 38, где указанная замена представляет собой по меньшей мере один цистеин, выбранный из положений 121, 124, 152, 171, 174, 258, 292, 333, 360 и 375 тяжелой цепи, и где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU.

42. Модифицированное антитело или фрагмент антитела по варианту осуществления 39, в которых указанная замена представляет собой два-шесть цистеинов, где указанные цистеины находятся в положениях, выбранных из положений 121, 124, 152, 171, 174, 258, 292, 333, 360 и 375 тяжелой цепи, и где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU.

43. Модифицированное антитело или фрагмент антитела по варианту осуществления 39, в которых указанная замена представляет собой по меньшей мере один цистеин, выбранных из положений 107, 108, 142, 145, 159, 161 и 165 легкой цепи, где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU, и где указанная легкая цепь представляет собой каппа легкую цепь человека.

44. Модифицированное антитело или фрагмент антитела по варианту осуществления 40, в которых указанная замена представляет собой два-шесть цистеинов, где указанные цистеины находятся в положениях, выбранных из положений 107, 108, 142, 145, 159, 161 и 165 легкой цепи, где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU, и где указанная легкая цепь представляет собой каппа легкую цепь человека.

45. Модифицированное антитело или фрагмент антитела по варианту осуществления 40, в которых указанная замена представляет собой по меньшей мере один цистеин, выбранный из положений 143, 147, 159, 163 и 168 легкой цепи, где указанные положения нумеруют в соответствии с системой Кабат, и где указанная легкая цепь представляет собой лямбда легкую цепь человека.

46. Модифицированное антитело или фрагмент антитела по варианту осуществления 40, в которых указанная замена представляет собой два-шесть цистеинов, где указанные цистеины находятся в положениях, выбранных из положений 143, 147, 159, 163 и 168 легкой цепи, где указанные положения нумеруют в соответствии с системой Кабат, и где указанная легкая цепь представляет собой лямбда легкую цепь человека.

47. Модифицированное антитело или фрагмент антитела по любому из вариантов осуществления 11, 12, 14-22, 38-47, которые дополнительно присоединены к фрагменту лекарственного средства, и где указанный фрагмент лекарственного средства присоединяют к модифицированному антителу или фрагменту антитела через серу указанного цистеина и необязательный линкер.

48. Модифицированное антитело или фрагмент антитела по варианту осуществления 47, где указанный фрагмент лекарственного средства присоединяют к сере указанного цистеина через Линкерный Блок.

49. Модифицированное антитело или фрагмент антитела по любому из вариантов осуществления 38-48, дополнительно содержащие по меньшей мере один Pcl или замену на неприродную аминокислоту или пептидную метку для фермент-опосредованной конъюгации и/или их комбинации.

50. Нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированное антитело или фрагмент антитела по любому из вариантов осуществления 38-49.

51. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 50.

52. Способ получения модифицированного антитела или фрагмента антитела, включающий в себя инкубацию клетки-хозяина по варианту осуществления 49 при подходящих условиях для экспрессии антитела или фрагмента антитела, и выделение указанного антитела или фрагмента антитела.

53. Способ выбора аминокислоты антитела, которая является подходящей для замены на цистеин для обеспечения подходящего участка для конъюгации, включающий в себя

(1) идентификацию аминокислот в константной области антитела, которые имеют подходящую поверхностную экспозицию, чтобы предоставить набор первоначальных кандидатных участков;

(2) для каждого первоначального кандидатного участка, экспрессию антитела, где нативную аминокислоту на данном участке заменяют на цистеин;

(3) для каждого экспрессированного антитела, определение того, является ли экспрессированный белок по существу гомогенным после восстановления, и повторное окисление, чтобы обеспечить функциональное антитело, имеющее свободный цистеин на первоначальном кандидатном участке,

(4) для каждого экспрессированного белка, который является по существу гомогенным и функциональным, конъюгирование цистеина на первоначальном кандидатном участке с малеимидным фрагментом, и определение того, является ли связь тиол-малеимид дестабилизированной на данном участке;

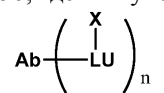
(5) удаление из набора первоначальных кандидатных участков тех участков, для которых экспрессированное антитело не является по существу гомогенным и функциональным, и тех участков, где связь тиол-малеимид является дестабилизированной, чтобы обеспечить набор преимущественных участков для замены на цистеин.

54. Способ по варианту осуществления 53, дополнительно включающий стадию определения температуры плавления для конъюгата каждого преимущественного участка для замены на цистеин, и исключение из набора любых участков, где замена на цистеин и конъюгация вызывают отличие температуры плавления на 5°C или более от температуры плавления исходного антитела.

55. Способ по варианту осуществления 53 или 54, дополнительно включающий продуцирование антитела или фрагмента антитела, содержащие цистеин на одном или более идентифицированных участках для замены.

56. Способ получения иммуноконъюгата, который включает в себя присоединение Линкерного Блока (LU) или комбинации Линкерный Блок-Полезная нагрузка (-LU-X) к остатку цистеина в антителе или фрагменте антитела, где цистеин расположен на участке замены на цистеин, выбранном из положений 121, 124, 152, 171, 174, 258, 292, 333, 360 и 375 тяжелой цепи указанного антитела или фрагмента антитела, и положений 107, 108, 142, 145, 159, 161 и 165 легкой цепи указанного антитела или фрагмента антитела, где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU.

57. Способ по варианту осуществления 56, где иммуноконъюгат имеет формулу (I):



где Ab представляет антитело или фрагмент антитела, содержащие по меньшей мере один остаток цистеина на одном из предпочтительных участков замены на цистеин, выбранном из описанных в данном документе;

LU представляет Линкерный Блок, как описано в данном документе;

X представляет собой полезную нагрузку или фрагмент лекарственного средства;

и n является целым числом от 1 до 16.

Определения

Термин "аминокислота" относится к каноническим, синтетическим и неприродным аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют аналогично каноническим аминокислотам. Канонические аминокислоты представляют собой протеиногенные аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, и включают аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутамин, глутаминовую кислоту, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин, валин, а также селеноцистеин, пирролизин и его аналог пирролин-карбокси-лизин. Аналоги аминокислот относится к соединениям, которые имеют одинаковую основную химическую структуру, в виде канонических аминокислот, т.е. α-углерод, который связан с водородом, карбоксильной группой, аминогруппой, и R группой, например, цитруллин, гомосерин, норлейцин, сульфоксид метионина, метилсульфоний метионина. Такие аналоги имеют модифицированные R группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные скелеты, но сохраняют одинаковую основную химическую структуру в виде канонической аминокислоты.

Миметики аминокислот относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, которая отличается от общей химической структуры аминокислоты, но которые функционируют аналогично канонической аминокислоте. Термин "неприродная аминокислота", как применяют в данном документе, подразумевает представление аминокислотных структур, которые не могут генерироваться биосинтетически в любом организме, с использованием немодифицированных или модифицированных генов из любого организма, вне зависимости от того являются ли они одинаковыми или различными. В дополнение, такие "неприродные аминокислоты" обычно требуют модифицированную тРНК и модифицированную тРНК синтетазу (RS) для введения в белок. Эта пара тРНК/RS преимущественно включает неприродную аминокислоту по сравнению с каноническими аминокислотами. Такая ортогональная пара тРНК/RS генерируется посредством процесса селекции, как разработано Schultz et al. (см., например, Liu et al. (2010) Annu. Rev. Biochem. 79:413-444) или аналогичной методики. Термин "неприродная аминокислота" не включает природный 22^{ой} протеиногенный аминокислотный пирролизин (Pyl), а также его деметилованный аналог пирролин-карбокси-лизин (Pcl), поскольку включение обоих остатков в белки опосредуется немодифицированной, природной пары пирролизил-тРНК/тРНК синтетазы, и поскольку Pyl и Pcl генерируются биосинтетически (см., например, Ou et al. (2011) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108:10437-10442; Cellitti et al. (2011) Nat. Chem. Biol. 7 (8):528-30). См. также Предварительную заявку США 61/76236, включенную посредством ссылки, в которой описаны участки специфичных аминокислотных остатков в легких и тяжелых цепях антитела, которые могут быть заменены на Pcl.

Термин "антитело", как применяют в данном документе, относится к полипептиду семейства иммуноглобулинов, который способен к связыванию соответствующего антигена нековалентно, обратимо, и специфичным образом. Например, природное антитело IgG представляет собой тетрамер, содержащий по меньшей мере две тяжелых (H) цепи (также называемых "тяжелая цепь антитела") и две легких (L) цепи (также называемых "легкая цепь антитела"), связанных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из варибельной области тяжелой цепи (сокращаемой в данном документе как V_H) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доме-

нов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращаемой в данном документе как V_L) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, C_L . V_H и V_L области могут дополнительно подразделяться на области гипервариабельности, называемые определяющие комплементарность области (CDR), перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными, называемые каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, и FR4. Переменные области тяжелых и легких цепей содержат домен связывания, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включающими различные клетки иммунной системы (например, эффекторными клетками), и первым компонентом (Clq) of classical complement system.

Термин "антитело" включает, но не ограничено перечисленным, моноклональные антитела, человеческие антитела, гуманизированные антитела, верблюжьи антитела, химерные антитела, и антиидиотипические (анти-Id) антитела (включающие, например, анти-Id антитела к антителам изобретения). Антитела могут принадлежать к любому изотипу/классу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), или подклассу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2).

Как легкие, так и тяжелые цепи разделяют на области структурной и функциональной гомологии. Термины "константная" и "переменная" применяют функционально. В данном отношении, следует учитывать, что переменные домены, частей как легкой (V_L), так и тяжелой (V_H) цепи определяют распознавание антигена и специфичность. Напротив, константные домены легкой цепи (C_L) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) придают важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарную подвижность, связывание Fc рецептора, связывание комплемента, и т.п. По договоренности, нумерация доменов константной области возрастает, по мере того, как они становятся более удаленными от участка связывания антигена или amino-конца антитела. N-конец является переменной области, а по C-концу находится константная область; CH3 и C_L домены в действительности содержат карбокси-концевые домены тяжелой и легкой цепи, соответственно.

Термин "фрагмент антитела", как применяют в данном документе, относится либо к антиген-связывающему фрагменту антитела или неантиген-связывающему фрагменту (например, Fc) антитела. Термин "антиген-связывающий фрагмент", как применяют в данном документе, относится к одному или более частям антитела, которые сохраняют способность специфически взаимодействовать с (например, посредством связывания, стерического несоответствия, стабилизации/дестабилизации, пространственного распределения) эпитопа антигена. Примеры связывающих фрагментов включают, но не ограничиваются перечисленным, одноцепочечные Fvs (scFv), дисульфид-связанные Fvs (sdFv), Fab фрагменты, F(ab') фрагменты, моновалентный фрагмент, состоящий из V_L , V_H , C_L и CH1 доменов; F(ab)₂ фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab фрагмента, связанные посредством дисульфидного мостика в шарнирной области; Fd фрагмент, состоящий из V_H и CH1 доменов; Fv фрагмент, состоящий из V_L и V_H доменов одиночного плеча антитела; dAb фрагмент (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989), который состоит из V_H домен; и изолированная определяющая комплементарность область (CDR), или другие эпитип-связывающие фрагменты антитела.

Кроме того, несмотря на то, что два домена Fv фрагмента, V_L и V_H , кодируются отдельными генами, они могут быть объединены, с использованием рекомбинантных методов, посредством синтетического линкера, который обеспечивает их получение в виде одиночной белковой цепи, в которой V_L и V_H области образуют пару с образованием моновалентных молекул (известных, как одноцепочечные Fv ("scFv"); см., например, Bird et al., Science 242:423-426, 1988; и Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883, 1988). Такие одноцепочечные антитела также подразумеваются охваченными термином "антиген-связывающий фрагмент." Эти антиген-связывающие фрагменты получают с использованием общепринятых методов, известных специалистам в данной области, и фрагменты подвергают скринингу на применимость, таким же образом, как интактные антитела.

Антиген-связывающие фрагменты могут также вводиться в одиночный домен антитела, макситела, минитела, нанотела, интраантитела, диатела, триатела, тетратела, v-NAR и бис-scFv (см., например, Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005). Антиген-связывающие фрагменты могут быть привиты к остовам на основе полипептидов, таких как фибронектин типа III (Fn3) (см. Патент США № 6,703,199, который описывает фибронектиновые полипептидные моноклетки).

Антиген-связывающие фрагменты могут вводиться в одноцепочечные молекулы, содержащие пару tandemных Fv сегментов (V_H -CH1- V_H -CH1), которые, вместе с комплементарными полипептидами легкой цепи, образуют пару антиген-связывающих областей (Zapata et al., Protein Eng. 8:1057-1062, 1995; и Патент США № 5,641,870).

Термин "моноклональное антитело" или композиция "моноклонального антитела", как применяют в данном документе, относится к полипептидам, включающим антитела и фрагменты антител, которые имеют по существу идентичную аминокислотную последовательность или произведены из одинакового генетического источника. Данный термин также включает препараты молекул антител одного молекулярного состава. Композиция моноклонального антитела проявляет одиночную специфичность связыва-

ния и аффинность для конкретного эпитопа.

Термин "человеческое антитело", как применяют в данном документе, включает антитела, имеющие вариабельные области, в которых как каркасные, так и CDR области являются производными последовательностей человеческого происхождения. Кроме того, если антитело содержит константную область, константная область также является производной от таких человеческих последовательностей, например, человеческих первоначальных последовательностей, или мутированных версий человеческих первоначальных последовательностей или антитела, содержащего косенсусные каркасные последовательности, производные от анализа человеческих каркасных последовательностей, например, как описано в Knappik et al., *J. Mol. Biol.* 296:57-86, 2000).

Человеческие антитела изобретения могут включать аминокислотные остатки, некодируемые человеческими последовательностями (например, мутации, вводимые посредством статистического или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматической мутации *in vivo*, или консервативной замены, чтобы инициировать стабильность или изготвление).

Термин "гуманизованное" антитело, как применяют в данном документе, относится к антителу, которое сохраняет реакционную способность нечеловеческого антитела, в то же время, являясь менее иммуногенным у людей. Это может достигаться, например, посредством сохранения нечеловеческих CDR областей и замены оставшихся частей антитела на их человеческие двойники. См., например, Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984); Morrison and Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.*, 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.*, 31(3):169-217 (1994).

Термин "распознает", как применяют в данном документе, относится к антителу или его антиген-связывающему фрагменту, которое находит и взаимодействует (например, связывается) с его эпитопом, независимо от того является ли этот эпитоп линейным или конформационным. Термин "эпитоп" относится к участку на антигене, с которым антитело или антиген-связывающий фрагмент изобретения специфически связываются. Эпитопы могут быть образованы из сближенных аминокислот или несближенных аминокислот, помещаемых рядом посредством четвертичным складыванием белка. Эпитопы, образованные из сближенных аминокислот, обычно сохраняются при предоставлении воздействию денатурирующих растворителей, в то время как эпитопы, образованные четвертичным складыванием, обычно теряют свои свойства при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Методы определения пространственной конформации эпитопов включают методы, известные в данной области, например, рентгеновскую кристаллографию и 2-мерный ядерный магнитный резонанс (см., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

Термин "аффинность", как применяют в данном документе, относится к силе взаимодействия между антителом и антигеном на одиночном антигенном участке. В пределах каждого антигенного участка, вариабельная область "плеча" антитела взаимодействует посредством слабых нековалентных сил с антигеном на многочисленных участках; чем больше взаимодействий, тем сильнее аффинность.

Термин "изолированное антитело" относится к антителу, которое не содержит по существу других антител, имеющих отличные антигенные специфичности. Изолированное антитело, которое специфически связывается с одним антигеном, может, однако, иметь перекрестную реактивность с другими антигенами. Более того, изолированное антитело может не содержать по существу другого клеточного материала и/или других химикатов.

Термин "консервативно модифицированный вариант" применяют как к аминокислотным последовательностям, так и последовательностям нуклеиновых кислот. По отношению к конкретным последовательностям нуклеиновых кислот, консервативно модифицированные варианты относятся к тем нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или по существу идентичные аминокислотные последовательности, или, где нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, до по существу идентичных последовательностей. Вследствие дегенерации генетического кода, большое число функционально идентичных нуклеиновых кислот кодирует любой данный белок. Например, кодоны GCA, GCC, GCG и GCU все кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, где аланин устанавливается кодоном, кодон может изменяться до любого из соответствующих кодонов, описанных без измененного кодируемого полипептида. Такие вариации нуклеиновых кислот представляют собой "молчащие вариации" которые являются одним видом консервативно модифицированной вариации. Каждая последовательность нуклеиновой кислоты в данном документе, которая кодирует полипептид, также описывает каждую возможную молчащую вариацию нуклеиновой кислоты. Квалифицированный специалист сможет понять, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) может быть модифицирован, чтобы на выходе дать функционально идентичную молекулу. Соответственно, каждая молчащая вариация нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид подразумевается в каждой описанной последовательности.

Для полипептидных последовательностей, "консервативно модифицированные варианты" включа-

ют индивидуальные замены, делеции или присоединения к полипептидной последовательности, которые приводят в результате к замене аминокислот на химически аналогичную аминокислоту. Таблицы консервативных замен, предоставляющие функционально сходные аминокислоты являются хорошо известными в данной области. Такие консервативно модифицированные варианты являются дополнением и не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели изобретения. Следующие восемь групп содержат аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг для друга: 1) Аланин (A), Глицин (G); 2) Аспарагиновая кислота (D), Глутаминовая кислота (E); 3) Аспарагин (N), Глутамин (Q); 4) Аргинин (R), Лизин (K); 5) Изолейцин (I), Лейцин (L), Метионин (M), Валин (V); 6) Фенилаланин (F), Тирозин (Y), Триптофан (W); 7) Серин (S), Треонин (T); и 8) Цистеин (C), Метионин (M) (см., например, Creighton, Proteins (1984)). В нескольких вариантах осуществления, термин "консервативные модификации последовательности" применяют для обозначения аминокислотных модификаций, которые не оказывают значительного воздействия или значительно не изменяют характеристики связывания антитела, содержащего аминокислотную последовательность.

Термин "оптимизированная", как его применяют в данном документе, относится к нуклеотидной последовательности, измененной для кодирования аминокислотной последовательности с использованием кодонов, которые являются предпочтительными в продуцирующей клетке или организме, обычно эукариотной клетке, например, дрожжевой клетке, клетке *Pichia*, грибковой клетке, клетке *Trichoderma*, клетке яичника китайского хомяка (СНО) или человеческой клетке. Оптимизированную нуклеотидную последовательность конструируют, чтобы сохранить полностью или максимально возможно аминокислотную последовательность, первоначально кодируемую первоначальной нуклеотидной последовательностью, которая также является известной как "родительская" последовательность.

Термины "процент идентичный" или "процент идентичный", в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей, относится к двум или более последовательностям или субпоследовательностям, которые являются одинаковыми. Две последовательности являются "по существу идентичными", если две последовательности имеют установленное процентное содержание аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (т.е. 60% идентичности, необязательно 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности по сравнению с установленной областью или, когда не установлены, по сравнению с полной последовательностью), когда их сравнивают и выравнивают для максимального соответствия по сравнению с окном сравнения, или обозначенной областью, измеренной с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или посредством ручного выравнивания и визуальной проверки. Необязательно, идентичность существует при сравнении с областью, которая имеет по меньшей мере приблизительно 30 нуклеотидов (или 10 аминокислот) по длине, или более предпочтительно, при сравнении с областью, которая имеет от 100 до 500 или 1000 или более нуклеотидов (или 20, 50, 200 или более аминокислот) по длине.

Для сравнения последовательностей, обычно одна последовательность действует в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей, тестируемую и эталонную последовательности вводят в компьютер, обозначают координаты субпоследовательности, если необходимо, и обозначают параметры алгоритма программы сравнения последовательностей. Могут применяться параметры программы по умолчанию или могут быть обозначены альтернативные параметры. Алгоритм сравнения последовательностей затем рассчитывает процент идентичности последовательностей для тестируемых последовательностей относительно эталонных последовательностей, на основании параметров программы.

А "окно сравнения", как применяют в данном документе, включает обозначение сегмента из любого одного из числа близлежащих положений, выбранных из группы, состоящей из от 20 до 600, обычно от приблизительно 50 до приблизительно 200, более обычно приблизительно от 100 до приблизительно 150, в котором последовательность может сравниваться с эталонной последовательностью из такого же числа близлежащих положений после оптимального выравнивания двух последовательностей. Методы выравнивания последовательностей для сравнения являются хорошо известными в данной области. Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может проводиться, например, посредством алгоритма локальной гомологии Smith и Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482c (1970), посредством алгоритма гомологии выравнивания Needleman и Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), посредством поиска метода подобия Pearson и Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), посредством компьютеризованных выполнений этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA, и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), или посредством выравнивания вручную и визуальной проверки (см., например, Brent et al., Current Protocols in Molecular Biology, 2003).

Двумя примерами алгоритмов, которые являются подходящими для определения процента идентичности последовательностей и подобия последовательностей являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в Altschul et al., Nuc. Кислоты Res. 25:3389-3402, 1977; и Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990, соответственно. Программное обеспечение для выполнения анализов BLAST является общедоступным через National Center for Biotechnology Information. Этот алгоритм включает в себя сначала идентификацию пар последовательностей с высокой балльной оценкой (HSPs) посредством идентификации коротких слов длины W в запрашиваемой последовательности, которая либо совпадает или

удовлетворяет некоторой положительно-значимой пороговой балльной оценке T , при сравнении со словом такой же длины в последовательности базы данных. T называют балльной оценкой порога соседнего слова (Altschul et al., выше). Эти первоначальные выборки соседнего слова действуют как затравки для инициации поисков, чтобы найти более длинные HSPs, содержащие их. Выборки слов расширяют в обоих направлениях вдоль каждой последовательности настолько далеко, насколько кумулятивная балльная оценка выравнивания может быть увеличена. Кумулятивные балльные оценки вычисляют, используя, для нуклеотидных последовательностей параметры M (наградная балльная оценка за пару совпадающих остатков; всегда >0) и N (штрафной балл за несовпадающие остатки; всегда <0). Для аминокислотных последовательностей, матрицу балльных оценок применяют для вычисления кумулятивного балла. Расширение словных выборок в каждом направлении прекращают, когда: кумулятивная балльная оценка выравнивания падает на количество X от его максимально достижимого значения; кумулятивная балльная оценка приходит к нулю или ниже, вследствие накопления одной или более отрицательных балльных оценок выравниваний остатков; или когда достигают конца обеих последовательностей. Параметры алгоритма BLAST W , T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. Программа BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) использует в качестве установок по умолчанию длину слова (W), равную 11, ожидание (E), равное 10, $M=5$, $N=-4$ и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей, программа BLASTP использует в качестве установок по умолчанию длину слова, равную 3, и ожидание (E), равное 10, и матрицу балльных оценок BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915), выравнивания (B), равные 50, ожидание (E), равное 10, $M=5$, $N=-4$, и сравнение обеих цепей.

Алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ подобия между двумя последовательностями (см., например, Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787, 1993). Одной мерой подобия, предоставляемой алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), которая предоставляет указание на вероятность, при которой совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями могло бы происходить случайно. Например, нуклеиновая кислота считается подобной эталонной последовательности, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой является меньше приблизительно 0,2, более предпочтительно, меньше приблизительно 0,01, и наиболее предпочтительно, меньше приблизительно 0,001.

Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями также может быть определен с использованием алгоритма E. Meyers и W. Miller, Comput. Appl. Biosci. 4:11-17, 1988), который был введен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы массы остатка PAM120, штрафа за продление пропуска в последовательности, равного 12, и штрафа за пропуск в последовательности, равного 4. В дополнение, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с использованием алгоритма Needleman и Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970), который был введен в программу GAP в пакете программного обеспечения GCG (доступного на www.gcg.com), с использованием либо матрицы Blossum 62 или матрикса PAM250, и штрафа за делецию, равного 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штрафа за продолжение делеции, равного 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Отличным от процентного значения идентичности последовательностей, отмеченного выше, еще одним показанием, что две последовательности нуклеиновой кислоты или два полипептида являются идентичными по существу, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой является иммунологически кросс-реактивным с антителами, вырабатываемыми против полипептида, кодируемого второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид обычно является по существу идентичным второму полипептиду, например, там, где два пептида отличаются только консервативными заменами. Еще одним показанием того, что две последовательности нуклеиновой кислоты являются по существу идентичными, является то, что две молекулы или их комплементы гибридизируются друг с другом в строгих условиях, как описано ниже. Еще одним другим показанием того, что две последовательности нуклеиновой кислоты являются по существу идентичными, является то, что для амплификации последовательностей могут применяться одинаковые праймеры.

Термин "нуклеиновая кислота" используют в данном документе взаимозаменяемо с термином "полинуклеотид" и он относится к дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам либо в одно- или двухцепочечной форме. Термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги нуклеотидов или модифицированные остатки или связи скелета, которые являются синтетическими, природными и неприродными, которые имеют сходные свойства связывания с эталонной нуклеиновой кислотой, и, которые метаболизируются аналогично эталонным нуклеотидам. Примеры таких аналогов включают, без ограничения, фосфотиоаты, фосфоамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2-О-метилрибонуклеотиды, пептид-нуклеиновые кислоты (PNA).

Если не указано иначе, конкретная последовательность нуклеиновой кислоты также в неявном виде охватывает ее молчащие варианты (например, вырожденные замены кодонов) и комплементарные последовательности, а также последовательности, указанные явным образом. В особенности, как подробно описано ниже, вырожденные замены кодонов могут быть достигнуты посредством генерации последовательностей, в которых третье положение одного или более выбранных (или всех) кодонов заменяют на

остатки со смешанными основаниями и/или остатки дезоксиинозина (Batzer et al. (1991) *Nucleic Acid Res.* 19:5081; Ohtsuka et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608; и Rossolini et al. (1994) *Mol. Cell. Probes* 8:91-98).

Термин "функционально связанные" в контексте нуклеиновых кислот относится к функциональной взаимосвязи между двумя или более полинуклеотидными (например, ДНК) сегментами. Обычно, он относится к функциональной взаимосвязи транскрипционной регуляторной последовательности с транскрибируемой последовательностью. Например, промоторные или энхансерные последовательности являются функционально связанными с кодирующей последовательностью, если они стимулируют или модулируют транскрипцию кодирующей последовательности в соответствующей клетке-хозяине или другой системе экспрессии. В общем случае, промоторные транскрипционные регуляторные последовательности, которые являются функционально связанными с транскрибируемой последовательностью, являются физически сближенными с транскрибируемой последовательностью, т.е. они являются cis-действующими. Однако, некоторые транскрипционные регуляторные последовательности, такие как энхансеры, не нуждаются в физическом сближении или расположении в тесной близости с кодирующими последовательностями, чью транскрипцию они усиливают.

Термины "полипептид" и "белок" применяют взаимозаменяемо в данном документе, для обозначения полимера из аминокислотных остатков. Термины применяют к полимерам канонических аминокислот, а также полимерам неканонических аминокислот. Если не указано иначе, конкретная полипептидная последовательность также в неявной форме охватывает ее консервативно модифицированные варианты.

Термин "иммуноконъюгат" или "конъюгат антитела", как применяют в данном документе, относится к связыванию антитела или фрагмента этого антитела с еще одним другим средством, таким как химиотерапевтическое средство, токсин, иммунотерапевтическое средство, зонд для визуализации, спектроскопический зонд, и т.п. Связь может осуществляться через одну или множество ковалентных связей, или нековалентных взаимодействий, и может включать хелатирование. Различные линкеры, многие из которых являются известными в данной области, могут использоваться, чтобы образовать иммуноконъюгат. Дополнительно, иммуноконъюгат может быть предоставлен в форме гибридного белка, который может экспрессироваться из полинуклеотида, кодирующего иммуноконъюгат. Как применяют в данном документе, "гибридный белок" относится к белкам, создаваемым посредством объединения двух или более генов или фрагментов генов, которые первоначально кодировали отдельные белки (включающие пептиды и полипептиды). Гибридный белок может быть создан посредством объединения по N- или C-концу, или посредством введения генов или фрагментов генов в разрешаемые области одного из партнерских белков. Трансляция гибридного гена приводит к единственному белку с функциональными свойствами, производимыми от каждого из исходных белков.

Термин "субъект" включает людей и животных, не являющихся людьми. Животные, не являющиеся людьми, включают всех позвоночных, например, млекопитающих и немлекопитающих, таких как приматы, не являющиеся людьми, овцы, собаки, коровы, куры, амфибии и рептилии. За исключением отмеченных случаев, термины "пациент" или "субъект" применяют в данном документе взаимозаменяемо.

Термин "цитотоксин" или "цитотоксическое средство", как применяют в данном документе, относится к любому средству, которое является вредным для роста и пролиферации клеток и могут действовать для снижения, ингибирования или разрушения клетки или злокачественного новообразования.

Термин "средство против злокачественных новообразований", как применяют в данном документе, относится к любому средству, которое может применяться для лечения пролиферативного нарушения клеток, такого как злокачественное новообразование, включающему, но не ограниченному перечисленным, цитотоксические средства, химиотерапевтические средства, лучевую терапию и средства для лучевой терапии, нацеленные средства против злокачественных новообразований, и иммунотерапевтические средства.

Термин "фрагмент лекарственного средства" или "полезная нагрузка" используют взаимозаменяемо, и он относится к химическому фрагменту, который конъюгируют с антителом или фрагментом антитела изобретения, и может включать любой фрагмент, который является применимым для присоединения к антителу или фрагменту антитела. Например, фрагмент лекарственного средства или полезная нагрузка могут представлять собой средство против злокачественных новообразований, противовоспалительное средство, противогрибковое средство, антибактериальное средство, противопаразитарное средство, противовирусное средство, анестезирующее средство. В некоторых вариантах осуществления фрагмент лекарственного средства выбирают из ингибитора V-АТФазы, ингибитора HSP90, ингибитора IAP, ингибитора mTog, стабилизатора микротрубочек, дестабилизаторов микротрубочек, ауристатины, доластатины, майтансиноида, MetAP (метионинаминопептидазы), ингибитора ядерного экспорта белков CRM1, ингибитора DPPIV, ингибитора реакций переноса фосфорила в митохондриях, ингибитора синтеза белка, ингибитора киназы, ингибитора CDK2, ингибитора CDK9, ингибитора протеасом, ингибитора кинезина, ингибитора HDAC, средства, повреждающего ДНК, ДНК-алкилирующего средства, интеркалятора ДНК, связующего малой бороздки ДНК и ингибитора DHFR. Подходящие примеры включают ауристатины, такие как MMAE и MMAF; калихеамицины, такие как гамма-калихеамицины; и майтансиноиды, такие как DM1 и DM4. Способы присоединения каждого из перечисленных к линкеру, совмести-

тому с антителами и способом изобретения, являются известными в данной области. См., например, Singh et al. (2009) *Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols*, vol. 525, 445-457. В дополнение, полезная нагрузка может представлять собой биофизический зонд, флуорофор, спиновую метку, инфракрасный зонд, аффинный зонд, хелатор, спектроскопический зонд, радиоактивный зонд, липидную молекулу, полиэтиленгликоль, полимер, спиновую метку, ДНК, РНК, белок, пептид, поверхность, антитело, фрагмент антитела, наночастицу, квантовую точку, липосому, частицу PLGA, сахарид или полисахарид, реакционноспособную функциональную группу, или связывающее средство, которое может соединять конъюгат с еще одним фрагментом, поверхностью и т.д.

Термин "отношение лекарственного средства к антителу" (также именуемое "DAR"), относится к числу полезных нагрузок или фрагментов лекарственного средства, связанных с антителом иммуноконъюгата. Например, отношение лекарственного средства к антителу, равное 2, означает, что в среднем два фрагмента лекарственного средства связаны с каждым антителом в образце иммуноконъюгатов. Некоторые индивидуальные иммуноконъюгаты находящиеся в образце при отношении лекарственного средства к антителу, равном двум, могут не иметь или иметь только один связанный фрагмент лекарственного средства; другие иммуноконъюгаты в этом образце будут иметь два, три, четыре или даже более фрагментов в индивидуальном антителе. Но среднее отношение в образце будет равно двум. Существуют различные методы, известные в данной области, для измерения отношений лекарственного средства к антителу иммуноконъюгатов.

В варианте осуществления данного изобретения, DAR в образце иммуноконъюгатов может являться "гомогенным". "Гомогенный образец конъюгации" представляет собой образец с узким распределением DAR. В качестве иллюстративного варианта осуществления, гомогенный образец конъюгации, имеющий DAR, равный 2, может содержать антитела, которые не являются конъюгированными, и некоторые антитела, имеющие более двух фрагментов, конъюгированных при DAR, приблизительно равном двум. "Большая часть образца" означает, что по меньшей мере свыше 70%, или по меньшей мере свыше 80% или по меньшей мере свыше 90% антител в образце будут конъюгированы с двумя фрагментами.

В качестве иллюстративного варианта осуществления, гомогенный образец конъюгации, имеющий DAR, равный 4, может содержать в данном образце антитела, которые имеют больше или меньше четырех фрагментов, конъюгированных при DAR, приблизительно равном четырем. "Большая часть образца" означает, что по меньшей мере свыше 70%, или по меньшей мере свыше 80% или по меньшей мере свыше 90% антител в образце будут конъюгированы с четырьмя фрагментами.

В качестве иллюстративного варианта осуществления, гомогенный образец конъюгации, имеющий DAR, равный 6, может содержать в данном образце антитела, которые имеют больше или меньше шести фрагментов, конъюгированных при DAR, приблизительно равном шести. "Большая часть образца" означает, что по меньшей мере свыше 70%, или по меньшей мере свыше 80% или по меньшей мере свыше 90% антител в образце будут конъюгированы с шестью фрагментами.

В качестве иллюстративного варианта осуществления, гомогенный образец конъюгации, имеющий DAR, равный 8, может содержать в данном образце антитела, которые имеют больше или меньше восьми фрагментов, конъюгированных при DAR, приблизительно равном восьми. "Большая часть образца" означает, что по меньшей мере свыше 70%, или по меньшей мере свыше 80% или по меньшей мере свыше 90% антител в образце будут конъюгированы с восемью фрагментами.

Иммуноконъюгат, имеющий "отношение лекарственного средства к антителу, равное приблизительно 2", относится к образцу иммуноконъюгатов, где отношение лекарственного средства к антителу может находиться в интервале от приблизительно 1,6-2,4 фрагментов/антитело, 1,8-2,3 фрагментов/антитело или 1,9-2,1 фрагментов/антитело.

Иммуноконъюгат, имеющий "отношение лекарственного средства к антителу, равное приблизительно 4", относится к образцу иммуноконъюгатов, где отношение лекарственного средства к антителу может находиться в интервале от приблизительно 3,6-4,4 фрагментов/антитело, 3,8-4,3 фрагментов/антитело или 3,9-4,1 фрагментов/антитело.

Иммуноконъюгат, имеющий "отношение лекарственного средства к антителу, равное приблизительно 6", относится к образцу иммуноконъюгатов, где отношение лекарственного средства к антителу может находиться в интервале от приблизительно 5,6-6,4 фрагментов/антитело, 5,8-6,3 фрагментов/антитело или 5,9-6,1 фрагментов/антитело.

Иммуноконъюгат, имеющий "отношение лекарственного средства к антителу, равное приблизительно 8", относится к образцу иммуноконъюгатов, где отношение лекарственного средства к антителу может находиться в интервале от приблизительно 7,6-8,4 фрагментов/антитело, 7,8-8,3 фрагментов/антитело или 7,9-8,1 фрагментов/антитело.

"Опухоль" относится к росту и пролиферации неопластических клеток, независимо от того, являются ли они злокачественными или доброкачественными, и всем предраковым и раковым клеткам и тканям.

Термин "противоопухолевая активность" означает снижение скорости пролиферации, жизнеспособности или метаболической активности опухолевых клеток. Возможным путем демонстрации противоопухолевой активности является показать падение скорости роста аномальных клеток, который возникает во время терапии, или устойчивость или снижение размера опухоли. Такую активность можно оце-

нить, используя принятые опухолевые модели *in vitro* или *in vivo*, включающие, но не ограниченные перечисленным, ксеноирансплантанные модели, аллотрансплантанные модели, модели MMTV и другие известные модели, известные в данной области для исследования противоопухолевой активности.

Термин "злокачественное образование" относится к недоброкачественной опухоли или раку. Как применяют в данном документе, термин "рак" включает злокачественное новообразование, характеризующееся дерегулированным или неуправляемым ростом клеток. Примерные злокачественные новообразования включают: карциномы, саркомы, лейкемии и лимфомы.

Термин "рак" включает первичные злокачественные опухоли (например, опухоли, клетки которых не мигрировали к участкам в организме субъекта, отличным от участка исходной опухоли) и вторичные злокачественные опухоли, (например, опухоли, возникающие в результате метастазов, миграции опухолевых клеток к вторичным участкам, которые отличаются от участка исходной опухоли).

Как применяют в данном документе, термин "оптический изомер" или "стереоизомер" относится к любой из различных стереоизомерных конфигураций, которые могут существовать для данного соединения настоящего изобретения и включают геометрические изомеры. Понимают, что заместитель может присоединяться по хиральному центру атома углерода. Термин "хиральный" относится к молекулам, которые обладают свойством неналагаемости на их партнера зеркального изображения, в то время как термин "хиральный" относится к молекулам, которые могут налагаться на их партнера зеркального изображения. Следовательно, изобретение включает энантиомеры, диастереомеры или рацематы соединения. "Энантиомеры" представляют собой пару стереоизомеров которые представляют собой неналагающиеся зеркальные изображения друг друга. 1:1 смесь пары энантиомеров представляет собой "рацемическую" смесь. Термин применяют для обозначения рацемической смеси в соответствующих случаях. "Диастереоизомеры" являются стереоизомерами, которые имеют по меньшей мере два асимметрических атома, но которые не являются зеркальными изображениями друг друга. Абсолютную стереохимию устанавливают в соответствии с R-S системой Кана-Ингольда-Прелога. Когда соединение представляет собой чистый энантиомер, стереохимия по каждому хиральному углероду может быть обозначена посредством либо R или S. Разделяемые соединения, абсолютная конфигурация которых является неизвестной, могут быть обозначены (+) или (-) в зависимости от направления (право- или левовращающего), в котором они вращают плоскополяризованный свет при длине волны D линии натрия. Некоторые соединения, описанные в данном документе, содержат один или более асимметрических центров или осей и могут, таким образом, приводить к энантиомерам, диастереомерам и другим стереоизомерным формам, которые могут быть определены, с точки зрения абсолютной стереохимии, как (R)- или (S)-.

В зависимости от выбора исходных веществ и методик, соединения могут быть представлены в форме одного из возможных изомеров или в виде их смесей, например, в виде чистых оптических изомеров, или как смеси изомеров, такие как рацематы и диастереоизомерные смеси, в зависимости от числа асимметрических углеродных атомов. Подразумевают, что настоящее изобретение включает все такие возможные изомеры, включая рацемические смеси, диастереомерные смеси и оптически чистые формы. Оптически активные (R)- и (S)-изомеры могут быть получены с использованием хиральных синтонов или хиральных реагентов, или могут быть разделены с использованием общепринятых методов. Если соединение содержит двойную связь, заместитель может иметь E или Z конфигурацию. Если соединение содержит дизамещенный циклоалкил, циклоалкильный заместитель может иметь цис- или транс-конфигурацию. Подразумевают, что все таутомерные формы также являются включенными.

Как применяют в данном документе, термины "соль" или "соли" относятся к кислотно-аддитивной или основно-аддитивной соли соединения изобретения. "Соли" включают, в частности, "фармацевтические приемлемые соли". Термин "фармацевтически приемлемые соли" относится к солям, которые сохраняют биологическую эффективность и свойства соединений данного изобретения и, которые обычно не являются биологически или иным образом нежелательными. Во многих случаях, соединения настоящего изобретения являются способными к образованию солей с кислотой и/или основанием вследствие присутствия amino и/или карбоксильных групп, или групп, аналогичных им.

Фармацевтически приемлемые кислотно-аддитивные соли могут быть образованы с неорганическими кислотами и органическими кислотами, например, соли ацетата, аспартата, бензоата, бесилата, бромида/гидробромида, бикарбоната/карбоната, бисульфата/сульфата, камфорсульфоната, хлорида/гидрохлорида, хлортеофиллината, цитрата, этандисульфоната, фумарата, глюцептата, глюконата, глюкуроната, гиппурата, гидройодида/йодида, изетионата, лактата, лактобионата, лаурилсульфата, малата, малеата, малоната, манделата, мезилата, метилсульфата, нафтоата, напсилата, никотината, нитрата, октадеканоата, олеата, оксалата, пальмитата, памоата, фосфата/гидрофосфата/дигидрофосфата, полигалактуроната, пропионата, стеарата, сукцината, сульфосалицилата, тартрата, тозилата и трифтораацетата.

Неорганические кислоты, из которых соли могут быть получены, включают, например, хлористоводородную кислоту, бромистоводородную кислоту, серную кислоту, азотную кислоту, фосфорную кислоту и т.п.

Органические кислоты, из которых соли могут быть получены, включают, например, уксусную кислоту, пропионовую кислоту, гликолевую кислоту, щавелевую кислоту, малеиновую кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, фумаровую кислоту, винную кислоту, лимонную кислоту, бензойную

кислоту, миндальную кислоту, метансульфоновую кислоту, этансульфоновую кислоту, толуолсульфоновую кислоту, сульфосалициловую кислоту и т.п. Фармацевтически приемлемые основно-аддитивные соли могут быть образованы с неорганическими и органическими основаниями.

Неорганические основания, из которых соли могут быть получены, включают, например, соли аммония и металлы из столбцов I-XII периодической таблицы. В некоторых вариантах осуществления, соли получают из натрия, калия, аммония, кальция, магния, железа, серебра, цинка и меди; особенно подходящие соли включают соли аммония, калия, натрия, кальция и магния.

Органические основания, из которых соли могут быть получены, включают, например, первичные, вторичные и третичные амины, замещенные амины, включающие природные замещенные амины, циклические амины, основные ионообменные смолы и т.п. Некоторые органические амины включают изопропиламин, бензатин, холинат, диэтанолламин, диэтиламин, лизин, меглумин, пиперазин и трометамин.

Фармацевтически приемлемые соли настоящего изобретения могут быть синтезированы из основного или кислотного фрагмента, посредством общепринятых химических методов. Обычно, такие соли могут быть получены посредством взаимодействия свободных кислотных форм этих соединений со стехиометрическим количеством соответствующего основания (такого как гидроксид, карбонат, бикарбонат или т.п. Na, Ca, Mg или K), или посредством взаимодействия свободных основных форм этих соединений со стехиометрическим количеством соответствующей кислоты. Такие реакции обычно проводят в воде или в органическом растворителе, или в смеси из обоих. Обычно, использование неводных сред, таких как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил является желательным там, где это практически осуществимо. Перечни дополнительных подходящей солей могут быть найдены, например, в "Remington's Pharmaceutical Sciences", 20th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1985); и в "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" by Stahl and Wermuth (Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002).

Любая формула, приведенная в данном документе, также предназначена для представления немеченых форм, а также меченых изотопами форм соединений. Изотопно меченые соединения имеют структуры, изображенных посредством формул, приведенных в данном документе, за исключением тех случаев, когда один или более атомов заменяют на атом, имеющий выбранную атомную массу или массовое число. Примеры изотопов, которые могут быть введены в соединения изобретения, включают изотопы водорода, углерода, азота, кислорода, фосфора, фтора и хлора, такие как ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}F , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{36}Cl , ^{125}I соответственно. Изобретение включает различные изотопно меченые соединения, определенные в настоящем документе, например те, в которых присутствуют радиоактивные изотопы, такие как ^3H и ^{14}C или те, в которых присутствуют нерадиоактивные изотопы, такие как ^2H и ^{13}C . Такие изотопно меченые соединения являются применимыми в метаболических исследованиях (с ^{14}C), кинетических исследованиях реакции (с, например, ^2H или ^3H), методах обнаружения или визуализации, таких как позитронная эмиссионная томография (ПЭТ) или однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ), включающих аналитические тесты на распределение в тканях лекарственного средства или субстрата, или при лечении пациентов радиоактивными изотопами. В частности, ^{18}F или меченое соединение могут быть особенно желательными для исследований методами ПЭТ или ОФЭКТ. Изотопно-меченые соединения формулы (I) обычно могут быть получены посредством общепринятых методов, известных квалифицированным специалистам в данной области или посредством процессов, аналогичных способам, описанным в сопровождающих Примерах и Получениях, с использованием соответствующих изотопно-меченых реагентов вместо ранее использовавшегося немеченого реагента.

Дополнительно, замена на более тяжелые изотопы, особенно дейтерий (т.е. ^2H или D) может давать некоторые терапевтические преимущества, являющиеся результатом более высокой метаболической стабильности, например увеличенному времени полужизни *in vivo* или сниженным требованиям к дозировке или улучшению терапевтического индекса. Понимают, что дейтерий в данном контексте считается заместителем соединения формулы (I). Концентрация такого более тяжелого изотопа, в особенности дейтерия, может быть определена посредством фактора изотопного обогащения. Термин "фактор изотопного обогащения", как применяют в данном документе, означает отношение между изотопной распространенностью и природной распространенностью установленного изотопа. Если заместитель в соединении данного изобретения обозначен как дейтерий, такое соединение имеет фактор изотопного обогащения для каждого обозначенного атома дейтерия, равный по меньшей мере 3500 (52,5% введения дейтерия по каждому обозначенному атому дейтерия), по меньшей мере 4000 (60% введения дейтерия), по меньшей мере 4500 (67,5% введения дейтерия), по меньшей мере 5000 (75% введения дейтерия), по меньшей мере 5500 (82,5% введения дейтерия), по меньшей мере 6000 (90% введения дейтерия), по меньшей мере 6333,3 (95% введения дейтерия), по меньшей мере 6466,7 (97% введения дейтерия), по меньшей мере 6600 (99% введения дейтерия), или по меньшей мере 6633,3 (99,5% введения дейтерия).

Как применяют в данном документе, термин "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, консерванты (например, антибактериальные средства, противогрибковые средства), изотонические средства, средства замедляющие всасывание, соли, консерванты, стабилизаторы лекарственных средств, связующие, эксципиенты, дезинтеграторы, смазки, подсластители, ароматизаторы, красители и

т.п. и их комбинации, как может быть известно специалистам в данной области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329). Кроме случаев, когда какой-либо общепринятый носитель является несовместимым с активным ингредиентом, предполагается его применение в терапевтических или фармацевтических композициях.

Термин "терапевтически эффективное количество" соединения настоящего изобретения относится к количеству соединения настоящего изобретения, которое будет вызывать биологический или медицинский ответ субъекта, например, снижение или ингибирование активности фермента или белка, или смягчение симптомов, облегчение состояний, замедление или задержка прогрессирования заболевания, или предотвращение заболевания и т.д. В одном неограничивающем варианте осуществления, термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству соединения настоящего изобретения, которое, когда его вводят субъекту, является эффективным, чтобы по меньшей мере частично облегчить, ингибировать, предотвратить и/или смягчить состояние или нарушение или заболевание, или по меньшей мере частично ингибировать активность целевого фермента или рецептора.

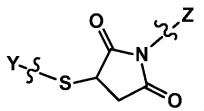
Как применяют в данном документе, термин "ингибировать", "ингибирование" или "ингибирующий" относится к снижению или подавлению данного состояния, симптома, или нарушения, или заболевания, или существенному снижению исходной активности биологической активности или процесса.

Как применяют в данном документе, термин "лечить", "излечивание" или "лечение" какого-либо заболевания или нарушения относится в одном варианте осуществления, к облегчению заболевания или расстройства (т.е. замедлению или отмены или снижению развития заболевания или по меньшей мере одного из его клинических симптомов). В еще одном варианте осуществления "лечить", "излечивание" или "лечение" относится к облегчению или снижению по меньшей мере одного физического параметра, включая те параметры, которые могут быть неразличимыми пациентом. В еще одном другом варианте осуществления, "лечить", "излечивание" или "лечение" относится к модуляции заболевания или расстройства, либо физически, (например, стабилизации различного симптома), физиологически, (например, стабилизации физического параметра), или обоим. В еще одном другом варианте осуществления, "лечить", "излечивание" или "лечение" относится к профилактике или задержке наступления или развития или прогрессирования заболевания или расстройства.

Как применяют в данном документе, субъект является "нуждающимся в" лечении, если такой субъект смог бы получить благоприятный эффект биологически, медицински или в качестве жизни от такого лечения.

Как применяют в данном документе, термин единственного и множественного числа и аналогичные термины, используемые в контексте настоящего изобретения (особенно в контексте формулы изобретения), следует рассматривать, как охватывающие как единственную, так и множественную форму, если в данном документе не указано иначе, или явно не противоречит по контексту.

Термин "тиол-малеимид", как применяют в данном документе, описывает группу, образованную посредством реакции тиола с малеимидом, имеющим данную общую формулу



где Y и Z являются группами, подлежащими соединению через связь тиол-малеимид, и могут представлять собой линкерные блоки, и могут быть присоединены к антителам или полезным нагрузкам. В некоторых случаях, Y представляет собой сконструированное антитело согласно изобретению, и атом серы, показанный в формуле, берется от цистеина на одном из участков замены, описанных в данном документе; в то время как Z представляет линкерный блок, соединенный с полезной нагрузкой.

"Линкерный Блок" (LU), как применяют в данном документе, относится к ковалентному химическому связыванию между двумя фрагментами, такими как антитело и полезная нагрузка. Каждый LU может состоять из одного или более компонентов, описанных в данном документе как L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ и L₆. Линкерный блок может быть выбран, чтобы предоставить подходящее расстояние между соединяемыми фрагментами, или обеспечить некоторые физико-химические свойства, или обеспечить расщепление линкерного блока при определенных условиях.

