

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045916**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.01.18**

**(51)** Int. Cl. *A61K 47/68* (2017.01)

**(21)** Номер заявки  
**202191518**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.11.25**

---

**(54) АНТИТЕЛО, СОДЕРЖАЩЕЕ ГЛУТАМИНСОДЕРЖАЩЕЕ С-КОНЦЕВОЕ  
УДЛИНЕНИЕ ЛЕГКОЙ ЦЕПИ, ЕГО КОНЬЮГАТЫ, СПОСОБЫ И ПУТИ  
ПРИМЕНЕНИЯ**

---

**(31)** 62/773,708

**(32)** 2018.11.30

**(33)** US

**(43)** 2021.10.04

**(86)** PCT/US2019/062913

**(87)** WO 2020/112588 2020.06.04

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**БРИСТОЛ-МАЕРС СКВИББ  
КОМПАНИ (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Строп Павел, Рао-Наик Четана, Дэн  
Сяоди, Шеппард Пол О., Холдер  
Патрик Г., Ямазое Сейуми (US)**

**(74)** Представитель:  
**Гизатуллин Ш.Ф., Угрюмов В.М.,  
Строкова О.В., Гизатуллина Е.М.,  
Парамонова К.В. (RU)**

**(56)** WO-A1-2016144608

WO-A1-2017025179

CHI-WANG LIN ET AL. "Transglutaminase-Catalyzed Site-Specific Conjugation of Small-Molecule Probes to Proteins in Vitro and on the Surface of Living Cells", JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 128, no. 14, 1 April 2006 (2006-04-01), pages 4542-4543, XP055028216, ISSN: 0002-7863, DOI: 10.1021/ja0604111, the whole document

SUGIMURA Y. ET AL. "Identification of preferred substrate sequences of microbial transglutaminase from Streptomyces mobaraensis using a phage-displayed peptide library", ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, ACADEMIC PRESS, US, vol. 477, no. 2, 15 September 2008 (2008-09-15), pages 379-383, XP024521364, ISSN: 0003-9861, DOI: 10.1016/J.ABB.2008.06.014, [retrieved on 2008-06-24], the whole document

TOMOKO OHTSUKA ET AL. "Comparison of Substrate Specificities of Transglutaminases Using Synthetic Peptides as Acyl donors", BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY, vol. 64, no. 12, 1 January 2000 (2000-01-01), pages 2608-2613, XP055650087, JP ISSN: 0916-8451, DOI: 10.1271/bbb.64.2608, cited in the application, the whole document

---

**(57)** Антитело имеет глутаминсодержащее удлинение на С-конце своей легкой цепи, что делает его пригодным для конъюгации посредством трансамидирования, опосредованного трансглутаминазой.

---

**B1**

**045916**

**045916 B1**

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

Согласно настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с §119 (e) раздела 35 USC по предварительной заявке США с серийным № 62/773708, поданной 30 ноября 2018 г.; раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

### Перечень последовательностей

В настоящий документ посредством ссылки в полном объеме включен Перечень последовательностей, озаглавленный "191017\_SEQT\_13142WOPCT\_YC.txt", содержащий SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 40, который включает в себя последовательности нуклеиновых кислот и/или аминокислотные последовательности, раскрытые в настоящем документе. Перечень последовательностей был подан в настоящем документе в текстовом формате ASCII посредством EFS-Web и, таким образом, представлен как в бумажной, так и в машиночитаемой форме. Перечень последовательностей был впервые создан с помощью PatentIn 3.5 26 октября 2018 г. и имеет размер примерно 14 кб.

### Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Настоящее раскрытие относится к модифицированным антителам, конъюгируемым ферментом транsgлутаминазой, и конъюгатам, полученным из таких антител.

В настоящее время большой интерес вызывает тот вид биопрепарата, в котором антитело ковалентно связано с молекулой-партнером ("конъюгат" или "иммуноконъюгат"). Таким образом, конъюгат состоит из трех компонентов: (1) антитело, (2) молекула-партнер и (3) линкер, ковалентно соединяющий первые два компонента.

Молекула-партнер может представлять собой терапевтическое средство, такое как противораковое лекарственное средство, адъювант, другой белок или радиоизотоп. Антитело представляет собой антитело, антиген которого экспрессируется целевой клеткой или тканью. Антитело, связываясь с антигеном, служит для доставки конъюгата к мишени. Оказавшись там, расщепление ковалентной связи или деградация антитела приводит к высвобождению терапевтического средства в целевом расположении. И наоборот, пока конъюгат циркулирует в системе крови, терапевтическое средство остается неактивным вследствие его ковалентной связи с антителом, что снижает риск побочных эффектов. Обзор конъюгатов при противораковом лечении см. в Gerber et al. 2013.

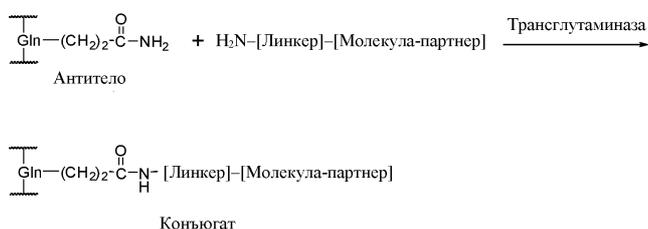
В качестве альтернативы терапевтическому средству молекула-партнер может представлять собой аналитическое средство для диагностики, определения очага заболевания или мониторинга медицинского состояния. В таком случае аналитическое средство может представлять собой, например, биотин, флуоресцентную метку, радиоактивную метку или дейтерированный полимер. Smith et al. 2019 раскрывает конъюгат, содержащий дейтерированный полимер, для визуализации с помощью МРТ. В таком случае отщепление линкера в целевом сайте не обязательно и фактически может быть нежелательным. Для такого применения линкер может быть нерасщепляемого типа.

Основной стадий приготовления конъюгата является стадия ковалентного соединения, также называемая стадией конъюгирования. Было раскрыто множество способов осуществления конъюгации. В последнее время значительный интерес вызывает конъюгация, опосредованная ферментом транsgлутаминазой (ЕС 2.3.2.13).

Известно множество вариантов транsgлутаминаз, которые либо продуцируются различными организмами в естественных условиях, либо создаются в процессе биоинженерии. В пищевой промышленности для текстурирования белков широко используется транsgлутаминаза *Streptomyces mobaraensis*, полученная с помощью ферментации или рекомбинантной экспрессии. В настоящем документе термин "транsgлутаминаза" используется в общем, если не указан конкретный тип или источник.

Транsgлутаминаза образует амидную связь между карбоксамидной боковой цепью глутамина (акцептор амина или реципрокно донор ацила) и ε-аминогруппой лизина (донор амина или реципрокно акцептор ацила). С точки зрения специфичности транsgлутаминаза является селективной в отношении остатка глутамина, требуя, чтобы он располагался в гибкой части белковой петли и фланкировался определенными аминокислотами, но является неизбирательной в отношении остатка лизина, например, легко принимает аминогруппу соединения алкиленамино в качестве суррогата лизина ε-амино. См. Fontana et al. 2008.

В типичной опосредованной транsgлутаминазой конъюгации остаток глутамина расположен на антителе, в то время как аминогруппа расположена на фрагменте линкерной молекулы-партнера, как показано ниже:



Расположение остатка глутамина в полипептидной цепи значительно влияет на его доступность в

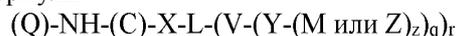
качестве акцептора амина. Обычно ни один из остатков глутамин в антителе недоступен, и требуется некоторая модификация антитела, чтобы сделать их доступными. Обычно антитело гликозилировано в положении 297 аспарагина (N297) тяжелой цепи (N-связанное гликозилирование). Jeger et al. 2010 обнаружил, что дегликозилирование антитела путем устранения сайта гликозилирования посредством замены N297A или посттрансляционного ферментативного дегликозилирования делает близлежащий глутамин в положении 295 (Q295) доступным для трансамидирования трансглутаминазой *S. mobaraensis*. Они также показали, что замена N297Q не только устраняет гликозилирование, но также вводит второй остаток глутамин (в положении 297), который также является акцептором амина. Таким образом, простое дегликозилирование генерирует два активных в отношении трансглутаминазой остатка глутамин на одно антитело (по одному на тяжелую цепь, в положении Q295), тогда как антитело с заменой N297Q генерирует четыре таких остатка глутамин (два на тяжелую цепь в положениях Q295 и Q297).

В дополнение к заменам N297A и N297Q, раскрытым Jeger et al. 2010, имели место и другие раскрытия касательно модификации антитела или другого белка для того, чтобы сделать его субстратом для трансглутаминазы.

(a) Strop et al. 2017 and Farias et al. раскрывают Fc-области антитела, сконструированные с помощью глутаминсодержащих меток, таких как LLQGG, LSLSQG, GGGLLQGG, GLLQG и т.д., при этом глутамин в метке может выступать в качестве акцептора амина и располагаться в различных местах тяжелой или легкой цепи антитела, включая их карбоксиконцы.

(b) Chen et al. 2005 раскрывает модификацию белка с меткой QSKVX, где X представляет собой L или I, и этот белок затем можно конъюгировать с трансглутаминазой.

