



(51) МПК
C07K 16/30 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/30 (2018.08); *A61K 47/68* (2018.08); *A61K 47/6803* (2018.08); *A61K 47/6811* (2018.08); *C12N 15/63* (2018.08)

(21)(22) Заявка: 2016144146, 10.04.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.04.2015

Дата регистрации:
17.01.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
11.04.2014 US 61/978,481

(43) Дата публикации заявки: 11.05.2018 Бюл. № 14

(45) Опубликовано: 17.01.2020 Бюл. № 2

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 11.11.2016

(86) Заявка РСТ:
US 2015/025237 (10.04.2015)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2015/157595 (15.10.2015)

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

(72) Автор(ы):

ГАО Чаншоу (US),
РЕЙНИ Годфри (US),
ГАО Цуйхуа (US)

(73) Патентообладатель(и):

МЕДИММЬОН, ЭлЭлСи (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2013070565 A1, 16.05.2013. EA
12566 B1, 30.10.2009. WO 2013118858 A1,
15.08.2013. EA 5404 B1, 24.02.2005. RU 2352583
C2, 20.04.2009.

(54) КОНЪЮГИРОВАННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, СОДЕРЖАЩИЕ СКОНСТРУИРОВАННЫЕ С
ЦИСТЕИНОМ АНТИТЕЛА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биохимии,
в частности, к способу получения соединения-
конъюгата. Изобретение позволяет

конструировать соединения-конъюгаты. 2 н. и 13
з.п. ф-лы, 24 ил., 9 табл., 6 пр.

RU
2 7 1 1 4 8 5
C 2

RU
2 7 1 1 4 8 5
C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07K 16/30 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07K 16/30 (2018.08); A61K 47/68 (2018.08); A61K 47/6803 (2018.08); A61K 47/6811 (2018.08); C12N 15/63 (2018.08)

(21)(22) Application: **2016144146, 10.04.2015**(24) Effective date for property rights:
10.04.2015Registration date:
17.01.2020

Priority:

(30) Convention priority:
11.04.2014 US 61/978,481(43) Application published: **11.05.2018 Bull. № 14**(45) Date of publication: **17.01.2020 Bull. № 2**(85) Commencement of national phase: **11.11.2016**(86) PCT application:
US 2015/025237 (10.04.2015)(87) PCT publication:
WO 2015/157595 (15.10.2015)

Mail address:

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

(72) Inventor(s):

**GAO, Changshou (US),
RAINEY, Godfrey (US),
GAO, Cuihua (US)**

(73) Proprietor(s):

MEDIMMUNE, LLC (US)

(54) **CONJUGATED COMPOUNDS CONTAINING CYSTEINE-CONSTRUCTED ANTIBODIES**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biochemistry,
particularly to a method of producing a conjugate
compound.

EFFECT: invention enables to design conjugate
compounds.

15 cl, 24 dwg, 9 tbl, 6 ex

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0000] Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и включен сюда в качестве ссылки во всей своей полноте. Указанная ASCII копия, созданная 27 мая 2015 года, названа
5 Cys-115WO1_SL.txt и занимает 44,469 байт.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0001] Настоящее раскрытие предусматривает сконструированные с цистеином антитела и Fc-гибридный белок, а также соединения-конъюгаты, содержащие такие сконструированные с цистеином молекулы. Такие конъюгаты можно использовать для
10 диагностических и терапевтических применений.

[0002] Применение антител было налажено для диагностики и целенаправленного лечения пациентов с раком, иммунологическими и ангиогенными нарушениями. Применение конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC), т. е. иммуноконъюгатов, для местной доставки цитотоксических или цитостатических
15 средств, т. е. лекарственных средств для уничтожения или ингибирования развития опухолевых клеток при лечении рака (Lambert (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549; Wu et al (2005) Nature Biotechnology 23:1137-1146; Payne (2003) Cancer Cell 3:207-21), теоретически обеспечивает целенаправленную доставку фрагмента лекарственного средства к опухолям, где они связываются с мишенью и могут быть интернализированы,
20 что приводит в результате к внутриклеточному накоплению в них, при этом системное введение этих лекарственных средств в неконъюгированном виде может привести к неприемлемым уровням токсичности по отношению к нормальным клеткам, в то же время предполагается, что опухолевые клетки будут устранены. Усилия в разработке и усовершенствовании ADC были сосредоточены на селективности моноклональных
25 антител (mAb), а также свойствах связывания с лекарственным средством и высвобождения лекарственного средства (Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549). Эти способы включают в себя конъюгирование антител с лекарственными средствами, токсинами, радиоактивными изотопами, пептидами, другими антителами и т. д.

[0003] Традиционные способы присоединения, т. е. связывания посредством
30 ковалентных связей фрагмента лекарственного средства с антителом, обычно приводят к образованию гетерогенной смеси молекул, при этом фрагменты лекарственного средства присоединяют в нескольких сайтах на антителе. Например, цитотоксические лекарственные средства, как правило, конъюгируют с антителами посредством зачастую
35 многочисленных остатков лизина в антителе, образуя гетерогенную смесь конъюгатов антитело-лекарственное средство.

[0004] Остатки цистеина вводят в белки с помощью методик генной инженерии для образования ковалентных присоединений с лигандами или для образования новых внутримолекулярных дисульфидных связей. Однако конструирование тиольных групп
40 цистеина путем мутации различных аминокислотных остатков белка на аминокислоту цистеин является потенциально проблематичным, особенно в случае неспаренных остатков (свободных остатков цистеина) или таковых, которые относительно восприимчивы к вступлению в реакцию или окислению. Например, образование внутримолекулярных или межмолекулярных дисульфидных связей может привести к
45 агрегации белков. Положение сконструированного цистеина может влиять на доступность для лекарственного средства в ходе конъюгирования, что приводит в результате к низким показателям выхода. Введение новых остатков цистеина может инактивировать антитело или привести к снижению специфичности связывания с его

мишенью вследствие неправильного скручивания или повреждения третичной структуры (Zhang et al (2002) Anal. Biochem. 311:1-9). К тому же, конъюгированные соединения могут характеризоваться плохой стабильностью в сыворотке, что приводит к снижению активности и разрушению (например, путем протеолитического расщепления или
5 выведения фрагмента антитела или путем гидролиза фрагмента лекарственного средства). Таким образом, целью настоящего изобретения является обеспечение улучшенных стратегий касательно конструирования цистеина, обеспечивающих возможность получения соединений-конъюгатов с повышенной стабильностью, например, стабильностью в сыворотке.

10 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

[0005] Настоящее раскрытие предусматривает соединения-конъюгаты, содержащие сконструированное с цистеином антитело или Fc-гибридный белок и по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, где (i) Fc-домен антитела или его Fc-гибридного белка содержит по меньшей мере одну сконструированную аминокислоту цистеин, выбранную
15 из аминокислоты цистеина, являющейся результатом замен на цистеин в аминокислотных положениях 241, 243, 251, 253, 258, 264, 269, 271, 272, 274, 280, 281, 285, 288, 291, 293, 294, 296, 301, 307, 309, 311, 318, 329, 340, 341, 345, 357, 385, 386, 387, 401, 402, 411, 417, 433, 435 или 439, вставки аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240 и их комбинаций, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с
20 EU-индексом, как изложено у Kabat (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA), и (ii) где по меньшей мере один гетерологичный фрагмент конъюгирован с одним из сконструированных остатков цистеина.

[0006] В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит 2 или более сконструированных аминокислоты цистеина.

25 [0007] В некоторых аспектах соединения-конъюгаты характеризуются высокой стабильностью в сыворотке.

[0008] Другой аспект настоящего раскрытия предусматривает нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева для получения антител или Fc-гибридных белков по меньшей мере с одной сконструированной аминокислотой цистеином, как описано в данном
30 документе.

[0009] Другой аспект раскрытия предусматривает способы получения соединений-конъюгатов, содержащих сконструированное с цистеином антитело или Fc-гибридный белок и по меньшей мере один гетерологичный фрагмент. В одном варианте осуществления гетерологичный фрагмент представляет собой лекарственное средство,
35 при этом лекарственное средство выбрано из цитотоксического средства, химиотерапевтического средства, пептида, пептидомиметика, каркасного белка, фермента, токсина, радионуклида, ДНК, РНК, siRNA, микроРНК, пептидо-нуклеиновой кислоты, флуоресцентной метки или биотина.

[0010] Другой аспект раскрытия предусматривает соединения-конъюгаты согласно
40 настоящему раскрытию, где соединения-конъюгаты способны к интернализации при связывании с рецепторами клеточной поверхности. В таких аспектах соединения-конъюгаты согласно раскрытию являются пригодными для внутриклеточной доставки молекул-карга и/или средств.

[0011] Другой аспект раскрытия предусматривает способы лечения, обнаружения и
45 диагностирования рака, аутоиммунных, воспалительных или инфекционных заболеваний с помощью соединений-конъюгатов согласно настоящему раскрытию.

[0012] Другой аспект настоящего раскрытия предусматривает композиции, содержащие соединения-конъюгаты согласно настоящему раскрытию.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ/ФИГУР

[0013] На **фигурах 1А и 1В** показаны аминокислотные последовательности (SEQ ID NO: 15-18, соответственно, в порядке их расположения) и нумерация для участков СН₂ и СН₃ тяжелых цепей IgG (IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4), соответственно, в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Остатки, которые отличаются от IgG1, заштрихованы, а сайты известной аллельной вариации указаны звездочкой (*). Заштрихованные прямоугольники указывают несколько сайтов замены/вставки цистеина, определенные в примере 1, а стрелки указывают сайты замены/вставки цистеина, тестируемые в отношении стабильности в сыворотке согласно приведенным в данном документе примерам.

[0014] На **фигуре 2** показаны профили эксклюзионной хроматографии (SEC), соответствующие соединению-конъюгату, содержащему антитело 1С1 с цистеином, сконструированным в положении согласно EU 258 (E258C), конъюгированное с Alexa Fluor 488 (AF488) при помощи химического вещества малеимида. Соединение-конъюгат инкубировали с сывороткой человека (NHS) или фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). На панели А показан результат при инкубировании с NHS в день 0, на панели В показан результат при инкубировании с PBS в день 0, на панели С показан результат после семи дней инкубирования с NHS и на панели D показан результат после семи дней инкубирования с PBS. Сигнал при 280 показывает общее содержание белков в образце, а сигнал при 494 - белка, конъюгированного с AF488. После семи дней инкубирования в сыворотке лишь небольшая часть AF488 перешла к HSA.

[0015] На **фигуре 3** показаны профили эксклюзионной хроматографии (SEC), соответствующие соединению-конъюгату, содержащему антитело 1С1 с цистеином, сконструированным в положении согласно EU 435 (H435C), конъюгированное с Alexa Fluor 488 (AF488) при помощи химического вещества малеимида. Соединение-конъюгат инкубировали с сывороткой человека (NHS) или фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). На панели А показан результат при инкубировании с NHS в день 0, на панели В показан результат при инкубировании с PBS в день 0, на панели С показан результат после семи дней инкубирования с NHS и на панели D показан результат после семи дней инкубирования с PBS. После семи дней инкубирования в сыворотке лишь небольшая часть AF488 перешла к HSA.

[0016] На **фигуре 4** показаны профили эксклюзионной хроматографии (SEC), соответствующие соединению-конъюгату, содержащему антитело 1С1 с цистеином, сконструированным в положении согласно EU 443 (L443C), конъюгированное с Alexa Fluor 488 (AF488) при помощи химического вещества малеимида. Соединение-конъюгат инкубировали с сывороткой человека (NHS) или фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). На панели А показан результат при инкубировании с NHS в день 0, на панели В показан результат при инкубировании с PBS в день 0, на панели С показан результат после семи дней инкубирования с NHS и на панели D показан результат после семи дней инкубирования с PBS. После семи дней инкубирования в сыворотке лишь небольшая часть AF488 перешла к HSA.

[0017] На **фигуре 5** показаны профили эксклюзионной хроматографии (SEC), соответствующие соединению-конъюгату, содержащему антитело 1С1 с цистеином, сконструированным в точке вставки между положениями согласно EU 239 и 240 (C239ins), конъюгированное с Alexa Fluor 488 (AF488) при помощи химического вещества малеимида. Соединение-конъюгат инкубировали с сывороткой человека (NHS) или фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). На панели А показан результат при

инкубировании с NHS в день 0, на панели В показан результат при инкубировании с PBS в день 0, на панели С показан результат после семи дней инкубирования с NHS и на панели D показан результат после семи дней инкубирования с PBS. После семи дней инкубирования в сыворотке лишь небольшая часть AF488 перешла к HSA.

5 [0018] На **фигуре 6** показаны профили эксклюзионной хроматографии (SEC), соответствующие соединению-конъюгату, содержащему антитело 1C1 с цистеином, сконструированным в положении согласно EU 239 (S239C), конъюгированное с Alexa Fluor 488 (AF488) при помощи химического вещества малеимида. Соединение-конъюгат инкубировали с сывороткой человека (NHS) или фосфатно-солевым буферным
10 раствором (PBS). На панели А показан результат при инкубировании с NHS в день 0, на панели В показан результат при инкубировании с PBS в день 0, на панели С показан результат после семи дней инкубирования с NHS и на панели D показан результат после семи дней инкубирования с PBS. После семи дней инкубирования в сыворотке лишь небольшая часть AF488 перешла к HSA.

15 [0019] На **фигуре 7** показаны профили эксклюзионной хроматографии (SEC), соответствующие соединению-конъюгату, содержащему антитело 1C1 с цистеином, сконструированным в его легкой цепи (LC) в положении согласно EU 205 (LC-V205C), что является высокостабилизирующей мутацией, конъюгированное с Alexa Fluor 488 (AF488) при помощи химического вещества малеимида. Соединение-конъюгат
20 инкубировали с сывороткой человека (NHS) или фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). На панели А показан результат при инкубировании с NHS в день 0, на панели В показан результат при инкубировании с PBS в день 0, на панели С показан результат после семи дней инкубирования с NHS и на панели D показан результат после семи дней инкубирования с PBS. После семи дней инкубирования в сыворотке лишь
25 небольшая часть AF488 перешла к HSA.

[0020] На **фигуре 8** показаны профили эксклюзионной хроматографии (SEC), соответствующие соединению-конъюгату, содержащему антитело 1C1 с цистеином, сконструированным в положении согласно EU 289 (T289C), что является
30 дестабилизирующей мутацией, конъюгированное с Alexa Fluor 488 (AF488) при помощи химического вещества малеимида. Соединение-конъюгат инкубировали с сывороткой человека (NHS) или фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). На панели А показан результат при инкубировании с NHS в день 0, на панели В показан результат при инкубировании с PBS в день 0, на панели С показан результат после семи дней инкубирования с NHS и на панели D показан результат после семи дней инкубирования
35 с PBS. После семи дней инкубирования в сыворотке большая часть A488 перешла к HSA.

[0021] На **фигуре 9** показаны необработанные данные (панель А) и данные, нормализованные относительно дня 0, (панель В), соответствующие экспериментальным данным, приведенным на фигурах 2-8. Новые сконструированные с цистеином антитела
40 1C1, содержащие мутации E258C, H435, L443 и C239ins, и конъюгированные с AF488 были стабильными после 7 дней инкубирования в сыворотке. Стабильность новых сконструированных соединений была сопоставима таковой для стабильного сайт-контроля 1C1-LC-V205C-AF488. Сайт-контроль для сравнения представлял собой соединение-конъюгат 1C1-T289C-AF488.

45 [0022] На **фигуре 10** показано, что мутации E258C и C239ins согласно EU не влияли на связывание с FcRn. На **фигуре 10А** показано, что при иммобилизации антител, несущих указанные мутации в указанных положениях, на планшете для ELISA, FcRn способен связываться до такой же степени в сравнении с антителом, несущим Fc IgG1 WT. На

фигуре 10В показано, что при иммобилизации антител, несущих указанные мутации в указанных положениях, с конъюгированием с AF488 при помощи химического вещества малеимида или без него, на планшете для ELISA, FcRn способен связываться до такой же степени в сравнении с антителом, несущим Fc IgG1 WT. Также показаны таблицы, в которых приведены значения LogEC_{50} для каждой кривой.

[0023] На **фигуре 11** показана аффинность связывания антител, имеющих Fc-участок дикого типа или сконструированный с цистеином Fc-участок, к Fc-рецепторам человека: FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa (как 158V, так и 158F аллелей) и FcRn. "N/A" означает, что связывание было очень слабым для того, чтобы получить достоверную оценку KD. Связывание FcRn обеспечивали при pH 6.

[0024] На **фигуре 12** показаны профили дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) в отношении дикого типа (WT), мутаций E258C, S239C, C239ins, H435C и Lc-V205C. Профили E258C, S239C и Lc-V205C подобны таковым для WT, в то время как новый более низкий пик плавления появляется как для мутанта C239ins, так и мутанта H435C. Также показана таблица, в которой приведены значения T_m1 , полученные из термограмм DSC.

[0025] На **фигурах 13А-С** показана цитотоксичность конъюгатов антитела с одиночной Cys-мутацией-лекарственное средство (ADC), полученных из антитела 1C1, содержащего цитотоксическое лекарственное средство на основе ауристатина, в отношении клеток DU145. На график нанесены цитотоксические кривые для 1C1-S239C-ADC, 1C1-LC-V205C-ADC, 1C1-E258C-ADC, C1-H435C-ADC, 1C1-239ins-ADC, 1C1-T289C-ADC, 1C1-L443C-ADC, 1C1-ccADC (при помощи подхода рандомного конъюгирования) и 1C1-WT-ADC (псевдоконъюгирование) и отрицательных контролей R347-S239C-ADC. На панели А показан эффект в день 0. На панели В показан эффект в день 3. На панели С показан эффект в день 7. Также показаны таблицы, в которых приведены значения EC_{50} для каждой кривой.

[0026] На **фигурах 14А-С** показана цитотоксичность ADC, полученных из антитела 1C1, содержащего два сконструированных остатка цистеина, и цитотоксического лекарственного средства на основе ауристатина, в отношении клеток DU145. На график нанесены цитотоксические кривые для 1C1-239ins-E258C-ADC, C1-239ins-H435C-ADC, 1C1-239ins-S442C-ADC, 1C1-FF-E258C-S435C-ADC, 1C1-FF-E258C-S442C-ADC, 1C1-FF-H435C-S442C-ADC (следует отметить, что "FF" указывает на то, что эта конструкция содержит дополнительные мутации L234F/L235F согласно EU для предотвращения Fc-опосредованной эффекторной функции) и 1C1-T289C-ADC. На панели А показан эффект в день 0. На панели В показан эффект в день 3. На панели С показан эффект в день 7. Также показаны таблицы, в которых приведены значения EC_{50} для каждой кривой.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0027] Настоящее раскрытие предусматривает соединения-конъюгаты, содержащие сконструированные с цистеином антитела или Fc-гибридные белки, где один или несколько аминокислотных остатков были заменены на реакционноспособные остатки цистеина, и более конкретно, соединения-конъюгаты для терапевтических и диагностических применений. Раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты содержат сконструированные с цистеином антитела или Fc-гибридные белки, конъюгированные, например, с химиотерапевтическими лекарственными средствами, токсинами, радионуклидами и детектируемыми метками, такими как радионуклиды или флуорофоры. Раскрытие также относится к способам применения раскрытых соединений-конъюгатов для диагностики или обработки *in vitro*, *in situ*, *ex vivo* и *in vivo*

клеток млекопитающих или лечения ассоциированных патологических состояний.

[0028] С целью сделать настоящее раскрытие более легким для понимания некоторые выражения определены заранее. В ходе подробного описания изложены дополнительные определения.

5 I. Определения

[0029] Прежде чем описывать предусмотренные варианты осуществления более подробно, следует понимать, что настоящее раскрытие не ограничивается конкретными композициями или стадиями способа, и в связи с этим они могут изменяться.

Используемые в данном описании и прилагаемой формуле формы единственного числа 10 включают определяемые объекты и во множественном числе, если из контекста явно не следует иное. Выражения в форме единственного числа, а также выражения "один или несколько" и "по меньшей мере один" могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо.

[0030] Кроме того, выражение "и/или" там, где оно употребляется в настоящем 15 документе, следует рассматривать как конкретное описание каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без другого. Таким образом, выражение "и/или" при использовании в настоящем документе в такой фразе, как "А и/или В", должно включать "А и В", "А или В", "А" (отдельно) и "В" (отдельно). Аналогично, выражение "и/или" при употреблении в такой фразе, как "А, В и/или С", должно охватывать каждый 20 из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А или С; А или В; В или С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно).

[0031] Если не определено иное, все используемые в настоящем документе технические и научные выражения имеют то же значение, которое обычно понимает специалист с 25 обычной квалификацией в области техники, к которой относится данное раскрытие.

Например, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; а также Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press обеспечивают специалиста общим словарем многих выражений, 30 используемых в данном раскрытии.

[0032] Единицы измерения, префиксы и символы обозначены в их форме, принятой в Système International de Unites (SI). Числовые диапазоны включают числа, определяющие 35 диапазон. Если не указано иное, то аминокислотные последовательности записаны слева направо в направлении от амино- к карбоксиконцу. Приведенные в данном документе заголовки не ограничивают различные аспекты, которые могут обеспечиваться ссылкой на описание в целом. Соответственно, выражения, непосредственно приведенные ниже, более полно определены посредством ссылки на описание во всей его полноте.

[0033] Следует понимать, что какие бы аспекты ни описывались в настоящем документе формулировкой "содержащий", другие аналогичные аспекты, описываемые 40 выражениями "состоящий из" и/или "состоящий по сути из", также предусмотрены.

[0034] В данном документе аминокислоты указаны либо с помощью их общеизвестных трехбуквенных символов, либо с помощью однобуквенных символов, рекомендованных Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Аналогично, нуклеотиды 45 указаны с помощью их общепринятых однобуквенных кодов.

[0035] Выражения "антитело" или "иммуноглобулин", используемые в данном документе взаимозаменяемо, включают целые антитела и любую их антигенсвязывающую область или одиночные цепи.

[0036] Типичное антитело содержит по меньшей мере две тяжелых (H) цепи и две

легких (L) цепи, связанные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из переменного участка тяжелой цепи (в данном документе сокращенно VH) и константного участка тяжелой цепи. Константный участок тяжелой цепи состоит из трех или четырех константных доменов: CH1, CH2, CH3, CH4. Каждая легкая цепь

5 состоит из переменного участка легкой цепи (в данном документе сокращенно VL) и константного участка легкой цепи. Константный участок легкой цепи состоит из одного домена CL. Участки VH и VL можно дополнительно подразделить на участки гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность участками (CDR), чередующиеся с более консервативными участками, называемыми каркасными

10 участками (FR). Каждый VH и VL состоит из трех CDR и четырех FW, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FW1, CDR1, FW2, CDR2, FW3, CDR3, FW4. Переменные участки тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные участки антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая

15 различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. Иллюстративные сконструированные с цистеином антитела согласно настоящему раскрытию включают типичные антитела, гибридные белки и конструкции, содержащие антитело или его антигенсвязывающую область, например, конструкцию, содержащую Fc-домен и

20 ковалентно связанный scFv (например, посредством пептидных связей или посредством химического линкера) с N-концом CH2-домена или C-концом CH3-домена тяжелой цепи типичного антитела.

[0037] Выражение "антитело" обозначает молекулу иммуноглобулина, которая распознает и специфически связывается с мишенью, такой как белок, полипептид,

25 пептид, углевод, полинуклеотид, липид или комбинация вышеуказанного, посредством по меньшей мере одного сайта распознавания антигена в переменном участке молекулы иммуноглобулина. Используемое в данном документе выражение "антитело" охватывает интактные поликлональные антитела, интактные моноклональные антитела, области антител (такие как Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv-области), одноцепочечные Fv (scFv)

30 мутанты, полиспецифические антитела, такие как биспецифические антитела, полученные из по меньшей мере двух интактных антител, химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, гибридные белки, содержащие антиген-определяющую часть антитела, и любую другую модифицированную молекулу иммуноглобулина, содержащую сайт распознавания антигена, при условии, что антитела проявляют

35 необходимую биологическую активность. Антитело может представлять собой любое из пяти основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM или их подклассов (изотипов) (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2), исходя из идентичности их константных доменов тяжелой цепи, обозначаемых как альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю, соответственно. Разные классы иммуноглобулинов характеризуются разными и

40 хорошо известными структурами субъединиц и пространственными конфигурациями. Антитела могут быть "голыми" или конъюгированными с другими молекулами, такими как токсины, радиоактивные изотопы и т. д., с образованием конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC).

[0038] Выражение "антигенсвязывающая область" относится к части интактного антитела и относится к антиген-определяющим переменным участкам интактного антитела. Из уровня техники известно, что антигенсвязывающая функция антитела может быть осуществлена при помощи областей полноразмерного антитела. Примеры областей антитела включают без ограничения Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv-области, линейные

антитела, одноцепочечные антитела и полиспецифические антитела, образованные из областей антитела.

[0039] "Моноклональное антитело" относится к гомогенной популяции антител, вовлеченных в высокоспецифичное распознавание и связывание одной антигенной детерминанты или эпитопа. Этим оно отличается от поликлональных антител, которые, как правило, включают разные антитела, направленные на разные антигенные детерминанты.

[0040] Выражение "моноклональное антитело" охватывает как интактные, так и полноразмерные моноклональные антитела, а также области антитела (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные (scFv) мутанты, гибридные белки, содержащие часть антитела, и любую другую модифицированную молекулу иммуноглобулина, содержащую сайт распознавания антигена. Кроме того, "моноклональное антитело" относится к таким антителам, которые получены любым из ряда путей, в том числе без ограничения посредством гибридомы, селекции с помощью фагового дисплея, рекомбинантной экспрессии и с применением трансгенных животных.

[0041] Выражение "гуманизированное антитело" относится к антителу, полученному из отличного от человеческого (например, мышинового) иммуноглобулина, которое было сконструировано с целью содержания минимального количества последовательностей не человеческого (например, мышинового) происхождения. Как правило, гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека, в которых остатки определяющего комплементарность участка (CDR) заменены остатками CDR отличных от человека видов (например, мыши, крысы, кролика или хомяка), которые характеризуются необходимой специфичностью, аффинностью и способностью (Jones *et al.*, 1986, *Nature*, 321:522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature*, 332: 323-327; Verhoeven *et al.*, 1988, *Science*, 239:1534-1536). В некоторых случаях остатки каркасного участка (FW) Fv иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками антитела из отличных от человека видов, которые характеризуются необходимой специфичностью, аффинностью и способностью.

[0042] Гуманизированные антитела можно дополнительно модифицировать посредством замены дополнительных остатков в каркасном участке Fv и/или в замененных остатках, нечеловеческого происхождения, для усовершенствования и оптимизации специфичности, аффинности и/или способности антитела. В целом, гуманизированное антитело будет содержать фактически все или по меньшей мере один, а, как правило, два или три переменных домена, содержащих все или фактически все CDR-участки, которые соответствуют иммуноглобулинам нечеловеческого происхождения, где все или фактически все FR-участки имеют человеческое происхождение. Гуманизированные антитела могут также содержать по меньшей мере часть константного участка или домена (Fc) иммуноглобулина, как правило, иммуноглобулина человека. Примеры способов, применяемых для получения гуманизированных антител, описаны в патентах США №№ 5225539 или 5639641.

[0043] "Варибельный участок" антитела относится к переменному участку легкой цепи антитела или переменному участку тяжелой цепи антитела либо отдельно, либо в комбинации. Каждые из переменных участков тяжелой и легкой цепей состоят из четырех каркасных участков (FW), соединенных с тремя определяющими комплементарность участками (CDR), также известными как гиперпеременные участки. В каждой цепи CDR удерживаются в непосредственной близости с помощью FW-участков и вместе с CDR из другой цепи участвуют в образовании антигенсвязывающего сайта антител. Существует по меньшей мере две методики

определения CDR: (1) подход, основанный на межвидовой вариабельности последовательностей (т. е. Kabat *et al.* Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); и (2) подход, основанный на кристаллографических исследованиях комплексов антиген-антитело (Al-lazikani *et al.* (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948)). Кроме того, для определения CDR иногда в данной области применяют комбинации этих двух подходов.

[0044] Систему нумерации по Kabat обычно используют при обозначении остатка в вариабельном домене (примерно остатки 1-107 легкой цепи и остатки 1-113 тяжелой цепи) (например, Kabat *et al.*, Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

[0045] Нумерация аминокислотных положений согласно Kabat относится к системе нумерации, применяемой к вариабельным доменам тяжелой цепи или вариабельным доменам легкой цепи антител в соответствии с собранными сведениями в Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). При применении этой системы нумерации фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество аминокислот или дополнительные аминокислоты, соответствующие укорочению FW или CDR вариабельного домена или вставке в них. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может содержать вставку одной аминокислоты (остаток 52a согласно Kabat) после остатка 52 в H2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b и 82c и т. д. согласно Kabat) после остатка 82 FW тяжелой цепи.

ТАБЛИЦА 1

Петля	Kabat	AbM	Chotia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26- H32...34
		(Нумерация по Kabat)	
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
		(Нумерация по Chotia)	
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0046] Нумерацию остатков по Kabat можно определить для данного антитела путем выравнивания участков антитела с гомологией последовательности антитела со "стандартной" последовательностью с нумерацией по Kabat. Chothia вместо этого обращается к расположению структурных петель (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Конец петли CDR-H1 по Chothia при нумерации согласно правилам нумерации по Kabat варьирует от H32 до H34 в зависимости от длины петли (это объясняется тем, что согласно номенклатуре Kabat размещаются вставки в H35A и H35B; при этом если как 35A, так и 35B отсутствуют, то петля заканчивается на 32; если только 35A присутствует, то петля заканчивается на 33; если как 35A, так и 35B присутствуют, то петля заканчивается на 34). Определение гипервариабельных участков согласно AbM

представляет компромисс между определением CDR по Kabat и структурных петель по Chothia и применяется в программном обеспечении по моделированию антител Oxford Molecular.

[0047] IMGT (ImMunoGeneTics) также обеспечивает систему нумерации переменных участков иммуноглобулина, в том числе CDR. См., например, Lefranc, M.P. *et al.*, *Dev. Comp. Immunol.* 27: 55-77(2003), который включен в данный документ посредством ссылки. Система нумерации IMGT была основана на выравнивании более 5000 последовательностей, данных о структуре и определении характеристик гипервариабельных петель, и она позволяет легко сравнивать переменные и CDR-участки всех видов. В соответствии с номенклатурой IMGT VH-CDR1 находится в положениях 26-35, VH-CDR2 находится в положениях 51-57, VH-CDR3 находится в положениях 93-102, VL-CDR1 находится в положениях 27-32, VL-CDR2 находится в положениях 50-52 и VL-CDR3 находится в положениях 89-97.

[0048] Используемое в данном документе выражение Fc-участок включает в себя полипептиды, содержащие константный участок антитела за исключением первого домена константного участка иммуноглобулина и его области. Таким образом, Fc относится к последним двум доменам константного участка иммуноглобулинов IgA, IgD и IgG и последним трем доменам константного участка иммуноглобулинов IgE и IgM, а также необязательно гибкому шарнирному участку на N-конце этих доменов. В случае IgA и IgM Fc-участок может охватывать J-цепь. В случае IgG Fc содержит домены иммуноглобулина C-гамма-2 и C-гамма-3 (C γ 2 и C γ 3) и необязательно шарнирный участок между C-гамма-1 (C γ 1) и C-гамма-2 (C γ 2). Несмотря на то, что границы Fc-участка могут варьировать, Fc-участок тяжелой цепи IgG человека обычно определяется как содержащий остатки C226 или P230 на его карбоксильном конце, при этом нумерация приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено в Kabat (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Fc может относиться к этому участку в отдельности или к этому участку в контексте антитела, области антитела или Fc-гибридного белка. Наблюдались полиморфизмы в ряде различных положений Fc, в том числе без ограничения в положениях 270, 272, 312, 315, 356 и 358, пронумерованных в соответствии с EU-индексом, и, следовательно, могут существовать незначительные различия между представленной последовательностью и последовательностями из уровня техники.

[0049] Используемое в данном документе выражение "Fc-гибридный белок" охватывает белки (например, соединения-конъюгаты согласно настоящему раскрытию), содержащие полноразмерный Fc-домен, а также белки, содержащие области Fc-домена (например, полный CH2-домен, полный CH3-домен, CH2-область, CH3-область или их комбинации). Fc-гибридный белок может также содержать весь или часть шарнирного участка.

[0050] Выражение "человеческое антитело" означает антитело, продуцируемое в организме человека, или антитело с аминокислотной последовательностью соответствующей антителу, продуцируемому в организме человека, полученное с использованием любых методик, известных из уровня техники. Это определение человеческого антитела включает в себя интактные или полноразмерные антитела, их области и/или антитела, содержащие по меньшей мере один полипептид тяжелой и/или легкой цепи человеческого происхождения, такие как, например, антитела, содержащие полипептиды легкой цепи мышинового происхождения и тяжелой цепи человеческого происхождения.

[0051] Выражение "химерные антитела" относится к антителам, в которых

аминокислотная последовательность молекулы иммуноглобулина получена от двух или более видов. Как правило, вариабельный участок как легкой, так и тяжелой цепей соответствует вариабельному участку антител, полученных от одного вида млекопитающих (например, мыши, крысы, кролика и т. д.) с необходимой специфичностью, аффинностью и способностью, в то время как константные участки гомологичны с последовательностями антител, полученных от другого (обычно человека), во избежание вызывания иммунного ответа у тех видов.

[0052] "Антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность" или "ADCC" относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемый Ig, связанный с Fc-рецепторами (FcR), представленными на определенных цитотоксических клетках (например, естественных клетках-киллерах (NK), нейтрофилах и макрофагах), дает возможность данным цитотоксическим эффекторным клеткам специфично связываться с несущей антиген клеткой-мишенью, а затем уничтожать клетку-мишень с помощью цитотоксинов. Антитела IgG, направленные на поверхность клеток-мишеней, "активизируют" цитотоксические клетки и являются абсолютно необходимыми для такого уничтожения. Лизис клетки-мишени является внеклеточным, требует непосредственного межклеточного контакта и не вовлекает систему комплемента. Предполагается, что помимо антител другие белки, содержащие Fc-участки, в частности Fc-гибридные белки, со способностью специфично связываться с несущей антиген клеткой-мишенью будут способными влиять на клеточно-опосредованную цитотоксичность. С целью упрощения, клеточно-опосредованная цитотоксичность, возникающая в результате активности Fc-гибридного белка, также упоминается в данном документе как ADCC-активность.