"Расщепляемый", как применяют в данном документе, относится к линкеру или линкерному блоку (LU), который соединяет два фрагмента посредством ковалентных соединений, но разрушается с разрывом ковалентного соединения между фрагментами при физиологических условиях. Расщепление может быть ферментативным или неферментативным, но обычно высвобождает полезную нагрузку из антитела, без разрушения антитела.

"Нерасщепляемый", как применяют в данном документе, относится к линкеру или линкерному блоку (LU), который не является подверженным к разрушению при физиологических условиях. В то время, как линкер может быть модифицирован физиологически, он сохраняет полезную нагрузку, соединенную с антителом, пока антитело не будет существенно разрушено, т.е. разрушение антитела предшествует расщеплению линкера *in vivo*.

"Циклооктин", как применяют в данном документе, относится к 8-членному кольцу, содержащему

углерод-углеродную тройную связь (ацетилен). Кольцо необязательно является конденсированным с одним или двумя фенильными кольцами, которые могут быть замещены 1-4 C_{1-4} алкилом, C_{1-4} алкокси, галогеном, гидроксилом, $COOH$, $COOL_1$, $-C(O)NH-L_1$, $O-L_1$ или аналогичными группами, и, которые могут содержать N, O или S в качестве члена кольца. В предпочтительных вариантах осуществления, циклооктин может представлять собой C_8 углеводородное кольцо, в частности изолированное кольцо, которое является насыщенным помимо тройной связи, и может быть замещенным F или Гидроксидом, и может быть связано с линкером или LU через $-O-$, $-C(O)$, $C(O)NH$ или $C(O)O$.

"Циклооктен", как применяют в данном документе, относится к 8-членному кольцу, содержащему по меньшей мере одну двойную связь, особенно транс-двойную связь. Кольцо необязательно является конденсированным с одним или двумя фенильными кольцами, которые могут быть замещены 1-4 C_{1-4} алкилом, C_{1-4} алкокси, галогеном, гидроксилом, $COOH$, $COOL_1$, $-C(O)NH-L_1$, $O-L_1$ или аналогичными группами, и, которые могут содержать N, O или S в качестве члена кольца. В предпочтительных вариантах осуществления, циклооктен может представлять собой изолированное C_8 углеводородное кольцо, которое является насыщенным помимо транс-двойной связи и необязательно является замещенным F или Гидроксидом, и может быть связано с линкером или LU через $-O-$, $-C(O)$, $C(O)NH$ или $C(O)O$.

Все способы, описанные в данном документе, могут выполняться в любом подходящем порядке, если в данном документе не указано иначе, или явным образом не противоречит контексту. Применение любых и всех примеров, или иллюстративной лексики (например, "такие как"), предоставленных в данном документе, предназначено просто для лучшего освещения изобретения и не накладывает ограничение на объем притязаний изобретения, заявленного иным образом.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. График поверхностной доступности аминокислотных остатков в тяжелой цепи человеческих IgG1 (A) и каппа легкой цепи (B). Поверхностную доступность рассчитывают, используя Surface Racer 5.0 и выражают в квадратных Ангстремах [\AA^2].

Фиг. 2. Расположение выбранных 92 TAG мутаций в структуре человеческого IgG1 с каппа легкой цепью. Выбранные остатки для TAG мутаций показаны черным цветом на только одной из двух тяжелых цепей и для одной из двух каппа легких цепей (1HZN.pdb). Структуры показаны с использованием PyMOL, пакета программ молекулярного моделирования из открытых источников (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0. Schrodinger, LLC).

Фиг. 3. Выравнивание аминокислотных последовательностей константных областей тяжелой цепи трастузумаб и антитела 14090. Остатки, прошедшие мутацию в Cys в антителе трастузумаб и в антителе 14090, подчеркнуты. Аминокислотные остатки в тяжелой цепи нумеруют посредством системы нумерации Eu (Edelman et al., 1969).

Фиг. 4. Выравнивание аминокислотных последовательностей константных областей трастузумаб, человеческих IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

Фиг. 5. Выравнивание аминокислотных последовательностей константных областей человеческих каппа и лямбда легких цепей. A. Остатки, прошедшие мутацию в Cys в каппа легкой цепи трастузумаб и лямбда легкой цепи антитела 14090 подчеркнуты. B. Остатки, выбранные для Cys мутаций, показаны на структурной модели PyMOL человеческой лямбда легкой цепи (Protein Structure Databank вход 3G6D.pdb).

Фиг. 6. Анализ трастузумаб Cys антител посредством невозстанавливающего SDS-PAGE.

Фиг. 7. Гель-фильтрация трастузумаб LC-S156C мутантного антитела (пунктирная линия) и дикого типа трастузумаб (сплошная линия).

Фиг. 8. Анализ дикого типа трастузумаб (A) и трастузумаб LC-E158C мутантного антитела (B) посредством обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. (ОФ-ВЭЖХ).

Фиг. 9. МС анализ трастузумаб LC-R108C мутантного антитела после очистки от Белка А (интактная МС).

Фиг. 10. Структура МС-MMAF.

Фиг. 11. Анализ конъюгационных смесей трастузумаб Cys антител с МС-MMAF посредством ОФ-ВЭЖХ. ОФ-ВЭЖХ следы конъюгационных смесей показаны пунктирными линиями. ОФ-ВЭЖХ следы немодифицированных антител показаны сплошными линиями. A. LC-R108C-MMAF, B. HC-360C-MMAF, C. LC-S156C-MMAF и D. HC-S275C-MMAF ADC.

Фиг. 12. Анализ конъюгационных смесей трастузумаб Cys антител с МС-MMAF посредством ОФ-ВЭЖХ. ОФ-ВЭЖХ следы конъюгационных смесей показаны пунктирными линиями. ОФ-ВЭЖХ следы немодифицированных антител показаны сплошными линиями. A. HC-S134C-MMAF и B. HC-S136C-MMAF ADC.

Фиг. 13. Анализ трастузумаб Cys-MMAF ADC посредством аналитической гель-фильтрации (An-SEC). Трастузумаб HC-K290C-MMAF ADC (короткая пунктирная линия), трастузумаб LC-R142C-MMAF ADC (пунктирная линия), и трастузумаб LC-L154C-MMAF ADC (штриховая линия) сравнивают с немодифицированным дикого типа трастузумаб (сплошная линия).

Фиг. 14. Температурная кривая плавления немодифицированного дикого типа трастузумаб и трастузумаб HC-T335C-MMAF, трастузумаб HC-S337C-MMAF и трастузумаб HC-K360C-MMAF ADC.

Фиг. 15. Аналитические тесты на пролиферацию клеток для трастузумаб LC-S159C-MMAF с клетками А. HCC1954, В. MDA-MB231 клона 16 и С. MDA-MB231 клона 40.

Фиг. 16. IC₅₀ трастузумаб Cys-MMAF ADC в аналитическом тесте на пролиферацию клеток MDA-MB231 клона 16.

Фиг. 17. Аналитические тесты на пролиферацию клеток для Антитело 14090 HC-S375C-MMAF ADC с клетками А. CMK11-5 и В. лейкоцитами Т-лимфоцитами человека.

Фиг. 18. Фармакокинетическое исследование трастузумаб LC-Cys-MMAF ADC, не проявляющего существенной потери лекарственного средства. А. Дикого типа неконъюгированное трастузумаб, В. LC-K107C-MMAF, С. LC-R108C-MMAF, D. LC-L154C-MMAF, и E. LC-S159C-MMAF ADC.

Фиг. 19. Фармакокинетическое исследование трастузумаб HC-Cys-MMAF ADC, не проявляющего существенной потери лекарственного средства. А. HC-K121C-MMAD, В. HC-L174C-MMAF, С. HC-E258C-MMAF, и D. HC-R292C-MMAF ADC.

Фиг. 20. Фармакокинетическое исследование трастузумаб Cys-MMAF ADC, проявляющего существенную потерю лекарственного средства. А. LC-T129C-MMAF, В. LC-E143C-MMAF, С. HC-K246C-MMAF, и D. HC-R344C-MMAF ADC.

Фиг. 21. Фармакокинетическое исследование двух трастузумаб Cys-MMAF ADC, проявляющих быстрое выведение *in vivo*. А. HC-T335C-MMAF и В. HC-S337C-MMAF ADC.

Фиг. 22. Исследования эффективности действия *in vivo* трастузумаб Cys-MMAF ADC на модели мышинного ксенотрансплантата MDA-MB231 клона 16.

Фиг. 23: Значения времени удерживания трастузумаб Pcl MMAF DAR 2 ADC, измеренного посредством Хроматографии с гидрофобным взаимодействием. АВА-MMAF присоединяется по Pcl остатку, замененному на указанный HC или LC остаток. А) HC конъюгированный ADC. В) LC конъюгированный ADC. Указано время удерживания неконъюгированного антитела дикого типа (WT).

Фиг. 24. Расположение выбранных участков полезной нагрузки в структуре человеческого IgG1 с каппа легкой цепью. Выбранные остатки показаны черным цветом на только одной из двух тяжелых цепей и для одной из двух каппа легких цепей (1HZH.pdb). Три вращения структуры показаны с использованием PyMOL, программного пакета для молекулярного моделирования из открытых источников (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0. Schrödinger, LLC).

Фиг. 25. Фармакокинетическое исследование трастузумаб и антитела 14090 Cys-MMAF ADC с DAR 4, 6 и 8, полученного с антителами с 2, 3 или 4 Cys мутациями. DAR 4 трастузумаб ADC: HC-E258C-LC-S159C-MMAF (A), HC-S375C-LC-S159C-MMAF (B), HC-E258C-LC-E165C-MMAF (C), HC-S375C-LC-E165C-MMAF (D), HC-E152C-LC-R142C-MMAF (E), HC-P171C-LC-R142C-MMAF, и HC-E152C-LC-S159C-MMAF (G); DAR 4 антитело 14090 ADC:HC-S375C-LC-A143C-MMAF (H), HC-K360C-LC-V159C-MMAF (I), и HC-S375C-LC-V159C-MMAF (J); K. DAR 6 трастузумаб ADC HC-K334C-S375C-LC-E165C-MMAF и HC-K334C-K392C-LC-E165C-MMAF; L. DAR 8 трастузумаб ADC HC-K334C-K360C-S375C-LC-E165C-MMAF, HC-K334C-K360C-K392C-LC-E165C-MMAF и HC-K334C-S375C-K392C-LC-E165C-MMAF. Антитело 14090 является мышинным кросс-реактивным, и следовательно, выводится более быстро, чем трастузумаб ADC, которое не связывается с какими-либо мышинными антигенами.

Подробное описание

Настоящее изобретение предоставляет способы сайт-специфичного мечения антител или фрагментов антител посредством замены одной или более аминокислот исходных антитела или фрагмента антитела в специфичных положениях на цистеиновые аминокислоты ("Cys"), таким образом, что сконструированные антитела или фрагменты антител способны к конъюгации с различными средствами (например, цитотоксическими средствами). Настоящее изобретение также предоставляет иммуноконъюгаты, которые получают посредством применения способов, описанных в данном документе.

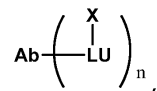
Когда цистеин встраивают в конструкцию исходных антитела или фрагмента антитела, модифицированное антитело или фрагмент антитела извлекают первыми из среды экспрессии с цистеином или глутатионом (GSH), присоединенными на сконструированных цистеиновых участке (участках) через дисульфидную связь (Chen et al. (2009) mAbs 16, 353-571). Присоединенные цистеин или GSH затем удаляют на стадии восстановления, на которой также восстанавливаются все нативные межцепочечные дисульфидные связи исходных антитела или фрагмента антитела. На второй стадии эти дисульфидные связи повторно окисляются перед тем, как происходит конъюгация. Настоящее раскрытие показывает, что, когда цистеин встраивают на определенных участках, стадия повторного окисления не протекает надлежащим образом, предположительно вследствие образования некорректных дисульфидных связей. Соответственно, настоящее изобретение предоставляет уникальные наборы участков в константной области тяжелой цепи антитела и константной области легкой цепи антитела, соответственно, где Cys-замена, как описано в данном документе, производит модифицированные антитела или фрагменты антител, которые участвуют надлежащим образом в процессе повторного окисления, а также приводит к получению стабильных и нормально функционирующих иммуноконъюгатов.

Сайт-специфичное мечение антитела, в соответствии с настоящим изобретением может достигаться с использованием разнообразных химически доступных реагентов для мечения, таких как средства против злокачественных новообразований, флуорофоры, пептиды, сахара, детергенты, полиэтиленгликоли,

средства, потенцирующие иммунную систему, зонды для визуализации с использованием радиоактивных изотопов, пролекарства и другие молекулы.

Соответственно, настоящее изобретение предоставляет способы получения гомогенных иммуноконъюгатов с определенным отношением лекарственное средство-к-антителу для применения в терапии злокачественных новообразований и других показаний, а также в качестве реагентов для визуализации. Настоящее изобретение также предоставляет иммуноконъюгаты, полученные таким образом, а также фармацевтические композиции, содержащие эти иммуноконъюгаты. Способы настоящего изобретения могут применяться в комбинации с другими способами конъюгации, известными в данной области.

Следующие нумерованные варианты осуществления представляют некоторые аспекты и вариации изобретения:



где Ab представляет антитело или фрагмент антитела, содержащие по меньшей мере один остаток цистеина на одном из предпочтительных участков замены на цистеин, выбранном из описанных в данном документе;

LU представляет собой Линкерный Блок, как описано в данном документе;

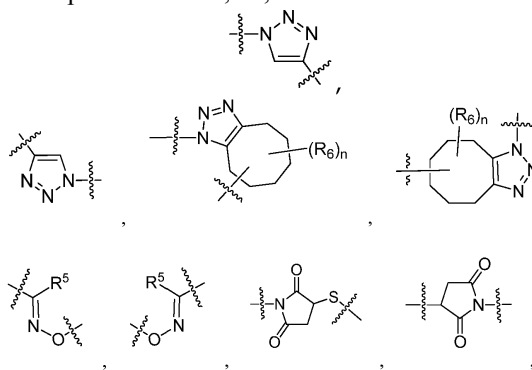
X представляет собой полезную нагрузку или фрагмент лекарственного средства;

и n является целым числом от 1 до 16.

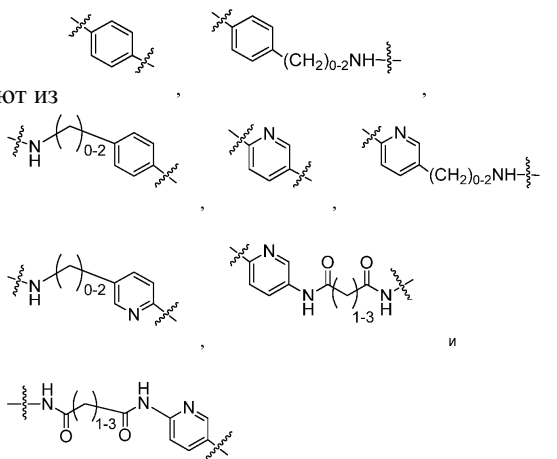
В этих вариантах осуществления, n предпочтительно представляет собой приблизительно 2, приблизительно 4, приблизительно 6, или приблизительно 8. LU представляет собой обычно группу формулы $-L_1-L_2-L_3-L_4-L_5-L_6-$, где L_1, L_2, L_3, L_4, L_5 и L_6 независимо выбирают из $-A_1-$, $-A_1X^2-$ и $-X^2-$; где:

A_1 представляет собой $-C(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$, $-(O(CH_2)_n)_m-$, $-(O(C(R^4)_2)_n)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m-$, $-((C(R^4)_2)_nO)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n-$, $-(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)-$, $-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)-$, $-NHC(=O)(CH_2)_n-$, $-NHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, $-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nS-$, $-S(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-S(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$, $-C(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)(C(R^4)_2)_n-$, $-(CH_2)_nC(=O)-$, $-(C(R^4)_2)_nC(=O)-$, $-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$, $-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n-$, $-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$ или $-(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$;

каждый X^2 независимо выбирают из связи, R^8 ,

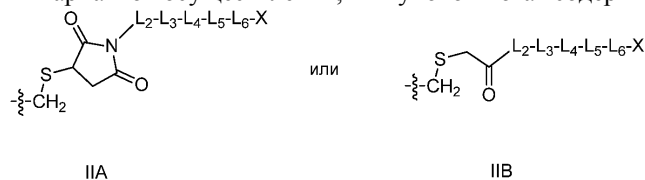


R⁸ независимо выбирают из



R⁹ независимо выбирают из H и C₁₋₆галогеналкила;
каждое n независимо выбирают из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9, и
каждое m независимо выбирают из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9.

В нескольких из этих вариантов осуществления, иммуноконъюгат содержит группу формулы



где атом серы представляет собой серу остатка цистеина в модифицированном антителе или фрагменте антитела и расположен на одном из участков замены идентифицированных в данном документе.

В любом из приведенных выше вариантов осуществления, участок замены на цистеин может занимать положение, которое соответствует одному из участков, идентифицированных посредством номера положения, даже несмотря на то, что положение участка в последовательности было изменено посредством модификации или усечения непроцессированного антитела. Соответствующие участки могут быть легко идентифицированы посредством выравнивания антитела или фрагмента с непроцессированным антителом.

1. Сайт-специфичные антитела со встроенным цистеином.

Сайт-специфичное мечение.

Антитела (например, исходное антитело, необязательно содержащее одну или более неканонических аминокислот) настоящего изобретения нумеруют в соответствии с системой нумерации EU, как приведено в Edelman et al. (1969) Proc. Natl. Acad. USA 63:78-85, за исключением того, что лямбда легкую цепь нумеруют в соответствии с системой нумерации Кабат, как приведено в Kabat et al. (1991) Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242. Константную область человеческого IgG1 применяют в качестве представительной на протяжении всей заявки. Однако, изобретение не ограничено человеческим IgG1;

соответствующие положения аминокислот могут быть легко выведены посредством выравнивания последовательностей. Например, фиг. 4 показывает выравнивание последовательностей константных областей тяжелой цепи человеческих IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, таким образом, что идентифицированный участок для встраивания Cys в константной области IgG1 может быть легко идентифицирован для IgG2, IgG3, и IgG4 как показано на фиг. 4. Для константной области легкой цепи, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 являются одинаковыми. В табл. 1 ниже приведены положения аминокислот в константной области тяжелой цепи антитела, которые могут быть заменены на цистеин. В табл. 2 приведены положения аминокислот в константной области каппа легкой цепи антитела, которые могут быть заменены на цистеин. В табл. 3 приведены положения аминокислот в константной области лямбда легкой цепи антитела, которые могут быть заменены на цистеин.

Таблица 1

Идентифицированные участки для замены на цистеин в константной области тяжелой цепи человеческого IgG1 (Участки пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU)

EU номер	Остаток	Поверхностная доступность [Å ²]	Выбранный HC Cys	SEQ ID NO.
117	SER	128,0	HC-S117C	2
119	SER	79,1	HC-S119C	3
121	LYS	135,9	HC-K121C	4
124	SER	40,2	HC-S124C	5
132	SER	34,4	HC-S132C	6
134	SER	123,3	HC-S134C	7
136	SER	182,9	HC-S136C	8
139	THR	32,9	HC-T139C	9
152	GLU	52,1	HC-E152C	10
153	PRO	89,1	HC-P153C	11
155	THR	69,0	HC-T155C	12
157	SER	39,0	HC-S157C	13
164	THR	125,4	HC-T164C	14
165	SER	183,2	HC-S165C	15
169	THR	60,0	HC-T169C	16
171	PRO	33,3	HC-P171C	17
174	LEU	68,1	HC-L174C	18
176	SER	161,9	HC-S176C	19
177	SER	68,1	HC-S177C	20
189	PRO	86,4	HC-P189C	21
191	SER	126,8	HC-S191C	22
195	THR	111,3	HC-T195C	23
197	THR	89,8	HC-T197C	24
205	LYS	217,1	HC-K205C	25
207	SER	50,0	HC-S207C	26
212	ASP	97,0	HC-D212C	27
246	LYS	55,1	HC-K246C	28
258	GLU	42,1	HC-E258C	29
269	GLU	189,2	HC-E269C	30
274	LYS	137,8	HC-K274C	31
286	ASN	119,4	HC-N286C	32
288	LYS	181,8	HC-K288C	33
290	LYS	177,0	HC-K290C	34
292	ARG	251,5	HC-R292C	35
293	GLU	83,3	HC-E293C	36
294	GLN	73,5	HC-E294C	37
320	LYS	55,0	HC-K320C	38
322	LYS	78,3	HC-K322C	39
326	LYS	212,7	HC-K326C	40
330	ALA	96,3	HC-A330C	41
333	GLU	84,7	HC-E333C	42
334	LYS	49,6	HC-K334C	43
335	THR	70,1	HC-T335C	44
337	SER	15,1	HC-S337C	45
344	ARG	98,2	HC-R344C	46
355	ARG	249,4	HC-R355C	47
360	LYS	113,9	HC-K360C	48

362	GLN	40,8	HC-Q362C	49
375	SER	28,9	HC-S375C	50
382	GLU	21,8	HC-E382C	51
389	ASN	189,5	HC-N389C	52
390	ASN	36,4	HC-N390C	53
392	LYS	81,8	HC-K392C	54
393	THR	35,8	HC-T393C	55
398	LEU	110,9	HC-L398C	56
400	SER	81,3	HC-S400C	57
413	ASP	79,6	HC-D413C	58
415	SER	69,0	HC-S415C	59
422	VAL	80,8	HC-V422C	60

Таблица 2

Идентифицированные участки для замены на цистеин в каппа легкой цепи константной области человеческого IgG1 (Участки пронумерованы в соответствии с системой нумерации EU)

EU номер	Остаток	Поверхностная доступность [Å ²]	Выбранный HC Cys	SEQ ID NO.
107	LYS	90	LC-K107C	61
108	ARG	49	LC-R108C	62
109	THR	148	LC-T109C	63
112	ALA	50	LC-A112C	64
114	SER	39	LC-S114C	65
122	ASP	90	LC-D122C	66
123	GLU	51	LC-E123C	67
129	THR	41	LC-T129C	68
142	ARG	55	LC-R142C	69
143	GLU	117	LC-E143C	70
145	LYS	160	LC-K145C	71
152	ASN	157	LC-N152C	72
154	LEU	117	LC-L154C	73
156	SER	122	LC-S156C	74
159	SER	22	LC-S159C	75
161	GLU	66	LC-E161C	76
165	GLU	74	LC-E165C	77
168	SER	170	LC-S168C	78
169	LYS	241	LC-K169C	79
170	ASP	48	LC-D170C	80
182	SER	59	LC-S182C	81
183	LYS	131	LC-K183C	82
188	LYS	201	LC-K188C	83
190	LYS	167	LC-K190C	84
191	VAL	58	LC-V191C	85
197	THR	38	LC-T197C	86
199	GLN	127	LC-Q199C	87
203	SER	110	LC-S203C	88
206	THR	70	LC-T206C	89

Таблица 3

Идентифицированные участки для замены на цистеин в лямбда легкой цепи человеческого IgG1

Кабат номер	Остаток	Поверхностная доступность [Å ²]	Выбранный HC Cys	SEQ ID NO.
143	ALA	82	LC-A143C	92
145	THR	106	LC-T145C	93
147	ALA	14	LC-A147C	94
156	LYS	233	LC-K156C	95
159	VAL	28	LC-V159C	96
163	THR	157	LC-T163C	97
168	SER	166	LC-S168C	98

Вследствие высокой гомологии последовательности константных областей антител IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, открытия изобретения не ограничиваются какими-либо конкретными антителами или фрагментами антител.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение предоставляет иммуноконъюгаты, содержащие модифицированное антитело или фрагмент этого антитела и фрагмент лекарственного средства, где указанное модифицированное антитело или фрагмент этого антитела содержит замену одной или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) аминокислот в их константной области тяжелой цепи, выбранных из положений, идентифицированных в табл. 1. В конкретном варианте осуществления, настоящее изобретение предоставляет иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело или фрагмент этого антитела и фрагмент лекарственного средства, где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит замену одной или более аминокислот на цистеин в его константной области, выбранных из положений 121, 124, 152, 171, 174, 258, 292, 333, 334, 360, 375 и 392 тяжелой цепи. Например, иммуноконъюгат изобретения содержит модифицированное антитело или фрагмент этого антитела и фрагмент лекарственного средства, где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит замену двух аминокислот на цистеин в их константной области, выбранных из положений 121 и 124, 121 и 152, 121 и 171, 121 и 174, 121 и 258, 121 и 292, 121 и 333, 121 и 334, 121 и 360, 121 и 375, 121 и 392, 124 и 152, 124 и 171, 124 и 174, 124 и 258, 124 и 292, 124 и 333, 124 и 334, 124 и 360, 124 и 375, 124 и 392, 152 и 171, 152 и 174, 152 и 258, 152 и 292, 152 и 333, 152 и 334, 152 и 360, 152 и 375, 152 и 392, 171 и 174, 171 и 258, 171 и 292, 171 и 333, 171 и 360, 171 и 375, 174 и 258, 174 и 292, 174 и 333, 174 и 334, 174 и 360, 174 и 375, 174 и 392, 258 и 292, 258 и 333, 258 и 334, 258 и 360, 258 и 375, 258 и 392, 292 и 333, 292 и 334, 292 и 360, 292 и 375, 292 и 392, 333 и 334, 333 и 360, 333 и 375, 333 и 392; 334 и 360, 334 и 375, 334 и 392, 360 и 375, 360 и 392 или 375 и 392 тяжелой цепи.

В еще одном варианте осуществления, иммуноконъюгат изобретения содержит модифицированное антитело или фрагмент этого антитела и фрагмент лекарственного средства, где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит замену трех аминокислот на цистеин в их константной области, выбранных из положений 121, 124 и 152; 121, 124 и 171; 121, 124 и 174; 121, 124 и 258; 121, 124 и 292; 121, 124 и 333; 121, 124 и 334; 121, 124 и 360; 121, 124 и 375; 121, 124 и 392; 121, 152 и 171; 121, 152 и 174; 121, 152 и 258; 121, 152 и 292; 121, 152 и 333; 121, 152 и 334; 121, 152 и 360; 121, 152 и 375; 121, 152 и 392; 121, 171 и 174; 121, 171 и 258; 121, 171 и 292; 121, 171 и 333; 121, 171 и 334; 121, 171 и 360; 121, 171 и 375; 121, 171 и 392; 121, 174 и 258, 121, 174 и 292; 121, 174 и 333; 121, 174 и 334; 121, 174 и 360; 121, 174 и 375; 121, 174 и 392; 121, 258 и 292; 121, 258 и 333; 121, 258 и 334; 121, 258 и 360; 121, 258 и 375; 121, 258 и 392; 121, 292 и 333; 121, 292 и 334; 121, 292 и 360; 121, 292 и 375; 121, 292 и 392; 121, 333 и 334; 121, 333 и 360; 121, 333 и 375; 121, 333 и 392; 121, 334 и 360; 121, 334 и 375; 121, 334 и 392; 121, 360 и 375; 121, 360 и 392; 121, 375 и 392; 124, 152 и 171; 124, 152 и 174; 124, 152 и 258; 124, 152 и 292; 124, 152 и 333; 124, 152 и 334; 124, 152 и 360; 124, 152 и 375; 124, 152 и 392; 124, 171 и 174; 124, 171 и 258; 124, 171 и 292; 124, 171 и 333; 124, 171 и 334; 124, 171 и 360; 124, 171 и 375; 124, 171 и 392; 124, 174 и 258; 124, 174 и 292; 124, 174 и 333; 124, 174 и 334; 124, 174 и 360; 124, 174 и 375; 124, 174 и 392; 124, 258 и 292; 124, 258 и 333; 124, 258 и 334; 124, 258 и 360; 124, 258 и 375; 124, 258 и 392; 124, 292 и 333; 124, 292 и 334; 124, 292 и 360; 124, 292 и 375; 124, 292 и 392; 124, 333 и 360; 124, 333 и 334; 124, 333 и 375; 124, 333 и 392; 124, 334 и 360; 124, 334 и 375; 124, 334 и 392; 124, 360 и 375; 124, 360 и 392; 124, 375 и 392; 152, 171 и 174; 152, 171 и 258; 152, 171 и 292; 152, 171 и 333; 152, 171 и 334; 152, 171 и 360; 152, 171 и 375; 152, 171 и 392; 152, 174 и 258; 152, 174 и 292; 152, 174 и 333; 152, 174 и 334; 152, 174 и 360; 152, 174 и 375; 152, 174 и 392; 152, 258 и 292; 152, 258 и 333; 152, 258 и 334; 152, 258 и 360; 152, 258 и 375; 152, 258 и 392; 152, 292 и 333; 152, 292 и 334; 152, 292 и 360; 152, 292 и 375; 152, 292 и 392; 152, 333 и 334; 152, 333 и 360; 152, 333 и 375; 152, 333 и 392; 152, 334 и 360; 152, 334 и 375; 152, 334 и 392; 152, 360 и 375; 152, 360 и 392; 152, 375 и 392; 171, 174 и 258; 171, 174 и 292; 171, 174 и 333; 171, 174 и 334; 171, 174 и 360; 171, 174 и 375; 171, 174 и 392; 171, 258 и 292; 171, 258 и 333; 171, 258 и 334; 171, 258 и 360; 171, 258 и 375; 171, 258 и 392; 171, 292 и 333; 171, 292 и 334; 171, 292 и 360;

171, 292 и 375; 171, 292 и 392; 171, 333 и 334; 171, 333 и 360; 171, 333 и 375; 171, 333 и 392; 171, 334 и 360; 171, 334 и 392; 171, 360 и 375; 171, 360 и 392; 171, 375 и 392; 174, 258 и 292; 174, 258 и 333; 174, 258 и 334; 174, 258 и 360; 174, 258 и 375; 174, 258 и 392; 174, 292 и 333; 174, 292 и 334; 174, 292 и 360; 174, 292 и 375; 174, 292 и 392; 174, 333 и 334; 174, 333 и 360; 174, 333 и 375; 174, 333 и 392; 174, 334 и 360; 174, 334 и 375; 174, 334 и 392; 174, 360 и 375; 174, 360 и 392; 174, 375 и 392; 258, 292 и 333; 258, 292 и 334; 258, 292 и 360; 258, 292 и 375; 258, 292 и 392; 258, 333 и 360; 258, 333 и 375; 258, 333 и 392; 258, 334 и 360; 258, 334 и 375; 258, 334 и 392; 258, 360 и 375; 258, 360 и 392; 258, 375 и 392; 292, 333 и 334; 292, 333 и 360; 292, 333 и 375; 292, 333 и 392; 292, 334 и 360; 292, 334 и 375; 292, 334 и 392; 292, 360 и 375; 292, 360 и 392; 292, 375 и 392; 333, 334 и 360; 333, 334 и 375; 333, 334 и 392; 333, 360 и 375; 333, 360 и 392; 333, 375 и 392; 334, 360 и 375; 334, 360 и 392; или 360, 375 и 392 тяжелой цепи.

В варианте осуществления, иммуноконъюгат изобретения содержит модифицированное антитело или фрагмент этого антитела и фрагмент лекарственного средства, где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит замену четырех аминокислот на цистеин в его константной области, выбранных из положений 152, 333, 375 и 392; или 152, 334, 375 и 392 тяжелой цепи.

В конкретном варианте осуществления, настоящее изобретение предоставляет иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело или фрагмент этого антитела, и фрагмент лекарственного средства, где указанное модифицированное антитело или фрагмент этого антитела содержит SEQ ID NO: 2, 3, 9, 11, 12, 13, 14, 16, 21, 25, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 38, 39, 40, 43, 44, 45, 46, 47, 51, 53, 54, 56, 57 или 60. В еще одном конкретном варианте осуществления, настоящее изобретение предоставляет иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело или фрагмент этого антитела, и фрагмент лекарственного средства, где указанное модифицированное антитело или фрагмент этого антитела содержит SEQ ID NO: 6, 7, 8, 15, 19, 20, 22, 23, 24, 27, 36, 37, 41, 49, 52, 55, 58 или 59.

В еще одном варианте осуществления, настоящее изобретение предоставляет иммуноконъюгаты, содержащие модифицированное антитело или фрагмент этого антитела, и фрагмент лекарственного средства, где указанное модифицированное антитело или фрагмент этого антитела содержит замену одной или более аминокислот (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) в их константной области легкой цепи, выбранных из положений, идентифицированных в табл. 2. В конкретном варианте осуществления, настоящее изобретение предоставляет иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело или фрагмент этого антитела и фрагмент лекарственного средства, где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит замену одной или более аминокислот на цистеин в их константной области, выбранных из положений 107, 108, 142, 145, 159, 161 и 165 легкой цепи, где указанная легкая цепь представляет собой каппа легкую цепь человека. Например, иммуноконъюгат изобретения содержит модифицированное антитело или фрагмент этого антитела и фрагмент лекарственного средства, где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит замену двух аминокислот на цистеин в его константной области, выбранных из положений 107 и 108; 107 и 142; 107 и 145; 107 и 159; 107 и 161; 107 и 165; 108 и 142; 108 и 145; 108 и 159; 108 и 161; 108 и 165; 142 и 145; 142 и 159; 142 и 161; 142 и 165; 145 и 159; 145 и 161; 145 и 165; 159 и 161; 159 и 165; 161 и 165 легкой цепи, где указанная легкая цепь представляет собой каппа легкую цепь человека. В еще одном варианте осуществления, иммуноконъюгат изобретения содержит модифицированное антитело или фрагмент этого антитела и фрагмент лекарственного средства, где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит замену трех аминокислот на цистеин в их константной области, выбранных из положений 107, 108 и 142; 107, 108 и 145; 107, 108 и 159; 107, 108 и 161; 107, 108 и 165; 107, 142 и 145; 107, 142 и 159; 107, 142 и 161; 107, 142 и 165; 107, 145 и 159; 107, 145 и 161; 107, 145 и 165; 107, 159 и 161; 107, 159 и 165; 107, 161 и 165; 108, 142 и 145; 108, 142 и 159; 108, 142 и 161; 108, 142 и 165; 108, 145 и 159; 108, 145 и 161; 108, 145 и 165; 108, 159 и 161; 108, 159 и 165; 108, 161 и 165; 142, 145 и 159; 142, 145 и 161; 142, 145 и 165; 142, 159 и 161; 142, 159 и 165; 142, 161 и 165; 145, 159 и 161; 145, 159 и 165; 145, 161 и 165; или 159, 161 и 165 легкой цепи, где указанная легкая цепь представляет собой каппа легкую цепь человека.

В конкретном варианте осуществления, настоящее изобретение предоставляет иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело или фрагмент этого антитела, и фрагмент лекарственного средства, где указанное модифицированное антитело или фрагмент этого антитела содержит SEQ ID NO: 63, 65, 68, 70, 72, 73, 74, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 86, 87 или 88. В еще одном конкретном варианте осуществления, настоящее изобретение предоставляет иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело или фрагмент этого антитела, и фрагмент лекарственного средства, где указанное модифицированное антитело или фрагмент этого антитела содержит SEQ ID NO: 64, 66, 67, 84, 85 или 89, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 70, 72, 73, 74, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88 или 89.

В еще одном варианте осуществления, настоящее изобретение предоставляет иммуноконъюгаты, содержащие модифицированное антитело или фрагмент этого антитела, и фрагмент лекарственного средства, где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит замену одной или более аминокислот в их константной области легкой цепи, выбранных из положений, идентифицированных в табл. 3. В конкретном варианте осуществления, настоящее изобретение предоставляет иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело или фрагмент этого антитела и фрагмент ле-

ловеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 258 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 163 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 258 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 168 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 292 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 143 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 292 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 147 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 292 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 159 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 292 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 163 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 292 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 168 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 333 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 143 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 333 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 147 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 333 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 159 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 333 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 163 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 333 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 334 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 143 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 334 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 147 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 334 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 159 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 334 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 163 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 334 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 168 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 360 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 143 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 360 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 147 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 360 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 159 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 360 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 163 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 360 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 168 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 375 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 143 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 375 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 147 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 375 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 159 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 375 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 163 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 375 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 168 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 392 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 143 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 392 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 147 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 392 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 159 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 392 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 163 человеческой лямбда легкой цепи; или Cys-замену в положении 392 тяжелой цепи, и Cys-замену в положении 168 человеческой лямбда легкой цепи.

В варианте осуществления изобретения, аминокислотная замена, описанная в данном документе, представляет собой цистеин, содержащий тиольную группу. В нескольких аспектах изобретения, тиольную группу используют для химической конъюгации, и ее присоединяют к линкерному блоку (LU) и/или фрагменту лекарственного средства. В нескольких вариантах осуществления, иммуноконъюгаты изобретения содержат фрагмент лекарственного средства, выбранный из группы, состоящей из ингибитора V-ATФазы, ингибитора HSP90, ингибитора IAP, ингибитора mTor, стабилизатора микротрубочек, дестабилизаторов микротрубочек, ауристатины, доластатины, майтансиноида, MetAP (метионинаминопептидазы), ингибитора ядерного экспорта белков CRM1, ингибитора DPPIV, ингибиторов протеасом, ингибиторов реакций переноса фосфорила в митохондриях, ингибитора синтеза белка, ингибитора киназы, ингибитора CDK2, ингибитора CDK9, ингибитора кинезина, ингибитора HDAC, средства, повреждающего ДНК, ДНК-алкилирующего средства, интеркалятора ДНК, связывающего малой бороздки ДНК и ингибитора DHFR. В нескольких вариантах осуществления, иммуноконъюгаты изобретения содержат фрагмент лекарственного средства, который представляет собой средство против злокачественных новообразований. Модифицированное антитело или фрагменты антитела настоящего изобретения могут иметь любые форматы, известные в данной области, такие как моноклональное, химерное, гуманизированное, полностью человеческое, биспецифичное или мультиспецифичное антитело или фрагмент этого антитела.

В соответствии с настоящим изобретением, тяжелая цепь и/или легкая цепь модифицированного антитела (или фрагмента этого антитела) может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более замены на цистеин в их константных областях. В одном варианте осуществления, модифицированные антитела или фрагменты антител содержат 2, 4, 6, 8 или более замен на цистеин в их константных областях. В нескольких вариантах осуществления, модифицированное антитело, фрагмент антитела или их иммуноконъюгат содержит 2 или 4 Cys-замены.

В одном варианте осуществления, исходное антитело (антитело без замены на цистеин) представляет собой антитело IgG, IgM, IgE или IgA. В конкретном варианте осуществления, исходное антитело антитело IgG1. В еще одном конкретном варианте осуществления, исходное антитело представляет собой антитело IgG2, IgG3 или IgG4.

Настоящее изобретение также предоставляет модифицированные антитела или фрагменты этих антител, содержащие замену одной или более аминокислот в их константной области тяжелой цепи, выбранных из положений, идентифицированных в табл. 1. В нескольких вариантах осуществления, настоящее изобретение предоставляет модифицированные антитела или фрагменты этих антител, содержащие замену одной или более аминокислот в их константной области легкой цепи, выбранных из положений, идентифицированных в табл. 2 или табл. 3.

В некоторых вариантах осуществления, модифицированные антитела или фрагменты антител, предоставленные в данном документе, метят, применяя способы изобретения в комбинации с другими способами конъюгации, известными в данной области, включающими, но не ограниченными перечисленным, химиоселективную конъюгацию через лизин, гистидин, тирозин, формил-глицин, пирролизин, пирролин-карбокси-лизин, неприродные аминокислоты, и белковые метки для фермент-опосредованной конъюгации (например, метки S6).

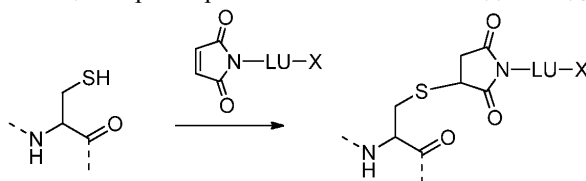
2. Химия конъюгации

Конъюгированное антитело или фрагмент этого антитела, предоставленные в данном документе, получают посредством посттрансляционной модификации по меньшей мере одного остатка цистеина, который был включен в антитело или фрагмент этого антитела, как описано выше, посредством сайт-специфичных способов введения метки. Конъюгированное антитело или фрагмент антитела могут быть получены посредством способов, известных в данной области для конъюгации полезной нагрузки, представляющей интерес с остатками цистеина, которые встречаются в белках в природе, и посредством способов, описанных для конъюгации с белками, сконструированными, чтобы содержать дополнительный остаток цистеина, заменяющий еще одну аминокислоту природной последовательности белка.

В некоторых вариантах осуществления модифицированные антитела или фрагмент этих антител, предоставленные в данном документе, конъюгируют, применяя известные способы, где введенный цистеин (Cys) конъюгируют с малеимидным производным, как на Схеме Ia ниже. Модифицированные антитела изобретения, которые проходят через данный тип конъюгации, содержат связь тиол-малеимид.

Схема Ia

Конъюгация через образование тиол-малеимидного аддукта

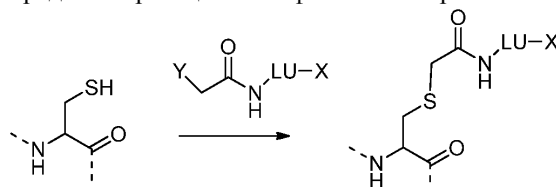


где LU представляет собой Линкерный Блок (LU), и X представляет собой полезную нагрузку или фрагмент лекарственного средства.

В других вариантах осуществления, Cys введенный в модифицированные антитела или фрагмент антитела конъюгируют посредством реакции с альфа-галогенкарбонильным соединением, таким как хлор-, бром- или йод-ацетамид, как показано на Схеме Ib ниже. Понимают, что другие уходящие группы, помимо галогена, такие как тозилат, трифлат и другие алкил- или арилсульфонаты, могут применяться в качестве уходящей группы Y. В то время как Схема Ib отображает реакцию Cys тиола с альфа-галогенацетамидом, способ включает любое алкилирование серы введенного Cys с группой Формулы Y-CHR-C(=O)-, где R представляет собой H или C₁₋₄алкил, Y представляет собой уходящую группу (обычно Cl, Br или I, и необязательно алкилсульфонат или арилсульфонат); она не ограничена амидами.

Схема Ib

Конъюгация посредством реакции с альфа-галогенкарбонильным соединением

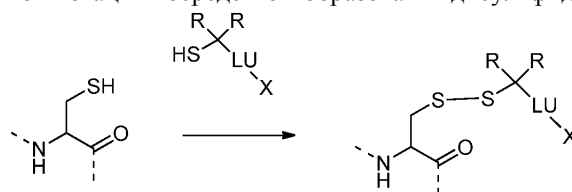


Y представляет собой уходящую группу (Cl, Br, I, OTs, OTf и т.п.);
LU представляет собой линкерный блок;
X представляет собой полезную нагрузку или фрагмент лекарственного средства.

Альтернативно, Cys, введенный в модифицированные антитела или фрагмент антитела, может быть конъюгирован посредством реакции с внешним тиолом при условиях, которые индуцируют образование дисульфидной связи между внешним тиолом и атомом серы введенного остатка цистеина, как показано на Схеме Ic ниже. В этих примерах, R может представлять собой H; однако, было обнаружено, что соединения, где одна или обе R группы представляют алкильную группу, например, Метил, увеличивают стабильность дисульфида.

Схема 1с

Конъюгация посредством образования дисульфида



каждый R представляет независимо H или C₁₋₄ алкил;
 LU представляет собой линкерный блок;
 X представляет собой полезную нагрузку или фрагмент лекарственного средства.

Посредством лишь примера, такие пост-трансляционные модификации иллюстрируются на Схемах (Ia)-(Ic) выше, где исходная структура представляет цистеин, введенный в легкую цепь или тяжелую цепь антитела на одном из специфичных участков, идентифицированных в данном документе. Способы выполнения каждого из этих способов конъюгации являются хорошо известными в данной области. Антитело может быть модифицировано посредством этих методов в его легких цепях, или его тяжелых цепях или как в легких, так и тяжелых цепях. Антитело, в котором каждая легкая цепь или каждая тяжелая цепь были модифицированы, чтобы содержать одиночный введенный цистеин, будут обычно содержать два участка конъюгации, так как антитело обычно содержит две легких и две тяжелых цепи.

При конъюгации, модифицированные антитела изобретения обычно содержат 1-12, часто 2-8, и предпочтительно 2, 4 или 6 фрагментов -LU-X (Линкерный Блок-Полезная нагрузка). В нескольких вариантах осуществления, легкую или тяжелую цепь антитела модифицируют, чтобы ввести два новых остатка Cys на двух из специфичных участков, идентифицированных в данном документе для Cys-замен (или альтернативно один Cys вводят в легкую цепь и одну в тяжелую цепь), так, что тетрамерное антитело в конечном счете содержит четыре участка конъюгации.

Аналогично, антитело может быть модифицировано посредством замены 3 или 4 из его нативных аминокислот на Cys на специфичных участках, идентифицированных в данном документе, в легкой цепи или тяжелой цепи или их комбинации, что приводит в результате к 6 или 8 участкам конъюгации в тетрамерном антителе.

X в этих конъюгатах представляет полезную нагрузку, которая может представлять собой любой химический фрагмент, который является применимым для присоединения антитела. В нескольких вариантах осуществления, X представляет собой фрагмент лекарственного средства, выбранный из цитотоксина, средства против злокачественных новообразований, противовоспалительного средства, противогрибкового средства, антибактериального средства, противопаразитарного средства, противовирусного средства, потенциатора иммунной системы, и анестезирующего средства или любого другого терапевтического или биологически активного фрагмента или фрагмента лекарственного средства. В других вариантах осуществления, X представляет собой метку, такую как биофизический зонд, флуорофор, аффинный зонд, спектроскопический зонд, радиоактивный зонд, спиновую метку или квантовую точку. В других вариантах осуществления, X представляет собой химический фрагмент, который модифицирует физико-химические свойства антитела такую как липидную молекулу, полиэтиленгликоль, полимер, полисахарид, липосому или хелатор. В других вариантах осуществления, X представляет собой функциональную или обнаруживаемую биомолекулу, такую как нуклеиновая кислота, рибонуклеиновая кислота, белок, пептид (например, фермент или рецептор), сахар или полисахарид, антитело или фрагмент антитела. В других вариантах осуществления, X представляет собой фиксирующий фрагмент, такой как наночастица, частица PLGA, или поверхность, или любой связывающий фрагмент для специфичного связывания конъюгата с еще одним фрагментом, таким как гистидиновая метка, поли-G, биотин, авидин, стрептавидин, и т.п. В других вариантах осуществления, X представляет собой реакционноспособную функциональную группу, которая может применяться для присоединения конъюгата антитела к еще одному химическому фрагменту, такому как фрагмент лекарственного средства, метка, еще одно антитело, еще один химический фрагмент, или поверхность.

Линкерный Блок (LU) может представлять собой любой подходящий химический фрагмент, который ковалентно присоединяет тиол-реакционноспособную группу (например, малеимид, альфа-галоген карбонил, винилкарбонил (например, акрилат или акриламид), винилсульфон, винилпиридина или тиол) к полезной нагрузке. Многие подходящие LU являются известными в данной области. Например, LU может состоять из одного, двух, трех, четырех, пяти, шести или более шести линкеров, называемых в данном документе L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ и L₆. В некоторых вариантах осуществления LU содержит линкер, выбранный из неферментативно расщепляемого линкера, нерасщепляемого линкера, ферментативно расщепляемого линкера, фото-стабильного линкера, фото-расщепляемого линкера или их любой комбинации, и LU необязательно содержит саморазрушающийся спэйсер.