(c) Fischer et al. 2015 раскрывает включение во фрагмент антитела, не содержащего Fc-домена, глутамин (Q)-содержащую метку формулы



(d) Rao-Naik et al. 2018 раскрывает добавление к антителу глутаминсодержащих C-концевых удлинений тяжелой цепи, для придания ему способности реагировать на трансглутаминазу.

В подходе, дополняющем модификацию антитела, чтобы сделать его активным в отношении трансглутаминазы, Rao-Naik et al. 2017 раскрывают модификацию трансглутаминазы таким образом, чтобы сделать ее способной к конъюгированию с антителом дикого типа.

Также были проведены исследования субстратной специфичности трансглутаминазы с использованием небольших пептидов содержащих молекул: Ando et al. 1989, Kamiya et al. 2011, Ohtsuka et al. 2000.

Другие раскрытия, касающиеся конъюгации антител или других белков с использованием трансглутаминазы: Bregeon 2016, Bregeon et al. 2016, Bregeon et al. 2017, Dennler et al. 2014, Innate Pharma 2013, Lin et al. 2006, Mero et al. 2009, Mindt et al. 2008, Sato 2002, Sato et al. 2001, Schibli et al. 2007, и Sugimura et al. 2007.

Также известно присоединение цистеинсодержащих концевых удлинений к антителу с целью осуществления конъюгации посредством реакции присоединения Михаэля к малеимидной группе. Liu et al. 2014 раскрывают присоединение таких удлинений к C-концу тяжелой цепи. Babcook et al. 2017 раскрывают присоединение таких удлинений к C-концу легкой цепи.

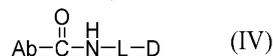
Полные ссылки на документы, процитированные в данном документе, с указанием первого автора или изобретателя и года выпуска перечислены в конце настоящего описания.

#### Краткое раскрытие настоящего изобретения

Расположение сайта конъюгации может влиять на стабильность и фармакокинетику конъюгата. Strop et al. 2013. Таким образом, желательнее предусмотреть альтернативные сайты конъюгации и структуры конъюгата, чтобы разнообразить варианты, доступные для разработки биопрепаратов.

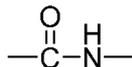
В настоящем описании раскрыты антитела, имеющие C-концевые глутаминсодержащие удлинения на легкой цепи для конъюгации с трансглутаминазой. В соответствии с одним вариантом осуществления предусмотрено полноразмерное антитело, имеющее на C-конце (карбоксиконце) своей легкой цепи глутаминсодержащее удлинение, содержащее аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, NO: 2, NO: 3, NO: 4, NO: 5, NO: 6, NO: 7, NO: 8, NO: 9, NO: 10, NO: 11, NO: 12, NO: 13, NO: 14, NO: 15, NO: 16, NO: 17, NO: 18, NO: 19, NO: 20, NO: 21, NO: 22, NO: 23, NO: 24, NO: 25, NO: 26, NO: 29, NO: 30, NO: 31, NO: 32, NO: 33, NO: 34, NO: 35, NO: 36, NO: 37, NO: 38, NO: 39 и NO:40.

В соответствии с другим аспектом в настоящем описании предусмотрен конъюгат формулы (IV)



где Ab представляет собой полноразмерное антитело, имеющее на C-конце (карбоксиконце) своей легкой цепи глутаминсодержащее удлинение, содержащее аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, NO: 2, NO: 3, NO: 4, NO: 5, NO: 6, NO: 7, NO: 8, NO: 9, NO: 10, NO: 11, NO: 12, NO: 13, NO: 14, NO: 15, NO: 16, NO: 17, NO: 18, NO: 19, NO: 20, NO: 21, NO: 22, NO: 23, NO: 24, NO: 25, NO: 26, NO: 29, NO: 30, NO: 31, NO: 32, NO: 33, NO: 34, NO: 35, NO: 36, NO: 37, NO: 38, NO: 39 и NO: 40;

L представляет собой линкерный фрагмент, связывающий Ab с помощью амидной связи



с глутамином в глутаминсодержащем удлинении; и

D выбирают из группы, состоящей из белка, радиоизотопа, аналитического средства и терапевтического средства.

В соответствии с другим аспектом в настоящем описании предусмотрен способ получения конъюгата антитела, включающий стадии

(a) смешивания полноразмерного антитела, имеющего на С-конце (карбоксиконце) своей легкой цепи глутаминсодержащее удлинение, содержащее аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, NO: 2, NO: 3, NO: 4, NO: 5, NO: 6, NO: 7, NO: 8, NO: 9, NO: 10, NO: 11, NO: 12, NO: 13, NO: 14, NO: 15, NO: 16, NO: 17, NO: 18, NO: 19, NO: 20, NO: 21, NO: 22, NO: 23, NO: 24, NO: 25, NO: 26, NO: 29, NO: 30, NO: 31, NO: 32, NO: 33, NO: 34, NO: 35, NO: 36, NO: 37, NO: 38, NO: 39 и NO: 40, с соединением-донором амина, содержащим первичный амин и фрагмент, выбранный из группы, состоящей из белка, радиоизотопа, аналитического средства и терапевтического средства, в присутствии трансглутаминазы; и

(b) предоставления трансглутаминазе возможности катализировать образование амидной связи между карбоксамидом боковой цепи глутамина глутаминсодержащего удлинения и первичным амином соединения-донора амина, тем самым приводя к образованию конъюгата антитела.

В соответствии с другим аспектом в настоящем описании предусмотрен способ получения конъюгата антитела, включающий стадии

(a) смешивания полноразмерного антитела, имеющего на С-конце (карбоксиконце) своей легкой цепи глутаминсодержащее удлинение, содержащее аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, NO: 2, NO: 3, NO: 4, NO: 5, NO: 6, NO: 7, NO: 8, NO: 9, NO: 10, NO: 11, NO: 12, NO: 13, NO: 14, NO: 15, NO: 16, NO: 17, NO: 18, NO: 19, NO: 20, NO: 21, NO: 22, NO: 23, NO: 24, NO: 25, NO: 26, NO: 29, NO: 30, NO: 31, NO: 32, NO: 33, NO: 34, NO: 35, NO: 36, NO: 37, NO: 38, NO: 39 и NO: 40, с первым соединением, при этом первое соединение представляет собой соединение-донор амина, имеющее первичный амин и первую реакционноспособную функциональную группу, в присутствии трансглутаминазы;

(b) предоставления трансглутаминазе возможности катализировать образование амидной связи между карбоксамидом боковой цепи глутамина глутаминсодержащего удлинения и первичным амином первого соединения, с образованием аддукта антитела и первого соединения;

(c) приведения аддукта в контакт со вторым соединением, имеющим вторую реакционноспособную функциональную группу и фрагмент, выбранный из группы, состоящей из белка, радиоизотопа, аналитического средства и терапевтического средства; при этом вторая реакционноспособная функциональная группа способна реагировать с первой реакционноспособной функциональной группой с образованием ковалентной связи между ними; и

(d) предоставления первой и второй реакционноспособным функциональным группам возможности вступать в реакцию и образовывать ковалентную связь между ними, тем самым приводя к образованию конъюгата антитела.

Если фрагмент (в первом соединении или втором соединении, в зависимости от обстоятельств) представляет собой белок, полученный конъюгат представляет собой слитый белок. Если фрагмент представляет собой радиоизотоп, полученный конъюгат можно использовать для лучевой терапии или радиовизуализации. Фрагмент может представлять собой аналитическое средство, такое как флуоресцентная метка, дейтерированный полимер или лиганд-подобный биотин, и в этом случае конъюгат можно использовать для диагностики медицинского состояния, мониторинга лечения или аналитических путей применения. Предпочтительно фрагмент представляет собой терапевтическое средство (в этом случае продукт также называют конъюгатом антитело-лекарственное средство или ADC), который можно использовать при различных видах лечения, особенно при лечении рака.

#### Краткое описание чертежей

На фиг. 1 схематически изображена легкая цепь антитела, имеющая С-концевое удлинение (SEQ ID NO: 1), как раскрыто в настоящем документе.

На фиг. 2 представлено сравнение одно- и двухстадийных способов получения конъюгатов с использованием трансглутаминазы (BTG).

#### Подробное раскрытие настоящего изобретения

##### Определения

Термин "антитело" означает целые антитела и любой антигенсвязывающий фрагмент (т.е., "антигенсвязывающую часть") или их одноцепочечные варианты. Полное антитело представляет собой белок, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (V<sub>H</sub>) и константную область тяжелой цепи, содержащую три домена, C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> и C<sub>H3</sub>. Каждая легкая цепь содер-

жит вариабельную область легкой цепи ( $V_L$  или  $V_k$ ) и константную область легкой цепи, содержащую один единственный домен,  $C_L$ . Области  $V_H$  и  $V_L$  могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), с вставками более консервативных каркасных областей (FR). Каждая  $V_H$  и  $V_L$  содержит три CDR и четыре FR, расположенные от амино- до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Вариабельные области содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области могут опосредовать связывание антитела с тканями или факторами хозяина, в том числе различными клетками иммунной системы (например, эффекторными клетками) и первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Считается, что антитело "специфически связывается" с антигеном X, если антитело связывается с антигеном X с  $K_D$   $5 \times 10^{-8}$  М или менее, более предпочтительно  $1 \times 10^{-8}$  М или менее, более предпочтительно  $6 \times 10^{-9}$  М или менее, более предпочтительно  $3 \times 10^{-9}$  М или менее, еще более предпочтительно  $2 \times 10^{-9}$  М или менее. Антитело может быть химерным, гуманизированным или предпочтительно человеческим. Константная область тяжелой цепи может быть сконструирована таким образом, чтобы воздействовать на тип или степень гликозилирования, увеличивать периода полужизни антитела, усиливать или уменьшать взаимодействия с эффекторными клетками или системой комплемента или модулировать некоторые другие свойства. Конструирование может быть выполнено с помощью замены, добавления или удаления одной или нескольких аминокислот или замены домена доменом из другого типа иммуноглобулина или комбинации вышеперечисленного.