[0053] Полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетка или композиция, которые являются "выделенными", представляют собой полипептид, антитело, полинуклеотид, вектор, клетку или композицию, которые находятся в не встречаемом в природе виде. Выделенные полипептиды, антитела, полинуклеотиды, векторы, клетки или композиции включают таковые, которые были очищены до такой степени, что они больше не находятся в такой форме, в которой они встречаются в природе. В некоторых аспектах выделенные антитело, полинуклеотид, вектор, клетка или композиция являются фактически чистыми.

[0054] Выражение "субъект" относится к любому животному (например, млекопитающему), в том числе без ограничения людям, отличным от человека приматам, грызунам и т. п., которые будут реципиентами конкретного лечения. Как правило, выражения "субъект" и "пациент" можно использовать взаимозаменяемо в отношении субъекта-человека.

[0055] Выражение "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который пребывает в такой форме, которая обеспечивает эффективность биологической активности активного ингредиента (например, раскрытого в данном документе соединения-конъюгата), и который не содержит дополнительных компонентов, которые неприемлемо токсичны для субъекта, которому будут вводить композицию. Такая композиция может содержать один или несколько фармацевтически приемлемых наполнителей. Такая композиция может быть стерильной.

[0056] "Эффективное количество" раскрытого в данном документе соединения-конъюгата представляет собой количество, достаточное для осуществления конкретно установленной цели. "Эффективное количество" в отношении установленной цели можно определить опытным путем и стандартным способом.

[0057] Выражение "терапевтически эффективное количество" относится к количеству

раскрытого в данном документе соединения-конъюгата или другого лекарственного средства, эффективного для "лечения" заболевания или нарушения у субъекта или млекопитающего.

5 [0058] Слово "метка", при использовании в данном документе, относится к выявляемому соединению или композиции, которая конъюгирована прямо или опосредованно с раскрытым в данном документе сконструированным с цистеином антителом или его областью с тем, чтобы получить "меченое" соединение-конъюгат. Метка может быть выявляемой сама по себе (например, радиоизотопные метки или флуоресцентные метки) или, в случае ферментной метки, может катализировать
10 химическое превращение субстратного соединения или композиции, которое является выявляемым.

[0059] Такие выражения как "осуществление лечения", или "лечение", или "лечить" относится как к (1) терапевтическим мерам, с помощью которых излечивают, замедляют, ослабляют симптомы диагностированного патологического состояния или расстройства
15 и/или останавливают его прогрессирование, так и к (2) профилактическим или предупреждающим мерам, с помощью которых предупреждают и/или замедляют развитие патологического состояния или нарушения, на которое осуществляют нацеливание. Таким образом, к нуждающимся в лечении относят тех, у кого уже есть нарушение; тех, кто предрасположен иметь нарушение; и тех, у кого нужно предупредить
20 развитие нарушения. В некоторых аспектах субъекта успешно "лечат" от заболевания или состояния, например, рака, в соответствии со способами по настоящему раскрытию, если пациент характеризуется, например, общей, частичной или временной ремиссией заболевания или состояния, например, определенного типа рака.

[0060] Выражения "рак", "опухоль", "раковый" и "злокачественный" относятся к физиологическому состоянию у млекопитающих, которое, как правило, характеризуется неконтролируемым клеточным ростом, или описывают его. Примеры типов рака
25 включают без ограничения карциному, в том числе аденокарциному, формы лимфомы, формы бластомы, формы меланомы, формы саркомы и формы лейкоза. Более конкретно примеры таких типов рака включают в себя плоскоклеточный рак, мелкоклеточный
30 рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, рак желудочно-кишечного тракта, лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому, рак поджелудочной железы, глиобластому, глиому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, например, печеночную карциному и гепатому, рак мочевого пузыря, рак молочной железы (в том числе гормонально опосредованный рак молочной железы, см., например, Innes *et al.* (2006) Br. J. Cancer 94:
35 1057-1065), рак толстой кишки, колоректальный рак, карциному эндометрия, миелому (например, множественную миелому), карциному слюнных желез, рак почки, например, почечно-клеточную карциному и опухоль Вильмса, базальноклеточную карциному, меланому, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, рак яичка, рак пищевода, различные типы рака головы и шеи и типы рака муцинозного
40 происхождения, например, муцинозный рак яичников, холангиокарциному (печени) и папиллярную карциному почки.

[0061] Под "аутоиммунным заболеванием" в данном документе подразумевается заболевание или нарушение, возникающее из собственных тканей или органов индивида и направленное против них, или его коагрегация или проявление, или возникающее в
45 результате этого состояние. При многих из этих аутоиммунных и воспалительных нарушений могут иметь место ряд клинических и лабораторных маркеров, в том числе без ограничения гипергаммаглобулинемия, высокие уровни антител, отложения комплексов антиген-антитело в тканях, положительный результат от схем лечения

кортикостероидами или иммунодепрессантами и агрегаты лимфатических клеток в пораженных тканях. Не вдаваясь в какую-либо теорию, касающуюся опосредованного В-клетками аутоиммунного заболевания, полагают, что В-клетки проявляют патогенный эффект при аутоиммунных заболеваниях человека посредством множества путей с разным механизмом действия, включая выработку аутоантител, образование иммунокомплексов, активацию дендритных и Т-клеток, синтез цитокинов, прямое высвобождение хемокинов и обеспечение очага для эктопического неоплимогенеза. Каждый из этих путей может участвовать в патологии аутоиммунных заболеваний в разной степени. Аутоиммунное заболевание может представлять собой орган-специфичное заболевание (т. е. иммунный ответ специфично направлен на систему органов, такую как эндокринную систему, кроветворную систему, кожу, сердечно-легочную систему, желудочно-кишечный тракт и печеночную систему, почечную систему, щитовидную железу, уши, нервно-мышечную систему, центральную нервную систему и т. д.) или системное заболевание, которое может оказывать влияние на множество систем органов (например, системная красная волчанка (SLE), ревматоидный артрит, полимиозит и т. д.)

[0062] "Полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота", используемые в данном документе взаимозаменяемо, относится к полимерам из нуклеотидов любой длины и включает ДНК и РНК. Нуклеотиды могут представлять собой дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания, и/или их аналоги, или любой субстрат, который можно встроить в полимер посредством ДНК- или РНК-полимеразы. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. Предыдущее описание применимо ко всем указанным в данном документе полинуклеотидам, в том числе РНК и ДНК.

[0063] Выражение "вектор" означает конструкцию, способную доставлять, а в некоторых аспектах экспрессировать, один или несколько представляющих интерес ген(генов) или последовательность(последовательностей) в клетку-хозяин. Примеры векторов включают без ограничения вирусные векторы, векторы экспрессии "голой" ДНК или РНК, плазмиды, космиды или фаговые векторы, векторы экспрессии ДНК или РНК, ассоциированные с катионными конденсирующими средствами, векторы экспрессии ДНК или РНК, инкапсулированные в липосомы, и некоторые эукариотические клетки, такие как клетки-продуценты.

[0064] Выражения "полипептид", "пептид" и "белок" используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров из аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, может содержать модифицированные аминокислоты и может быть разделен на аминокислотами. Выражения также охватывают полимер из аминокислот, который был модифицирован в естественных условиях или посредством вмешательства; например, образованием дисульфидной связи, гликозилированием, липидизацией, ацетилизацией, фосфорилированием или любой другой манипуляцией или модификацией, такой как конъюгирование с метящим компонентом. В данное определение также включены, например, полипептиды, содержащие один или несколько аналогов аминокислоты (в том числе, например, не встречающиеся в природе аминокислоты и т. п.), а также другие модификации, известные из уровня техники. Следует понимать, что поскольку полипептиды согласно настоящему раскрытию исходят из антител, в некоторых аспектах данные полипептиды могут встречаться в виде одиночных цепей или объединенных цепей.

[0065] "Рекомбинантный" полипептид или белок относится к полипептиду или белку, полученному посредством технологии рекомбинантных ДНК. Полученные

рекомбинантным путем полипептиды и белки, экспрессирующиеся в сконструированных клетках-хозяевах, считаются выделенными для цели настоящего раскрытия, также как и нативные или рекомбинантные полипептиды, разделенные, фракционированные или частично или в значительной степени очищенные с помощью любой подходящей методики. Раскрытые в данном документе полипептиды можно получить рекомбинантным путем при помощи известных из уровня техники способов. Альтернативно, раскрытые в данном документе белки и пептиды можно синтезировать химическим путем.

[0066] Выражение "аминокислотная замена" относится к замене остатка аминокислоты в исходной последовательности остатком другой аминокислоты. Аминокислоту можно заменить в исходной последовательности, например, посредством химического синтеза пептида или рекомбинантных способов, известных из уровня техники. Соответственно, ссылки на "замена в положении X" или "замена в положении X" относятся к замене аминокислоты, находящейся в положении X, альтернативным аминокислотным остатком. Структуры замены можно описать в соответствии со схемой АХУ, где А представляет собой однобуквенный код, соответствующий аминокислоте, присутствующей в естественных условиях в положении X, и А представляет собой замещающий аминокислотный остаток. Соответственно, L234F будет обозначать замену аминокислоты лейцин (L) в положении 234 фенилаланином (F).

[0067] Выражение "вставка аминокислоты" относится к введению нового аминокислотного остатка между двумя аминокислотными остатками, находящимися в исходной последовательности. Аминокислоту можно вставить в исходную последовательность, например, посредством химического синтеза пептида или рекомбинантных способов, известных из уровня техники. Соответственно, используемая в данном документе фраза "вставка между положениями X и Y", где X и Y соответствуют положениям аминокислот (например, вставка аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240), относится к вставке аминокислоты между положениями X и Y, а также к вставке в последовательность нуклеиновой кислоты кодона, кодирующей аминокислоту, между кодонами, кодирующими аминокислоты в положениях X и Y. Структуры вставки можно описать в соответствии со схемой АХ-ins, где А представляет собой однобуквенный код, соответствующий представляющей интерес аминокислоте, и X представляет собой предыдущее вставке положение. Соответственно, С239ins будет обозначать вставку аминокислоты цистеина (С) после положения 239 (т. е. вставку между положениями 239 и 240). С239ins может также обозначаться в данном документе более кратким сокращением "239ins".

[0068] Выражения "сконструированный цистеин" или "цистеин, сконструированный в положении ..." или его грамматические варианты относятся к аминокислоте цистеину (С), которую сконструировали в антитело или часть антитела (например, Fc-домен или его область) и которая имеет тиольную функциональную группу (-SH).

40 II. Соединения-конъюгаты, содержащие сконструированные остатки цистеина

[0069] Настоящее раскрытие предусматривает соединения-конъюгаты, содержащие сконструированное с цистеином антитело или Fc-гибридный белок и по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, где (i) Fc-домен антитела или его Fc-гибридного белка содержит по меньшей мере одну сконструированную аминокислоту цистеин, выбранную из аминокислоты цистеина, являющейся результатом замен на цистеин в аминокислотных положениях 241, 243, 251, 253, 258, 264, 269, 271, 272, 274, 280, 281, 285, 288, 291, 293, 294, 296, 301, 307, 309, 311, 318, 329, 340, 341, 345, 357, 385, 386, 387, 401, 402, 411, 417, 433, 435 или 439, вставки аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240 и их

комбинаций, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, VA), и (ii) где по меньшей мере один гетерологичный фрагмент конъюгирован с одним из сконструированных остатков цистеина.

5 [0070] В некоторых аспектах сконструированная аминокислота цистеин выбрана из аминокислоты цистеина, являющейся результатом замен на цистеин в аминокислотных положениях 241, 243, 251, 253, 258, 264, 271, 285, 288, 291, 296, 301, 307, 309, 311, 329, 385, 387, 433 или 435, вставки аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240 и их комбинаций.

10 [0071] В других аспектах сконструированная аминокислота цистеин выбрана из аминокислоты цистеина, являющейся результатом замен на цистеин в аминокислотных положениях 258 или 435, вставки аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240 и их комбинаций.

15 [0072] В некоторых аспектах раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты содержат по меньшей мере одну сконструированную аминокислоту цистеин в одном или нескольких раскрытых в данном документе положениях (например, положениях 241, 243, 251, 253, 258, 264, 269, 271, 272, 274, 280, 281, 285, 288, 291, 293, 294, 296, 301, 307, 309, 311, 318, 329, 340, 341, 345, 357, 385, 386, 387, 401, 402, 411, 417, 433, 435 или 439 или вставку аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240) и необязательно
20 содержат дополнительные сконструированные остатки цистеина в дополнительных положениях, подходящих для конструирования цистеина, описанных в уровне техники, в том числе без ограничения положениях 239, 248, 254, 273, 279, 282, 284, 286, 287, 289, 297, 298, 312, 324, 326, 330, 335, 337, 339, 350, 355, 356, 359, 360, 361, 375, 383, 384, 389, 398, 400, 413, 415, 418, 422, 440, 441, 442, 443 и 446.

25 [0073] Раскрытые в данном документе сайты, подходящие для конструирования цистеина, определяли на иллюстративном антителе 1C1. Эти положения расположены в СН2- и СН3-доменах антитела, которые являются доменами, полностью консервативными во всех видах антител. Эти сайты должны быть широко применимыми
30 к другим антителам без дополнительной необходимости в разработке структуры или знания специфических структур антитела и без нарушения антигенсвязывающих свойств, присущих переменным доменам антитела.

[0074] В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит (i) сконструированную аминокислоту цистеин в аминокислотном положении 241 и (ii) вторую сконструированную аминокислоту цистеин в аминокислотном положении 243, 251, 253,
35 258, 264, 269, 271, 272, 274, 280, 281, 285, 288, 291, 293, 294, 296, 301, 307, 309, 311, 318, 329, 340, 341, 345, 357, 385, 386, 387, 401, 402, 411, 417, 433, 435 или 439 или вставку аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240. В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит сконструированную аминокислоту цистеин в аминокислотном положении 243 и вторую сконструированную аминокислоту цистеин
40 в аминокислотном положении 241, 251, 253, 258, 264, 269, 271, 272, 274, 280, 281, 285, 288, 291, 293, 294, 296, 301, 307, 309, 311, 318, 329, 340, 341, 345, 357, 385, 386, 387, 401, 402, 411, 417, 433, 435 или 439 или вставку аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240. В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит (i) сконструированную аминокислоту цистеин в аминокислотном положении 251 и (ii) вторую
45 сконструированную аминокислоту цистеин в аминокислотном положении 241, 243, 253, 258, 264, 269, 271, 272, 274, 280, 281, 285, 288, 291, 293, 294, 296, 301, 307, 309, 311, 318, 329, 340, 341, 345, 357, 385, 386, 387, 401, 402, 411, 417, 433, 435 или 439 или вставку аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240. В некоторых аспектах

аминокислоту цистеин в аминокислотном положении 433 и (ii) вторую сконструированную аминокислоту цистеин в аминокислотном положении 241, 243, 251, 253, 258, 264, 269, 271, 272, 274, 280, 281, 285, 288, 291, 293, 294, 296, 301, 307, 309, 311, 318, 329, 340, 341, 345, 357, 385, 386, 387, 401, 402, 411, 417, 435 или 439 или вставку аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240. В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит (i) сконструированную аминокислоту цистеин в аминокислотном положении 435 и (ii) вторую сконструированную аминокислоту цистеин в аминокислотном положении 241, 243, 251, 253, 258, 264, 269, 271, 272, 274, 280, 281, 285, 288, 291, 293, 294, 296, 301, 307, 309, 311, 318, 329, 340, 341, 345, 357, 385, 386, 387, 401, 402, 411, 417, 433 или 439 или вставку аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240.

[0092] В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит (i) сконструированную аминокислоту цистеин в аминокислотном положении 439 и (ii) вторую сконструированную аминокислоту цистеин в аминокислотном положении 241, 243, 251, 253, 258, 264, 269, 271, 272, 274, 280, 281, 285, 288, 291, 293, 294, 296, 301, 307, 309, 311, 318, 329, 340, 341, 345, 357, 385, 386, 387, 401, 402, 411, 417, 433 или 435 или вставку аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240. В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит (i) сконструированную аминокислоту цистеин, вставленную между положениями 239 и 240 и (ii) вторую сконструированную аминокислоту цистеин в аминокислотном положении 241, 243, 251, 253, 258, 264, 269, 271, 272, 274, 280, 281, 285, 288, 291, 293, 294, 296, 301, 307, 309, 311, 318, 329, 340, 341, 345, 357, 385, 386, 387, 401, 402, 411, 417, 433, 435 или 439.

[0093] В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит по меньшей мере цистеин, сконструированный в СН₂- и/или СН₃-домене Fc-домена. В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит

- (i) сконструированную аминокислоту цистеин в СН₂-домене, или
 - (ii) сконструированную аминокислоту цистеин в СН₃-домене, или
 - (iii) более одной сконструированной аминокислоты цистеин в СН₂-домене, или
 - (iv) более одной сконструированной аминокислоты цистеин в СН₃-домене, или
 - (v) сконструированную аминокислоту цистеин в СН₂-домене и сконструированную аминокислоту цистеин в СН₃-домене, или
 - (vi) сконструированную аминокислоту цистеин в СН₂-домене и более одной сконструированной аминокислоты цистеин в СН₃-домене, или
 - (vii) более одной сконструированной аминокислоты цистеин в СН₂-домене и сконструированную аминокислоту цистеин в СН₃-домене, или
 - (viii) более одной сконструированной аминокислоты цистеин в СН₂-домене и более одной сконструированной аминокислоты цистеин в СН₃-домене,
- где сконструированные аминокислоты цистеин выбраны из:

(i) аминокислоты цистеина, являющейся результатом замен на цистеин в аминокислотных положениях 241, 243, 251, 253, 258, 264, 269, 271, 272, 274, 280, 281, 285, 288, 291, 293, 294, 296, 301, 307, 309, 311, 318, 329, 340, 341, 345, 357, 385, 386, 387, 401, 402, 411, 417, 433, 435 или 439, являющейся результатом вставки аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240; или

(ii) аминокислоты цистеина, являющейся результатом замен в аминокислотных положениях 241, 243, 251, 253, 258, 264, 271, 285, 288, 291, 296, 301, 307, 309, 311, 329, 385, 387, 433 или 435, являющейся результатом вставки аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240; или

(iii) аминокислоты цистеина, являющейся результатом замен в аминокислотных

положениях 258 или 435 или являющейся результатом вставки аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240.

[0094] В некоторых аспектах такие более одной сконструированных аминокислот цистеина представляют собой две, три, четыре или пять сконструированных аминокислот цистеина. В некоторых аспектах сконструированные аминокислоты цистеин в СН₂-домене расположены в положениях 241, 243, 251, 253, 258, 264, 269, 271, 272, 274, 280, 281, 285, 288, 291, 293, 294, 296, 301, 307, 309, 311, 318, 329, 340 или вставлены между положениями 239 и 240. В некоторых аспектах сконструированные аминокислоты цистеин в СН₂-домене расположены в положениях 241, 243, 251, 253, 258, 264, 271, 285, 288, 291, 296, 301, 307, 309, 311, 329 или вставлены между положениями 239 и 240. В некоторых аспектах сконструированные аминокислоты цистеин в СН₂-домене расположены в положениях 258 или вставлены между положениями 239 и 240. В некоторых аспектах сконструированные аминокислоты цистеин в СН₃-домене расположены в положениях 341, 345, 357, 385, 386, 387, 401, 402, 411, 417, 433, 435 или 439. В некоторых аспектах сконструированные аминокислоты цистеин в СН₃-домене расположены в положениях 385, 387, 433 или 435. В некоторых аспектах сконструированная аминокислота цистеин в СН₃-домене расположена в положении 435.

[0095] В некоторых аспектах раскрытое в данном документе соединение-конъюгат содержит аминокислотную замену на цистеин, выбранную из группы, состоящей из F241C, F243C, L251C, I253C, S254C, E258C, V264C, P271C, E272C, K274C, Q274C, D280C, G281C, H285C, K288C, P291C, E293C, E294C, Y296C, F296C, R301C, T307C, L309C, V309C, Q311C, E318C, P329C, K340C, G341C, E345C, E357C, G385C, Q386C, P387C, D401C, G402C, T411C, W417C, H433C, H435C, R435C, K439C, вставку аминокислоты цистеин между S239 и V240 и их комбинации.

[0096] В некоторых аспектах раскрытое в данном документе соединение-конъюгат содержит аминокислотную замену на цистеин, выбранную из группы, состоящей из F241C, F243C, L251C, I253C, E258C, V264C, P271C, H285C, K288C, P291C, Y296C, F296C, R301C, T307C, L309C, V309C, Q311C, P329C, G385C, P387C, H433C, H435C, аминокислотную вставку цистеина между S239 и V240 и их комбинации.

[0097] В некоторых аспектах раскрытое в данном документе соединение-конъюгат содержит Fc-домен, содержащий по меньшей мере один сконструированный цистеин в СН₂-домене, выбранный из аминокислоты цистеина, являющейся результатом замен F241C, F243C, L251C, I253C, S254C, E258C, V264C, P271C, E272C, K274C, Q274C, D280C, G281C, H285C, K288C, P291C, E293C, E294C, Y296C, R301C, T307C, L309C, V309C, Q311C, E318C, P329C, K340C, вставки аминокислоты цистеина между S239 и V240 и их комбинаций.

[0098] В некоторых аспектах раскрытое в данном документе соединение-конъюгат содержит Fc-домен, содержащий по меньшей мере один сконструированный цистеин в СН₃-домене, выбранный из аминокислотных замен G341C, E345C, E357C, G385C, Q386C, P387C, D401C, G402C, T411C, W417C, H433C, H435C, R435C, K439C и их комбинаций.

[0099] В некоторых аспектах раскрытое в данном документе соединение-конъюгат содержит Fc-домен, содержащий по меньшей мере один сконструированный цистеин в СН₂-домене, выбранный из аминокислотных замен F241C, F243C, L251C, I253C, E258C, V264C, P271C, H285C, K288C, P291C, Y296C, R301C, T307C, L309C, Q311C, P329C, аминокислотной вставки цистеина между S239 и V240 и их комбинаций. В некоторых аспектах раскрытое в данном документе соединение-конъюгат содержит Fc-домен, содержащий по меньшей мере один сконструированный цистеин в СН₃-домене,

выбранный из аминокислотных замен G385C, P387C, H433C, H435C и их комбинаций.

[0100] В конкретных аспектах раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты содержат Fc-домен, содержащий:

5 (a) цистеин (C), вставленный между серином (S), расположенным в положении 239, и валином (V), расположенным в положении 240;

(b) цистеин (C), являющийся результатом замены глутаминовой кислоты (E), расположенной в положении 258;

(c) цистеин (C), являющийся результатом замены гистидина (H), расположенного в положении 435;

10 (d) цистеин (C), являющийся результатом замены аргинина (R), расположенного в положении 435; или

(e) их комбинацию,

где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat.

15 [0101] Специалисту в данной области будет понятно, что в следствие существования аллельных вариантов, разные аминокислоты в раскрытых в данном документе положениях согласно EU можно заменить остатками цистеина. Например, в некоторых аспектах цистеином (C) можно заменить аргинин (R), расположенный в положении 435, в исходном антителе или его области, если такое исходное антитело представляет собой
20 IgG3.

[0102] В некоторых аспектах раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты содержат один сконструированный остаток цистеина, выбранный из группы, состоящей из остатков цистеина, являющихся результатом вставки в положении 241, 243, 251, 253, 258, 264, 271, 285, 288, 291, 296, 301, 307, 309, 311, 329, 385, 387, 433 или 435 или вставки
25 аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat. В некоторых аспектах раскрытое в данном документе соединение-конъюгат содержит один сконструированный остаток цистеина, выбранный из группы, состоящей из остатков цистеина, являющихся результатом вставки в положении 258, 435 или вставки
30 аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat.

[0103] В некоторых аспектах раскрытое в данном документе соединение-конъюгат содержит два сконструированных остатка цистеина, выбранных из группы, состоящей из остатков цистеина, являющихся результатом вставки в положении 241, 243, 251, 253, 258, 264, 271, 285, 288, 291, 296, 301, 307, 309, 311, 329, 385, 387, 433 или 435 или вставки
35 аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat. В некоторых аспектах раскрытое в данном документе соединение-конъюгат содержит два сконструированных остатка цистеина, выбранных из группы, состоящей из остатков цистеина, являющихся результатом вставки в положении 258, 435 или вставки
40 аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat.

[0104] В некоторых аспектах раскрытое в данном документе соединение-конъюгат содержит три сконструированных остатка цистеина, выбранных из группы, состоящей из остатков цистеина, являющихся результатом вставки в положении 241, 243, 251, 253, 258, 264, 271, 285, 288, 291, 296, 301, 307, 309, 311, 329, 385, 387, 433 или 435 или вставки
45 аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat. В некоторых

аспектах раскрытое в данном документе соединение-конъюгат содержит три сконструированных остатка цистеина, выбранных из группы, состоящей из остатков цистеина, являющихся результатом вставки в положении 258, 435 или вставки аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat.

[0105] В некоторых аспектах раскрытое в данном документе соединение-конъюгат содержит четыре сконструированных остатка цистеина, выбранных из группы, состоящей из остатков цистеина, являющихся результатом вставки в положении 241, 243, 251, 253, 258, 264, 271, 285, 288, 291, 296, 301, 307, 309, 311, 329, 385, 387, 433 или 435 или вставки аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat. В некоторых аспектах раскрытое в данном документе соединение-конъюгат содержит четыре сконструированных остатка цистеина, выбранных из группы, состоящей из остатков цистеина, являющихся результатом вставки в положении 258, 435 или вставки аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat.

[0106] В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит один сконструированный цистеин в положении 258 и второй цистеин, сконструированный в положении 435. В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит один сконструированный цистеин в положении 258 и второй цистеин, сконструированный в положении 442. В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит один сконструированный цистеин в положении 435 и второй цистеин, сконструированный в положении 442. В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит один сконструированный цистеин в положении 258 и второй цистеин, сконструированный между положениями 239 и 240. В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит один сконструированный цистеин в положении 435 и второй цистеин, сконструированный между положениями 239 и 240. В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит один сконструированный цистеин в положении 442 и второй цистеин, сконструированный между положениями 239 и 240. В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит три сконструированных остатка цистеина в положениях 258, 435 и 442. В других аспектах соединение-конъюгат содержит два сконструированных остатка цистеина в положениях 258, 435 и третий цистеин, сконструированный между положениями 239 и 240. В других аспектах соединение-конъюгат содержит два сконструированных остатка цистеина в положениях 258 и 442 и третий цистеин, сконструированный между положениями 239 и 240. В других аспектах соединение-конъюгат содержит два сконструированных остатка цистеина в положениях 435 и 442 и третий цистеин, сконструированный между положениями 239 и 240. В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит три сконструированных остатка цистеина в положениях 258, 435 и 442 и четвертый цистеин, сконструированный между положениями 239 и 240.

[0107] В некоторых определенных аспектах соединение-конъюгат содержит сконструированное с цистеином антитело, содержащее два или три сконструированных остатка цистеина, выбранных из:

(i) аминокислоты цистеина, являющейся результатом замены на цистеин в положении 258 исходного антитела и являющейся результатом вставки аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240 исходного антитела;

(ii) аминокислоты цистеина, являющейся результатом замены на цистеин в положении 289 исходного антитела и являющейся результатом вставки аминокислоты цистеина

аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240 исходного антитела; и
(xix) аминокислоты цистеина, являющейся результатом замены на цистеин в
положениях 435 и 442 исходного антитела и являющейся результатом вставки
аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240 исходного антитела;

5 где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом,
как изложено у Kabat.

[0108] Специалисту в данной области будет понятно, что в некоторых аспектах
конструирование одного остатка цистеина в определенном положении зачастую
10 приводит в результате к появлению двух остатков цистеина в таком положении в
полученном в результате антителе или Fc-гибридном белке в связи с гомодимерной
структурой молекул, из которых состоит Fc-участок. В некоторых аспектах Fc-участки
соединения-конъюгата могут быть выборочно сконструированными с помощью мутаций
для того, чтобы: стимулировать и/или поддерживать гетеродимеризацию (например,
15 химерные мутации, комплементарные мутации, мутации «замок на причале», мутации
«выступ во впадине», мутации сконструированных доменов посредством обмена нитей
(SEED) и т. д.); изменять период полувыведения (например, повышать связывание с
FcRn). Соответственно, соединение-конъюгат можно сконструировать с образованием
гетеродимера, содержащего, например, один цистеин, сконструированный в одном Fc-
20 участке или его области в определенных раскрытых в данном документе положениях
(например, цистеин в положении 258), и один цистеин, сконструированный во втором
Fc-участке или области в отличных от раскрытых в данном документе положениях
(например, сконструированный цистеин в положении 435). То же самое будет
применимым к аспектам, в которых Fc-участок содержит два, три или четыре остатка
цистеина, сконструированных в конкретных положениях, раскрытых в данном документе.
25 Подобным образом оба Fc-участка могут содержать разное количество
сконструированных остатков цистеина в конкретных положениях, раскрытых в данном
документе, например, один Fc-участок может содержать один, два, три или четыре
сконструированных остатков цистеина, в то время как второй Fc-участок может не
содержать сконструированных остатков цистеина или содержать один, два, три или
30 четыре сконструированных остатка цистеина в конкретных положениях, раскрытых в
данном документе.

[0109] Раскрытые в данном документе сконструированные остатки цистеина вводят
тиольные группы, которые можно применять для дериватизации с помощью ряда
гетерологичных молекул (например, для получения реактивов для диагностики, для
35 получения конъюгатов антитело-лекарственное средство, для добавления фрагментов,
которые могут улучшить биодоступность исходного антитела, или для добавления
разных антигенсвязывающих фрагментов с получением, например, биспецифических
антител). Соответственно, конструированием одного или нескольких остатков цистеина
в положениях согласно EU, раскрытых выше, можно получить соединения с одной или
40 несколькими гетерологичными молекулами, занимающими положения по всем
введенным тиольным группам, или соединения-конъюгаты, у которых одна или
несколько тиольных групп доступны для дополнительных конъюгирований. Таким
образом, в некоторых аспектах соединения-конъюгаты содержат по меньшей мере
одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей
45 мере пять, по меньшей мере шесть, по меньшей мере семь, по меньшей мере восемь, по
меньшей мере девять, по меньшей мере десять, по меньшей мере 11, по меньшей мере
12, по меньшей мере 13, по меньшей мере 14, по меньшей мере 15 или по меньшей мере
16 тиольных групп для цели конъюгирования с гетерологичной молекулой. В некоторых

аспектах соединения-конъюгат содержит более 16 тиольных групп с целью конъюгирования с гетерологичной молекулой.

[0110] В некоторых аспектах 1, 2, 3 или 4 аминокислот цистеина конструируют в положения согласно EU, указанные на фигурах 1 и 2. В некоторых аспектах другие
5 остатки цистеина можно сконструировать в дополнительные положения согласно EU, подходящие для конструирования цистеина, описанные в уровне техники. В некоторых аспектах другие аминокислоты можно модифицировать в дополнительных положениях согласно EU, раскрытых в уровне техники. Соответственно, в некоторых аспектах раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты дополнительно содержат по
10 меньшей мере один сконструированный остаток цистеина, выбранный из аминокислотных замен на цистеин в аминокислотных положениях 239, 248, 254, 273, 279, 282, 286, 287, 289, 297, 298, 312, 324, 326, 330, 335, 337, 339, 350, 355, 356, 359, 360, 361, 375, 383, 384, 389, 398, 400, 413, 415, 418, 422, 440, 441, 442, 443 и 446.

[0111] Любую форму антитела или его области, содержащую СН₂- и/или СН₃-домен,
15 можно конструировать, как описано в данном документе, т. е. ее можно мутировать. Например, исходную Fc-область антитела можно конструировать с образованием сконструированной с цистеином Fc-области. Подобным образом, исходное моноклональное антитело можно конструировать с цистеином, как описано в данном документе. Способы разработки, отбора и получения, раскрытые в данном документе,
20 и способы, известные из уровня техники, обеспечивают возможность получения антител с остатками цистеина, сконструированными в положениях согласно EU, раскрытыми в данном документе, и дополнительно обеспечивают соединения-конъюгаты, такие как соединения-конъюгаты в виде антитело-лекарственное средство (ADC) с молекулами лекарственного средства в обозначенных разработанных селективных сайтах.
25 Сконструированные остатки цистеина позволяют специфично конъюгировать гетерологичный фрагмент, например, фрагмент лекарственного средства, посредством тиольных реакционноспособных групп, таких как малеимид или галоацетил.

[0112] Соответственно, настоящее раскрытие предусматривает способ получения соединения-конъюгата, включающий осуществление реакции по меньшей мере одной
30 сконструированной цистеиновой группы сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка с гетерологичным фрагментом, где Fc-домен антитела или Fc-гибридного белка содержит по меньшей мере одну сконструированную аминокислоту цистеин, выбранную из аминокислоты цистеина, являющейся результатом замен на цистеин в аминокислотных положениях 241, 243, 251, 253, 258, 264, 269, 271, 272, 274,
35 280, 281, 285, 288, 291, 293, 294, 296, 301, 307, 309, 311, 318, 329, 340, 341, 345, 357, 385, 386, 387, 401, 402, 411, 417, 433, 435 или 439, вставки аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240 и их комбинаций, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat. В некоторых аспектах сконструированная аминокислота цистеин выбрана из аминокислоты цистеина,
40 являющейся результатом замен на цистеин в аминокислотных положениях 241, 243, 251, 253, 258, 264, 271, 285, 288, 291, 296, 301, 307, 309, 311, 329, 385, 387, 433 или 435, вставки аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240 и их комбинаций. В других аспектах сконструированная аминокислота цистеин выбрана из аминокислоты цистеина, являющейся результатом замен на цистеин в аминокислотных положениях
45 258 или 435, вставки аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240 и их комбинаций.

[0113] В некоторых аспектах эффективность конъюгирования по сконструированному цистеину в аминокислотном положении, выбранном из 241, 243, 251, 253, 258, 264, 269,

271, 272, 274, 280, 281, 285, 288, 291, 293, 294, 296, 301, 307, 309, 311, 318, 329, 340, 341, 345, 357, 385, 386, 387, 401, 402, 411, 417, 433, 435, 439 и вставки аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat, составляет по меньшей мере
5 приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 45%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 65%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или
10 по меньшей мере приблизительно 100% от таковой, полученной при осуществлении реакции сконструированной цистеиновой группы сравнительного сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка с гетерологичным фрагментом с аминокислотной заменой на цистеин в аминокислотном положении 289, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено
15 у Kabat.