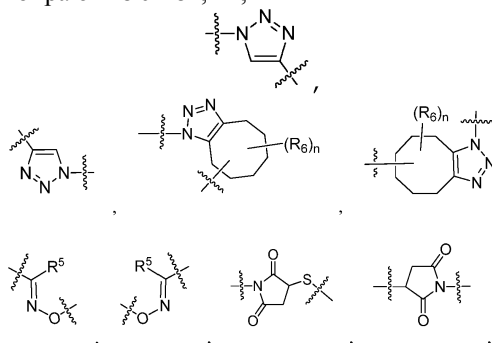
В нескольких вариантах осуществления, LU представляет собой группу формулы -L₁-L₂-L₃-L₄- или -L₁-L₂-L₃-L₄-L₅-L₆-. Связывающие группы L₁, L₂, L₃, L₄, L₅ и L₆ для применения в LU включают алкиле-

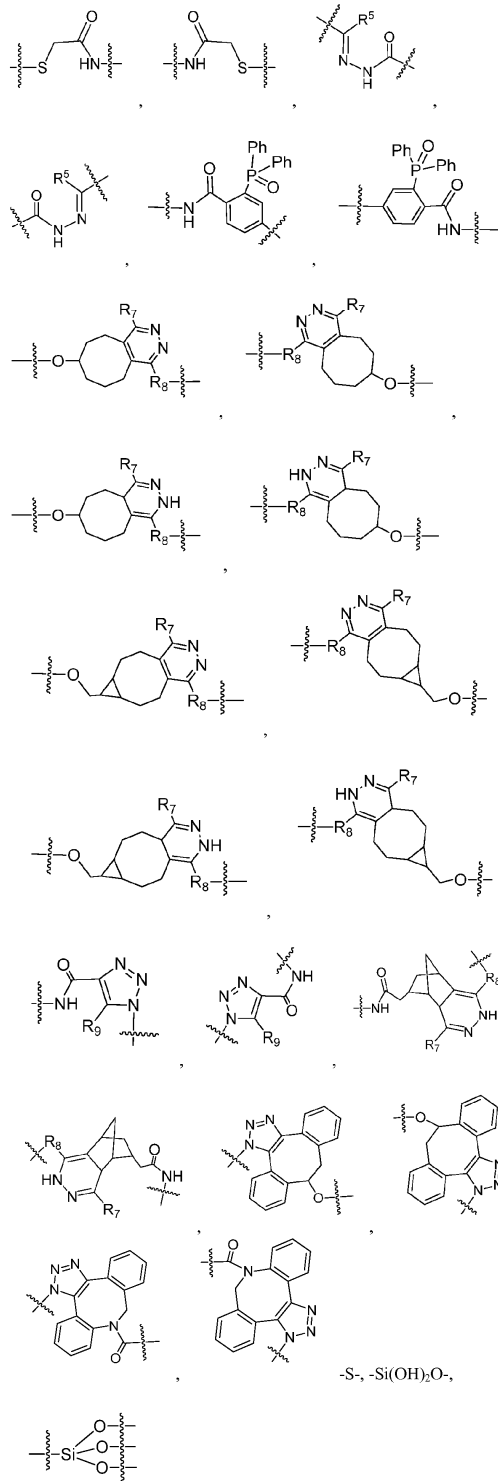
новые группы $-(\text{CH}_2)_n-$ (где n равно 1-20, обычно 1-10 или 1-6), блоки этиленгликоля $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-$ (где n равно 1-20, обычно 1-10 или 1-6), амиды $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-$ или $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-$, сложные эфиры $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ или $-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-$, кольца, имеющие две доступные точки присоединения, такие как дивалентный фенила, C_{3-8} циклоалкильные или C_{4-8} гетероциклические группы, аминокислоты $-\text{NH}-\text{CHR}^*-\text{C}(=\text{O})-$ или $-\text{C}(=\text{O})-\text{CHR}^*-\text{NH}-$, где R^* представляет собой боковую цепь известной аминокислоты (часто одной из канонических аминокислот, но также включающей например, норвалин, норлейцин, гомосерин, гомоцистеин, фенилглицин, цитруллин, и другие названные альфа-аминокислоты), полипептиды из известных аминокислот (например, дипептиды, трипептиды, тетрапептиды, и т.д.), связи тиол-малеимид (от добавления $-\text{SH}$ к малеимиду), $-\text{S}-\text{CR}_2-$ и другие простые эфиры тиола, такие как $-\text{S}-\text{CR}_2-\text{C}(=\text{O})-$ или $-\text{C}(=\text{O})-\text{CR}_2-\text{S}-$, где R такой, как определено выше для Схемы Ic, $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$, и дисульфиды $(-\text{S}-\text{S}-)$, а также комбинации любых из перечисленных с другими линкерами, описанными ниже, например, связь, неферментативно расщепляемый линкер, нерасщепляемый линкер, ферментативно расщепляемый линкер, фото-стабильный линкер, фото-расщепляемый линкер или линкер, который содержит саморазрушающийся спайсер.

В нескольких вариантах осуществления, когда LU представляет собой $-\text{L}_1-\text{L}-\text{L}_3-\text{L}_4-\text{L}_5-\text{L}_6-$, L_1 , L_2 , L_3 , L_4 , L_5 и L_6 могут быть выбраны из:

$-\text{A}_1-$, $-\text{A}_1\text{X}^2-$ и $-\text{X}^2-$; где:

A_1 представляет собой $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{C}(\text{R}^4)_2)_n-$, $-(\text{O}(\text{CH}_2)_n)_m-$, $-(\text{O}(\text{C}(\text{R}^4)_2)_n)_m-$, $-(\text{CH}_2)_n\text{O}-$, $-(\text{C}(\text{R}^4)_2)_n\text{O}-$, $-(\text{CH}_2)_n\text{O}(\text{CH}_2)_n-$, $-(\text{C}(\text{R}^4)_2)_n\text{O}(\text{C}(\text{R}^4)_2)_n-$, $-(\text{CH}_2)_n\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$, $-(\text{C}(\text{R}^4)_2)_n\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$, $-(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(=\text{O})-$, $-(\text{C}(\text{R}^4)_2)_n\text{NHC}(=\text{O})-$, $-\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n-$, $-\text{NHC}(=\text{O})(\text{C}(\text{R}^4)_2)_n-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{S}-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{C}(\text{R}^4)_2)_n\text{S}-$, $-\text{S}(\text{CH}_2)_n\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$, $-\text{S}(\text{C}(\text{R}^4)_2)_n\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{C}(\text{R}^4)_2)_n\text{NHC}(=\text{O})(\text{C}(\text{R}^4)_2)_n-$, $-\text{C}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n-$, $-\text{C}(=\text{O})(\text{C}(\text{R}^4)_2)_n-$, $-(\text{CH}_2)_n\text{C}(=\text{O})-$, $-(\text{C}(\text{R}^4)_2)_n\text{C}(=\text{O})-$, $-(\text{CH}_2)_n(\text{O}(\text{CH}_2)_n)_m\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n-$, $-(\text{C}(\text{R}^4)_2)_n(\text{O}(\text{C}(\text{R}^4)_2)_n)_m\text{NHC}(=\text{O})(\text{C}(\text{R}^4)_2)_n-$, $-(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n-$, $-(\text{C}(\text{R}^4)_2)_n\text{NHC}(=\text{O})(\text{C}(\text{R}^4)_2)_n-$, $-(\text{CH}_2)_n\text{NH}((\text{CH}_2)_n\text{O})_m(\text{CH}_2)_n-$, $-(\text{C}(\text{R}^4)_2)_n\text{NH}((\text{C}(\text{R}^4)_2)_n\text{O})_m(\text{C}(\text{R}^4)_2)_n-$, $-(\text{O}(\text{CH}_2)_n)_m\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n-$ или $-(\text{O}(\text{C}(\text{R}^4)_2)_n)_m\text{NHC}(=\text{O})(\text{C}(\text{R}^4)_2)_n-$; каждый X^2 независимо выбирают из связи, R^8 ,





$C(=O)NH-$ и $-NHC(=O)-$;

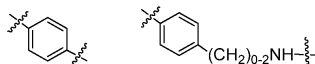
каждый R^4 независимо выбирают из H, C_{1-4} алкила, боковых цепей известных аминокислот, $-C(=O)OH$ и $-OH$,

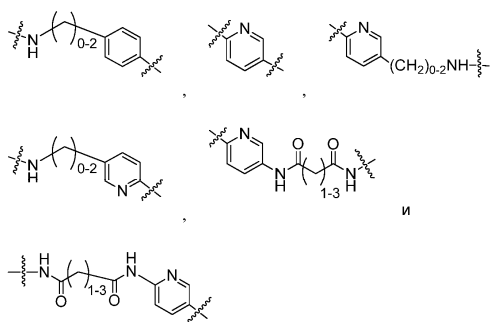
каждый R^5 независимо выбирают из H, C_{1-4} алкила, фенила или C_{1-4} алкила, замещенного 1-3 $-OH$ группами;

каждый R^6 независимо выбирают из H, фтора, бензилокси, замещенного $-C(=O)OH$, бензила, замещенного $-C(=O)OH$, C_{1-4} алкокси, замещенного $-C(=O)OH$ и C_{1-4} алкила, замещенного $-C(=O)OH$;

R^7 независимо выбирают из H, C_{1-4} алкила, фенила, пиримидина и пиридина;

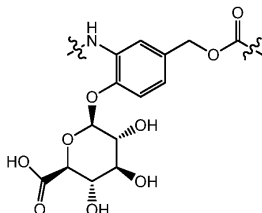
R^8 независимо выбирают из





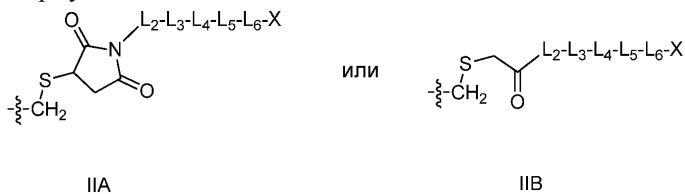
R^9 независимо выбирают из H и C_{1-6} галогеналкила;
каждое n независимо выбирают из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9, и
каждое m независимо выбирают из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9.

В нескольких вариантах осуществления, по меньшей мере один из L_1 , L_2 , L_3 , L_4 , L_5 и L_6 представляет собой стабильный или нерасщепляемый, линкер. В нескольких вариантах осуществления, по меньшей мере один из L_1 , L_2 , L_3 , L_4 , L_5 и L_6 представляет собой расщепляемый линкер, который может быть химически расщепляемым (гидразоны, дисульфиды) или ферментативно расщепляемым. В нескольких вариантах осуществления, ферментативно расщепляемый линкер представляет собой линкер, легко расщепляемый пептидазой: Val-Cit линкер (валин-цитруллин), дипептид из двух известных аминокислот, является одним таким линкером. В других вариантах осуществления, ферментативно расщепляемый линкер представляет собой линкер, который приводится в действие активностью глюкуронидазы.



является примером такого линкера, который также содержит саморазрушающийся спейсер, который разрушается самопроизвольно при физиологических условиях, как только глюкуронидаза расщепляет гликозидную связь.

В нескольких вариантах осуществления, иммуноконъюгат изобретения содержит модифицированный остаток цистеина Формулы IА или IВ:



где $-CH_2-S-$ представляет боковую цепь Cys, введенного на одном из выбранных участков Cys-замены, описанных в данном документе, и L_2-L_6 и X представляют связывающие группы и полезные нагрузки, соответственно, как дополнительно описано в данном документе. В нескольких вариантах осуществления IА, L_2 представляет собой связь. В нескольких вариантах осуществления IВ, L_2 является NH или O. В нескольких вариантах осуществления обоих IА и IВ, L_3 выбирают из $(CH_2)_{1-10}$ и $(CH_2CH_2O)_{1-6}$. L_4 , L_5 и L_6 представляют собой дополнительные необязательные линкеры, выбранные из линкеров, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления, L_6 может представлять собой карбонил (C=O) или линкер, который содержит саморазрушающийся спейсер.

В некоторых вариантах осуществления Линкерный Блок (LU) представляет собой $-L_1-L_2-L_3-L_4-$, где:

L_1 представляет собой связь, неферментативно расщепляемый линкер, нерасщепляемый линкер, ферментативно расщепляемый линкер, фото-стабильный линкер или фото-расщепляемый линкер;

L_2 представляет собой связь, неферментативно расщепляемый линкер, нерасщепляемый линкер, ферментативно расщепляемый линкер, фото-стабильный линкер или фото-расщепляемый линкер;

L_3 представляет собой связь, неферментативно расщепляемый линкер, нерасщепляемый линкер, ферментативно расщепляемый линкер, фото-стабильный линкер или фото-расщепляемый линкер, и

L_4 представляет собой связь, неферментативно расщепляемый линкер, нерасщепляемый линкер, ферментативно расщепляемый линкер, фото-стабильный линкер, фото-расщепляемый линкер или линкер, который содержит саморазрушающийся спейсер.

В некоторых вариантах осуществления Линкерный Блок (LU) представляет собой $-L_1-L_2-L_3-L_4-$, где

L_1 представляет собой неферментативно расщепляемый линкер, нерасщепляемый линкер, ферментативно расщепляемый линкер, фотостабильный линкер или фото-расщепляемый линкер;

L_2 представляет собой связь, неферментативно расщепляемый линкер, нерасщепляемый линкер, ферментативно расщепляемый линкер, фото-стабильный линкер или фото-расщепляемый линкер;

L_3 представляет собой связь, неферментативно расщепляемый линкер, нерасщепляемый линкер, ферментативно расщепляемый линкер, фото-стабильный линкер или фото-расщепляемый линкер, и

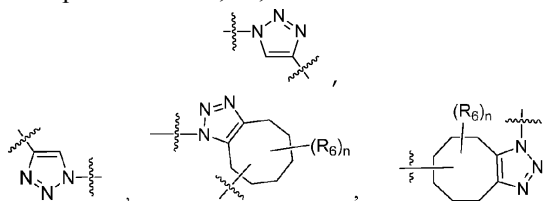
L_4 представляет собой связь, неферментативно расщепляемый линкер, нерасщепляемый линкер, ферментативно расщепляемый линкер, фото-стабильный линкер, фото-расщепляемый линкер или линкер, который содержит саморазрушающийся спэйсер.

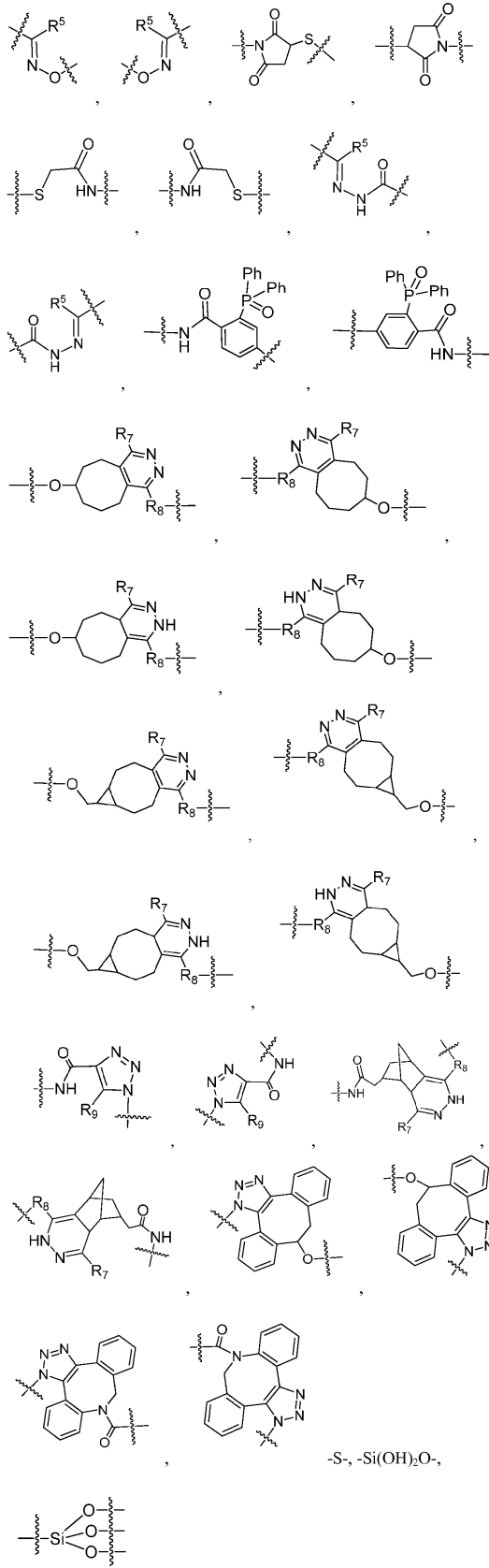
В нескольких из вариантов осуществления LU по меньшей мере один из L_1 , L_2 , L_3 , L_4 , L_5 и L_6 представляет собой расщепляемый линкер, и LU считают расщепляемым. Аналогично, в нескольких из вариантов осуществления LU по меньшей мере один из L_1 , L_2 , L_3 , L_4 , L_5 и L_6 представляет собой нерасщепляемый линкер. В некоторых из этих вариантов осуществления, каждый линкер из LU является нерасщепляемым, и LU считается нерасщепляемым.

В нескольких из вышеприведенных вариантов осуществления, где LU представляет собой $-L_1-L_2-L_3-L_4-$, по меньшей мере один из L_1 , L_2 , L_3 и L_4 представляет собой линкер, выбранный из

$-A_1-$, $-A_1X^2-$ и $-X^2-$; где:

A_1 представляет собой $-C(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$, $-(O(CH_2)_n)_m-$, $-(O(C(R^4)_2)_n)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m-$, $-((C(R^4)_2)_nO)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n-$, $-(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)-$, $-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)-$, $-NHC(=O)(CH_2)_n-$, $-NHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, $-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nS-$, $-S(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-S(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$, $-C(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)(C(R^4)_2)_n-$, $-(CH_2)_nC(=O)-$, $-(C(R^4)_2)_nC(=O)-$, $-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$, $-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n-$, $-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$ или $-(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$; каждый X^2 независимо выбирают из связи, R^8 ,





C(=O)NH- и -NHC(=O)-;

каждый R⁴ независимо выбирают из H, C₁₋₄алкила, боковых цепей известных аминокислот, -C(=O)ОН и -ОН,

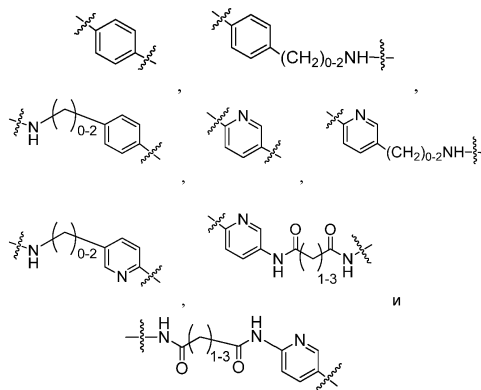
каждый R⁵ независимо выбирают из H, C₁₋₄алкила, фенила или C₁₋₄алкила, замещенного 1-3 -ОН группами;

каждый R⁶ независимо выбирают из H, фтора, бензилокси, замещенного -C(=O)ОН, бензила, заме-

щенного $-C(=O)OH$, C_{1-4} алкокси, замещенного $-C(=O)OH$ и C_{1-4} алкила, замещенного $-C(=O)OH$;

R^7 независимо выбирают из H, C_{1-4} алкила, фенила, пиримидина и пиридина;

R^8 независимо выбирают из



R^9 независимо выбирают из H и C_{1-6} галогеналкила;

каждое n независимо выбирают из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9, и

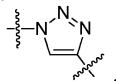
каждое m независимо выбирают из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9.

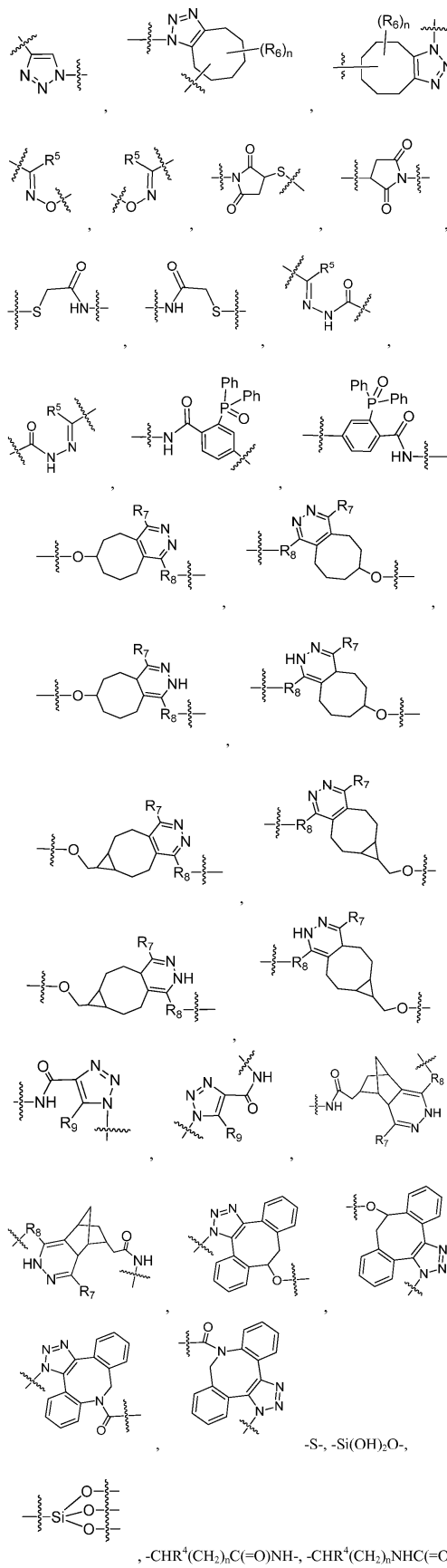
В этих вариантах осуществления, другие линкеры из LU независимо выбирают из связи, $-A^1-$, $-A_1X^2-$, $-X^2-$, ферментативно расщепляемого линкера, нерасщепляемого линкера, ферментативно расщепляемого линкера, фото-стабильного линкера, фото-расщепляемого линкера и линкера, который содержит саморазрушающийся спэйсер.

В некоторых вариантах осуществления Линкерный Блок (LU) представляет собой $-L_1-L_2-L_3-L_4-$, где L_1 представляет собой связь, $-A_1-$, $-A_1X^2-$ или $-X^2-$; где:

A_1 представляет собой $-C(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(C(R^4)_2)_n-$, $-(O(CH_2)_n)_m-$, $-(O(C(R^4)_2)_n)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m-$, $-((C(R^4)_2)_nO)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-(((C(R^4)_2)_nO)_mC(R^4)_2)_n-$, $-(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)-$, $-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)-$, $-NHC(=O)(CH_2)_n-$, $-NHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, $-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nS-$, $-S(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-S(C(R^4)_2)_nC(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$, $-C(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)(C(R^4)_2)_n-$, $-(CH_2)_nC(=O)-$, $-(C(R^4)_2)_nC(=O)-$, $-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(C(R^4)_2)_n(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(C(R^4)_2)_nNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$, $-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-(C(R^4)_2)_nNH((C(R^4)_2)_nO)_m(C(R^4)_2)_n-$, $-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$ или $-(O(C(R^4)_2)_n)_mNHC(=O)(C(R^4)_2)_n-$;

каждый X^2 независимо выбирают из связи, R^8





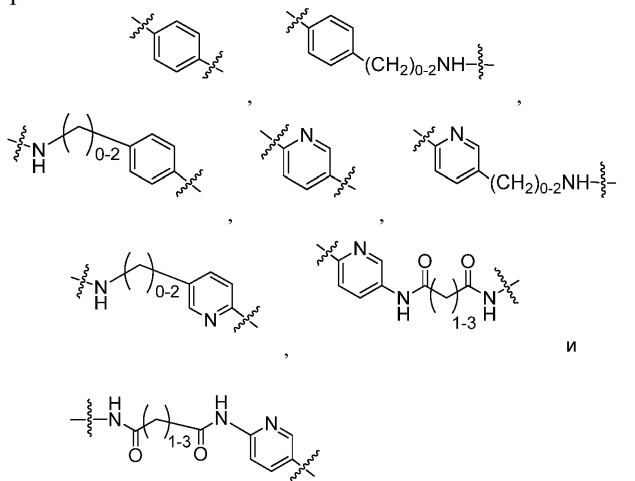
каждый R⁴ независимо выбирают из H, C₁₋₄алкила, боковых цепей известных аминокислот, -C(=O)ОН и -ОН,

каждый R⁵ независимо выбирают из H, C₁₋₄алкила, фенила или C₁₋₄алкила, замещенного 1-3 -ОН группами;

каждый R^6 независимо выбирают из H, фтора, бензилокси, замещенного $-C(=O)OH$, бензила, замещенного $-C(=O)OH$, C_{1-4} алкокси, замещенного $-C(=O)OH$ и C_{1-4} алкила, замещенного $-C(=O)OH$;

R^7 независимо выбирают из H, C_{1-4} алкила, фенила, пиримидина и пиридина;

R^8 независимо выбирают из



R^9 независимо выбирают из H и C_{1-6} галогеналкила;

каждое n независимо выбирают из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9, и

каждое m независимо выбирают из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9;

L_2 представляет собой связь, неферментативно расщепляемый линкер, нерасщепляемый линкер, ферментативно расщепляемый линкер, фото-стабильный линкер или фото-расщепляемый линкер;

L_3 представляет собой связь, неферментативно расщепляемый линкер, нерасщепляемый линкер, ферментативно расщепляемый линкер, фото-стабильный линкер или фото-расщепляемый линкер, и

L_4 представляет собой связь, неферментативно расщепляемый линкер, нерасщепляемый линкер, ферментативно расщепляемый линкер, фото-стабильный линкер, фото-расщепляемый линкер или линкер, который содержит саморазрушающийся спэйсер.

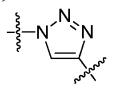
В некоторых вариантах осуществления, L_1 представляет собой $C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-CH_2CH_2-S-$, так, что LU представляет собой $-C(=O)-CH_2CH_2-NH-C(=O)-CH_2CH_2-S-L_2-L_3-L_4-$.

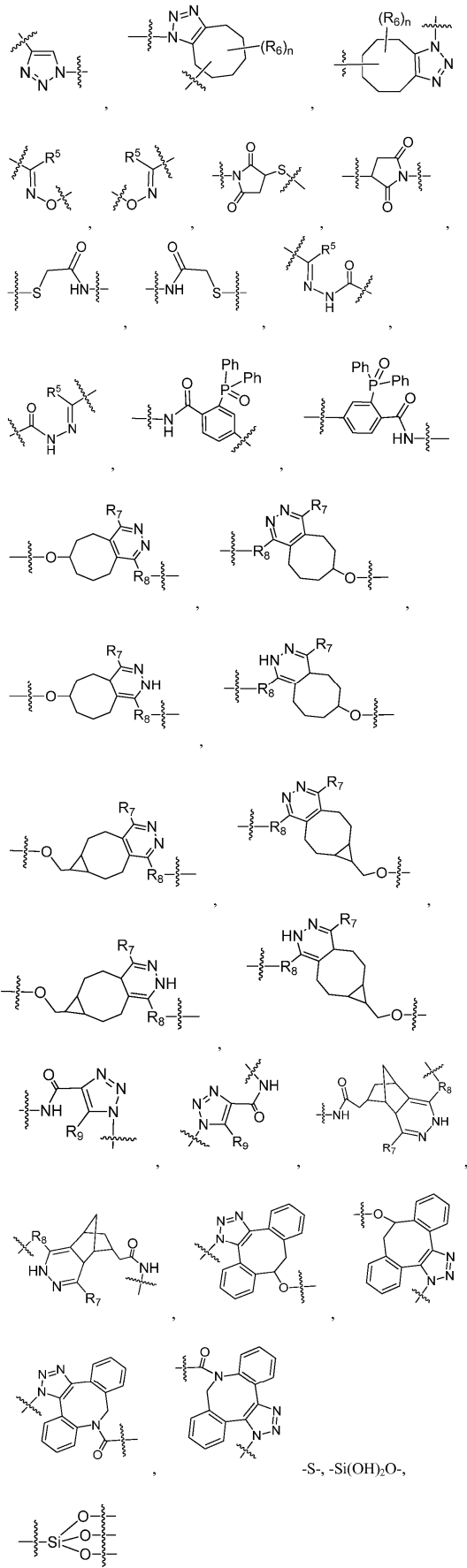
В некоторых вариантах осуществления Линкерный Блок (LU) представляет собой $-L_1-L_2-L_3-L_4-$, где

L_1 представляет собой связь, $-A_1-$, $-A_1X^2-$ или $-X^2-$; где:

A_1 представляет собой $-C(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_n-$, $-(O(CH_2)_n)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)-$, $-NHC(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, $-S(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nC(=O)-$, $-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$ или $-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$;

каждый X^2 независимо выбирают из связи, R^8





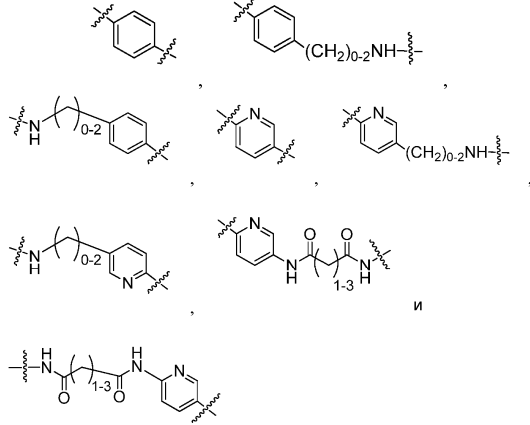
каждый R⁴ независимо выбирают из H, C₁₋₄алкила, боковых цепей известных аминокислот, -C(=O)OH и -OH,

каждый R^5 независимо выбирают из H, C_{1-4} алкила, фенила или C_{1-4} алкила, замещенного 1-3 -ОН группами;

каждый R^6 независимо выбирают из H, фтора, бензилокси, замещенного $-C(=O)OH$, бензила, замещенного $-C(=O)OH$, C_{1-4} алкокси, замещенного $-C(=O)OH$ и C_{1-4} алкила, замещенного $-C(=O)OH$;

R^7 независимо выбирают из H, C_{1-4} алкила, фенила, пиримидина и пиридина;

R^8 независимо выбирают из



R^9 независимо выбирают из H и C_{1-6} галогеналкила;

каждое n независимо выбирают из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9, и

каждое m независимо выбирают из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9;

L_2 представляет собой связь, неферментативно расщепляемый линкер, нерасщепляемый линкер, ферментативно расщепляемый линкер, фото-стабильный линкер или фото-расщепляемый линкер;

L_3 представляет собой связь, неферментативно расщепляемый линкер, нерасщепляемый линкер, ферментативно расщепляемый линкер, фото-стабильный линкер или фото-расщепляемый линкер;

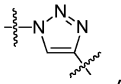
L_4 представляет собой связь, неферментативно расщепляемый линкер, нерасщепляемый линкер, ферментативно расщепляемый линкер, фото-стабильный линкер, фото-расщепляемый линкер или линкер, который содержит саморазрушающийся спэйсер.

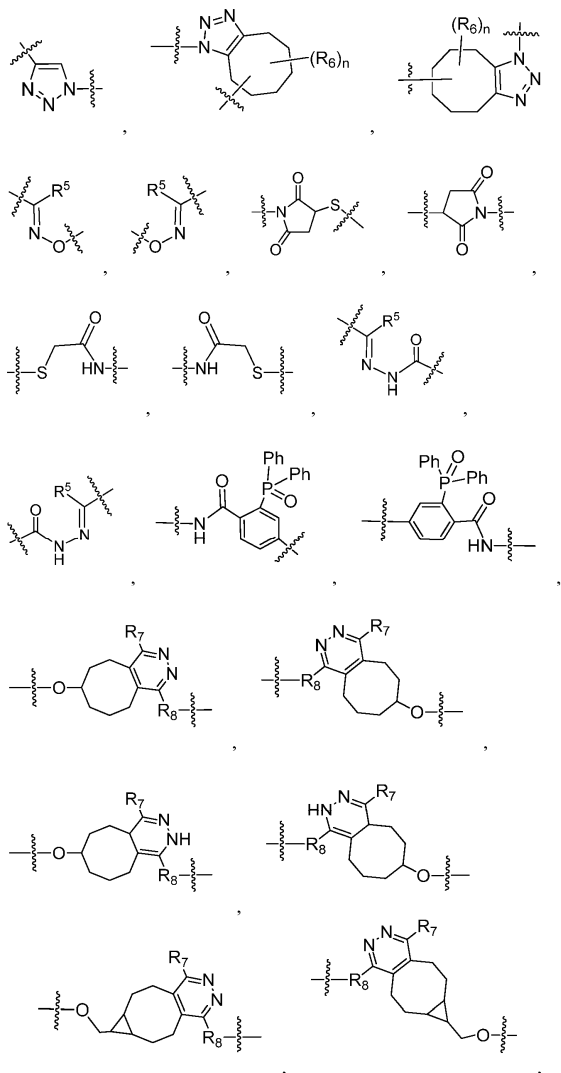
В некоторых вариантах осуществления Линкерный Блок (LU) представляет собой $-L_1-L_2-L_3-L_4-$, где

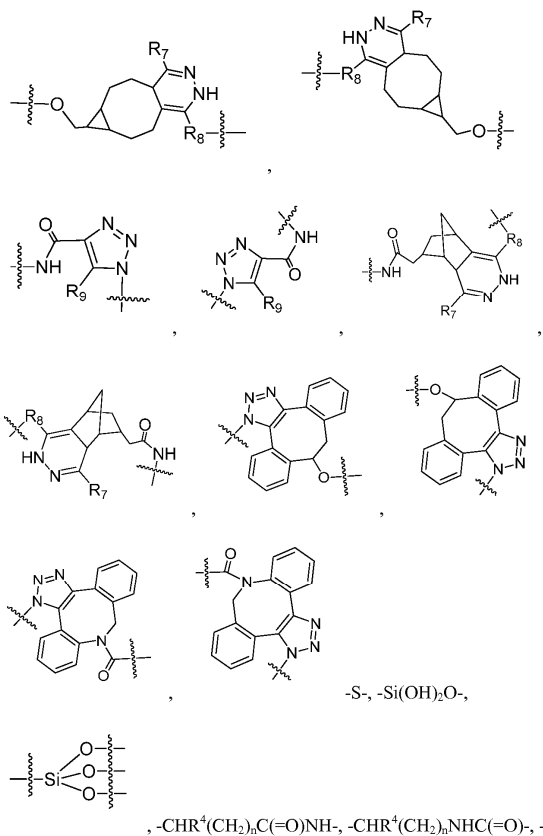
L_1 представляет собой связь, $-A_1-$, $-A_1X^2-$ или $-X^2-$; где:

A_1 представляет собой $-C(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, $-(O(CH_2)_n)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-NHC(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$ или $-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$;

каждый X^2 независимо выбирают из связи, R^8







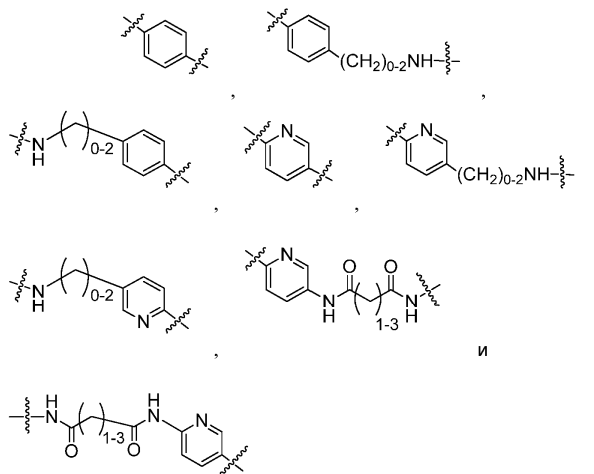
каждый R⁴ независимо выбирают из H, C₁₋₄алкила, боковых цепей известных аминокислот, -C(=O)OH и -OH,

каждый R⁵ независимо выбирают из H, C₁₋₄алкила, фенила или C₁₋₄алкила, замещенного 1-3 -OH группами;

каждый R⁶ независимо выбирают из H, фтора, бензилокси, замещенного -C(=O)OH, бензила, замещенного -C(=O)OH, C₁₋₄алкокси, замещенного -C(=O)OH и C₁₋₄алкила, замещенного -C(=O)OH;

R⁷ независимо выбирают из H, C₁₋₄алкила, фенила, пиримидина и пиридина;

R⁸ независимо выбирают из



R⁹ независимо выбирают из H и C₁₋₆галогеналкила;

каждое n независимо выбирают из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9, и

каждое m независимо выбирают из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9;

L₂ представляет собой связь, неферментативно расщепляемый линкер, нерасщепляемый линкер, ферментативно расщепляемый линкер, фото-стабильный линкер или фото-расщепляемый линкер;

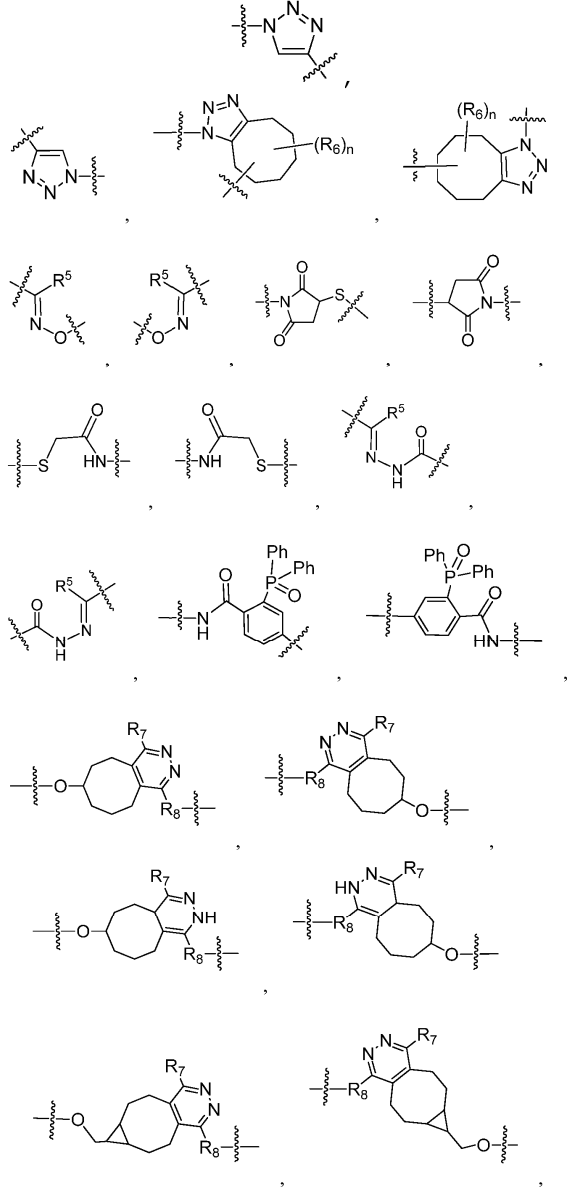
L₃ представляет собой связь, неферментативно расщепляемый линкер, нерасщепляемый линкер, ферментативно расщепляемый линкер, фото-стабильный линкер или фото-расщепляемый линкер, и

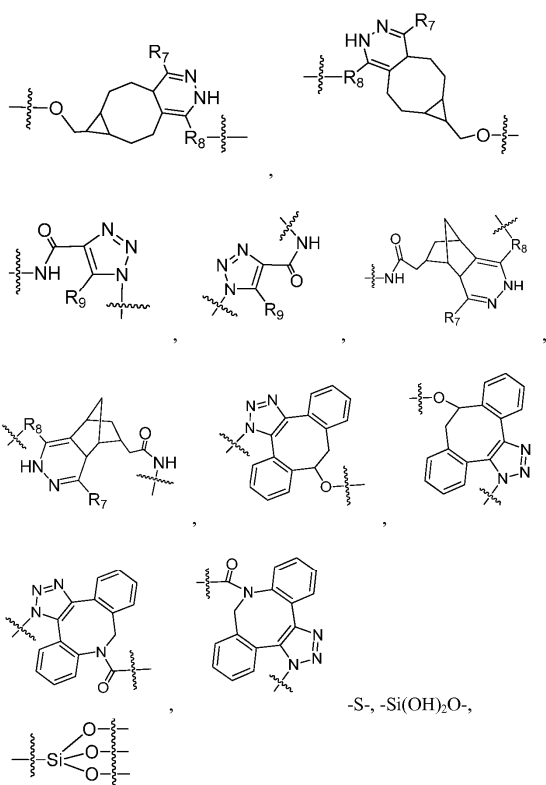
L₄ представляет собой связь, неферментативно расщепляемый линкер, нерасщепляемый линкер, ферментативно расщепляемый линкер, фото-стабильный линкер, фото-расщепляемый линкер или лин-

кер, который содержит саморазрушающийся спэйсер.

В некоторых вариантах осуществления Линкерный Блок (LU) представляет собой $-L_1-L_2-L_3-L_4-$, где L_1 представляет собой связь, $-A_1-$, $-A_1X^2-$ или $-X^2-$; где:

A_1 представляет собой $-C(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, $-(O(CH_2)_n)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-NHC(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$ или $-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$;
каждый X^2 независимо выбирают из связи, R^8





-S-, -Si(OH)₂O-,

, -CHR⁴(CH₂)_nC(=O)NH-, -CHR⁴(CH₂)_nNHC(=O)-,

C(=O)NH- and -NHC(=O)-;

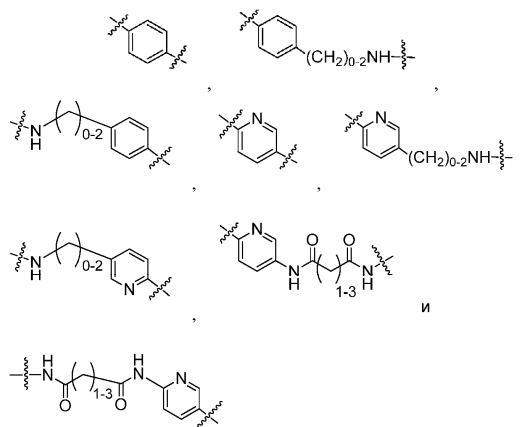
каждый R⁴ независимо выбирают из H, C₁₋₄алкила, боковых цепей известных аминокислот, -C(=O)OH и -OH,

каждый R⁵ независимо выбирают из H, C₁₋₄алкила, фенила или C₁₋₄алкила, замещенного 1-3 -OH группами;

каждый R⁶ независимо выбирают из H, фтора, бензилокси, замещенного -C(=O)OH, бензила, замещенного -C(=O)OH, C₁₋₄алкокси, замещенного -C(=O)OH и C₁₋₄алкила, замещенного -C(=O)OH;

R⁷ независимо выбирают из H, C₁₋₄алкила, фенила, пиримидина и пиридина;

R⁸ независимо выбирают из



и

R⁹ независимо выбирают из H и C₁₋₆галогеналкила;

каждое n независимо выбирают из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9, и

каждое m независимо выбирают из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9;

L₂ представляет собой связь, неферментативно расщепляемый линкер или нерасщепляемый линкер;

L₃ представляет собой связь, неферментативно расщепляемый линкер или нерасщепляемый линкер;

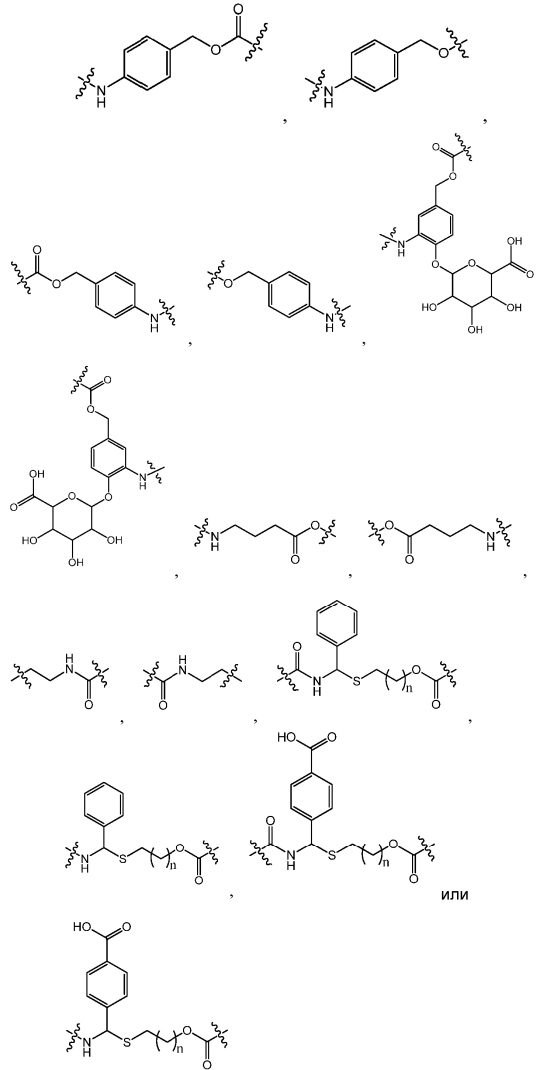
L₄ представляет собой связь, ферментативно расщепляемый линкер или линкер, который содержит саморазрушающийся спэйсер.

В некоторых вариантах осуществления Линкерный Блок (LU) представляет собой -L₁-L₂-L₃-L₄-, где L₁ представляет собой связь, -A₁-, -A₁X²- или -X²-;

L₂ представляет собой связь, -A₂- или -A₂X²-;

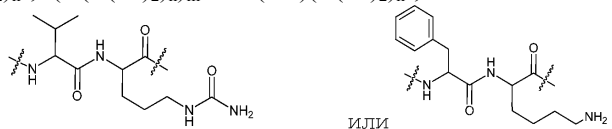
L₃ представляет собой связь, -A₃- или -A₃X²-;

L₄ представляет собой связь, -A₄-, -A₄X²-,

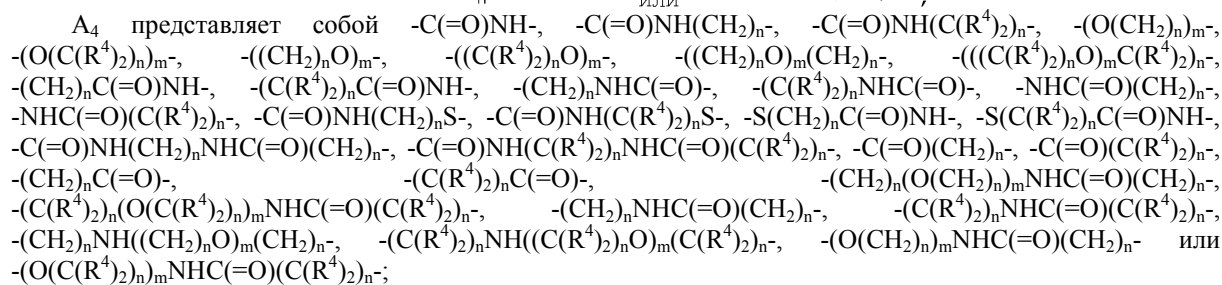
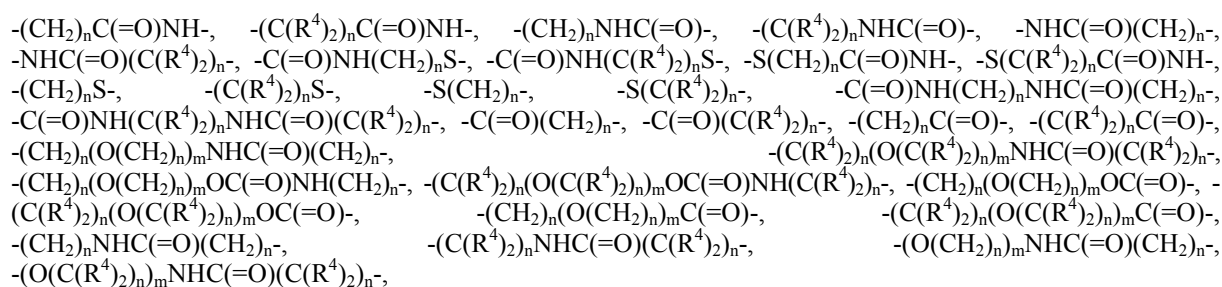


A₁ представляет собой -C(=O)NH-, -NHC(=O)-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -((C(R⁴)₂)_nO)_m-, -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_mC(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-, -S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNH((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n- или -(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-;

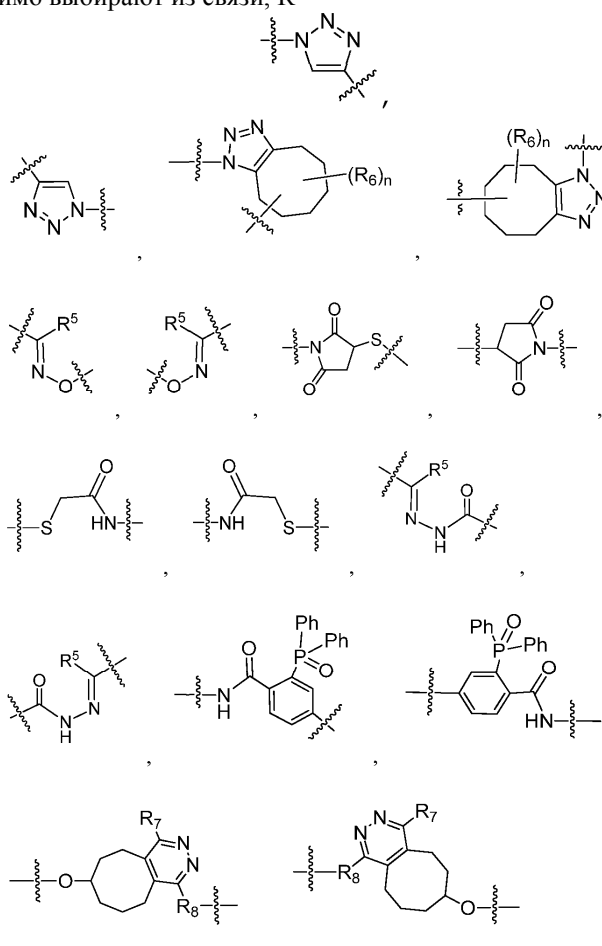
A₂ представляет собой -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -((C(R⁴)₂)_nO)_m-, -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -((C(R⁴)₂)_nO)_mC(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)NH-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)NR⁴-, -(CH₂)_nNHC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)-, -NHC(=O)(CH₂)_n-, -NHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)NH(CH₂)_nS-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nS-, -S(CH₂)_nC(=O)NH-, -S(C(R⁴)₂)_nC(=O)NH-, -(CH₂)_nS-, -(C(R⁴)₂)_nS-, -S(CH₂)_n-, -S(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNH-, -(C(R⁴)₂)_nNH-, -C(=O)NH(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -C(=O)(CH₂)_n-, -C(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nC(=O)-, -(C(R⁴)₂)_nC(=O)-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_n(O(CH₂)_n)_mOC(=O)NH(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_n(O(C(R⁴)₂)_n)_mOC(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNHC(=O)(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-, -(CH₂)_nNH((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(C(R⁴)₂)_nNH((C(R⁴)₂)_nO)_m(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_mNHC(=O)(CH₂)_n-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_mNHC(=O)(C(R⁴)₂)_n-;

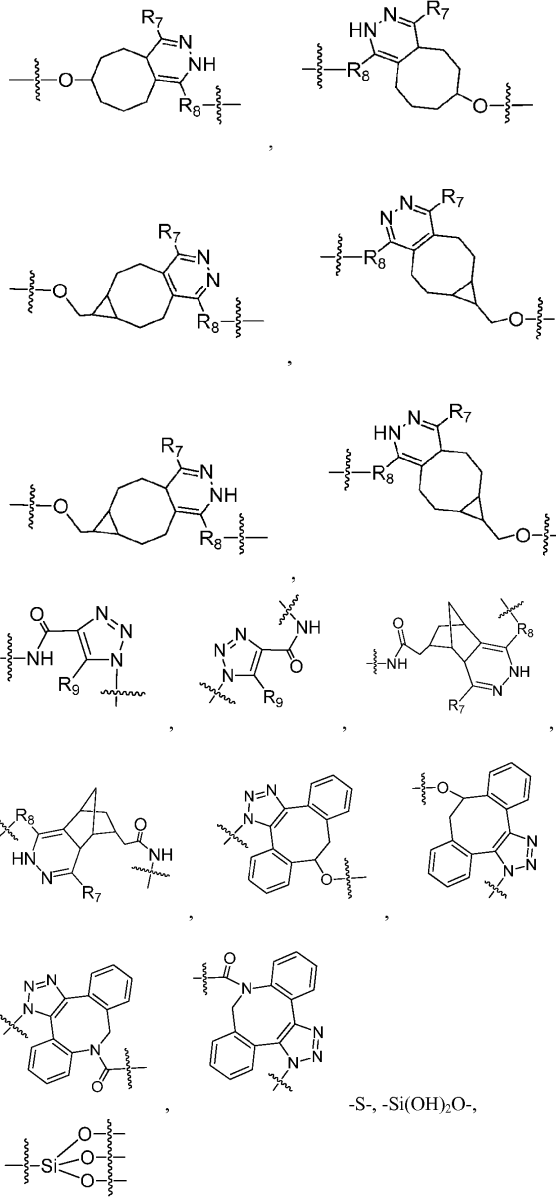


A₃ представляет собой -C(=O)NH-, -C(=O)NH(CH₂)_n-, -C(=O)NH(C(R⁴)₂)_n-, -(O(CH₂)_n)_m-, -(O(C(R⁴)₂)_n)_m-, -((CH₂)_nO)_m-, -((C(R⁴)₂)_nO)_m-, -((CH₂)_nO)_m(CH₂)_n-, -(((C(R⁴)₂)_nO)_mC(R⁴)₂)_n-,



каждый X^2 независимо выбирают из связи, R^8





-S-, -Si(OH)₂O-,

, -CHR⁴(CH₂)_nC(=O)NH-, -CHR⁴(CH₂)_nNHC(=O)-, -

C(=O)NH- и -NHC(=O)-;

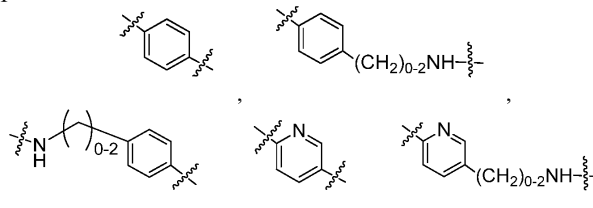
каждый R⁴ независимо выбирают из H, C₁₋₄алкила, боковых цепей известных аминокислот, -C(=O)OH и -OH,

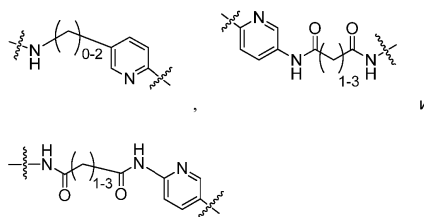
каждый R⁵ независимо выбирают из H, C₁₋₄алкила, фенила или C₁₋₄алкила, замещенного 1-3 -OH группами;

каждый R⁶ независимо выбирают из H, фтора, бензилокси, замещенного -C(=O)OH, бензила, замещенного -C(=O)OH, C₁₋₄алкокси, замещенного -C(=O)OH и C₁₋₄алкила, замещенного -C(=O)OH;

R⁷ независимо выбирают из H, C₁₋₄алкила, фенила, пиримидина и пиридина;

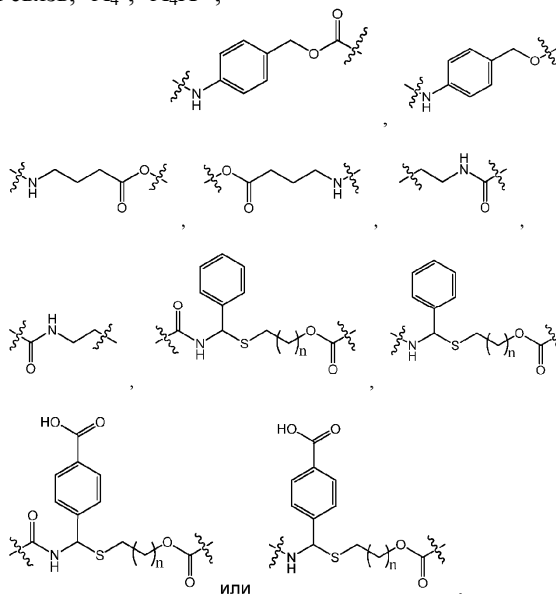
R⁸ независимо выбирают из





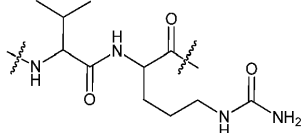
R^9 независимо выбирают из H и C_{1-6} галогеналкила;
каждое n независимо выбирают из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9, и
каждое m независимо выбирают из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9.