"Антигенсвязывающий фрагмент" и "антигенсвязывающая часть" антитела (или просто "часть антитела" или "фрагмент антитела") означают один или несколько фрагментов антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может выполняться фрагментами полноразмерного антитела, такими как (i) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов  $V_L$ ,  $V_H$ ,  $C_L$  и  $C_{H1}$ ; (ii) фрагмент  $F(ab')_2$ , бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент  $Fab'$ , который по сути представляет собой Fab с частью шарнирной области (см., например, Abbas et al., Cellular and Molecular Immunology, 6th Ed., Saunders Elsevier 2007); (iv) фрагмент Fd, состоящий из доменов  $V_H$  и  $C_{H1}$ ; (v) фрагмент Fv, состоящий из доменов  $V_L$  и  $V_H$  одного плеча антитела, (vi) фрагмент dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), который состоит из домена  $V_H$ ; (vii) выделенная область, определяющая комплементарность (CDR); и (viii) нанотело, вариабельная область тяжелой цепи, содержащая один вариабельный домен и два константных домена. Предпочтительными антигенсвязывающими фрагментами являются фрагменты Fab,  $F(ab')_2$ ,  $Fab'$ , Fv и Fd. Кроме того, хотя два домена фрагмента Fv,  $V_L$  и  $V_H$ , кодируются отдельными генами, они могут быть соединены с использованием рекомбинантных способов с помощью синтетического линкера, который позволяет им находиться в виде одной белковой цепи, в которой области  $V_L$  и  $V_H$  попарно соединяются с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечные Fv или scFv); см., например, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883/ Такие одноцепочечные антитела также охвачены термином "антигенсвязывающая часть" антитела.

Если не указано иное, например, посредством ссылки на линейную нумерацию в перечне SEQ ID NO:, ссылки на нумерацию аминокислотных положений в вариабельной области тяжелой или легкой цепи антитела ( $V_H$  или  $V_L$ ) соответствуют системе Kabat (Kabat et al., "Sequences of proteins of immunological interest, 5th ed., Pub. No. 91-3242, U.S. Dept. Health & Human Services, NIH, Bethesda, Md., 1991, hereinafter "Kabat") и ссылки на нумерацию аминокислотных положений в константной области тяжелой или легкой цепи антитела ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  или  $C_L$ ) соответствуют EU-индексу, как изложено в соответствии с Kabat. См. Lazar et al., US 2008/0248028 A1, раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Кроме того, информационная система ImMunoGeneTics (IMGT) предоставляет на своем веб-сайте таблицу под названием "IMGT Scientific Chart: Correspondence between C Numberings", которая показывает соответствие между его системой нумерации, нумерацией согласно EU и нумерацией согласно Kabat для константной области тяжелой цепи.

Термин "выделенное антитело" означает антитело, которое по сути не содержит других антител, обладающих другой антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывает антиген X, по сути не содержит антител, которые специфически связывают антигены, отличные от антигена X). Однако выделенное антитело, которое специфически связывает антиген X, может обладать перекрестной реактивностью с другими антигенами, такими как молекулы антигена X от других видов. В соответствии с определенными вариантами осуществления выделенное антитело специфически связывается с антигеном X человека и не вступает в перекрестную реакцию с другими антигенами антигена X (отличными от человеческих). Более того, выделенное антитело может по сути не содержать другой клеточный материал и/или химические вещества.

"Моноклональное антитело" или "композиция моноклонального антитела" означает препарат молекул антитела с одним молекулярным составом, который демонстрирует одну специфичность связывания и аффинность в отношении конкретного эпитопа.

"Человеческое антитело" означает антитело, имеющее вариабельные области, в которых как кар-

касная область, так и области CDR (и константная область, при наличии) происходят из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела могут включать более поздние модификации, включая естественные или синтетические модификации. Человеческие антитела могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или с помощью сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или с помощью соматической мутации *in vivo*). Однако термин "человеческое антитело" не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающего, такого как мышь, привиты на последовательности каркасных областей человека.

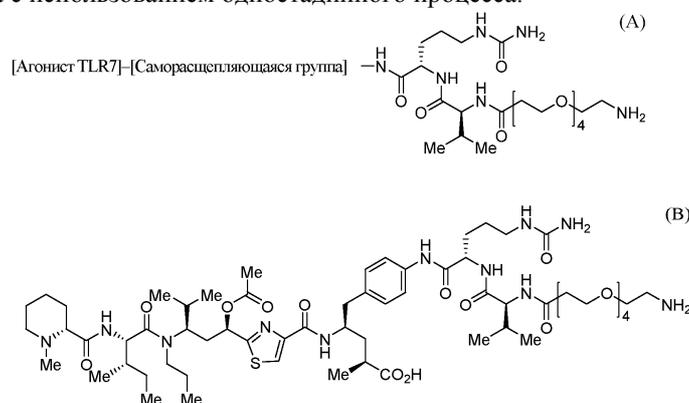
"Человеческое моноклональное антитело" означает антитело, проявляющее одну специфичность связывания, которое имеет переменные области, в которых как каркасная область, так и области CDR происходят из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. В соответствии с одним вариантом осуществления человеческие моноклональные антитела продуцируются гибридомой, которая содержит В-клетку, полученную от трансгенного животного, отличного от человека, например, трансгенной мыши, геном которой содержит трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи, слитый с иммортализованной клеткой.

### Варианты осуществления

Обычно опосредованное транслугутинамизой получение конъюгата антитела может быть одностадийным или двухстадийным, как схематично показано на фиг. 2. В одностадийном процессе транслугутинамиза связывает глютаминкарбоксамид в удлинении, действуя как акцептор амина, и соединение-донор амина  $H_2N-LD$ , где L представляет собой линкерный фрагмент, а молекула-партнер D представляет собой белок, радиоизотоп, аналитическое средство или терапевтическое средство, с непосредственным образованием конъюгата. В двухстадийном процессе транслугутинамиза катализирует образование начального аддукта трансамидирования между карбоксамидом глютамина в удлинении, действующим как рецептор амина, и первым соединением ( $H_2N-L'-R'$ ), которое представляет собой соединение-донор амина, где L' представляет собой первый линкерный фрагмент, а R' представляет собой первую реакционноспособную функциональную группу. Затем аддукт вступает в реакцию со вторым соединением ( $R''-L''-D$ ), где R'' представляет собой вторую реакционноспособную функциональную группу, способную вступать в реакцию с R, L'' представляет собой второй линкерный фрагмент, а D имеет значение, определенное выше. Иногда одностадийный процесс называют ферментативным, а двухстадийный процесс химиоферментативным процессом, поскольку он включает в себя как химическую, так и ферментативную стадию. Каждый из L, L' и L'' может представлять собой алкильную цепь  $-(CH_2)_m-$ , где m представляет равняется целому числу от 2 до 10 включительно, или может представлять собой, особенно в случае L и L'', более сложную структуру, как описано ниже.

Донор амина,  $H_2N-L-D$  или  $H_2N-L'-R'$ , часто используется в большом избытке для подавления нежелательного переамидирования между карбоксамидом глютамина и  $\epsilon$ -аминогруппой лизина антитела. Если фрагмент D является дорогостоящим или труднодоступным для получения, использование большого избытка может оказаться нецелесообразным. В таких случаях двухстадийный процесс может быть предпочтительным, даже если он требует дополнительной стадии.

В качестве демонстрации конъюгировали антитело к мезотелину, имеющее такие же CDR тяжелой и легкой цепей, что и антитело 6A4 из Terrett et al, US 8268970 B2 (2012). Его последовательности тяжелой и легкой цепи представлены как SEQ ID NO: 27 и SEQ ID NO: 28 соответственно. Были присоединены C-концевые удлинения легкой цепи, имеющие последовательности, описанные ниже, и модифицированные таким образом антитела затем конъюгированы либо с соединением (A), либо с соединением (B) в качестве донора амина с использованием одностадийного процесса.