[0114] В некоторых аспектах эффективность конъюгирования составляет по меньшей мере 50% от таковой, полученной при осуществлении реакции сконструированной цистеиновой группы сравнительного сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка с гетерологичным фрагментом с аминокислотной заменой на
20 цистеин в аминокислотном положении 289, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat. В некоторых аспектах эффективность конъюгирования составляет по меньшей мере 80% от таковой, полученной при осуществлении реакции сконструированной цистеиновой группы сравнительного сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка
25 с гетерологичным фрагментом с аминокислотной заменой на цистеин в аминокислотном положении 289, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat. В других аспектах эффективность конъюгирования составляет более 100% от таковой, полученной при осуществлении реакции сконструированной цистеиновой группы сравнительного сконструированного с
30 цистеином антитела или Fc-гибридного белка с гетерологичным фрагментом с аминокислотной заменой на цистеин в аминокислотном положении 289, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat.

[0115] В определенных аспектах раскрытые в данном документе соединения-
35 конъюгаты можно получить согласно следующему общему способу:

(i) осуществление мутагенеза, например, посредством сайт-направленного мутагенеза, по меньшей мере последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело или Fc-гибридный белок, путем

(a) замены по меньшей мере кодона в аминокислотном положении 241, 243, 251, 253,
40 258, 264, 269, 271, 272, 274, 280, 281, 285, 288, 291, 293, 294, 296, 301, 307, 309, 311, 318, 329, 340, 341, 345, 357, 385, 386, 387, 401, 402, 411, 417, 433, 435 или 439 кодоном, кодирующим аминокислоту цистеин (C), или вставки кодона, кодирующего цистеин (C), между кодонами, кодирующими аминокислоты в положениях 239 и 240, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как
45 изложено у Kabat; или

(b) замены по меньшей мере кодона в аминокислотном положении 241, 243, 251, 253, 258, 264, 271, 285, 288, 291, 296, 301, 307, 309, 311, 329, 385, 387, 433 или 435 кодоном, кодирующим аминокислоту цистеин (C), или вставки кодона, кодирующего цистеин

(C), между кодонами, кодирующими аминокислоты в положениях 239 и 240, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat; или

5 (с) замены по меньшей мере кодона в аминокислотном положении 258 или 435 кодоном, кодирующим аминокислоту цистеин (C), или вставки кодона, кодирующего цистеин (C), между кодонами, кодирующими аминокислоты в положениях 239 и 240, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat;

(ii) экспрессия сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка;
10 (iii) выделение сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка и

(iv) осуществление реакции по меньшей мере одной сконструированной цистеиновой группы сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка с гетерологичным фрагментом.

15 [0116] В определенных аспектах раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты можно получить согласно следующему общему способу:

(i) функциональное связывание последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вариабельный участок тяжелой цепи или гетерологичный белок, с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, представляющий собой Fc-участок, где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок, представляющий собой Fc-участок, содержит:

(a) по меньшей мере кодон, кодирующий цистеин в аминокислотном положении 241, 243, 251, 253, 258, 264, 269, 271, 272, 274, 280, 281, 285, 288, 291, 293, 294, 296, 301, 307, 309, 311, 318, 329, 340, 341, 345, 357, 385, 386, 387, 401, 402, 411, 417, 433, 435 или 439, или
25 вставленный между кодонами, кодирующими аминокислоты в положениях 239 и 240, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat; или

(b) по меньшей мере кодон, кодирующий цистеин в аминокислотном положении 241, 243, 251, 253, 258, 264, 271, 285, 288, 291, 296, 301, 307, 309, 311, 329, 385, 387, 433 или 435,
30 или вставленный между кодонами, кодирующими аминокислоты в положениях 239 и 240, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat; или

(с) по меньшей мере кодон, кодирующий цистеин в аминокислотном положении 258 или 435, или вставленный между кодонами, кодирующими аминокислоты в положениях
35 239 и 240, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat;

(ii) экспрессия сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка;

(iii) выделение сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка

и

40 (iv) осуществление реакции по меньшей мере одной сконструированной цистеиновой группы сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка с гетерологичным фрагментом.

[0117] В некоторых аспектах приблизительно 25%, приблизительно 30%,
приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%,
45 приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%,
приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85% или приблизительно 95% гетерологичного фрагмента, химически конъюгированного со сконструированным цистеином в аминокислотном положении, выбранном из 241, 243, 251, 253, 258, 264,

269, 271, 272, 274, 280, 281, 285, 288, 291, 293, 294, 296, 301, 307, 309, 311, 318, 329, 340, 341, 345, 357, 385, 386, 387, 401, 402, 411, 417, 433, 435, 439 и вставки аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat, остается интактным после 3 дней инкубирования в сыворотке. В некоторых аспектах по меньшей мере 70% химически конъюгированного гетерологичного фрагмента остается интактным после 3 дней инкубирования в сыворотке. В некоторых аспектах приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85% или приблизительно 95% химически конъюгированного гетерологичного фрагмента остается интактным после 7 дней инкубирования в сыворотке. В других аспектах по меньшей мере 70% химически конъюгированного гетерологичного фрагмента остается интактным после 7 дней инкубирования в сыворотке.

[0118] В некоторых аспектах приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85% или приблизительно 95% гетерологичного фрагмента, химически конъюгированного со сконструированным цистеином в аминокислотном положении, выбранном из 258, 435 и вставки аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat, остается интактным после 3 дней инкубирования в сыворотке. В некоторых аспектах по меньшей мере 70% химически конъюгированного гетерологичного фрагмента остается интактным после 3 дней инкубирования в сыворотке. В некоторых аспектах приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45%, приблизительно 50%, приблизительно 55%, приблизительно 60%, приблизительно 65%, приблизительно 70%, приблизительно 75%, приблизительно 80%, приблизительно 85% или приблизительно 95% химически конъюгированного гетерологичного фрагмента остается интактным после 7 дней инкубирования в сыворотке. В других аспектах по меньшей мере 70% химически конъюгированного гетерологичного фрагмента остается интактным после 7 дней инкубирования в сыворотке.

[0119] В некоторых аспектах соединения-конъюгаты, содержащие гетерологичный фрагмент, химически конъюгированный со сконструированным цистеином в аминокислотном положении, выбранном из 241, 243, 251, 253, 258, 264, 269, 271, 272, 274, 280, 281, 285, 288, 291, 293, 294, 296, 301, 307, 309, 311, 318, 329, 340, 341, 345, 357, 385, 386, 387, 401, 402, 411, 417, 433, 435, 439 и вставки аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat, характеризуются снижением активности на менее, чем приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45% или приблизительно 50% в течение 3-дневного периода при инкубировании с сывороткой. В некоторых аспектах соединения-конъюгаты характеризуются снижением активности на менее, чем приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45% или приблизительно 50% в течение 7-дневного периода при инкубировании с сывороткой. В других аспектах соединения-конъюгаты характеризуются снижением активности на менее, чем

приблизительно 50% в течение 7-дневного периода при инкубировании с сывороткой.

[0120] В некоторых аспектах соединения-конъюгаты, содержащие гетерологичный фрагмент, химически конъюгированный со сконструированным цистеином в аминокислотном положении, выбранном из 258, 435 и вставки аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat, характеризуются снижением активности на менее, чем приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45% или приблизительно 50% в течение 3-дневного периода при инкубировании с сывороткой. В некоторых аспектах соединения-конъюгаты характеризуются снижением активности на менее, чем приблизительно 5%, приблизительно 10%, приблизительно 20%, приблизительно 25%, приблизительно 30%, приблизительно 35%, приблизительно 40%, приблизительно 45% или приблизительно 50% в течение 7-дневного периода при инкубировании с сывороткой. В других аспектах соединения-конъюгаты характеризуются снижением активности на менее, чем приблизительно 50% в течение 7-дневного периода при инкубировании с сывороткой.

[0121] В некоторых аспектах раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты содержат по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, химически конъюгированный со сконструированным цистеином. В других аспектах соединение-конъюгат содержит по меньшей мере два, по меньшей мере три или по меньшей мере 4 гетерологичных фрагмента, где по меньшей мере один гетерологичный фрагмент конъюгирован со сконструированным цистеином. В других аспектах соединение-конъюгат содержит по меньшей мере два, по меньшей мере три или по меньшей мере 4 гетерологичных фрагмента, где каждый из гетерологичных фрагментов конъюгирован со сконструированным цистеином. В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит по меньшей мере 6, 8, 10, 12, 14, 16 или более гетерологичных фрагментов, где по меньшей мере один гетерологичный фрагмент конъюгирован со сконструированным цистеином. В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит по меньшей мере 6, 8, 10, 12, 14, 16 или более гетерологичных фрагментов, где каждый из гетерологичных фрагментов конъюгирован со сконструированным цистеином. В определенных аспектах все гетерологичные фрагменты являются одинаковыми. В других аспектах по меньшей мере один гетерологичный фрагмент отличается от остальных.

[0122] В некоторых аспектах Fc-домен сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка является частью моноклонального антитела, биспецифического антитела, полиспецифического антитела, химерного антитела, человеческого антитела или гуманизированного антитела.

[0123] В некоторых аспектах Fc-домен сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка является Fc-доменом IgG или его областью. В некоторых аспектах такой Fc-домен IgG или его область имеет человеческое происхождение. В некоторых аспектах IgG является изотипом IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека или их областей. В некоторых аспектах Fc-домен сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка не содержит полноразмерного CH2. В других аспектах Fc-домен сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка не содержит полноразмерного CH3-домена и/или полноразмерного CH4-домена. В некоторых аспектах Fc-гибридный белок содержит полипептид, который опосредует связывание с мишенью. Например, Fc-гибридный белок может содержать антигенсвязывающий домен, выбранный из группы, состоящей из (a) scFv; (b) диатела; (c) Fd-области; (d) Fv-

области; (e) TANDAB®; (f) F(ab')₂-области; (g) FCAB™ и (h) F(ab)-области.

[0124] В некоторых аспектах сконструированное с цистеином антитело или Fc-гибридный белок может содержать Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, одноцепочечный Fv или scFv, связанный дисульфидной связью Fv, домен V NAR, IgNar, интраантитело, IgGΔCH2, миниантитело, F(ab')₃, тетратело, триотело, диатело, однодоменное антитело, DVD-Ig, Fcab, mAb², (scFv)₂ или scFv-Fc.

[0125] В некоторых аспектах Fc-гибридный белок содержит белковый каркас (например, каркас, полученный из тенасцина или фибронектина) или миметик антитела. В других аспектах Fc-гибридный белок содержит полипептид, выбранный из группы, состоящей из (a) лиганда, (b) фермента, (c) лигандсвязывающей части рецептора и (d) адгезивного белка.

[0126] В других аспектах Fc-домен сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка является мутированным Fc-доменом. В литературных источниках описаны многочисленные мутации в Fc-домене. Например, мутации Fc-домена описаны в публикациях PCT-заявок №№ WO2012/064733, WO2013/093809, WO2008/070593 и WO1996/014339; публикациях заявок на патенты США №№ US2007/0269369, US2007/0111260 и US2010/0297103 и патенте США № 7855275, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей их полноте. В некоторых аспектах Fc-домен сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка содержит по меньшей мере один не встречающийся в природе аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из 234D, 234E, 234N, 234Q, 234T, 234H, 234Y, 234I, 234V, 234F, 235A, 235D, 235R, 235W, 235P, 235S, 235N, 235Q, 235T, 235H, 235Y, 235I, 235V, 235F, 236E, 239A, 239D, 239E, 239N, 239Q, 239F, 239T, 239H, 239Y, 240I, 240A, 240T, 240M, 241W, 241L, 241Y, 241E, 241R, 243W, 243L, 243Y, 243R, 243Q, 244H, 245A, 247L, 247V, 247G, 251F, 252Y, 254T, 255L, 256E, 256M, 262I, 262A, 262T, 262E, 263I, 263A, 263T, 263M, 264L, 264I, 264W, 264T, 264R, 264F, 264M, 264Y, 264E, 265G, 265N, 265Q, 265Y, 265F, 265V, 265I, 265L, 265H, 265T, 266I, 266A, 266T, 266M, 267Q, 267L, 269Y, 269F, 269R, 270E, 280A, 284M, 292P, 292L, 296E, 296Q, 296D, 296N, 296S, 296T, 296L, 296I, 296H, 296G, 297S, 297D, 297E, 298H, 298I, 298T, 298F, 299I, 299L, 299A, 299S, 299V, 299H, 299F, 299E, 305I, 313F, 316D, 325Q, 325L, 325I, 325D, 325E, 325A, 325T, 325V, 325H, 327G, 327W, 327N, 327L, 328S, 328M, 328D, 328E, 328N, 328Q, 328F, 328I, 328V, 328T, 328H, 328A, 329F, 329H, 329Q, 330K, 330G, 330T, 330C, 330L, 330Y, 330V, 330I, 330F, 330R, 330H, 331G, 331A, 331L, 331M, 331F, 331W, 331K, 331Q, 331E, 331S, 331V, 331I, 331C, 331Y, 331H, 331R, 331N, 331D, 331T, 332D, 332S, 332W, 332F, 332E, 332N, 332Q, 332T, 332H, 332Y, 332A, 339T, 370E, 370N, 378D, 392T, 396L, 416G, 419H, 421K, 440Y и 443W, где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat.

[0127] В некоторых аспектах Fc-домен сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка характеризуется пониженным связыванием с Fc-рецептором для снижения цитотоксичности, например, посредством ADCC. В некоторых аспектах Fc-домен сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка характеризуется повышенным связыванием с Fc-рецептором для повышения цитотоксичности, например, посредством ADCC.

[0128] Определенные модификации могут обеспечить необходимые эффекторные функции или период полувыведения из сыворотки. Если необходимо исключить или ослабить эффекторную функцию для того, чтобы минимизировать побочные эффекты или терапевтические осложнения, можно применять определенные другие Fc-участки.

Fc-участок антител или Fc-гибридных белков можно модифицировать для повышения аффинности связывания с FcRn и, таким образом, увеличить период полувыведения из сыворотки. Соответственно, в некоторых аспектах Fc-домен сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка характеризуется пониженным связыванием с Fc-рецептором FcRn.

[0129] В некоторых аспектах Fc-домен сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка содержит остаток не встречающейся в природе аминокислоты, снижающей ADCC, в одном или нескольких положениях, выбранных из группы, состоящей из 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 251, 252, 254, 255, 256, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 279, 280, 284, 292, 296, 297, 298, 299, 305, 313, 316, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 339, 341, 343, 370, 373, 378, 392, 416, 419, 421, 440 и 443, пронумерованных согласно EU-индекса, как изложено у Kabat.

Многочисленные специфические мутации, способные снижать ADCC-активность антитела, известны из уровня техники и включают, например, 234F, 235E, 235F, 235Q (или 235Y), 239A, 332Q, 331S и их комбинации. Например, см. мутации, описанные в WO8807089, WO9958572, WO9951642, WO2012175751, WO2011149999, WO2011066501, WO2000042072, WO2011120134, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Антитела с ослабленной эффекторной функцией ADCC также включают таковые с заменами в Fc-участке одного или нескольких из остатков 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 (патент США № 6737056). Такие Fc-мутанты также включают Fc-мутанты с заменами в двух или более аминокислотных положениях 265, 269, 270, 297 и 327, в том числе Fc-мутант с заменой остатков 265 и 297 на аланин (патент США № 7332581). Необязательно, могут быть введены мутации, которые снижают как ADCC, так и CDC.

(а) Гетерологичные фрагменты

[0130] Раскрытые в данном документе сконструированные с цистеином антитела или Fc-гибридные белки можно конъюгировать с любым гетерологичным фрагментом, который может быть ковалентно присоединен к сконструированному с цистеином антителу или Fc-гибридному белку посредством реакционноспособной тиольной группы цистеина. В иллюстративном аспекте соединение-конъюгат содержит сконструированное с цистеином антитело или Fc-гибридный белок и гетерологичный фрагмент, где гетерологичный фрагмент присоединен к сконструированному с цистеином антителу или Fc-гибридному белку посредством одного или двух сконструированных остатков цистеина. В некоторых аспектах один или несколько линкеров расположены между гетерологичным фрагментом и сконструированным с цистеином антителом или Fc-гибридным белком. Соответственно, конъюгированное соединение согласно настоящему раскрытию может быть представлено формулой CEP-(L-N)_p, где CEP представляет собой сконструированный с цистеином белок (т. е. антитело или Fc-гибридный белок), L представляет собой линкер, N представляет собой гетерологичный фрагмент и p равняется 1, 2, 3 или 4. Количество гетерологичных фрагментов, которые можно конъюгировать посредством тиольной группы сконструированного цистеина со сконструированным с цистеином антителом или Fc-гибридным белком, ограничено количеством цистеиновых остатков, которые введены, как раскрыто в данном документе. Соответственно, предыдущая формула относится к соединениям-конъюгатам, где сконструированное с цистеином антитело или Fc-гибридный белок содержит 1, 2, 3 или 4 сконструированных аминокислоты цистеина.

[0131] В некоторых аспектах раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты содержат по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, конъюгированный по

одному из сконструированных остатков цистеина, где такой гетерологичный фрагмент представляет собой токсин, лекарственное средство, радионуклид, иммуномодулятор, цитокин, лимфокин, хемокин, фактор роста, фактор некроза опухоли, гормон, антагонист гормона, фермент, олигонуклеотид, ДНК, РНК, siRNA, RNAi, микроРНК, пептидо-нуклеиновую кислоту, фотоактивное терапевтическое средство, антиангиогенное средство, проапоптозное средство, не встречающуюся в природе аминокислоту, пептид, липид, углевод, каркасную молекулу, флуоресцентную метку, пептид для визуализации, биотин, средство, продлевающее период полувыведения из сыворотки, метку захвата, хелатирующее средство, твердую подложку или их комбинацию. Сконструированные остатки цистеина, раскрытые в данном документе, можно конъюгировать с любым гетерологичным фрагментом, который может ковалентно присоединяться к реакционноспособным тиольным группам цистеина (Singh et al. (2002) *Anal. Biochem.* 304:147-15; Harlow E. and Lane, D. (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Lundblad R. L. (1991) *Chemical Reagents for Protein Modification*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, Fla.).

[0132] В некоторых аспектах раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты содержат по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, конъюгированный по одному из сконструированных остатков цистеина, где такой гетерологичный фрагмент представляет собой лекарственное средство. В некоторых аспектах лекарственное средство представляет собой азотистый иприт, производное этиленмина, алкилсульфонаты, нитрозомочевину, гемцитабин, триазен, аналог фолиевой кислоты, антрациклин, таксан, ингибитор COX-2, пиримидиновый аналог, пуриновый аналог, антибиотик, ингибитор фермента, эпиподофиллотоксин, координационный комплекс платины, алкалоид барвинка, замещенную мочевину, производное метилгидразина, средство, подавляющее выработку адренкортикоидов, антагонист гормона, эндостатин, таксол, камптотецин, SN-38, доксорубин, аналог доксорубина, антиметаболит, алкилирующее средство, антимиотическое средство, антиангиогенное средство, ингибитор тирозинкиназы, ингибитор mTOR, ингибитор белков теплового шока (HSP90), протеосомальный ингибитор, ингибитор HDAC, проапоптозное средство, метотрексат, CPT-11 или их комбинацию, и где конъюгирование осуществляют по одному из сконструированных остатков цистеина. В конкретных аспектах лекарственное средство представляет собой амифостин, цисплатин, дакарбазин, дактиномицин, мехлорэтамин, стрептозоцин, циклофосфамид, кармустин, ломустин, инкапсулированный в липосомы доксорубин, гемцитабин, даунорубин, инкапсулированный в липосомы даунорубин, прокарбазин, митомицин, цитарабин, этопозид, метотрексат, 5-фторурацил, винбластин, винкристин, блеомицин, паклитаксел, доцетаксел, альдеслейкин, аспарагиназу, бусульфан, карбоплатин, кладрибин, 10-гидрокси-7-этилкамптотецин (SN38), gefitinib, дакарбазин, флосуридин, флударабин, гидроксимочевину, ифосфамид, идарубин, месну, интерферон альфа, интерферон бета, иринотекан, митоксантрон, топотекан, лейпролид, мегестрол, мелфалан, меркаптопурин, пликамицин, митоган, пэгаспаргазу, пентостатин, пипоброман, пликамицин, стрептозоцин, тамоксифен, тенипозид, тестолактон, тиогуанин, тиотепу, урациловый иприт, винорелбин, хлорамбуцил, ингибиторы ароматазы и их комбинации.

[0133] В некоторых аспектах лекарственное средство представляет собой ауристин (патенты США №№ 5635483; 5780588), например, MMAE (монометилауристин E) или MMAF (монометилауристин F). В других аспектах лекарственное средство представляет собой доластатин или пептидный аналог или производное доластатина. Было показано, что доластатин и ауристаны нарушают динамику микротрубочек,

гидролиз ГТР и деление ядер и клеток (Woyke et al., *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45:3580-3584 (2001)), а также обладают противораковой активностью (патент США № 5663149) Фрагмент лекарственного средства в виде доластатина или ауристатина можно присоединить к соединению-конъюгату посредством N- (амино) конца или C-
 5 (карбоксильного) конца пептидного фрагмента лекарственного средства (см., например, WO2002088172).

[0134] В других аспектах лекарственное средство представляет собой майтанзиноид. В некоторых аспектах майтанзиноид представляет собой N-2'-деацетил-N-2'-(3-меркапто-1-оксопролил)-майтанзин (DM1), N-2'-деацетил-N2'-(4-меркапто-1-оксопентил)-майтанзин
 10 (DM3) или N-2'-деацетил-N-2'-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)-майтанзин (DM4). Майтанзиноиды являются митотическими ингибиторами, действие которых заключается в ингибировании полимеризации тубулина. Майтанзин впервые был выделен из восточноафриканского кустарника *Maytenus serrata* (патент США № 3896111). Позднее было обнаружено, что определенные микроорганизмы также продуцируют
 15 майтанзиноиды, такие как майтанзиол и C-3 сложные эфиры майтанзиола (патент США № 4151042). Синтетический майтанзиол и его производные и аналоги раскрыты, например, в патентах США №№ 4137230, 4248870, 4256746, 4260608, 4265814, 4294757, 4307016, 4308268, 4308269, 4309428, 4313946, 4315929, 4317821, 4322348, 4331598, 4361650, 4364866, 4424219, 4450254, 4362663 и 4371533.

[0135] Фрагменты лекарственного средства в виде майтанзиноида являются перспективными фрагментами лекарственного средства для конъюгатов антитело-
 лекарственное средство в связи с тем, что они: (i) относительно доступны для получения с помощью ферментации или химической модификации, дериватизации продуктов
 ферментации, (ii) поддаются дериватизации с помощью функциональных групп,
 25 подходящих для конъюгирования посредством не содержащих дисульфидные связи линкеров с антителами, (iii) стабильны в плазме и (iv) эффективны в отношении широкого разнообразия опухолевых клеточных линий. Конъюгаты, содержащие майтанзиноиды, способы получения таковых и их терапевтическое применение раскрыты, например, в патентах США №№ 5208020, 5416064 и европейском патенте
 30 EP0425235B1; Liu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623 (1996) (описывающий иммуноконъюгаты, содержащие майтанзиноид, обозначенный DM1) и Chari *et al.*, *Cancer Research* 52:127-131 (1992).

[0136] Соединения-конъюгаты на основе майтанзиноида можно получить посредством химического связывания антитела с молекулой майтанзиноида без значительного
 35 снижения биологической активности антитела или молекулы майтанзиноида. См., например, патент США № 5208020. В среднем 3-4 молекулы майтанзиноида, конъюгированные на молекулу антитела, показали эффективность повышения цитотоксичности в отношении клеток-мишеней, не оказывая негативного влияния на функциональность или растворимость антитела, хоть и ожидается, что даже одна
 40 молекула токсин/антитело повысит цитотоксичность при применении «голового» антитела. Майтанзиноиды хорошо известны из уровня техники и могут быть синтезированы с помощью известных методик или выделены из природных источников. Подходящие майтанзиноиды раскрыты, например, в патенте США № 5208020. Иллюстративные фрагменты лекарственного средства в виде майтанзиноида включают таковые с
 45 модифицированным ароматическим кольцом, например, C-19-дехлор (патент США США № 4256746) (полученный посредством восстановления ансамитоцина P2 с помощью алюмогидрида лития); C-20-гидрокси (или C-20-деметил)+/-C-19-дехлор (патенты США №№ 4361650 и 4307016) (полученные посредством деметилирования с

использованием *Streptomyces* или *Actinomyces* или дехлорирования с использованием ЛАН) и С-20-деметокси, С-20-ацилокси (-OCOR), +/-дехлор (патент США № 4294757) (полученный посредством ацилирования с использованием хлорангидридов), а также таковые с модификациями в других положениях. Иллюстративные фрагменты лекарственного средства в виде майтанзиноида также включают таковые с такими модификациями, как С-9-SH (патент США № 4424219) (полученный посредством реакции майтанзинола с H₂S или P₂S₅); С-14-алкоксиметил(деметокси/CH₂OR) (патент США № 4331598); С-14-гидроксиметил или ацилоксиметил (CH₂OH или CH₂OAc) (патент США № 4450254) (полученный из *Nocardia*); С-15-гидрокси/ацилокси (патент США № 4364866) (полученный посредством превращения майтанзинола с помощью *Streptomyces*); С-15-метокси (патенты США №№ 4313946 и 4315929) (выделенный из *Trewia nudiflora*); С-18-N-деметил (патенты США №№ 4362663 и 4322348) (полученный посредством деметилирования майтанзинола с помощью *Streptomyces*) и 4,5-дезоксиде (патент США № 4371533) (полученный посредством восстановления майтанзинола с помощью треххлористого титана/ЛАН). Известно много положений соединений майтанзина, пригодных в качестве положения для связывания, в зависимости от типа связи. Например, для образования сложноэфирной связи подходящими являются все из положения С-3 с гидроксильной группой, положения С-14, модифицированного гидроксиметилом, положения С-15, модифицированного гидроксильной группой, и положения С-20 с гидроксильной группой.

[0137] В некоторых аспектах лекарственное средство представляет собой калихеамицин. Антибиотики калихеамицинового семейства способны образовывать двунитевые разрывы ДНК в субпиколярных концентрациях. Касательно получения конъюгатов на основе калихеамицинового семейства, см., например, патенты США №№ 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001, 5877296. Структурные аналоги калихеамицина, которые можно применять, включают без ограничения γ II, α 2I, α 3I, N-ацетил- γ II, PSAG и θ 11 (*Hinman et al.*, *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993), *Lode et al.*, *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998) и вышеупомянутые патенты США, закрепленные за American Cyanamid).

[0138] В некоторых аспектах лекарственное средство представляет собой тубулизин. Тубулизины являются представителями класса природных веществ, выделенных из видов миксобактерий (*Sasse et al.*, *J. Antibiot.* 53:879-885 (2000)). Как средства, взаимодействующие с цитоскелетом, тубулизины являются митотическими ядами, которые ингибируют полимеризацию тубулина и приводят к блокированию клеточного цикла и апоптозу (*Steinmetz et al.*, *Chem. Int. Ed.* 43:4888-4892 (2004); *Khalil et al.*, *ChemBioChem.* 7:678-683 (2006); *Kaur et al.*, *Biochem. J.* 396: 235-242 (2006)). Тубулизины являются весьма эффективными цитотоксическими молекулами, превышая в отношении ингибирования роста клеток любые подходящие с клинической точки зрения традиционные химиотерапевтические средства, например, эпотилоны, паклитаксел и винбластин. Кроме того, они эффективны в отношении клеточных линий с устойчивостью ко многим лекарственным средствам (*Domling et al.*, *Mol. Diversity* 9:141-147 (2005)). Эти соединения показали высокую цитотоксичность при тестировании на панели раковых клеточных линий со значениями IC₅₀ в узком пиколярном диапазоне, поэтому они представляют интерес в качестве противораковых терапевтических средств. См., например, WO2012019123, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Конъюгаты на основе тубулизина раскрыты, например, в патенте США № 7776814.

[0139] В некоторых аспектах лекарственное средство представляет собой пирролобензодиазепин (PBD). PBD представляют собой относительно малые молекулы, при этом некоторые из них обладают способностью распознавать и ковалентно связываться со специфичными последовательностями в малой бороздке ДНК и, следовательно, характеризуются антибиотической/противоопухолевой активностью. Ряд PBD и их производных известны из уровня техники, например, димеры PBD (например, SJG-136 или SG2000), C2-ненасыщенные димеры PBD, пирролобензодиазепиновые димеры с арильными заменами в C2 (например, SG2285), пролекарство на основе димеров PBD, активируемое гидролизом (например, SG2285), и полипиррол-PBD (например, SG2274). PBD дополнительно описаны в WO 2000/012507, WO 2007/039752, WO 2005/110423, WO 2005/085251 и WO 2005/040170, и патенте США № 7612062, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0140] В некоторых аспектах раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты содержат по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, конъюгированный по одному из сконструированных остатков цистеина, где такой гетерологичный фрагмент представляет собой токсин. В некоторых аспектах токсин включает, например, абрин, бруцин, цикутоксин, дифтерийный токсин, ботулотоксин, шига-токсин, эндотоксин, тетанотоксин, коклюшный токсин, сибиреязвенный токсин, холерный токсин, фалкаринол, альфа-токсин, гелданамицин, гелонин, лотавстралин, рицин, стрихнин, тетродотоксин, сапонин, рибонуклеазу (РНКазу), ДНКазу I, стафилококковый энтеротоксин-A, противовирусный белок лаконоса, экзотоксин синегнойной палочки, эндотоксин синегнойной палочки или их комбинацию. В других аспектах токсин включает, например, цепь A модессина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii* (тунгового дерева), диантиновые белки, белки *Phytolaca americana* (лаконоса американского) (РАPI, РАPII и РАР-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaria officinalis* (мыльнянки лекарственной), митогеллин, рестриктоцин, феномицин, неомицин, трихотецины или их комбинацию. См., например, WO1993/021232.

[0141] В некоторых аспектах раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты содержат по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, конъюгированный по одному из сконструированных остатков цистеина, где такой гетерологичный фрагмент представляет собой хелатирующее средство. В некоторых аспектах хелатирующее средство представляет собой, например, ДТРА, ЕС, DMSA, EDTA, Су-EDTA, EDTMP, DTPA, СуДТРА, Су2ДТРА, ВОРТА, ДТРА-МА, ДТРА-ВА, ДТРМР, ДОТА, ТРИТА, ТЕТА, DOTMA, ДОТА-МА, НР-ДОЗА, рNB-ДОТА, ДОТР, ДОТМР, ДОТЕР, ДОТПР, ДОТВзР, ДОТРМЕ, НЕДР, ДТТР, триамидэтиол N3S, DADS, МАМА, DADT, диаминтетратиол N2S4, дитиолбисфосфин N2P2, 6-гидразиноникотиновую кислоту, пропиленаминоксим, тетраамин, циклам или их комбинацию.

[0142] В некоторых аспектах раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты содержат по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, конъюгированный по одному из сконструированных остатков цистеина, где такой гетерологичный фрагмент представляет собой радионуклид. В некоторых аспектах радионуклид представляет собой, например, хром (^{51}Cr), кобальт (^{57}Co), фтор (^{18}F), гадолиний (^{153}Gd , ^{159}Gd), германий (^{68}Ge), гольмий (^{166}Ho), индий (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), йод (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), лантан (^{140}La), лютеций (^{177}Lu), марганец (^{54}Mn), молибден (^{99}Mo), палладий (^{103}Pd), фосфор (^{32}P), празеодим (^{142}Pr), прометий (^{149}Pm), рений (^{186}Re , ^{188}Re), родий (^{105}Rh), рутений (^{97}Ru), самарий (^{153}Sm), скандий (^{47}Sc), селен (^{75}Se), стронций (^{85}Sr), серу (^{35}S),

технеций (^{99}Tc), таллий (^{201}Tl), олово (^{113}Sn , ^{117}Sn), тритий (^3H), ксенон (^{133}Xe), иттербий (^{169}Yb , ^{175}Yb), иттрий (^{90}Y), цинк (^{65}Zn) или их комбинацию. В некоторых определенных аспектах радионуклид присоединен к соединению-конъюгату с помощью хелатирующего средства.

[0143] В некоторых аспектах раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты содержат по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, конъюгированный по одному из сконструированных остатков цистеина, где такой гетерологичный фрагмент представляет собой средство, продлевающее период полувыведения из сыворотки. В некоторых конкретных аспектах средство, продлевающее период полувыведения из сыворотки, включает, например, альбумин, альбуминсвязывающий полипептид, PAS, β -субъединицу С-концевого пептида (СТР) хорионического гонадотропина человека, полиэтиленгликоль (PEG), гидроксипропилкрахмал (HES), ХТЕН, альбуминсвязывающие малые молекулы или их комбинацию.

[0144] В некоторых аспектах раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты содержат по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, конъюгированный по одному из сконструированных остатков цистеина, где такой гетерологичный фрагмент представляет собой визуализируемую метку. Визуализируемые метки включают без ограничения хромофор, флуорофор, флуоресцентный белок, фосфоресцентный краситель, тандемный краситель, частицу, гаптен, фермент, радиоактивный изотоп или их комбинацию.

[0145] В некоторых аспектах метка для визуализации представляет собой пептид для визуализации. В некоторых аспектах пептид для визуализации обеспечивает визуализацию или определение расположения соединения-конъюгата *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* или при любой их комбинации. В некоторых аспектах пептид для визуализации представляет собой биотин-акцепторный пептид, акцепторный пептид с липоевой кислотой, флуоресцентный белок, цистеин-содержащий пептид для лигирования красителя, содержащего два атома мышьяка или для конъюгирования метастабильного технеция, пептид для конъюгирования клатратов из европия для анализов с определением расстояния на основе резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) или любую их комбинацию. В некоторых аспектах флуоресцентный белок представляет собой зеленый флуоресцентный белок (GFP), красный флуоресцентный белок (RFP), желтый флуоресцентный белок (YFP), улучшенный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), улучшенный желтый флуоресцентный белок (EYFP) или любую их комбинацию. В некоторых аспектах флуоресцентный белок представляет собой фикобилипротеин или его производное. Флуоресцентные белки, в особенности фикобилипротеин, пригодны для получения метящих реактивов на основе тандемных красителей. Эти тандемные красители содержат флуоресцентный белок и флуорофор с целью получения большего стоксового сдвига, где спектр испускания дальше смещен от длины волны спектра поглощения флуоресцентного белка. Это может быть эффективным для выявления небольшого количества мишени в образце, где испускаемый флуоресцентный свет максимально оптимизирован, другими словами, испускаемый свет повторно поглощается флуоресцентным белком в незначительном количестве или совсем не поглощается. С этой целью флуоресцентный белок и флуорофор функционируют в качестве пары для переноса энергии, при этом флуоресцентный белок испускает при длине волны, при которой флуорофор поглощает, а затем флуорофор испускает при длине волны, смещенной относительно флуоресцентных белков дальше, чем можно было бы получить с помощью только флуоресцентного белка.