В некоторых вариантах осуществления Линкерный Блок (LU) представляет собой $-L_1-L_2-L_3-L_4-$, где
 L_1 представляет собой связь, $-A_1-$, $-A_1X^2-$ или $-X^2-$;
 L_2 представляет собой связь, $-A_2-$ или $-A_2X^2-$;
 L_3 представляет собой связь, $-A_3-$ или $-A_3X^2-$;
 L_4 представляет собой связь, $-A_4-$, $-A_4X^2-$,

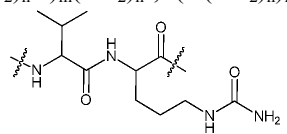


A_1 представляет собой $-C(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_n-$, $-(O(CH_2)_n)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-NHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, $-S(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nC(=O)-$, $-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$ или $-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$;

A_2 представляет собой $-C(=O)NH-$, $-(=O)NH(CH_2)_n-$, $-(O(CH_2)_n)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-NHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, $-S(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nC(=O)-$, $-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$ или

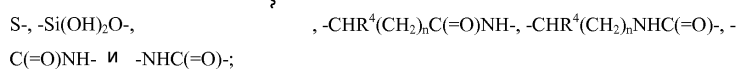
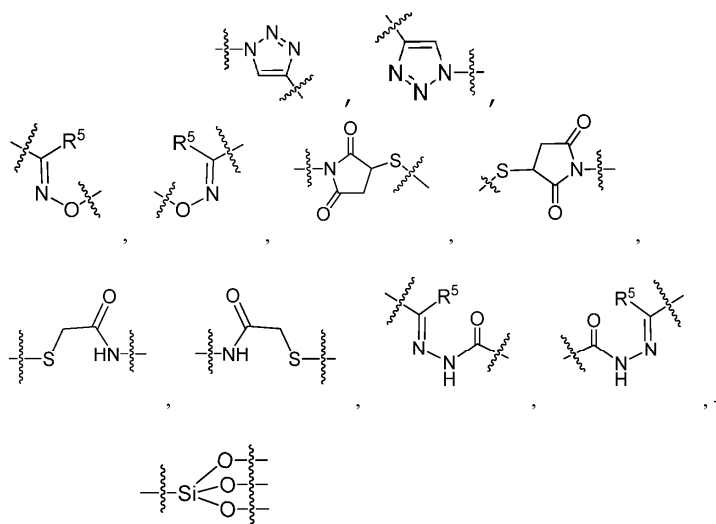


A_3 представляет собой $-C(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_n-$, $-(O(CH_2)_n)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-NHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, $-S(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nC(=O)-$, $-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$ или



A_4 $-C(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_n-$, $-(O(CH_2)_n)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m-$, $-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-NHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, $-S(CH_2)_nC(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-C(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nC(=O)-$, $-(CH_2)_n(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$ или $-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$;

каждый X^2 независимо выбирают из связи,



каждый R^4 независимо выбирают из H, C_{1-4} алкила, боковых цепей известных аминокислот, $-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$ и $-\text{OH}$,

каждый R^5 независимо выбирают из H, C_{1-4} алкила, фенила или C_{1-4} алкила, замещенного 1-3 $-\text{OH}$ группами;

каждое n независимо выбирают из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9, и

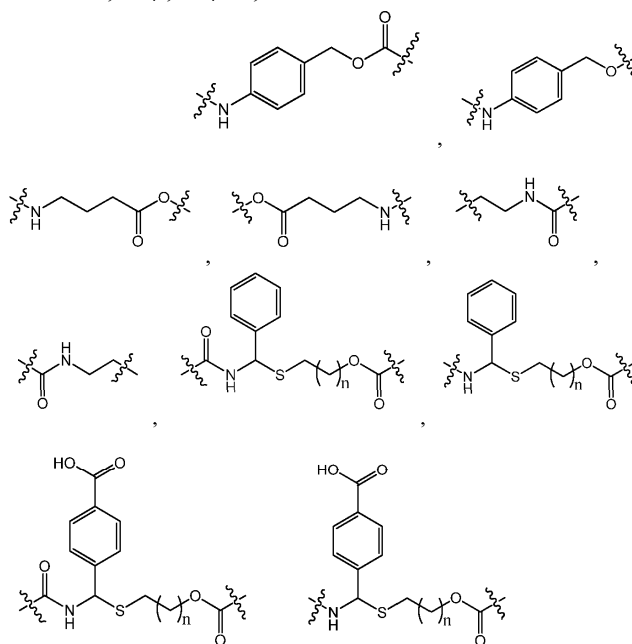
каждое m независимо выбирают из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9.

В некоторых вариантах осуществления Линкерный Блок (LU) представляет собой $-\text{L}_1-\text{L}_2-\text{L}_3-\text{L}_4-$, где L_1 представляет собой связь, $-\text{A}_1-$, $-\text{A}_1\text{X}^2-$ или $-\text{X}^2-$;

L_2 представляет собой связь, $-\text{A}_2-$ или $-\text{A}_2\text{X}^2-$;

L_3 представляет собой связь, $-\text{A}_3-$ или $-\text{A}_3\text{X}^2-$;

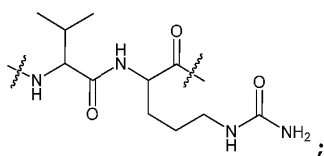
L_4 представляет собой связь, $-\text{A}_4-$, $-\text{A}_4\text{X}^2-$,



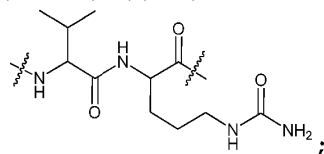
или

A_1 представляет собой $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{S}-$, $-(\text{O}(\text{CH}_2)_n)_m-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n-$, $-\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n-$, $-(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n-$, $-(\text{CH}_2)_n\text{NH}((\text{CH}_2)_n\text{O})_m(\text{CH}_2)_n-$ или $-(\text{O}(\text{CH}_2)_n)_m\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n-$;

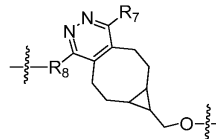
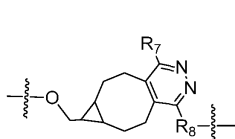
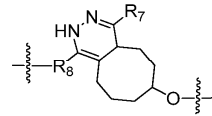
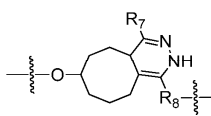
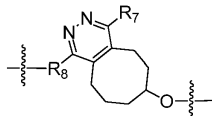
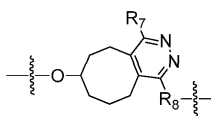
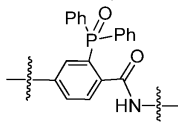
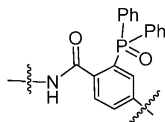
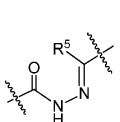
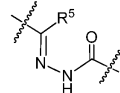
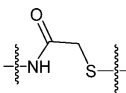
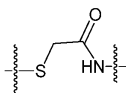
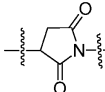
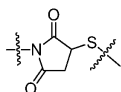
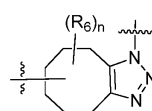
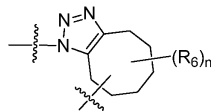
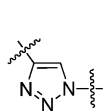
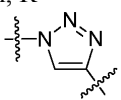
A_2 представляет собой $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{S}-$, $-(\text{O}(\text{CH}_2)_n)_m-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n-$, $-\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n-$, $-(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(=\text{O})-$, $-\text{C}(=\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n-$, $-(\text{CH}_2)_n\text{NH}((\text{CH}_2)_n\text{O})_m(\text{CH}_2)_n-$, $-(\text{O}(\text{CH}_2)_n)_m\text{NHC}(=\text{O})(\text{CH}_2)_n-$ или

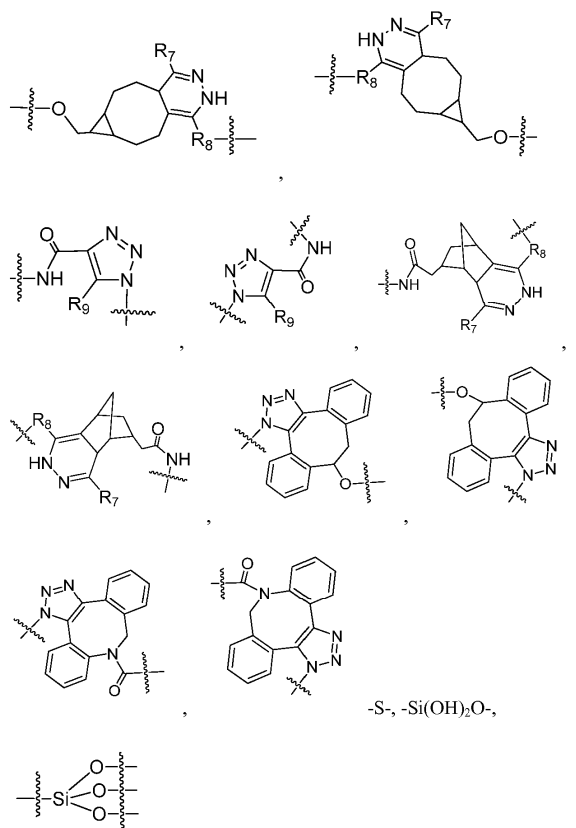


A_3 представляет собой $-C(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, $-(O(CH_2)_n)_m-$,
 $-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-NHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,
 $-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$ или



A_4 представляет собой $-C(=O)NH-$, $-C(=O)NH(CH_2)_n-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nS-$, $-(O(CH_2)_n)_m-$,
 $-((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$, $-NHC(=O)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nNHC(=O)-$, $-C(=O)NH(CH_2)_nNHC(=O)(CH_2)_n-$,
 $-(CH_2)_nNH((CH_2)_nO)_m(CH_2)_n-$ или $-(O(CH_2)_n)_mNHC(=O)(CH_2)_n-$;
 каждый X^2 независимо выбирают из связи, R^8





C(=O)NH- и -NHC(=O)-;

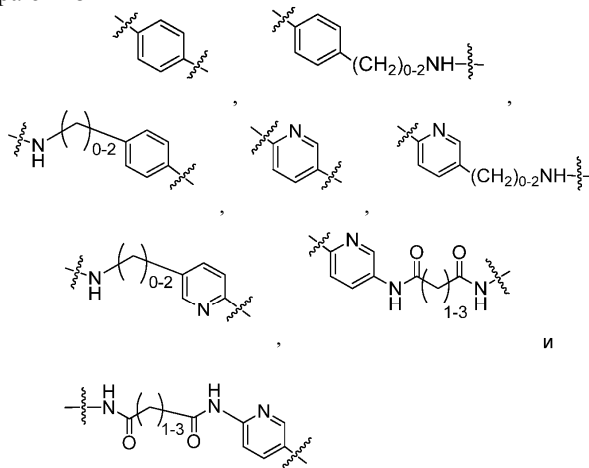
каждый R⁴ независимо выбирают из H, C₁₋₄алкила, боковых цепей известных аминокислот, -C(=O)OH и -OH,

каждый R⁵ независимо выбирают из H, C₁₋₄алкила, фенила или C₁₋₄алкила, замещенного 1-3 -OH группами;

каждый R⁶ независимо выбирают из H, фтора, бензилокси, замещенного -C(=O)OH, бензила, замещенного -C(=O)OH, C₁₋₄алкокси, замещенного -C(=O)OH и C₁₋₄алкила, замещенного -C(=O)OH;

R⁷ независимо выбирают из H, C₁₋₄алкила, фенила, пиримидина и пиридина;

R⁸ независимо выбирают из



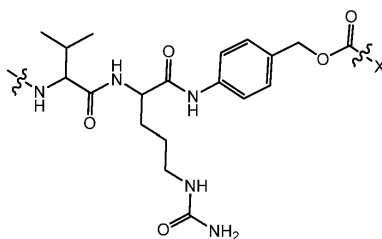
R⁹ независимо выбирают из H и C₁₋₆галогеналкила;

каждое n независимо выбирают из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9, и

каждое m независимо выбирают из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9.

В одном варианте осуществления, L₁ представляет собой -(CH₂)₁₋₁₀-C(=O)-, например, -(CH₂)₅-C(=O)-; и каждый из L₂, L₃ и L₄ представляет связь.

В некоторых вариантах осуществления LU содержит val-cit линкер данной формулы, в которой X представляет полезную нагрузку, обычно фрагмент лекарственного средства, такой как фрагмент, имеющий активность против злокачественных новообразований:



Когда L_4 - L_5 - L_6 представляет собой val-cit линкер, как показано выше, L_3 предпочтительно представляет собой $-(CH_2)_{2-6}-C(=O)-$.

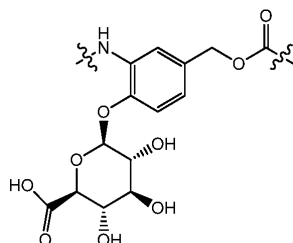
В некоторых вариантах осуществления X группа представляет собой майтансиноид, такой как DM1 или DM4, или аналог или производное доластатина, такое как доластатин 10 или 15, и ауристатины MMAF или MMAE, или калихеамицин, такой как N-ацетил- γ -калихеамицин, или метка или краситель, такой как родамин или тетраметилродамин.

Как применяют в данном документе, "линкер" представляет собой любой химический фрагмент, который способен к соединению антитела или его фрагмента с X группой (полезной нагрузкой) для образования иммуноконъюгата. Линкеры могут быть подвержены расщеплению, такому как расщепление, индуцируемое кислотой, расщепление, индуцируемое светом, расщепление, индуцируемое пептидазой, расщепление индуцируемое эстеразой, и расщепление дисульфидной связи, при условиях, в которых соединение или антитело остается активным. Альтернативно, линкеры могут быть по существу резистентными к расщеплению. Линкер может включать или может не включать саморазрушающийся спэйсер.

Неограничивающие примеры неферментативно расщепляемых линкеров, как применяют в данном документе, чтобы конъюгировать X^1 группу с модифицированными антителами или фрагментом этих антител, предоставленными в данном документе, включают кислотолабильные линкеры, линкеры, содержащие дисульфидный фрагмент, линкеры, содержащие триазольный фрагмент, линкеры, содержащие гидразоновый фрагмент, линкеры, содержащие тиоэфирный фрагмент, линкеры, содержащие диазо фрагмент, линкеры, содержащие оксимный фрагмент, линкеры, содержащие амидный фрагмент, и линкеры, содержащие ацетамидный фрагмент.

Неограничивающие примеры ферментативно расщепляемых линкеров, как применяют в данном документе, чтобы конъюгировать X группу с модифицированными антителами или фрагментами этих антител, предоставленными в данном документе, включают, но не ограничиваются перечисленным, линкеры, которые расщепляются протеазой, линкеры, которые расщепляются амидазой, и линкеры, которые расщепляются -глюкуронидазой или еще одной глюкозидазой.

В некоторых вариантах осуществления, такие расщепляемые ферментами линкеры представляют собой линкеры, которые расщепляются катепсином, включающим катепсин Z, катепсин В, катепсин Н и катепсин С. В некоторых вариантах осуществления ферментативно расщепляемый линкер представляет собой дипептид, расщепляемый катепсином, включающий дипептиды, расщепляемые катепсином Z, катепсином В, катепсином Н или катепсином С. В некоторых вариантах осуществления ферментативно расщепляемый линкер является катепсин В-расщепляемым пептидным линкером. В некоторых вариантах осуществления ферментативно расщепляемый линкер является катепсин В-расщепляемым дипептидным линкером. В некоторых вариантах осуществления ферментативно расщепляемый дипептидный линкер представляет собой валин-цитруллин или фенилаланин-лизин. Другие неограничивающие примеры ферментативно расщепляемых линкеров, как применяют в данном документе, для конъюгации X группы с модифицированными антителами или фрагментами этих антител, предоставленными в данном документе, включают, но не ограничиваются перечисленным, линкеры, которые расщепляются -глюкуронидазой, например,



См. Ducry et al, *Bioconjugate Chem*, (2010) vol. 21(1), 5-13.

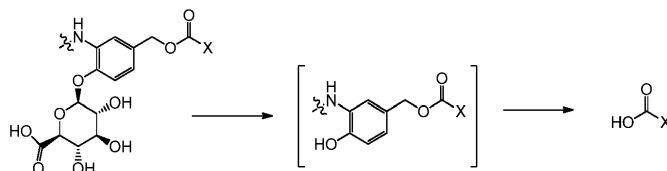
"Саморазрушающиеся спэйсеры" представляют собой бифункциональные химические фрагменты, ковалентно связанные по одному концу с первым химическим фрагментом и по другому концу со вторым химическим фрагментом, образуя посредством этого стабильную молекулу из трех частей. Линкер может содержать саморазрушающийся спэйсер, связанный с третьим химическим фрагментом, который является отщепляемым от спэйсера либо химически или ферментативно. При расщеплении связи между саморазрушающимся спэйсером и первым химическим фрагментом или третьим химическим фрагмен-

том, саморазрушающиеся спэйсеры претерпевают быстрые и самопроизвольные внутримолекулярные реакции и, таким образом, отделяются от второго химического фрагмента. Эти внутримолекулярные реакции обычно включают в себя электронные перегруппировки, такие как реакции 1,4, или 1,6, или 1,8 элиминирования или циклизации с образованием в высокой степени преимущественных пяти- или шестичленных колец. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения, первый или третий фрагмент представляет собой группу, расщепляемую ферментом, и это расщепление является результатом ферментативной реакции, в то время как в других вариантах осуществления первый или третий фрагмент является кислотолabileй группой, и это расщепление происходит вследствие изменения pH. В применении к настоящему изобретению, второй фрагмент представляет собой группу "Полезной нагрузки", определенную в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, отщепление первого или третьего фрагмента от саморазрушающегося спэйсера является результатом расщепления под действием протеолитического фермента, в то время как в других вариантах осуществления оно является результатом расщепления гидролазой. В некоторых вариантах осуществления, отщепление первого или третьего фрагмента от саморазрушающегося спэйсера является результатом расщепления катепсиновым ферментом или глюкуронидазой.

В некоторых вариантах осуществления, расщепляемый ферментом линкер представляет собой пептидный линкер, а спэйсер ковалентно связан по одному из его концов с пептидным линкером и ковалентно связан с его другому концу с фрагментом лекарственного средства. Эта молекула из трех частей является стабильной и фармакологически неактивной в отсутствие фермента, но является ферментативно расщепляемой посредством фермента по связи, ковалентно связывающей спэйсерный фрагмент и пептидный фрагмент. Пептидный фрагмент отщепляется от молекулы из трех частей, что инициирует саморазрушающуюся природу спэйсерного фрагмента, приводя к самопроизвольному расщеплению связи, ковалентно связывающей спэйсерный фрагмент с фрагментом лекарственного средства, чтобы, таким образом, воздействовать на высвобождение лекарственного средства в фармакологически активной форме.

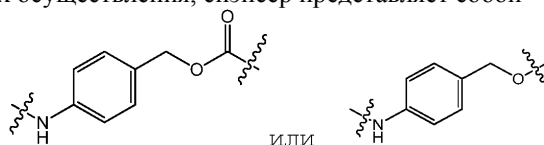
В других вариантах осуществления, линкер содержит саморазрушающийся спэйсер, который соединяется с пептидом, либо непосредственно или опосредованно по одному концу, и с полезной нагрузкой по другому концу; и спэйсер присоединяется к третьему фрагменту, который может отщепляться от спэйсера ферментативно, таким образом, как под действием глюкуронидазы. При отщеплении третьего фрагмента, спэйсер разрушается или перегруппировывается таким путем, который вызывает высвобождение полезной нагрузки. Примером линкера с данным типом саморазрушающегося спэйсера является этот расщепляемый глюкуронидазой линкер, где гидролиз ацеталя, катализируемый глюкуронидазой, высвобождает фенольное соединение, которое самопроизвольно разлагается при физиологических условиях:



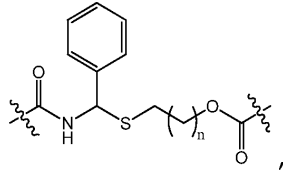
Неограничивающие примеры саморазрушающегося спэйсера, необязательно применяемого при конъюгации группы X^1 с модифицированными антителами или фрагментами этих антител, представленными в данном документе, включают, но не ограничиваются перечисленным, фрагменты, которые включают бензилкарбонильный фрагмент, бензилэфирный фрагмент, 4-аминобутиратный фрагмент, гемитиоаминовый фрагмент или N-ацилгемитиоаминовый фрагмент.

Другие примеры саморазрушающихся спэйсеров включают, но не ограничиваются перечисленным, p-аминобензилоксикарбонильные группы, ароматические соединения, которые являются электронно сходными с p-аминобензилоксикарбонильной группой, такие как производные 2-аминоимидазол-5-метанола и орто или пара-аминобензилацетали. В некоторых вариантах осуществления, саморазрушающиеся спэйсеры, применяемые в данном документе, которые претерпевают циклизацию при гидролизе амидной связи, включают замещенные и незамещенные амиды 4-аминомасляной кислоты и амиды 2-аминофенилпропионовой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления, спэйсер представляет собой

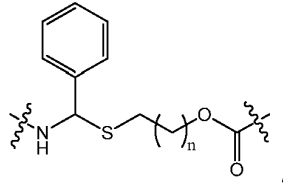


в то время как в других вариантах осуществления спэйсер представляет собой



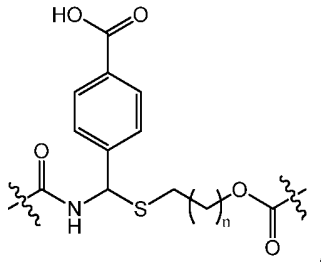
где n равно 1 или 2.

В других вариантах осуществления спэйсер представляет собой



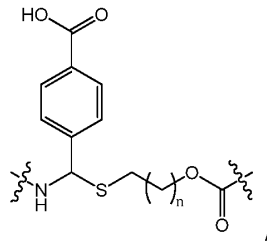
где n равно 1 или 2.

В других вариантах осуществления спэйсер представляет собой



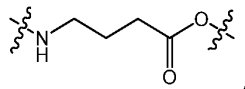
где n равно 1 или 2.

В других вариантах осуществления спэйсер представляет собой



где n равно 1 или 2.

В других вариантах осуществления спэйсер представляет собой



где n равно 1 или 2.

Схемы (2a-2c) иллюстрируют пост-трансляционную модификацию модифицированных антител или фрагментов этих антител, предоставленных в данном документе, где Линкерный Блок (LU) представляет собой $-L_1-L_2-L_3-L_4-$, и L_1 в каждом случае представляет собой группу, которая взаимодействует с новым Cys.

Схема 2a

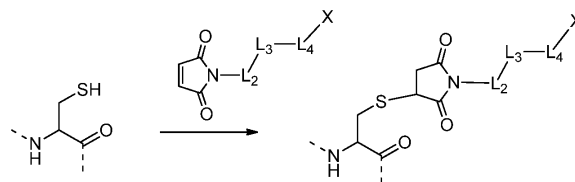
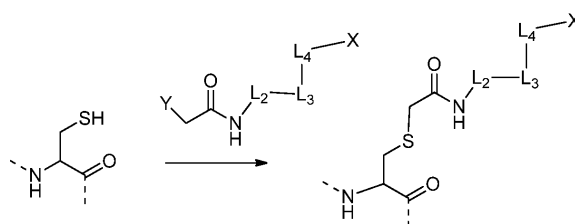
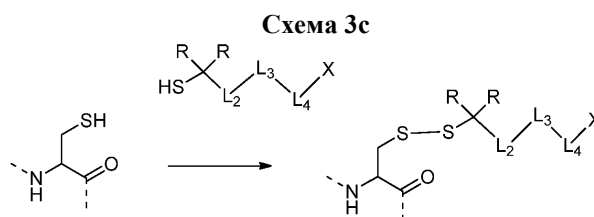


Схема 2b





На каждой из схем 2а-2с, исходным веществом является замененный Cys остаток в антителе или фрагменте антитела, модифицированных, как описано в данном документе, где пунктирные связи показывают соединение с присоединяемыми остатками антитела или фрагмента антитела; каждый R представляет собой H или C₁₋₄алкил, обычно H или метил; L₂, L₃ и L₄ являются компонентами связывающего блока LU, такими, как описанные выше; X представляет собой полезную нагрузку; и группой, соединяющей L₂ с серой замененного Cys изобретения, является L₁.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, X представляет собой реакционноспособную функциональную группу, которая может применяться, чтобы соединить конъюгированное антитело с еще одним химическим фрагментом, посредством взаимодействия с подходящей комплементарной функциональной группой. Табл. 4 отображает несколько примеров реакционноспособных функциональных групп, которые X может представлять, наряду с комплементарной функциональной группой, которая может применяться для соединения конъюгата, содержащего X с еще одним соединением. Способы применения X для соединения с соответствующей комплементарной функциональной группой являются хорошо известными в данной области. Соединением с использованием азидов обычно делают, используя "Клик" или не содержащую меди клик-химию; реакции, включающие гидразины, алкоксиамины или ацилгидразины обычно протекают через образование основания Шиффа с одной из карбонильных функциональных групп.

Таблица 4

X	Комплементарная реакционноспособная функциональная группа для X
тиол	тиол, малеимид, галогенацетамид, винилсульфон или винилпиридин
азид	алкен, алкин, фосфин-(тио)сложный эфир, циклооктин, циклооктен или оксаноборнадиен
фосфин-(тио)сложный эфир)	азид
оксаноборнадиен	азид или тетразин
алкин	азид или тетразин
алкен	тетразин
циклооктин	азид или тетразин
циклооктен	тетразин
норборнен	тетразин
тетразин	норборнен, алкен, алкин, циклооктин или оксаноборнадиен
альдегид	гидроксиламин, гидразин или NH ₂ -NH-C(=O)-
кетон	гидроксиламин, гидразин или NH ₂ -NH-C(=O)-
гидроксиламин	альдегид или кетон
гидразин	альдегид или кетон
NH ₂ -NH-C(=O)-	альдегид или кетон
галогенацетамид	тиол
тиол	тиол
малеимид	Тиол
винилсульфон	Тиол
винилпиридин	Тиол

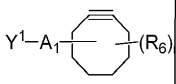
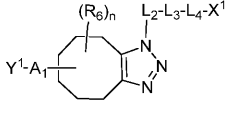
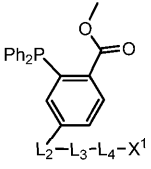
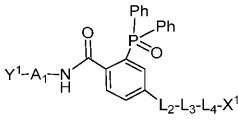
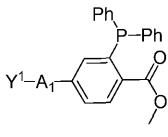
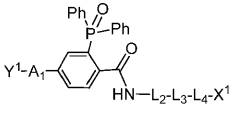
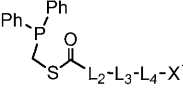
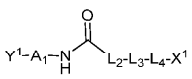
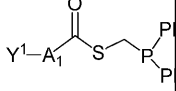
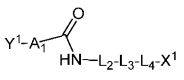
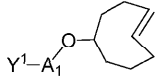
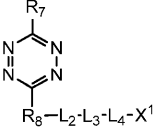
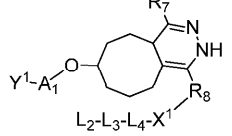
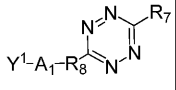
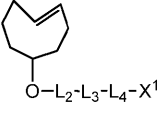
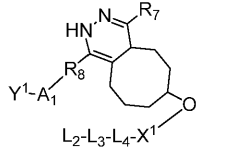
Примерные продукты соединений, сделанных с использованием этих компонентов, отображены в табл. 5, где Y¹ представляет антитело изобретения, A₁ представляет связывающий блок (LU), соединяющий антитело с полезной нагрузкой X^a, -L₂-L₃-L₄- в Формуле II-а представляет линкерный блок, который

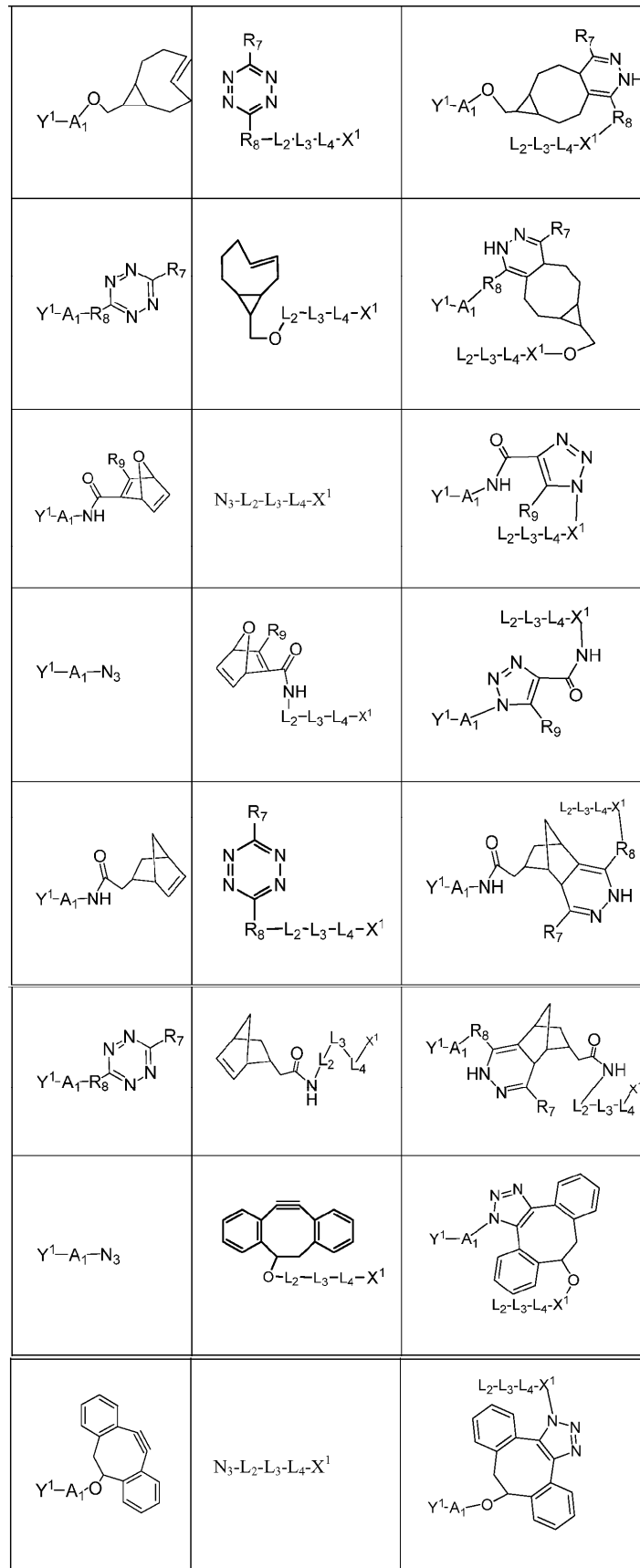
может быть представлен в молекуле, подлежащей соединению с конъюгированным антителом через X^a , и X^1 представляет полезную нагрузку. Полезная нагрузка X^a представляет собой реакционноспособную функциональную группу, и X^b в Формуле II-а является соответствующей комплементарной функциональной группой, а сама Формула II-а представляет молекулу, подлежащую соединению с конъюгированным антителом. Третий столбец в табл. 5 отображает продукт реакции X^a с X^b .

Таблица 5

$Y^1-A_1-X^a$	$X^b-L_2-L_3-L_4-X^1$ Формула (II-а)	$Y^1-A_1-X^2-L_2-L_3-L_4-X^1$
$Y^1-A_1-N_3$	$HC\equiv C-L_2-L_3-L_4-X^1$	
$Y^1-A_1-N_3$	$HC\equiv C-L_2-L_3-L_4-X^1$	
$Y^1-A_1-C\equiv CH$	$N_3-L_2-L_3-L_4-X^1$	
$Y^1-A_1-C\equiv CH$	$N_3-L_2-L_3-L_4-X^1$	
	$NH_2-O-L_2-L_3-L_4-X^1$	
	$NH_2-O-L_2-L_3-L_4-X^1$	
$Y^1-A_1-O-NH_2$	$CH_3C(=O)-L_2-L_3-L_4-X^1$	
$Y^1-A_1-O-NH_2$	$HC(=O)-L_2-L_3-L_4-X^1$	
	$HS-L_2-L_3-L_4-X^1$	
Y^1-A_1-SH		
Y^1-A_1-SH		

	$\text{HS-L}_2\text{-L}_3\text{-L}_4\text{-X}^1$	
	$\text{HS-L}_2\text{-L}_3\text{-L}_4\text{-X}^1$	
	$\text{NH}_2\text{-NH-C(=O)-L}_2\text{-L}_3\text{-L}_4\text{-X}^1$	
	$\text{NH}_2\text{-NH-C(=O)-L}_2\text{-L}_3\text{-L}_4\text{-X}^1$	
	$\text{R}_5\text{C(=O)-L}_2\text{-L}_3\text{-L}_4\text{-X}^1$	
	$\text{HC(=O)-L}_2\text{-L}_3\text{-L}_4\text{-X}^1$	
	$\text{HS-L}_2\text{-L}_3\text{-L}_4\text{-X}^1$	
$\text{Y}_1\text{-A}_1\text{-N}_3$		

 <p>Y^1-A_1-Substituted cyclohexene ring with (R_6) group.</p>	<p>$N_3-L_2-L_3-L_4-X^1$</p>	 <p>Y^1-A_1-Substituted cyclohexene ring with a diazole ring and $(R_6)_n$ group.</p>
<p>$Y^1-A_1-N_3$</p>	 <p>Benzene ring with Ph_2P, CO_2Me, and $L_2-L_3-L_4-X^1$ substituents.</p>	 <p>Benzene ring with Y^1-A_1-NH, CO, Ph_2P, and $L_2-L_3-L_4-X^1$ substituents.</p>
 <p>Benzene ring with Y^1-A_1, Ph_2P, CO_2Me, and $L_2-L_3-L_4-X^1$ substituents.</p>	<p>$N_3-L_2-L_3-L_4-X^1$</p>	 <p>Benzene ring with Y^1-A_1, Ph_2P, CO, and $HN-L_2-L_3-L_4-X^1$ substituents.</p>
<p>$Y^1-A_1-N_3$</p>	 <p>$Ph_2P-S-CO-L_2-L_3-L_4-X^1$</p>	 <p>$Y^1-A_1-NH-CO-L_2-L_3-L_4-X^1$</p>
 <p>$Y^1-A_1-CO-S-CH_2-CH_2-P(Ph)_2$</p>	<p>$N_3-L_2-L_3-L_4-X^1$</p>	 <p>$Y^1-A_1-CO-NH-L_2-L_3-L_4-X^1$</p>
 <p>Y^1-A_1-O-Cyclohexene ring.</p>	 <p>1,2,4,5-tetrazine ring with R_7 and R_8 substituents.</p>	 <p>Cyclohexene ring with Y^1-A_1-O, R_7, R_8, and $L_2-L_3-L_4-X^1$ substituents.</p>
 <p>$Y^1-A_1-R_8$-1,2,4,5-tetrazine ring with R_7 substituent.</p>	 <p>Cyclohexene ring with $O-L_2-L_3-L_4-X^1$ substituent.</p>	 <p>Cyclohexene ring with Y^1-A_1, R_8, R_7, and $L_2-L_3-L_4-X^1$ substituents.</p>



В некоторых вариантах осуществления, модифицированное антитело или фрагмент этого антитела, предоставленные в данном документе, конъюгируют при отношении "X группа-к-антителу" (полезной нагрузки к антителу) между приблизительно 1 и 16, таким как 1-12, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8, где модифицированное антитело или фрагмент этого антитела содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 остатков цистеина, введенных на специфичных участках, раскрытых в данном документе. Например, отношение "X группа-к-антителу", равное 4, может достигаться посредством введения двух остатков Cys в тяжелую цепь анти-

тела, которая будет содержать 4 участка конъюгация, по два от каждой тяжелой цепи. Иммуноконъюгаты таки антител будут содержать до 4 групп полезной нагрузки, которые могут быть подобными или различными, и предпочтительно все являются одинаковыми. В еще одном примере, отношение "X группа-к-антителу", равное 4, может достигаться посредством введения одного остатка Cys в тяжелую цепь, а второго остатка Cys в легкую цепь антитела, приводя в результате к 4 участкам конъюгации, двум в двух тяжелых цепях и двум в двух легких цепях. Отношение 6, 8 или выше может достигаться посредством комбинаций из 3, 4 или более замен на цистеин изобретения в тяжелой и легкой цепи антитела. Замена на множество цистеиновых групп в антителе может приводить к неуместному образованию дисульфида и другим проблемам. Таким образом, для загрузки более 4 групп полезной нагрузки на одну молекулу антитела, способы изобретения могут альтернативно комбинироваться со способами, которые не основаны на реакциях по цистеину серы, такими как ацилирование по лизину или конъюгация через метки S6 или Pcl методология.

В то время, как отношение полезной нагрузки к антителу имеет точное значение для конкретной молекулы конъюгата, понимают, что значение будет часто представлять собой среднее значение, когда его используют для описания образца, содержащего много молекул, вследствие некоторой степени негомогенности, обычно на стадии конъюгации. Средняя загрузка для образца иммуноконъюгата именуется в данном документе как отношение лекарственного средства к антителу или DAR. В нескольких вариантах осуществления, DAR находится между приблизительно 1 и приблизительно 16, и обычно равно приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. В нескольких вариантах осуществления, по меньшей мере 50% массы образца является соединением, имеющим среднее отношение плюс или минус 2, и предпочтительно по меньшей мере 50% образца составляет конъюгат, который содержит среднее отношение плюс или минус 1. Предпочтительные варианты осуществления включают иммуноконъюгаты, где DAR равно приблизительно 2 или приблизительно 8, например, приблизительно 2, приблизительно 4, приблизительно 6 или приблизительно 8. В нескольких вариантах осуществления, DAR, равное 'приблизительно n' означает, что измеренное значение для DAR находится в пределах 10% от n (в Формуле (I)).

3. Дополнительное изменение каркаса области Fc

Настоящее изобретение предоставляет сайт-специфичные меченые иммуноконъюгаты. Иммуноконъюгаты изобретения могут содержать модифицированные антитела или фрагменты этих антител, которые дополнительно содержат модификации каркасных остатков в V_H и/или V_L , например, для улучшения свойств антитела. Обычно такие каркасные модификации получают, чтобы уменьшить иммуногенность антитела. Например, одним подходом является "обратно-мутировать" один или более каркасных остатков в соответствующую первоначальную последовательность. Более конкретно, антитело, которое прошло через соматическую мутацию, может содержать каркасные остатки, которые отличаются от первоначальной последовательности, из которого получают антитело. Такие остатки могут быть идентифицированы посредством сравнения каркасных последовательностей антитела с первоначальными последовательностями, из которых получают антитело. Для возврата последовательностей каркасной области к их первоначальной конфигурации, соматические мутации могут быть "обратно-мутированы" в первоначальную последовательность посредством, например, сайт-направленного мутагенеза. Такие "обратно-мутированные" антитела также подразумеваются охваченными изобретением.

Еще один тип модификации каркаса включает в себя мутацию одного или более остатков в каркасной области, или даже в одной или более областей CDR, чтобы удалить T-клеточные эпитопы, чтобы, таким образом, снизить потенциальную иммуногенность антитела. Данный подход также называется "деиммунизацией", и описан в дополнительных подробностях в патентной публикации США № 20030153043 Carr et al.

В дополнение или как альтернатива к модификациям, сделанным в каркасных областях или областях CDR, антитела изобретения могут быть сконструированы, чтобы включать модификации внутри Fc области, обычно для изменения одного или более функциональных свойств антитела, таких как время полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, связывание с Fc рецептором и/или антиген-зависимая клеточная цитотоксичность. Кроме того, антитело изобретения могут быть химически модифицировано (например, один или более химических фрагментов могут быть присоединены к антителу) или быть модифицированы для изменения его гликозилирования, снова для изменения одного или более функциональных свойств антитела. Каждый из этих вариантов осуществления описан в дополнительных подробностях ниже.

В одном варианте осуществления, шарнирная область CH1 модифицируют таким образом, что число остатков цистеина в шарнирной области изменяется, например, увеличивается или уменьшается. Этот подход описан дополнительно в патенте США № 5,677,425 Bodmer et al. Число остатков цистеина в шарнирной области CH1 изменяется для, например, облегчения сборки легких и тяжелых цепей или для увеличения или уменьшения стабильности антитела.

В еще одном варианте осуществления, Fc шарнирную область антитела подвергают мутации, чтобы снизить биологическое время полужизни антитела. Более конкретно, одну или более аминокислотных мутаций вводят в межфазную область CH2-CH3 домена Fc-шарнирного фрагмента, таким образом, что антитело имеет нарушенное связывание Стафилококкового белка A (SpA) относительно связывания

SpA нативным Fc-шарнирным доменом. Этот подход описан с дополнительными подробностями в патенте США № 6,165,745 by Ward et al.

В еще других вариантах осуществления, Fc область изменяют посредством замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка на отличный от него аминокислотный остаток для изменения эффекторных функций антитела. Например, одна или более аминокислот могут быть заменены на отличный от них аминокислотный остаток таким образом, что антитело имеет измененную аффинность для эффекторного лиганда но сохраняет антиген-связывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, по отношению к которому аффинность изменяют, может представлять собой, например, Fc рецептор или C1 компонент комплемента. Данный подход описан, например, в патентах США № 5,624,821 и 5,648,260, оба Winter et al.

В еще одном варианте осуществления, одна или более аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков, может быть заменена на отличный от них аминокислотный остаток таким образом, что антитело имеет измененную связывание C1q и/или пониженную или отмененную комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). Данный подход описан, например, в патентах США № 6,194,551 Idusogie et al.

В еще одном варианте осуществления, один или более аминокислотных остатков изменяют, чтобы, таким образом, изменить способность антитела фиксировать комплемент. Данный подход описан, например, в Публикации PCT WO 94/29351 Vodmer et al. В конкретном варианте осуществления, одна или более аминокислот антитела или фрагмента этого антитела настоящего изобретения заменяют одним или более аллотипичными аминокислотными остатками, такими, как показанные на фиг. 4 для подкласса IgG1 и каппа изотипа. Аллотипичные аминокислотные остатки также включают, но не ограничиваются перечисленным, константную область тяжелой цепи подклассов IgG1, IgG2 и IgG3, а также константную область легкой цепи каппа изотипа, как описано Jefferis et al., MAbs. 1:332-338 (2009).

В еще одном другом варианте осуществления, Fc область модифицируют, чтобы увеличить способность антитела опосредовать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или чтобы увеличить аффинность антитела для Fcγ рецептора посредством модификации одной или более аминокислот. Данный подход описан, например, в Публикации PCT WO 00/42072 Presta. Более того, участки связывания в человеческом IgG1 для FcγRI, FcγRII, FcγRIII и FcRn были картированы и варианты с улучшенным связыванием были описаны (см. Shields et al., J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001).

В еще одном другом варианте осуществления, модифицируют гликозилирование антитела. Например, может быть получено агликозилированное антитело (т.е. у антитела отсутствует гликозилирование). Гликозилирование может быть изменено, чтобы, например, увеличить аффинность антитела для "антигена". Такие углеводные модификации могут осуществляться посредством, например, изменения одного или более участков гликозилирования в последовательности антитела. Например, могут быть сделаны одна или более аминокислотных замен, которые приводят к элиминированию одного или более участков гликозилирования вариабельной области каркаса, чтобы, таким образом, элиминировать гликозилирование на данном участке. Такое агликозилирование может увеличивать аффинность антитела для антигена. Такой подход описан, например, в патентах США № 5,714,350 и 6,350,861 Co et al.

Дополнительно или альтернативно, может быть получено антитело, которое имеет измененный тип гликозилирования, такое как гипофукозилированное антитело, имеющее пониженные количества фукозильных остатков, или антитело, имеющее увеличенные раздвоенные структуры GlcNac. Было продемонстрировано, что такие измененные гликозилирование матрицы увеличивают ADCC способность антитела. Такие углеводные модификации могут выполняться, например, посредством экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным механизмом гликозилирования. Клетки с измененным механизмом гликозилирования были описаны в данной области и могут применяться в качестве клеток-хозяев, в которых экспрессируются рекомбинантные антитела изобретения, чтобы, таким образом, продуцировать антитело с измененным гликозилированием. Например, EP 1,176,195 от Hang et al. описывает клеточную линию с функционально нарушенным геном FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу, таким образом, что антитела, экспрессированные в такой клеточной линии проявляют гипофукозилирование. Публикация PCT WO 03/035835 от Presta описывает вариантную клеточную линию CHO, клетки Lec13, с пониженной способностью присоединять фукозу к Asn(297)-связанным углеводам, также приводящей в результате к гипофукозилированию антитела, экспрессированного в такой клетке-хозяине (см. также Shields et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740). Публикация PCT WO 99/54342 от Umana et al. описывает клеточные линии, сконструированные, чтобы экспрессировать гликопротеин-модифицирующие гликозилтрансферазы (например, бета(1,4)-N ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)) таким образом, что антитела, экспрессируемые в сконструированных клеточных линиях, проявляют увеличенные раздвоенные структуры GlcNac, что приводит в результате к увеличенной ADCC активности антитела (см. также Umana et al., Nat. Biotech. 17:176-180, 1999).