В соединении (A) терапевтическое средство представляет собой агонист Toll-подобного рецептора 7 (TLR7), который можно использовать в качестве адъюванта для вакцин и иммунотерапевтических средств при лечении различных состояний. Примеры агонистов TLR7 раскрыты в заявках США с серий-

ными №№ 16/103210, 16/103511, 16/103581, 16/013601 и 16/103619; каждая из которых подана 14 августа 2018 г.; раскрытия которых включены в настоящий документ посредством ссылки. В соединении (B) терапевтическое средство представляет собой аналог тубулизина, цитотоксин, который можно использовать при лечении рака. Получение соединения (B) описано в предварительной заявке США с серийным № 62/688737, поданной 22 июня 2018 г.; раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки.

В соответствии с одним вариантом осуществления раскрытые в настоящем документе С-концевые удлинения легкой цепи содержат один глутамин. Примеры перечислены в табл. А ниже вместе с соотношением лекарственное средство-антитело (DAR) конъюгатов, полученных из них. Поскольку на одно антитело приходится две легкие цепи, каждая из которых имеет удлинение, теоретический максимум DAR составляет 2,0. На фиг. 1 схематически изображена легкая цепь антитела, имеющая С-концевое удлинение под SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO:	Последовательность удлинения	DAR (соед. А)	DAR (соед. В)
1	GGVLQRAS	1,99	2,0
2	GGVLQGAS	1,84	1,6
3	GGVLQRPS	1,96	2,0
4	GGVLQGPS	1,97	2,0
5	GGVLQSPS	1,94	1,77
6	GGVLQYAS	1,87	1,7
7	GGGGVLQRAS	1,99	2,0
8	GGGGVLQGAS	1,95	2,0
9	GGGGVLQRPS	1,99	2,0
10	GGGGVLQGPS	1,94	2,0
11	GGGGVLQSPS	1,99	2,0
12	GGGGVLQYAS	2	2,0
13	VLQYAS	0,95	0,97

В соответствии с другим вариантом осуществления С-концевое удлинение легкой цепи содержит два глутамин. Примеры перечислены в табл. В ниже вместе с соотношением лекарственное средство-антитело (DAR) конъюгатов, полученных из них.

Поскольку на одно антитело приходится две легкие цепи, каждая из которых имеет удлинение с двумя глутаминами, теоретический максимум DAR составляет 4,0.

Таблица В – Удлинения с двумя глутаминами			
SEQ ID NO:	Последовательность удлинения	DAR (соед. А)	DAR (соед. В)
14	GGVLQRQS	2,37	2,05
15	GGVLQGS	2,04	2,04
16	GGVLQRQRPS	2,23	2,01
17	GGVLQGGGPS	3,27	3,19
18	GGVLQSQSPS	1,86	2,01
19	GGVLQYQS	2,90	2,60
20	GGGGVLQRQS	2,95	2,88
21	GGGGVLQGS	2,60	2,89
22	GGGGVLQRQRPS	2,96	2,88
23	GGGGVLQGGGPS	3,72	3,71
24	GGGGVLQSQSPS	2,37	2,84
25	GGGGVLQYQS	3,32	3,58
26	VLQYQS	1,95	2,67
29	GGVLQVLQS		3,0
30	GGVLQGVLS		3,8
31	GGVLQGGVLS		3,4
32	GGVLQVLQGPS		2,5
33	GGVLQGGQGPS		3,0
34	GGVLQGGQGPS		3,1
35	GGGGVLQVLQS		3,2
36	GGGGVLQGVLS		4,0
37	GGGGVLQGGVLS		4,0
38	GGGGVLQVLQGPS		3,2
39	GGGGVLQGGQGPS		3,5
40	GGGGVLQGGQGPS		3,3

Возможно, что в С-концевых удлинениях, содержащих два глутамина, полезно отделить глутамины друг от друга дополнительно, чем так, как они представлены в табл. В, вставив между ними от двух до четырех аминокислот.

Поскольку С-конец легкой цепи в некоторой степени скрыт, желательно предусмотреть спейсеры так, чтобы глутамин в удлинении был более выступающим и был доступен для трансглутаминазы. Такого эффекта можно достичь, используя несколько глицинов (от двух до четырех) на N-конце удлинения. Ссылаясь на табл. А, можно заметить, что удлинение без глицинов (SEQ ID NO: 13) приводит к более низкому DAR, чем те, которые имеют два или четыре глицина.

В соответствии с одним вариантом осуществления антитело имеет С-концевое удлинение легкой цепи, содержащее два спейсерных глицина и один глутамин. Примеры таких удлинений представлены под SEQ ID NO: 1, NO: 2, NO: 3, NO: 4, NO: 5 и NO: 6.

В соответствии с другим вариантом осуществления антитело имеет С-концевое удлинение легкой цепи, содержащее четыре спейсерных глицина и один глутамин. Примеры таких удлинений представлены под SEQ ID NO: 7, NO: 8, NO: 9, NO: 10, NO: 11 и NO: 12.

В соответствии с другим вариантом осуществления антитело имеет С-концевое удлинение легкой цепи, содержащее два спейсерных глицина и два глутамина. Примеры таких удлинений представлены под SEQ ID NO: 14, NO: 15, NO: 16, NO: 17, NO: 18, NO: 19, NO: 29, NO: 30, NO: 31, NO: 32, NO: 33 и NO: 34.

В соответствии с другим вариантом осуществления антитело имеет С-концевое удлинение легкой цепи, содержащее четыре спейсерных глицина и два глутамина. Примеры таких удлинений представлены под SEQ ID NO: 20, NO: 21, NO: 22, NO: 23, NO: 24, NO: 25, NO: 35, NO: 36, NO: 37, NO: 38, NO: 39 и NO: 40.

Предпочтительно С-концевые удлинения легкой цепи содержат дипептид валин-лейцин (VL) на N-концевой стороне глутамина.

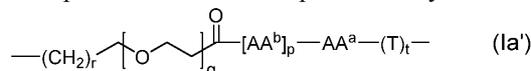
Антитела, которые можно модифицировать и конъюгировать способами, описанными в настоящем раскрытии, включают антитела, распознающие следующие антигены: мезотелин, специфический мембранный антиген простаты (PSMA), CD19, CD22, CD30, CD70, B7H3, B7H4 (также известный как O8E), белок тирозинкиназа 7 (PTK7), глипикан-3, RG1, фукозил-GM1, CTLA4 и CD44. Антитело может быть животным (например, мышинным), химерным, гуманизированным или предпочтительно человеческим. Антитело предпочтительно является моноклональным, особенно моноклональным человеческим антите-

лом. Получение человеческих моноклональных антител к некоторым из вышеупомянутых антигенов раскрыто в Korman et al., US 8609816 B2 (2013; B7H4, также известное как 08E; в частности, антитела 2A7, 1G11 и 2F9); Rao-Naik et al., 8097703 B2 (2012; CD19; в частности, антитела 5G7, 13F1, 46E8, 21D4, 21D4a, 47G4, 27F3 и 3C10); King et al., US 8481683 B2 (2013; CD22; в частности, антитела 12C5, 19A3, 16F7 и 23C6); Keler et al., US 7387776 B2 (2008; CD30; в частности, антитела 5F11, 2H9 и 17G1); Terrett et al., US 8124738 B2 (2012; CD70; в частности, антитела 2H5, 10B4, 8B5, 18E7 и 69A7); Korman et al., US 6984720 B1 (2006; CTLA-4; в частности, антитела 10D1, 4B6 и 1E2); Vistica et al., US 8,383,118 B2 (2013, fucosyl-GM1, в частности, антитела 5B1, 5B1a, 7D4, 7E4, 13B8 и 18D5) Korman et al., US 8008449 B2 (2011; PD-1; в частности, антитела 17D8, 2D3, 4H1, 5C4, 4A11, 7D3 и 5F4); Huang et al., US 2009/0297438 A1 (2009; PSMA, в частности, антитела 1C3, 2A10, 2F5, 2C6); Cardarelli et al., US 7875278 B2 (2011; PSMA; в частности, антитела 4A3, 7F12, 8C12, 8A11, 16F9, 2A10, 2C6, 2F5 и 1C3); Terrett et al., US 8,222,375 B2 (2012; PTK7; в частности, антитела 3G8, 4D5, 12C6, 12C6a и 7C8); Terrett et al., US 8680247 B2 (2014; глипикан-3; в частности, антитела 4A6, 11E7 и 16D10); Harkins et al., US 7335748 B2 (2008; RG1; в частности, антитела A, B, C и D); Terrett et al., US 8268970 B2 (2012; мезотелин; в частности, антитела 3C10, 6A4 и 7B1); Xu et al., US 2010/0092484 A1 (2010; CD44; в частности, антитела 14G9.B8.B4, 2D1.A3.D12 и 1A9.A6.B9); Deshpande et al., US 8258266 B2 (2012; IP10; в частности, антитела 1D4, 1E1, 2G1, 3C4, 6A5, 6A8, 7C10, 8F6, 10A12, 10A12S и 13C4); Kuhne et al., US 8450464 B2 (2013; CXCR4; в частности, антитела F7, F9, D1 и E2); и Korman et al., US 7943743 B2 (2011; PD-L1; в частности, антитела 3G10, 12A4, 10A5, 5F8, 10H10, 1B12, 7H1, 11E6, 12B7 и 13G4); раскрытия которых включены в данный документ посредством ссылки.