Функциональная комбинация может представлять собой фикобилипротеины и

сульфородаминовые флуорофоры или сульфированные цианиновые флуорофоры, известные из уровня техники. Флуорофор в некоторых случаях функционирует в качестве донора энергии, при этом акцептором энергии является флуоресцентный белок.

5 [0146] В других аспектах краситель, содержащий два атома мышьяка, представляет собой 4',5'-бис(1,3,2-дитиоарсолан-2-ил)флуоресцеин (FIAsH). В некоторых аспектах биотин-акцепторный пептид способствует конъюгированию реактивов на основе авидина и стрептавидина. В некоторых аспектах акцепторный пептид с липоевой кислотой способствует конъюгированию зондов с реакционноспособной тиольной группой со связанной липоевой кислотой или непосредственному лигированию флуоресцентных аналогов липоевой кислоты.

10 [0147] В некоторых аспектах раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты содержат по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, конъюгированный по одному из сконструированных остатков цистеина, где такой гетерологичный фрагмент представляет собой флуоресцентную метку. В некоторых аспектах флуоресцентная метка включает краситель флуоресцеинового типа, краситель родаминового типа, краситель данзилового типа, краситель лиссаминового типа, краситель цианинового типа, краситель фикоэритринового типа, краситель типа тexasский красный или любую их комбинацию. Флуорофоры, подходящие для конъюгирования с раскрытыми в данном документе сконструированными с цистеином антителами или Fc-гибридными белками, 15 включают без ограничения пирен (в том числе любое из соответствующих производных соединений), антрацен, нафталин, акридин, стильбен, индол или бензиндол, оксазол или бензоксазол, тиазол или бензотиазол, 4-амино-7-нитробенз-2-окса-1,3-диазол (NBD), цианин (в том числе любые соответствующие соединения), карбоцианин (в том числе любые соответствующие соединения), карбостирил, порфирин, салицилат, антранилат, 20 азулен, перилен, пиридин, хинолин, бораполизаиндацен (в том числе любые соответствующие соединения), ксантен (в том числе любые соответствующие соединения), оксазин (в том числе любые соответствующие соединения) или бензоксазин, карбазин (в том числе любые соответствующие соединения), феналенон, кумарин (в том числе любые раскрытые соответствующие соединения), бензофуран (в том числе 30 любые соответствующие соединения) и бензфеналенон (в том числе любые соответствующие соединения) и их производные. В контексте данного документа оксазины включают резорфуфины (в том числе любые соответствующие соединения), аминоксазины, диаминооксазины и их бензозамещенные аналоги или любую их комбинацию.

35 [0148] В определенных аспектах флуорофоры, конъюгированные с раскрытыми в данном документе сконструированными с цистеином антителами или Fc-гибридными белками, включают ксантен (родол, родамин, флуоресцеин и их производные), кумарин, цианин, пирен, оксазин, бораполизаиндацен или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления такие флуорофоры представляют собой сульфированные ксантены, фторированные ксантены, сульфированные кумарины, фторированные кумарины, сульфированные цианины или любую их комбинацию. Также включены красители, реализуемые под торговыми марками, и, как правило, известные как Alexa Fluor®, DyLight®, Cy Dyes®, BODIPY®, Oregon Green®, Pacific Blue®, IRDyes®, FAM®, FITC® и ROX®.

45 [0149] Выбор флуорофора, присоединяемого к раскрытым в данном документе сконструированным с цистеином антителам или Fc-гибридным белкам, будет определять свойства поглощения и испускания флуоресценции соединения-конъюгата. Физические свойства флуорофорной метки, которую можно применять, включают без ограничения

спектральные характеристики (поглощение, испускание и стоксов сдвиг), интенсивность, длительность, поляризацию флуоресценции и скорость обесцвечивания или их комбинацию. Все эти физические свойства можно применять для того, чтобы отличить один флуорофор от другого, и, таким образом, способствовать мультиплексному анализу. В определенных аспектах флуорофор имеет максимум поглощения при длинах волн более 480 нм. В некоторых аспектах флуорофор поглощает при 488-514 нм или вблизи этих значений (что особенно подходит для возбуждения излучением аргонового ионного лазерного источника возбуждения) или вблизи 546 нм (что особенно подходит для возбуждения ртутной дуговой лампой). В некоторых аспектах флуорофор может испускать в NIR (ближней инфракрасной области) для применения в тканях или во всем организме. Другие необходимые свойства флуоресцентной метки могут включать клеточную проницаемость и низкую токсичность, например, если мечение антитела необходимо проводить в клетке или организме (например, живом животном). В некоторых определенных аспектах флуоресцентная метка представляет собой Alexa Fluor 488 C5-малеимид.

[0150] В некоторых аспектах раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты содержат по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, конъюгированный по одному из сконструированных остатков цистеина, где такой гетерологичный фрагмент представляет собой метку захвата. В некоторых аспектах метка захвата представляет собой биотин или His6-метку (SEQ ID NO: 1). Биотин является подходящим, поскольку он может функционировать в ферментной системе для дополнительного усиления детектируемого сигнала, и он также может функционировать в качестве метки для применения в аффинной хроматографии в целях выделения. В целях выявления можно применять конъюгат фермента, который характеризуется аффинностью к биотину, такой как авидин-HRP. Затем можно добавить субстрат пероксидазы для получения детектируемого сигнала. Помимо биотина можно применять и другие гаптены, в том числе гормоны, встречающиеся в природе и синтетические лекарственные средства, загрязнители, аллергены, эффекторные молекулы, факторы роста, хемокины, цитокины, лимфокины, аминокислоты, пептиды, промежуточные химические соединения, нуклеотиды и т. п.

[0151] В некоторых аспектах раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты содержат по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, конъюгированный по одному из сконструированных остатков цистеина, где такой гетерологичный фрагмент представляет собой фермент. Ферменты являются эффективными метками, поскольку можно получить усиление детектируемого сигнала, приводящее к повышению чувствительности анализов. Зачастую сам фермент не вызывает детектируемый ответ, а действует путем разрушения субстрата при контакте с подходящим субстратом, так что превращаемый субстрат испускает флуоресцентный, колориметрический или люминесцентный сигнал. Ферменты усиливают детектируемый сигнал, поскольку один фермент в метящем реактиве может приводить к превращению нескольких субстратов в детектируемый сигнал. Субстрат для фермента выбирают так, чтобы получить измеримый продукт, например, колориметрический, флуоресцентный или хемилюминесцентный. Такие субстраты широко применяются в данной области и известны из уровня техники.

[0152] В некоторых вариантах осуществления в комбинации колориметрического или флуорогенного субстрата и фермента применяются оксидоредуктазы, такие как пероксидаза хрена, и субстрат, такой как 3,3'-диаминобензидин (DAB) и 3-амино-9-этилкарбазол (AEC), которые дают отличительный цвет (коричневый и красный,

соответственно). Другие колориметрические субстраты оксидоредуктаз, которые дают детектируемые продукты, включают без ограничения 2,2-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновую кислоту (ABTS), о-фенилендиамин (OPD), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ), о-дианизидин, 5-аминосалициловую кислоту, 4-хлор-1-нафтол. Флуорогенные субстраты включают без ограничения гомованилиновую кислоту или 4-гидрокси-3-метоксифенилукусную кислоту, восстановленные феноксазины и восстановленные бензотиазины, в том числе реактив Amplex® Red и его варианты, и восстановленные дигидроксантены, в том числе дигидрофлуоресцеины, и дигидрородамины, в том числе дигидрородамин 123. Субстраты пероксидазы, которыми являются тирамиды, представляют уникальный класс субстратов пероксидазы, поскольку по своей природе они могут быть выявлены до действия фермента, но под действием пероксидазы "фиксируются на месте" в процессе, описанном как тирамидное усиление сигнала (TSA). Эти субстраты широко используются для мечения мишеней в образцах, которыми являются клетки, ткани или монослои, для их последующего выявления с помощью микроскопии, проточной цитометрии, оптического сканирования и флуорометрии.

[0153] Иногда в комбинации колориметрического (и в некоторых случаях флуорогенного) субстрата и фермента применяется фермент фосфатаза, такой как кислая фосфатаза, щелочная фосфатаза или рекомбинантный вариант такой фосфатазы, в комбинации с колориметрическим субстратом, таким как 5-бром-6-хлор-3-индолилфосфат (BCIP), 6-хлор-3-индолилфосфат, 5-бром-6-хлор-3-индолилфосфат, п-нитрофенилфосфат или о-нитрофенилфосфат, или с флуорогенным субстратом, таким как 4-метилумбеллиферилфосфат, 6,8-дифтор-7-гидрокси-4-метилкумаринилфосфат (DiFMUP, патент США № 5830912), флуоресцеиндифосфат, 3-О-метилфлуоресцеинфосфат, резорурфинфосфат, 9Н-(1,3-дихлор-9,9-диметилакридин-2-он-7-ил)фосфат (DDAO-фосфат) или ELF 97, ELF 39 или родственные фосфаты.

[0154] Гликозидазы, в частности, бета-галактозидаза, бета-глюкуронидаза и бета-глюкозидаза, являются дополнительными подходящими ферментами. Подходящие колориметрические субстраты включают без ограничения 5-бром-4-хлор-3-индолил-бета-D-галактопиранозид (X-gal) и подобные индолилгалактозиды, глюкозиды и глюкурониды, о-нитрофенил-бета-D-галактопиранозид (ONPG) и п-нитрофенил-бета-D-галактопиранозид. В некоторых вариантах осуществления флуорогенные субстраты включают резорурфин-бета-D-галактопиранозид, флуоресцеиндигалактозид (FDG), флуоресцеиндиглюкуронид и их структурные варианты, 4-метилумбеллиферил-бета-D-галактопиранозид, карбоксиумбеллиферил-бета-D-галактопиранозид и фторированные кумарин-бета-D-галактопиранозиды.

[0155] Дополнительные ферменты включают без ограничения гидролазы, такие как холинэстеразы и пептидазы, оксидазы, такие как глюкозооксидаза и цитохромоксидазы, и редуктазы, для которых известны подходящие субстраты.

[0156] Ферменты и их соответствующие субстраты, которые дают хемилюминесценцию, являются подходящими для некоторых анализов. Они включают без ограничения природные и рекомбинантные формы люцифераз и экворинов. Дополнительно продуктивными являются дающие хемилюминесценцию субстраты фосфатаз, гликозидаз и оксидаз, как, например, содержащие стабильные диоксетаны, люминол, изолюминол и сложные эфиры акридиния.

[0157] В некоторых аспектах раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты содержат по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, конъюгированный по одному из сконструированных остатков цистеина, где такой гетерологичный фрагмент

представляет собой нуклеиновую кислоту. Нуклеиновая кислота может быть выбрана из группы, состоящей из ДНК, РНК, короткой интерферирующей РНК (siRNA), микроРНК, шпильки или миметиков нуклеиновых кислот, таких как пептидо-
 5 нуклеиновые кислоты. В определенных аспектах конъюгированная нуклеиновая кислота состоит 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 100, по меньшей мере 200, по меньшей мере 500, по меньшей мере 1000, по меньшей мере 5000 или более пар оснований. Конъюгированная нуклеиновая кислота может быть одонитевой. В
 10 различных аспектах конъюгированная нуклеиновая кислота может быть двунитевой. В некоторых аспектах конъюгированная нуклеиновая кислота кодирует открытую рамку считывания. В некоторых аспектах открытая рамка считывания, кодируемая конъюгированной нуклеиновой кислотой, соответствует индуцирующему апоптоз белку, вирусному белку, ферменту или подавляющему рост опухоли белку. Методики доставки таких нуклеиновых кислот известны из уровня техники.

15 (b) Линкеры

[0158] В некоторых аспектах гетерологичный фрагмент конъюгирован с одним из сконструированных остатков цистеина посредством линкера. Используемое в данном документе выражение "линкер" относится к пептиду или полипептидной
 20 последовательности (например, синтетическому пептиду или полипептидной последовательности) или линкеру непептидной природы, главная функция которого заключается в соединении гетерологичного фрагмента со сконструированным с цистеином антителом или Fc-гибридным белком посредством тиольной группы сконструированного цистеина. В некоторых аспектах линкер может находиться между
 25 любыми двумя гетерологичными фрагментами или отличными от линкера элементами соединений-конъюгатов согласно настоящему раскрытию. Например, один или несколько линкеров могут находиться между сконструированным с цистеином антителом или Fc-гибридным белком и гетерологичным фрагментом или между первым гетерологичным фрагментом и вторым гетерологичным фрагментом. В некоторых
 30 аспектах два или более линкеров могут быть связаны один за другим. Если в раскрытом в данном документе соединении-конъюгате присутствуют несколько линкеров, то каждый из линкеров может быть одинаковым или разным. Как правило, линкеры обеспечивают гибкость соединению-конъюгату. Обычно линкеры не расщепляются, таким образом, в некоторых аспектах линкер представляет собой нерасщепляемый линкер. Однако в определенных вариантах осуществления такое расщепление может
 35 быть необходимым. Соответственно, в некоторых аспектах линкер может содержать один или несколько расщепляемых протеазой сайтов, которые могут быть расположены в пределах последовательности линкера или фланкировать линкер с любого конца линкерной последовательности.

[0159] В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит линкер непептидной
 40 природы. В других аспектах линкер состоит из линкера непептидной природы. В некоторых аспектах линкер непептидной природы включает, например, малеимидокапроил (MC), val-cit, MC-val-cit, MC-val-cit-PAVC, Mal-PEG2C2, Mal-PEG3C2, Mal-PEG6C2, малеимидопропаноил (MP), метоксилполиэтиленгликоль (MPEG), сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), MBS
 45 (сложный эфир м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид), 4-сукцинимидилокскарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридилдитио)толуол (SMPT), сукцинимидил-6-[3-(2-пиридилдитио)-пропионамид]гексаноат (LC-SPDP), BMPEO, SPP, сукцинимидил-4-(п-малеимидофенил)бутират (SMPB), N-сукцинимидил-S-

ацетилтиоацетат (SATA), N-сукцинимидил-(4-йодацетил)аминобензоат (SIAB) или любую их комбинацию. См., например, патент США № 7375078.

[0160] В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит пептидный линкер. В некоторых аспектах линкер состоит из пептидного линкера. В некоторых аспектах пептидный линкер содержит по меньшей мере две аминокислоты, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять, 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. В других аспектах пептидный линкер содержит по меньшей мере 200, по меньшей мере 300, по меньшей мере 400, по меньшей мере 500, по меньшей мере 600, по меньшей мере 700, по меньшей мере 800, по меньшей мере 900 или по меньшей мере 1000 аминокислот. В еще одних аспектах пептидный линкер может содержать по меньшей мере приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 или 2000 аминокислот. Пептидный линкер может содержать 1-5 аминокислот, 1-10 аминокислот, 1-20 аминокислот, 10-50 аминокислот, 50-100 аминокислот, 100-200 аминокислот, 200-300 аминокислот, 300-400 аминокислот, 400-500 аминокислот, 500-600 аминокислот, 600-700 аминокислот, 700-800 аминокислот, 800-900 аминокислот или 900-1000 аминокислот.

[0161] Примеры пептидных линкеров хорошо известны из уровня техники, например, пептидные линкеры согласно формуле $[(\text{Gly})_x\text{-Ser}_y]_z$, где x равен 1-4, y равен 0 или 1 и z равен 1-50 (SEQ ID NO: 2). В одном аспекте пептидный линкер содержит последовательность G_n , где n может равняться целому числу от 1 до 100 (SEQ ID NO: 3). В определенных аспектах последовательность пептидного линкера представляет собой GGGG (SEQ ID NO: 4). Пептидный линкер может содержать последовательность $(\text{GA})_n$ (SEQ ID NO: 5). Пептидный линкер может содержать последовательность $(\text{GGS})_n$ (SEQ ID NO: 6). В других аспектах пептидный линкер содержит последовательность $(\text{GGGS})_n$ (SEQ ID NO: 7). В еще одних аспектах пептидный линкер содержит последовательность $(\text{GGS})_n(\text{GGGS})_n$ (SEQ ID NO: 8). В этих случаях n может равняться целому числу от 1 до 100. В других случаях n может равняться целому числу от 1 до 20, т. е. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. Примеры линкеров включают без ограничения GGG, SGGSGGS (SEQ ID NO: 9), GGSGGSGGSGGSGGG (SEQ ID NO: 10), GGSGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 11), GGSGGSGGSGGSGGSGGS (SEQ ID NO: 12) или GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 13). В других аспектах линкер представляет собой поли-G последовательность $(\text{GGGG})_n$, где n может равняться целому числу от 1 до 100 (SEQ ID NO: 14).

[0162] В одном аспекте пептидный линкер является синтетическим, т. е. не встречающимся в природе. В одних аспектах пептидный линкер включает пептиды (или полипептиды) (например, встречающиеся или не встречающиеся в природе пептиды), которые содержат аминокислотную последовательность, которая связывает или генетически сливает первую линейную последовательность аминокислот со второй линейной последовательностью аминокислот, с которой она естественным образом не связана или генетически не слита в природе. Например, в одном аспекте пептидный линкер может содержать не встречающиеся в природе полипептиды, которые являются модифицированными формами встречающихся в природе полипептидов (например, содержащие мутацию, такую как вставка, замена или делеция). В другом аспекте пептидный линкер может содержать не встречающиеся в природе аминокислоты. В

другом аспекте пептидный линкер может содержать встречающиеся в природе аминокислоты, пребывающие в линейной последовательности, которая не встречается в природе. В еще одном аспекте пептидный линкер может содержать встречающуюся в природе полипептидную последовательность.

5 III. Конструирование с цистеином антител и Fc-гибридных белков

[0163] В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит сконструированное с цистеином антитело или Fc-гибридный белок, который специфично связывается по меньшей мере с одной мишенью. В некоторых аспектах сконструированное с цистеином антитело или Fc-гибридный белок может связываться с более чем одной мишенью. В 10 некоторых аспектах сконструированное с цистеином антитело сохраняет антигенсвязывающую способность аналога исходного антитела. Таким образом, раскрытое в данном документе сконструированное с цистеином антитело может быть способным к связыванию, предпочтительно специфично, с антигенами. Такие антигены включают, например, опухоль-ассоциированные антигены (ТАА), белки рецепторов 15 клеточной поверхности и другие молекулы клеточной поверхности, трансмембранные белки, сигнальные белки, факторы, регулирующие выживание клеток, факторы, регулирующие пролиферацию клеток, молекулы, ассоциированные с развитием или дифференцировкой тканей (например, с известным или предположительным функциональным содействием ему), лимфокины, цитокины, молекулы, вовлеченные в 20 регуляцию клеточного цикла, молекулы, вовлеченные в образование и развитие сосудов, и молекулы, ассоциированные с развитием кровеносных сосудов (например, с известным или предположительным функциональным содействием ему). Опухоль-ассоциированный антиген может представлять собой фактор кластера дифференцировки (т. е. CD-белок). Антиген, с которым сконструированное с цистеином антитело способно связываться, 25 может быть представителем подмножества одной из вышеупомянутых категорий.

[0164] В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит сконструированное с цистеином антитело или Fc-гибридный белок, который специфично связывается по меньшей мере с одной мишенью, и по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, который специфично связывается по меньшей мере с одной второй мишенью. В 30 некоторых аспектах сконструированное с цистеином антитело или Fc-гибридный белок и гетерологичный фрагмент могут связываться с одной и той же мишенью. В других аспектах сконструированное с цистеином антитело или Fc-гибридный белок и гетерологичный фрагмент могут связываться с разными мишенями. Таким образом, в некоторых аспектах соединения-конъюгаты являются моноспецифическими. В других 35 аспектах соединения-конъюгаты являются биспецифическими, триспецифическими, тетраспецифическими и т. д. В других аспектах соединения-конъюгаты являются полиспецифическими. В некоторых аспектах соединения-конъюгаты являются моновалентными, бивалентными, тривалентными, тетравалентными и т. д. В еще одних аспектах соединения-конъюгаты являются поливалентными. В конкретных аспектах сконструированные с цистеином антитела и Fc-гибридные белки и полученные из них 40 соединения-конъюгаты являются бивалентными, например, сконструированные на основе антитела соединения содержат два разных специфичных антигенсвязывающих сайтов или сконструированный Fc-гибридный белок содержит два домена связывания разных мишеней. В конкретных аспектах сконструированные с цистеином антитела 45 или его области и полученные из них соединения-конъюгаты являются биспецифическими, т. е. молекула может специфично связываться с двумя разными антигенами (например, двумя разными эпитопами на одной и той же или разных молекулах). В некоторых конкретных аспектах сконструированные с цистеином антитела

или их области и полученные из них соединения-конъюгаты являются биспецифическими и тетравалентными, например, полученные из исходного антитела, содержащие четыре антигенсвязывающих сайта, которые способны к связыванию с двумя разными антигенами (например, двумя разными эпитопами на одной и той же или разных молекулах).

[0165] Настоящее раскрытие предусматривает анализ для выявления связывания раскрытого в данном документе сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка или раскрытого в данном документе соединения-конъюгата с клеткой-мишенью, включающий:

(a) воздействие на клетки сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка или соединения-конъюгата и

(b) определение степени связывания сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка или соединения-конъюгата с клетками-мишенями.

[0166] Способность связывания раскрытого в данном документе сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка или полученного из них соединения-конъюгата, раскрытого в данном документе, с мишенью можно определить экспериментально с применением любого подходящего хорошо известного из уровня техники способа, например, проточной цитометрии, твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), или радиоиммуноанализа (RIA), или анализа кинетики (например, анализ BIACORE™). С легкостью можно также применять анализы в формате прямого связывания, а также анализы в формате конкурентного связывания. См., например, Berzofsky *et al.*, "Antibody-Antigen Interactions," In *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, N.Y. (1984); Kuby, *Immunology*, W. H. Freeman and Company: New York, N.Y. (1992) и описанные в данном документе способы. Измеряемая аффинность взаимодействия конкретного сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка или полученного из них соединения-конъюгата, раскрытого в данном документе, с мишенью может варьировать в случае измерения в разных условиях (например, концентрация солей, pH, температура и т. д.).

[0167] Практически любая молекула может быть специфично связанной соединением-конъюгатом, содержащим сконструированное с цистеином антитело или Fc-гибридный белок и гетерологичный фрагмент, и/или встроенной в него. В некоторых аспектах представители (рецептор или лиганд) суперсемейства TNF, а также субъединицы, домены, мотивы и эпитопы белков, принадлежащих к этому семейству белков, специфично связываются соединением-конъюгатом и/или встраиваются в него. Суперсемейство TNF включает многочисленные молекулы, в том числе без ограничения фактор некроза опухоли альфа ("TNF-альфа"), фактор некроза опухоли бета ("TNF-бета"), лимфотоксин-альфа ("LT-альфа"), лиганд CD30, лиганд CD27, лиганд CD40, лиганд 4-1 BB, лиганд Apo-1 (также называемый Fas-лигандом или лигандом CD95), лиганд Apo-2 (также называемый TRAIL), лиганд Apo-3 (также называемый TWEAK), остеопротегерин (OPG), APRIL, лиганд RANK (также называемый TRANCE), TALL-1 (также называемый BlyS, BAFF или THANK), DR4, DR5 (также называемый Apo-2, TRAIL-R2, TR6, Tango-63, hAPO8, TRICK2 или KILLER), DR6, DcR1, DcR2, DcR3 (также называемый TR6 или M68), CAR1, HVEM (также называемый ATAR или TR2), GITR, ZTNFR-5, NTR-1, TNFL1, CD30, LTβr, 4-1BB-рецептор и TR9.

[0168] В некоторых аспектах соединение-конъюгат специфично связывает и/или встраивает в себя одну или несколько молекул, а также субъединиц, доменов, мотивов и эпитопов молекул, выбранных из группы, состоящей из 5T4, ABL, ABCF1, ACVR1, ACVR1B, ACVR2, ACVR2B, ACVRL1, ADORA2A, аггрекана, AGR2, AICDA, AIF1, AIGI,

АКАР1, АКАР2, АМН, АМНР2, ANGPT1, ANGPT2, ANGPTL3, ANGPTL4, ANPEP, APC, АРОС1, AR, ароматазы, АТХ, АХ1, AZGP1 (цинк-а-гликопротеина), В7.1, В7.2, В7-Н1, ВAD, ВАFF, ВAG1, ВАII, ВСR, ВСL2, ВСL6, ВDNF, ВLNK, ВLR1 (MDR15), ВlyS, ВMP1, ВMP2, ВMP3В (GDFIO), ВMP4, ВMP6, ВMP8, ВMPR1А, ВMPR1В, ВMPR2, ВРАG1
 5 (плектина), ВRCA1, С19orf10 (IL27w), С3, С4А, С5, С5R1, САНТ1, САСР1, САСР4, СAV1, ССВР2 (D6/JAB61), ССL1 (1-309), ССL11 (эотаксина), ССL13 (MCP-4), ССL15 (MIP-Id), ССL16 (mcc-4), ССL17 (TARC), ССL18 (PARC), ССL19 (MIP-3b), ССL2 (MCP-1), МСAF, ССL20 (MIP-3a), ССL21 (MEP-2), SLC, exodus-2, ССL22(MDC/STC-I), ССL23 (MPlF-I), ССL24 (MPlF-2/эотаксина-2), ССL25 (TECK), ССL26 (эотаксина-3), ССL27 (СТАСК/ILC),
 10 ССL28, ССL3 (MIP-1a), ССL4 (MIP-1b), ССL5 (RANTES), ССL7 (MCP-3), ССL8 (mcp-2), ССNA1, ССNA2, ССND1, ССNE1, ССNE2, ССR1 (СКR1/НМ145), ССR2 (mcp-IRB/RA), ССR3 (СКR3/СМКВR3), ССR4, ССR5(СМКВR5/ChemR13), ССR6 (СМКВR6/СКR-L3/STRL22/DRY6), ССR7 (СКR7/ЕВ11), ССR8 (СМКВR8/ТЕР1/СКR-L1), ССR9 (GPR-9-6), ССRL1 (VSHK1), ССRL2 (L-CCR),CD164, CD19, CDIC, CD20, CD200, CD22, CD24, CD28,
 15 CD3, CD33, CD35, CD37, CD38, CD3E, CD3G, CD3Z, CD4, CD40, CD40L, CD44, CD45RB, CD52, CD69, CD72, CD74, CD79A, CD79B, CD8, CD80, CD81, CD83, CD86, CD137, CDH1 (Е-кадгерина), CDH10, CDH12, CDH13, CDH18,CDH19, CDH20, CDH5, CDH7, CDH8, CDH9, CDK2, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7,CDK9, CDKN1A (p21Wap1/Cip1),CDKN1B (p27Kip1), CDKN1C, CDKN2A (p161NK4a), CDKN2B, CDKN2C, CDKN3, СЕВРВ, СЕР1,
 20 СHGA, СHGB, хитиназы, СHST10, СКLFSF2, СКLFSF3, СКLFSF4, СКLFSF5, СКLFSF6, СКLFSF7, СКLFSF8, CLDN3, CLDN7 (клаудина-7), CLN3, CLU (кластерина), СМКLР1, СМКOR1 (RDCI), CNR1, COL18A1, COLIA1, COL4A3, COL6A1, CR2, Срипто, СRР, СSF1 (M-CSF), СSF2 (GM-CSF), СSF3 (GCSF), СTLA4, СTL8, СТNNB1 (b-катенина), СТСВ (катепсина В), СХ3СL1 (SCYD1), СХ3СR1 (V28), СХСL1 (GRO1), СХСL10 (IP-10), СХСL11 (I-TAC/IP-9), СХСL12 (SDF1), СХСL13, СХСL14, СХСL16, СХСL2 (GRO2), СХСL3 (GRO3),
 25 СХСL5 (ENA-78/LIX), СХСL6 (GCP-2), СХСL9 (MIG), СХСR3 (GPR9/СКR-L2), СХСR4, СХСR6 (TYMSTR/STRL33/Bonzo), СYB5, СYС1, СYSLTR1, DAB2IP, DES, DKFZp451J0118, DNCL1, DPP4, E2F1, Engel, Edge, Fennel, EFNA3, EFNB2, EGF, EGFR, ELAC2, ENG, Enola, ENO2, ENO3, ЕРНА1, ЕРНА2, ЕРНА3, ЕРНА4, ЕРНА5, ЕРНА6, ЕРНА7, ЕРНА8, ЕРНА9,
 30 ЕРНА10, ЕРНВ1, ЕРНВ2, ЕРНВ3, ЕРНВ4, ЕРНВ5, ЕРНВ6, ЕPHRIN-A1, ЕPHRIN-A2, ЕPHRINA3, ЕPHRIN-A4, ЕPHRIN-A5, ЕPHRIN-A6, ЕPHRIN-B1, ЕPHRIN-B2, ЕPHRIN-B3, ЕРНВ4, ЕРР, ЕRBB2 (Her-2), EREG, ERK8, эстрогенового рецептора, Earl, ESR2, F3 (TF), FADD, фарнезилтрансферазы, FasL, FASNf, FCER1A, FCER2, FCGR3A, FGF, FGF1 (aFGF), FGF10, FGF11, FGF12, FGF12B, FGF13, FGF14, FGF16, FGF17, FGF18, FGF19, FGF2 (bFGF),
 35 FGF20, FGF21, FGF22, FGF23, FGF3 (int-2), FGF4 (HST), FGF5, FGF6 (HST-2), FGF7 (KGF), FGF8, FGF9, FGFR3, FIGF (VEGFD), FIL1 (ЭПСИЛОН), FBL1 (ДЗЕТА), FLJ12584, FLJ25530, FLRT1 (фибронектина), FLT1, FLT-3, FOS, FOSLI (FRA-1), FY (DARC), GABRP (GABAa), GAGEB1, GAGEC1, GALNAC4S-6ST, GATA3, GD2, GDF5, GF11, GGT1, GM-CSF, GNAS1, GNRH1, GPR2 (CCR10), GPR31, GPR44, GPR81 (FKSG80), GRCC10 (C10),
 40 GRP, GSN (гельсолина), GSTP1, HAVCR2, HDAC, HDAC4, HDAC5, HDAC7A, HDAC9, Hedgehog, HGF, HIF1A, HIP1, гистамина и гистаминовых рецепторов, HLA-A, HLA-DRA, HM74, HMOX1, HSP90, HUMCYT2A, ICEBERG, ICOSL, ID2, IFN-a, IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, EFNA6, BFNA7, IFNB1, IFN-гамма, IFNW1, IGBP1, IGF1, IGFIR, IGF2, IGFBP2, IGFBP3, IGFBP6, DL-1, ILIO, ILIORA, ILIORB, IL-1, IL1R1 (CD121a), IL1R2 (CD121b),
 45 ILIRA, IL-2, IL2RA (CD25), IL2RB(CD122), IL2RG (CD132), IL-4, IL-4R (CD123), IL-5, IL5RA (CD125), IL3RB (CD131), IL-6, IL6RA, (CD126), IR6RB (CD130), IL-7, IL7RA (CD127), IL-8, CXCR1 (IL8RA), CXCR2, (IL8RB/CD128), IL-9, IL9R (CD129), IL-10, IL10RA (CD210), IL10RB (CDW210B), IL-11, IL11RA, IL-12, IL-12A, IL-12B, IL-12RB1, IL-12RB2, IL-13,

IL13RA1, IL13RA2, IL14, IL15, IL15RA, IL16, IL17, IL17A, IL17B, IL17C, IL17R, IL18,
 IL18BP, IL18R1, IL18RAP, IL19, IL1A, IL1B, IL1F10, IL1F5, IL1F6, IL1F7, IL1F8, DL1F9,
 IL1HY1, IL1R1, IL1R2, IL1RAP, IL1RAPL1, IL1RAPL2, IL1RL1, IL1RL2, IL1RN, IL2, IL20,
 IL20RA, IL21R, IL22, IL22R, IL22RA2, IL23, DL24, IL25, IL26, IL27, IL28A, IL28B, IL29,
 5 IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3, IL30, IL3RA, IL4, IL4R, IL6ST (гликопротеина 130), ILK, INHA,
 INHBA, INSL3, INSL4, IRAK1, IRAK2, ITGA1, ITGA2, ITGA3, ITGA6 (α6-интегрин),
 ITGAV, ITGB3, ITGB4 (1344-интегрин), JAG1, JAK1, JAK3, JTB, JUN, K6HF, KAI1, KDR,
 KITLG, KLF5 (GC-бокс BP), KLF6, KLK10, KLK12, KLK13, KLK14, KLK15, KLK3, KLK4,
 KLK5, KLK6, KLK9, KRT1, KRT19 (Кератин 19), KRT2A, KRTHB6 (специфического для
 10 волос кератин типа II), LAMA5, LEP (лептин), Lingo-p75, Lingo-Troy, LPS, LTA (TNF-
 b), LTβ, LTβ4R (GPR16), LTβ4R2, LTβR, MACMARCKS, MAG или Omgp, MAP2K7 (c-
 Jun), MCP-1, MDK, MIB1, мидкина, MIF, MISRII, MJP-2, MK, MKI67 (Ki-67), MMP2, MMP9,
 MS4A1, MSMB, MT3 (металлотрионектина-UI), mTOR, MTSS1, MUC1 (муцина), MYC,
 MYD88, NCK2, нейрокана, NFKB1, NFKB2, NGFB (NGF), NGFR, NgR-Lingo, NgRNogo66,
 15 (Nogo), NgR-p75, NgR-Troy, NMEI (NM23A), NOTCH, NOTCH1, NOX5, NPPB, NROB1,
 NROB2, NR1D1, NR1D2, NR1H2, NR1H3, NR1H4, NR1I2, NR1I3, NR2C1, NR2C2, NR2E1,
 NR2E3, NR2F1, NR2F2, NR2F6, NR3C1, NR3C2, NR4A1, NR4A2, NR4A3, NR5A1, NR5A2,
 NR6A1, NRP1, NRP2, NT5E, NTN4, ODZ1, OPRD1, P2RX7, PAP, PART1, PATE, PAWR,
 PCA3, PCDGF, PCNA, PDGFA, PDGFB, PDGFRA, PDGFRB, PECAM1, ПЭГ-аспарагиназы,
 20 PF4 (CXCL4), PGF, PGR, фосфакана, PIAS2, PI3-киназы, PIK3CG, PLAU (uPA), PLG,
 PLXDC1, PKC, PKC-β, PPBP (CXCL7), PPID, PR1, PRKCQ, PRKD1, PRL, PROC, PROK2,
 PSAP, PSCA, PTAFR, PTEN, PTGS2 (COX-2), PTN, RAC2 (P21Rac2), RANK, лиганда RANK,
 RARB, RGS1, RGS13, RGS3, RNF110 (ZNF144), Ron, ROBO2, RXR, S100A2, SCGB 1D2
 (липофилина B), SCGB2A1 (маммаглобина 2), SCGB2A2 (маммаглобина 1), SCYE1
 25 (эндотелиального активирующего моноциты цитокина), SDF2, SERPENA1, SERPINA3,
 SERPINB5 (маспин), SERPINE1 (PAI-1), SERPINF1, SHIP-1, SHIP-2, SHB1, SHB2, SHBG,
 SfcAZ, SLC2A2, SLC33A1, SLC43A1, SLIT2, SPP1, SPRR1B (Spr1), ST6GAL1, STAB1,
 STAT6, STEAP, STEAP2, TB4R2, TBX21, TCP10, TDGF1, ТЕК, TGFA, TGFB1, TGFBIII,
 TGFB2, TGFB3, TGFB1, TGFB1R1, TGFB1R2, TGFB1R3, TH1L, THBS1 (тромбоспондина-1),
 30 THBS2, THBS4, THPO, TIE (Tie-1), TIMP3, тканевого фактора, TLR10, TLR2, TLR3, TLR4,
 TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TNF, TNFα, TNFAIP2 (B94), TNFAIP3, TNFRSF1A,
 TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF21, TNFRSF5, TNFRSF6 (Fas), TNFRSF7, TNFRSF8,
 TNFRSF9, TNFRSF10 (TRAIL), TNFRSF11 (TRANCE), TNFRSF12 (APO3L), TNFRSF13 (April),
 TNFRSF13B, TNFRSF14 (HVEM-L), TNFRSF15 (VEGI), TNFRSF18, TNFRSF4 (лиганда OX40),
 35 TNFRSF5 (лиганда CD40), TNFRSF6 (FasL), TNFRSF7 (лиганда CD27), TNFRSF8 (лиганда
 CD30), TNFRSF9 (лиганда 4-1BB), TOLLIP, Toll-подобных рецепторов, TOP2A
 (топоизомеразы IIa), TP53, TPM1, TPM2, TRADD, TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4, TRAF5,
 TRAF6, TRKA, TREM1, TREM2, TRPC6, TSLP, TWEAK, тирозиназы, uPAR, VEGF, VEGFB,
 VEGFC, версикана, VHL C5, VLA-4, Wnt-1, XCL1 (лимфолактина), XCL2 (SCM-Ib), XCR1
 40 (GPR5/CCXCR1), YY1 и ZFPM2.