В еще одном варианте осуществления, антитело модифицируют, чтобы увеличить его время биологической полужизни. Возможными являются различные подходы. Например, могут вводиться одна или более из следующих мутаций: T252L, T254S или T256F, как описано в патенте США № 6,277,375 на имя Ward. Альтернативно, чтобы увеличить время биологической полужизни, антитело может быть изменено

в области CN1 или C_L, чтобы содержать эпитоп связывания с рецептором реутилизации, взятом из двух петель CN2 домена области Fc из IgG, как описано в патентах США 5,869,046 и 6,121,022 by Presta et al.

4. Конъюгаты антитела.

Настоящее изобретение предоставляет сайт-специфичные способы введения метки, модифицированные антитела и фрагменты этих антител, и иммуноконъюгаты, полученные соответственно. С использованием способов изобретения, модифицированные антитела или фрагменты этого антитела могут быть конъюгированы с меткой, такой как фрагмент лекарственного средства, например, средство против злокачественных новообразований, средство лечения аутоиммунных расстройств, противовоспалительное средство, противогрибковое средство, антибактериальное средство, противопаразитарное средство, противовирусное средство, или анестезирующее средство, или реагент для визуализации, такой как хелатор для ПЭТ-визуализации, или флуоресцентная метка или контрастный реагент для МРТ. Антитело или фрагменты антитела могут также быть конъюгированы с использованием некоторых идентичных или различных метящих фрагментов при комбинировании способов изобретения с другими способами конъюгации.

В некоторых вариантах осуществления, иммуноконъюгаты настоящего изобретения содержат фрагмент лекарственного средства, выбранный из ингибитора V-ATФазы, ингибитора HSP90, ингибитора IAP, ингибитора mTog, стабилизатора микротрубочек, дестабилизатора микротрубочек, ауристинина, доластатина, майтансиноида, MetAP (метионинаминопептидазы), ингибитора ядерного экспорта белков CRM1, ингибитора DPPIV, ингибиторов протеасом, ингибитора реакций переноса фосфорила в митохондриях, ингибитора синтеза белка, ингибитора киназы, ингибитора CDK2, ингибитора CDK9, ингибитора HDAC, средства, повреждающего ДНК, ДНК-алкилирующего средства, интеркалятора ДНК, связывающего малой бороздки ДНК, ингибиторов топоизомеразы, ингибиторов синтеза РНК, ингибиторов кинезина, ингибиторов белок-белковых взаимодействий и ингибитора DHFR.

Дополнительно, модифицированные антитела или фрагменты антител настоящего изобретения могут быть конъюгированы с фрагментом лекарственного средства, который модифицирует данный биологический ответ. Фрагменты лекарственных средств не должны быть истолкованы, как ограниченные классическими химическими терапевтическими средствами. Например, фрагмент лекарственного средства может представлять собой иммуномодулятор, такой как потенциатор иммунной системы, низкомолекулярный потенциатор иммунной системы, агонист TLR, олигомер CpG, TLR2 агонист, агонист TLR4, агонист TLR7, агонист TLR9, агонист TLR8, пептид эпитопа Т-клеток или т.п. Фрагмент лекарственного средства может также представлять собой олигонуклеотид, miРНК, shРНК, κДНК или т.п. Альтернативно, фрагмент лекарственного средства может представлять собой белок, пептид, или полипептид, обладающей желательной биологической активностью. Такие белки могут включать, например, токсин, такие как абрин, рицин А, экзотоксин псевдомонас, холерный токсин или дифтерийный токсин, белок, такой как фактор некроза опухолей, α-интерферон, β-интерферон, фактор роста нервов, тромбоцитарный фактор роста, тканевой активатор плазминогена, цитокин, апоптотическое средство, анти-ангиогенное средство, или модификатор биологического ответа, такой как, например, лимфокин.

В одном варианте осуществления, модифицированные антитела или фрагменты антител настоящего изобретения конъюгируют с фрагментом лекарственного средства, таким как цитотоксин, лекарственным средством (например, иммуносупрессором) или радиотоксином. Примеры цитотоксина включают, но не ограничиваются перечисленным, таксаны (см., например, Международные (PCT) Патентные заявки № WO 01/38318 и PCT/US03/02675), ДНК-алкилирующие средства (например, аналоги CC-1065), антрациклины, аналоги тубулизина, аналоги дуокармицина, ауристин Е, ауристин F, майтансиноиды, и цитотоксические средства, содержащие реакционноспособный фрагмент полиэтиленгликоля (см., например, Sasse et al., J. Antibiot. (Tokyo), 53, 879-85 (2000), Suzawa et al., Bioorg. Med. Chem., 8, 2175-84 (2000), Ichimura et al., J. Antibiot. (Tokyo), 44, 1045-53 (1991), Francisco et al., Blood (2003) (электронная публикация перед печатной публикацией), Патенты США № 5,475,092, 6,340,701, 6,372,738, и 6,436,931, Публикацию Патентной заявки США № 2001/0036923 A1, рассматриваемые патентные заявки США Сер. № 10/024,290 и 10/116,053, и Международную (PCT) Патентную Заявку № WO 01/49698), таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды и пуромидин и его аналоги или гомологи. Терапевтические средства также включают, например, анти-метаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, декарбазин), абляционные средства (например, мехлорэтамин, тиотепа хлорамбуцил, мейфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфид, дибромманнит, стрептозотоцин, митомицин С, и цис-дихлордиамин платины (II) (DDP), дисплатин, антрациклины (например, даунорубицин (прежде дауномицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (прежде актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (AMC)), и антимиотические средства (например, винкристин и винбластин). (См. например, Seattle Genetics US 20090304721).

Другие примеры терапевтических цитотоксинов, которые могут быть конъюгированы с модифицированными антителами или фрагментами антител изобретения, включают дуокармицины, калихеамицины, майтансины и ауристинины и их производные. Пример конъюгата калихеамицина с антителом явля-

ется доступным для приобретения (Mylotarg™; Wyeth-Ayerst).

Для дополнительного обсуждения типов цитотоксинов, линкеров и способов для конъюгирования терапевтических средств с антителами, см. также Saito et al. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail et al. (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan and Kreitman, (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter and Springer, (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

В соответствии с настоящим изобретением, модифицированные антитела или фрагменты этих антител могут также быть конъюгированы с радиоактивным изотопом для генерации цитотоксических радиофармпрепаратов, называемых радиоиммуноконъюгатами. Примеры радиоактивных изотопов, которые могут быть конъюгированы с антителами для применения диагностически или терапевтически включают, но не ограничиваются перечисленным, иод¹³¹, индий¹¹¹, иттрий⁹⁰, и лютеций. Способы получения радиоиммуноконъюгатов являются установленными в данной области. Примеры радиоиммуноконъюгатов являются доступными для приобретения, включающие Zevalin™ (DEC Pharmaceuticals) и Веххаг™ (Corixa Pharmaceuticals), и аналогичные способы могут применяться для получения радиоиммуноконъюгатов с использованием антител изобретения. В некоторых вариантах осуществления, макроциклический хелатор представляет собой 1,4,7,10-тетраазациклододекан-N,N',N'',N'''-тетрауксусную кислоту (DOTA), которая может быть присоединена к антителу через линкерную молекулу. Такие линкерные молекулы являются общеизвестными в данной области и описаны в Denardo et al. (1998) *Clin. Cancer Res.* 4(10): 2483-90; Peterson et al. (1999) *Bioconj. Chem.* 10(4):553-7; и Zimmerman et al. (1999) *Nucl. Med. Biol.* 26(8):943-50, каждая полностью включается посредством ссылки.

Настоящее изобретение дополнительно предоставляет модифицированные антитела или их фрагменты, которые специфически связываются с антигеном. Модифицированные антитела или фрагменты могут быть конъюгированы или гибридизированы с гетерологичным белком или полипептидом (или их фрагментом, предпочтительно с полипептидом из по меньшей мере 10, по меньшей мере 20, по меньшей мере 30, по меньшей мере 40, по меньшей мере 50, по меньшей мере 60, по меньшей мере 70, по меньшей мере 80, по меньшей мере 90 или по меньшей мере 100 аминокислот) для генерации гибридных белков. В частности, изобретение предоставляет гибридные белки, содержащие фрагмент антитела, описанный в данном документе (например, Fab фрагмент, Fd фрагмент, Fv фрагмент, F(ab)₂ фрагмент, V_H домен, V_H CDR, V_L домен или V_L CDR) и гетерологичный белок, полипептид или пептид.

В нескольких вариантах осуществления, модифицированные фрагменты антитела без антиген-связывающей специфичности, такие как, но не ограниченные перечисленным, модифицированные Fc домены со сконструированными остатком (остатками) цистеина в соответствии с настоящим изобретением, применяют для генерации гибридных белков, содержащих такой фрагмент антитела (например, сконструированные Fc) и гетерологичный белок, полипептид или пептид.

Дополнительные гибридные белки могут генерироваться посредством методов перетасовки генов, перетасовки мотивов, перетасовки экзонов, и/или перетасовки кодонов (обобщенно называемых "перетасовками ДНК"). Перетасовки ДНК могут использоваться для изменения активностей антител изобретения или их фрагментов (например, антитела или их фрагменты с более высокими аффинностями и более низкими скоростями диссоциации). См., в целом, Патенты США № 5,605,793, 5,811,238, 5,830,721, 5,834,252, и 5,837,458; Patten et al. (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:724-33; Narayana, (1998) *Trends Biotechnol.* 16(2):76-82; Hansson et al. (1999) *J. Mol. Biol.* 287:265-76; и Lorenzo and Blasco, (1998) *Biotechniques* 24(2):308-313 (каждая из этих патентов и публикации полностью включены посредством ссылки). Антитела или их фрагменты, или кодируемые антитела или их фрагменты, могут быть изменены посредством подвергания статистическому мутагенезу посредством подверженного ошибкам ПЦР, статистического введения нуклеотидов или других методов перед рекомбинацией. Полинуклеотид, кодирующий антитело или его фрагмент, которые специфически связываются с антигеном, могут быть рекомбинированы с одним или более компонентами, мотивами, секциями, частями, доменами, фрагментами и т.д. одной или более гетерологичных молекул.

Более того, модифицированные антитела или фрагменты этих антител настоящего изобретения могут быть конъюгированы с маркерными последовательностями, таким как пептид для облегчения очистки. В предпочтительных вариантах осуществления, маркерная аминокислотная последовательность представляет собой гекса-гистидиновый пептид, такой как метка, предоставленная в векторе pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311), среди других, многие из которых являются доступными для приобретения. Как описано в Gentz et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:821-824, например, гекса-гистидин обеспечивает удобную очистку гибридного белка. Другие пептидные метки, применимые для очистки, включают, но не ограничиваются перечисленным, гемагглютининовую ("HA") метку, которая соответствует эпитопу, полученному из гемагглютининового белка вируса гриппа (Wilson et al. (1984) *Cell* 37:767), и "FLAG" метка (A. Einhauser et al., *J. Biochem. Biophys. Methods* 49: 455-465, 2001). В соответствии с настоящим изобретением, антитела или фрагменты антител могут также быть конъюгированы с проникающими в опухоль пептидами, чтобы усилить их эффективность действия.

В других вариантах осуществления, модифицированные антитела или фрагменты антител настоя-

шего изобретения являются конъюгированными с диагностическим или обнаруживаемым средством. Такие иммуноконъюгаты могут быть применимыми для мониторинга или прогнозирования наступления, развития, прогрессирования и/или тяжести заболевания или расстройства как части методики клинического тестирования, такой как определение эффективности действия конкретной терапии. Такой диагноз и обнаружение могут осуществляться посредством сочетания антитела с обнаруживаемыми веществами, включающими, но не ограниченными перечисленным, различные ферменты, такие как, но не ограниченные перечисленным,

пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или ацетилхолинэстераза;

простетические группы, такие как, но не ограниченные перечисленным, стрептавидин/биотин и авидин/биотин;

флуоресцентные материалы, такие как, но не ограниченные перечисленным, Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 405, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 500, Alexa Fluor 514, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 610, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700, Alexa Fluor 750, умбеллиферон, флуоресцеин, изотиоцианат флуоресцеина, родамин, дихлортриазиниламина флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; люминесцентные материалы, такие как, но не ограниченные перечисленным, люминол;

биолюминесцентные материалы, такие как, но не ограниченные перечисленным, люцифераза, люциферин, и экворин; радиоактивные материалы, такие как, но не ограниченные перечисленным, йод (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , и ^{121}I), углерод (^{14}C), сера (^{35}S), тритий (^3H), индий (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , и ^{111}In), технеций (^{99}Tc), таллий (^{201}Tl), галлий (^{68}Ga , ^{67}Ga), палладий (^{103}Pd), молибден (^{99}Mo), ксенон (^{133}Xe), фтор (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{64}Cu , ^{113}Sn , и ^{117}Sn ; и позитрон-испускающие металлы с использованием различных позитронно-эмиссионных томографий и нерадиоактивные парамагнитные ионы металлов.

Модифицированные антитела или фрагменты антител изобретения могут также присоединяться к твердым подложкам, которые являются особенно применимыми для иммунологических анализов или очистки целевого антигена. Такие твердые подложки включают, но не ограничиваются перечисленным, стекло, целлюлозу, полиакриламид, нейлон, полистирол, поливинилхлорид или полипропилен.

5. Фармацевтическая композиция.

Чтобы получить фармацевтические или стерильные композиции, включающие иммуноконъюгаты, иммуноконъюгаты изобретения смешивают с фармацевтически приемлемым носителем или эксципиентом. Композиции могут дополнительно содержать один или более других терапевтических средств, которые являются подходящими для лечения или профилактики злокачественного новообразования (рака молочной железы, колоректального рака, рака легкого, множественной миеломы, рака яичника, рака печени, рака желудка, рака поджелудочной железы, острой миелоидной лейкемии, хронической миелоидной лейкемии, остеосаркомы, карциномы сквамозных клеток, лимфоцитарных опухолей периферических нервов (например, шванномы), рака шеи и головы, рака мочевого пузыря, рака пищевода, рака пищевода Барретса, глиобластомы, чистоклеточной саркомы мягких тканей, злокачественной мезотелиомы, нейрофиброматоза, рака почки, меланомы, рака простаты, доброкачественной гиперплазии простаты (BPH), гинекомастии и эндометриоза).

Лекарственные формы терапевтических и диагностических средств могут быть получены посредством смешивания с физиологически приемлемыми носителями, эксципиентами или стабилизаторами в форме, например, лиофилизированных порошков, взвесей, водных растворов, лосьонов или суспензий (см., например, Hardman et al., Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y., 2001; Gennaro, Remington: Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y., 2000; Avis, et al. (eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY, 1993; Lieberman, et al. (eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY, 1990; Lieberman, et al. (eds.) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY, 1990; Weiner и Kotkoskie, Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., 2000).

Выбор режима введения для терапевтического средства зависит от нескольких факторов, включающих интенсивность обмена объекта в сыворотке или ткани, уровень симптомов, иммуногенность объекта, и доступность целевых клеток в биологическом матриксе. В некоторых вариантах осуществления, режим введения максимизирует количество терапевтического средства, доставляемого пациенту совместимый с приемлемым уровнем побочных эффектов. Соответственно, количество доставленного биологического средства зависит частично от конкретного объекта и тяжести состояния, подвергаемого лечению. Руководство по выбору соответствующих доз антител, цитокинов и малых молекул является доступным (см, например, Wawrzynczak, Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK, 1996; Kresina (ed.), Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1991; Bach (ed.), Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, New York, N.Y., 1993; Baert et al., New Engl. J. Med. 348:601-608, 2003; Milgrom et al., New Engl. J. Med. 341:1966-1973, 1999; Slamon et al., New Engl. J. Med. 344:783-792, 2001; Beniamonovitz et al., New Engl. J. Med. 342:613-619, 2000; Ghosh et al., New Engl. J. Med. 348:24-32, 2003; Lipsky et al., New Engl. J. Med. 343:1594-1602, 2000).

Определение соответствующей дозы делается клиницистом, например, с использованием параметров или факторов, известных или предполагаемых в данной области, чтобы воздействовать на лечение или предсказанных для воздействия на лечение. Обычно, дозу начинают с количества до некоторой степени меньшего, чем оптимальная доза, и ее затем увеличивают небольшими приращениями, пока не достигают желательного или оптимального эффекта относительно любого из негативных побочных эффектов. Важные диагностические измерения включают измерения симптомов, например, воспаления или уровня продуцируемых воспалительных цитокинов.

Действительные уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях настоящего изобретения могут варьироваться таким образом, чтобы получить количество активного ингредиента, которое является эффективным, чтобы достигнуть желательного терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции, и способа введения, не являясь токсичным для пациентом. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от различных фармакокинетических факторов, включающих активность конкретных используемых композиций настоящего изобретения, или их сложного эфира, соли или амида, путь введения, время введения, скорость выведения конкретного используемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, применяемые в комбинации с конкретными используемыми композициями, возрастом, полом, массой тела, состоянием, общим состоянием здоровья и предшествующей медицинской историей пациента, подвергнутого лечению, и т.п. факторов известных в медицинских областях.

Композиции, содержащие антитела или их фрагменты изобретения могут быть обеспечены, посредством непрерывной инфузии, или посредством доз при интервалах, равных например, одному дню, одной неделе или 1-7 раз в неделю. Дозы могут обеспечиваться внутривенно, подкожно, местно, перорально, назально, ректально, внутримышечно, интрацеребрально или посредством ингаляции. Конкретный протокол доз представляет собой протокол, включающий максимальную дозу или частоту доз, который позволяет избежать значительных нежелательных побочных эффектов.

Для иммуноконъюгатов изобретения, дозировка, вводимая пациенту, может составлять от 0,0001 мг/кг до 100 мг/кг массы тела пациента. Дозировка может составлять между 0,0001 мг/кг и 20 мг/кг, 0,0001 мг/кг и 10 мг/кг, 0,0001 мг/кг и 5 мг/кг, 0,0001 и 2 мг/кг, 0,0001 и 1 мг/кг, 0,0001 мг/кг и 0,75 мг/кг, 0,0001 мг/кг и 0,5 мг/кг, от 0,0001 мг/кг до 0,25 мг/кг, от 0,0001 до 0,15 мг/кг, от 0,0001 до 0,10 мг/кг, от 0,001 до 0,5 мг/кг, от 0,01 до 0,25 мг/кг или от 0,01 до 0,10 мг/кг массы тела пациента. Дозировка антител или их фрагментов изобретения может быть рассчитана с использованием массы пациента в килограммах (кг), умноженной на дозу, подлежащую введению в мг/кг.

Дозы иммуноконъюгатов изобретения могут повторяться и введения могут быть разделены на по меньшей мере 1 день, 2 дня, 3 дня, 5 дней, 10 дней, 15 дней, 30 дней, 45 дней, 2 месяца, 75 дней, 3 месяца или по меньшей мере 6 месяцев. В конкретном варианте осуществления, дозы иммуноконъюгатов изобретения повторяют каждые 3 дня.

Эффективное количество для конкретного пациента может варьировать в зависимости от факторов, таких как состояние, подвергаемое лечению, общее состояние здоровья пациента, способ введения и доза введения и тяжесть побочных эффектов (см., например, Maynard et al., *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Raton, Fla., 1996; Dent, *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ., London, UK, 2001).

Способ введения может проводиться посредством, например, местного или кожного применения, инъекции или инфузии посредством внутривенного, внутривнутрибрюшинного, интрацеребрального, внутримышечного, внутриглазного, внутриартериального, интрацереброспинального, внутрь повреждения введения, или посредством систем с продолжительным высвобождением или имплантата (см., например, Sidman et al., *Biopolymers* 22:547-556, 1983; Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277, 1981; Langer, *Chem. Tech.* 12:98-105, 1982; Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688-3692, 1985; Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4030-4034, 1980; Патенты США № 6,350,466 и 6,316,024). Там, где необходимо, композиция может также включать солюбилизирующее средство и местное анестезирующее средство, такое как лидокаин, чтобы снизить боль на участке инъекции. В дополнение, может также использоваться легочное введение, например, посредством применения ингалятора или распылителя, и лекарственной формы с аэрозольным средством. См., например, Патенты США № 6,019,968, 5,985,320, 5,985,309, 5,934,272, 5,874,064, 5,855,913, 5,290,540, и 4,880,078; и Публикации PCT № WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, и WO 99/66903, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.

Композиция настоящего изобретения может также вводиться через один или более путей введения с использованием одного или более из разнообразных способов, известных в данной области. Как будет понятно квалифицированному специалисту в области, путь и/или способ введения будут видоизменяться в зависимости от желательных результатов. Выбранные пути введения для иммуноконъюгатов изобретения включают внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутривнутрибрюшинный, подкожный, спинной или другие парентеральные пути введения, например, посредством инъекции или инфузии. Парентеральное введение может представлять способы введения, отличные от энтерального и местного введения, обычно посредством инъекции, и включает, без ограничения, внутривенную, внутримышеч-

ную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспиральную, эпидуральную и интастеральную инъекцию и инфузию. Альтернативно, композиция изобретения может вводиться через непарентеральный путь, такой как местный, эпидермальный или чрезслизистый путь введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, подязычно или местно. В одном варианте осуществления, иммуноконъюгаты изобретения вводят посредством инфузии. В еще одном варианте осуществления, иммуноконъюгаты изобретения вводят подкожно.

Если иммуноконъюгаты изобретения вводят в системе с контролируемым высвобождением или системе с продолжительным высвобождением, может применяться насос для достижения контролируемого или продолжительного высвобождения (см. Langer, выше; Sefton, *CRC Crit. Ref Biomed. Eng.* 14:20, 1987; Buchwald et al., *Surgery* 88:507, 1980; Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321:574, 1989). Полимерные материалы могут применяться для достижения контролируемого или продолжительного высвобождения терапий изобретения (см., например, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer и Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla., 1974; *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen и Ball (eds.), Wiley, New York, 1984; Ranger and Peppas, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61, 1983; см. также Levy et al., *Science* 228:190, 1985; During et al., *Ann. Neurol.* 25:351, 1989; Howard et al., *J. Neurosurg.* 71:105, 1989; Патент США № 5,679,377; Патент США № 5,916,597; Патент США № 5,912,015; Патент США № 5,989,463; Патент США № 5,128,326; Публикация PCT № WO 99/15154; и Публикация PCT № WO 99/20253. Примеры полимеров, применяемых в лекарственных формах с продолжительным высвобождением включают, но не ограничиваются перечисленным, поли (2-гидроксиэтилметакрилат), поли(метилметакрилат), поли(акриловую кислоту), поли(этилен-со-винилацетат), поли(метакриловую кислоту), полигликолиды (PLG), полиангидриды, поли(N-винилпирролидон), поли(виниловый спирт), полиакриламид, поли(этиленгликоль), полилактиды (PLA), поли(лактид-со-гликолиды) (PLGA), и полиортоэфиры. В одном варианте осуществления, полимер, применяемый в лекарственной форме с продолжительным высвобождением является инертным, не содержащим способных к утечке примесей, стабильным при хранении, стерильным, и биodeградируемым. Система с контролируемым или продолжительным высвобождением может помещаться в близости от профилактической или терапевтической мишени, таким образом, требуя только фракцию системной дозы (см., например, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pp. 115-138, 1984).

Системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer, *Science* 249:1527-1533, 1990). Любой метод, известный специалисту в данной области, может применяться для получения лекарственных форм с продолжительным высвобождением, содержащих один или более иммуноконъюгатов изобретения. См., например, Патент США № 4,526,938, Публикацию PCT WO 91/05548, Публикацию PCT WO 96/20698, Ning et al., *Radiotherapy & Oncology* 39:179-189, 1996; Song et al., *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50:372-397, 1995; Cleek et al., *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854, 1997; и Lam et al., *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-760, 1997, каждая из которых полностью включена в данный документ посредством ссылки.

Если иммуноконъюгаты изобретения вводят местно, они могут быть составлены в форме мази, крема, трансдермального пластыря, лосьона, геля, шампуня, спрея, аэрозоля, раствора, эмульсии или другой формы хорошо известной специалисту в данной области. См., например, Remington's *Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Для неразбрызгиваемых местных дозированных форм обычно используют от вязких до полутвердых или твердых форм, содержащих носитель или один или более эксципиентов, совместимых с местным применением, и имеющих динамическую вязкость, в некоторых случаях, большую, чем у воды. Подходящие лекарственные формы включают, без ограничения, растворы, суспензии, эмульсии, кремы, мази, порошки, линименты, бальзамы и т.п., которые, если желательно, стерилизуют или смешивают со вспомогательными средствами (например, консервантами, стабилизаторами, увлажняющими средствами, буферами или солями) для оказания влияния на различные свойства, такие как, например, осмотическое давление. Другие подходящие местные дозированные формы включают распыляемые аэрозольные препараты, где активный ингредиент, в некоторых случаях, в комбинации с твердым или жидким инертным носителем, упаковывают в смеси с находящимся под давлением летучим веществом (например, газообразным пропеллентом, таким как Freon™) или в сжимаемой бутылки. Смачивающие вещества или увлажнители могут также добавляться к фармацевтическим композициям и дозированным формам, если желательно. Примеры таких дополнительных ингредиентов являются хорошо известными в данной области.

Если композиции, содержащие иммуноконъюгаты, вводят интраназально, они могут быть составлены в форме аэрозоля, спрея, тумана или в форме капель. В частности, профилактические или терапевтические средства для применения в соответствии с настоящим изобретением могут удобным образом доставляться в форме презентации аэрозольного спрея из находящихся под давлением упаковок или распылителя, с подходящим пропеллентом (например, дихлордифторметаном, трихлорфторметаном, дихлортетрафторэтаном, диоксидом углерода или другим подходящим газом). В случае находящегося под давлением аэрозоля единица дозировки может быть определена посредством обеспечения клапана для

доставки отмеренного количества. Капсулы и картриджи (составленные из, например, желатина) для применения в ингаляторе или инсуффляторе могут быть составлены содержащими порошковую смесь соединения и подходящей порошковой основы, такой как лактоза или крахмал.

Способы совместного введения или лечения вместе со вторым терапевтическим средством, например, цитокином, стероидом, химиотерапевтическим средством, антибиотиком или излучением, являются известными в данной области (см., например, Hardman et al. (eds.) (2001) *Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10^{sup}.th ed., McGraw-Hill, New York, N.Y.; Poole and Peterson (eds.) (2001) *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.; Chabner и Longo (eds.) (2001) *Cancer Chemotherapy и Biotherapy*, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.). Эффективное количество терапевтического средства может снижать симптомы на по меньшей мере 10%; на по меньшей мере 20%; по меньшей мере приблизительно 30%; по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50%.

Дополнительные терапии (например, профилактические или терапевтические средства), которые могут вводиться в комбинации с иммуноконъюгатами изобретения, могут вводиться с интервалом, с интервалом меньше 5 мин, с интервалом меньше 30 мин, с интервалом 1 ч, с интервалом приблизительно 1 ч, с интервалом от приблизительно 1 до приблизительно 2 ч, с интервалом от приблизительно 2 до приблизительно 3 ч, с интервалом от приблизительно 3 до приблизительно 4 ч, с интервалом от приблизительно 4 до приблизительно 5 ч, с интервалом от приблизительно 5 до приблизительно 6 ч, с интервалом от приблизительно 6 до приблизительно 7 ч, с интервалом от приблизительно 7 до приблизительно 8 ч, с интервалом от приблизительно 8 до приблизительно 9 ч, с интервалом от приблизительно 9 до приблизительно 10 ч, с интервалом от приблизительно 10 до приблизительно 11 ч, с интервалом от приблизительно 11 до приблизительно 12 ч, с интервалом от приблизительно 12 до 18 ч, с интервалом от 18 до 24 ч, с интервалом от 24 до 36 ч, с интервалом от 36 до 48 ч, с интервалом от 48 до 52 ч, с интервалом от 52 до 60 ч, с интервалом от 60 до 72 ч, с интервалом от 72 до 84 ч, с интервалом от 84 до 96 ч, или с интервалом от 96 до 120 ч от иммуноконъюгатов изобретения. Две или более терапии могут вводиться в течение одного и того же посещения пациента.

В некоторых вариантах осуществления, иммуноконъюгаты изобретения могут быть составлены для обеспечения надлежащего распределения *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (BBB) включает многие высокогидрофильные соединения. Для обеспечения того, что терапевтические соединения изобретения пересекают BBB (если желательно), они могут быть составлены, например, в виде липосом. По методам производства липосом, см., например, Патенты США № 4,522,811; 5,374,548; и 5,399,331. Липосомы могут содержать один или более фрагментов, которые селективно транспортируются в специфичные клетки или органы, и, таким образом, усиливают нацеленную доставку лекарственного средства (см., например, Ranade, (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Примерные нацеливающие фрагменты включают фолат или биотин (см., например, Патент США № 5,416,016 на имя Low et al.); маннозиды (Umezawa et al. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); антитела (Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); поверхностно-активный рецептор белка А (Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 123:134); p 120 (Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); см. также K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

Изобретение предоставляет протоколы для введения фармацевтической композиции, содержащей иммуноконъюгаты изобретения по отдельности или в комбинации с другими терапиями субъекту, нуждающемуся в этом. Терапии (например, профилактические или терапевтические средства) комбинированных терапий настоящего изобретения могут вводиться сопутствующим образом или последовательно субъекту. Терапия (например, профилактические или терапевтические средства) комбинированных терапий настоящего изобретения могут также вводиться циклически. Циклическая терапия включает введение первой терапии (например, первого профилактического или терапевтического средства) в течение периода времени, с последующим введением второй терапии (например, второго профилактического или терапевтического средства) в течение периода времени и повтор данного последовательного введения, т.е. цикла, чтобы уменьшить развитие резистентности к одной из терапий (например, средства), чтобы избежать или снизить побочные эффекты одной из терапий (например, средств), и/или чтобы улучшить эффективность действия терапий.

Терапии (например, профилактические или терапевтические средства) комбинированных терапий изобретения могут вводиться субъекту одновременно.

Термин "одновременно" не ограничен введением терапий (например, профилактических или терапевтических средств) точно в одно и то же время, но скорее означает то, что фармацевтическая композиция, содержащая антитела или их фрагменты изобретения вводится субъекту в последовательности и в пределах временного интервала таким образом, что антитела изобретения могут действовать вместе с другими терапией или терапиями для обеспечения увеличенного благоприятного эффекта, чем если бы они вводились иным образом. Например, каждая терапия может вводиться субъекту в одно время или последовательно в любом порядке в различные временные отметки; однако, если ее не вводят в одно и то же время, они должны вводиться достаточно близко по времени, так, чтобы обеспечить желательный

терапевтический или профилактический эффект. Каждая терапия может вводиться субъекту отдельно, в любой подходящей форме и посредством любого подходящего пути. В различных вариантах осуществления, терапии (например, профилактические или терапевтические средства) вводят субъекту с интервалом меньше 15 мин, меньше 30 мин, меньше 1 ч, с интервалом приблизительно 1 ч, с интервалом от приблизительно 1 до приблизительно 2 ч, с интервалом от приблизительно 2 до приблизительно 3 ч, с интервалом от приблизительно 3 до приблизительно 4 ч, с интервалом от приблизительно 4 до приблизительно 5 ч, с интервалом от приблизительно 5 до приблизительно 6 ч, с интервалом от приблизительно 6 до приблизительно 7 ч, с интервалом от приблизительно 7 до приблизительно 8 ч, с интервалом от приблизительно 8 до приблизительно 9 ч, с интервалом от приблизительно 9 до приблизительно 10 ч, с интервалом от приблизительно 10 до приблизительно 11 ч, с интервалом от приблизительно 11 до приблизительно 12 ч, с интервалом 24 ч, с интервалом 48 ч, с интервалом 72 ч, или с интервалом 1 неделя. В других вариантах осуществления, две или более терапий (например, профилактических или терапевтических средств) вводят в течение одного и того же посещения пациента.

Профилактические или терапевтические средства комбинированных терапий могут вводиться субъекту в одной и той же фармацевтической композиции. Альтернативно, профилактические или терапевтические средства комбинированных терапий могут вводиться одновременно субъекту в отдельных фармацевтических композициях. Профилактические или терапевтические средства могут вводиться субъекту посредством одного и того же или различных путей введения.

Данное изобретение, будучи полностью описанным, дополнительно иллюстрируется следующими примерами и формулой изобретения, которые являются иллюстративными и не означают дополнительное ограничение.

Примеры

Пример 1. Выбор поверхностных доступных участков для Cys мутации в тяжелой цепи IgG1 и каппа легкой цепи человека.

Экспонированные на поверхности остатки в константной области тяжелой цепи IgG1 человека и каппа легких цепей человека были идентифицированы в кристаллической структуре антитела hIgG1/каппа (структура Банка данных Белков вход 1HZN.pdb, табл. 6, 7, фиг. 1) с использованием компьютерной программы Surface Racer 5.0, как описано в Tsodikov et al, "A novel computer program for fast exact calculation of accessible and molecular surface areas and average surface curvature," J. Comput. Chem., 23, 600-609 (2002). 88 остатков были выбраны для Cys-замены, 59 участков в hIgG тяжелой цепи и 29 в человеческой каппа легкой цепи, на основании следующих критериев: 1) выбор остатков в CH1, CH2 и CH3 доменах константных областей тяжелой цепи и константных областей легкой цепи; 2) выбор экспонированных на поверхности остатков, но обход полностью экспонированных остатков и C-концевой области, чтобы избежать образования димера между антителами; 3) сосредоточение внимания на полярных или заряженных остатках, таких как Ser, Thr, Lys, Arg, Glu, и Asp; и 4) исключение остатков в домене связывания FcRn, домене связывания Белка А, и шарнирной области тяжелой цепи.

Критерий 1) именно выбор участков Cys-замены в константной области антитела, подтверждения переносимости участков конъюгации к многим различным антителам. Критерий 2) основан на наблюдении образования димера между антителами для Cys-замен выступающим образом экспонированных остатков (остатки, исключенные на основании данного критерия, приведены в табл. 6). На основании кристаллической структуры IgG учитывали предполагаемую ориентацию боковой цепи Cys: остатки, для которых боковая цепь Cys может быть частично экранирована от взаимодействий с еще одним антителом, но все еще могут быть реакционноспособными по отношению к низкомолекулярной полезной нагрузке, обладали преимуществом над остатками с более крупной поверхностной доступностью, но с ориентацией, которая может обеспечить взаимодействия с крупной макромолекулой, такие как образование димера. Критерий 3) выполняли, чтобы дать преимущество консервативным мутациям, чтобы минимизировать дестабилизирующие эффекты мутаций на антитело. Аналогично, критерий 4) применяли, чтобы избежать функциональных изменений антитела, таких как эффекты на связывание FcRn и Белка А, которое может воздействовать на фармакокинетические свойства антитела или приводить к потере при манипуляции очистки, соответственно. Остатки, исключенные на основании критерия, 4 перечислены в табл. 6. Расположение 88 выбранных участков мутации в структурной модели hIgG1/каппа указывает на то, что выбранные участки являются поверхностно доступными (фиг. 2).

Таблица 6

Поверхностная доступность аминокислотных остатков в тяжелой цепи IgG1 человека. Поверхностная доступность была рассчитана с использованием программы Surface Racer 5.0 и выражена в виде квадратных Ангстремов [\AA^2]. "Исключенные участки" указывают на участки, которые исключают из выбора вследствие причин, указанных в примере 1. "Выбранные участки" представляют собой участки, которые выбирают для замены на Cys в изобретении

Eu номер	Остаток	Поверхностная доступность [\AA^2]	Причина для исключения (если применима)	Выбранные участки
117	SER	128		HC-S117C
118	ALA	2		
119	SER	79		HC-S119C
120	THR	71		
121	LYS	136		HC-K121C
122	GLY	21		
123	PRO	2		
124	SER	40		HC-S124C
125	VAL	0		
126	PHE	1		
127	PRO	0		
128	LEU	0		
129	ALA	0		
130	PRO	0		
131	SER	0		
132	SER	34		HC-S132C
133	LYS	87		
134	SER	123		HC-S134C
135	THR	1		
136	SER	183		HC-S136C
137	GLY	84		
138	GLY	40		

043810

139	THR	33		HC-T139C
140	ALA	0		
141	ALA	0		
142	LEU	0		
143	GLY	0		
144	CYS	0		
145	LEU	0		
146	VAL	0		
147	LYS	0		
148	ASP	1		
149	TYR	0		
150	PHE	0		
151	PRO	0		
152	GLU	52		HC-E152C
153	PRO	89		HC-P153C
154	VAL	10		
155	THR	69		HC-T155C
156	VAL	0		
157	SER	39		HC-S157C
158	TRP	0		
159	ASN	4		
160	SER	164	Димер	
161	GLY	35	Димер	
162	ALA	115	Димер	
163	LEU	17		
164	THR	125		HC-T164C
165	SER	183		HC-S165C
166	GLY	20		
167	VAL	12		
168	HIS	5		
169	THR	60		HC-T169C
170	PHE	0		
171	PRO	33		HC-P171C
172	ALA	9		

043810

173	VAL	0		
174	LEU	68		HC-L174C
175	GLN	0		
176	SER	162		HC-S176C
177	SER	68		HC-S177C
178	GLY	8		
179	LEU	0		
180	TYR	6		
181	SER	0		
182	LEU	2		
183	SER	0		
184	SER	0		
185	VAL	0		
186	VAL	0		
187	THR	30		
188	VAL	0		
189	PRO	86		HC-P189C
190	SER	21		
191	SER	127		HC-S191C
192	SER	17		
193	LEU	0		
194	GLY	18		
195	THR	111		HC-T195C
196	GLN	79		
197	THR	90		HC-T197C
198	TYR	0		
199	ILE	25		
200	CYS	0		
201	ASN	8		
202	VAL	0		
203	ASN	22		
204	HIS	0		
205	LYS	217		HC-K205C
206	PRO	66		

043810

207	SER	50		HC-S207C
208	ASN	91		
209	THR	24		
210	LYS	234	Димер	
211	VAL	30		
212	ASP	97		HC-D212C
213	LYS	70		
214	LYS	146		
215	ALA	0		
216	GLU	79		
217	PRO	0		
218	LYS	4		
219	SER	149		
220	CYS	7		
221	ASP	0	Шарнир	
222	LYS	208	Шарнир	
223	THR	112	Шарнир	
224	HIS	1	Шарнир	
225	THR	22	Шарнир	
226	CYS	12	Шарнир	
227	PRO	22	Шарнир	
228	PRO	133	Шарнир	
229	CYS	7	Шарнир	
230	PRO	84	Шарнир	
231	ALA	114	Шарнир	
232	PRO	49	Шарнир	
233	GLU	114	Шарнир	
234	LEU	90		
235	LEU	88		
236	GLY	9		
237	GLY	46		
238	PRO	14		
239	SER	9		
240	VAL	0		

043810

241	PHE	0		
242	LEU	0		
243	PHE	1		
244	PRO	34		
245	PRO	0		
246	LYS	55		HC-K246C
247	PRO	18		
248	LYS	47		
249	ASP	1		
250	THR	0	Связывание FcRn	
251	LEU	0		
252	MET	53	Связывание Белка А, FcRn	
253	ILE	155	Связывание Белка А	
254	SER	157	Связывание Белка А, FcRn	
255	ARG	103		
256	THR	86	Связывание FcRn	
257	PRO	0	Связывание FcRn	
258	GLU	42		HC-E258C
259	VAL	0	Связывание FcRn	
260	THR	0		
261	CYS	0		
262	VAL	0		
263	VAL	0		
264	VAL	0		
265	ASP	11	Связывание FcRn	
266	VAL	0		
267	SER	10		

043810

268	HIS	79		
269	GLU	189		HC-E269C
270	ASP	23		
271	PRO	20		
272	GLU	152		
273	VAL	19		
274	LYS	138		HC-K274C
275	PHE	2		
276	ASN	1		
277	TRP	0		
278	TYR	14		
279	VAL	0		
280	ASP	66		
281	GLY	72		
282	VAL	141		
283	GLU	80		
284	VAL	25		
285	HIS	133		
286	ASN	119		HC-N286C
287	ALA	67		
288	LYS	182		HC-K288C
289	THR	5		
290	LYS	177		HC-K290C
291	PRO	51		
292	ARG	252		HC-R292C
293	GLU	83		HC-E293C
294	GLU	73		HC-E294C
295	GTN	170		
296	TYR	29		
297	ASN	61	Гликозилиро- вание	
298	SER	125	Гликозилиро- вание	

043810

299	THR	2	Гликозилирование	
300	TYR	28		
301	ARG	18		
302	VAL	0		
303	VAL	10		
304	SER	0		
305	VAL	17		
306	LEU	0		
307	THR	27	Связывание FcRn	
308	VAL	0	Связывание FcRn	
309	LEU	122		
310	HIS	4	Связывание Белка А	
311	GLN	145	Связывание Белка А, FcRn	
312	ASP	14		
313	TRP	0		
314	LEU	6	Связывание Белка А	
315	ASN	151	Связывание Белка А	
316	GLY	12		
317	LYS	81		
318	GLU	49		
319	TYR	0		
320	LYS	55		HC-K320C
321	CYS	0		
322	LYS	78		HC-K322C
323	VAL	0		
324	SER	0		
325	ASN	0		
326	LYS	213		HC-K326C

043810

327	ALA	10		
328	LEU	9		
329	PRO	158		
330	ALA	96		HC-A330C
331	PRO	44		
332	ILE	32		
333	GLU	85		HC-E333C
334	LYS	50		HC-K334C
335	THR	70		HC-T335C
336	ILE	13		
337	SER	15		HC-S337C
338	LYS	0		
339	ALA	37		
340	LYS	217	Связывание Белка А	
341	GLY	37		
342	GLN	235		
343	PRO	42		
344	ARG	98		HC-R344C
345	GLU	105		
346	PRO	0		
347	GLN	24		
348	VAL	3		
349	TYR	3		
350	THR	0		
351	LEU	0		
352	PRO	38		
353	PRO	0		
354	SER	0		
355	ARG	249		HC-R355C
356	ASP	53		
357	GLU	0		
358	LEU	36		
359	THR	144	Димер	

043810

360	LYS	114		HC-K360C
361	ASN	155		
362	GLN	41		HC-Q362C
363	VAL	0		
364	SER	0		
365	LEU	0		
366	THR	0		
367	CYS	0		
368	LEU	0		
369	VAL	0		
370	LYS	1		
371	GLY	0		
372	PHE	0		
373	TYR	23		
374	PRO	0		
375	SER	29		HC-S375C
376	ASP	9		
377	ILE	11		
378	ALA	11		
379	VAL	4		
380	GLU	18	Связывание FcRn	
381	TRP	0		
382	GLU	22		HC-E382C
383	SER	1		
384	ASN	147		
385	GLY	102	Димер	
386	GLN	161		
387	PRO	99		
388	GLU	4		
389	ASN	189		HC-N389C
390	ASN	36		HC-N390C
391	TYR	44		
392	LYS	82		HC-K392C

043810

393	THR	36		HC-T393C
394	THR	0		
395	PRO	72		
396	PRO	47		
397	VAL	9		
398	LEU	111		HC-L398C
399	ASP	0		
400	SER	81		HC-S400C
401	ASP	68		
402	GLY	29		
403	SER	0		
404	PHE	22		
405	PHE	0		
406	LEU	0		
407	TYR	0		
408	SER	0		
409	LYS	0		
410	LEU	0		
411	THR	0		
412	VAL	0		
413	ASP	80		HC-D413C
414	LYS	83		
415	SER	69		HC-S415C
416	ARG	53		
417	TRP	0		
418	GLN	108		
419	GLN	177		
420	GLY	39		
421	ASN	35		
422	VAL	81		HC-V422C
423	PHE	0		
424	SER	2		
425	CYS	0		
426	SER	0		

043810

427	VAL	0		
428	MET	0	Связывание FcRn	
429	HIS	0		
430	GLU	14		
431	ALA	22		
432	LEU	1		
433	HIS	227	Связывание Белка А	
434	ASN	126	Связывание Белка А, FcRn	
435	HIS	28		
436	TYR	54		
437	THR	36		
438	GLN	82		
439	LYS	12		
440	SER	62		
441	LEU	2		
442	SER	34		
443	LEU	101		
444	SER	70	Димер	

Таблица 7

Поверхностная доступность аминокислотных остатков в каппа легкой цепи человека. Поверхностную доступность рассчитывали, используя Surface Racer 5.0 и выражали в квадратных Ангстремах [Å²]. "Выбранные участки" указывают на участки, выбранные для замены на Cys в изобретении

Eu номер	Оста-ток	Поверх-ностная доступ-ность [Å ²]	Выбранные участки	Eu номер	Оста-ток	Поверх-ностная доступ-ность [Å ²]	Выбранные участки
107	LYS	90	LC-K107C	161	GLU	66	LC-E161C
108	ARG	49	LC-R108C	162	SER	8	
109	THR	148	LC-T109C	163	VAL	14	
110	VAL	77		164	THR	5	
111	ALA	16		165	GLU	74	LC-E165C
112	ALA	50	LC-A112C	166	GLN	8	
113	PRO	2		167	ASP	13	
114	SER	39	LC-S114C	168	SER	170	LC-S168C
115	VAL	0		169	LYS	241	LC-K169C
116	PHE	0		170	ASP	48	LC-D170C
117	ILE	0		171	SER	1	
118	PHE	0		172	THR	0	
119	PRO	0		173	TYR	0	
120	PRO	0		174	SER	0	
121	SER	0		175	LEU	0	
122	ASP	90	LC-D122C	176	SER	0	
123	GLU	51	LC-E123C	177	SER	0	
124	GLN	0		178	THR	0	
125	LEU	21		179	LEU	0	
126	LYS	230		180	THR	13	
127	SER	101		181	LEU	21	
128	GLY	12		182	SER	59	LC-S182C
129	THR	41	LC-T129C	183	LYS	131	LC-K183C
130	ALA	0		184	ALA	32	
131	SER	0		185	ASP	52	
132	VAL	0		186	TYR	0	
133	VAL	0		187	GLU	77	
134	CYS	0		188	LYS	201	LC-K188C
135	LEU	0		189	HIS	42	
136	LEU	0		190	LYS	167	LC-K190C
137	ASN	5		191	VAL	58	LC-V191C
138	ASN	18		192	TYR	0	
139	PHE	0		193	ALA	0	
140	TYR	0		194	CYS	0	
141	PRO	3		195	GLU	12	
142	ARG	55	LC-R142C	196	VAL	0	
143	GLU	117	LC-E143C	197	THR	38	LC-T197C
144	ALA	7		198	HIS	4	
145	LYS	160	LC-K145C	199	GLN	127	LC-Q199C
146	VAL	11		200	GLY	11	
147	GLN	22		201	LEU	17	
148	TRP	0		202	ARG	343	
149	LYS	48		203	SER	110	LC-S203C
150	VAL	0		204	PRO	69	

151	ASP	59		205	VAL	30	
152	ASN	157	LC-N152C	206	THR	70	LC-T206C
153	ALA	51		207	LYS	44	
154	LEU	117	LC-L154C	208	SER	47	
155	GLN	26		209	PHE	5	
156	SER	122	LC-S156C	210	ASN	44	
157	GLY	114		211	ARG	89	
158	ASN	19		212	GLY	15	
159	SER	22	LC-S159C	213	GLU	107	
160	GLN	36		214	CYS	58	

Пример 2. Получение мутантных антител трастузумаб Cys.

ДНК, кодирующие вариабельные области тяжелой и легкой цепей трастузумаб, были химически синтезированы и клонированы в два вектора экспрессии млекопитающих, рOG-НС и рOG-LC, которые содержат константные области человеческого IgG1 и человеческой каппа легкой цепи, что приводило в результате к двум конструкциям дикого типа, рOG-трастузумаб НС и рOG-трастузумаб LC, соответственно. В векторах экспрессия конструкций тяжелой и легкой цепей антитела в клетках млекопитающих направляется CMV промотором. Векторы содержат синтетическую сигнальную последовательность из 24 аминокислот: MKTFILLWVLLLWVFLLPGATA (SEQ ID NO: 99), в N-конце тяжелой цепи или легкой цепи для проведения их секреции из клеток млекопитающих. Сигнальную последовательность утверждали как эффективную при направлении секреции белка для сотен белков млекопитающих в 293 Freestyle™ клетках. Олигонуклеотид-направленный мутагенез использовали для получения Cys-мутантных конструкций в трастузумаб. Были химически синтезированы 88 пар праймеров мутации (табл. 8), которые соответствуют 88 участкам Cys мутации, выбранным в константных областях тяжелой цепи и каппа легкой цепи человеческого IgG1, как описано в Примере 1. Смысловые и антисмысловые пары праймеров мутации смешивали перед ПЦР амплификацией. ПЦР реакции выполняли, применяя PfuUltra II Fusion HS ДНК Полимеразу (Stratagene) с рOG-трастузумаб НС и рOG-трастузумаб LC в качестве матриц. После ПЦР реакций, ПЦР продукты подтверждали на агарозных гелях, и обрабатывали DPN I с последующей трансформацией в клетках DH5a (Klocket al. (2009) Methods Mol Biol. 498:91-103).

Последовательности 88 Cys-мутантных конструкций подтверждали секвенированием ДНК. Аминокислотная последовательность непроцессированной тяжелой цепи трастузумаб дикого типа показана как SEQ ID NO: 1, а такая последовательность легкой цепи - как SEQ ID NO: 90. Кодированные последовательности белка константной области 59 трастузумаб НС Cys-мутантных конструкций (SEQ ID NO: 2 через SEQ ID NO: 60) и 29 трастузумаб LC Cys-мутантных конструкций (SEQ ID NO: 61 - SEQ ID NO: 89) показаны в табл. 9 и табл. 10, соответственно. Аминокислотные остатки в тяжелой цепи человеческого IgG1 и человеческой каппа легкой цепи нумеруют посредством Eu системы нумерации (Edelman et al, (1969) Proc Natl Acad Sci USA, 63:78-85).