В отношении конъюгатов формулы (IV)



- (a) D предпочтительно представляет собой, в соответствии с одним вариантом осуществления, цитотоксическое лекарственное средство.
- (b) В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления D представляет собой агонист TLR7, STING, NLRP3 или RIG-1.
- (c) В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления L представляет собой  $-(\text{CH}_2)_{2-6}$ .
- (d) В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления L представляет собой



где T представляет собой саморасщепляющуюся группу;

t равняется 0 или 1;

$\text{AA}^a$  и каждое  $\text{AA}^b$  независимо выбирают из группы, состоящей из аланина,  $\beta$ -аланина,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты,  $\gamma$ -карбоксиглутаминовой кислоты, цитруллина, цистеина, глутаминовой кислоты, глутамина, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, норлейцина, норвалина, орнитина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина;

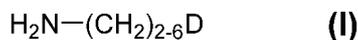
p представляет собой 1, 2, 3 или 4;

q равняется 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10; и

r равняется 1, 2, 3, 4 или 5.

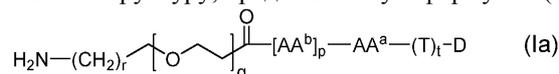
Одно- и двухстадийные процессы конъюгации далее обсуждаются более подробно.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления соединение-донор амина в одностадийном процессе представлено формулой (I):



где D представляет собой белок, радиоизотоп, аналитическое средство или терапевтическое средство.

В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления соединение-донор амина для одностадийного процесса имеет структуру, представленную формулой (Ia):



где D представляет собой белок, радиоизотоп, аналитическое средство или терапевтическое средство;

T представляет собой саморасщепляющуюся группу;

t равняется 0 или 1;

$\text{AA}^a$  и каждое  $\text{AA}^b$  независимо выбирают из группы, состоящей из аланина,  $\beta$ -аланина,  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты,  $\gamma$ -карбоксиглутаминовой кислоты, цитруллина, цистеина, глутаминовой кислоты, глутамина, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, норлейцина, норвалина, орнитина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, трип-

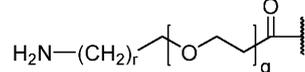
тофана, тирозина и валина;

р представляет собой 1, 2, 3 или 4;

q равняется 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10; и

г равняется 1, 2, 3, 4 или 5.

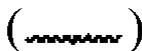
В формулах (Ia), (Ia') и (III) (ниже)  $-AA^a-[AA^b]_p-$  представляет собой полипептид, длина которого определяется значением р (дипептид, если р равен 1, тетрапептид, если р равен 3 и т.д.).  $AA^a$  находится на карбоксильном конце полипептида, и его карбоксильная группа образует пептидную (амидную) связь с азотом амина D (или T, при наличии). В отличие от этого, последний  $AA^b$  находится на аминоконце полипептида, и его  $\alpha$ -аминогруппа образует пептидную связь с



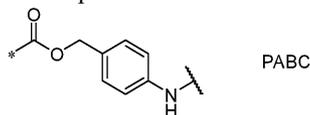
Предпочтительными полипептидами  $-AA^a-[AA^b]_p-$  являются ValCit, Val-Lys, Lys-Val-Ala, Asp-Val-Ala, Val-Ala, Lys-Val-Cit, Ala-Val-Cit, ValGly, ValGln и Asp-Val-Cit, записанные в обычном направлении N-to-C, как в  $H_2NValCitCO_2H$ . Более предпочтительным полипептидом представляет собой Val-Cit, Val-Lys или Val-Ala. Предпочтительно полипептид  $AA^a-[AA^b]_p$  расщепляется ферментом, обнаруженным внутри целевой клетки, например, катепсином и особенно катепсином В, или ферментом в окружении целевого органа или ткани.

Если индекс q отличается от 0, соединение (Ia) содержит группу поли(этиленгликоля) (PEG), которая может преимущественно улучшать растворимость соединения (Ia), облегчая конъюгацию с антителом - стадию, которая осуществляется в водной среде. Кроме того, группа PEG может служить в качестве спейсера между антителом и пептидом  $-AA^a-[AA^b]_p-$  таким образом, что основная масса антитела не препятствует стерически действию фермента, расщепляющего пептид.

Как указано нижним индексом, если t равняется 0 или 1, саморасщепляющаяся группа T необязательно присутствует. Саморасщепляющаяся группа представляет собой группу, отщепление которой от  $AA^a$  или  $AA^b$ , в зависимости от обстоятельств, инициирует последовательность реакций, в результате чего саморасщепляющаяся группа отделяется от D и освобождает последнюю для выполнения своей терапевтической функции. При наличии саморасщепляющаяся группа T, предпочтительно это п-аминобензилоксикарбонильная (РАВС) группа, структура которой показана ниже звездочкой (\*), обозначающей конец РАВС, связанный с аминным азотом лекарственного средства D, и волнистой линией

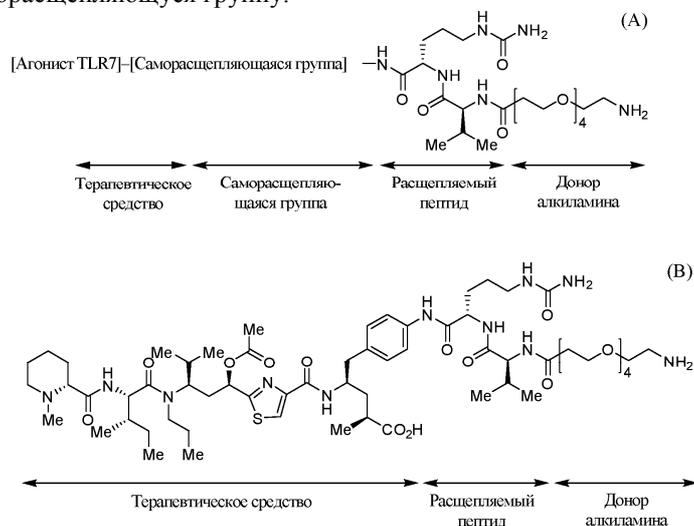


обозначающей конец, связанный с полипептидом  $-AA^a-[AA^b]_p-$ . Группа РАВС может быть замещена, как раскрыто в предварительной заявке США с серийным № 62/677307, поданной 29 мая 2018 г.



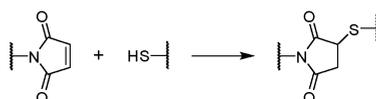
Другой саморасщепляющейся группой, которая может быть использована, является замещенный тиазол, как описано в Feng, US 7375078 B2 (2008).

Соединения (A) и (B) иллюстрируют конструкцию соединений-доноров амина в соответствии с формулой (Ia) с расположением их различных элементов, как показано. Соединение (A), но не соединение (B), содержит саморасщепляющуюся группу.

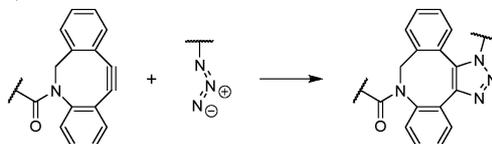


При двухстадийной конъюгации можно использовать множество комбинаций групп R' и R''. Подходящие комбинации R' и R'' (или, наоборот, R'' и R') включают:

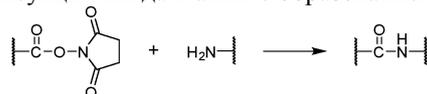
(а) малеимидную группу и сульфгидрильную группу с образованием аддукта присоединения Михаэля, как в



(б) дибензоциклооктиновую группу и азидную группу с образованием продукта циклоприсоединения посредством "клик"-химии, как в

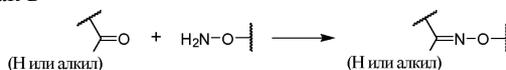


(с) сложный эфир N-гидроксисукцинимида и амин с образованием амида, как в

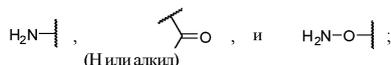
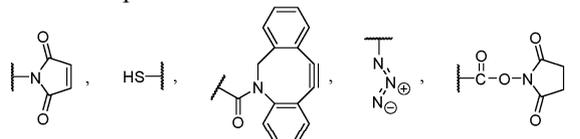


и

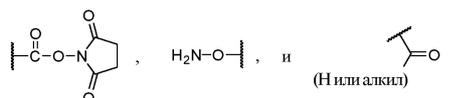
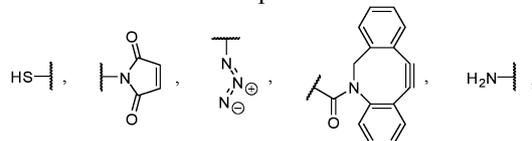
(д) альдегид или кетон (где "алкил" предпочтительно представляет собой C<sub>1-3</sub>алкил) и гидроксил-амин с образованием оксима, как в



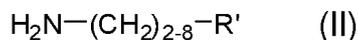
Таким образом, R' может быть выбран из



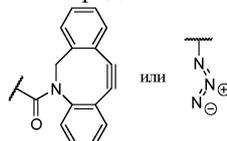
в то время как реципрокно R'' может быть выбран из



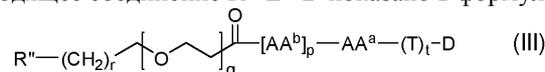
Подходящее первое соединение-донор амина для двухстадийного процесса изображено в формуле (II)



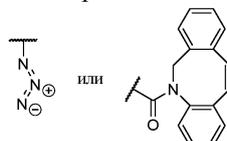
где R' определен выше и предпочтительно представляет собой



Соответствующее подходящее соединение R''-L''-D показано в формуле (III)



где R' определен выше и предпочтительно представляет собой



и r, q, AA<sup>b</sup>, p, AA<sup>a</sup>, T, t и D определены выше в соответствии с формулой (Ia).