[0169] В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит сконструированное с
 цистеином антитело или Fc-гибридный белок или гетерологичный фрагмент, который
 специфично связывается с одной или несколькими небелковыми молекулами и/или
 встраивает их в себя, например, нуклеиновая кислота (например, ДНК или РНК), липид,
 45 гликолипид, полисахарид и т. д. В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит
 сконструированное с цистеином антитело или Fc-гибридный белок или гетерологичный
 фрагмент, который специфично связывается с опухоль-ассоциированным
 гликолипидным антигеном, а так же субъединицами, доменами, мотивами и эпитопами

такового и/или встраивает их в себя, см., например, патент США № 5091178).

[0170] В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит сконструированное с цистеином антитело или Fc-гибридный белок, содержащий домен (например, эпитопсвязывающий домен или домен лиганда), который конкурирует с лигандами за связывание с PDGFRальфа, PDGFRбета, PDGF, VEGF, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, FGF, FGF2, HGF, KDR, fit-1, FLK-1 Ang-2, Ang-1, PLGF, CEA, CXCL13, Baff, IL-21, CCL21, TNF-альфа, CXCL12, SDF-1, bFGF, MAC-1, IL23p19, FPR, IGFBP4, CXCR3, TLR4, CXCR2, EphA2, EphA4, EphrinB2, EGFR (ErbB1), HER2 (ErbB2 или p185neu), HER3 (ErbB3), HER4 (ErbB4) или tyro2), SC1, LRP5, LRP6, RAGE, Nav1.7, GLP1, RSV, RSV F-белком, белком НА вируса гриппа, белком NA вируса гриппа, HMGB1, CD16, CD19, CD20, CD21, CD28, CD32, CD32b, CD64, CD79, CD22, ICAM-1, FGFR1, FGFR2, HDGF, EphB4, GITR, 13-амилоидом, hMPV, PIV-1, PIV-2, OX40L, IGFBP3, cMet, PD-1, PLGF, непролизином, CTD, IL-18, IL-6, CXCL-13, IL-1R1, IL-15, IL-4R, IgE, PAI-1, NGF, EphA2, CEA, uPARt, DLL-4, av136, a5131, рецептором типа I и типа II интерферона, CD19, ICOS, IL-17, фактором-II, Hsp90, IGF, CD19, GM-CSFR, PIV-3, CMV, IL-13, IL-9 и EBV.

[0171] В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит сконструированное с цистеином антитело или Fc-гибридный белок, который связывается с той же мишенью, что и антитело, выбранное из группы, состоящей из абаговомаба, абатацепта (также известного как ORENCIA®), абциксимаба (также известного как REOPRO®, c7E3 Fab), адалимумаба (также известного как HUMIRA®), адекатумумаба, алемтузумаба (также известного как CAMPATH®, Mab-Кампат или Кампат-1H), алтумумаба, афелимомумаба, анатумумаба мафенатокса, анетумумаба, анрукизумаба, аполизумаба, арцитумумаба, аселизумаба, атлизумаба, аторолимумаба, бапинеузумаба, базиликсимаба (также известного как SIMULECT®), бавитуксимаба, бектумумаба (также известного как LYMPHOSCAN®), белимумаба (также известного как LYMPHO-STAT-B®), бертилимумаба, бесилезомаба, бевацизумаба (также известного как AVASTIN®), бициромаба браллобарбитала, биватузумаба мертанзина, кампата, канакинумаба (также известного как ACZ885), кантузумаба мертанзина, капромаба (также известного как PROSTASCINT®), катумаксумаба (также известного как REMOVAB®), целелизумаба (также известного как CIMZIA®), цертолизумаба пэгола, цетуксимаба (также известного как ERBITUX®), кленоликсимаба, дацетузумаба, дакликсимаба, даклизумаба (также известного как ZENAPAX®), деносумаба (также известного как AMG 162), детумумаба, дорлимомумаба аритокса, дорликсизумаба, дунтумумаба, дуримулумаба, дурмулумаба, экромексимаба, экулизумаба (также известного как SOLIRIS®), эдобакомаба, эдреколомаба (также известного как Mab17-1A, PANOREX®), эфализумаба (также известного как RAPTIVA®), эфунгумаба (также известного как MYCOGRAB®), элсилимомумаба, энлимомумаба пэгола, эпитумумаба цитуксетана, эфализумаба, эпитумумаба, эпратузумаба, эрлизумаба, эртумаксумаба (также известного как REXOMUN®), этанерцепта (также известного как ENBREL®), этарацизумаба (также известного как этаратузумаб, VITAXIN®, ABEGGRIN™), эксбивирумаба, фанолезомаба (также известного как NEUTROSPEC®), фаралимомумаба, фелвизумаба, фонтолизумаба (также известного как HUZAF®), галиксимаба, гантенерумаба, гавилимомумаба (также известного как AVXCBL®), гемтузумаба озогамицина (также известного как MYLOTARG®), голимумаба (также известного как CNTO 148), гомиликсимаба, ибализумаба (также известного как TNX-355), ибритумумаба тиуксетана (также известного как ZEVALIN®), иговомаба, имциромаба, инфликсимаба (также известного как REMICADE®), инолимомумаба, инотузумаба озогамицина, ипилимумаба (также

известного как MDX-010, MDX-101), иратумумаба, келиксимаба, лабетузумаба, лемалезумаба, лебрилизумаба, лерделимумаба, лексатумумаба (также известного как HGS-ETR2, ETR2-ST01), лекситумумаба, либивирумаба, линтузумаба, лукатумумаба, лумиликсимаба, мапатумумаба (также известного как HGSETR1, TRM-1), маслимомаба, матузумаба (также известного как EMD72000), меполизумаба (также известного как BOSATRIA®), метелимумаба, милатузумаба, минретумомаба, митумомаба, моролимумаба, мотавизумаба (также известного как NUMAX™), муромонаба (также известного как ОКТ3), наколомаба тафенатокса, наптумомаба эстафенатокса, натализумаба (также известного как TYSABRI®, ANTEGREN®), небакумаба, нерелимомаба, нимотузумаба (также известного как THERACIM hR3®, THERA-CIM-hR3®, THERALOC®), нофетумомаба мерпентана (также известного как VERLUMA®), окрелизумаба, одулимомаба, офатумумаба, омализумаба (также известного как XOLAIR®), ореговомаба (также известного как OVAREX®), отеликсизумаба, пагибаксимаба, паливизумаба (также известного как SYNAGIS®), панитумумаба (также известного как ABX-EGF, VECTIBIX®), пасколизумаба, пемтумомаба (также известного как THERAGYN®), пертузумаба (также известного как 2C4, OMNITARG®), пекселизумаба, пинтумомаба, приликсимаба, притумумаба, ранибизумаба (также известного как LUCENTIS®), раксибакумаба, регавирумаба, реслизумаба, ритуксимаба (также известного как RITUXAN®, MabTHERA®), ровелизумаба, руплизумаба, сатумомаба, севирумаба, сибротузумаба, сиплизумаба (также известного как MEDI-507), сонтузумаба, стамулумаба (также известного как MYO-029), сулезумаба (также известного как LEUKOSCAN®), такатузумаба тетраксетана, тадоцизумаба, тализумаба, таплитумомаба паптокса, тефибазумаба (также известного как AUREXIS®), телимомаба аритокса, тенеликсимаба, теплизумаба, тицилимумаба, тоцилизумаба (также известного как АСТЕМРА®), торализумаба, тоситумомаба, трастузумаба (также известного как HERCEPTIN®), тремелимумаба (также известного как CP-675,206), тукотузумаба целмолейкина, тувирумаба, уртоксазумаба, устекинумаба (также известного как CNTO 1275), вапаликсимаба, велтузумаба, вепалимомаба, визилизумаба (также известного как NUVION®), волоциксимаба (также известного как M200), вотумумаба (также известного как HUMASPECT®), залутумумаба, занолимумаба (также известного как NuMAX-CD4), зиралимумаба или золимомаба аритокса. В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит сконструированное с цистеином антитело или Fc-гибридный белок, содержащий антигенсвязывающий участок из антитела, выбранного из предыдущего перечня антител.

[0172] Раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты могут специфично связываться с молекулами из нескольких источников, например, вирусные, бактериальные (например, микоплазменные), грибковые или животные мишени, и/или встраивать их в себя. В некоторых случаях молекула животного представляет собой молекулу человека. В некоторых аспектах раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты могут специфично связываться с молекулами паразитических организмов (например, грибков, бактерий, нематод и т. д.) и/или встраивать их в себя. В некоторых аспектах молекула представляет собой антиген. Соответственно, в некоторых аспектах соединение-конъюгат может нацеливаться на бактериальный антиген, при этом гетерологичный фрагмент представляет собой антибактериальное средство. В других аспектах мишень представляет собой вирусный антиген, при этом гетерологичный фрагмент представляет собой противовирусное средство. В еще одних аспектах соединение-конъюгат может нацеливаться на опухолевый антиген (например, антиген опухоли человека), при этом гетерологичный фрагмент представляет собой

противоопухолевое средство. В некоторых аспектах соединение-конъюгат может нацеливаться на грибковый антиген, при этом гетерологичный фрагмент представляет собой противогрибковое средство. В некоторых аспектах соединение-конъюгат может нацеливаться на антиген паразитического организма, при этом гетерологичный фрагмент представляет собой противопаразитарное средство. В других аспектах соединение-конъюгат может нацеливаться на микоплазменный антиген, при этом гетерологичный фрагмент представляет собой противомикоплазменное средство. В некоторых аспектах соединение-конъюгат может нацеливаться на антиген дифференцировки или гистосовместимости, при этом гетерологичный фрагмент представляет собой цитотоксическое средство. Сконструированные с цистеином антитела и Fc-гибридные белки, содержащие раскрытые цистеиновые мутации (замены в аминокислотных положениях 241, 243, 251, 253, 258, 264, 269, 271, 272, 274, 280, 281, 285, 288, 291, 293, 294, 296, 301, 307, 309, 311, 318, 329, 340, 341, 345, 357, 385, 386, 387, 401, 402, 411, 417, 433, 435 или 439, вставку аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240 и любые их комбинации) и необязательно одну или несколько цистеиновых мутаций в дополнительных положениях, подходящих для конструирования цистеина, описанных в уровне техники (например, замены в аминокислотных положениях 239, 248, 254, 273, 279, 282, 284, 286, 287, 289, 297, 298, 312, 324, 326, 330, 335, 337, 339, 350, 355, 356, 359, 360, 361, 375, 383, 384, 389, 398, 400, 413, 415, 418, 422, 440, 441, 442, 443 и 446), можно получить согласно способам, известным из уровня техники. См., например, патент США № 4816567.

[0173] Нуклеиновые кислоты, например, ДНК, кодирующие раскрытые цистеиновые мутации, можно получить различными способами, известными из уровня техники. Эти способы включают без ограничения получение посредством сайт-направленного (или опосредуемого олигонуклеотидами) мутагенеза, мутагенеза с помощью ПЦР и касетного мутагенеза заранее полученной ДНК, кодирующей полипептид. Варианты рекомбинантных антител и Fc-гибридных белков также можно конструировать посредством манипуляций с рестрикционными областями или посредством ПЦР с перекрывающимися синтетическими олигонуклеотидами. Мутагенные праймеры кодируют замену(замены) кодонами цистеина. Стандартные методики мутагенеза можно применять для получения ДНК, кодирующей такие мутантные сконструированные с цистеином антитела и Fc-гибридные белки. Общее руководство можно найти в Sambrook et al *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 и Ausubel et al *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993.

[0174] Сайт-направленный мутагенез является одним из способов получения вариантов с заменой, т. е. мутантных белков. Эта методика хорошо известна из уровня техники (см. Например, Carter (1985) et al *Nucleic Acids Res.* 13:4431-4443; Ho et al (1989) *Gene (Amst.)* 77:51-59 и Kunkel et al (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488). Вкратце, при проведении сайт-направленного мутагенеза ДНК исходная ДНК изменяется в ходе первой гибридизации олигонуклеотида, кодирующего необходимую мутацию, с одиночной нитью такой исходной ДНК. После гибридизации применяется ДНК-полимераза для синтеза целой второй нити при помощи гибридизованного олигонуклеотида в качестве праймера и одиночной нити исходной ДНК в качестве матрицы. Таким образом, олигонуклеотид, кодирующий необходимую мутацию, встраивается в полученную в результате двунитевую ДНК. Сайт-направленный мутагенез можно проводить в гене, экспрессирующем предполагаемый мутированный белок, в экспрессионной плазмиде, и полученную в результате плазмиду можно

секвенировать для подтверждения введения необходимых мутаций по типу замены на цистеин (Liu et al (1998) J. Biol. Chem. 273:20252-20260). Протоколы и форматы для сайт-направленного мутагенеза, в том числе коммерчески доступные, включают, например, набор для множественного сайт-направленного мутагенеза QuikChange® (Stratagene, Ла-Холья, Калифорния).

[0175] Мутагенез с помощью ПЦР также является подходящим для получения вариантов аминокислотных последовательностей исходного полипептида. См. Higuchi (1990) в PCR Protocols, pp. 177-183, Academic Press; Ito et al (1991) Gene 102:67-70; Bernhard et al (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132 и Vallette et al (1989) Nuc. Acids Res. 17:723-733.

Вкратце, при использовании небольших количеств матричной ДНК в качестве исходного материала для ПЦР можно применять праймеры, последовательности которых незначительно отличаются от соответствующего участка в матричной ДНК, с получением относительно больших количеств конкретной области ДНК, которая отличается от матричной последовательности только в положениях, где праймеры отличаются от матрицы.

[0176] Другой способ получения вариантов, кассетный мутагенез, основан на методике, описанной Wells et al (1985) Gene 34:315-323. Исходным материалом является плаزمид (или другой вектор), содержащая исходную ДНК, кодирующую полипептид, которая будет мутирована. В исходной ДНК идентифицируют кодон(кодоны), которые будут мутированы. С каждой стороны идентифицированного сайта(сайтов) для мутации должен быть уникальный сайт рестрикции эндонуклеазой. При отсутствии таких сайтов рестрикции их можно получить при помощи вышеописанного способа опосредуемого олигонуклеотидами мутагенеза для того, чтобы ввести их в соответствующие положения в исходной ДНК, кодирующей полипептид. Плазмидная ДНК разрезается в этих сайтах для ее линейаризации. Двунитевой олигонуклеотид, кодирующий последовательность ДНК между сайтами рестрикции, но содержащую необходимую мутацию(мутации), синтезируют при помощи стандартных процедур, при которых две нити олигонуклеотида синтезируют отдельно, а затем гибридизируют вместе при помощи стандартных методик. Этот двунитевой олигонуклеотид называется кассетой. Эту кассету конструируют с 5' и 3' концами, сходными с концами линейаризованной плазмиды, благодаря чему ее можно непосредственно лигировать в плазмиду. После этого плазмиды содержит мутированную последовательность ДНК. Мутантную ДНК, содержащую кодируемые цистеиновые замены, можно подтвердить с помощью секвенирования ДНК.

[0177] Одиночные мутации также получают посредством олигонуклеотид-направленного мутагенеза с применением двунитевой плазмидной ДНК в качестве матрицы для мутагенеза на основе ПЦР (Sambrook and Russel, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition; Zoller et al (1983) Methods Enzymol. 100:468-500; Zoller, M. J. and Smith, M. (1982) Nucl. Acids Res. 10:6487-6500).

[0178] Полинуклеотид(полинуклеотиды), кодирующие сконструированные с цистеином антитела или Fc-гибридные белки согласно настоящему раскрытию, можно дополнительно модифицировать рядом различных способов при помощи технологии рекомбинантных ДНК. В некоторых аспектах константные домены легкой и тяжелой цепей антитела, например, мышинового моноклонального антитела, можно заменить (1) на таковые участки, например, человеческого антитела, с получением химерного антитела или (2) на отличный от иммуноглобулина полипептид с получением гибридного антитела. В некоторых аспектах константные участки усекают или удаляют с получением необходимой области антитела моноклонального антитела. Сайт-направленный или высокопроизводительный мутагенез варьируемых участков можно применять для

оптимизации специфичности, аффинности и т. д. моноклонального антитела.

[0179] Человеческие антитела можно непосредственно получить при помощи различных методик, известных из уровня техники. Можно получить иммортализованные В-лимфоциты человека, иммунизированные *in vitro*, или выделенные из
 5 иммунизированного индивида, у которого продуцируются антитела непосредственно к целевому антигену (см., например, Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Voemer *et al.*, *J. Immunol.* 147:86-95 (1991) и патент США № 5750373). Одну или несколько кДНК, кодирующих антитело в иммортализованном В-лимфоците, можно затем получить и вставить в вектор экспрессии и/или
 10 гетерологичную клетку-хозяина для экспрессии не встречающейся в природе рекомбинантной версии антитела.

[0180] Также раскрытые в данном документе сконструированные с цистеином антитела или Fc-гибридные белки могут быть отобраны из фаговой библиотеки, при этом такая фаговая библиотека экспрессирует человеческие антитела или их области в виде
 15 гибридных белков с гетерологичными белками фага, как описано, например, в Vaughan *et al.*, *Nat. Biotech.* 14:309-314 (1996); Sheets *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:6157-6162 (1998); Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.* 227:381 (1991) и Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581 (1991)). Методики получения и применения фаговых библиотек антител также описаны в патентах США №№ 5969108, 6172197, 5885793, 6521404, 6544731, 6555313, 6582915,
 20 6593081, 6300064, 6653068, 6706484 и 7264963, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0181] В некоторых аспектах сконструированное с цистеином антитело или Fc-гибридный белок согласно настоящему раскрытию может представлять собой гуманизированное антитело. Можно также применять способы конструирования,
 25 гуманизации или изменения поверхности не относящихся к человеческим антител или человеческих антител, и они хорошо известны из уровня техники. Гуманизированное, с измененной поверхностью или подобным образом сконструированное антитело может иметь один или несколько аминокислотных остатков из отличного от человека
 30 источника, например, без исключения мыши, крысы, кролика, отличного от человека примата или другого млекопитающего. Эти аминокислотные остатки отличного от человеческого происхождения заменяют остатками, часто называемыми "импортированными" остатками, которые, как правило, взяты из "импортированного" вариабельного, константного или другого домена известной последовательности человека. Такие импортированные последовательности можно применять для снижения
 35 иммуногенности или снижения, повышения или модификации связывания, аффинности, скорости ассоциации, скорости диссоциации, avidности, специфичности, периода полувыведения или любых других подходящих характеристик, известных из уровня техники. Гуманизация, изменение поверхности или конструирование раскрытых в данном документе сконструированных с цистеином антител или их областей можно
 40 осуществлять при помощи любых известных способов, таких как без ограничения способы, описанные в Damschroder *et al.*, *Mol. Immunol.* 44:3049-3060 (2007); Jones *et al.*, *Nature* 321:522 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science* 239:1534 (1988)), Sims *et al.*, *J. Immunol.* 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987), Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.* 151: 2623 (1993), патентах США №№ 5639641, 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539, 4816567, 7557189, 7538195 и 7342110, WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, WO2005/042743, WO2006/102095 и EP229246, каждый из которых в полном объеме включен в

данный документ посредством ссылки, в том числе ссылки, цитируемые в них.

IV. Экспрессия и очистка сконструированных с цистеином антител и Fc-гибридных белков

[0182] В определенных аспектах настоящее раскрытие предусматривает
 5 полинуклеотиды, содержащие последовательности нуклеиновой кислоты, которые кодируют сконструированное с цистеином антитело или Fc-гибридный белок, содержащий раскрытые цистеиновые мутации (замены в аминокислотных положениях 241, 243, 251, 253, 258, 264, 269, 271, 272, 274, 280, 281, 285, 288, 291, 293, 294, 296, 301, 307, 309, 311, 318, 329, 340, 341, 345, 357, 385, 386, 387, 401, 402, 411, 417, 433, 435 или 439,
 10 вставку аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240 и любые их комбинации). Эти полинуклеотиды могут быть в виде РНК или в виде ДНК. ДНК включает кДНК, геномную ДНК и синтетическую ДНК; и может быть двунитовой или однонитовой, и если она однонитовая, то может представлять собой кодирующую нить или некодирующую (антисмысловую) нить. В определенных аспектах ДНК представляет
 15 собой кДНК, которую применяют для получения не встречающегося в природе рекомбинантного сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка.

[0183] В определенных аспектах полинуклеотиды выделены. В определенных аспектах полинуклеотиды практически чистые. В определенных аспектах полинуклеотиды содержат последовательность, кодирующую зрелый полипептид, слитую в той же рамке
 20 считывания с полинуклеотидом (либо природным, либо гетерологичным), который способствует, например, экспрессии и секреции полипептида из клетки-хозяина (например, лидерная последовательность, которая функционирует как последовательность сигнала секреции для регулирования транспорта полипептида из клетки). Полипептид с лидерной последовательностью является белком-
 25 предшественником и может иметь лидерную последовательность, расщепляемую клеткой-хозяином, с получением зрелой формы полипептида. В определенных аспектах полинуклеотиды изменены для оптимизации частоты использования кодона для определенной клетки-хозяина.

[0184] В определенных аспектах полинуклеотиды содержат последовательность,
 30 кодирующую зрелое сконструированное с цистеином антитело или Fc-гибридный белок, слитую в той же рамке считывания с гетерологичной маркерной последовательностью, что обеспечивает возможность, например, очистки кодируемого полипептида. Например, маркерная последовательность может представлять собой гексагистицидиновую метку (SEQ ID NO: 1), доставляемую вектором рQE-9, для обеспечения очистки зрелого
 35 полипептида, слитого с маркером, в случае хозяина-бактерии, или маркерная последовательность может представлять собой гемагглютининовую (НА) метку, полученную из белка гемагглютинина вируса гриппа, если применяют хозяина-млекопитающего (например, клетки COS-7).

[0185] Полинуклеотиды могут содержать изменения в кодирующих участках,
 40 некодирующих участках или обоих. В некоторых аспектах эти полинуклеотидные варианты содержат изменения, которые приводят к "молчащим" заменам, вставкам или делециям, но не изменяют свойства или виды активностей кодируемого полипептида. В некоторых аспектах полинуклеотидные варианты получены с помощью "молчащих" замен благодаря вырожденности генетического кода. Полинуклеотидные варианты
 45 можно также получать в силу ряда причин, например, для оптимизации экспрессии кодонов для конкретного хозяина (замена кодонов в мРНК человека на кодоны, предпочтительные для бактериального хозяина, такого как *E. coli*).

[0186] В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий раскрытое в данном

документе сконструированное с цистеином антитело или Fc-гибридный белок, можно создать с помощью химического синтеза с применением олигонуклеотидного синтезатора. Такие олигонуклеотиды можно разработать на основе аминокислотной последовательности необходимого полипептида и отбирая те кодоны, которые являются предпочтительными для клеток-хозяев, в которых будет продуцироваться представляющий интерес рекомбинантный полипептид. Для синтеза выделенной полинуклеотидной последовательности, кодирующей выделенный представляющий интерес полипептид, можно применять стандартные способы. Например, полную аминокислотную последовательность можно применять для конструирования обратно транслируемого гена. Затем можно синтезировать ДНК-олигомер, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую конкретный выделенный полипептид. Например, можно синтезировать несколько небольших олигонуклеотидов, кодирующих часть необходимого полипептида, а затем лигировать их. Отдельные олигонуклеотиды, как правило, содержат 5' или 3' "липкие" концы для комплементарной сборки.

[0187] Также предусмотрены векторы и клетки, содержащие описанные в данном документе полинуклеотиды. Сразу после сборки (с помощью синтеза, сайт-направленного мутагенеза или другого способа) полинуклеотидные последовательности, кодирующие конкретный выделенный представляющий интерес полипептид (например, сконструированное с цистеином антитело или Fc-гибридный белок), могут быть вставлены в вектор экспрессии и функционально связаны с контролирующей экспрессию последовательностью, соответствующей экспрессии белка в необходимом хозяине. Правильность сборки можно проверить с помощью секвенирования нуклеотидов, рестрикционного картирования и экспрессии биологически активного полипептида в подходящем хозяине. Как хорошо известно из уровня техники, для того, чтобы получить высокие уровни экспрессии трансфицированного гена в хозяине, ген должен быть функционально связан с последовательностями, контролирующими транскрипцию и трансляцию, которые являются функциональными в выбранном для экспрессии хозяине.

[0188] В определенных аспектах рекомбинантные векторы экспрессии применяют для накопления и экспрессии ДНК, кодирующей раскрытые в данном документе сконструированные с цистеином антитела или Fc-гибридные белки. Рекомбинантные векторы экспрессии представляют собой реплицируемые ДНК-конструкции, которые имеют синтетические или полученные из кДНК области ДНК, кодирующие, например, полипептидную цепь антитела к HER2 или/и его антигенсвязывающую область, функционально связанные с подходящими регулируемыми транскрипцию или трансляцию элементами, полученными из генов млекопитающих, микроорганизмов, вирусов или насекомых. Транскрипционная единица, как правило, содержит сборку из (1) генетического элемента или элементов, имеющих регуляторную роль в экспрессии генов, например, промоторы или энхансеры транскрипции, (2) структурной или кодирующей последовательности, которая транскрибируется в мРНК и транслируется в белок, и (3) соответствующих последовательностей инициации транскрипции и трансляции и последовательностей терминации, подробно описанных ниже. Такие регуляторные элементы могут включать последовательность оператора для контроля транскрипции. Можно использовать широкое разнообразие комбинаций хозяин/вектор для экспрессии. Пригодные векторы экспрессии для эукариотических хозяев включают, например, векторы, содержащие контролирующую экспрессию последовательности из SV40, вируса папилломы крупного рогатого скота, аденовируса и цитомегаловируса. Пригодные векторы экспрессии для бактериальных хозяев включают известные бактериальные плазмиды, такие как плазмиды из *E. coli*, в том числе pCR1, pBR322,

pMB9 и их производные, плазмиды для более широкого круга хозяев, такие как M13 и нитчатые одноклеточные ДНК фаги.

[0189] Подходящие клетки-хозяева для экспрессии сконструированных с цистеином антител или Fc-гибридных белков включают клетки прокариотов, дрожжей, насекомых или высших эукариотов под контролем соответствующих промоторов. Прокариоты включают грамотрицательные или грамположительные организмы, например, *E. coli* или бациллы. Клетки высших эукариотов включают установившиеся клеточные линии, происходящие из млекопитающих, как описано ниже. Можно также использовать бесклеточные системы трансляции. Соответствующие векторы для клонирования и экспрессии для применения с клетками-хозяевами бактерий, грибов, дрожжей и млекопитающих описаны Pouwels *et al.* (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985), релевантное раскрытие которого включено в данный документ посредством ссылки. Дополнительную информацию касательно способов получения белков, в том числе получения антител, можно найти, например, в публикации заявки на патент США № 2008/0187954, патентах США №№ 6413746 и 6660501 и публикации международного патента № WO 04009823, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0190] Различные системы на основе культур клеток млекопитающих или насекомых можно успешно применять для экспрессии рекомбинантных сконструированных с цистеином антител или Fc-гибридных белков согласно настоящему раскрытию. Экспрессию рекомбинантных белков можно осуществлять в клетках млекопитающих, поскольку такие белки обычно правильно свернуты, модифицированы соответствующим образом и полностью функциональны. Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают НЕК-293 и НЕК-293Т, линии клеток почки обезьяны COS-7, описанные Gluzman (Cell 23:175, 1981), и другие клеточные линии, в том числе, например, клеточные линии L-клеток, C127, 3T3, яичника китайского хомячка (СНО), NSO, HeLa и ВНК. Векторы экспрессии в млекопитающих могут содержать нетранскрибируемые элементы, такие как точка начала репликации, подходящий промотор и энхансер, связанный с геном, который будут экспрессировать, и другие 5' и 3' фланкированные нетранскрибируемые последовательности, и 5' или 3' нетранслируемые последовательности, такие как необходимые сайты связывания рибосом, сайт полиаденилирования, донорные и акцепторные сайты сплайсинга и последовательности терминации транскрипции. Бакуловирусные системы получения гетерологичных белков в клетках насекомых отображены у Luckow & Summers, BioTechnology 6:47 (1988).

[0191] Сконструированные с цистеином антитела или Fc-гибридные белки, продуцируемые трансформированным хозяином, можно очистить согласно любому подходящему способу. Такие стандартные способы включают хроматографию (например, ионообменную, аффинную и эксклюзионную колоночную хроматографию), центрифугирование, очистку на основе различной растворимости или любую другую стандартную методику очистки белков. Аффинные метки, такие как гексагистидин (SEQ ID NO: 1), домен связывания мальтозы, последовательность оболочки вируса гриппа и глутатион-S-трансфераза, можно присоединять к белку для обеспечения возможности легкой очистки путем пропускания через соответствующую аффинную колонку. Выделенные белки можно также физически характеризовать при помощи таких методик, как протеолиз, ядерный магнитный резонанс и рентгеноструктурная кристаллография.

[0192] Например, надосадочные жидкости из систем, которые секретируют

рекомбинантный белок в культуральную среду, можно сперва сконцентрировать при помощи коммерчески доступного фильтра, концентрирующего белок, например, установки для ультрафильтрации Pellicon от Millipore или Amicon. Следом за стадией концентрирования концентрат можно нанести на подходящую матрицу для очистки.

5 В некоторых аспектах можно использовать анионообменную смолу, например, матрицу или субстрат с боковыми диэтиламиноэтильными (DEAE) группами. Матрицы могут быть акриламидными, агарозными, декстрановыми, целлюлозными или других типов, обычно используемых для очистки белков. В некоторых аспектах можно использовать стадию катионного обмена. Подходящие катионообменники включают различные
10 нерастворимые матрицы, содержащие сульфопропильные или карбоксиметильные группы.

[0193] Дополнительно или необязательно можно применять одну или несколько стадий обратно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC), в которых используют гидрофобные среды для RP-HPLC, например, силикагель с
15 боковыми метильными или другими алифатическими группами, для дополнительной очистки сконструированного с цистеином антитела или его области. Некоторые или все из вышеизложенных стадий очистки в различных комбинациях можно также использовать для получения гомогенного рекомбинантного белка.

[0194] Продуцируемое в культуре рекомбинантное сконструированное с цистеином
20 антитело или Fc-гибридный белок можно выделить, например, с помощью изначального экстрагирования из клеточных осадков, с последующей одной или несколькими стадиями концентрирования, высаливания, ионообменной или эксклюзионной хроматографии в водной среде. На конечных этапах очистки можно использовать высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC). Используемые для экспрессии рекомбинантного
25 белка клетки можно разрушить с помощью любого удобного способа, в том числе чередования циклов замораживания-оттаивания, разрушения ультразвуком, механического разрушения или применения средств, лизирующих клетки. Известные из уровня техники способы очистки антител и других белков также включают, например, таковые, описанные в публикациях заявок на патент США №№ US2008/0312425, US2008/
30 0177048 и US2009/0187005, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

V. Конъюгирование гетерологичных фрагментов со сконструированными с цистеином антителами и Fc-гибридными белками

[0195] Сконструированные с цистеином антитела и Fc-гибрид, содержащие раскрытые
35 цистеиновые мутации (замены в аминокислотных положениях 241, 243, 251, 253, 258, 264, 269, 271, 272, 274, 280, 281, 285, 288, 291, 293, 294, 296, 301, 307, 309, 311, 318, 329, 340, 341, 345, 357, 385, 386, 387, 401, 402, 411, 417, 433, 435 или 439, вставку аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240 и любые их комбинации), можно сайт-специфически и эффективно объединить по меньшей мере с одним гетерологичным
40 фрагментом при помощи тиол-рационнспособных реактивов. В некоторых аспектах конъюгирование гетерологичного фрагмента можно осуществлять по тиольной группе, предоставляемой по меньшей мере одним сконструированным остатком цистеина в одном или нескольких раскрытых в данном документе положениях (например, положениях 241, 243, 251, 253, 258, 264, 269, 271, 272, 274, 280, 281, 285, 288, 291, 293,
45 294, 296, 301, 307, 309, 311, 318, 329, 340, 341, 345, 357, 385, 386, 387, 401, 402, 411, 417, 433, 435 или 439 или вставки аминокислоты цистеина между положениями 239 и 240), и необязательно по меньшей мере одним сконструированным остатком цистеина в одном или нескольких положениях, известных из уровня техники (например, положениях

239, 248, 254, 273, 279, 282, 284, 286, 287, 289, 297, 298, 312, 324, 326, 330, 335, 337, 339, 350, 355, 356, 359, 360, 361, 375, 383, 384, 389, 398, 400, 413, 415, 418, 422, 440, 441, 442, 443 и 446).