Таблица 8

Последовательности ДНК праймеров мутации, используемых для получения 88 Cys мутаций тяжелой и легкой цепей человеческого IgG1

Участки мутации	Наименование праймера	Последовательность	SEQ ID NO.
LC-K107C	LC-CYS-S1	GTGGAGATCTGTGCAACGGTGG CCGCTCCCAGCGTGTTC	100
	LC-CYS-A1	ACCGTTCGACAGATCTCCACCT TGGTACCCTGTCCGAAC	101
LC-R108C	LC-CYS-S2	GGAGATCAAATGCACGGTGGCC GCTCCCAGCGTGTTCATCT	102
	LC-CYS-A2	GCCACCGTGCATTTGATCTCCA CCTTGGTACCCTGTCCGA	103
LC-T109C	LC-CYS-S3	GATCAAACGATGTGTGGCCGCT CCCAGCGTGTTCATCTTCC	104
	LC-CYS-A3	GCGGCCACACATCGTTTGATCT CCACCTTGGTACCCTGTTC	105
LC-A112C	LC-CYS-S4	ACGGTGGCCTGTCCCAGCGTGT TCATCTTCCCCCAGCGA	106

	LC-CYS-A4	CACGCTGGGACAGGCCACCGTT CGTTTGATCTCCACCTTG	107
LC-S114C	LC-CYS-S5	GCCGCTCCCTGCGTGTTCATCT TCCCCCAGCGACGAGCA	108
	LC-CYS-A5	ATGAACACGCAGGGAGCGGCCA CCGTTGCTTTGATCTCCA	109
LC-D122C	LC-CYS-S6	CCCCAGCTGTGAGCAGCTGAA GAGCGGCACCGCCAGCGT	110
	LC-CYS-A6	CAGCTGCTCACAGCTGGGGGG AAGATGAACACGCTGGGA	111
LC-E123C	LC-CYS-S7	CCCAGCGACTGTGAGCTGAAGA GCGGCACCGCCAGCGTG	112
	LC-CYS-A7	TTCAGCTGACAGTCGCTGGGGG GGAAGATGAACACGCTG	113
LC-T129C	LC-CYS-S10	AGAGCGGCTGTGCCAGCGTGGT GTGCCTGCTGAACAATT	114
	LC-CYS-A10	CACGCTGGCACAGCCGCTCTTC AGCTGCTCGTCGCTGGGG	115
LC-R142C	LC-CYS-S11	TCTACCCCTGTGAGGCCAAGGT GCAGTGGAAAGGTGGACAA	116
	LC-CYS-A11	TTGGCCTCACAGGGGTAGAAGT TGTTTCAGCAGGCACACCA	117
LC-E143C	LC-CYS-S12	TACCCCGGTGTGCCAAGGTGC AGTGGAAAGGTGGACAAC	118
	LC-CYS-A12	ACCTTGGCACACCGGGGGTAGA AGTTGTTTCAGCAGGCACA	119
LC-K145C	LC-CYS-S13	CGGGAGGCCTGCGTGCAGTGA AGGTGGACAACGCCCTGC	120
	LC-CYS-A13	CACTGCACGCAGGCCTCCCGGG GGTAGAAGTTGTTTCAGCA	121
LC-N152C	LC-CYS-S14	AAGGTGGACTGTGCCCTGCAGA GCGGCAACAGCCAGGAGA	122
	LC-CYS-A14	TGCAGGGCACAGTCCACCTTCC ACTGCACCTTGGCCTCCC	123

LC-L154C	LC-CYS-S15	GACAACGCCTGTCAGAGCGGCA ACAGCCAGGAGAGCGTCA	124
	LC-CYS-A15	TGCCGCTCTGACAGGCGTTGTC CACCTTCCACTGCACCTTG	125
LC-S156C	LC-CYS-S16	GCCCTGCAGTGTGGCAACAGCC AGGAGAGCGTCACCGAGCA	126
	LC-CYS-A16	GCTGTTGCCACACTGCAGGGCG TTGTCCACCTTCCACTGCA	127
LC-S159C	LC-CYS-S18	AGCGGCAACTGTCAGGAGAGCG TCACCGAGCAGGACAGCAA	128
	LC-CYS-A18	CTCTCCTGACAGTTGCCGCTCT GCAGGGCGTTGTCCACCT	129
LC-E161C	LC-CYS-S19	AACAGCCAGTGCAGCGTCACCG AGCAGGACAGCAAGGACT	130
	LC-CYS-A19	GTGACGCTGCACTGGCTGTTGC CGCTCTGCAGGGCGTTGT	131
LC-E165C	LC-CYS-S20	GAGCGTCACCTGTCAGGACAGC AAGGACTCCACCTACAGC	132
	LC-CYS-A20	CTGTCTGACAGGTGACGCTCT CCTGGCTGTTGCCGCTCT	133
LC-S168C	LC-CYS-S21	GAGCAGGACTGCAAGGACTCCA CCTACAGCCTGAGCAGCA	134
	LC-CYS-A21	GAGTCCTTGCACTGCTGCTCGG TGACGCTCTCCTGGCTGT	135
LC-K169C	LC-CYS-S22	CAGGACAGCTGTGACTCCACCT ACAGCCTGAGCAGCACC	136
	LC-CYS-A22	GTGGAGTCACAGCTGCTCCTGCT CGGTGACGCTCTCCTGG	137
LC-D170C	LC-CYS-S23	ACAGCAAGTAGTCCACCTACAG CCTGAGCAGCACCTGAC	138
	LC-CYS-A23	TAGGTGGACTACTTGCTGTCCT GCTCGGTGACGCTCTCCT	139
LC-S182C	LC-CYS-S24	TGACCCTGTGCAAGGCCGACTA CGAGAAGCATAAGGTGTA	140

043810

	LC-CYS-A24	GTCGGCCTTGCACAGGGTCAGG GTGCTGCTCAGGCTGTAG	141
LC-K183C	LC-CYS-S25	GACCCTGAGCTGTGCCGACTAC GAGAAGCATAAGGTGTAC	142
	LC-CYS-A25	TAGTCGGCACAGCTCAGGGTCA GGGTGCTGCTCAGGCTGT	143
LC-K188C	LC-CYS-S26	GACTACGAGTGCCATAAGGTGT ACGCCTGCGAGGTGAC	144
	LC-CYS-A26	ACCTTATGGCACTCGTAGTCGG CCTTGCTCAGGGTCAGG	145
LC-K190C	LC-CYS-S27	GAGAAGCATTGCGTGTACGCCT GCGAGGTGACCCACCAG	146
	LC-CYS-A27	GGCGTACACGCAATGCTTCTCG TAGTCGGCCTTGCTCAGG	147
LC-V191C	LC-CYS-S28	AGCATAAGTAGTACGCCTGCGA GGTGACCCACCAGGGCCT	148
	LC-CYS-A28	CAGGCGTACTACTTATGCTTCT CGTAGTCGGCCTTGCTCA	149
LC-T197C	LC-CYS-S29	GCGAGGTGTGTACCAGGGCCT GTCCAGCCCCGTGACCAA	150
	LC-CYS-A29	CCCTGGTGACACACCTCGCAGG CGTACACCTTATGCTTCT	151
LC-Q199C	LC-CYS-S30	GTGACCCACTGTGGCCTGTCCA GCCCCGTGACCAAGAGCT	152
	LC-CYS-A30	GACAGGCCACAGTGGGTACCT CGCAGGCGTACACCTTAT	153
LC-S203C	LC-CYS-S31	GGCCTGTCCTGTCCCGTGACCA AGAGCTTCAACAGGGGCGA	154
	LC-CYS-A31	GTCACGGGACAGGACAGGCCCT GGTGGGTACCTCGCAGG	155
LC-T206C	LC-CYS-S32	CAGCCCCGTGTGCAAGAGCTTC AACAGGGGCGAGTGCTAA	156
	LC-CYS-A32	AAGCTCTTGACACGGGGCTGG ACAGGCCCTGGTGGGTC	157

043810

HC-S117C	HC-CYS-S1	CCGTCTCCTGCGCTAGCACCAA GGGCCCCAGCGTGTTTC	158
	HC-CYS-A1	GGTGCTAGCGCAGGAGACGGTG ACCAGGGTTCCTTGAC	159
HC-S119C	HC-CYS-S2	TCCTCGGCTTGTACCAAGGGCC CCAGCGTGTCCCCCTGG	160
	HC-CYS-A2	CCCTTGGTACAAGCCGAGGAGA CGGTGACCAGGGTTCCTT	161
HC-K121C	HC-CYS-S3	CTAGCACCTGTGGCCCCAGCGT GTTCCCCCTGGCCCCCA	162
	HC-CYS-A3	GCTGGGGCCACAGGTGCTAGCC GAGGAGACGGTGACCAG	163
HC-S124C	HC-CYS-S4	AGGGCCCCTGTGTGTTCCCCCT GGCCCCCAGCAGCAAGA	164
	HC-CYS-A4	GGGGAACACACAGGGCCCTTG GTGCTAGCCGAGGAGACG	165
HC-S132C	HC-CYS-S5	CCCCCAGCTGCAAGAGCACCAG CGGCGGCACAGCCGCCCT	166
	HC-CYS-A5	GGTGCTCTTGCAGCTGGGGGCC AGGGGGAACACGCTGGGG	167
HC-S134C	HC-CYS-S6	AGCAGCAAGTGTACCAGCGGCG GCACAGCCGCCCTGGGCT	168
	HC-CYS-A6	CCGCTGGTACACTGCTGCTGG GGGCCAGGGGGAACACG	169
HC-S136C	HC-CYS-S7	AGAGCACCTGTGGCGGCACAGC CGCCCTGGGCTGCCTGGT	170
	HC-CYS-A7	GTGCCGCCACAGGTGCTCTTGC TGCTGGGGGCCAGGGGGA	171
HC-T139C	HC-CYS-S8	AGCGGCGGCTGTGCCGCCCTGG GCTGCCTGGTGAAGGACT	172
	HC-CYS-A8	CAGGGCGGCACAGCCGCCGCTG GTGCTCTTGCTGCTGGGG	173
HC-E152C	HC-CYS-S9	TACTTCCCCTGTCCCGTGACCG TGTCCTGGAACAGCGGA	174

043810

	HC-CYS-A9	GGTCACGGGACAGGGGAAGTAG TCCTTCACCAGGCAGC	175
HC-P153C	HC-CYS-S10	TCCCCGAGTGCGTGACCGTGTC CTGGAACAGCGGAGCCCT	176
	HC-CYS-A10	CACGGTCACGCACTCGGGGAAG TAGTCCTTCACCAGGCAG	177
HC-T155C	HC-CYS-S11	GAGCCCCTGTGCGTGCTCCTGGA ACAGCGGAGCCCTGACCT	178
	HC-CYS-A11	CAGGACACGCACACGGGCTCGG GGAAGTAGTCCTTCACCA	179
HC-S157C	HC-CYS-S12	TGACCGTGCTGGAACAGCGG AGCCCTGACCTCCGGCGT	180
	HC-CYS-A12	CTGTTCCAGCACACGGTCACGG GCTCGGGGAAGTAGTCCT	181
HC-T164C	HC-CYS-S13	GGAGCCCTGTGCTCCGGCGTGC ACACCTTCCCCGCCGTGCT	182
	HC-CYS-A13	ACGCCGGAGCACAGGGCTCCGC TGTTCCAGGACACGGTCA	183
HC-S165C	HC-CYS-S14	CCCTGACCTGTGGCGTGACAC CTTCCCCGCCGTGCTGCA	184
	HC-CYS-A14	TGTGCACGCCACAGGTCAGGGC TCCGCTGTTCCAGGACAC	185
HC-T169C	HC-CYS-S15	GCGTGCACTGCTTCCCCGCCGT GCTGCAGAGCAGCGGCCT	186
	HC-CYS-A15	GGCGGGGAAGCAGTGACGCCG GAGGTCAGGGCTCCGCTG	187
HC-P171C	HC-CYS-S16	CACACCTTCTGTGCCGTGCTGC AGAGCAGCGGCCTGTACA	188
	HC-CYS-A16	CAGCACGGCACAGAAGGTGTGC ACGCCGAGGTCAGGGCT	189
HC-L174C	HC-CYS-S17	CCGCCGTGTGTCAGAGCAGCGG CCTGTACAGCCTGTCCA	190
	HC-CYS-A17	GCTGCTCTGACACACGGCGGGG AAGGTGTGCACGCCGAG	191

043810

HC-S176C	HC-CYS-S18	TGCTGCAGTGCAGCGGCCTGTA CAGCCTGTCCAGCGTGGT	192
	HC-CYS-A18	ACAGGCCGCTGCACTGCAGCAC GGCGGGGAAGGTGTGCACG	193
HC-S177C	HC-CYS-S19	CTGCAGAGCTGTGGCCTGTACA GCCTGTCCAGCGTGGTGA	194
	HC-CYS-A19	TACAGGCCACAGCTCTGCAGCA CGGCGGGGAAGGTGTGCA	195
HC-P189C	HC-CYS-S21	TGACAGTGTGCAGCAGCAGCCT GGGCACCCAGACCTACAT	196
	HC-CYS-A21	CTGCTGCTGCACACTGTCACCA CGCTGGACAGGCTGTACA	197
HC-S191C	HC-CYS-S22	TGCCCAGCTGCAGCCTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAA	198
	HC-CYS-A22	CCCAGGCTGCAGCTGGGCACTG TCACCACGCTGGACAGGCT	199
HC-T195C	HC-CYS-S23	GCCTGGGCTGTCAGACCTACAT CTGCAACGTGAACCACAA	200
	HC-CYS-A23	GTAGGTCTGACAGCCAGGCTG CTGCTGGGCACTGTCACCA	201
HC-T197C	HC-CYS-S24	GCACCCAGTGTACATCTGCAA CGTGAACCACAAGCCCA	202
	HC-CYS-A24	GCAGATGTAGCACTGGGTGCC AGGCTGCTGCTGGGCACT	203
HC-K205C	HC-CYS-S25	TGAACCACTGTCCCAGCAACAC CAAGGTGGACAAGAGAGT	204
	HC-CYS-A25	TGTTGCTGGGACAGTGGTTCAC GTTGCAGATGTAGGTCTGG	205
HC-S207C	HC-CYS-S26	ACAAGCCCTGCAACACCAAGGT GGACAAGAGAGTGGAGC	206
	HC-CYS-A26	CTTGGTGTTCAGGGCTTGTGG TTCACGTTGCAGATGTAG	207
HC-D212C	HC-CYS-S27	ACCAAGGTGTGCAAGAGAGTGG AGCCCAAGAGCTGCGACA	208

043810

	HC-CYS-A27	CACTCTCTGCACACCTTGGTG TTGCTGGGCTTGTGGTTCA	209
HC-K246C	HC-CYS-S28	TCCCCCCTGTCCCAAGGACAC CCTGATGATCAGCAGGA	210
	HC-CYS-A28	GTCTTGGGACAGGGGGGAAC AGGAACACGGAGGGTCCG	211
HC-E258C	HC-CYS-S29	AGGACCCCTGCGTGACCTGCG TGGTGGTGGACGTGAG	212
	HC-CYS-A29	CAGGTCACGCAGGGGGTCCTGC TGATCATCAGGGTGTCTT	213
HC-E269C	HC-CYS-S30	TGAGCCACTGTGACCCAGAGGT GAAGTTCAACTGGTACG	214
	HC-CYS-A30	CTCTGGGTCACAGTGGCTCACG TCCACCACCACGCAGGTC	215
HC-K274C	HC-CYS-S32	CCAGAGGTGTGCTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGG	216
	HC-CYS-A32	CCAGTTGAAGCACACCTCTGGG TCCTCGTGGCTCACGTCCA	217
HC-N286C	HC-CYS-S35	GAGGTGCACTGTGCCAAGACCA AGCCCAGAGAGGAGCAGT	218
	HC-CYS-A35	GGTCTTGGCACAGTGCACCTCC ACGCCGTCCACGTACCAGT	219
HC-K288C	HC-CYS-S36	CACAACGCCTGTACCAAGCCCA GAGAGGAGCAGTACAACA	220
	HC-CYS-A36	GGCTTGGTACAGGCGTTGTGCA CCTCCACGCCGTCCACGT	221
HC-K290C	HC-CYS-S37	GCCAAGACCTGTCCAGAGAGG AGCAGTACAACAGCACCT	222
	HC-CYS-A37	CTCTCTGGGACAGGTCTTGGCG TTGTGCACCTCCACGCCGT	223
HC-R292C	HC-CYS-S38	ACCAAGCCCTGTGAGGAGCAGT ACAACAGCACCTACAGGGT	224
	HC-CYS-A38	CTGCTCCTCACAGGGCTTGGTC TTGGCGTTGTGCACCTCCA	225

043810

HC-E293C	HC-CYS-S39	CAAGCCCAGATGCGAGCAGTAC AACAGCACCTACAGGGTG	226
	HC-CYS-A39	GTACTGCTCGCATCTGGGCTTG GTCTTGGCGTTGTGCACCT	227
HC-E294C	HC-CYS-S40	GCCCAGAGAGTGTGAGTACAAC AGCACCTACAGGGTGGT	228
	HC-CYS-A40	TTGACTGACACTCTCTGGGCT TGGTCTTGGCGTTGTGCA	229
HC-K320C	HC-CYS-S41	CAAGGAATACTGCTGCAAGGTC TCCAACAAGGCCCTGCCA	230
	HC-CYS-A41	GACCTTGACAGCAGTATTCCTTG CCGTTACGCCAGTCCCTGGT	231
HC-K322C	HC-CYS-S42	TACAAGTGTGCGTCTCCAACA AGGCCCTGCCAGCCCCCA	232
	HC-CYS-A42	GTTGGAGACGCAGCACTTGTAT TCCTTGCCGTTACGCCAGT	233
HC-K326C	HC-CYS-S43	GGTCTCCAAGTGTGCCCTGCCA GCCCCATCGAAAAGACC	234
	HC-CYS-A43	GGCAGGGCACAGTTGGAGACCT TGCACTTGTATTCCCTTGC	235
HC-A330C	HC-CYS-S44	GCCCTGCCATGTCCCATCGAAA AGACCATCAGCAAGGCCA	236
	HC-CYS-A44	TTCGATGGGACATGGCAGGGCC TTGTTGGAGACCTTGCACT	237
HC-E333C	HC-CYS-S45	GCCCCATCTGCAAGACCATCA GCAAGGCCAAGGGCCAGC	238
	HC-CYS-A45	GATGGTCTTGCAGATGGGGGCT GGCAGGGCCTTGTGGAGA	239
HC-K334C	HC-CYS-S46	CCCATCGAATGCACCATCAGCA AGGCCAAGGGCCAGCCA	240
	HC-CYS-A46	GCTGATGGTGCATTGATGGGG GCTGGCAGGGCCTTGTTG	241
HC-T335C	HC-CYS-S47	TCGAAAAGTGCATCAGCAAGGC CAAGGGCCAGCCACGGGA	242

	HC-CYS-A47	CTTGCTGATGCACTTTTCGATG GGGGCTGGCAGGGCCTTGT	243
HC-S337C	HC-CYS-S48	AGACCATCTGCAAGGCCAAGGG CCAGCCACGGGAGCCCCA	244
	HC-CYS-A48	CCTTGGCCTTGCAGATGGTCTT TTCGATGGGGCTGGCAGG	245
HC-R344C	HC-CYS-S50	GGCCAGCCATGCGAGCCCCAGG TGTACACCCTGCCTCCAT	246
	HC-CYS-A50	CTGGGGCTCGCATGGCTGGCCC TTGGCCTTGCTGATGGTCT	247
HC-R355C	HC-CYS-S51	CTCCATCCTGCGACGAGCTGAC CAAGAACCAGGTGTCCCT	248
	HC-CYS-A51	CAGCTCGTGCAGGATGGAGGC AGGGTGTACACCTGGGGCT	249
HC-K360C	HC-CYS-S52	AGCTGACCTGCAACCAGGTGTC CCTGACCTGTCTGGTGA	250
	HC-CYS-A52	CACCTGGTTGCAGGTCAGCTCG TCCCGGGATGGAGGCAGG	251
HC-Q362C	HC-CYS-S53	CCAAGAACTGCGTGTCCCTGAC CTGTCTGGTGAAGGGCTT	252
	HC-CYS-A53	TCAGGGACACGCAGTTCTTGGT CAGCTCGTCCCGGGATGGA	253
HC-S375C	HC-CYS-S54	TTCTACCCCTGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAACG	254
	HC-CYS-A54	GGCGATGTCGCAGGGGTAGAAG CCCTTCACCAGACAGGTCA	255
HC-E382C	HC-CYS-S55	TGGAGTGGTGCAGCAACGGCCA GCCCCGAGAACAACACTACA	256
	HC-CYS-A55	GGCCGTTGCTGCACCACTCCAC GGCGATGTCGCTGGGGTAG	257
HC-N389C	HC-CYS-S56	AGCCCGAGTGCAACTACAAGAC CACCCCCCAGTGCTGGA	258
	HC-CYS-A56	CTTGTAGTTGCACTCGGGCTGG CCGTTGCTCTCCCACTCCA	259

043810

HC-N390C	HC-CYS-S57	CCCGAGAAGTGTACAAGACCA CCCCCCAGTGTGGACA	260
	HC-CYS-A57	GGTCTTGTAGCAGTTCTCGGGC TGGCCGTTGCTCTCCCACT	261
HC-K392C	HC-CYS-S58	GAACAAGTACTGCACCACCCCC CCAGTGTGGACAGCGAC	262
	HC-CYS-A58	GGGGTGGTGCAGTAGTTGTTCT CGGGCTGGCCGTTGCTCT	263
HC-T393C	HC-CYS-S59	AAGTACAAGTGTACCCCCCAG TGCTGGACAGCGACGGCA	264
	HC-CYS-A59	TGGGGGGGTACACTTGTAGTTG TTCTCGGGCTGGCCGTTG	265
HC-L398C	HC-CYS-S60	CCCCAGTGTGTGACAGCGACGG CAGCTTCTTCTGTACA	266
	HC-CYS-A60	GTCGCTGTCACACTGGGGGG GTGGTCTGTAGTTGTTCT	267
HC-S400C	HC-CYS-S61	TGCTGGACTGCGACGGCAGCTT CTTCTGTACAGCAAGCT	268
	HC-CYS-A61	GCTGCCGTCGACAGTCCAGCACT GGGGGGTGGTCTTGTAGT	269
HC-D413C	HC-CYS-S62	TGACCGTGTGCAAGTCCAGGTG GCAGCAGGGCAACGTGTT	270
	HC-CYS-A62	ACCTGGACTTGCACACGGTCAG CTTGCTGTACAGGAAGAAG	271
HC-S415C	HC-CYS-S63	TGGACAAGTGCAGGTGGCAGCA GGGCAACGTGTTGAGCT	272
	HC-CYS-A63	CTGCCACCTGCACTTGTCCACG GTCAGCTTGCTGTACAGG	273
HC-V422C	HC-CYS-S64	AGGGCAACTGCTTCAGCTGCAG CGTGATGCACGAGGCCCT	274
	HC-CYS-A64	GCAGCTGAAGCAGTTGCCCTGC TGCCACCTGGACTTGTCCA	275

Таблица 9

Аминокислотные последовательности константных областей Cys-мутантных конструкций в тяжелой цепи человеческого IgG1. SEQ ID NO: 1 представляет собой последовательность непроцессированного тростузамаб (человеческий IgG1). SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 60 показывают последовательность ID номеров для 59 Cys-мутантных конструкций в тяжелой цепи человеческого IgG1, показывая только последовательности константной области.

<p>SEQ ID NO:1</p> <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYA DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDITLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p> <p>SEQ ID NO:2</p> <p>CASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDITLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:3</p> <p>SACTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDITLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGIFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

<p>SEQ ID NO: 4</p> <p>SASTCGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 5</p> <p>SASTKGPCVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 6</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 7</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKCTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 8</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTCGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

<p>SEQ ID NO: 9</p> <p>SASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGCAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFFAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 10</p> <p>SASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPCPVTVSWNSGALTSVHTFFAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 11</p> <p>SASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPECVTVSWNSGALTSVHTFFAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 12</p> <p>SASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVCVSWNSGALTSVHTFFAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGCP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 13</p> <p>SASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVCWNSGALTSVHTFFAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

<p>SEQ ID NO:14</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALCSGVHTFFAVLQSS GLYLSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:15</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTCGVHTFFAVLQSS GLYLSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:16</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVGHCFPAVLQSS GLYLSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:17</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVGHVTFCAVLQSS GLYLSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:18</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVGHVTFFAVCQSS GLYLSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

<p>SEQ ID NO:19</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQCS GLYLSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:20</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSC GLYLSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:21</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYLSLSSVTVCSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:22</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYLSLSSVTVPSCSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:23</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYLSLSSVTVPSSSLGCQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

<p>SEQ ID NO:24</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQCYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:25</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:26</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPCNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:27</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVCKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:28</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

SEQ ID NO:29 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPCVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:30 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHCDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:31 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVCFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:32 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHCAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO:33 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

<p>SEQ ID NO: 34</p> <p>SASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFFAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTCPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 35</p> <p>SASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFFAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 36</p> <p>SASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFFAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRCEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 37</p> <p>SASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFFAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 38</p> <p>SASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFFAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

<p>SEQ ID NO: 39</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYLSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCCVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 40</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYLSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 41</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYLSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPCPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 42</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYLSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 43</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYLSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

<p>SEQ ID NO: 44</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFFAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 45</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFFAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTICKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 46</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFFAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPCPEPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 47</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFFAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGCP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSCEEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 48</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFFAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

<p>SEQ ID NO: 49</p> <p>SASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NCVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 50</p> <p>SASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPCDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 51</p> <p>SASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 52</p> <p>SASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPECNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 53</p> <p>SASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENCYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

SEQ ID NO: 54 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGSP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYCTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 55 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGSP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKCTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 56 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGSP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVCDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 57 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGSP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
SEQ ID NO: 58 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGSP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVCKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

<p>SEQ ID NO: 59</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYLSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKCRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 60</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYLSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN CFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO 290:</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYLSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE<u>CT</u>ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPY<u>P</u>CDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO:</p> <p>291SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYLSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE<u>CT</u>ISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNY<u>CT</u>TPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 292</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYLSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE<u>CT</u>ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT<u>C</u> NQVSLTCLVKGFPY<u>P</u>CDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 293</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYLSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE<u>CT</u>ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT<u>C</u> NQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNY<u>CT</u>TPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 294</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYLSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE<u>CT</u>ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPY<u>P</u>CDIAVEWESNGQPENNY<u>CT</u>TPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>
<p>SEQ ID NO: 295</p> <p>SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF<u>P</u>CVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYLSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFPY<u>P</u>CDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>

Таблица 10

Аминокислотные последовательности константной области 29 Cys-мутантных конструкций человеческой каппа легкой цепи. SEQ ID NO: 61 представляет собой последовательность константной области человеческой каппа легкой цепи дикого типа. SEQ ID NO: 62 - SEQ ID NO: 90 показывает последовательность ID номера для 29 Cys-мутантных конструкций в константной области человеческой каппа легкой цепи

SEQ ID NO: 61 CRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 62 KCTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 63 KRCVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 64 KRTVACPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 65 KRTVAAPCVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 66 KRTVAAPSVFIFPPSCEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 67 KRTVAAPSVFIFPPSDCQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 68 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGCASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 69 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPCEAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 70 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRCAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 71 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREACVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO: 72 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDCALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:73 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNACQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:74 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQCGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:75 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNCQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:76 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQCSVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:77 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTCQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:78 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD CKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:79 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SCDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:80 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKCSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:81 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:82 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:83 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYECHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:84
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:85
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:86
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVCHQGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:87
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHCGLSSPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:88
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSCPVTKSFNRGEC
SEQ ID NO:89
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVCKSFNRGEC
SEQ ID NO:90
DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR FSGSRGTDFTLTLSISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSK ADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Пример 3. Перенос Cys мутаций тяжелой цепи и легкой цепи трастузумаб в различные антитела.

Для трастузумаб, все Cys мутации для присоединения полезных нагрузок лекарственного средства выбирали в константной области его тяжелой цепи человеческого IgG1 и человеческой каппа легкой цепи. Поскольку константные области антител являются высоко консервативными в первичной последовательности и структуре, Cys мутантные остатки, которые идентифицируют в качестве хороших участков присоединения полезной нагрузки в контексте трастузумаб, будут также служить в качестве предпочтительных остатков для присоединения в других антителах. Для демонстрации переносимости этих родо-вых участков конъюгации в другие антитела, авторы клонировали набор Cys мутаций в антитело 14090. Антитело 14090 представляет собой антитело с тяжелой цепью человеческого IgG1 и человеческой лямбда легкой цепью, которое связывается с целевым белком, отличным от трастузумаб. ДНК, кодирующую вариабельную область антитела 14090, клонировали в семь выбранных Cys мутантных плазмидных конструкций рОG трастузумаб HC (SEQ ID NO приведены в табл. 11) для замены вариабельных областей конструкций трастузумаб в плазидах, как описано в Примере 2. В результате, аминокислотные последовательностей константных областей тяжелой цепи в соответствующих семи Cys конструкциях антитела 14090 и трастузумаб являются идентичными (фиг. 3). Последующие примеры показывают, что эти участки могут быть легко конъюгированы. Напротив, вследствие высокой степени подобия в первичных последовательностях и в третичных структурах для различных человеческих изоформ IgG (фиг. 4), Cys мутации в каппа легкой цепи трастузумаб могут легко переноситься в эквивалентные легкие цепи в человеческих антителах, содержащих тяжелые цепи различного изоформы. Таким же образом, участки, идентифицированные в константной области IgG1, могут переноситься в IgG2, IgG3 и IgG4.

Пример 4. Цистеиновые мутации в человеческих лямбда легких цепях.

Человеческие лямбда и каппа легкие цепи имеют небольшое подобие аминокислотных последовательностей (фиг. 5A). Мутации в лямбда легкой цепи антитела 14090 были выбраны на основе приблизительного сходства местоположений остатков в модели кристаллической структуры (Protein Databank structure вход 3G6D.pdb) Fab, содержащего человеческую лямбда легкая цепь в сравнении с желательными остатками в каппа легкой цепи трастузумаб (фиг. 5A и B). Семь дополнительных Cys-мутантных конструкций генерировали в плазмиду антитела 14090-лямбда легкой цепи, используя олигонуклеотид-направленный мутагенез (Higuchi et al. 1988) в комбинации со стратегией клонирования PIPE (Klock и Lesley, 2009). Праймеры мутации, применяемые для генерации Cys точечных мутаций в лямбда легкой цепи, приведены в табл. 12. Секретия антитела 14090 также направляется синтетической сигнальной последовательностью из 24 аминокислот: MKTFILLLVWLLWVIFLLPGATA (SEQ ID NO: 99). Последовательности конструкций антитела 14090 Cys подтверждали секвенированием ДНК. Последовательность для константной области человеческой лямбда легкой цепи дикого типа показана как SEQ ID NO: 91. Последовательности кодируемого белка семи Cys-мутантных конструкций в легкой цепи (SEQ ID NO: 92 - SEQ ID NO: 98) показаны в табл. 13. Последующие примеры покажут, что эти Cys мутанты эффективно конъюгируются с полезной нагрузкой ADC. Поскольку все из этих мутантов находятся в константной

области человеческой лямбда легкой цепи, эти участки конъюгации могут легко переноситься в другие антитела с лямбда легкими цепями.

Таблица 11

ID номера последовательностей Cys конструкций тяжелой цепи трастузумаб, применяемых для клонирования вариабельной области антитела 14090

ID NO последовательности Cys конструкции трастузумаб HC
SEQ ID NO:5
SEQ ID NO:8
SEQ ID NO:9
SEQ ID NO:10
SEQ ID NO:18
SEQ ID NO:48
SEQ ID NO:50

Таблица 12

Нуклеотидные последовательности праймеров, применяемых при мутагенезе семи Cys-мутантных конструкций в лямбда легкой цепи человеческого IgG1

Участки мутации	Наименование праймера	Последовательность	SEQ ID NO.
LC-A143C	Seq-0017	CCGGGATGCGTGACAGTGGCCTGG AAGGCAGATAGC	276
	Seq-0018	TGTCACGCATCCCGGGTAGAAGTC ACTTATGAGACA	277
LC-T145C	Seq-0019	GCCGTGTGTGTGGCCTGGAAGGCA GATAGCAGCCCC	278
	Seq-0020	GGCCACACACACGGCTCCCGGGTA GAAGTCACTTAT	279
LC-A147C	Seq-0021	ACAGTGTGTTGGAAGGCAGATAGC AGCCCCGTCAAG	280
	Seq-0022	CTTCCAACACACTGTCACGGCTCC CGGGTAGAAGTC	281
LC-K156C	Seq-0023	CCCGTCTGTGCGGGAGTGGAGACC ACCACACCCTCC	282
	Seq-0024	TCCCGCACAGACGGGGCTGTATC TGCCTTCCAGGC	283
LC-V159C	Seq-0025	GCGGGATGTGAGACCACCACACC TCCAAACAAGC	284
	Seq-0026	GGTCTCACATCCCGCCTTGACGGG GCTGCTATCTGC	285
LC-T163C	Seq-0027	ACCACCTGTCCCTCCAACAAGC ACAACAAGTAC	286
	Seq-0028	GGAGGGACAGGTGGTCTCCACTCC CGCCTTGACGGG	287
LC-S168C	Seq-0029	AAACAATGCAACAACAAGTACGCG GCCAGCAGCTAT	288
	Seq-0030	GTTGTTGCATTGTTTGGAGGGTGT GGTGGTCTCCAC	289

Аминокислотная последовательность константной области Cys-мутантных конструкций в лямбда легкой цепи антитела 14090

SEQ ID NO: 91 представляет собой последовательность для константной области человеческой лямбда легкой цепи дикого типа. SEQ ID NO: 91 - SEQ ID NO: 98 показывают последовательности 7 Cys-мутантов в константной области лямбда легкой цепи человеческого антитела 14090

SEQ ID NO:91	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO:92	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGCVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO:93	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVCVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO:94	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVCWKADSSPVKAGVETTTPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO:95	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVCAGVETTTPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO:96	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGCETTTPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO:97	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTCPKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
SEQ ID NO:98	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQC NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

Пример 5. Экспрессия и очистка Cys мутантных антител в клетках 293 Freestyle™.

Cys мутанты антитела трастузумаб экспрессировали в клетках 293 Freestyle™ посредством совместной трансфекции плазмид тяжелой цепи и легкой цепи с использованием метода преходящей трансфекции, как описано ранее (Meissner, et al., *Biotechnol Bioeng.* 75:197-203 (2001)). ДНК плазмиды, применяемые при совместной трансфекции, получали, используя набор препаратов плазмид Qiagen в соответствии с протоколом изготовителя. Клетки 293 Freestyle™ культивировали в суспензии в средах для экспрессии Freestyle™ (Invitrogen) при 37°C под 5% CO₂. В день перед трансфекцией, клетки разделяли на 0,7×10⁶ клеток/мл в свежих средах. В день трансфекции, плотность клеток обычно достигала 1,5×10⁶ клеток/мл. Клетки трансфицировали смесью плазмид тяжелой цепи и легкой цепи при отношении 1:1, используя метод PEI (Meissner et al., 2001). Трансфицированные клетки дополнительно культивировали в течение пяти дней. Среду из культуры собирали центрифугированием культуральной жидкости при 2000×g в течение 20 мин и фильтровали через 0,2 микрометрические фильтры. Экспрессированные антитела очищали от профильтрованной среды, применяя Белок А-Сефарозу™ (GE Healthcare Life Sciences). Антитела типа IgG элюировали с колонки Белок А-Сефароза™ с использованием элюирующего буфера (pH 3,0) и немедленно нейтрализовали 1 М Tris-HCl (pH 8,0), с последующей заменой буфера на PBS.

Уровни экспрессии 88 мутантных антител Cys трастузумаб в преходящем образом трансфицированных 293 Freestyle™ являются сходными с уровнями экспрессии трастузумаб дикого типа, со средним выходом при 18,6 мг/л +/- 9,5 мг/л (табл. 14), позволяя предположить, что одиночные точечные мутации на выбранных участках не изменяют значительно удерживание экспрессированного антитела механизмом секреции клеток. Анализ очищенных Cys мутантных антител трастузумаб с использованием невосстанавливающего SDS PAGE показывает, что Cys мутантные антитела не образуют олигомеров дисульфидно-связанных сконструированными цистеинами (фиг. 6). Гель-фильтрация (фиг. 7) дополнительно подтверждает вывод, что все Cys мутантные антитела трастузумаб являются мономерными. Анализ мутантных антител с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ также позволяет предположить, что большинство Cys мутантных антител являются неотличимыми от трастузумаб дикого типа с точки зрения времени удерживания и гомогенности (фиг. 8). Анализ невосстановленного дегликозилированного непротессированного трастузумаб LC-R108C посредством масс-спектрометрии (интактной ЖХ-МС) показал, что большинство антител было модифицировано двумя цистеинами (фиг. 9 и табл. 15). Эти наблюдения со-

гласуются с предшествующей публикацией, указывающей на то, что тиольную группу сконструированного цистеина в Cys мутантных антителах трастузумаб модифицируют цистеином, когда экспрессию проводят в клетках 293 freestyle™, и, что модификацию необходимо удалять восстановителями перед конъюгацией с любыми тиол-реакционноспособными реагентами (Chen, et al., mAbs 1:6, 563-571, 2009).

Cys мутантные антитела 14090 также экспрессировали в клетках 293 Freestyle™ посредством совместной трансфекции плазмид HC и LC, с использованием метода PEI, описанного (Meissner et al., 2001). Уровни экспрессии Cys мутантных антител 14090 являются аналогичными уровням экспрессии антитела 14090 дикого типа (табл. 16).

Таблица 14

Выход Cys мутантных антител трастузумаб, проходящим образом экспрессированных в клетках 293 Freestyle™. Выходы измеряли по УФ-поглощению при 280 нм после очистки с белком А

Cys мутант трастузумаб	Очищенный Аб (мг/л)	Cys мутант трастузумаб	Очищенный Аб (мг/л)
HC-S117C	46,9	HC-R355C	30,1
HC-S119C	22,5	HC-K360C	32,0
HC-K121C	22,1	HC-Q362C	20,7
HC-S124C	17,8	HC-S375C	33,3
HC-S132C	30,9	HC-E382C	35,3
HC-S134C	18,6	HC-N389C	28,7
HC-S136C	21,2	HC-N390C	34,5
HC-T139C	25,9	HC-K392C	28,2
HC-E152C	13,0	HC-T393C	6,6
HC-P153C	10,8	HC-L398C	5,1
HC-T155C	18,4	HC-S400C	4,1
HC-S157C	16,9	HC-D413C	27,6
HC-T164C	20,2	HC-S415C	10,6
HC-S165C	20,6	HC-V422C	5,0
HC-T169C	8,2	LC-K107C	11,0
HC-P171C	24,6	LC-R108C	27,0
HC-L174C	15,2	LC-T109C	13,1
HC-S176C	13,4	LC-A112C	10,5
HC-S177C	30,0	LC-S114C	21,2
HC-P189C	11,7	LC-D122C	25,5
HC-K205C	13,3	LC-E123C	20,1
HC-S207C	2,5	LC-T129C	7,1
HC-D212C	26,5	LC-R142C	14,6
HC-K246C	12,0	LC-E143C	10,0
HC-E258C	18,7	LC-K145C	13,0
HC-E269C	6,3	LC-N152C	12,0
HC-K273C	20,7	LC-L154C	13,1
HC-N286C	15,0	LC-S156C	12,0
HC-K288C	20,9	LC-S159C	26,6
HC-K290C	20,0	LC-E161C	20,0

HC-R292C	21,0	LC-E165C	5,0
HC-E293C	31,2	LC-S168C	12,0
HC-E294C	37,5	LC-K169C	4,0
HC-K320C	23,6	LC-D170C	5,0
HC-K322C	35,1	LC-S182C	8,8
HC-K326C	28,0	LC-K183C	12,6
HC-A330C	27,1	LC-K188C	12,0
HC-E333C	10,3	LC-K190C	5,2
HC-K334C	14,0	LC-V191C	29,9
HC-T335C	7,0	LC-T197C	19,0
HC-S337C	6,9	LC-Q199C	16,8
HC-R344C	32,6	LC-S203C	26,2
		LC-T206C	27,8

Таблица 15

Теоретическая и наблюдаемая масса для антитела трастузумаб LC-R108C после очистки из клеток 293 Freestyle™

Вид антитела		Теоретическая масса (Da)	Наблюдаемая масса (Da)
LC-R108C		145063	145071
LC-R108C-Cys аддукт	+1 Cys	145181	145189
LC-R108C-Cys двойной аддукт	+2 Cys	145299	145311

Таблица 16

Выход Cys мутантов антитела 14090, переходящим образом экспрессированных в клетках 293 Freestyle™

Cys мутант антитела 14090	Выход Ab (мг/л)
HC-S124C	4,72
HC-S136C	3,64
HC-T139C	4,59
HC-E152C	2,93
HC-L174C	5,26
HC-E258C	5,86
HC-K360C	4,86
LC-A143C	4,63
LC-T145C	6,98
LC-A147C	8,37
LC-K156C	5,74
LC-V159C	9,67
LC-T163C	9,98
LC-S168C	5,61

Пример 6. Восстановление, повторное окисление и конъюгация Cys мутантных антител с MC-MMAF.

Поскольку встроенные Cys в антителах, экспрессированных в клетках млекопитающих, модифицируют посредством аддуктов (дисульфидов), таких как глутатион (GSH) и/или Цистеин во время их биосинтеза (Chen et al. 2009), модифицированный Cys в продукте, первоначально экспрессированном, является нереакционноспособным по отношению к тиол-реакционноспособным средствам, таким как малеимидо или бром- или йод-ацетамидные группы. Чтобы конъюгировать встроенный цистеин после экспрессии, глутатионовые или цистеиновые аддукты необходимо удалить посредством восстановления этих дисульфидов, которое обычно влечет за собой восстановление всех дисульфидов в экспрессируемом белке. Это может выполняться посредством первоначального предоставления антитела воздействию восстановителя, такого как дитиотреитол (DTT), с последующей операцией, которая обеспечивает повтор-

ное окисление всех нативных дисульфидных связей антитела для восстановления и/или стабилизации структуры функционального антитела.

Соответственно, чтобы восстановить все нативные дисульфидные связи и дисульфидное связывание между цистеином или GSH аддуктами встроенного остатка цистеина, свежеприготовленный DTT добавляли к ранее очищенным Cys мутантам трастузумаб и антителу 14090, до конечной концентрации, равной 20 мМ. После инкубации антитела с DTT при 37°C в течение 1 ч, смеси диализовали при 4°C против PBS в течение трех дней с ежедневной заменой буфера для удаления DTT и повторно окислить нативные дисульфидные связи. Альтернативным методом является удаление восстановителя через обессоливающую колонку, Sephadex G-25. Как только белок полностью восстанавливают, 1 мМ окисленный аскорбат (дегидро-аскорбиновую кислоту) добавляют к обессоленным образцам и инкубации для повторного окисления выполняют в течение 20 ч. Оба метода приводили к аналогичным результатам. Однако, попытки следовать методикам переокисления, ранее описанным в литературе, с использованием CuSO_4 приводили к осаждению белка. Во всех примерах в данном описании применяли методику диализа, описанную выше. Повторное окисление восстанавливает внутрицепочечные дисульфиды, в то время как диализ позволяет цистеинам и глутатионам, соединенным с вновь введенными цистеином (цистеинами), отдиализоваться.

После повторного окисления антитела являются готовыми для конъюгации. Малеимид-MMAF (MC-MMAF, 10 эквивалентов относительно антитела, фиг. 10) добавляли к повторно окисленным антителам в PBS буфере (pH 7,2). Инкубации проводили в течение от 1 до 24 ч. Процесс конъюгации регистрировали посредством обращенно-фазовой ВЭЖХ, которая может отделять конъюгированные антитела от неконъюгированных. Реакционные смеси конъюгации анализировали на колонке PRLP-S 4000A (50 мм × 2,1 мм, Agilent), нагретой при 80°C и элюирование колонки выполняли посредством линейного градиента из 30-60% ацетонитрила в воде, содержащей 0,1% ТФУ при скорости потока, равной 1,5 мл/мин. Элюирование белков с колонки регистрировали при 280 нм, 254 нм и 215 нм. Хроматограмма обращенно-фазовой ВЭЖХ типовой конъюгационной смеси показана на фиг. 11.

Когда конъюгационные смеси анализировали посредством обращенно-фазовой ВЭЖХ, многие Cys участки генерировали гомогенные продукты конъюгации, как можно предположить по однородным профилям элюирования с одиночным пиком (фиг. 11), в то время как некоторые Cys участки генерировали гетерогенные продукты конъюгации (фиг. 12). Операции, описанные выше, включают в себя восстановление и повторное окисление нативных дисульфидных связей, а также восстановление связей между цистеином и GSH аддуктами сконструированных остатков цистеина. Во время процесса повторного окисления, сконструированный остаток цистеина может препятствовать повторному образованию надлежащих нативных дисульфидных связей посредством процесса дисульфидной перетасовки. Это может приводить к образованию несогласованных дисульфидных связей, либо между сконструированным цистеином и нативным остатком цистеина или между некорректно согласованных нативных дисульфидных связей. Такие несогласованные дисульфидные связи могут воздействовать на удерживание антитела на колонке обращенно-фазовой ВЭЖХ. Процессы рассогласования могут также приводить к неспаренным остаткам цистеина, отличным от желательного сконструированного цистеина. Присоединение малеимид-MMAF к различным положениям в антителе воздействует на время удерживания различным образом (см. обсуждение гомогенно конъюгированных ADC ниже). В дополнение, неполное повторное окисление будет оставлять антитело с нативными остатками цистеина, которые будут взаимодействовать с малеимид-MMAF в дополнение к желательной конъюгации со сконструированным остатком цистеина. Любой процесс, который затрудняет надлежащее и полное образование нативных дисульфидных связей будет приводить к сложному профилю ВЭЖХ (фиг. 11) при конъюгации с Малеимид-MMAF. Выход однородного ADC, измеренный посредством УФ-поглощения неочищенных реакционных смесей, варьировал в зависимости от Cys мутаций (табл. 17). С использованием методики восстановления/повторного окисления и операций конъюгации, описанных выше, 65 из 88 Cys мутантных антител трастузумаб давали в результате гомогенные продукты конъюгации, и эти участки являются преимущественными участками для Cys замен, которые нужно сделать, при получении цистеин-сконструированные антител для конъюгации.

Эти 65 Cys-MMAF ADC анализировали подробно в различных аналитических тестах: Дифференциальную сканирующую флуориметрию (ДСФ) применяли для измерения термической стабильности. Аналитическую гель-фильтрацию (AnSEC) применяли для измерения агрегации. Антигензависимую активность по уничтожению клеток *in vitro* измеряли посредством анализов на жизнеспособность клеток, а фармакокинетические характеристики измеряли у мышей. Эти аналитические тесты и соответствующие результаты описаны более подробно ниже.

Чтобы оценить состояние агрегации трастузумаб Cys-MMAF ADC, ADC анализировали на колонке для гель-фильтрации (GE, Superdex 200, 3.2/30) при скорости потока, равной 0,1 мл/мин в PBS. Все 65 Cys-MMAF ADC были мономерными. Большинство ADC содержит меньше 10% олигомера (фиг. 13, табл. 18), указывая на то, что конъюгация MC-MMAF с Cys-мутантными конструкциями трастузумаб на выбранных участках не вызывала агрегацию антитела.

Выход MMAF ADC, генерируемых с Cys-мутантными конструкциями трастузумаб. "Гетеро" указывает на гетерогенную смесь образцов, показанную на обращенно-фазовой ВЭЖХ с различными значениями времени удерживания

трастузумаб Cys-MMAF ADC	Выход (мг/л)	Cys конструкция	Выход (мг/л)
HC-S117C	6,9	HC-R344C	33,4
HC-S119C	15,3	HC-R355C	24,3
HC-K121C	4,4	HC-K360C	26,5
HC-S124C	13,2	HC-Q362C	гетеро
HC-S132C	Гетеро	HC-S375C	34,3
HC-S134C	Гетеро	HC-E382C	34,9
HC-S136C	Гетеро	HC-N389C	гетеро
HC-T139C	11,1	HC-N390C	33,1
HC-E152C	7,8	HC-K392C	20,8
HC-P153C	8,2	HC-T393C	гетеро
HC-T155C	12,9	HC-L398C	3,4
HC-S157C	13,5	HC-S400C	1,7
HC-T164C	13,7	HC-D413C	гетеро
HC-S165C	Гетеро	HC-S415C	гетеро
HC-T169C	4,7	HC-V422C	3,6
HC-P171C	14,7	LC-K107C	1,6
HC-L174C	9,1	LC-R108C	12,2
HC-S176C	Гетеро	LC-T109C	8,4
HC-S177C	Гетеро	LC-A112C	гетеро
HC-P189C	7,7	LC-S114C	16,9
HC-S191C	Гетеро	LC-D122C	Гетеро
HC-T195C	Гетеро	LC-E123C	Гетеро
HC-T197C	Гетеро	LC-T129C	4,0
HC-K205C	11,3	LC-R142C	11,3
HC-S207C	1,0	LC-E143C	4,0
HC-D212C	Гетеро	LC-K145C	8,7
HC-K246C	9,0	LC-N152C	7,2

HC-E258C	10,1	LC-L154C	1,3
HC-E269C	5,6	LC-S156C	7,2
HC-K274C	15,3	LC-S159C	12,3
HC-N286C	12,9	LC-E161C	12,0
HC-K288C	14,4	LC-E165C	2,0
HC-K290C	8,0	LC-S168C	3,1
HC-R292C	10,3	LC-K169C	2,5
HC-E293C	15,0	LC-D170C	2,2
HC-E294C	Гетеро	LC-S182C	7,9
HC-K320C	18,9	LC-K183C	3,8
HC-K322C	29,1	LC-K188C	7,2
HC-K326C	22,8	LC-K190C	Гетеро
HC-A330C	Гетеро	LC-V191C	Гетеро
HC-E333C	7,4	LC-T197C	16,4
HC-K334C	11,2	LC-Q199C	10,3
HC-T335C	5,2	LC-S203C	13,5
HC-S337C	1,4	LC-T206C	Гетеро

Таблица 18
 Процентное содержание олигомера в препаратах трастузумаб Cys-MMAF ADC,
 определенное посредством аналитической гель-фильтрации

трастузумаб Cys-MMAF ADC	Олигомер (%)	Участок конъюгации	Олигомер (%)
HC-S117C	н.о.	HC-R344C	9,5
HC-S119C	3,2	HC-R355C	н.о.
HC-K121C	н.о.	HC-K360C	н.о.
HC-S124C	н.о.	HC-S375C	н.о.
HC-T139C	4,8	HC-E382C	н.о.
HC-E152C	н.о.	HC-N390C	н.о.
HC-P153C	н.о.	HC-K392C	н.о.
HC-T155C	н.о.	HC-L398C	н.о.
HC-S157C	н.о.	HC-S400C	9,2
HC-T164C	н.о.	HC-V422C	н.о.