В случае, когда конъюгат предназначен для использования при лечении рака, терапевтическое

средство может представлять собой цитотоксическое лекарственное средство, которое вызывает гибель целевой раковой клетки. Цитотоксические лекарственные средства, которые можно использовать в конъюгатах, включают следующие типы соединений, их аналоги и производные:

(a) ендины, такие как калихеамицин (см., например, Lee et al, J. Am. Chem. Soc. 1987, 109, 3464 и 3466) и унциаламицин (см., например, Davies et al., WO 2007/038868 A2 (2007); Chowdari et al., US 8709431 B2 (2012); и Nicolaou et al., WO 2015/023879 A1 (2015));

(b) тубулизины (см., например, Domling et al., US 7778814 B2 (2010); Cheng et al., US 8394922 B2 (2013); и Cong et al., US 8980824 B2 (2015));

(c) ДНК-алкиляторы, такие как аналоги CC-1065 и дуокармицин (см., например, Yang et al., US 2018/0051031 A1 (2018); Boger, US 65458530 B1 (2003); Sufi et al., US 8461117 B2 (2013); и Zhang et al., US 8852599 B2 (2014));

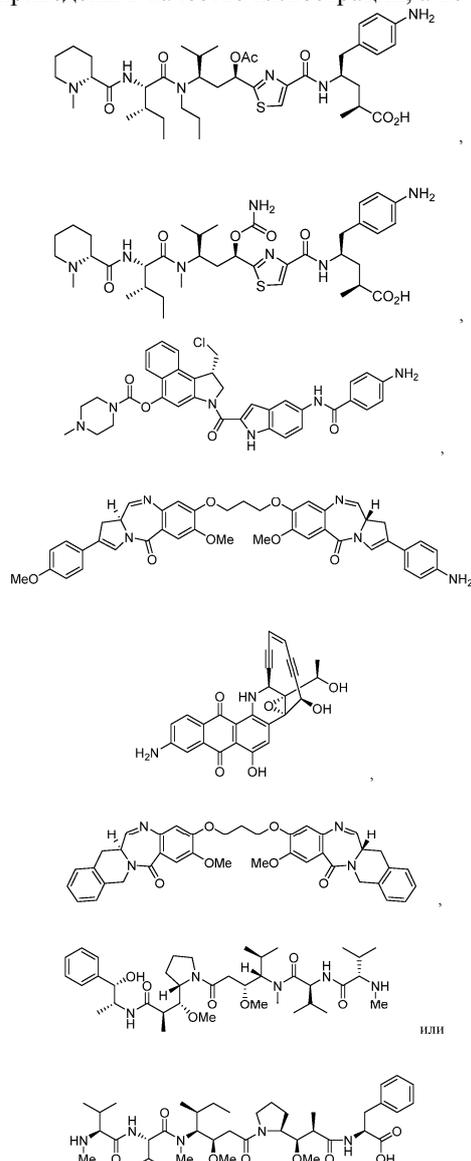
(d) эпотилоны (см., например, Vite et al., US 2007/0275904 A1 (2007) и US RE42930 E (2011));

(e) ауристатины (см., например, Senter et al., US 6844869 B2 (2005), и Doronina et al., US 7498298 B2 (2009));

(f) бензодиазепиновые димеры (см., например, Zhang et al, US 9527871 B2 (2016); Zhang et al., US 9688694 B2 (2017); McDonald et al, US 9526801 B2 (2016); Howard et al., US 2013/0059800 A1 (2013); US 2013/0028919 A1 (2013); и WO 2013/041606 A1 (2013)); и

(g) майтансиноиды, такие как DM1 и DM4 (см., например, Chari et al., US 5208020 (1993), и Amphlett et al., US 7374762 B2 (2008)).

В соответствии с одним вариантом осуществления цитотоксическое лекарственное средство представляет собой ДНК-алкилятор, тубулизин, ауристатин, бензодиазепиновый димер, ендиин или майтансиноид. Конкретные примеры приведены в качестве иллюстрации, а не ограничения.



В иммунной системе имеются рецепторы, естественными лигандами которых являются патоген-ассоциированные молекулярные структуры (PAMP). Связывание PAMP с его когнатным рецептором

активирует иммунную систему для защиты от инфекции, вызванной ассоциированным патогеном. Кроме того, эти рецепторы также могут быть активированы синтетическими агонистами, которые оказывают адьювантное действие на действие вакцин и иммунотерапевтических средств при лечении множества состояний, отличных от фактической патогенной инфекции. Иммуноонкологические средства, такие как ипилимумаб, ниволумаб и пембролизумаб, в частности, могут извлекать пользу от этого адьювантного эффекта. Рецепторы, которые могут быть активированы синтетическими агонистами, включают TLR3, TLR7, TLR9 (Toll-подобный рецептор-3, -7 и -9 соответственно), STING (стимулятор генов; также известный как MPYS, TMEM173, MITA или ERIS), NLRP3 (NOD-подобный рецепторный белок 3) и RIG-I (ген I, индуцируемый ретиноевой кислотой). Таким образом, в соответствии с альтернативным вариантом осуществления терапевтическое средство представляет собой агонист TLR3, TLR7, TLR9, STING, NLRP3 или RIG-I. В частности, терапевтическое средство может представлять собой агонист TLR7, как раскрывается в Poudel et al., US 2019/0055243 A1 (2019); Young et al., US 2019/0055244 A1 (2019); Poudel et al., US 2019/0055245 A1 (2019); He et al., US 2019/0055246 A1 (2019); He et al., US 2019/0055247 A1 (2019); и Purandare et al., заявке PCT PCT/US2019/028697, поданных 23 апреля 2019 г.

Вышеупомянутые терапевтические средства можно использовать в конъюгатах, полученных либо с помощью одностадийного, либо двухстадийного способа.

### Примеры

Практическое применение настоящего изобретения можно дополнительно понять, обратившись к следующим примерам, которые предоставлены в качестве иллюстрации, а не ограничения.

#### Пример 1 - Получение модифицированных антител

Клетки ExpiCHO использовали для экспрессии антител. Клетки ExpiCHO выращивали в среде ExpiCHO при 37°C, атмосфере 8% CO<sub>2</sub> в пластмассовых колбах. Вектор экспрессии тяжелой цепи и легкой цепи смешивали в OptiMEM, добавляли раствор PEI в OptiMEM и полученный комплекс PEI/ДНК инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут перед добавлением к клеткам. Через 24 часа после трансфекции к клеткам добавляли Feed B и VPA и клетки хранили при 37°C при перемешивании. Через 7 дней супернатант культуры собирали с помощью центрифугирования и фильтрации. Супернатант очищали смолой MabSelect SuRe LX. Вкратце, клеточный супернатант инкубировали со смолой в течение ночи при 4°C, промывали 10 CV PBS с последующим элюированием 4 CV 0,1 М цитрата pH 3,5, немедленно нейтрализовали 1/10 объема 1 М Tris pH 8.

#### Пример 2 - Конъюгация модифицированных антител

Конъюгацию антитела, модифицированного, как описано в настоящем документе, с донором амина с использованием транслугаминазы проводили по протоколу, указанному ниже. Использовали диспазу, активирующую VTGase с точечными мутациями V65I и Y75F. Ее диализовали в 50 мМ ацетата натрия pH 5,5 из состава (буфер 20 мМ ацетат, 10% глицерин pH 4) перед использованием.

Антитело в концентрации ~ 2 мг/мл в 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, или 20 мМ гистидина, 50 мМ имидазола, 10% сахарозы, pH ~ 7,8 вступало в реакцию с 10-кратным молярным избытком на сайт донора амина в присутствии 0,2 молярного избытка транслугаминазы на антитело. Реакция протекала в течение ночи при 37°C при непрерывном осторожном перемешивании.

Конъюгат антитело-лекарственное средство фильтровали через 0,2 мкм  $\mu$ и очищали с использованием колонки mAb Select SuRe™ (GE Healthcare). Конъюгат загружали в колонку, предварительно уравновешенную 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, и промывали 10 CV (объемы колонки) уравновешивающего буфера, а затем 10 CV 50 мМ Tris-HCl, 17% ацетонитрила, pH 8,0, с удалением непрореагировавшего донора амина. Колонку повторно уравновешивали 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, перед элюированием 0,1 М цитратом, pH 3,5, фракциями по 1 мл и нейтрализовали 1/10 объема элюирования 1 М Tris, pH 8,0. Необходимые фракции диализовали в буфере для приготовления 20 мМ гистидина, 10% сахарозы, pH 6,0 и анализировали с помощью LC-MS (ESI-QTOF), RP-HPLC и SDS-PAGE для определения чистоты и соотношения лекарственное средство-антитело (DAR).