5 [0196] Различные способы конъюгирования гетерологичного фрагмента со сконструированным остатком цистеина известны из уровня техники. Реактивы для такого конъюгирования, как правило, несут реакционноспособные функциональные группы, которые могут непосредственно реагировать с тиольной группой цистеина (например, сконструированного цистеина согласно настоящему изобретению) с образованием соединения-конъюгата, или с линкерным реактивом с образованием меченого линкером промежуточного продукта, или с линкерным белком с образованием 10 соединения-конъюгата. В случае линкера реакции органической химии, условия и реактивы, которые можно применять, включают без ограничения реакцию цистеиновой группы с линкерным реактивом с образованием посредством ковалентной связи промежуточного продукта белок-линкер с последующей реакцией с активированным 15 гетерологичным фрагментом; и реакцию нуклеофильной группы гетерологичного фрагмента с линкерным реактивом с образованием посредством ковалентной связи промежуточного продукта гетерологичный фрагмент-линкер с последующей реакцией с цистеиновой группой (например, сконструированного цистеина согласно настоящему изобретению).

20 [0197] В некоторых аспектах бифункциональные линкеры являются пригодными для настоящего изобретения. Например, бифункциональный линкер, содержащий тиольную модифицирующую группу для ковалентного связывания с остатком(остатками) цистеина и по меньшей мере один присоединяемый фрагмент (например, второй тиольный модифицирующий фрагмент) для ковалентного или нековалентного связывания с 25 соединением-конъюгатом. Для получения соединения согласно настоящему изобретению можно применять ряд белков и соединений, (и линкеров). Тиольные группы цистеина являются нуклеофильными и способны реагировать с образованием ковалентных связей с электрофильными группами на линкерных реактивах или промежуточных продуктах соединение-линкер или лекарственных средствах, в том числе: (i) активированных 30 сложных эфирах, таких как NHS-сложные эфиры, НОВt-сложные эфиры, галогенформиаты и галогенангидриды; (ii) алкил- и бензилгалогенидах, таких как галоацетамиды; (iii) альдегидах, кетонах, карбоксильных и малеимидных группах; и (iv) дисульфидах, в том числе пиридилдисульфидах, посредством сульфидного обмена. Нуклеофильные группы на гетерологичном фрагменте или линкере включают без 35 ограничения аминовые, тиольные, гидроксильные, гидразидные, оксимовые, гидразиновые, тиосемикарбазонные, гидразинкарбоксилатные и арилгидразидные группы, способные реагировать с образованием ковалентных связей с электрофильными группами на линкерных фрагментах и линкерных реактивах. В определенных аспектах метящие реактивы включают малеимид, галоацетил, сукцинимидиловый сложный эфир 40 йодоацетамида, изотиоцианат, сульфонилхлорид, 2,6-дихлортриазинил.

[0198] Эффективность конъюгирования гетерологичной молекулы с раскрытым в данном документе сконструированным с цистеином антителом или Fc-гибридным белком можно определить путем оценки присутствия свободных тиольных групп, оставшихся после реакции конъюгирования. Присутствие свободных тиольных групп 45 можно определить различными методиками, принятыми в данной области. В определенных аспектах представленный в данном документе способ обеспечивает эффективное конъюгирование гетерологичного фрагмента, где эффективность конъюгирования составляет по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей

мере 15%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 35%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 45%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или более, как измерено по уровню свободных тиольных групп, оставшихся после реакции конъюгирования.

[0199] В некоторых аспектах представленный в данном документе способ обеспечивает конъюгирование гетерологичного фрагмента с раскрытым в данном документе сконструированным с цистеином антителом или Fc-гибридным белком, содержащим свободные остатки цистеина, которые содержат сульфгидрильные группы, которые заблокированы или защищены защитными группами. Такие защитные группы включают белки, пептиды, ионы и другие вещества, которые взаимодействуют с сульфгидрильной группой и предотвращают или ингибируют образование конъюгата. В некоторых аспектах перед реакцией конъюгирования с раскрытых в данном документе сконструированных с цистеином антител или Fc-гибридных белков необходимо снять защитные группы. В конкретных аспектах с антител или Fc-гибридных белков сняты защитные группы, и они характеризуются свободными сульфгидрильными группами, способными к конъюгированию. В конкретных аспектах раскрытые в данном документе сконструированные с цистеином антитела или Fc-гибридные белки подвергают реакции снятия защитных групп, что не нарушает или перемещает встречающиеся в природе дисульфидные связи.

[0200] В некоторых аспектах раскрытые в данном документе сконструированные с цистеином антитела или Fc-гибридные белки можно подвергать реакциям конъюгирования, при этом сконструированное с цистеином антитело или Fc-гибридный белок, который будут конъюгировать, присутствует в концентрации по меньшей мере 1 мг/мл, по меньшей мере 2 мг/мл, по меньшей мере 3 мг/мл, по меньшей мере 4 мг/мл, по меньшей мере 5 мг/мл или выше.

[0201] Тиол-реакционноспособный реактив может представлять собой, например, многофункциональный линкерный реактив, реактив, представляющий собой метку захвата (т. е. аффинную) (например, реактив биотин-линкер), детектируемую метку (например, флуорофорный реактив), реактив для иммобилизации на твердой подложке (например, SEPHAROSE™, полистирол или стекло) или промежуточный продукт лекарственное средство-линкер. Один пример тиол-реакционноспособного реактива представляет собой N-этилмалеимид (NEM). В иллюстративном примере реакция сконструированного с цистеином антитела или Fc-гибридного белка с многофункциональным линкерным реактивом дает промежуточный продукт соединения-конъюгата с функционализированным линкером, который может дальше вступать в реакцию с гетерологичным фрагментом (например, фрагментом лекарственного средства).

[0202] Такой подход можно применять для конъюгирования других тиол-реакционноспособных средств, в которых реакционноспособная группа представляет собой группу, например, малеимида, йодацетамида, пиридилдисульфида, галоацетила, сукцинимидиловый сложный эфир йодацетамида (например, NHS, N-гидроксисукцинимид), изотиацианата, сульфонилхлорида, 2,6-дихлортриазинила, сложного эфира пентафторфенила и фосфорамидата или других тиол-реакционноспособных партнеров по конъюгированию (Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach,

Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671).

[0203] Соответственно, раскрытое в данном документе сконструированное с цистеином антитело или Fc-гибридный белок можно конъюгировать при помощи способов конъюгирования по тиольной группе, известных из уровня техники, по меньшей мере с одним гетерологичным фрагментом, таким как токсин, лекарственное средство, радионуклид, иммуномодулятор, цитокин, лимфокин, хемокин, фактор роста, фактор некроза опухоли, гормон, антагонист гормона, фермент, олигонуклеотид, ДНК, РНК, siRNA, RNAi, микроРНК, пептидо-нуклеиновая кислота, фотоактивное терапевтическое средство, антиангиогенное средство, проапоптозное средство, не встречающаяся в природе аминокислота, пептид, липид, углевод, каркасная молекула, флуоресцентная метка, пептид для визуализации, биотин, средство, продлевающее период полувыведения из сыворотки, метка захвата, хелатирующее средство, твердая подложка или их комбинация, где конъюгирование осуществляют по одному из сконструированных остатков цистеина.

VI. Фармацевтические композиции

[0204] Настоящее раскрытие предусматривает составы, содержащие по меньшей мере одно раскрытое в данном документе соединение-конъюгат, составленное вместе с разбавителем, носителем или наполнителем. Настоящее раскрытие также предусматривает фармацевтические композиции, содержащие по меньшей мере одно раскрытое в данном документе соединение-конъюгат, составленное вместе с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или наполнителем. Такие составы или фармацевтические композиции могут включать одно из, например, без ограничения двух или более разных соединений-конъюгатов или комбинацию из них. Например, раскрытый в данном документе состав или фармацевтическая композиция может содержать комбинацию из соединений-конъюгатов, которые связываются с разными мишенями, например, разными эпитопами, или которые характеризуются взаимосвязанными видами активности.

[0205] Для получения фармацевтических или стерильных композиций, содержащих раскрытое в данном документе соединение-конъюгат, соединение-конъюгат может быть смешано с фармацевтически приемлемым носителем или наполнителем. Составы на основе терапевтических и диагностических средств можно получить путем смешивания с физиологически приемлемыми носителями, наполнителями или стабилизаторами в форме, например, лиофилизированных порошков, взвеси, водных растворов, примочек или суспензий.

[0206] Фармацевтические композиции, содержащие раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты, также можно вводить при комбинированной терапии, как, например, в комбинации с другими средствами. Например, комбинированная терапия может предусматривать раскрытое в данном документе соединение-конъюгат в комбинации по меньшей мере с одной другой терапией, при этом терапия может представлять собой оперативное вмешательство, иммунотерапию, химиотерапию, лучевую терапию или фармакотерапию.

[0207] Фармацевтические соединения могут включать одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. Примеры таких солей включают соли присоединения кислоты и соли присоединения основания. Соли присоединения кислоты включают таковые, полученные из нетоксических неорганических кислот, таких как хлористоводородная, азотная, фосфорная, серная, бромистоводородная, йодистоводородная, фосфористая и т. п., а также из нетоксических органических кислот,

таких как алифатические моно- и дикарбоксильные кислоты, фенильно-замещенные алкановые кислоты, гидроксислкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты и т. п. Соли присоединения основания включают таковые, полученные из щелочноземельных металлов, таких как натрий, калий, магний, кальций и т. п., а также из нетоксических органических аминов, таких как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтанолламин, этилендиамин, прокаин и т. п.

[0208] Фармацевтическая композиция также может включать фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, цистеин гидрохлорид, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т. п.; (2) жирорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т. п.; и (3) метал-хелатирующие средства, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (EDTA), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т. п.

[0209] Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые можно использовать в раскрытых в данном документе фармацевтических композициях, включают воду, этанол, многоатомные спирты (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т. п), и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло и органические сложные эфиры для инъекционного применения, такие как этилолеат. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрывающих материалов, таких как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц - в случае дисперсий, и путем применения поверхностно-активных веществ.

[0210] Эти фармацевтические композиции также могут содержать вспомогательные средства, такие как консерванты, смачивающие средства, эмульгирующие средства и диспергирующие средства. Предотвращение появления микроорганизмов можно гарантировать как с помощью процедур стерилизации, так и с помощью включения различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабена, хлорбутанола, фенол сорбиновой кислоты и т. п. Также может быть необходимым включать в состав средства, регулирующие изотоничность, такие как сахара, хлорид натрия и т. п. Кроме того, продленное всасывание инъекционных фармацевтических форм может обеспечиваться включением средств, которые замедляют всасывание, таких как моностеарат алюминия и желатин.

[0211] Фармацевтические композиции могут быть стерильными и стабильными в условиях получения и хранения. Композиции могут быть составлены в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Носителем может быть растворитель или дисперсионная среда, содержащая, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т. п.), и их подходящие смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, путем поддержания необходимого размера частиц - в случае дисперсии, и путем применения поверхностно-активных веществ. Во многих случаях подходящим может быть включение в композицию средств, регулирующих изотоничность, например, сахаров, полиспиртов, таких как маннит, сорбит или хлорида натрия. Продленное всасывание инъекционных композиций может обеспечиваться включением в композицию средств, которые замедляют всасывание,

например, моностеаратных солей и желатина.

[0212] Стерильные инъекционные растворы можно получить путем помещения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или комбинацией из перечисленных выше ингредиентов, если необходимо, с последующей стерилизацией микрофильтрацией. Как правило, дисперсии получают путем помещения активного соединения в стерильную среду, которая содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из таковых, перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов, соответствующие способы получения включают вакуумную сушку и сублимационную сушку (лиофилизацию), с помощью которых получают порошок активного ингредиента с любым дополнительным необходимым ингредиентом из их предварительно простерилизованных фильтрованием растворов.

[0213] В одном аспекте представленные в данном документе композиции являются апирогенными составами, которые практически не содержат эндотоксинов и/или сопутствующих пирогенных веществ. Эндотоксины включают токсины, которые локализованы внутри микроорганизма и высвобождаются при разрушении или уничтожении микроорганизмов. Пирогенные вещества также включают вызывающие повышение температуры термостабильные вещества (гликопротеины) из внешней мембраны бактерий и других микроорганизмов. Оба эти вещества могут вызывать повышение температуры, гипотонию и шок при введении людям. Вследствие возможных вредоносных эффектов даже невысокие количества эндотоксинов должны быть соответствующим образом удалены из фармацевтических лекарственных растворов для внутривенного введения. Управление по контролю продуктов питания и лекарственных средств ("FDA") установило верхний предел в 5 эндотоксиновых единиц (EU) на дозу на килограмм веса тела за один одночасовой период для внутривенных введений лекарственных средств. Если терапевтические белки вводят в количествах равных нескольким сотням или тысячам миллиграммов на килограмм веса тела, даже следовые количества эндотоксина должны соответствующим образом быть удалены.

[0214] В аспекте уровни эндотоксинов и пирогенов в композиции составляют менее 10 EU/мг, менее 5 EU/мг, менее 1 EU/мг, менее 0,1 EU/мг, менее 0,01 EU/мг или менее 0,001 EU/мг. В определенных вариантах осуществления уровни эндотоксинов и пирогенов в композиции составляют менее приблизительно 10 EU/мг, менее приблизительно 5 EU/мг, менее приблизительно 1 EU/мг или менее приблизительно 0,1 EU/мг, менее приблизительно 0,01 EU/мг или менее приблизительно 0,001 EU/мг.

35 VII. Способы диагностики

[0215] В определенных аспектах представленные в данном документе соединения-конъюгаты можно применять *in vivo* и/или *in vitro* для диагностических анализов. Такие диагностические анализы включают, например, (i) выявление присутствия или отсутствия заболевания или нарушения, (ii) наблюдение или прогнозирование развития или прогрессирования заболевания или нарушения (такого как, без ограничения, рака), (iii) процедуры клинических испытаний, такие как определение эффективности конкретной терапии, или (iv) идентификацию пациентов-кандидатов для определенного лечения.

[0216] В некоторых аспектах раскрытые в данном документе методики предусматривают способы определения присутствия представляющей интерес молекулы-мишени в образце, который предположительно содержит такую молекулу. В некоторых аспектах способ включает воздействие на образец раскрытого в данном документе соединения-конъюгата и определение связывания соединения-конъюгата с представляющей интерес молекулой-мишенью в образце, при этом связывание

соединения-конъюгата с представляющей интерес молекулой-мишенью в образце указывает на присутствие представляющей интерес молекулы-мишени в образце. В некоторых аспектах образец представляет собой биологический образец. В определенных аспектах биологический образец взят от млекопитающего, испытывающего или предположительно испытывающего заболевание или нарушение, ассоциированное с представляющей интерес молекулой-мишенью.

[0217] Например, выявление связывания раскрытого в данном документе соединения-конъюгата с представляющей интерес молекулой-мишенью (например, мишенью на поверхности клетки) можно достичь путем:

- (a) воздействия на образец, который будут тестировать (например, клеток), соединения-конъюгата, необязательно вместе с контрольным образцом, в условиях, которые обеспечивают образование комплекса между соединением-конъюгатом и представляющей интерес молекулой-мишенью; и
- (b) определения степени связывания соединения-конъюгата с молекулой-мишенью.

[0218] Раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты можно применять в способах выявления рака, аутоиммунных, воспалительных или инфекционных заболеваний или нарушений у нуждающегося в этом субъекта, при этом способ включает введение субъекту соединения-конъюгата. Образование комплекса между соединением-конъюгатом и мишенью можно выявить, например, при помощи ELISA. При использовании контрольного образца вместе с тестируемым образцом комплекс можно выявить как в одном, так и в другом образце, при этом любая статистически значимая разница в образовании комплексов между образцами указывает на присутствие представляющей интерес молекулы-мишени в тестируемом образце.

[0219] В определенных аспектах раскрытое в данном документе соединение-конъюгат можно применять для выявления сверхэкспрессии или накопления представляющей интерес молекулы-мишени при помощи диагностического анализа *in vivo*. В некоторых аспектах соединение-конъюгат добавляют к образцу, где соединение-конъюгат связывается с представляющей интерес молекулой-мишенью, которую необходимо выявить, и метит ее с помощью детектируемой метки (например, радиоактивного изотопа или флуоресцентной метки) и наружно сканируют пациента для определения локализации метки. FISH-анализы, такие как INFORM™ (реализуемый Ventana, Аризона) или PATHVISION™ (Vysis, Иллинойс), можно проводить на фиксированной в формалине и залитой в парафин ткани для определения степени (если таковая имеется) сверхэкспрессии представляющей интерес молекулы-мишени, например, в опухолях.

[0220] В определенных аспектах раскрытое в данном документе соединение-конъюгат можно применять в способе диагностики клеточно-пролиферативного заболевания, ассоциированного с повышением количества клеток, экспрессирующих представляющую интерес молекулу-мишень. В некоторых аспектах способ включает приведение тестируемых клеток в биологическом образце в контакт с раскрытым в данном документе соединением-конъюгатом; определение уровня представляющей интерес молекулы-мишени в тестируемых клетках в образце путем определения связывания раскрытого в данном документе соединения-конъюгата; и сравнение уровня соединения-конъюгата, связанного с клетками в контрольном образце, при этом уровень связанного соединения-конъюгата нормализован относительно количества клеток, экспрессирующих представляющую интерес молекулу, в тестируемом и контрольном образцах, и при этом более высокий уровень связанного соединения-конъюгата в тестируемом образце по сравнению с контрольным образцом указывает на присутствие клеточно-пролиферативного нарушения, ассоциированного с клетками,

экспрессирующими представляющую интерес молекулу-мишень.

[0221] В определенных аспектах раскрытое в данном документе соединение-конъюгат можно применять в способе выявления представляющей интерес растворимой молекулы в крови или сыворотке. В некоторых аспектах способ включает приведение тестируемого образца крови или сыворотки от млекопитающего, предположительно испытывающего нарушение, ассоциированное с представляющей интерес молекулой, в контакт с раскрытым в данном документе соединением-конъюгатом и выявление повышения количества представляющих интерес растворимых молекул в тестируемом образце относительно контрольного образца крови или сыворотки от здорового млекопитающего. В некоторых аспектах способ выявления является пригодным в качестве способа диагностирования нарушения, ассоциированного с повышением количества представляющих интерес растворимых молекул в крови или сыворотке млекопитающего.

[0222] В определенных аспектах раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты можно применять в качестве биомаркеров для визуализации и зондов различными способами и методиками биомедицинской и молекулярной визуализации, такими как: (i) MRI (магниторезонансная визуализация); (ii) MicroCT (компьютерная томография); (iii) SPECT (однофотонная эмиссионная компьютерная томография); (iv) PET (позитрон-эмиссионная томография) (см. Chen et al. (2004) Bioconjugate Chem. 15: 41-49); (v) билюминесценция; (vi) флуоресценция и (vii) ультразвуковое исследование. Иммуноскинтиграфия представляет собой процедуру визуализации, при которой полученные из антител соединения, меченые радиоактивными веществами, вводят пациенту-животному или пациенту-человеку и делают снимки участков в теле, где локализуется антитело (патент США № 6528624). Биомаркеры для визуализации можно объективно измерить и оценить как индикатор нормального биологического процесса, патогенного процесса или фармакологических ответов на терапевтическое вмешательство. Биомаркеры для визуализации могут предоставить фармакодинамическую (PD) терапевтическую информацию о: (i) экспрессии белка-мишени, (ii) связывании терапевтического средства с белком-мишенью, т. е. селективности, и (iii) фармакокинетических данных клиренса и периода полувыведения.

VIII. Способы лечения

[0223] Настоящее раскрытие также предусматривает способ лечения рака, аутоиммунных, воспалительных или инфекционных заболеваний или нарушений у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту раскрытого в данном документе соединения-конъюгата. В некоторых аспектах способ дополнительно включает применение дополнительной терапии, где дополнительная терапия представляет собой, например, химиотерапию, биологическую терапию, иммунотерапию, лучевую терапию, гормональную терапию и оперативное вмешательство. Также предусмотрен способ доставки гетерологичного фрагмента, например, терапевтического средства, в клетку, включающий обработку клетки раскрытым в данном документе соединением-конъюгатом. В некоторых аспектах соединение-конъюгат может интернализироваться клеткой.

[0224] В различных аспектах раскрытое в данном документе соединение-конъюгат можно вводить в клетки, например, раковые клетки. Биологическим эффектом соединения-конъюгата может быть, например, уничтожение клетки, ингибирование клеточной пролиферации, лишение ее воздействия, изменения морфологии клетки или изменения характера роста клетки. В некоторых аспектах соединение-конъюгат содержит детектируемую метку, описанную выше. В определенных аспектах метка

указывает на локализацию опухолевого антигена в клетке.

[0225] В определенных аспектах соединение-конъюгат можно вводить субъекту, нуждающемуся в лечении. В различных аспектах соединение-конъюгат несет лекарственное средство или токсин целенаправленно к опухолевому антигену. В некоторых аспектах соединение-конъюгат несет детектируемую метку, посредством которой мишень, например, антиген, можно идентифицировать и определить локализацию. Некоторые аспекты включают выявление биологического эффекта, например, терапевтического эффекта, соединения-конъюгата. В определенных аспектах за состоянием субъекта можно наблюдать. Лечебную дозу соединения-конъюгата можно регулировать в соответствии с наблюдением.

[0226] Раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты и композиции, содержащие таковые, являются пригодными для многих целей, например, в качестве терапевтических средств для предупреждения, сдерживания развития или лечения широкого спектра хронических и острых заболеваний, в том числе без ограничения аутоиммунных и/или воспалительных нарушений, гиперпролиферативных нарушений, таких как доброкачественные или злокачественные опухоли, лейкоз и лимфолейкозы; инфекционных заболеваний, в том числе вирусных, бактериальных и грибковых заболеваний. В некоторых аспектах раскрытые в данном документе композиции и способы можно применять с одной или несколькими традиционными терапиями, которые применяют для предупреждения, сдерживания развития или лечения вышеуказанных заболеваний и нарушений. В некоторых аспектах также предусмотрены способы применения раскрытых в данном документе соединений-конъюгатов для инактивации различных инфекционных агентов, таких как вирусы, грибки, эукариотические микроорганизмы и бактерии.

[0227] В некоторых аспектах также предусмотрены способы применения раскрытых в данном документе соединений-конъюгатов и композиций, содержащих таковые, для истощения популяции клеток. В аспекте представленные в данном документе способы можно применять для истощения следующих типов клеток: эозинофилов, базофилов, нейтрофилов, Т-клеток, В-клеток, тучных клеток, моноцитов, эндотелиальных клеток и опухолевых клеток.

[0228] В определенных аспектах раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты и композиции, содержащие таковые, могут быть также пригодными для диагностирования и выявления заболеваний и их симптомов. В некоторых аспектах композиции могут быть пригодными для наблюдения прогрессирования заболевания. В различных аспектах композиции могут быть пригодными для наблюдения курсов лечения. В определенных аспектах композиции являются пригодными для диагностики в условиях *ex vivo*, как например, с использованием диагностического набора.

[0229] В некоторых аспектах раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты и композиции, содержащие таковые, могут нацеливаться на антигены, являющиеся рецепторами клеточной поверхности, которые интернализуются. В определенных аспектах антиген-мишень представляет собой внеклеточный антиген. В некоторых аспектах мишень представляет собой внутриядерный антиген. В некоторых аспектах раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты сразу после связывания интернализуются клетками, при этом интернализация по меньшей мере на приблизительно 10%, по меньшей мере на приблизительно 20%, по меньшей мере на приблизительно 30%, по меньшей мере на приблизительно 40%, по меньшей мере на приблизительно 50%, по меньшей мере на приблизительно 60%, по меньшей мере на приблизительно 70%, по меньшей мере на приблизительно 80% или по меньшей мере

на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 100%, по меньшей мере на приблизительно 110%, по меньшей мере на приблизительно 130%, по меньшей мере на приблизительно 140%, по меньшей мере на приблизительно 150%, по меньшей мере на приблизительно 160% или по меньшей мере на приблизительно 170% превышает интернализацию контрольных антител.

[0230] В определенных вариантах осуществления раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты сразу после связывания интернализуются клетками, при этом интернализация составляет 1-10%, 10-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, 50-60%, 60-70%, 70-80%, 80-90%, 90-100%, 100-110%, 110-120%, 120-130%, 130-140%, 140-150%, 150-160%, 160-170% или больше по сравнению с контрольными антителами.

IX. Наборы

[0231] Настоящее раскрытие также предусматривает изделия, например, наборы, которые содержат раскрытое в данном документе соединение-конъюгат, которые можно применять для проведения описанных в данном документе способов. В определенных аспектах набор содержит по меньшей мере одно очищенное соединение-конъюгат в одном или нескольких контейнерах. В некоторых аспектах наборы содержат компоненты, необходимые и/или достаточные для проведения анализа выявления, в том числе все контроли, указания для проведения анализов и, например, любое необходимое программное обеспечение для анализа и представления результатов. Специалисту в данной области будет понятно, что раскрытые в данном документе соединения-конъюгаты можно с легкостью задействовать в одном из установленных форматов набора, которые хорошо известны из уровня техники. В некоторых аспектах набор содержит контейнер и этикетку или инструкцию по применению на контейнере или в объединении с ним. Подходящие контейнеры включают, например, сосуды, флаконы, шприцы, блистерные упаковки и т. д. Контейнеры могут быть изготовлены из ряда материалов, таких как стекло или пластмасса. В некоторых аспектах контейнер может вмещать композицию, содержащую раскрытое в данном документе соединение-конъюгат, которая эффективна для лечения конкретного заболевания или состояния, и может иметь стерильное вводное отверстие (например, контейнер может представлять собой пакет с раствором для внутривенного введения или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). Этикетка или инструкция по применению может указывать, что композиция применяется для лечения выбранного состояния, такого как, рак. Альтернативно или дополнительно, набор может дополнительно содержать второй (или третий) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-буферный солевой раствор, раствор Рингера и декстрозный раствор. Набор может дополнительно включать другие материалы, требуемые с точки зрения производителя и потребителя, в том числе другие буферы, растворители, фильтры, иглы и шприцы.

[0232] Все из цитируемых выше ссылок, а также все ссылки, цитируемые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0233] Следующие примеры представлены в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения.

Примеры

Пример 1

Сканирование цистеина в Fc

[0234] 187 аминокислот Fc-участка по отдельности мутировали на цистеин с применением набора для мутагенеза QuikChange. Уровни экспрессии и агрегации исследовали в высокопроизводительной мелкомасштабной системе трансфекции и

экспрессии. Эффективность конъюгирования изначально исследовали посредством способа высокопроизводительного автоматизированного конъюгирования на твердой фазе с применением автоматизированного прибора для микроэкстрагирования PhyNexus и нормализовали относительно эффективности конъюгирования Fc-T289. (В этом анализе Fc-T289С характеризовался эффективностью конъюгирования выше 95%.)

[0235] Неавтоматизированное среднemasштабное конъюгирование в жидкой фазе проводили для подтверждения эффективности конъюгирования с использованием мутаций, которые характеризовались эффективностью конъюгирования по меньшей мере приблизительно 50% от наблюдаемой для T289С. Fc-мутанты экспрессировали во встряхиваемых колбах и определяли уровень экспрессии в кондиционированных средах. Fc-мутанты очищали на белке А и уровень агрегации анализировали посредством SEC.

[0236] В таблице 2 показаны данные о конъюгировании и мелкомасштабной экспрессии для мутантов, характеризующихся эффективностью конъюгирования по меньшей мере 50% от наблюдаемой для T289С в способе с применением Phynexus.

Значения эффективности конъюгирования >100% выделены жирным и подчеркнуты; 80-100% - подчеркнуты; 50-80% - представлены неформатированным текстом. Клоны с эффективностью конъюгирования менее 50% не показаны. В таблице 3 также представлены значения эффективности конъюгирования для выбранных мутантов, определенные с применением неавтоматизированного конъюгирования в жидкой фазе. В таблице 3 показан уровень экспрессии и процентное содержание мономеров для выбранных мутантов.

[0237] Эффективность конъюгирования E258С и H435С с AF488 также измеряли посредством масс-спектрометрии и сравнивали с эффективностью сообщаемых ранее мутаций в Fc S239С, T289С и мутации V205С в легкой цепи (упоминаемой в данном документе как LC-V205С). Как обобщено в таблице 4 все мутации характеризовались эффективностью конъюгирования около 100% (DAR=2 означает 100% конъюгирование). Антитело дикого типа включали в качестве отрицательного контроля (т. е. без сконструированных остатков цистеина).

[0238] Как можно увидеть исходя из этих исследований, остатки цистеина, сконструированные в большинстве сайтов, представленных в таблице 2 ниже, характеризовались эффективностью конъюгирования по меньшей мере ~50 и хорошо экспрессировались. Эти сайты могут быть пригодными для получения конъюгатов на основе антитела или Fc-гибридного белка. В частности, сконструированные остатки цистеина в ряде положений, в том числе 258, 274, 286, 289, 291, 293, 296, 318, 329, 340, 341, 342, 345, 401, 415, 433, 435 и 443, характеризовались очень высокой эффективностью конъюгирования в одном или обоих форматах анализа и хорошо экспрессировались. Применение сконструированных остатков цистеина в одном или нескольких из этих сайтов предусмотрено для эффективного получения сайт-специфических конъюгатов на основе антитела или Fc-гибридного белка.

ТАБЛИЦА 2. Обобщенные результаты исследований эффективности конъюгирования

Домен	Положение	Мутация	Конъюгирование с применением Phynexus, % от T289С	Неавтоматизированная конъюгирование, % от T289С	Экспрессия в 96 лунках (Octet), мг/л
CH2	241	F241C	66,3	100,1	229
CH2	243	F243C	64,1	115,4	211
CH2	246	K246C	68,0	104,2	209,5
CH2	251	L251C	52,3	Н.о.	232,5
CH2	253	I253C	57,2	Н.о.	105,5
CH2	254	S254C	101,2	90,6	193,5

	CH2	258	E258C	<u>114,3</u>	<u>143,4</u>	120,5
	CH2	264	V264C	<u>85,6</u>	<u>148</u>	239
	CH2	269	E269C	<u>115,6</u>	<u>123,5</u>	234
	CH2	271	P271C	<u>107,9</u>	<u>101,2</u>	189
5	CH2	272	E272C	<u>122,6</u>	<u>130</u>	177,5
	CH2	274	K274C	<u>95,4</u>	<u>146,8</u>	198
	CH2	280	D280C	67,0	низкая экспрессия	69
	CH2	281	G281C	<u>107,6</u>	<u>141,7</u>	Н.о.
	CH2	283	E283C	<u>100,9</u>	<u>90,6</u>	183
	CH2	284	V284C	62,4	<u>125,5</u>	246,5
10	CH2	285	H285C	78,2	<u>176</u>	249
	CH2	286	N286C	<u>123,6</u>	<u>123,2</u>	236
	CH2	288	K288C	<u>86,0</u>	<u>128,1</u>	193
	CH2	291	P291C	<u>128,8</u>	<u>138</u>	192
	CH2	293	E293C	<u>104,6</u>	<u>120</u>	176
	CH2	294	E294C	76,9	<u>90,6</u>	212,5
15	CH2	296	Y296C	<u>118,1</u>	<u>130,8</u>	215,5
	CH2	299	T299C	53,1	Н.о.	167
	CH2	301	R301C	62,2	<u>130,5</u>	253
	CH2	307	T307C	50,8	Н.о.	189
	CH2	309	L309C	<u>84,7</u>	низкий % мономеров	220
	CH2	311	Q311C	55,2	Н.о.	192
20	CH2	318	E318C	<u>97,5</u>	<u>104</u>	236,5
	CH2	329	P329C	<u>90,4</u>	<u>122,6</u>	203
	CH2	340	K340C	<u>95,0</u>	<u>123,6</u>	220
	CH3	341	G341C	<u>124,3</u>	<u>146,5</u>	116,5
	CH3	342	Q342C	<u>117,1</u>	<u>126</u>	107,5
25	CH3	345	E345C	<u>123,7</u>	<u>121,2</u>	122
	CH3	355	R355C	<u>91,3</u>	<u>85,5</u>	122
	CH3	357	E357C	58,5	65,4	128
	CH3	358	L358C	51,8	79,5	120,5
	CH3	375	S375C	61,3	72,0	123,5
	CH3	385	G385C	77,2	<u>125,2</u>	195
30	CH3	386	Q386C	69,0	<u>129,4</u>	176
	CH3	387	P387C	53,4	<u>105,9</u>	236
	CH3	390	N390C	78,5	<u>126,4</u>	Н.о.
	CH3	401	D401C	<u>106,6</u>	<u>93,8</u>	149,3
	CH3	402	G402C	78,0	<u>86,4</u>	201,5
	CH3	411	T411C	53,9	Н.о.	146,3
35	CH3	413	D413C	<u>93,2</u>	44,9	153,3
	CH3	415	S415C	<u>121,6</u>	<u>95,6</u>	109,8
	CH3	417	W417C	57,3	32,5	88,1
	CH3	418	Q418C	71,8	<u>91,0</u>	117,3
	CH3	433	H433C	<u>84,8</u>	<u>136,5</u>	166
	CH3	435	H435C	51,2	<u>118,5</u>	79
40	CH3	439	K439C	<u>93,7</u>	<u>77,7</u>	162
	CH3	443	L443C	<u>90,5</u>	<u>94,3</u>	175

ТАБЛИЦА 3. Уровень экспрессии и процентное содержание мономеров для выбранных мутантов

Мутант	Экспрессия (мг/л)	% мономеров	Мутант	Экспрессия (мг/л)	% мономеров
IC1-WT	130	96,3	Q342C	85	95,8
S254C	107	76,4	E345C	113	96,4
E258C	152	95,4	R355C	122	95,9

5	V264C	216	94,7	L358C	87,8	95
	E269C	130	94,4	S375C	101,5	96
	P271C	131	94,5	G385C	87,2	72
	E272C	113	81	Q386C	98,7	88
	K274C	110	91,8	P387C	57,9	67
	E283C	120	96	N390C	89,5	96
	H285C	150	86,4	D401C	140	77
	N286C	150	88,1	G402C	76,3	88
	K288C	105	93,9	T411C	116,4	95
	P291C	97	73	D413C	79,4	82
10	E293C	125	85,7	S415C	59,4	51
	E294C	173	80,7	W417C	138	94
	Y296C	115	90,3	Q418C	58,7	91
	R329C	109	95	H433C	84,9	66
	L309C	137	40,2	H435C	91,9	90
	E318C	131	95,5	K439C	103,5	98
15	K340C	111	95,4	L443C	98,4	96
	G341C	187	92,4			

ТАБЛИЦА 4. Эффективность конъюгирования, измеренная посредством масс-спектрометрии

Ab-конъюгат	DAR (IgG)	Соотношение при 2 лекарственных средствах (IgG)
1C1-E258C-AF488	2,04	98% (HC)
1C1-H435C-AF488	1,98	96% (HC)
1C1-S239C-AF488	1,98	96% (HC)
1C1-LC-V205C-AF488	2,06	99% (LC)
1C1-T289C-AF488	2,00	94% (HC)

Пример 2

Мутанты со вставкой и скрининг изначальной стабильности в сыворотке

[0239] Помимо цистеиновых замен, описанных в примере 1, получали два мутанта со вставкой, в которых остаток цистеина вставляли между остатками 239 и 240 (обозначенный C239ins) или между остатками 238 и 239 (обозначенный 238-ins). C239ins характеризовался сопоставимой с T289C эффективностью конъюгирования (см. таблицу 6 и не показанные в ней данные). Это было неожиданным, поскольку эффективность конъюгирования для мутации V24°С была очень низкой (только ~11%).