HC-T169C	н.о.	LC-K107C	н.о.
HC-P171C	н.о.	LC-R108C	н.о.
HC-L174C	н.о.	LC-T109C	н.о.
HC-P189C	н.о.	LC-S114C	н.о.
HC-K205C	н.о.	LC-T129C	н.о.
HC-S207C	н.о.	LC-R142C	н.о.
HC-K246C	н.о.	LC-E143C	13,1
HC-E258C	н.о.	LC-K145C	н.о.
HC-E269C	н.о.	LC-N152C	н.о.
HC-K274C	11,7	LC-L154C	7,3
HC-N286C	9,2	LC-S156C	6,1
HC-K288C	н.о.	LC-S159C	2,8
HC-K290C	н.о.	LC-E161C	н.о.
HC-R292C	н.о.	LC-E165C	н.о.
HC-E293C	н.о.	LC-S168C	н.о.
HC-K320C	н.о.	LC-K169C	н.о.
HC-K322C	н.о.	LC-D170C	н.о.
HC-K326C	н.о.	LC-S182C	6,9
HC-E333C	н.о.	LC-K183C	н.о.
HC-K334C	н.о.	LC-K188C	н.о.
HC-T335C	н.о.	LC-T197C	н.о.
HC-S337C	н.о.	LC-Q199C	6,3
		LC-S203C	н.о.

н.о.: Ниже предела обнаружения.

Пример 7. Анализ термической стабильности трастузумаб Cys-MMAF ADC in vitro.

Конъюгация полезной нагрузки с трастузумаб может стабилизировать или дестабилизировать анти-тело, приводя к изменениям в температуре антитела, которые могут быть определены посредством дифференциальной сканирующей флуориметрии (ДСФ), которая основана на температурно-индуцированной денатурации, регистрируемой красителем, чувствительным к окружению, таким как сипро оранжевый. Образцы ADC отбирали аликвотами при трех повторностях в 384-луночные планшеты в PBS (6,7 мМ фосфата натрия pH 7,2; 150 мМ NaCl). В каждой лунке, 8 мкл 0,25 мг/мл антитела смешивали с 2 мкл 25× красителя сипро оранжевого (Invitrogen). Планшеты герметически закрывали и анализировали в системе Roche LightCycler 480 при линейном изменении температуры от 30 до 85°C с 20 сканированиями флуоресценции, регистрируемыми на градус C. Температуры плавления определяли по первой производной интенсивности флуоресцентности на температурных кривых.

Типовой анализ термического сдвига для трастузумаб дикого типа показал два перехода плавления (T_m), T_{m1} при 69,7°C и T_{m2} при 81,2°C, соответственно (табл. 19). Когда трастузумаб Cys-MMAF ADC подвергали аналитическим тестам на термическую стабильность белка, стало очевидным, что конъюгация MC-MMAF с антителами индуцировала различные изменения T_m в зависимости от участков конъюгации (табл. 19). Когда MC-MMAF конъюгировали с большинством Cys участков либо в CH1 или CH3 доменах, полученный в результате ADC, например HC-K356C-MMAF, показывал картину распределения, аналогичную картине дикого типа анти-Her с небольшими изменениями по T_{m1} и T_{m2} . Однако, когда MC-MMAF конъюгировали с Cys участками, расположенными в CH2 домене, снижение T_{m1} наблюдали для большинства участков, в то время, как T_{m2} оставался в основном неизменным. Снижение T_{m1} , наблюдаемое для большинства CH2 доменов Cys-MMAF конъюгатов, находилось в интервале от 5°C до 26°C. Два ADC с наибольшим снижением T_{m1} представляли собой HC-T335C-MMAF и HC-S337C-MMAF, с T_{m1} при 42°C и 45°C, соответственно (фиг. 14). Результаты показывают, что местоположение конъюгации MC-MMAF может иметь значительное воздействие на стабильность ADC.

Таблица 19

Температуры плавления Tm1 и Tm2 трастузумаб Cys-MMAF ADC, наблюдаемые посредством дифференциальной сканирующей флуориметрии (ДСФ)

Трастузумаб Cys-MMAF ADC	НС домен	Tm1 [°C]	Tm2 [°C]
дикого типа антитело	н.п.	69,71	81,18
НС-S117C	CH1	69,09	79,85
НС-S119C	CH1	69,28	78,58
НС-K121C	CH1	69,63	78,52
НС-S124C	CH1	69,27	80,56
НС-T139C	CH1	69,09	80,74
НС-E152C	CH1	69,63	80,83
НС-P153C	CH1	69,71	78,52
НС-T155C	CH1	69,27	80,83
НС-S157C	CH1	69,72	80,81
НС-T164C	CH1	69,17	80,7
НС-T169C	CH1	68,74	80,47
НС-P171C	CH1	69,27	77,18
НС-L174C	CH1	69,89	80,03
НС-P189C	CH1	69,09	81,27
НС-K205C	CH1	69,54	80,65
НС-S207C	CH1	69,00	80,65
НС-K246C	CH2	64,65	80,74
НС-E258C	CH2	65,32	81,03
НС-E269C	CH2	65,36	81,01
НС-K274C	CH2	67,14	81,09
НС-N286C	CH2	67,22	81,09
НС-K288C	CH2	65,54	80,83
НС-K290C	CH2	69,00	80,65
НС-R292C	CH2	67,49	80,56
НС-E293C	CH2	64,34	81,03
НС-K320C	CH2	60,60	80,59
НС-K322C	CH2	62,41	80,70
НС-K326C	CH2	63,05	80,74
НС-E333C	CH2	63,67	80,92
НС-K334C	CH2	64,65	80,47
НС-T335C	CH2	42,93	80,04
НС-S337C	CH2	45,56	80,48
НС-R344C	CH3	69,50	80,92
НС-R355C	CH3	68,18	81,25

HC-K360C	CH3	69,28	80,92
HC-S375C	CH3	68,20	81,36
HC-E382C	CH3	69,36	80,74
HC-N390C	CH3	68,73	80,92
HC-K392C	CH3	67,05	80,92
HC-L398C	CH3	68,47	81,36
HC-S400C	CH3	68,65	81,27
HC-V422C	CH3	69,98	81,45
LC-K107C	н.п.	69,45	80,29
LC-R108C	н.п.	70,10	н.о.,1
LC-T109C	н.п.	68,47	80,21
LC-T129C	н.п.	68,47	80,12
LC-R142C	н.п.	69,00	78,61
LC-E143C	н.п.	69,83	80,59
LC-K145C	н.п.	69,00	80,65
LC-N152C	н.п.	67,49	81,09
LC-L154C	н.п.	68,47	80,65
LC-S156C	н.п.	68,83	80,47
LC-S159C	н.п.	69,50	79,93
LC-E161C	н.п.	68,65	80,12
LC-E165C	н.п.	69,27	79,76
LC-S168C	н.п.	69,54	79,67
LC-K169C	н.п.	69,09	80,29
LC-D170C	н.п.	68,83	80,12
LC-S182C	н.п.	69,18	80,29
LC-K183C	н.п.	69,09	80,47
LC-K188C	н.п.	68,74	80,65
LC-T197C	н.п.	69,63	80,74
LC-Q199C	н.п.	69,54	80,21
LC-S203C	н.п.	68,84	80,92

н.о. - не определено вследствие того, что широкий переход Tm2 препятствовал точному определению Tm, н.п. - не применимо.

Пример 8. Аналитические тесты на пролиферацию клеток для измерения активности по уничтожению клеток *in vitro* для Cys ADC.

Клетки, которые естественно экспрессируют целевые антигены, или клеточные линии, сконструированные для экспрессии целевых антигенов, часто применяют для анализа активности ADC. Для оценки активности по уничтожению клеток трастузумаб ADC *in vitro*, использовали две сконструированные клеточные линии, клон 16 и клон 40 MDA-MB231, и клетки HCC1954 (Clinchy B, Gazdar A, Rabinovsky R, Yefenof E, Gordon B, Vitetta ES. *Breast Cancer Res Treat.* (2000) 61:217-228). Клетки клона 16 MDA-MB231 стабильно экспрессируют высокое число копий ($\sim 5 \times 10^5$ копий/клетку) рекомбинантных человеческих Her2, в то время, как клон 40 экспрессирует низкое число копий ($\sim 5 \times 10^3$ копий/клетку) человеческих Her2. Клетки HCC1954 эндогенно экспрессируют высокий уровень ($\sim 5 \times 10^5$ копий/клетку) человеческих Her2 на поверхности. Для определения активности по уничтожению клеток антитела 14090 ADC, применяли клетки CMK11-5 и клетки линии лейкоэмических Т-лимфоцитов человека. В то время как CMK11-5 клетки экспрессируют высокий уровень антигена для антитела 14090 на клеточной поверхности, в клетках линии лейкоэмических Т-лимфоцитов человека нет никакой обнаруживаемой экспрессии антигенов. Антигензависимый цитотоксический эффект должен уничтожать только клетки, которые экспрессируют достаточно антигена на клеточной поверхности, а не клетки, в которых отсутствует антиген. Аналитические тесты на пролиферацию клеток проводили с Cell-Titer-Glo™ (Promega) через пять дней после того, как клетки инкубировали с различными концентрациями ADC (Riss et al. (2004) *Assay Drug Dev Technol.* 2:51-62). В некоторых исследованиях, аналитические тесты на клеточной основе являются высокопроизводительными и проводятся в автоматизированной системе (Melnick et al. (2006) *Proc Natl Acad Sci USA.* 103:3153-3158).

Трастузумаб Cys-MMAF ADC специфически уничтожал клон 16 клеток MDA-MB231 и HCC1954, но не клон 40 клеток MDA-MB231 (фиг. 15). IC₅₀ трастузумаб Cys-MMAF ADC в аналитических тестах на клетках клона 16 MDA-MB231 находится в интервале от 30 пМ до 200 пМ (табл. 20, фиг. 16). Аналогично, антитело 14090 Cys-MMAF ADC проявлял антигензависимое уничтожение клеток в аналитических тестах на пролиферацию клеток. Антитело 14090 Cys-MMAF ADC уничтожал антиген-экспрессирующие клетки CMK11-5, но не антиген-отрицательные лейкоэмические Т-лимфоциты человека (фиг. 17). IC₅₀ антитело 14090-MMAF ADC в аналитическом тесте на пролиферацию CMK11-5 находится в интервале от 400 пМ до 1 нМ (табл. 21).

Таблица 20

IC₅₀ трастузумаб Cys-MMAF ADC в MDA-MB231 аналитическом тесте на пролиферацию клеток клона 16 Her2⁺

трастузумаб Cys-MMAF ADC	IC ₅₀ (мкМ)	трастузумаб Cys-MMAF ADC	IC ₅₀ (мкМ)
HC-S117C	1,55E-04	HC-R344C	2,75E-04
HC-S119C	1,18E-04	HC-R355C	1,21E-04
HC-K121C	1,06E-04	HC-K360C	1,92E-04
HC-S124C	9,78E-05	HC-S375C	1,42E-04
HC-T139C	1,48E-04	HC-E382C	2,53E-04
HC-E152C	7,62E-05	HC-N390C	1,58E-04
HC-P153C	9,27E-05	HC-K392C	1,43E-04
HC-T155C	1,33E-04	HC-L398C	1,08E-04
HC-S157C	1,47E-04	HC-S400C	1,43E-04
HC-T164C	1,34E-04	HC-V422C	1,72E-04
HC-T169C	1,98E-04	LC-K107C	2,59E-05
HC-P171C	1,33E-04	LC-R108C	2,96E-05
HC-L174C	1,19E-04	LC-T109C	8,12E-05
HC-P189C	1,82E-04	LC-S114C	3,37E-05
HC-K205C	1,02E-04	LC-T129C	2,73E-05
HC-S207C	2,16E-04	LC-R142C	2,64E-05
HC-K246C	9,54E-05	LC-E143C	3,76E-05
HC-E258C	9,40E-05	LC-K145C	3,87E-05
HC-E269C	8,98E-05	LC-N152C	2,14E-05
HC-K274C	9,99E-05	LC-L154C	3,52E-05
HC-N286C	9,94E-05	LC-S156C	4,28E-05
HC-K288C	7,47E-05	LC-S159C	4,34E-05
HC-K290C	3,55E-04	LC-E161C	3,62E-05
HC-R292C	9,69E-05	LC-E165C	4,68E-05
HC-E293C	1,10E-04	LC-S168C	2,50E-04
HC-K320C	9,79E-05	LC-K169C	7,74E-05
HC-K322C	1,16E-04	LC-D170C	1,64E-04
HC-K326C	1,73E-04	LC-S182C	9,07E-05
HC-E333C	1,28E-04	LC-K183C	8,39E-05
HC-K334C	1,43E-04	LC-K188C	9,71E-05
HC-T335C	8,69E-05	LC-T197C	1,07E-04
HC-S337C	7,79E-05	LC-Q199C	1,31E-04
		LC-S203C	1,18E-04

IC₅₀ антитело 14090 Cys-MMAF ADC в аналитическом тесте на пролиферацию клеток СМК11-5

Антитело 14090 Cys-MMAF ADC	IC ₅₀ (мкМ)
HC-S124C	9,26E-04
HC-T139C	1,22E-03
HC-E152C	4,60E-04
HC-L174C	6,02E-04
HC-K360C	8,56E-04
HC-S375C	4,38E-04
LC-A143C	7,09E-04
LC-A147C	1,14E-03
LC-V159C	5,41E-04
LC-T163C	6,38E-04
LC-S168C	1,06E-03

Пример 9. Фармакокинетическое исследование трастузумаб Cys-MMAF ADC.

Было продемонстрировано, что длительное время полужизни в сыворотке является решающим для высокой *in vivo* эффективности действия ADC (Hamblett, et al., "Effects of drug loading on antitumor activity of a monoclonal antibody drug conjugate" Clin Cancer Res., 10:7063-7070 (2004); Alley et al., Bioconjug Chem. 19:759-765 (2008)). Обычно присоединение гидрофобной полезной нагрузки лекарственного средства к антителу может оказывать значительное воздействие на свойства антитела, и это может приводить к быстрому выведению ADC *in vivo* (Hamblett et al., 2004) и плохой эффективности действия *in vivo*. Чтобы оценить эффекты различных участков конъюгации на выведение MMAF ADC *in vivo*, фармакокинетические исследования на мышах, не имеющих опухоли, проводили с 65 трастузумаб Cys-MMAF ADC. Чтобы обнаружить MMAF, содержащие ADC в мышинной плазме, генерировали анти-MMAF. Были разработаны аналитические тесты ELISA для обнаружения ADC с использованием внеклеточного домена человеческого HER2 для захвата трастузумаб IgG молекул из плазмы и антитела против человеческого IgG (анти-hIgG) и антитела против MMAF для генерации сигналов в двух отдельных аналитических тестах. В двух аналитических тестах ELISA измеряют сывороточную концентрацию антитела трастузумаб и "интактного" ADC соответственно, как более подробно обсуждается ниже.

Трем мышам на группу вводили однократную дозу трастузумаб Cys-MMAF ADC при 1 мг/кг. Десять образцов плазмы собирали в течение двух недель и анализировали посредством ELISA, используя внеклеточный домен человеческого HER2 для захвата всех молекул трастузумаб IgG, включающих трастузумаб Cys-MMAF ADC и трастузумаб без MMAF. Антитела против MMAF и против hIgG затем применяли для обнаружения в двух отдельных аналитических тестах. В ELISA с антителом против MMAF измеряли концентрацию только конъюгатов трастузумаб MMAF, а в ELISA с анти-hIgG количественно определяли как конъюгаты трастузумаб Cys-MMAF, так и антитела трастузумаб, в которых отсутствует MMAF. Стандартные кривые получали для каждого ADC, отдельно используя такой же материал, как инфицировали мышам. Аналитические тесты с анти-MMAF и анти-hIgG должны, следовательно, давать на выходе идентичные считывания концентраций, если никаких изменений по нагрузке лекарственным средством трастузумаб Cys-MMAF ADC не происходит после инъекции в мышей. Для трастузумаб Cys-MMAF ADC, который терял некоторое количество полезной нагрузки MMAF, в аналитическом тесте ELISA с анти-MMAF антителом будут измерять более низкую концентрацию, чем в ELISA с анти-hIgG. Сравнение двух считываний концентрации, следовательно, позволяет измерить высвобождение лекарственного средства из трастузумаб Cys-MMAF ADC во время инкубации *in vivo* в мышах.

Как было измерено посредством анти-hIgG ELISA, 63 из 65 ADC проявляли фармакокинетический профиль, аналогичный неконъюгированному антителу трастузумаб дикого типа (фиг. 18, 19, 20), указывая на то, что конъюгация полезной нагрузки MC-MMAF с этими участками не оказывает существенного воздействия на выведение антитела. Двумя исключениями являются HC-T335C и HC-S337C. Конъюгация MC-MMAF с этими двумя участками приводит к быстрому выведению ADC, измеренному посредством ELISA с анти-MMAF и анти-hIgG (фиг. 21). Анализ термического сдвига белка показал, что Tm1 для трастузумаб HC-T335C-MMAF и трастузумаб HC-S337C-MMAF снижался от 69°C для антитела трастузумаб дикого типа до 42°C и 45°C, соответственно (фиг. 14). Конъюгация MC-MMAF с двумя участками резко снижает термическую стабильность ADC (на 27°C и 24°C, соответственно). Для 63 ADC, которые показывают фармакокинетический профиль, сходный с неконъюгированным антителом, изменения Tm1 составляли менее 8°C, позволяя предположить, что быстрое выведение может возможно коррелировать с низкой термической стабильностью ADC.

Чтобы определить химическую стабильность связывания между полезной нагрузкой MMAF и антителом на различных Cys участках, концентрации трастузумаб Cys-MMAF ADC, измеренные посредством

ELISA с анти-MMAF и всех молекул трастузумаб, измеренные посредством ELISA с анти-hIgG, сравнивали друг с другом для каждого образца. Многие трастузумаб Cys-MMAF ADC, в пределах ошибки измерений, проявляли хорошее перекрытие между двумя концентрациями в течение двух недель, позволяя предположить, что связь между MC-MMAF и цистеином, введенным на этих участках была стабильной во время циркуляции у мышей в течение данного периода (фиг. 18, 19). Напротив, некоторые трастузумаб Cys-MMAF ADC проявляли существенную потерю лекарственного средства, на что указывает более высокое считывание анти-hIgG, чем считывание анти-MMAF (фиг. 20). Для некоторых трастузумаб Cys-MMAF ADC, концентрация ADC была равна приблизительно 50% от концентрации для hIgG. Эти результаты позволяют предположить, что существуют значительные различия по стабильности тиол-малеимидной связи полезных нагрузок лекарственного средства, конъюгированных с различными участками, как предполагалось ранее (Shen et al. *Nat. Biotechnol.* 2012, 30 (2):184-9). Участки, имеющие хорошую стабильность, являются предпочтительными участками для применения при получении ADC, как описано в данном документе.

При фармакокинетических исследованиях, площадь под кривой зависимости плазменной концентрации от времени (AUC) является важным параметром при оценке общего выведения и биодоступности вводимого лекарственного средства. В фармакокинетических исследованиях авторов, для каждого трастузумаб Cys-MMAF ADC два значения AUC, AUC-MMAF и AUC-hIgG, рассчитывали отдельно для измерений ELISA с анти-MMAF и анти-hIgG. Отношения AUC-MMAF к AUC-hIgG для всех трастузумаб Cys-MMAF ADC варьировали от 0,4 до 1,2 (табл. 20). Фиг 18, 19 и 20 включают ФК кривые для ADC на протяжении полного интервала наблюдаемых отношений AUC-MMAF/AUC-hIgG и иллюстрируют изменчивость и неопределенность измерений. Отношения AUC-MMAF к AUC-hIgG >1 (табл. 20) предполагают неопределенности >25%, поскольку отношение должно оставаться около 1, если не происходит никакой потери лекарственного средства. Как показано в табл. 20, из 63 трастузумаб Cys-MMAF ADC с измеряемыми AUC от обоих ELISA, 40 ADC показывают отношение AUC-MMAF/AUC-hIgG >0,7, указывая на то, что в пределах точности измерений, небольшую потерю лекарственного средства MMAF наблюдали у них после введения мышам. Однако, 23 ADC проявляли отношение AUC-MMAF/AUC-hIgG <0,7, позволяя предположить, что количество полезной нагрузки MMAF конъюгата на этих 23 участках значительно снизилось во время *in vivo* инкубации у мышей.

О различиях в стабильности малеимидной связи на различных участках конъюгации сообщалось ранее для Cys сконструированных ADC (см. Shen et al. (2012) *Nat Biotechnol.* 22;30(2):184-9 для обсуждения и ссылок). Для предпочтительных участков, которые проявляют увеличенную стабильность в сыворотке, окружение антитела вероятно катализирует гидролиз сукцинимидного кольца, образованного посредством реакции малеимида с цистеином. Гидролизованная форма не может вернуться назад и не может высвободить малеимидное лекарственное средство. Сама по себе, способность окружения антитела катализировать гидролиз кольца не может быть предсказана и является неожиданным свойством некоторых сконструированных Cys участков. Участки в табл. 22, имеющие отношение AUC(MMAF)/AUC(hIgG) более чем 0,7, являются, следовательно, особенно подходящими участками для замены на цистеин на основе данного критерия, а участки, имеющие отношение, равное приблизительно 0,9 или выше, являются особенно предпочтительными участками для замены на цистеин для целей изобретения, когда их применяют. Эти участки включают участки тяжелой цепи 322, 334, 121, 288, 171, 139, 360, 117, 392, 375, 292, 333, 174, 258, 337, 422, 320, 390 и 335; и участки легкой цепи 107, 203, 108 и 114.

Таблица 22

AUC-MMAF и AUC-hIgG трастузумаб Cys-MMAF ADC у мышей			
Трастузумаб Cys-MMAF ADC	AUC-MMAF (час*мкг/мл)	AUC-hIgG (час*мкг/мл)	AUC (MMAF) / AUC (hIgG)
HC-K246C-MMAF	1515	3587	0,4
HC-K205C-MMAF	2109	4893	0,4
LC-S168C-MMAF	1688	3619	0,5
LC-E143C-MMAF	1589	3254	0,5
HC-E382C-MMAF	1364	2541	0,5
HC-T155C-MMAF	2930	5308	0,6
HC-S119C-MMAF	2230	4045	0,6
LC-T129C-MMAF	2375	4332	0,6
LC-T109C-MMAF	1588	2716	0,6
LC-K169C-MMAF	2858	4855	0,6
HC-S400C-MMAF	2363	3922	0,6
HC-R355C-MMAF	2344	3777	0,6

043810

HC-R344C-MMAF	1994	3215	0,6
LC-Q199C-MMAF	2042	3261	0,6
LC-S182C-MMAF	2434	3722	0,7
HC-P153C-MMAF	2201	3402	0,7
HC-N286C-MMAF	2286	3535	0,7
HC-T169C-MMAF	2113	3190	0,7
LC-K183C-MMAF	2014	3053	0,7
LC-T197C-MMAF	2126	3177	0,7
LC-K145C-MMAF	2339	3454	0,7
HC-L398C-MMAF	2063	2979	0,7
HC-P189C-MMAF	2042	2968	0,7
HC-S157C-MMAF	2625	3640	0,7
HC-E269C-MMAF	2373	3293	0,7
LC-S159C-MMAF	2063	2809	0,7
LC-E161C-MMAF	1974	2632	0,8
LC-E165C-MMAF	2481	3244	0,8
HC-T164C-MMAF	2514	3290	0,8
LC-R142C-MMAF	2903	3786	0,8
LC-S156C-MMAF	2217	2847	0,8
HC-S207C-MMAF	2378	3001	0,8
LC-N152C-MMAF	2303	2862	0,8
HC-E152C-MMAF	3403	4202	0,8
LC-L154C-MMAF	1959	2387	0,8
LC-K188C-MMAF	2230	2680	0,8
HC-K326C-MMAF	2621	3157	0,8
LC-D170C-MMAF	2048	2420	0,9
HC-K290C-MMAF	2668	3090	0,9
HC-E293C-MMAF	2167	2523	0,9
HC-S124C-MMAF	2107	2463	0,9
HC-K274C-MMAF	3080	3554	0,9
HC-K322C-MMAF	3108	3437	0,9
HC-K334C-MMAF	4527	5048	0,9
HC-K121C-MMAF	2647	2952	0,9
HC-K288C-MMAF	2681	2902	0,9

HC-P171C-MMAF	2312	2481	0,9
LC-K107C-MMAF	2621	2817	0,9
HC-T139C-MMAF	2951	3186	0,9
HC-K360C-MMAF	3791	4014	0,9
HC-S117C-MMAF	2661	2828	0,9
LC-S203C-MMAF	2730	2919	0,9
HC-K392C-MMAF	3148	3302	1,0
HC-S375C-MMAF	2593	2644	1,0
HC-R292C-MMAF	2816	2806	1,0
HC-E333C-MMAF	3850	3796	1,0
HC-L174C-MMAF	2604	2541	1,0
HC-E258C-MMAF	3941	3732	1,1
HC-S337C-MMAF	34,38	32,14	1,1
HC-V422C-MMAF	2662	2424	1,1
HC-K320C-MMAF	3181	2776	1,2
HC-N390C-MMAF	3627	3105	1,2
LC-R108C-MMAF	3711	2992	1,2
LC-S114C-MMAF	н.п.	2567	н.п.
HC-T335C-MMAF	6,71	н.п.	н.п.

н.п.: не применимо.

Пример 10. Комбинация Cys участков для получения конъюгатов антитела с лекарственным средством при отношении лекарственного средства к антителу больших 2.

Конъюгаты антител, получаемые посредством конъюгации с остатками лизина или частично восстановленными нативными дисульфидными связями часто характеризуются отношениями лекарственного средства к антителу (DAR) между 3 и 4. Cys сконструированные антитела более обычно имеют DAR, равный 2. Для некоторых показаний, может быть желательным получать ADC с более высоким DAR, которое может в принципе достигаться посредством введения множества Cys мутаций в антитело. По мере роста числа Cys мутаций, вероятность того, что такие мутации препятствуют требуемому процессу повторного окисления во время получения ADC, и, следовательно, приводят к гетерогенным продуктам, также увеличивается. В данном исследовании, идентифицировали большое число Cys мутантов по одиночному участку тяжелой и легкой цепи с хорошим поведением при повторном окислении.

Чтобы продемонстрировать, что некоторые участки конъюгации могут объединяться для получения ADC с DAR, большим двух, несколько предпочтительных одиночных участков Cys конструкций легкой и тяжелой цепи трастузумаб и антитела 14090 (табл. 23) совместно экспрессировали в клетках 293 Free-style™, как описано в Примере 5. Очищенные антитела, все из которых содержат одну Cys мутацию в тяжелой цепи и одну Cys мутацию в легкой цепи восстанавливали, повторно окисляли и конъюгировали с MC-MMAF, как описано в Примере 6. Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография продемонстрировала единичный определенный пик элюирования, предполагая эффективное повторное окисления нативных дисульфидных связей. Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография после конъюгации MC-MMAF также показала преобладающий единичный пик элюирования для видов ADC с DAR 4. DAR всех ADC в табл. 23 был подтвержден, как равный 4, посредством масс-спектрометрии. Выходы при получении варьировали от 16 до 24 мг/л переходящей культуры клеток. ADC, в основном, являлись мономерными, как было определено посредством аналитической гель-фильтрации; только для 2 из 8 антител могли быть обнаружены агрегаты (табл. 23). Трастузумаб и 14090 ADC проявляли антиген-зависимое уничтожение клеток в аналитических тестах на пролиферацию клеток клона 16 MDA-MB231 и CMK1105, соответственно (табл. 23).

Таблица 23

Свойств Cys сконструированных MMAF ADC с DAR, равным 4

Cys-MMAF ADC (DAR=4)	LC SEQ ID NO	HC SEQ ID NO	Выход (мг/л)	AnSEC %Мономер	AnSEC %Мульти- мер	IC ₅₀ MDA- MB231-16 клетки (мкМ)	IC ₅₀ CMK11-5 клетки (мкМ)
трастузумаб LC-S159C- HC-E258C	75	29	17,3	100	Не обнару- жено	4,91e-4	Нет актив- ности

трастузумаб LC-S159C- HC-S375C	75	50	17,8	100	Не обнару- жено	2,44e-4	Нет активнос- ти
трастузумаб LC-E165C- HC-E258C	77	29	16,5	100	Не обнару- жено	3,24e-4	Нет актив- ности
трастузумаб LC-E165C- HC-S375C	77	50	16,9	100	Не обнару- жено	2,15e-4	Нет актив- ности
Антитело 14090 LC- A143C-HC- K360C	92	48	16,1	94,8	5,2	Нет актив- ности	4,92e-4
Антитело 14090 LC- A143C-HC- S375C	92	50	21,8	100	Не обнару- жено	Нет актив- ности	4,76e-4
Антитело 14090 LC- V159C-HC- K360C	96	48	24,0	100	Не обнару- жено	Нет актив- ности	4,55e-4
Антитело 14090 LC- V159C-HC- S375C	96	50	21,7	97,1	2,9	Нет актив- ности	3,99e-4

н.о.: не обнаруживаемо, нет активности: отсутствие признаков уничтожения клеток при наивысшей оцениваемой концентрации (66 нМ) SEQ ID NO только устанавливают константные области последовательностей антител.

Пример 11. Выбор Cys участков на основании гидрофобности ADC.

Для дополнительной оптимизации выбора Cys мутантов и комбинаций мутантов для получения ADC с DAR 2, 4, 6 и 8, анализировали свойства MMAF ADC, полученных с единственным участком у мутантов трастузумаб Cys и Pcl (Получение Pcl ADC описано в патентной заявке 55573), и доступность и воздействие растворителей на участки конъюгации проверяли на кристаллических структурах IgG.

Одним из наиболее информативных было наблюдение того, что гидрофобность трастузумаб Pcl-MMAF ADC сильно варьировала, когда полезную нагрузку присоединяли на различных участках (фиг. 23). Гидрофобность этих ADC измеряли посредством хроматографии с гидрофобным взаимодействием (ГВХ), используя колонку TSKgel Phenyl-5PW (Tosoh Bioscience, TSKgel Фенил-5PW, 13 мкм, 21×150 мм, нержавеющая сталь, Cat# 07656; промывочный буфер А: 1,5 М сульфат аммония в 20 мМ NaPi (pH7,4); буфер В: 20% изопропанол в 20 мМ NaPi (pH7,4); скорость потока 5 мл/мин; линейный градиент от 20 до 80% буфера В в течение 90 мин; регистрация посредством УФ-поглощения при 280 нм). Удивительно то, что наблюдали, что значения времени удерживания образцов с DAR 2 сильно варьировали между ADC, несмотря на то, что единственным различием являлся участок присоединения АВА-MMAF (фиг. 23). ГВХ разделяет молекулы на основе гидрофобности. Все ADC с DAR 2 имеют время удерживания при ГВХ больше, чем время удерживания неконъюгированного антитела (WT=45 мин, фиг. 23), что может быть ожидаемым, когда гидрофобная молекула лекарственного средства, такая как АВА-MMAF присоединяется к антителу. Однако, присоединение полезной нагрузки на различных участках увеличивает гидрофобность ADC в различной степени.

Удивительно большие различия в значениях времени удерживания могут быть рационально объяснены в результате проверки местоположения присоединения участков в структуре антитела (фиг. 24): значения времени удерживания являются более высокими, если полезная нагрузка лекарственного средства присоединяется на экспонированном участке с наружной стороны антитела, например на HC-K288Pcl, HC-N286Pcl, HC-V422Pcl, HC-L398Pcl и HC-S415Pcl, где значения времени удерживания между 87 и 94 мин измеряли для соответствующих ADC (фиг. 23). Напротив, если полезная нагрузка присоединяется на внутреннем участке, таком как полость, образованная между вариабельной областью и СН1 доменами (например, HC-P153Pcl, HC-E152Pcl, HC-L174Pcl, HC-P171Pcl, LC-R142Pcl, LC-E161Pcl, LC-E165Pcl, LC-S159Pcl) или большое отверстие между СН2 и СН3 доменами антитела (например, HC-K246C, HC-S375Pcl, HC-T393Pcl, HC-K334Pcl), время удерживания при ГВХ увеличивалось до только 47-57 мин поскольку полезная нагрузка является частично ограниченной от взаимодействия с раствори-

телем и колонки ГВХ. Для других участков, например, относительно экспонированных участков, LC-K107Pc1 и HC-K360Pc1, измеряли промежуточные значения времени удерживания, равные 70 и 83 мин.

Снижение гидрофобности белкового лекарственного средства обычно считают благоприятным, поскольку оно может понизить агрегацию и выведение из циркуляции. Авторы предполагают, что данные ГВХ, представленные на фиг. 23, обеспечивают выбор предпочтительных участков присоединения полезной нагрузки. Конъюгирование полезных нагрузок лекарственных средств на участках, где они ограничены от взаимодействий с растворителем и присоединения, минимально увеличивает гидрофобность антитела, что при присоединении лекарственного средства должно быть благоприятным независимо от химизма конъюгации и класса полезной нагрузки. Осторожный выбор участков присоединения, который приводит к минимальным изменениям гидрофобности, может быть особенно благоприятным, когда присоединяют 4, 6 или 8 лекарственных средств на антитело, или когда применяют особенно гидрофобные полезные нагрузки.

Cys участки, выбранные для ADC с низкой гидрофобностью.

Чтобы минимизировать гидрофобность ADC, выбирали участки, которые могли бы быть направлены в сторону внутренней части различных белковых доменов антитела. Выбор был основан на анализе структуры антитела и поведения существующих ADC с DAR=2, где это применимо (поведение = время удерживания на ГВХ и/или задержанное время удерживания на AnSEC с конъюгатами, которые взаимодействуют со смолами SEC). Из Cys участков, идентифицированных в табл. 1 и табл. 2, участки, приведенные в таблице 24 удовлетворяют приведенным выше критериям.

Все ADC анализировали посредством хроматографии с гидрофобным взаимодействием (ГВХ). Трастузумаб MMAF ADC, конъюгированный на экспонированных участках HC-K360C, LC-K107C, HC-E258C и HC-R292C, применяли для целей сравнения. Результаты показаны в табл. 25. трастузумаб Cys-MMAF ADC и неконъюгированное антитело дикого типа анализировали на колонке TSKgel Butyl-NPR, как описано ниже. Для сравнения, также приведены данные ГВХ, полученные ранее для Pcl-MMAF ADC на TSKgel Phenyl-5PW (фиг. 23). Несмотря на различные приборное оснащение и методики, и хотя ожидается некоторая изменчивость вследствие различных геометрии и структур двух линкеров, отношение значений времени удерживания для ADC, конъюгированных по одинаковому положению, но посредством различных методов конъюгации, остается почти постоянным. Данные ГВХ позволяют предположить, что значения времени удерживания несомненно являются мерой измерения того, насколько хорошо полезная нагрузка ограничена во внутренней части антитела независимо от химизма присоединения и структуры линкера. Как ожидалось, относительное ранжирование различных участков присоединения остается, в основном, идентичным для Pcl-MMAF и Cys-MMAF ADC.

Присоединение к участку, выбранному в табл. 24, HC-E333C, HC-K392C и HC-K326C приводит к MMAF ADC, которые имеют значения времени удерживания при ГВХ, которые являются сходными с такими значениями для ADC с экспонированными участками LC-K107C-MMAF, HC-E258C-MMAF, HC-R292C-MMAF и HC-K360C-MMAF (табл. 28). Присоединение к участкам HC-E152C, LC-E165C, HC-P171C, LC-R142C, LC-E161C, HC-L174C и HC-S124C увеличивает время удерживания полученного в результате ADC на менее 15% в сравнении с неконъюгированным антителом дикого типа. Все эти участки расположены в CH1 домене или в легкой цепи (ЛЦ) и данные по времени удерживания при ГВХ позволяют предложить их в качестве предпочтительных участков присоединения. Из участков CH3 домена, HC-K334C и HC-S375C проявляют самое низкое увеличение гидрофобности при конъюгации, что делает их предпочтительными участками присоединения.

Таблица 24

Cys мутантные участки

Cys мутантный участок	Участок (EU No.)
LC-R142C	142
LC-S159C	159
LC-E161C	161
LC-E165C	165
HC-S124C	124
HC-E152C	152
HC-P171C	171
HC-L174C	174
HC-K326C	326
HC-E333C	333
HC-K334C	334
HC-S375C	375
HC-K392C	392

Таблица 25

Значение времени удерживания при хроматографии с гидрофобным взаимодействием (ГВХ) образцов трастузумаб MMAF ADC с DAR 2. При сравнении химизма конъюгации Cys и Pcl, два набора хорошо согласуются: участки, которые скрывают лекарственное средство, конъюгированное посредством одного химизма, также имеют тенденцию к скрытию лекарственного средства, когда их конъюгируют посредством другого химизма. Некоторая изменчивость является ожидаемой вследствие различной геометрии двух линкерных систем

Трастузумаб ADC	DAR2 ГВХ удерживание ^a (мин)	Трастузумаб ADC	DAR2 ГВХ удерживание ^b (мин)	Отношение
ДТ	19,5	ДТ	45	0,43
HC-E152C-MMAF	20,4	HC-E152Pcl-MMAF	50	0,41
LC-E165C-MMAF	20,8	LC-E165Pcl-MMAF	55	0,38
HC-P171C-MMAF	21,0	HC-P171Pcl-MMAF	51	0,41
HC-K334C-MMAF	21,5	HC-K334Pcl-MMAF	56	0,38
HC-S375C-MMAF	21,6	HC-S375Pcl-MMAF	52	0,42
LC-R142C-MMAF	21,7	LC-R142Pcl-MMAF	51	0,42
LC-E161C-MMAF	22,0	LC-E161Pcl-MMAF	55	0,40
HC-L174C-MMAF	22,0	HC-L174Pcl-MMAF	50	0,44
HC-S124C-MMAF	22,4	HC-S124Pcl-MMAF	59	0,38
HC-E333C-MMAF	23,1	HC-E333Pcl-MMAF	63	0,37
HC-K392C-MMAF	23,1	HC-K392Pcl-MMAF	60	0,38
HC-R292C-MMAF	23,8	HC-R292Pcl-MMAF	69	0,35
HC-K326C-MMAF	24,5	HC-K326Pcl-MMAF	72	0,34
LC-K107C-MMAF	24,8	LC-K107Pcl-MMAF	70	0,35
HC-E258C-MMAF	24,9	HC-E258Pcl-MMAF	69	0,36
HC-K360C-MMAF	26,8	HC-K360Pcl-MMAF	83	0,32

^a Аналитическая ГВХ: Tosoh Bioscience (King of Prussia, PA, USA) колонка TSKgel Butyl-NPR (100 мм × 4,6 мм, 2,5 мкм), промывочный буфер А: 50 мМ фосфата натрия, 1,5 М сульфата аммония, pH 7,0; буфер В: 50 мМ фосфата натрия, pH 7,0; градиент состоял из 5 мин поддержания 100% А, с последующим линейным градиентом от 20 до 100% В в течение 40 мин; регистрация посредством УФ-поглощения при 280 нм.

^b Полу-преп ГВХ: Tosoh Bioscience (King of Prussia, PA, USA), TSKgel Phenyl-5PW, 13 мкм, 21×150 мм; промывочный буфер А: 1,5 М сульфата аммония в 20 мМ NaPi (pH 7,4); буфер В: 20% изопропанола в 20 мМ NaPi (pH 7,4); скорость потока 5 мл/мин; линейный градиент от 20 до 80% буфера В в течение 90 мин; регистрация посредством УФ-поглощения при 280 нм.

Подробная методика аналитической ГВХ.

Данные аналитической ГВХ для трастузумаб Cys-MMAF ADC получали, используя Tosoh Bioscience (King of Prussia, PA, USA) колонку TSKgel Butyl-NPR (100 мм × 4,6 мм, 2,5 мкм), установленную на Dionex UltiMate 3000 ВЭЖХ (Sunnyvale, CA, USA). Метод состоял из бинарного градиента буфера А (50 мМ фосфата натрия, 1,5 М сульфата аммония, pH 7,0) и буфера В (50 мМ фосфата натрия, pH 7,0). Образцы получали разбавлением приблизительно 50 мкг антитела (PBS) равным объемом 3 М сульфата аммония. Градиент состоял из 5 мин выдерживания при 100% А, с последующим линейным градиентом от 20 до 100% В в течение 40 мин и окончательного повторного уравнивания при первоначальных условиях в течение 10 мин перед следующим инъектированием. Разделение регистрировали посредством УФ-поглощения при 280 нм.

Получение и характеристика Cys ADC с DAR 4, 6 и 8.

Cys мутации могут комбинироваться для получения ADC с DAR 4, 6 и 8. Как правило, предпочтительная комбинация представляет собой комбинацию из двух Cys мутаций, приводящих к ADC с DAR 4. Некоторые примеры, которые включают комбинирование Cys мутантной тяжелой цепи (HC) с Cys мутантной легкой цепью (LC) для получения ADC с DAR 4, показаны в примере 10 для трастузумаб и для антитела 14090. Дополнительные данные представлены в табл. 26. На основании данных ГВХ и проверки участков присоединения в кристаллических структурах IgG, были получены дополнительные Cys комбинации с использованием методик, описанных в примерах 2, 5 и 6. Данные для выбранных примеров MMAF ADC показаны в табл. 26. В дополнение, выбранные участки тяжелой цепи комбинировали и двойные Cys мутации тяжелой цепи клонировали, следуя методикам, приведенным в примере 2. Получали антитела, представляющие две HC Cys мутации и конъюгировали, следуя методикам, описанным в примере 5 и 6.

Для получения ADC с DAR 4, комбинации включают мутации по одиночному участку, приведенные в табл. 24. Комбинации одиночных участков приводили к ADC с низкой гидрофобностью (табл. 25). В некоторых комбинациях, одна Cys мутация расположена в CH1 домене или в легкой цепи, а второй участок расположен в CH3 домене. Примерами таких комбинаций являются антитела, представляющие комбинации Cys мутантов из HC-E152C и HC-S375C и LC-E165C и HC-S375C и HC-E152C и HC-K334C и LC-E165C и HC-K334C.

ADC с DAR 6 и 8 также могут быть получены, когда три или четыре Cys мутации комбинируют в одном антителе. Выбранные комбинации тяжелой цепи комбинировали для получения ADC с DAR 4, 6 и 8. Двойные и тройные Cys мутации тяжелой цепи клонировали, следуя протоколам, приведенным в примере 2. Антитела, представляющие две, три и четыре Cys мутации получали и конъюгировали, следуя методикам, описанным в примере 5 и 6. Характеристики некоторых примеров ADC с DAR 4, DAR 6 и DAR 8 обобщены в табл. 26. Некоторые из этих ADC имели удивительно хорошие ФК свойства, как показано на фиг. 25. Антитело 14090 является мышинным кросс-реакционноспособным и, следовательно, антитело 14090 ADC, как ожидают, выводится более быстро, чем трастузумаб ADC, который не связывается с какими-либо мышинными антигенами.

Комбинации включают комбинации с тремя и четырьмя мутациями по единственному участку, приведенными в табл. 24. Комбинации включают те участки, которые приводят к ADC с низкой гидрофобностью (табл. 25). Комбинации включают одну Cys мутацию, расположенную в CH1 домене или в легкой цепи (LC), и необязательно дополнительные один-три участка находятся в CH3 домене. Примеры таких комбинаций включают антитела, представляющие комбинации Cys мутантов из HC-E152C или LC-E165C, с HC-S375C, с HC-K334C и/или HC-K392C. Предпочтительные комбинации для получения ADC с DAR 6 и DAR 8 показаны в табл. 27 и табл. 28 соответственно.

С некоторыми исключениями, присоединение MMAF на всех исследованных Cys участках приводит к ADC с высокой термической стабильностью (Пример 7, табл. 19), низкой склонностью к агрегации (Пример 6, табл. 18) и хорошими фармакокинетическими свойствами ADC DAR 2 (Пример 9, табл. 22, фиг. 18). Различия ADC по гидрофобности, очевидно, не переводятся в большие различия в биофизических и фармакокинетических свойствах, когда применяют относительно растворимую полезную нагрузку, такую как MMAF. В действительности, как показано выше, MMAF ADC с DAR 4, DAR 6 и DAR 8 с приемлемыми фармакокинетическими свойствами могут быть получены даже с использованием экспонированных, "гидрофобных" участков, таких как HC-K360C в комбинации с более предпочтительными участками присоединения. Однако, при менее хороших характеристиках, когда применяют больше гидрофобных полезных нагрузок, осторожный выбор участков присоединения, которые приводят к минимальным изменениям в гидрофобности, может быть незаменимым, чтобы обеспечить получение неагрегирующих ADC с хорошими фармакокинетическими свойствами. Для таких гидрофобных полезных нагрузок, использование комбинации участков, которые снижают гидрофобность, увеличения могут быть благоприятными, когда присоединяют 4, 6 или 8 лекарственных средств на антитело.

Таблица 26

Характеризация выбранных MMAF ADC с DAR 4, 6 и 8, полученных с комбинациями Cys мутаций

Наименование Cys-MMAF ADC	DAR	Мульти- мера AnSEC	AUC MMAF/AUC hIgG
трастузумаб-НС-Е258С-LC-S159С-MMAF	4,0	н.о.	0,9
трастузумаб-НС-S375С-LC-S159С-MMAF	4,0	н.о.	0,8
трастузумаб-НС-Е258С-LC-Е165С-MMAF	4,0	н.о.	0,9
трастузумаб-НС-S375С-LC-Е165С-MMAF	4,0	н.о.	0,8
трастузумаб-НС-Е152С-LC-R142С-MMAF	3,8	н.о.	0,9
трастузумаб-НС-Р171С-LC-R142С-MMAF	3,8	0,1	1,1
трастузумаб-НС-Е152С-LC-S159С-MMAF	3,8	н/а	0,7
Антитело 14090-НС-S375С-LC-A143С-MMAF	4,0	н.о.	0,9
Антитело 14090-НС-K360С-LC-V159С-MMAF	4,0	н.о.	1,0
Антитело 14090-НС-S375С-LC-V159С-MMAF	4,0	2,9	1,0
трастузумаб-НС-K334С-S375С-LC-Е165С-MMAF	6,0	н.о.	0,8
трастузумаб-НС-K334С-K392С-LC-Е165С-MMAF	5,8	11	0,4
трастузумаб-НС-K334С-K360С-S375С-LC-Е165С-MMAF	8,0	5	0,6
трастузумаб-НС-K334С-K360С-K392С-LC-Е165С-MMAF	7,8	н.о.	0,8
трастузумаб-НС-K334С-S375С-K392С-LC-Е165С-MMAF	8,0	н.о.	0,7

* Расчеты AUC основаны ФК измерениях у мышей с использованием аналитических тестов ELISA с анти-MMAF и анти-IgG. н.о.; не обнаружено, ниже предела количественного определения.

Таблица 27

Предпочтительные комбинации Cys-участков для получения ADC с DAR 6

ADC комбинация	Участок 1	Участок 2	Участок 3
1	НС-Е152С	НС-S375С	НС-K392С
2	НС-Е152С	НС-S375С	НС-K334С
3	НС-Е152С	НС-K334С	НС-K392С
4	LC-Е165С	НС-S375С	НС-K392С
5	LC-Е165С	НС-S375С	НС-K334С
6	LC-Е165С	НС-K334С	НС-K392С

Таблица 28

Предпочтительные комбинации Cys-участков для получения ADC с DAR 8

ADC комбинация	Участок 1	Участок 2	Участок 3	Участок 4
1	HC-E152C	HC-S375C	HC-K334C	HC-K392C
2	HC-E152C	HC-S375C	HC-E333C	HC-K392C
3	LC-E165C	HC-S375C	HC-K334C	HC-K392C
4	LC-E165C	HC-S375C	HC-E333C	HC-K392C

Пример 12. Исследования эффективности действия трастузумаб Cys-MMAF ADC *in vivo*.