#### Пример 3 - Анализ конъюгированных модифицированных антител

Антитело в концентрации 5 мг/мл в 50 мМ имидазоле, 10% сахарозе, pH 8, вступало в реакцию с 10-кратным молярным количеством на сайт донора амина в присутствии 0,2 молярного избытка рекомбинантной бактериальной транслугаминазы на антитело. После инкубации в течение ночи при 37°C при непрерывном осторожном перемешивании реакционную смесь анализировали с помощью LC-MS (ESI-QTOF) для оценки DAR.

Приведенное выше подробное описание настоящего изобретения включает фрагменты, которые главным образом или исключительно связаны с конкретными частями или аспектами настоящего изобретения. Следует понимать, что это делается для ясности и удобства, что конкретный признак может иметь отношение не только к фрагменту, в котором он раскрыт, и что настоящее раскрытие в настоящем документе включает в себя все соответствующие комбинации информации, найденной в различных фрагментах. Точно так же, хотя различные фигуры и описания в настоящем документе относятся к конкретным вариантам осуществления настоящего изобретения, следует понимать, что там, где конкретный признак раскрывается в контексте конкретного чертежа или варианта осуществления, такой признак

также может использоваться в соответствующей степени в контексте другого чертежа или варианта осуществления в сочетании с другим признаком или в настоящем изобретении в целом.

Кроме того, хотя настоящее изобретение было конкретно описано с точки зрения определенных предпочтительных вариантов осуществления, настоящее изобретение не ограничивается такими предпочтительными вариантами осуществления. Предпочтительно объем настоящего изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения.

#### Литературные источники

Полные ссылки на следующие ссылки, процитированные в сокращенном виде первым автором (или изобретателем) и датированные ранее в этом описании, приведены ниже. Каждая из этих ссылок включена в настоящий документ в качестве ссылки для всех целей.

Ando et al., *Agri. Biol. Chem.* 1989, 53, 2613, "Purification and Characteristics of a Novel Transglutaminase Derived from Microorganisms."

Babcook et al., US 2017/0008970 (2017).

Bregeon, US 2016/0114056 A1 (2016).

Bregeon et al., US 9,427,478 B2 (2016).

Bregeon et al., US 9,717,803 B2 (2017).

Chen et al., US 2005/0136491 A1 (2005).

Dennler et al., *Bioconjug. Chem.* 2014, 25, 569, "Transglutaminase-Based Chemo-Enzymatic Conjugation Approach Yields Homogeneous Antibody-Drug Conjugates."

Farias et al., US 2016/0193356 A1 (2016).

Fischer et al., US 2015/0284713 A1 (2015).

Fontana et al., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008, 60, 13, "Site-Specific modification and PEGylation of pharmaceutical proteins mediated by transglutaminase."

Gerber et al., *Nat. Prod. Rep.* 2013, 30, 625, "The antibody-drug conjugate: an enabling modality for natural product-based cancer therapies."

Innate Pharma, "A New Site Specific Antibody Conjugation Using Bacterial Transglutaminase," presentation at ADC Summit, San Francisco, California, Oct. 15, 2013.

Jeger et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 9995, "Site-Specific and Stoichiometric Modification of Antibodies by Bacterial Transglutaminase."

Kamiya et al., US 2011/0184147 A1 (2011).

Lin et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 4542, "Transglutaminase-Catalyzed Site-Specific Conjugation of Small-Molecule Probes to Proteins in Vitro and on the Surface of Living Cells."

Liu et al., US 8,865,875 B2 (2014).

Mero et al., *Bioconjug. Chem.* 2009, 20, 384, "Transglutaminase-Mediated PEGylation of Proteins: Direct Identification of the Sites of Protein Modification by Mass Spectrometry Using a Novel Monodisperse PEG."

Mindt et al., *Bioconjug. Chem.* 2008, 19, 271, "Modification of Different IgG1 Antibodies via Glutamine and Lysine using Bacterial and Human Tissue Transglutaminase."

Ohtsuka et al., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2000, 64, 2608, "Comparison of Substrate Specificities of Transglutaminases Using Synthetic Peptides as Acyl Donors."

Rao-Naik et al., WO 2017/059158 A1 (2017).

Rao-Naik et al., US 2018/0037921 A1 (2018).

Sato, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002, 54, 487, "Enzymatic procedure for site-specific pegylation of proteins."

Sato et al., US 6,322,996 B1 (2001).

Schibli et al., US 2007/0184537 A1 (2007).

Smith et al., US 2019/0099505 A1 (2019).

Strop et al., *Chemistry & Biology* 2013, 20, 161, "Location Matters: Site of Conjugation Modulates Stability and Pharmacokinetics of Antibody Drug Conjugates."

Strop et al., US 9,676,871 B2 (2017).

Sugimura et al., *J. Biotechnol.* 2007, 131, 121, "Novel site-specific immobilization of a functional protein using a preferred substrate sequence for transglutaminase 2."

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полноразмерное антитело, имеющее на С-конце своей легкой цепи глутаминсодержащее удлинение, содержащее аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, NO: 2, NO: 3, NO: 4, NO: 5, NO: 6, NO: 7, NO: 8, NO: 9, NO: 10, NO: 11, NO: 12, NO: 13, NO: 14, NO: 15, NO: 16, NO: 17, NO: 18, NO: 19, NO: 20, NO: 21, NO: 22, NO: 23, NO: 24, NO: 25, NO: 26, NO: 29, NO: 30, NO: 31, NO: 32, NO: 33, NO: 34, NO: 35, NO: 36, NO: 37, NO: 38, NO: 39 и NO: 40.

2. Полноразмерное антитело по п.1, где удлинение имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, NO: 2, NO: 3, NO: 4, NO: 5 и NO: 6.

3. Полноразмерное антитело по п.1, где удлинение имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 7, NO: 8, NO: 9, NO: 10, NO: 11 и NO: 12.

4. Полноразмерное антитело по п.1, где удлинение имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 14, NO: 15, NO: 16, NO: 17, NO: 18 и NO: 19.

5. Полноразмерное антитело по п.1, где удлинение имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, NO: 21, NO: 22, NO: 23, NO: 24 и NO: 25.

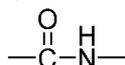
6. Полноразмерное антитело по п.1, где глутаминсодержащее удлинение имеет валин-лейцин (VL) на N-концевой стороне глутамина.

7. Конъюгат формулы (IV)



где Ab представляет собой полноразмерное антитело, имеющее на С-конце (карбоксихонце) своей легкой цепи глутаминсодержащее удлинение, содержащее аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, NO: 2, NO: 3, NO: 4, NO: 5, NO: 6, NO: 7, NO: 8, NO: 9, NO: 10, NO: 11, NO: 12, NO: 13, NO: 14, NO: 15, NO: 16, NO: 17, NO: 18, NO: 19, NO: 20, NO: 21, NO: 22, NO: 23, NO: 24, NO: 25, NO: 26, NO: 29, NO: 30, NO: 31, NO: 32, NO: 33, NO: 34, NO: 35, NO: 36, NO: 37, NO: 38, NO: 39 и NO: 40;

L представляет собой линкерный фрагмент, связанный с Ab с помощью амидной связи



с глутамином в глутаминсодержащем удлинении; и

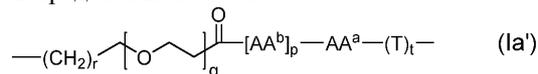
D выбирают из группы, состоящей из белка, радиоизотопа, аналитического средства и терапевтического средства.

8. Конъюгат по п.7, где D представляет собой цитотоксическое лекарственное средство.

9. Конъюгат по п.7, где D представляет собой агонист TLR3, TLR7, TLR9, STING, NLRP3 или RIG-I.

10. Конъюгат по п.7, где L представляет собой  $-(\text{CH}_2)_{2-6}-$ .

11. Конъюгат по п.7, где L представляет собой



где T представляет собой саморасщепляющуюся группу;

t равняется 0 или 1;

AA<sup>a</sup> и каждое AA<sup>b</sup> независимо выбирают из группы, состоящей из аланина, β-аланина, γ-аминоасляной кислоты, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, γ-карбоксихлутаминовой кислоты, цитруллина, цистеина, глутаминовой кислоты, глутамина, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, норлейцина, норвалина, орнитина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина;

r представляет собой 1, 2, 3 или 4;

q равняется 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10; и

г равняется 1, 2, 3, 4 или 5.

12. Способ получения конъюгата антитела, включающий стадии

(а) смешивания полноразмерного антитела, имеющего на С-конце (карбоксихонце) своей легкой цепи глутаминсодержащее удлинение, содержащее аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, NO: 2, NO: 3, NO: 4, NO: 5, NO: 6, NO: 7, NO: 8, NO: 9, NO: 10, NO: 11, NO: 12, NO: 13, NO: 14, NO: 15, NO: 16, NO: 17, NO: 18, NO: 19, NO: 20, NO: 21, NO: 22, NO: 23, NO: 24, NO: 25, NO: 26, NO: 29, NO: 30, NO: 31, NO: 32, NO: 33, NO: 34, NO: 35, NO: 36, NO: 37, NO: 38, NO: 39 и NO: 40, с соединением-донором амина, содержащим первичный амин и фрагмент, выбранный из группы, состоящей из белка, радиоизотопа, аналитического средства и терапевтического средства, в присутствии транслгутаминазы; и

(б) предоставления транслгутаминазе возможности катализировать образование амидной связи между карбоксамидом боковой цепи глутамина глутаминсодержащего удлинения и первичным амином

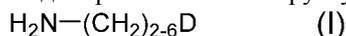
соединения-донора амина, тем самым приводя к образованию конъюгата антитела.