[0240] Ряд этих вариантов исследовали в отношении стабильности в сыворотке. Для анализов изначальной стабильности Alexa Fluor 488 C5-малеимид (AFF488) конъюгировали по выбранным сайтам в качестве суррогатной молекулы карго лекарственного средства для облегчения анализа. Образцы инкубировали с сывороткой здорового человека (NHS) или буфером PBS в течение 3-7 дней. После инкубирования с NHS или PBS применяли анализ эксклюзионной хроматографии (SEC) с детекцией по флуоресценции для отслеживания стабильности конъюгатов, содержащих AFF488.

Процент флуоресценции, остающийся при пике IgG, использовали для оценки стабильности. Для образцов, инкубируемых с сывороткой человека, процент переноса AF488 к сывороточному альбумину человека (HSA), основному резервуару обмена с лекарственным средством в сыворотке, может быть измеренным непосредственно как процент сигнала при пике HSA. На фигурах 2-8 показаны профили SEC для мутантов E258C, H435C, L443C, C239ins, S239C, LC-V205C и T289C, соответственно, и в том числе образцов, инкубированных с NHS (панели А и С) и PBS (панели В и D) в день 0 (панели А и В) в день 7 (панели С и D). Результаты этих исследований представлены в виде графика на фигуре 9 и обобщены в таблице 5.

[0241] Было обнаружено, что четыре сайта конъюгирования (E258C, H435C, L443C и C239ins), тестируемых в этих исследованиях, характеризовались по меньшей мере 70% интактного соединения-конъюгата после 7 дней инкубирования в сыворотке, подобно стабильности, наблюдаемой для нескольких антител, содержащих сообщаемые ранее мутации LC-V205C и S239C (см. таблицу 5).

ТАБЛИЦА 5. Стабильность выбранных Cys-мутантов, конъюгированных с AF488, после 7 дней инкубирования в сыворотке

Ab-конъюгат	% сохранения IgG-AF488 (день 7)	% HSA-AF488
1C1-E258C-AF488	81,48	14,2
1C1-H435C-AF488	89,92	9,01
1C1-L443C-AF488	83,83	13,14
1C1-239ins-AF488	75,77	17,0
1C1-S239C-AF488	77,05	17,6
1C1-LC-V205C-AF488	89,53	9,04
1C1-T289C-AF488	45,48	41,76

Пример 3

Измерения связывания с Fc-рецептором и термостабильности

[0242] Тестировали связывание нескольких мутантов с рядом Fc-рецепторов. В анализе ELISA связывание E258C, S239C, C239ins и LC-V205C с FcRn было сопоставимым с диким типом (WT) (фигура 10A). Кроме того, при конъюгировании с A488 связывание E258C, LC-V205C и S239C с FcRn было практически таким же (фигура 10B). Эти данные указывают на то, что эти мутации, даже при конъюгировании с лекарственным средством, не влияют на связывание с FcRn. В противоположность этому, мутация H435C предотвращала связывание с FcRn (данные не показаны), что соответствует ранее сообщаемым наблюдениям, что для связывания с FcRn необходим положительно заряженный остаток в положении согласно EU 435.

[0243] Анализ BIACORE проводили для определения аффинности C239ins, S442C и тройной мутации L234F/S239A/S442C в отношении Fc-рецепторов человека: FcγRI, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa (как 158V, так и 158F аллелей) и FcRn. Данные, представленные на фигуре 11, демонстрируют, что C239ins снижала связывание с FcγRI, предотвращала связывание с FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa (как 158V, так и 158F аллелей), но имела весьма незначительное влияние на связывание с FcRn. В противоположность этому, S442C имела небольшое влияние на связывание с любым тестируемым Fc-рецептором. Как и ожидалось добавление L234F и S239A, мутаций, как сообщалось, снижающих связывание с определенными FcγR, приводило в результате к значительно сниженному связыванию с FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa (как 158V, так и 158F аллелей). Таким образом, мутация C239ins может быть особенно пригодной для получения сайт-специфических конъюгатов на основе антитела или Fc-гибрида, если эффекторная функция не является требуемой.

[0244] Дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC) применяли для изучения термостабильности E258C, S239C, LC-V205C, C239ins и H435C по сравнению с диким типом (WT). Как показано на фигуре 12, профили DSC в отношении мутаций E258C, S239C и LC-V205C были практически такими же как в отношении WT, указывая на то, что эти мутации не влияют на термостабильность модельного IgG1 1C1, как измерено посредством DSC. Появлялся новый более низкий пик плавления как для C239ins, так и H435C, однако значение Tm1 оставалось выше 60°C для обеих мутаций, указывая только на минимальное влияние на термостабильность для этих мутаций.

Пример 4

Стабильность конъюгатов с токсином и одиночной мутацией в сыворотке по

цитотоксичности

[0245] 1C1-Fc-Cys-мутанты-конъюгаты с 2 лекарственными средствами/Ab тестировали на стабильность в сыворотке в анализе цитотоксичности: 1C1-S239C, 1C1-E258C, 1C1-H435C, 1C1-L443C, 1C1-LC-V205C, 1C1-239ins и 1C1-T289C. Также тестировали контроль 1C1-ccADC с 6 лекарственными средствами/Ab, полученный с помощью классического конъюгирования, R347-S239C - отрицательный контроль для анализа цитотоксичности и 1C1-WT, служащий в качестве неконъюгированного контроля. Каждый конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) содержал токсин на основе ауристатиона.

[0246] Как показано в таблице 6, каждый из cys-мутантов характеризовался эффективностью конъюгирования 88-98%, в противоположность этому дикий тип показал конъюгирование на фоновом уровне - только 2%. ADC инкубировали с сывороткой в течение 0, 3 или 7 дней и анализировали в отношении цитотоксичности, как описано в примере 6 ниже. Цитотоксические кривые для каждой из одиночных мутаций и контролей нанесены на график на фигурах 13А, В и С (дни 0, 3 и 7, соответственно). Также ниже графиков в таблицах представлены значения EC_{50} . Все данные из этого исследования обобщены в таблице 7, и в ней представлены значения снижения кратности EC_{50} в день 3 и 7.

[0247] 1C1-E258C-ADC, 1C1-H435C-ADC, 1C1-L443C-ADC и 1C1-239ins-ADC были стабильными после инкубирования в сыворотке и сопоставимыми с другими сайтами, о которых сообщали, что они являются стабильными в сыворотке (например, LC-V205C), при связывании при помощи химического вещества малеимида. Значение EC_{50} для этих мутаций сохранялось даже после 7 дней инкубирования в сыворотке. 1C1-T289C-ADC несколько терял активность. См. таблицу 7. Подобные исследования проводили с применением 1C1-238-ins-ADC, однако эта мутация характеризовалась снижением EC_{50} более чем в 6,25 раз в течение 7 дней (данные не показаны), указывая на то, что конъюгирование при помощи химического вещества малеимида по этому сайту не является стабильным, и при этом оно быстро теряет активность при инкубировании в сыворотке.

[0248] Четыре сконструированных цистеиновых сайта в Fc-участке, расположенных в положениях согласно EU 258, 435 и 443 (E258C, H435C, L443C), и новый сконструированный сайт вставки, расположенный между положениями согласно EU 239 и 240 (239ins), идентифицировали как высокодоступные для конъюгирования и имеющие показательную стабильность в сыворотке.

ТАБЛИЦА 6. Эффективность конъюгирования 1C1-Fc-Cys-мутантов

Положение	Результаты масс-спектрометрии
1C1-S239C	97%
1C1-E258C	97%
1C1-T289C	92%
1C1-H435C	88%
1C1-L443C	97%
1C1-LC-V205C	98%
1C1-239ins	96%
R347-S239C	97%
1C1-WT	2%

ТАБЛИЦА 7. Значения EC_{50} для ADC на основе 1C1 с одиночной Cys-мутацией в отношении клеток DU145 и снижение цитотоксичности после инкубирования в сыворотке

	EC_{50} (нг/мл)	Снижение EC_{50} (кратность)
--	-------------------	--------------------------------

ADC	День 0	День 3	День 7	День 3	День 7
1C1-S239C-ADC	47,4	72,1	75,6	1,52	1,59
1C1-LC-V205C-ADC	47,2	37,8	42,2	0,80	0,89
1C1-T289C-ADC	78,3	181,7	199,3	2,32	2,55
1C1-E258C-ADC	59	48,9	53,9	0,83	0,91
1C1-H435C-ADC	70,1	75,7	95,2	1,08	1,36
1C1-239ins-ACD	60,9	84,3	91	1,38	1,49
1C1-L443C-ADC	52	54	51,2	1,04	0,98
1C1-ccADC	8,3	15,8	24	1,90	2,89

Пример 5

Стабильность конъюгатов с токсином и двойной Cys-мутацией в сыворотке по цитотоксичности

[0249] При некоторых применениях необходимым может быть иметь более двух лекарственных средств на антитело (т. е. значение DAR равное 4 или более). Cys-мутации, описанные выше, тестировали в различных комбинациях друг с другом и/или с другими мутациями, включая в некоторых случаях мутации L234F-L235F (обозначенные "FF"), для предотвращения Fc-опосредуемой эффекторной функции, и тестировали на стабильность в сыворотке с применением анализа цитотоксичности, описанного в примере 6. 1C1-Fc-2Cys-мутанты и конъюгаты с 4 лекарственными средствами на Ab тестировали на стабильность в сыворотке в анализе цитотоксичности: 1C1-239ins-E258C, 1C1-239ins-H435C, 1C1-239ins-S442C, 1C1-FF-E258C-H435C, 1C1-FF-E258C-S442C и 1C1-FF-H435C-S442C. Также в анализ цитотоксичности включали образец для сравнения 1C1-T289C - 2 лекарственных средства/Ab и отрицательный контроль R347-S239C - 2 лекарственных средства/Ab. Все ADC содержали токсин на основе ауристатиона, конъюгированный при помощи химического вещества малеимида.

[0250] Как показано в таблице 8, каждый из cys-мутантов характеризовался эффективностью конъюгирования ~92-100%. ADC инкубировали с сывороткой в течение 0, 3 или 7 дней и анализировали в отношении цитотоксичности, как описано в примере 6 ниже. Цитотоксические кривые для каждой из комбинации мутаций и контролей нанесены на графики на фигурах 14A, B и C (дни 0, 3 и 7, соответственно). Также ниже графиков в таблицах представлены значения EC₅₀. Все данные из этого исследования обобщены в таблице 9, и в ней представлены значения снижения кратности EC₅₀ в день 3 и 7.

[0251] Все тестируемые ADC на основе 1C1 с двойной Cys-мутацией были стабильными после инкубирования в сыворотке. Значение EC₅₀ сохранялось, особенно после 7 дней инкубирования в сыворотке. 1C1-T289C-ADC несколько терял активность. См. таблицу 9.

ТАБЛИЦА 8. Эффективность конъюгирования 1C1-Fc-Cys-мутантов

Положение-конъюгат	Результаты масс-спектрометрии
1C1-239ins-E258C-ADC	~100%
1C1-239ins-H435C-ADC	~100%
1C1-239ins-S442C-ADC	~100%
1C1-FF-E258C-H435C-ADC	~100%
1C1-FF-E258C-S442C-ADC	~100%
1C1-FF-H435C-S442C-ADC	~100%
1C1-T289C-ADC	~92%

ТАБЛИЦА 9. Значения EC₅₀ для ADC на основе 1C1 с двойной Cys-мутацией в отношении клеток DU145 и снижение цитотоксичности после инкубирования в сыворотке

ADC	EC50			Снижение EC50 (кратность)	
	День 0	День 3	День 7	День 3	День 7
1C1-239ins-E258C-ADC	25,2	32,43	25,87	1,29	1,03
1C1-239ins-H435C-ADC	32,79	44,75	41,84	1,36	1,28
1C1-239ins-S442C-ADC	46,01	47,94	35,11	1,04	0,76
1C1-FF-E258C-H435C-ADC	34,91	43,41	41,96	1,24	1,20
1C1-FF-E258C-S442C-ADC	31,7	44,21	30,66	1,39	0,97
1C1-FF-H435C-S442C-ADC	35,69	48,12	40,67	1,35	1,14
1C1-T289C-ADC	85	402,6	243,4	4,74	2,86

Пример 6

Материалы и способы

[0252] Мутирование Fc с цистеином. Тяжелую цепь человеческого IgG1, включая антитело 1C1, клонировали в однокассетный вектор pOE (MedImmune LLC) для удобства мутагенеза. 187 аминокислот Fc-области по отдельности мутировали на цистеин с применением набора для сайт-направленного мутагенеза II XL QuikChange (Agilent Technologies Inc., Санта-Клара, Калифорния) в формате 96-луночного планшета согласно инструкции производителя. Цистеиновую мутацию в каждом положении подтверждали посредством секвенирования. Подобную методику применяли для получения мутаций по типу вставки цистеина.

[0253] Высокопроизводительная мелкомасштабная трансфекция и экспрессия. Каппа-цепь 1C1 клонировали в pOE-каппа вектор (MedImmune LLC), ДНК вектора с каппа-цепью 1C1 и вектора с тяжелой цепью 1C1 (дикий тип или с мутированным цистеином) совместно трансфицировали в клетки 293F (Life Technologies, Гранд Айленд, Нью-Йорк) в 96-луночных планшетах, кондиционированную среду (СМ), содержащую экспрессированное антитело 1C1, собирали на 5 день после трансфекции, концентрацию антител в СМ определяли с применением Octet при помощи калибровочной кривой, построенной по очищенному антителу 1C1 WT, экспрессию также анализировали посредством белкового гель-электрофореза для оценки уровня агрегации.

[0254] Высокопроизводительное автоматизированное сайт-специфическое конъюгирование на твердой фазе. Alexa Fluor 488 C5-малеимид (Life Technologies, Гранд Айленд, Нью-Йорк) применяли в качестве суррогатной молекулы карго лекарственного средства для облегчения анализа. Высокопроизводительное автоматизированное конъюгирование проводили с применением автоматизированного прибора для микроэкстрагирования (МЕА) PhyNexus (PhyNexus, Inc., Сан-Хосе, Калифорния). Антитело 1C1 в СМ захватывали иммобилизованным в наконечниках для пипеток Phynexus белком А, восстанавливали Tris(2-карбоксиэтил)фосфином (ТСЕР) (Thermo Scientific, Рокфорд, Иллинойс) для удаления захваченного цистеина, окисляли дегидроаскорбиновой кислотой (dhAA) (Sigma-Aldrich Corp., Сент-Луис, Миссури) для повторного образования внутрицепочечных дисульфидных связей антитела и конъюгировали с помощью 10-кратного избытка Alexa Fluor 488 C5-малеимида. Реакцию останавливали N-ацетил-L-цистеином (НАС) (Sigma-Aldrich Corp., Сент-Луис, Миссури), конъюгированные антитела элюировали буфером для элюции IgG.

[0255] Анализ эффективности конъюгирования. 1C1-T289C, который характеризовался эффективностью конъюгирования более 95%, определенной посредством масс-спектрометрического анализа, выбирали в качестве сравнительного контроля конъюгирования. Эффективность конъюгирования анализировали посредством SEC с детекцией по флуоресценции, T289C-AF488 применяли для построения калибровочной кривой: разные количества T289C-AF488 загружали в HPLC-SEC с детектором флуоресценции (Ex=494, Em=519). Для построения калибровочной кривой использовали

значение площади под кривой (AUC) при 280 нм (как ось X) и при 494 нм (как ось Y). Калибровочная кривая была линейной, R^2 был близок к 1. 25 мкл 1C1-мутант-AF488 загружали в колонку для SEC, значения площади при 280 и 494 каждого образца использовали для расчета эффективности конъюгирования, используя калибровочную кривую по T289C-AF488. Эффективность конъюгирования представляли как % от конъюгирования T289C, эффективность конъюгирования некоторых мутантов также измеряли посредством масс-спектрометрии, при этом они хорошо коррелировали.

[0256] Среднемасштабная экспрессия и неавтоматизированное конъюгирование.

Неавтоматизированное конъюгирование проводили для подтверждения эффективности конъюгирования. 1C1-Fc-мутанты с уровнем конъюгирования более 50% относительно сравнительного T289C, определенным посредством способа автоматизированного конъюгирования на твердой фазе, экспрессировали в клетках 293F во встряхиваемых колбах и уровень экспрессии в кондиционированной среде измеряли посредством HPLC с белком А. 1C1-Fc-мутанты очищали посредством аффинной хроматографии с белком А и уровень агрегации анализировали посредством SEC. Для неавтоматизированного конъюгирования 2 мг 1C1-Fc-мутантов восстанавливали в 50 мМ ТСЕР при 37°C в течение 3 часов для активации сконструированных остатков цистеина, с последующим обширным диализом в буфере для конъюгирования (PBS+1 мМ EDTA, рН 7,2) для удаления свободного цистеина, затем окисляли в 50 мМ dhAA при комнатной температуре в течение 4 часов для повторного образования внутрицепочечных дисульфидных связей. Это вещество конъюгировали с помощью 8-кратного молярного избытка Alexa Fluor 488 C5-малеимида при комнатной температуре в течение 1 часа, реакцию останавливали N-ацетил-L-цистеином (NAC), свободный неконъюгированный AF488 удаляли путем разведения и концентрирования образцов за 3 цикла в центрифужном концентраторе, конъюгированные 1C1-Fc-мутанты концентрировали до конечного объема 0,3-0,5 мл, концентрацию белка измеряли с применением наноклап. Эффективность конъюгирования измеряли посредством флуоресцентной SEC и масс-спектрометрии.

[0257] Инкубирование ADC в сыворотке для определения стабильности. 100 мкг конъюгированных с AF488 1C1-Fc-мутантов в 50 мкл PBS (20% от конечного объема) смешивали с 200 мкл сыворотки здорового человека или PBS (80% от конечного объема). После фильтрования 10 мкл смеси загружали в колонку для HPLC - SEC с детекцией по флуоресценции для получения профилей флуоресценции в контрольный день 0 инкубирования в сыворотке. Остальную часть каждой смеси инкубировали при 37°C в течение 3 дней и 7 дней. Профили флуоресценции получали тем же путем, что и для образцов в день 0. Стабильность в сыворотке анализировали путем разделения пиковой флуоресценции (площадь) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) на общую флуоресценцию (площадь) с получением процентного соотношения флуоресценции ADC для каждого момента времени. % флуоресценции, остающийся при пике IgG в 0 день, 3 день и 7 день, использовали для оценки стабильности. Новый пик флуоресценции в площади, соответствующей сывороточному альбумину человека (HSA), наблюдали для образцов, инкубируемых 3 дня или 7 дней в сыворотке. Этот пик рассчитывали для оценки процентного соотношения конъюгатов, перенесенных к HSA.

[0258] Связывание с FcRn, ELISA. Половину лунок в планшетах для ELISA покрывали 5 мкг/мл каждого 1C1 Fc-Cys мутанта при 4°C в течение ночи, промывали PBST, рН 5,8, и блокировали блокирующим буфером на основе рыбного желатина, рН 5,8 при КТ в течение 1 часа. 0,02-100 мкг/мл биотинилированного FcRn (разведенного в блокирующем буфере на основе рыбного желатина, рН 5,8, всего 11 разведений), добавляли в лунки

и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. Планшеты промывали PBST, pH 5,8, и добавляли стрептавидин-HRP, и инкубировали при КТ в течение 40 мин., проявление результатов ELISA осуществляли с помощью TMB и останавливали с помощью 0,2 н. H₂SO₄. Измеряли OD450 с помощью многоканального ридера EnVision

2104 (PerkinElmer, Уолтем, Массачусетс), анализировали EC50 с помощью программного обеспечения Prism 5 с использованием зависимости ответа от логарифма концентрации агониста с аппроксимацией кривой с переменным наклоном в качестве модели (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния).

[0259] Измерение равновесных констант связывания с FcγR. Константы связывания (KD) относительно связывания IgG с hFcγR измеряли на приборе ProteOn XPR36. Вкратце, антитела иммобилизовали при высокой плотности на сенсорном чипе GLC при помощи стандартного химического вещества для связывания с аминогруппой, как изложено в инструкции к прибору производителя. Измеренная конечная плотность IgG на поверхности составляла приблизительно 3000 RU (резонансных единиц). На этом сенсорном чипе также получали эталонную проточную ячейку с применением такого же протокола за исключением IgG. Основные растворы каждого hFcγR получали в концентрации 4000 нМ, 16000 нМ или 32000 нМ в прилагаемом к прибору буфере (буфер на основе фосфатно-солевого буферного раствора [PBS]/Tween/этилендиаминтетрауксусной кислоты [EDTA], содержащий 50 мМ фосфата, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ EDTA и 0,005% Tween-20), а затем последовательно разводили (1:3) в том же буфере с получением партий с требуемой концентрацией для каждого рецептора: 1,82-4000 нМ (hFcγRI), 197,5-16000 нМ (hFcγRIIA), 395,1-16000 нМ (hFcγRIIb), 21,9-16000 нМ (hFcγRIIA-158V) и 395-32000 нМ (hFcγRIIA-158F). FcγR каждой концентрации наносили на поверхности ячейки с 5T4-108-маia IgG и эталонной ячейки при скорости потока 25 мкл/мин. в течение 8 мин., на протяжении чего собирали данные о связывании. В промежутках между введениями восстанавливали поверхности (т. е. удаляли связанный FcγR) с помощью 60-секундной импульсной обработки 5 мМ HCl. В ходе серии введений также делали вразброс несколько введений буфера. Затем одно из этих введений буфера вместе с данными от эталонной ячейки использовали для корректировки данных о связывании в отношении любых артефактов введения (например, неспецифического связывания) посредством методики, обычно называемой "двойной контроль" (Myszka, 1999). После сбора всех данных о связывании, отдельные наборы данных усредняли относительно связывания (ответ в равновесном состоянии [Req]) при каждой концентрации (C), а затем аппроксимировали с получением графика изотермы связывания 1:1 (Req в зависимости от C). Исходя из этого получали значения равновесных констант связывания KD с применением программного обеспечения версии 3.1.0.6 поставщика.

[0260] Измерение равновесных констант связывания с белком FcRn человека. Аффинность (KD) относительно связывания IgG с белком FcRn человека (huFcRn) измеряли на приборе ProteOn XPR36. Вкратце, антитела иммобилизовали при высокой плотности на сенсорном чипе GLC при помощи стандартного химического вещества для связывания с аминогруппой, как описано выше. Основные растворы каждого hFcγR получали в концентрации 3000 нМ в прилагаемом к прибору буфере (50 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 6, содержащий 150 мМ NaCl и 0,05% Tween-20), а затем последовательно разводили (3:1) до 1,37 нМ в том же буфере. FcRn каждой концентрации последовательно вводили на поверхности ячейки с 5T4-108-маia IgG и эталонной ячейки, соединенных последовательно, при скорости потока 25 мкл/мин. в течение 16 мин. Собирали данные о связывании, с последующим 60-секундным введением 50 мМ натрий

фосфатного буфера, pH 7,4, содержащего 150 мМ NaCl и 0,05% Tween 20, в промежутках между введением каждого рецептора или холостого буфера для восстановления поверхности IgG (т. е. удаления связанного белка FcRn). В ходе серии введений также делали вразброс несколько введений буфера. Затем одно из этих введений буфера использовали вместе с данными от эталонной ячейки для корректировки наборов необработанных данных в отношении артефактов введений (например, неспецифического связывания) посредством "двойного контроля" (Myszka, 1999). После сбора всех данных о связывании, отдельные наборы данных усредняли относительно связывания (Req) при каждой концентрации (C), а затем аппроксимировали с получением графика изотермы связывания 1:1 (Req в зависимости от C). Исходя из этого получали значения равновесных констант связывания KD с применением программного обеспечения BIAevaluation версии 4.1 поставщика.

[0261] Измерение термостабильности. Профили термического разворачивания 1C1 Fc-Cys мутантов измеряли посредством дифференциальной сканирующей калориметрии (VP-DSC, MicroCal, LLC, Нортхэмптон, Массачусетс). 0,503 мл 1C1 Fc-Cys мутанта в концентрации 1 мг/мл в 25 мМ гистидиновом буфере, pH 6,0 загружали в камеру, сканировали при 1°C/мин. от 20°C до 110°C. Точки перехода (значения T_m) из данных термограммы определяли при помощи модели без перехода двух фаз в программном обеспечении Origin 7, предоставляемом производителем.

[0262] Конъюгирование с токсином. 2 мг каждого Fc-Cys-мутантного 1C1 и мутантного контроля сравнения конъюгировали с токсином 1 или токсином 2 при помощи того же способа, как конъюгирование с AF488, описанное выше. Несвязанное лекарственное средство удаляли посредством жидкостной хроматографии на СНТ типа II (керамическом гидроксипатите), элюировали при градиенте NaCl 0-2 М в 10 мМ фосфатном буфере, pH 7,0. Пик мономерного ADC собирали и диализировали в 25 мМ гистидине, pH 6,0 с 7% сахарозы, и концентрировали до 0,3-0,5 мл. Эффективность конъюгирования анализировали посредством масс-спектрометрии.

[0263] Анализ цитотоксичности для определения стабильности ADC в сыворотке. Инкубирование ADC в сыворотке проводили таким же образом, как описано выше. Клетки DU-145 высевали в 96-луночный планшет с белыми стенками (VWR, Раднор, Пенсильвания): 2000 клеток в 80 мкл/луночку, и выращивали в течение ночи в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂. Образцы сыворотки с ADC разбавляли до 0,004-80 мкг/мл культуральной средой, 20 мкл разбавленной сыворотки с ADC добавляли к 80 мкл клеток в трех повторениях. Конечные концентрации ADC в культуре составляли 0,0008-16 мкг/мл, клетки инкубировали в инкубаторе в течение еще 3 дней и жизнеспособные клетки определяли с применением набора для люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo (Promega, Мэдисон, Висконсин). Сигнал люминесценции измеряли с помощью многоканального ридера EnVision 2104 (PerkinElmer, Уолтем, Массачусетс) и значение EC50 уничтожения клеток анализировали с помощью программного обеспечения Prism 5 с использованием зависимости ответа от логарифма концентрации агониста с аппроксимацией кривой с переменным наклоном в качестве модели (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния).

[0264] Предусмотренные в данном документе варианты осуществления были описаны выше с помощью функциональных структурных элементов, иллюстрирующих воплощение указанных функций и взаимосвязей между ними. Границы этих функциональных структурных элементов были определены в настоящем документе произвольно для удобства описания. Альтернативные границы могут быть определены

при условии, что указанные функции и взаимосвязи между ними выполняются надлежащим образом.

[0265] Вышеизложенное описание конкретных вариантов осуществления достаточно для предоставления возможности другим, оруduющим знанием в данной области, без труда модифицировать и/или адаптировать для различных применений такие конкретные варианты осуществления, без необходимости проведения излишних экспериментов, не отклоняясь при этом от общих концепций, представленных в данном документе. Следовательно, такие адаптации и модификации предназначены для нахождения в пределах значения и диапазона эквивалентов раскрытых вариантов осуществления, основанных на идее и принципе, представленных в настоящем документе. Следует понимать, что формулировки или терминология в настоящем документе предназначены для целей описания, а не ограничения, поэтому терминологию или формулировки в настоящем описании квалифицированному специалисту следует интерпретировать в свете идей и принципов.

[0266] Широта и объем настоящего раскрытия не должны ограничиваться ни одним из описанных выше иллюстративных вариантов осуществления, но должны определяться только в соответствии с нижеследующими пунктами формулы изобретения и их эквивалентами.