Ксенотрансплантантные модели опухоли *in vivo* имитируют наблюдаемую биологическую активность посредством трансплантации соответствующих и хорошо охарактеризованных человеческих первичных опухолей или клеточных линий опухолей иммунодефицитным голым мышам. Исследования по обработке мышей с ксенотрансплантантами опухоли противораковыми реагентами позволили получить ценную информацию, касающуюся эффективности действия *in vivo* тестируемых реагентов (Sausville and Burger, 2006). Поскольку клетки MDA-MB231 клона 16 являлись чувствительными к трастузумаб Cys-MMAF ADC антигензависимым образом (фиг. 15), данную клеточную линию выбрали в качестве модели *in vivo* для оценки трастузумаб Cys-MMAF ADC. Все исследования на животных проводили в соответствии с Руководством по содержанию и использованию лабораторных животных (публикация NIH; National Academy Press, 8th edition, 2001). Клетки клона 16MDA-MB231 имплантировали *nu/nu* мышам подкожно (Morton and Houghton, 2007). После того, как размер опухоли достигал ~200 мм³, трастузумаб Cys-MMAF ADC вводили мышам посредством ВВ инъекции одной дозой при 3 мг/кг. Рост опухоли измеряли ежедневно после инъекции ADC. Каждая группа обработки включала 9 мышей. Пример исследования эффективности действия *in vivo* указан на фиг. 22 с тремя трастузумаб Cys-MMAF ADC. Обработка мышей 3 мг/кг трастузумаб Cys-MMAF ADC вызывала регресс опухоли для всех трех тестируемых Cys-MMAF ADC (фиг. 22). Не наблюдали никакой потери массы, ассоциированной с обработкой ADC. Результаты подтверждали, что при обработке однократной дозой при 3 мг/кг, трастузумаб Cys-MMAF ADC эффективно вызывали регресс опухолей MDA-MB231 клона 16.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело IgG или фрагмент этого антитела и фрагмент лекарственного средства, где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит замену аминокислоты на цистеин в константной области тяжелой цепи в положении, соответствующем положению 152 тяжелой цепи IgG1, и где указанное положение нумеруют в соответствии с системой EU.

2. Иммуноконъюгат по п.1, где указанное антитело или фрагмент антитела содержит последовательность SEQ ID NO: 10.

3. Иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело IgG или фрагмент этого антитела и фрагмент лекарственного средства, где указанное модифицированное антитело или фрагмент антитела содержит замены двух аминокислот на цистеин в константной области тяжелой цепи в положениях, соответствующих положениям 152 и 375 тяжелой цепи IgG1, где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU.

4. Иммуноконъюгат по п.3, в котором указанное модифицированное антитело или фрагмент этого антитела содержит последовательность SEQ ID NO: 295.

5. Иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело IgG или фрагмент этого антитела и фрагмент лекарственного средства, где указанное модифицированное антитело или фрагмент этого антитела содержит комбинацию из замен трех аминокислот на цистеин в константной области тяжелой цепи, где комбинация содержит замены, выбранные из:

- а) положений, соответствующих положениям 152, 375 и 392 тяжелой цепи антитела IgG1,
 - б) положений, соответствующих положениям 152, 334 и 375 тяжелой цепи антитела IgG1, и
- где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU.

6. Иммуноконъюгат, содержащий модифицированное антитело IgG или фрагмент этого антитела и фрагмент лекарственного средства, где указанное модифицированное антитело или фрагмент этого антитела содержит комбинацию из замен четырех аминокислот на цистеин:

- а) в константной области в положениях, соответствующих положениям 152, 334, 375 и 392 тяжелой цепи IgG1; или
 - б) в константной области в положениях, соответствующих положениям 152, 333, 375 и 392 тяжелой цепи IgG1;
- где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU.

7. Иммуноконъюгаты по любому из предшествующих пунктов, имеющие отношение лекарственно-

го средства к антителу приблизительно 4, приблизительно 6 или приблизительно 8.

8. Иммуноконъюгат по любому из предшествующих пунктов, где фрагмент лекарственного средства присоединяют к модифицированному антителу или фрагменту антитела через серу указанного цистеина и необязательный линкер.

9. Иммуноконъюгат по п.8, где указанный фрагмент лекарственного средства соединяют с указанной серой указанного цистеина через расщепляемый или нерасщепляемый линкер.

10. Иммуноконъюгат по любому из предшествующих пунктов, где указанный иммуноконъюгат содержит связь тиол-малеимид, связь $-S-CH_2-C(=O)-$ или дисульфидную связь.

11. Иммуноконъюгат по любому из предшествующих пунктов, где указанный фрагмент лекарственного средства представляет собой цитотоксичное средство.

12. Иммуноконъюгат по п.11, где указанный фрагмент лекарственного средства выбирают из группы, состоящей из таксанов, ДНК-алкилирующих агентов (например, аналогов СС-1065), антрациклинов, аналогов тубулизина, аналогов дуокармицина, ауристатины Е, ауристатины F и майтансиноидов.

13. Иммуноконъюгат по любому из предшествующих пунктов, где указанное антитело представляет собой моноклональное антитело, химерное антитело, гуманизированное антитело, полностью человеческое антитело, биспецифичное антитело или мультиспецифичное антитело.

14. Иммуноконъюгат по любому из предшествующих пунктов, где указанное антитело или фрагмент антитела специфически связывается с маркером клеточной поверхности, характеристическим для опухоли.

15. Иммуноконъюгат по любому из предшествующих пунктов, где IgG представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

16. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуноконъюгат по любому из предшествующих пунктов.

17. Модифицированное антитело IgG или фрагмент этого антитела, содержащее замену аминокислоты на цистеин в константной области тяжелой цепи в положении, соответствующем положению 152 тяжелой цепи IgG1, где указанное положение нумеруют в соответствии с системой EU.

18. Модифицированное антитело IgG или фрагмент этого антитела, содержащее:

(i) две замены аминокислот на цистеин в константной области тяжелой цепи в положениях, соответствующих положениям 152 и 375 тяжелой цепи IgG1;

(ii) три замены аминокислот на цистеин в константной области тяжелой цепи в положениях, соответствующих:

а) положениям 152, 375 и 392 тяжелой цепи IgG1;

б) положениям 152, 334 и 375 тяжелой цепи IgG1; или

с) положениям 152, 334 и 392 тяжелой цепи IgG1; или

(iii) четыре замены аминокислот на цистеин в константной области тяжелой цепи в положениях, соответствующих:

а) положениям 152, 334, 375 и 392 тяжелой цепи IgG1; или

б) положениям 152, 333, 375 и 392 тяжелой цепи IgG1;

где указанные положения нумеруют в соответствии с системой EU.

19. Модифицированное антитело IgG или фрагмент этого антитела по п.17 или 18, где IgG представляет собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

20. Нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированное антитело или фрагмент антитела по любому из пп.17-19.

21. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.20.

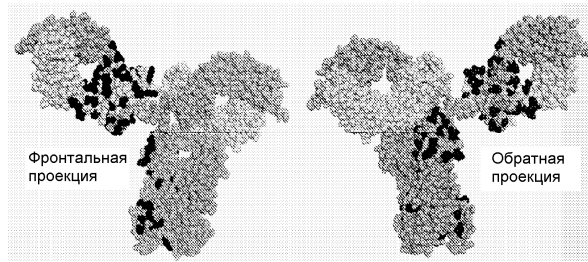
22. Способ получения модифицированного антитела или фрагмента антитела, включающий в себя инкубацию клетки-хозяина по п.21 при подходящих условиях для экспрессии антитела или фрагмента антитела, и выделение указанного антитела или фрагмента антитела.



Фиг. 1А



Фиг. 1В



Фиг. 2

```

Tras  SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS 176
14090 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS 176
Tras  SGLYLSVSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG 236
14090 SGLYLSVSVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG 236
Tras  GPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY 296
14090 GPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY 296
Tras  NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE 356
14090 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE 356
Tras  EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR 416
14090 EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR 416
Tras  WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 447
14090 WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 447
    
```

Фиг. 3

трастузумаб, Ig гамма-1 цепь С область	119	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSVSVVTPSSSLGTQT	197
P01857[1-330], Ig гамма-1 цепь С область, <i>Homo sapiens</i>	119	STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSVSVVTPSSSLGTQT	197
P01859[1-326], Ig гамма-2 цепь С область, <i>Homo sapiens</i>	119	STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSVSVVTPSSNFGTQT	197
P01860[1-377], Ig гамма-3 цепь С область, <i>Homo sapiens</i>	119	STKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSVSVVTPSSSLGTQT	197
P01861[1-327], Ig гамма-4 цепь С область, <i>Homo sapiens</i>	119	STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSVSVVTPSSSLGKTK	197
трастузумаб, Ig гамма-1 цепь С область	198	YICNVNHKPSNTKVDKKVE-----PKSCDKTHTCPPCP	230
P01857[1-330], Ig гамма-1 цепь С область, <i>Homo sapiens</i>	198	YICNVNHKPSNTKVDKKVE-----PKSCDKTHTCPPCP	230
P01859[1-326], Ig гамма-2 цепь С область, <i>Homo sapiens</i>	198	YICNVNHKPSNTKVDKTVR-----KCCVECPPCP	227
P01860[1-377], Ig гамма-3 цепь С область, <i>Homo sapiens</i>	198	YICNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLDGTHTCPCRCPEPKSCDTPPPCPCRCPEPKSCDTPPPCPCRCP	277
P01861[1-327], Ig гамма-4 цепь С область, <i>Homo sapiens</i>	198	YICNVNHKPSNTKVDKRVES-----KYGPPCPCP	227
трастузумаб, Ig гамма-1 цепь С область	231	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH	310
P01857[1-330], Ig гамма-1 цепь С область, <i>Homo sapiens</i>	231	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH	310
P01859[1-326], Ig гамма-2 цепь С область, <i>Homo sapiens</i>	228	APPVAG-PSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVH	306
P01860[1-377], Ig гамма-3 цепь С область, <i>Homo sapiens</i>	278	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH	357
P01861[1-327], Ig гамма-4 цепь С область, <i>Homo sapiens</i>	228	APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH	307
трастузумаб, Ig гамма-1 цепь С область	311	QDMLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN	390
P01857[1-330], Ig гамма-1 цепь С область, <i>Homo sapiens</i>	311	QDMLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN	390
P01859[1-326], Ig гамма-2 цепь С область, <i>Homo sapiens</i>	307	QDMLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN	386
P01860[1-377], Ig гамма-3 цепь С область, <i>Homo sapiens</i>	358	QDMLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN	437
P01861[1-327], Ig гамма-4 цепь С область, <i>Homo sapiens</i>	308	QDMLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN	387
трастузумаб, Ig гамма-1 цепь С область	391	YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	446
P01857[1-330], Ig гамма-1 цепь С область, <i>Homo sapiens</i>	391	YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	446
P01859[1-326], Ig гамма-2 цепь С область, <i>Homo sapiens</i>	387	YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	442
P01860[1-377], Ig гамма-3 цепь С область, <i>Homo sapiens</i>	438	YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	493
P01861[1-327], Ig гамма-4 цепь С область, <i>Homo sapiens</i>	388	YKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	443

Фиг. 4

Каппа RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWVKDQNA-LQSGNSQESVTEQDSK
AAPSV +FPPS E+L++ A++VCL+++FYP V WK D++ +++G E+ T

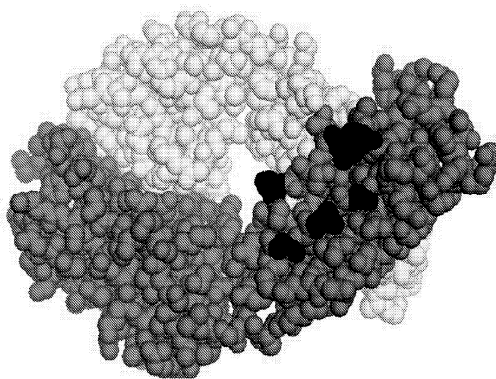
Лямбда QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG--VETTTIPSKQS

Каппа DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
++ Y+ SS L+L+ ++ H+ Y+C+VTH+G S V K+ EC

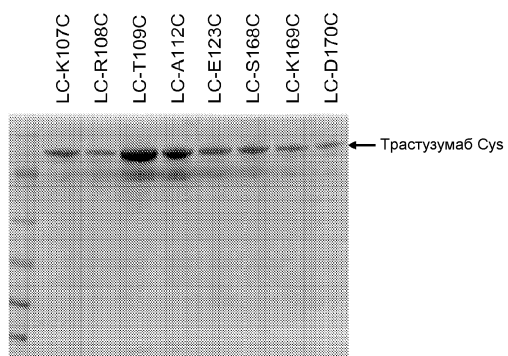
Лямбда NNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSQVTHEG--STVEKTVAPTECS

Фиг. 5А

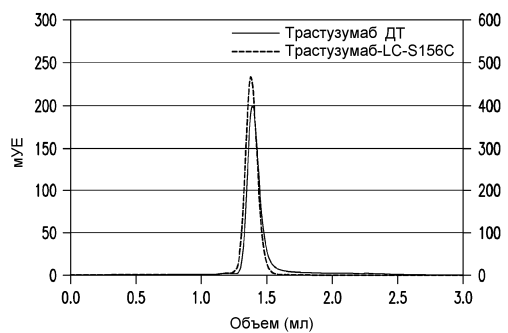
043810



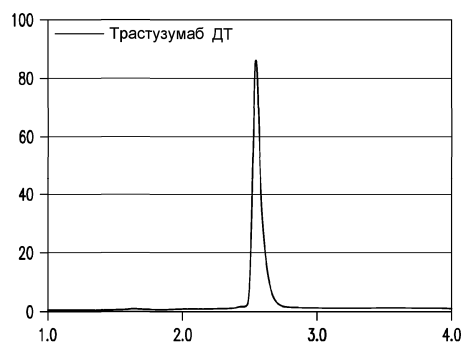
Фиг. 5В



Фиг. 6

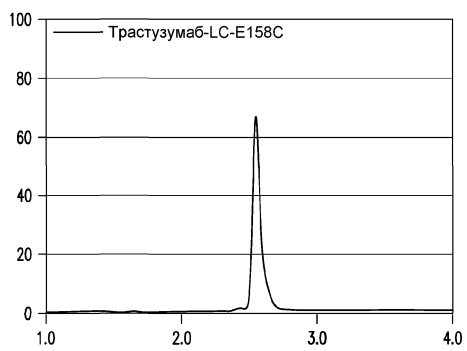


Фиг. 7

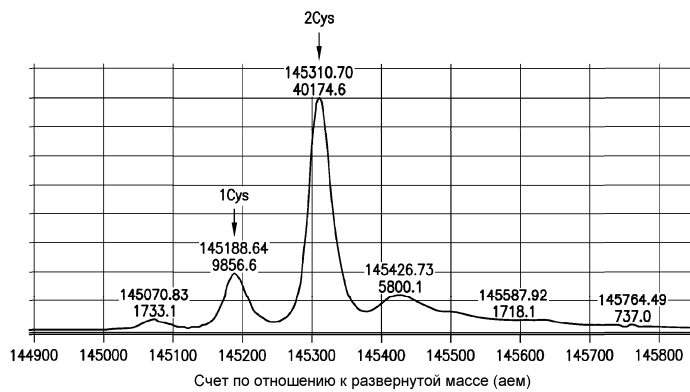


Фиг. 8А

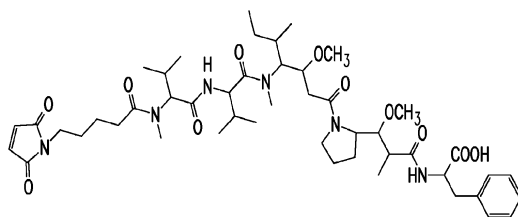
043810



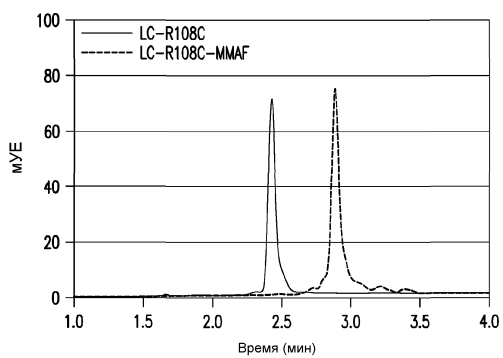
Фиг. 8В



Фиг. 9

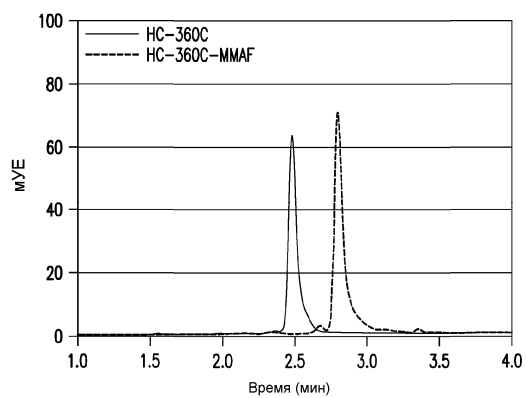


Фиг. 10

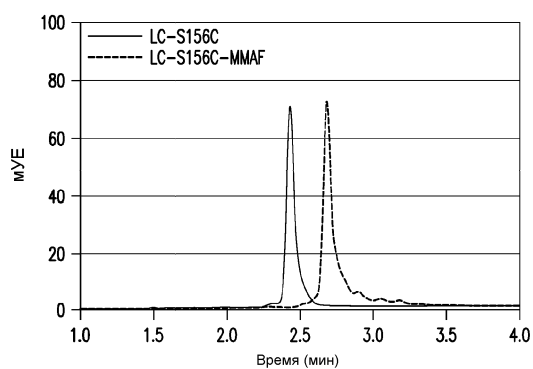


Фиг. 11А

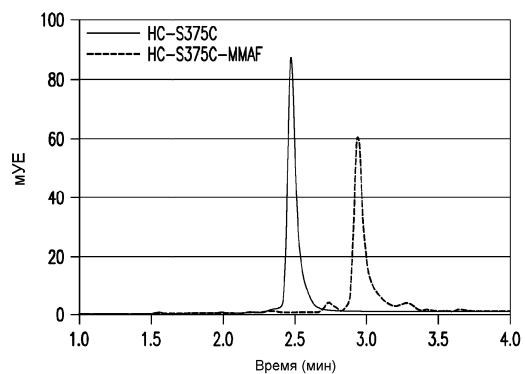
043810



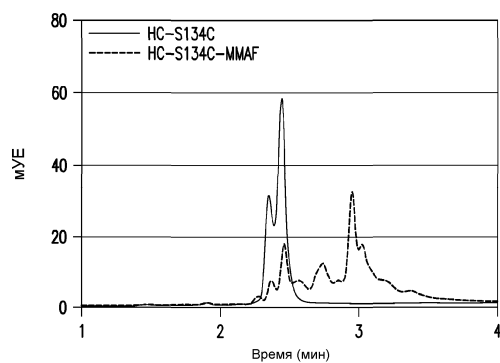
Фиг. 11В



Фиг. 11С

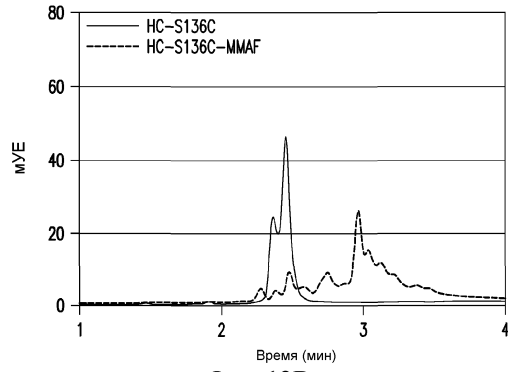


Фиг. 11D

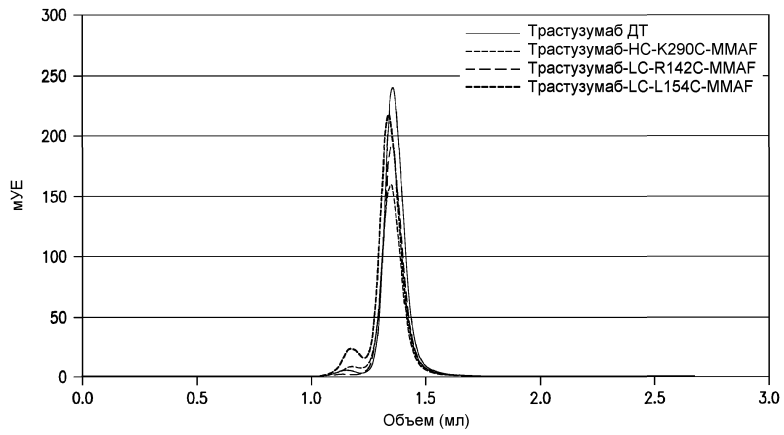


Фиг. 12А

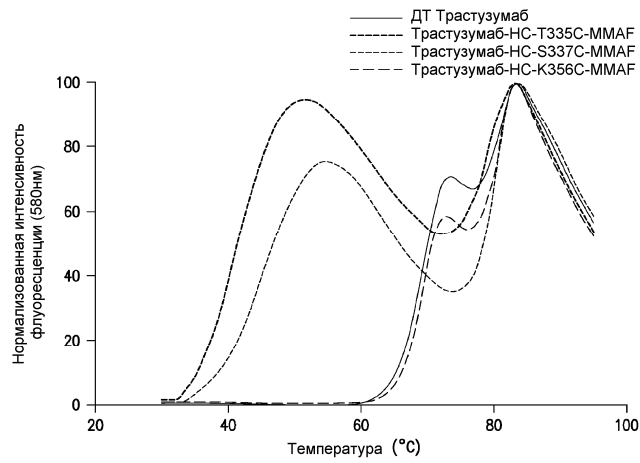
043810



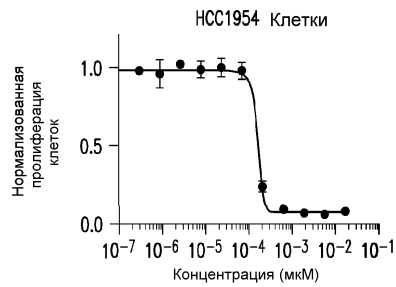
Фиг. 12В



Фиг. 13

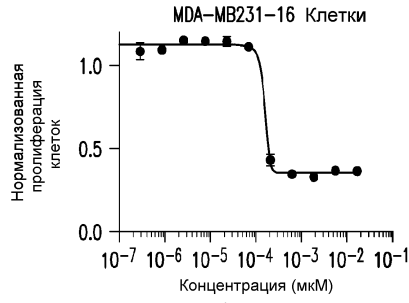


Фиг. 14

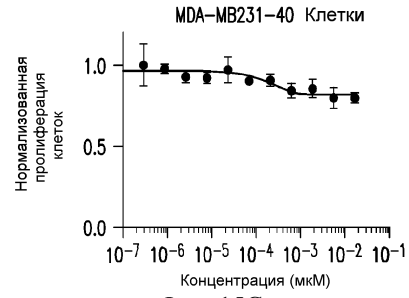


Фиг. 15А

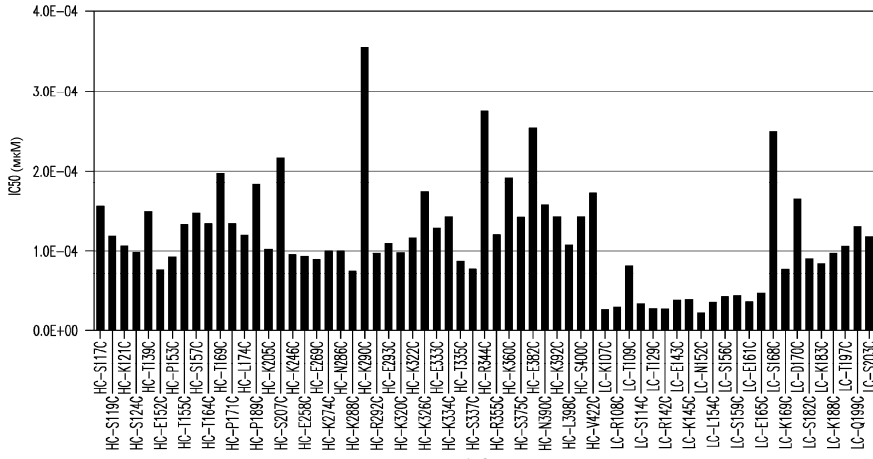
043810



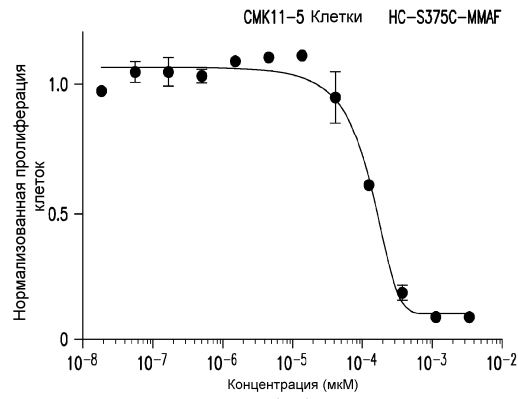
Фиг. 15В



Фиг. 15С

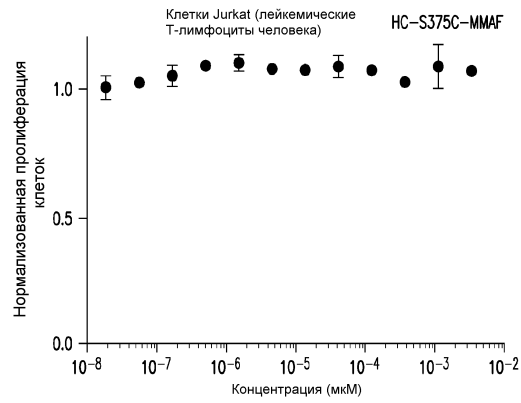


Фиг. 16

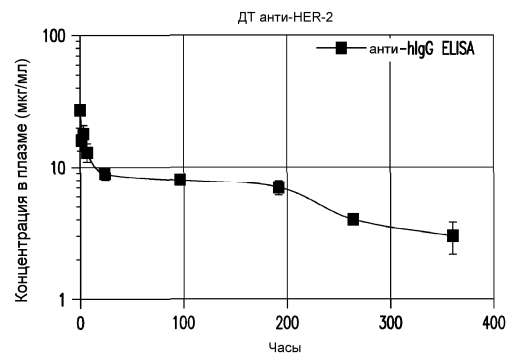


Фиг. 17А

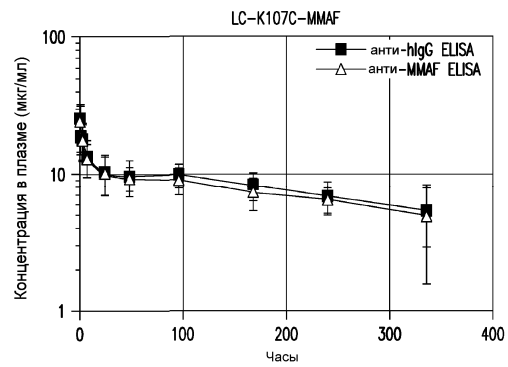
043810



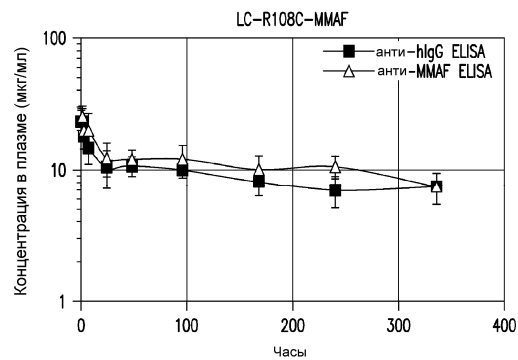
Фиг. 17В



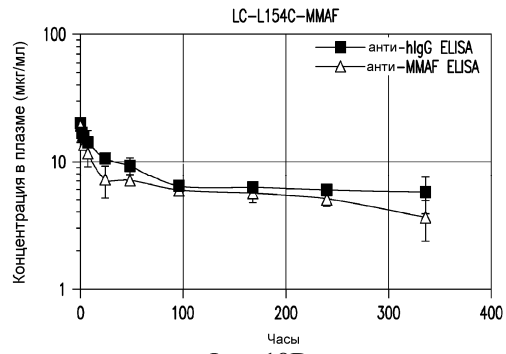
Фиг. 18А



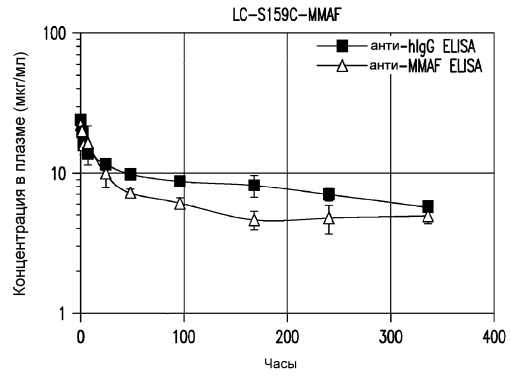
Фиг. 18В



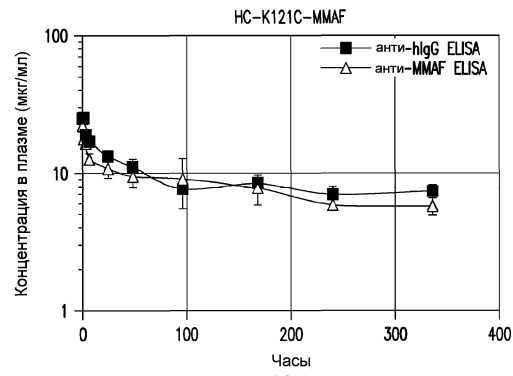
Фиг. 18С



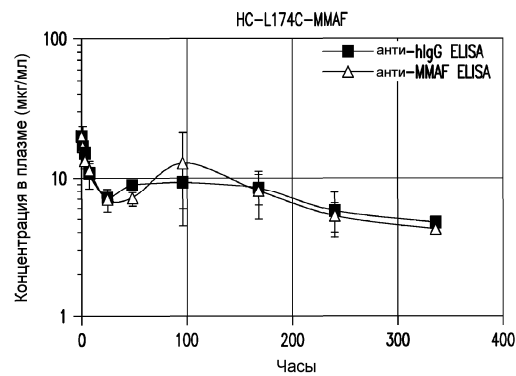
Фиг. 18D



Фиг. 18E

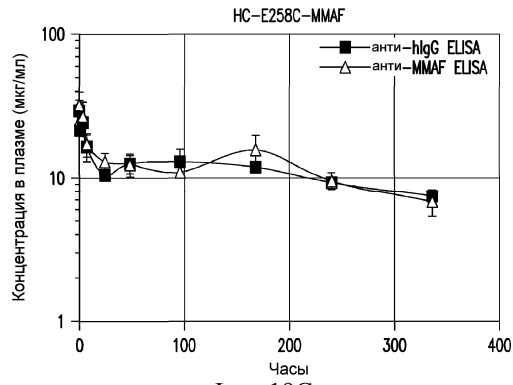


Фиг. 19A

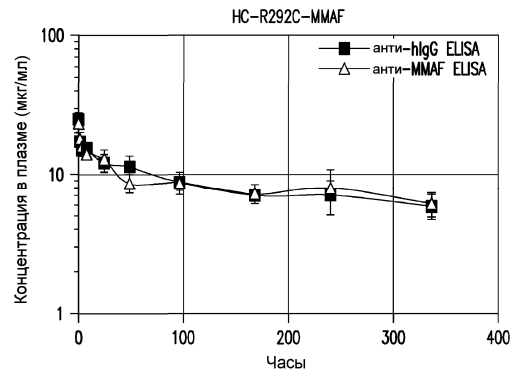


Фиг. 19B

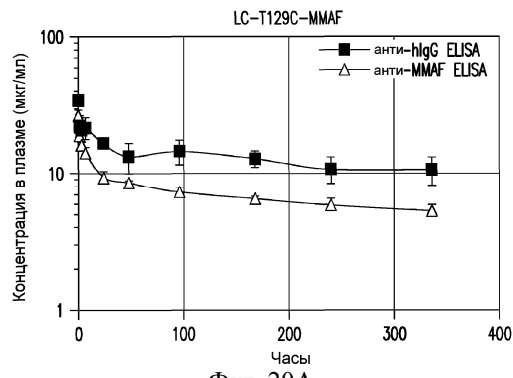
043810



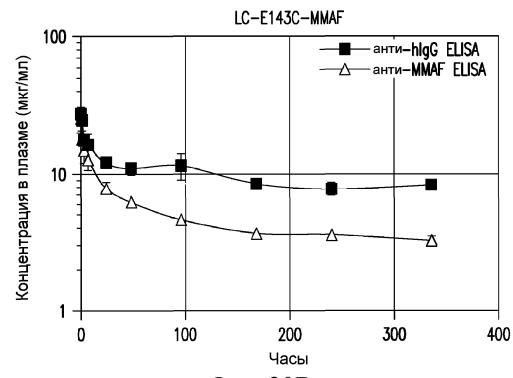
Фиг. 19С



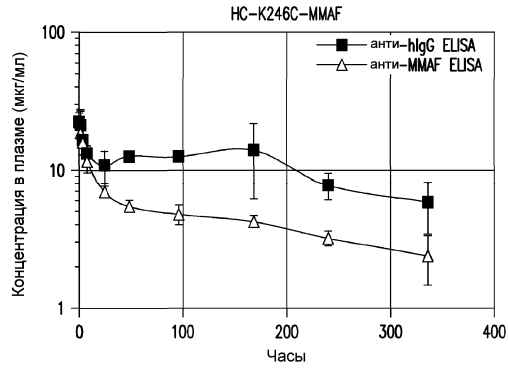
Фиг. 19D



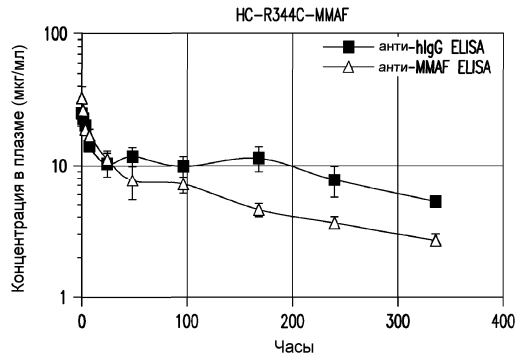
Фиг. 20А



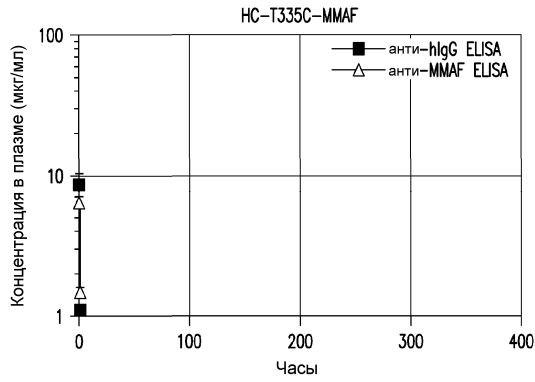
Фиг. 20В



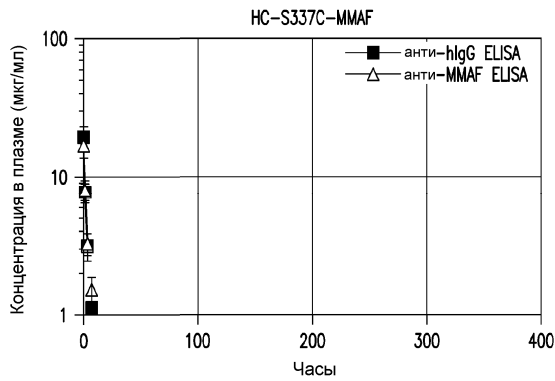
Фиг. 20С



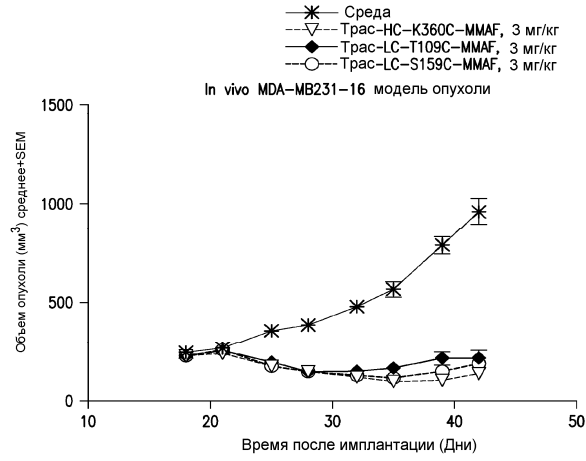
Фиг. 20D



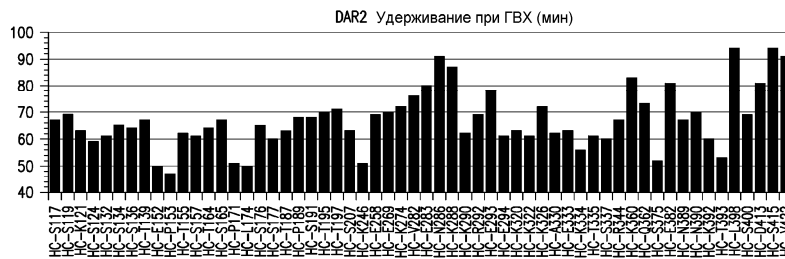
Фиг. 21А



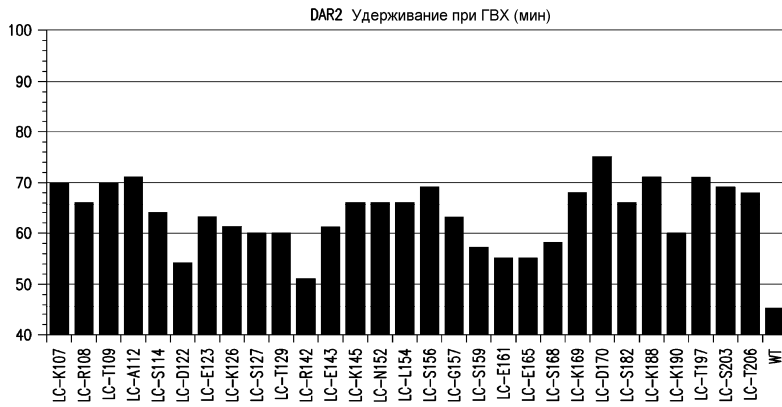
Фиг. 21В



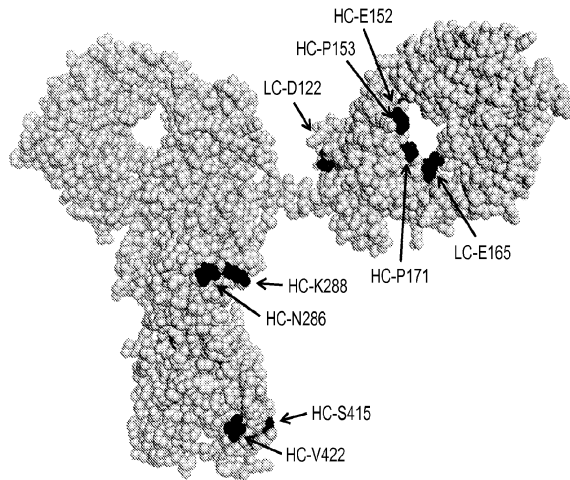
Фиг. 22



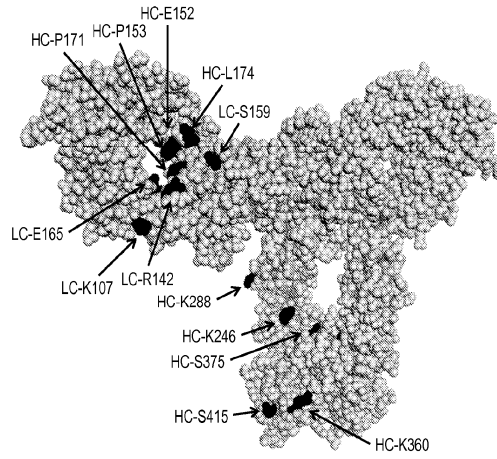
Фиг. 23А



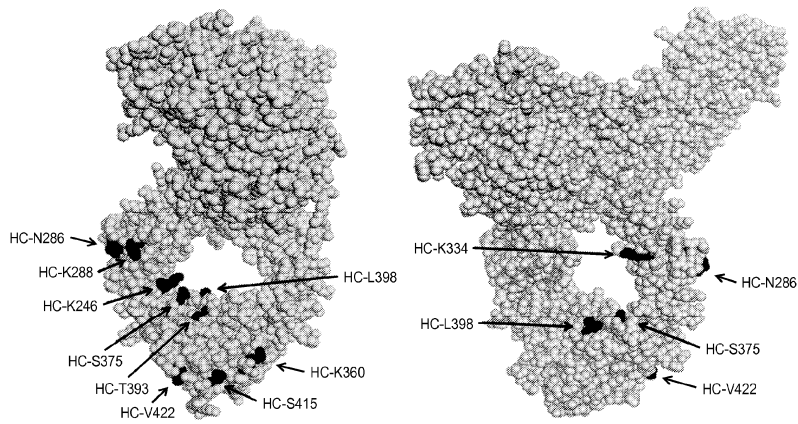
Фиг. 23В



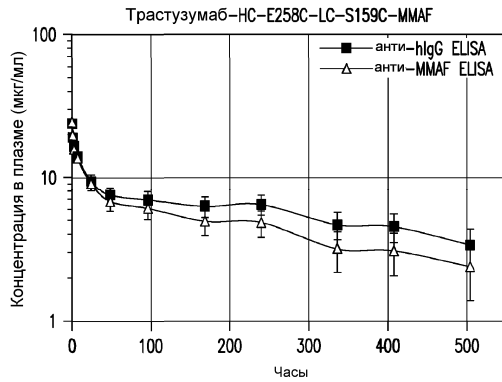
Фиг. 24А



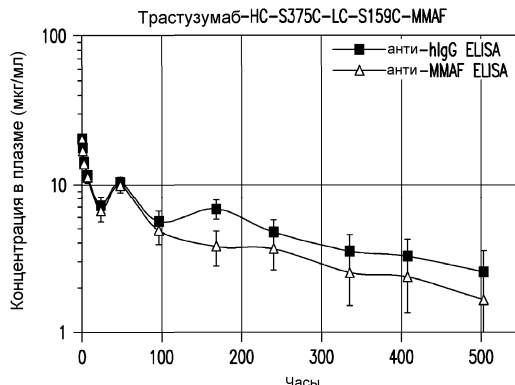
Фиг. 24В



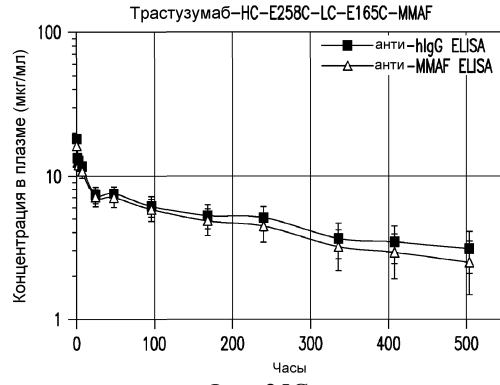
Фиг. 24С



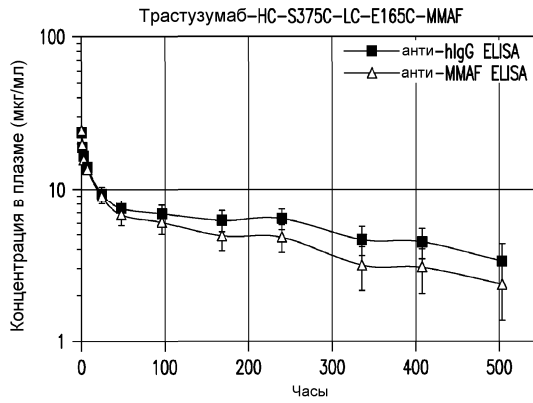
Фиг. 25А



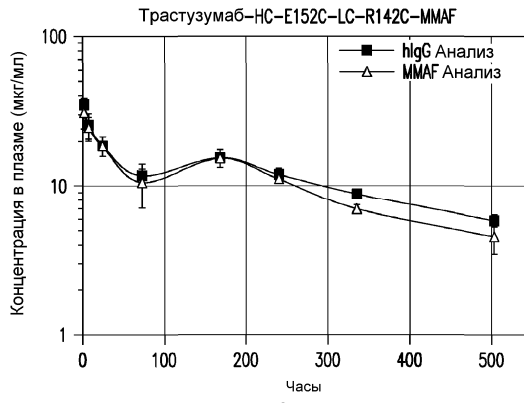
Фиг. 25В



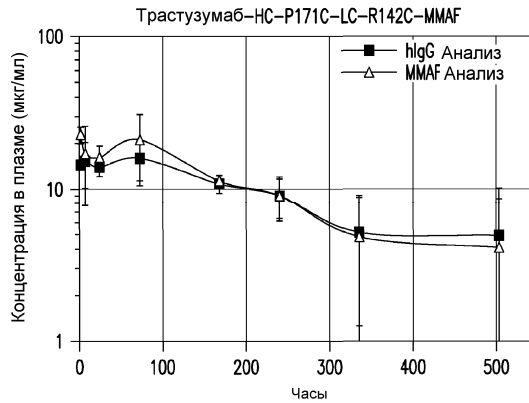
Фиг. 25C



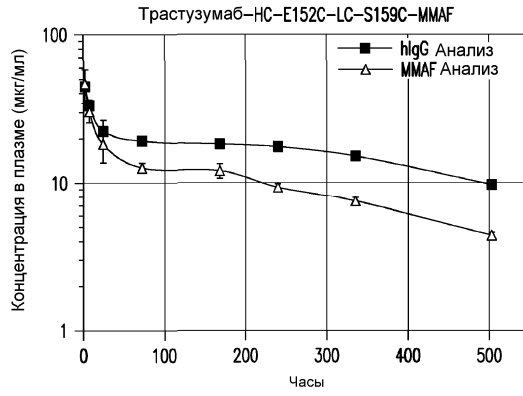
Фиг. 25D



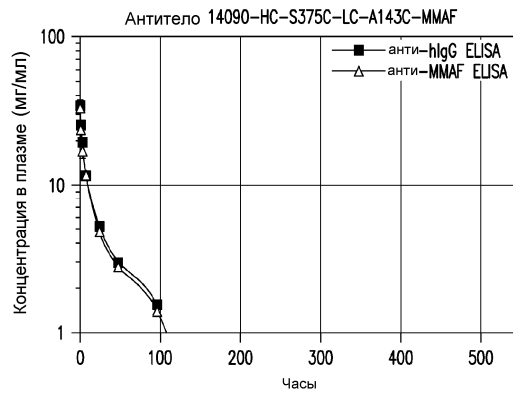
Фиг. 25E



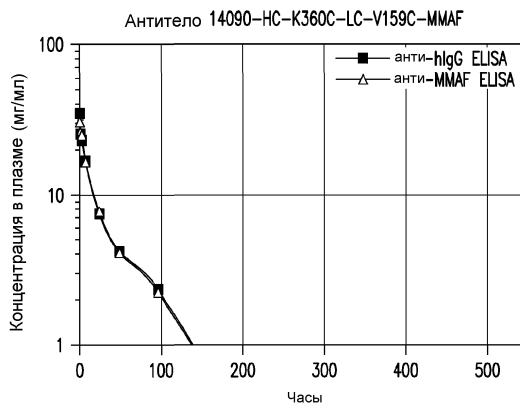
Фиг. 25F



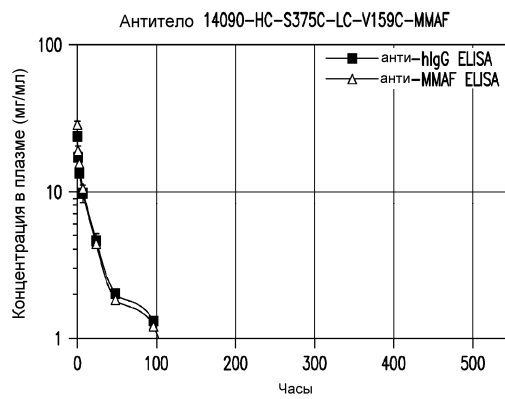
Фиг. 25G



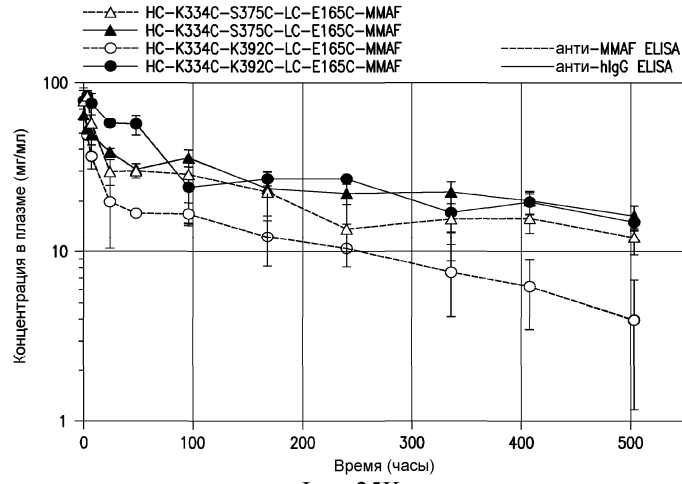
Фиг. 25H



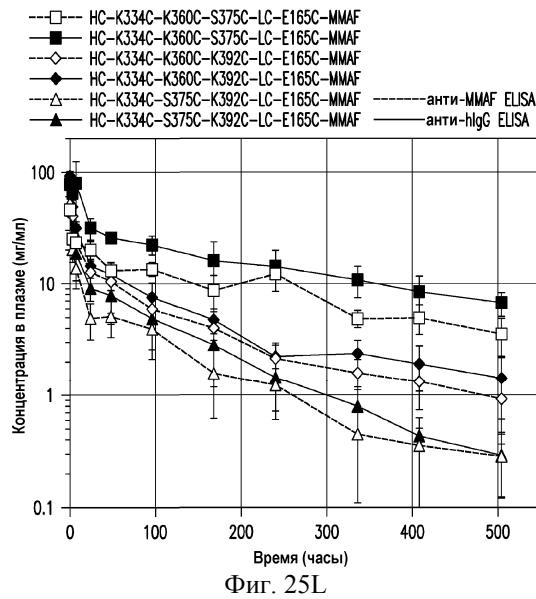
Фиг. 25I



Фиг. 25J



Фиг. 25К



Фиг. 25L