13. Способ по п.12, где соединение-донор амина имеет структуру

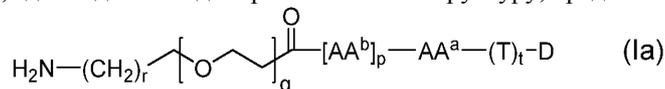


где L представляет собой линкерный фрагмент, и D представляет собой белок, радиоизотоп, аналитическое средство или терапевтическое средство.

14. Способ по п.13, где соединение-донор амина имеет структуру



15. Способ по п.12, где соединение донор-амин имеет структуру, представленную формулой (Ia)



где D представляет собой белок, радиоизотоп, аналитическое средство или терапевтическое средство;

T представляет собой саморасщепляющуюся группу;

t равняется 0 или 1;

AA<sup>a</sup> и каждое AA<sup>b</sup> независимо выбирают из группы, состоящей из аланина, β-аланина, γ-аминомасляной кислоты, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, γ-карбоксиглутаминовой кислоты, цитруллина, цистеина, глутаминовой кислоты, глутамина, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, норлейцина, норвалина, орнитина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина;

r представляет собой 1, 2, 3 или 4;

q равняется 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10; и

g равняется 1, 2, 3, 4 или 5.

16. Способ по п.12, где фрагмент представляет собой терапевтический фрагмент.

17. Способ по п.16, где терапевтическое средство представляет собой цитотоксическое лекарственное средство.

18. Конъюгат по п.16, где терапевтическое средство представляет собой агонист TLR3, TLR7, TLR9, STING, NLRP3 или RIG-I.

19. Способ получения конъюгата антитела, включающий стадии

(a) смешивания полноразмерного антитела, имеющего на C-конце (карбоксиконце) своей легкой цепи глутаминсодержащее удлинение, содержащее аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, NO: 2, NO: 3, NO: 4, NO: 5, NO: 6, NO: 7, NO: 8, NO: 9, NO: 10, NO: 11, NO: 12, NO: 13, NO: 14, NO: 15, NO: 16, NO: 17, NO: 18, NO: 19, NO: 20, NO: 21, NO: 22, NO: 23, NO: 24, NO: 25, NO: 26, NO: 29, NO: 30, NO: 31, NO: 32, NO: 33, NO: 34, NO: 35, NO: 36, NO: 37, NO: 38, NO: 39 и NO: 40, с первым соединением, при этом первое соединение представляет собой соединение-донор амина, имеющее первичный амин и первую реакционноспособную функциональную группу, в присутствии трансглутаминазы;

(b) предоставления трансглутаминазе возможности катализировать образование амидной связи между карбоксамидом боковой цепи глутамина глутаминсодержащего удлинения и первичным амином первого соединения, с образованием аддукта антитела и первого соединения;

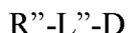
(c) приведения аддукта в контакт со вторым соединением, имеющим вторую реакционноспособную функциональную группу и фрагмент, выбранный из группы, состоящей из белка, радиоизотопа, аналитического средства и терапевтического средства; при этом вторая реакционноспособная функциональная группа способна реагировать с первой реакционноспособной функциональной группой с образованием ковалентной связи между ними; и

(d) предоставления первой и второй реакционноспособным функциональным группам возможности вступать в реакцию и образовывать ковалентную связь между ними, тем самым приводя к образованию конъюгата антитела.

20. Способ по п.19, где первое соединение имеет структуру

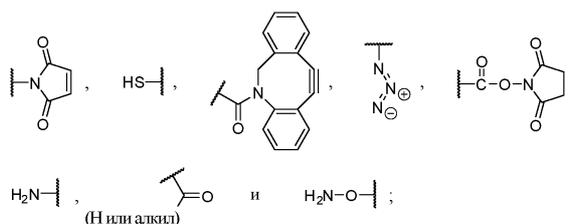


где L' представляет собой первый линкерный фрагмент, и R' представляет собой первую реакционноспособную функциональную группу, и второе соединение имеет структуру

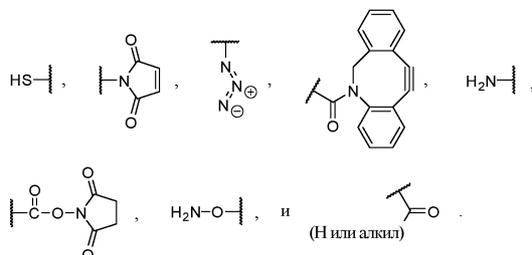


где R'' представляет собой вторую реакционноспособную функциональную группу, способную вступать в реакцию с R', L'' представляет собой второй линкерный фрагмент, и D представляет собой белок, радиоизотоп, аналитическое средство или терапевтическое средство.

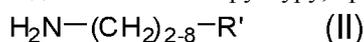
21. Способ по п.20, где R' выбирают из



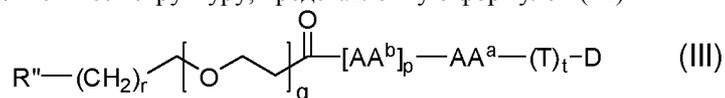
и реципрокно R" выбирают из



22. Способ по п.20, где первое соединение имеет структуру, представленную формулой (II)



и второе соединение имеет структуру, представленную формулой (III)



где R' представляет собой первую реакциюспособную группу;

R'' представляет собой вторую реакциюспособную группу, способную вступать в реакцию с R';

D представляет собой белок, радиоизотоп, аналитическое средство или терапевтическое средство;

T представляет собой саморасщепляющуюся группу;

t равняется 0 или 1;

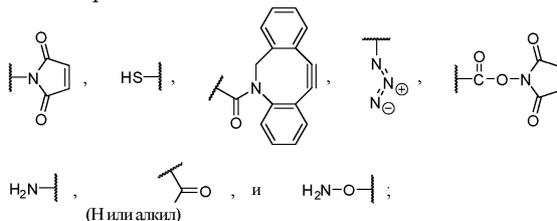
AA<sup>a</sup> и каждое AA<sup>b</sup> независимо выбирают из группы, состоящей из аланина, β-аланина, γ-аминомасляной кислоты, аргинина, аспарагина, аспарагиновой кислоты, γ-карбоксиглутаминовой кислоты, цитруллина, цистеина, глутаминовой кислоты, глутамина, глицина, гистидина, изолейцина, лейцина, лизина, метионина, норлейцина, норвалина, орнитина, фенилаланина, пролина, серина, треонина, триптофана, тирозина и валина;

r представляет собой 1, 2, 3 или 4;

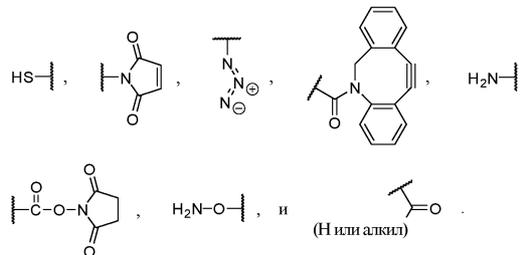
q равняется 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10; и

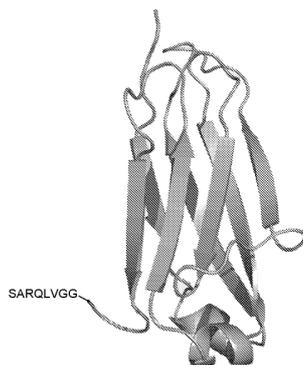
г равняется 1, 2, 3, 4 или 5.

23. Способ по п.22, где R' выбирают из



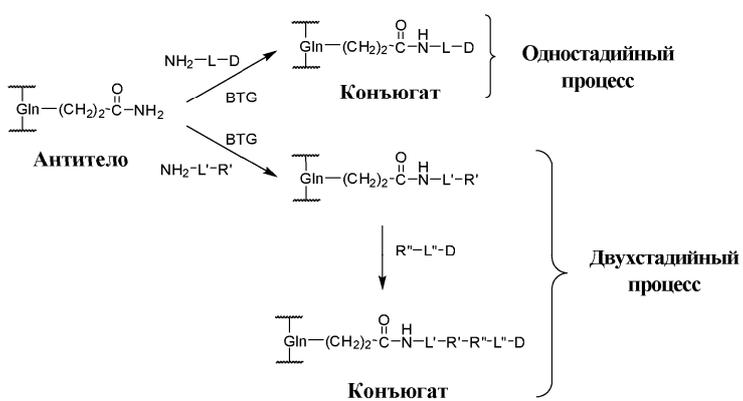
и реципрокно R" выбирают из





Фиг. 1

**Получение конъюгата антитела с помощью трансглутаминазы (BTG)**



Фиг. 2