SEQUENCE LISTING

<110> MEDIMMUNE, LLC

<120> КОНЪЮГИРОВАННЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, СОДЕРЖАЩИЕ СКОНСТРУИРОВАННЫЕ С ЦИСТЕИНОМ АНТИТЕЛА

<130> CYS-115WO1

<140> PCT/US2015/025237

<141> 2015-04-10

<150> 61/978,481

<151> 2014-04-11

<160> 18

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 6

<212> Белок

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<223> Описание Искусственной Последовательности: Синтетическая

6xHis метка

<400> 1

His His His His His His

1. 5

<210> 2

<211> 250

<212> Белок

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<223> Описание Искусственной Последовательности: Синтетический

полипептид

<220>

<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК

<222> (1) .. (4)

- <223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
 <220>
 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 5 <222> (5)..(5)
 <223> Могут присутствовать или отсутствовать
 <220>
 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (6)..(9)
 10 <223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
 <220>
 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (10)..(10)
 15 <223> Могут присутствовать или отсутствовать
 <220>
 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (11)..(14)
 <223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые
 20 положения могут отсутствовать
 <220>
 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (15)..(15)
 <223> Могут присутствовать или отсутствовать
 25 <220>
 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (16)..(19)
 <223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые
 положения могут отсутствовать
 30 <220>
 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (20)..(20)
 <223> Могут присутствовать или отсутствовать
 <220>
 35 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (21)..(24)
 <223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые
 положения могут отсутствовать
 <220>
 40 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (25)..(25)
 <223> Могут присутствовать или отсутствовать
 <220>
 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 45 <222> (26)..(29)
 <223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые
 положения могут отсутствовать
 <220>

- <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (30)..(30)
 <223> Могут присутствовать или отсутствовать
 <220>
- 5 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (31)..(34)
 <223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
 <220>
- 10 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (35)..(35)
 <223> Могут присутствовать или отсутствовать
 <220>
- 15 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (36)..(39)
 <223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
 <220>
- 20 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (40)..(40)
 <223> Могут присутствовать или отсутствовать
 <220>
- 25 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (41)..(44)
 <223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
 <220>
- 30 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (45)..(45)
 <223> Могут присутствовать или отсутствовать
 <220>
- 35 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (46)..(49)
 <223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
 <220>
- 40 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (50)..(50)
 <223> Могут присутствовать или отсутствовать
 <220>
- 45 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (51)..(54)
 <223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
 <220>
- 50 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (55)..(55)
 <223> Могут присутствовать или отсутствовать

- <220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (56)..(59)
<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые
5 положения могут отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (60)..(60)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
10 <220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (61)..(64)
<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые
положения могут отсутствовать
15 <220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (65)..(65)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
20 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (66)..(69)
<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые
положения могут отсутствовать
<220>
25 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (70)..(70)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
30 <222> (71)..(74)
<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые
положения могут отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
35 <222> (75)..(75)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (76)..(79)
40 <223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые
положения могут отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (80)..(80)
45 <223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (81)..(84)

- <223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
- 5 <222> (85)..(85)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (86)..(89)
- 10 <223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (90)..(90)
- 15 <223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (91)..(94)
- 20 <223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (95)..(95)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
- 25 <220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (96)..(99)
- 30 <223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (100)..(100)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
- 35 <220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (101)..(104)
<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
<220>
- 40 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (105)..(105)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
- 45 <222> (106)..(109)
<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
<220>

- <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (110)..(110)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
- 5 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (111)..(114)
<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
<220>
- 10 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (115)..(115)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
- <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
15 <222> (116)..(119)
<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
<220>
- <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
20 <222> (120)..(120)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
- <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (121)..(124)
25 <223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
<220>
- <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (125)..(125)
30 <223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
- <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (126)..(129)
<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые
35 положения могут отсутствовать
<220>
- <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (130)..(130)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
40 <220>
- <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (131)..(134)
<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые
положения могут отсутствовать
45 <220>
- <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (135)..(135)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать

- <220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (136)..(139)
<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые
5 положения могут отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (140)..(140)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
10 <220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (141)..(144)
<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые
положения могут отсутствовать
15 <220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (145)..(145)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
20 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (146)..(149)
<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые
положения могут отсутствовать
<220>
25 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (150)..(150)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
30 <222> (151)..(154)
<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые
положения могут отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
35 <222> (155)..(155)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (156)..(159)
40 <223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые
положения могут отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (160)..(160)
45 <223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (161)..(164)

- <223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
- 5 <222> (165)..(165)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (166)..(169)
- 10 <223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (170)..(170)
- 15 <223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (171)..(174)
- <223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
20 <220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (175)..(175)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
- 25 <220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (176)..(179)
- <223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
30 <220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (180)..(180)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
- 35 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (181)..(184)
<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
<220>
- 40 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (185)..(185)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
- 45 <222> (186)..(189)
<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
<220>

- <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (190)..(190)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
- 5 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (191)..(194)
<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
<220>
- 10 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (195)..(195)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
- 15 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (196)..(199)
<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
<220>
- 20 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (200)..(200)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
- 25 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (201)..(204)
<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
<220>
- 30 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (205)..(205)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
- 35 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (206)..(209)
<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
<220>
- 40 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (210)..(210)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
- 45 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (211)..(214)
<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
<220>
- <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (215)..(215)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать

- <220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (216)..(219)
<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые
5 положения могут отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (220)..(220)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
10 <220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (221)..(224)
<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые
положения могут отсутствовать
15 <220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (225)..(225)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
20 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (226)..(229)
<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые
положения могут отсутствовать
<220>
25 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (230)..(230)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
30 <222> (231)..(234)
<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые
положения могут отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
35 <222> (235)..(235)
<223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (236)..(239)
40 <223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые
положения могут отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (240)..(240)
45 <223> Могут присутствовать или отсутствовать
<220>
<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
<222> (241)..(244)

<223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
 <220>
 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 5 <222> (245)..(245)
 <223> Могут присутствовать или отсутствовать
 <220>
 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (246)..(249)
 10 <223> Данный участок может содержать 1-4 остатка, где некоторые положения могут отсутствовать
 <220>
 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (250)..(250)
 15 <223> Могут присутствовать или отсутствовать
 <220>
 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (1)..(250)
 <223> Данная последовательность может содержать 1-50
 20 повторяющихся единиц "(Gly)x-(Ser)y", где x представляет собой 1 - 4, y представляет
 <220>
 <223> См. описание поданного изобретения для подробного описания
 замен и предпочтительных вариантов осуществления
 <400> 2
 25 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1. 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 30 35 40 45
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 50 55 60
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 65 70 75 80
 35 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 85 90 95
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 100 105 110
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 40 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 145 150 155 160
 45 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 165 170 175
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 180 185 190

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 195 200 205

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 210 215 220

5 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 245 250

<210> 3

10 <211> 100
 <212> Белок
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <223> Описание Искусственной Последовательности: Синтетический

15 полипептид
 <220>
 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (1)..(100)
 <223> Данная последовательность может содержать 1-100 остатков, где некоторые

20 положения могут отсутствовать
 <400> 3

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 1. 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 25 20 25 30

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 35 40 45

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 50 55 60

30 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 65 70 75 80

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 85 90 95

Gly Gly Gly Gly
 35 100

<210> 4
 <211> 4
 <212> Белок
 <213> Искусственная Последовательность

40 <220>
 <223> Описание Искусственной Последовательности: Синтетический
 пептид
 <400> 4

Gly Gly Gly Gly
 45 1

<210> 5
 <211> 200
 <212> Белок

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<223> Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полипептид

5 <220>

<221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК

<222> (1)..(200)

<223> Данная последовательность может содержать 1-100 повторяющихся единиц "Gly Ala", где некоторые положения могут отсутствовать

10 <400> 5

Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala
1. 5 10 15

Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala
20 25 30

15 Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala
35 40 45

Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala
50 55 60

20 Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala
65 70 75 80

Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala
85 90 95

Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala
100 105 110

25 Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala
115 120 125

Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala
130 135 140

30 Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala
145 150 155 160

Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala
165 170 175

Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala
180 185 190

35 Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala
195 200

<210> 6

<211> 300

<212> Белок

40 <213> Искусственная Последовательность

<220>

<223> Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полипептид

<220>

45 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК

<222> (1)..(300)

<223> Данная последовательность может содержать 1-100 повторяющихся единиц "Gly Gly Ser", где некоторые положения могут отсутствовать

<400> 6
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 1. 5 10 15
 Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 5 20 25 30
 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 35 40 45
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 50 55 60
 10 Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 65 70 75 80
 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 85 90 95
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 15 100 105 110
 Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 130 135 140
 20 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 165 170 175
 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 25 180 185 190
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 195 200 205
 Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 210 215 220
 30 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 225 230 235 240
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 245 250 255
 Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 35 260 265 270
 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 275 280 285
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 290 295 300
 40 <210> 7
 <211> 400
 <212> Белок
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 45 <223> Описание Искусственной Последовательности: Синтетический
 полипептид
 <220>
 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК

<222> (1)..(400)

<223> Данная последовательность может содержать 1-100 повторяющихся единиц "Gly Gly Gly Ser", где некоторые положения могут отсутствовать
<400> 7

5	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	1. 5	10	15
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	20	25	30
10	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	35	40	45
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	50	55	60
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	65	70	75
15	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	85	90	95
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	100	105	110
20	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	115	120	125
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	130	135	140
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	145	150	155
25	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	165	170	175
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	180	185	190
30	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	195	200	205
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	210	215	220
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	225	230	235
35	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	245	250	255
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	260	265	270
40	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	275	280	285
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	290	295	300
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	305	310	315
45	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	325	330	335
	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser	340	345	350

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 355 360 365

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 370 375 380

5 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 385 390 395 400

<210> 8
 <211> 800
 <212> Белок

10 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <223> Описание Искусственной Последовательности: Синтетический
 полипептид
 <220>

15 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (1)..(300)
 <223> Данный участок может содержать 1-100 повторяющихся
 единиц "Gly Gly Ser", где некоторые положения могут отсутствовать
 <220>

20 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (301)..(800)
 <223> Данный участок может содержать 1-100
 повторяющихся единиц "Gly Gly Gly Ser", где некоторые положения могут отсутствов
 <400> 8

25 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 1. 5 10 15
 Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30
 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 30 35 40 45
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 50 55 60
 Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 65 70 75 80

35 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 85 90 95
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 100 105 110
 Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 40 115 120 125
 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 145 150 155 160

45 Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
 165 170 175
 Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
 180 185 190

RU 2711485 C2

	Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly	
	195	200 205
	Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly	
	210	215 220
5	Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser	
	225	230 235 240
	Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly	
	245	250 255
10	Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly	
	260	265 270
	Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser	
	275	280 285
	Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly	
	290	295 300
15	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
	305	310 315 320
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly	
	325	330 335
20	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
	340	345 350
	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly	
	355	360 365
	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly	
	370	375 380
25	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
	385	390 395 400
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly	
	405	410 415
30	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
	420	425 430
	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly	
	435	440 445
	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly	
	450	455 460
35	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
	465	470 475 480
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly	
	485	490 495
40	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
	500	505 510
	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly	
	515	520 525
	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly	
	530	535 540
45	Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser	
	545	550 555 560
	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly	
	565	570 575

RU 2711485 C2

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
580 585 590
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
595 600 605
5 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
610 615 620
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
625 630 635 640
10 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
645 650 655
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
660 665 670
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
675 680 685
15 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
690 695 700
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
705 710 715 720
20 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
725 730 735
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
740 745 750
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
755 760 765
25 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
770 775 780
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
785 790 795 800
<210> 9
30 <211> 7
<212> Белок
<213> Искусственная Последовательность
<220>
<223> Описание Искусственной Последовательности: Синтетический
35 пептид
<400> 9
Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1. 5
<210> 10
40 <211> 15
<212> Белок
<213> Искусственная Последовательность
<220>
<223> Описание Искусственной Последовательности: Синтетический
45 пептид
<400> 10
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1. 5 10 15

<210> 11
 <211> 16
 <212> Белок
 <213> Искусственная Последовательность
 5 <220>
 <223> Описание Искусственной Последовательности: Синтетический
 пептид
 <400> 11
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 10 1. 5 10 15
 <210> 12
 <211> 18
 <212> Белок
 <213> Искусственная Последовательность
 15 <220>
 <223> Описание Искусственной Последовательности: Синтетический
 пептид
 <400> 12
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 20 1. 5 10 15
 Gly Ser
 <210> 13
 <211> 15
 <212> Белок
 25 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <223> Описание Искусственной Последовательности: Синтетический
 пептид
 <400> 13
 30 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1. 5 10 15
 <210> 14
 <211> 400
 <212> Белок
 35 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <223> Описание Искусственной Последовательности: Синтетический
 полипептид
 <220>
 40 <221> ДРУГОЙ ПРИЗНАК
 <222> (1)..(400)
 <223> Данная последовательность может содержать 1-100 повторяющихся
 единиц "Gly Gly Gly Gly", где некоторые положения могут отсутствовать
 <400> 14
 45 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 1. 5 10 15
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

RU 2 711 485 C2

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 35 40 45
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 50 55 60
 5 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 65 70 75 80
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 85 90 95
 10 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 130 135 140
 15 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 165 170 175
 20 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 180 185 190
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 195 200 205
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 210 215 220
 25 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 245 250 255
 30 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 260 265 270
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 275 280 285
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 290 295 300
 35 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 305 310 315 320
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 325 330 335
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 40 340 345 350
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 355 360 365
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 370 375 380
 45 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 385 390 395 400
 <210> 15
 <211> 217

<212> Белок

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<223> Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полипептид

5

<400> 15

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

1. 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

10

20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu

50 55 60

15

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln

20

100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu

115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

130 135 140

25

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

165 170 175

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

30

180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

210 215

35

<210> 16

<211> 216

<212> Белок

<213> Искусственная Последовательность

<220>

<223> Описание Искусственной Последовательности: Синтетический полипептид

40

<400> 16

Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

1. 5 10 15

45

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

20 25 30

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val

35 40 45

RU 2 711 485 C2

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 50 55 60
 Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln
 65 70 75 80
 5 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 85 90 95
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro
 100 105 110
 10 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 115 120 125
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 130 135 140
 Asp Ile Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 145 150 155 160
 15 Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 180 185 190
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 20 195 200 205
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215
 <210> 17
 <211> 217
 25 <212> Белок
 <213> Искусственная Последовательность
 <220>
 <223> Описание Искусственной Последовательности: Синтетический
 полипептид
 30 <400> 17
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1. 5 10 15
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 35 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 40 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 100 105 110
 45 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 115 120 125
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160
 Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175
 5 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
 180 185 190
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
 195 200 205
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 10 210 215
 <210> 18
 <211> 217
 <212> Белок
 <213> Искусственная Последовательность
 15 <220>
 <223> Описание Искусственной Последовательности: Синтетический
 полипептид
 <400> 18
 Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 20 1. 5 10 15
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 25 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 30 85 90 95
 Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met
 115 120 125
 35 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 40 165 170 175
 Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
 180 185 190
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205
 45 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210 215

(57) Формула изобретения

1. Способ получения соединения-конъюгата, включающий

(i) осуществление мутагенеза по меньшей мере последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело или Fc-слитый белок, путем вставки кодона, кодирующего цистеин (C), между кодонами, кодирующими аминокислоты в положениях 239 и 240,

где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat;

(ii) экспрессию сконструированного с цистеином антитела или Fc-слитого белка;

(iii) выделение сконструированного с цистеином антитела или Fc-слитого белка; и

(iv) осуществление реакции по меньшей мере одной сконструированной цистеиновой группы сконструированного с цистеином антитела или Fc-слитого белка с гетерологичной группой.

2. Способ получения соединения-конъюгата, включающий

(i) функциональное связывание последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей вариабельный участок тяжелой цепи или гетерологичный белок, с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, представляющий собой Fc-участок,

где последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая белок, представляющий собой Fc-участок, содержит:

по меньшей мере кодон, кодирующий цистеин, встроенный между кодонами, кодирующими аминокислоты в положениях 239 и 240,

где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat; или

(ii) экспрессию сконструированного с цистеином антитела или Fc-слитого белка;

(iii) выделение сконструированного с цистеином антитела или Fc-слитого белка; и

(iv) осуществление реакции по меньшей мере одной сконструированной цистеиновой группы сконструированного с цистеином антитела или Fc-слитого белка с гетерологичной группой.

3. Способ по любому из пп.1-2, где сконструированное с цистеином антитело или

Fc-слитый белок дополнительно содержит по меньшей мере одну сконструированную аминокислоту цистеин, выбранную из замен на цистеин в аминокислотных положениях 241, 243, 251, 253, 258, 264, 269, 271, 272, 274, 280, 281, 285, 288, 291, 293, 294, 296, 301, 307, 309, 311, 318, 329, 340, 341, 345, 357, 385, 386, 387, 401, 402, 411, 417, 433, 435 или 439,

где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat.

4. Способ по п.3, где сконструированная аминокислота цистеин выбрана из аминокислоты цистеина, являющейся результатом замен на цистеин в аминокислотных положениях 241, 243, 251, 253, 258, 264, 271, 285, 288, 291, 296, 301, 307, 309, 311, 329, 385, 387, 433 или 435, и их комбинаций.

5. Способ по п.4, где сконструированная аминокислота цистеин выбрана из аминокислоты цистеина, являющейся результатом замен на цистеин в аминокислотных положениях 258 или 435, и их комбинаций.

6. Способ по любому из пп.1-5, где сконструированное с цистеином антитело или Fc-слитый белок содержит цистеин (C), вставленный между серином (S) в положении 239 и валином (V) в положении 240; и

(a) цистеин (C), являющийся результатом замены глутаминовой кислоты (E), расположенной в положении 258;

(b) цистеин (C), являющийся результатом замены гистидина (H), расположенного в

положении 435;

(с) цистеин (C), являющийся результатом замены аргинина (R), расположенного в положении 435; или

(d) их комбинацию,

5 где нумерация аминокислотных положений приведена в соответствии с EU-индексом, как изложено у Kabat.

7. Способ по любому из пп.1-6, где Fc-домен дополнительно содержит по меньшей мере один сконструированный остаток цистеина, выбранный из аминокислоты цистеина, являющейся результатом замен на цистеин в аминокислотных положениях 239, 248,
10 254, 273, 279, 282, 284, 286, 287, 289, 297, 298, 312, 324, 326, 330, 335, 337, 339, 350, 355, 356, 359, 360, 361, 375, 383, 384, 389, 398, 400, 413, 415, 418, 422, 440, 441, 442, 443 и 446.

8. Способ по любому из пп.1-7, где каждая гетерологичная группа конъюгирована со сконструированным цистеином.

9. Способ по любому из пп.1-8, где Fc-домен антитела или Fc-слитого белка является
15 Fc-доменом IgG человека, необязательно выбранным из группы, состоящей из Fc-домена IgG из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

10. Способ по любому из пп.1-9, где Fc-слитый белок содержит антигенсвязывающий домен, выбранный из группы, состоящей из: (a) scFv, (b) диатела, (c) Fd-области, (d) Fv-области, (e) TANDAB®, (f) F(ab')₂-области, (g) FCAB™ и (h) F(ab)-области.

20 11. Способ по любому из пп.1-10, где антитело представляет собой моноклональное антитело, биспецифическое антитело, полиспецифическое антитело, химерное антитело, человеческое антитело или гуманизированное антитело.

12. Способ по любому из пп.1-11, где по меньшей мере один гетерологичный фрагмент представляет собой токсин, лекарственное средство, радионуклид, иммуномодулятор,
25 цитокин, лимфокин, хемокин, фактор роста, фактор некроза опухоли, гормон, антагонист гормона, фермент, олигонуклеотид, ДНК, РНК, siRNA, RNAi, микроРНК, пептидо-нуклеиновую кислоту, фотоактивное терапевтическое средство, антиангиогенное средство, проапоптозное средство, не встречающуюся в природе аминокислоту, пептид, липид, углевод, каркасную молекулу, флуоресцентную метку,
30 пептид для визуализации, биотин, средство, продлевающее период полувыведения из сыворотки, метку захвата, хелатирующее средство, твердую подложку или их комбинацию, и

где конъюгирование осуществляют по одному из сконструированных остатков цистеина.

35 13. Способ по п.12, где лекарственное средство представляет собой ауристин, тубулизин или пирролобензодиазепин (PBD), майтанзиноид.

14. Способ по любому из пп.1-13, где сконструированное с цистеином антитело или Fc-слитый белок специфично связывается по меньшей мере с одной мишенью.

40 15. Способ по п.14, где мишень представляет собой опухолевый антиген, а гетерологичный фрагмент представляет собой противоопухолевое средство.

CH2-участки

EU	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	
IgG1	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	
IgG2	A	P	P	V	A	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	
IgG3	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	
IgG4	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	
EU	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	
IgG1	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K		
IgG2	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	Q		
IgG3	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	Q		
IgG4	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	D	V	S	Q	E	D	P	E	V	Q		
EU	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	
IgG1	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	
IgG2	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	
IgG3	F	K	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y*	
IgG4	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	
EU	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	
IgG1	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	O	D	W	L	N	G	K	E	
IgG2	N	S	T	F	R	V	V	S	V	L	T	V	V	H	O	D	W	L	N	G	K	E	
IgG3	N	S	T	F	R	V	V	S	V	L	T	V	V	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	
IgG4	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	V	L	H	O	D	W	L	N	G	K	E
EU	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	
IgG1	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	
IgG2	Y	K	C	K	V	S	N	K	G	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	T	K	
IgG3	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	T	K	
IgG4	Y	K	C	K	V	S	N	K	G	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	

*сайт известной аллельной вариации

ФИГ. 1А

СНЗ-участки

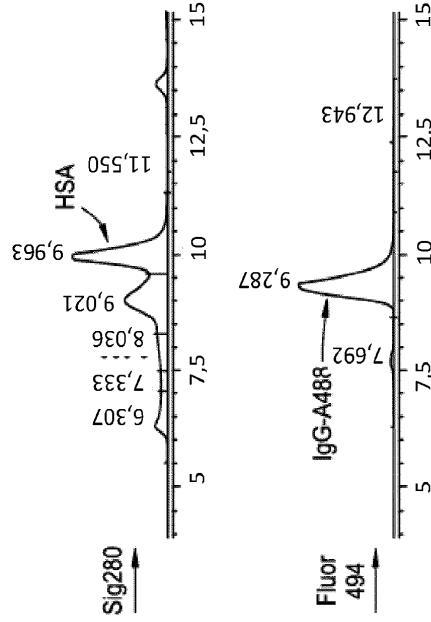
EU	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362
IgG1	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	D*	E	L*	T	K	N	Q
IgG2	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q
IgG3	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q
IgG4	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q
EU	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384
IgG1	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N
IgG2	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	S*	V	E	W	E	S	N
IgG3	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V*	E	W	E	S	N
IgG4	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N
EU	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406
IgG1	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	L
IgG2	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	P	P	M	L	D	S	D	G	S	F	F	L	L
IgG3	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	P	P	M*	L	D	S	D	G	S	F	F	L	L
IgG4	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	L
EU	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428
IgG1	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M
IgG2	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M
IgG3	Y	S	K*	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q*	G	N	I*	F	S	C	S	V	M
IgG4	Y	S	R*	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	E	G	N	V	F	S	C	S	V	M
EU	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447			
IgG1	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G	K			
IgG2	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G	K			
IgG3	H	E	A	L	H	N	H*	F*	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G	K			
IgG4	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	L	G	K			

* сайт известной аллельной вариации

ФИГ. 1В

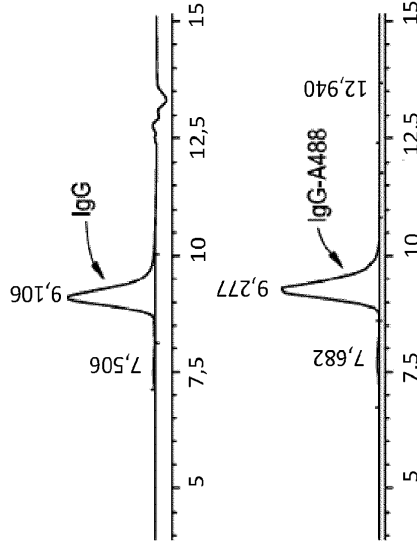
ФИГ. 2А

E258C NHS, день 0



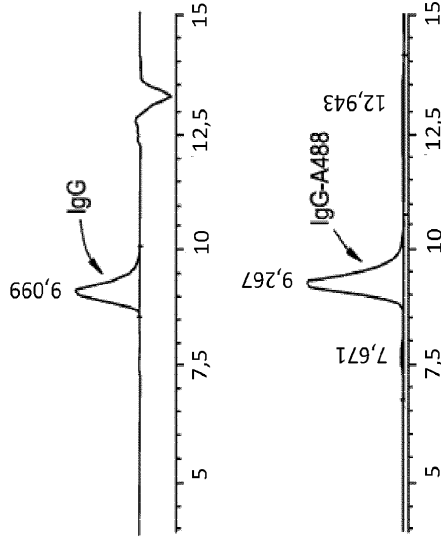
ФИГ. 2В

E258C PBS, день 0



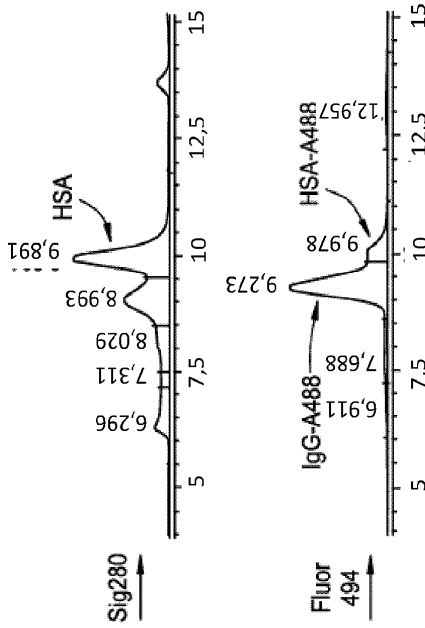
ФИГ. 2D

E258C PBS, день 7

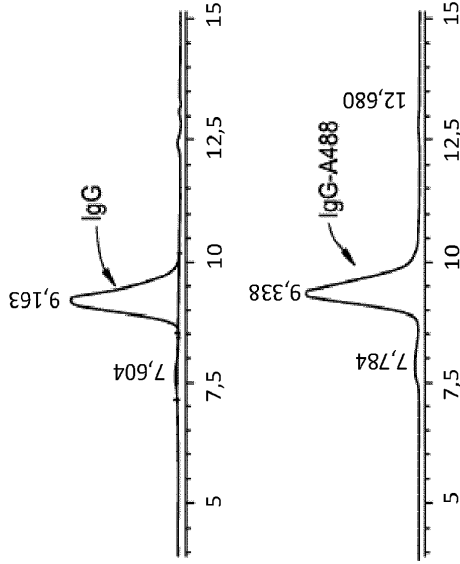


ФИГ. 2С

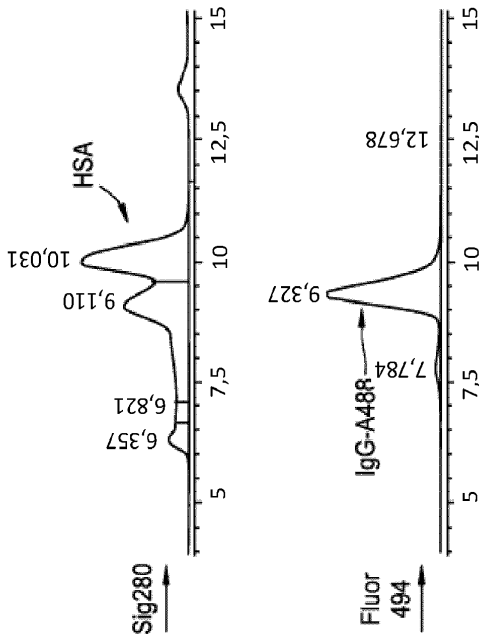
E258C NHS, день 7



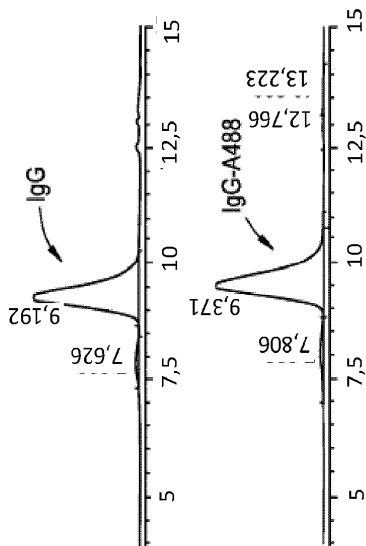
ФИГ. 3В
H435C PBS, день 0



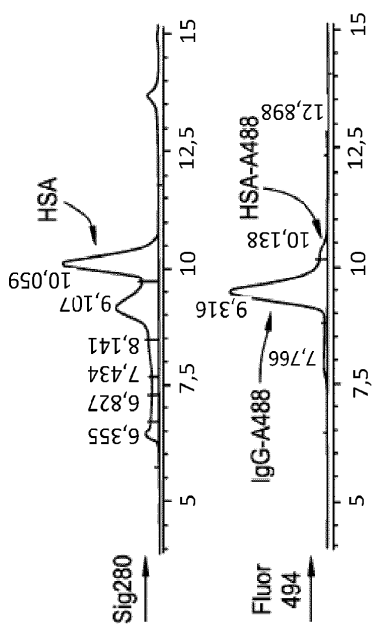
ФИГ. 3А
H435C NHS, день 0



ФИГ. 3D
H435C PBS, день 7

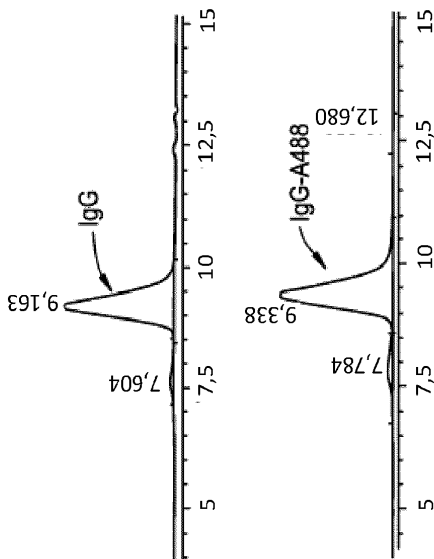


ФИГ. 3C
H435C NHS, день 7



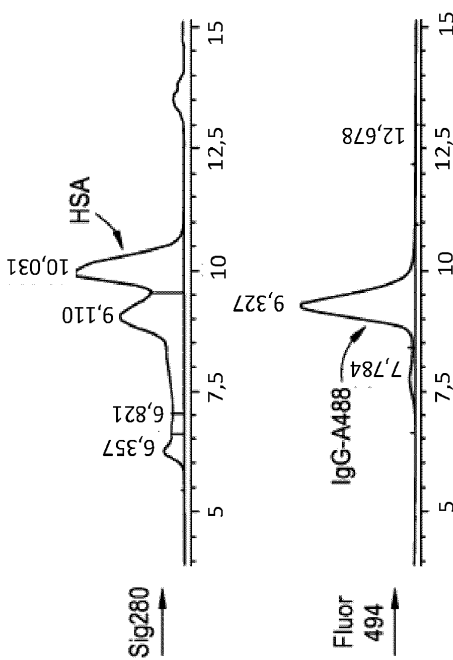
ФИГ. 4В

L443С PBS, день 0



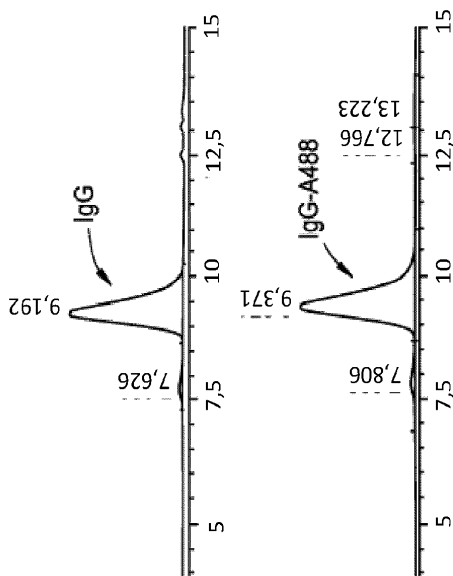
ФИГ. 4А

L443С NHS, день 0



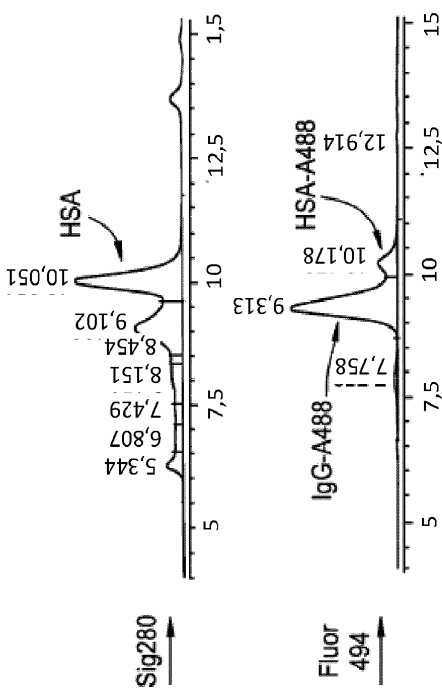
ФИГ. 4D

L443C PBS, день 7



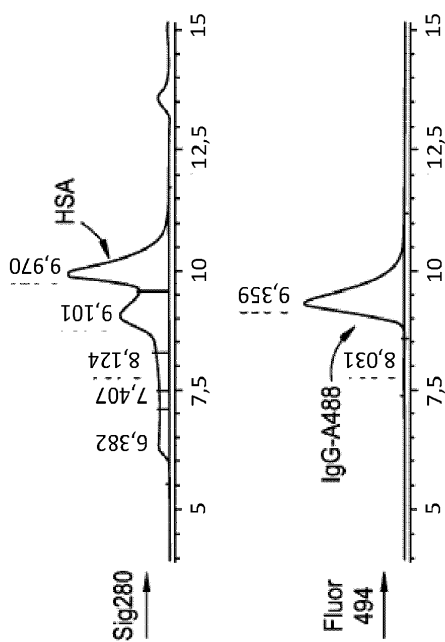
ФИГ. 4C

L443C NHS, день 7

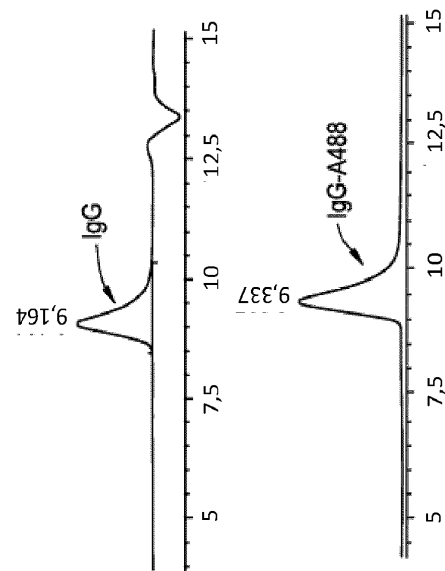


ФИГ. 5А

C239ins NHS, день 0

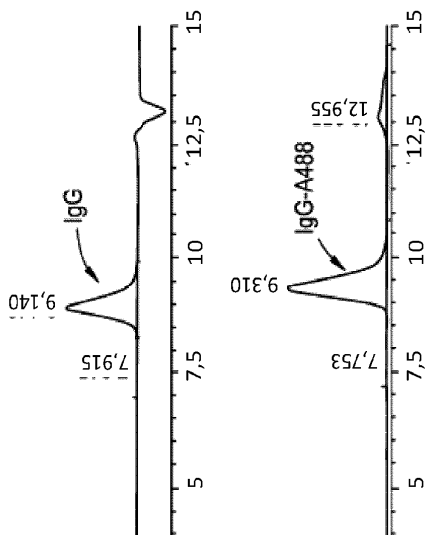


ФИГ. 5В
C239ins PBS, день 0

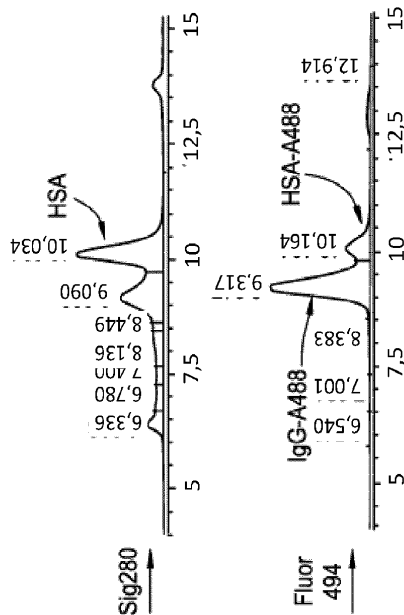


10/24

ФИГ. 5D
C239ins PBS, день 7



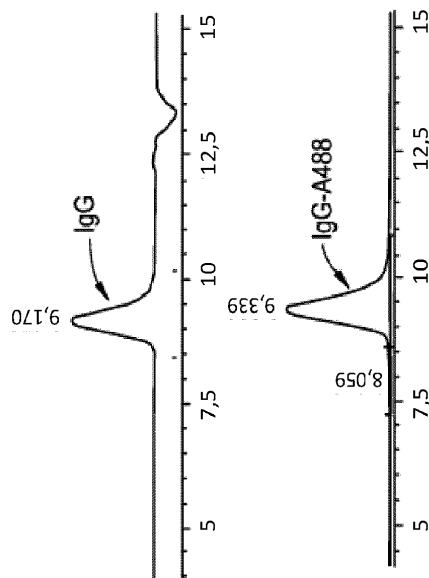
ФИГ. 5C
C239ins NHS, день 7



11/24

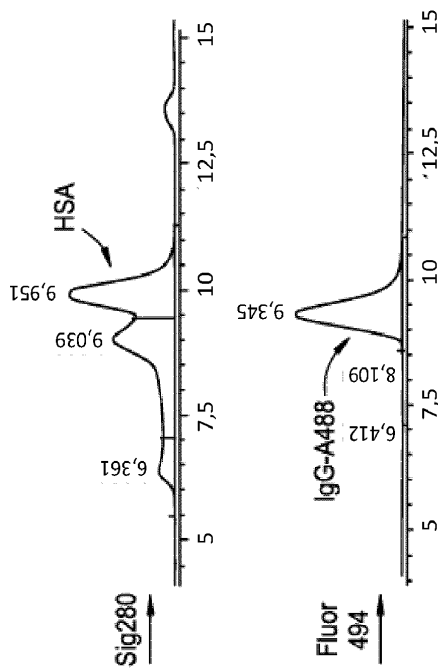
ФИГ. 6В

S239C PBS, день 0



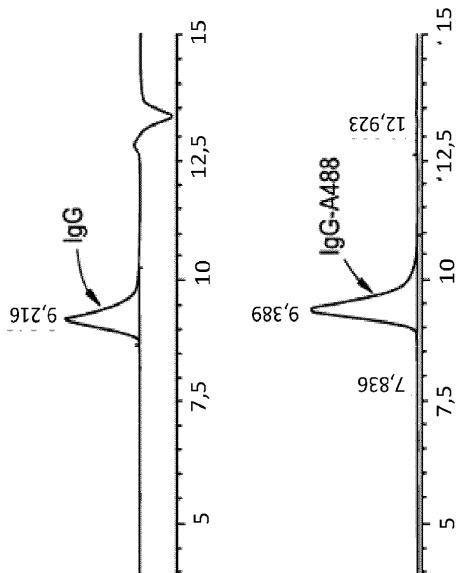
ФИГ. 6А

S239C PBS, день 0

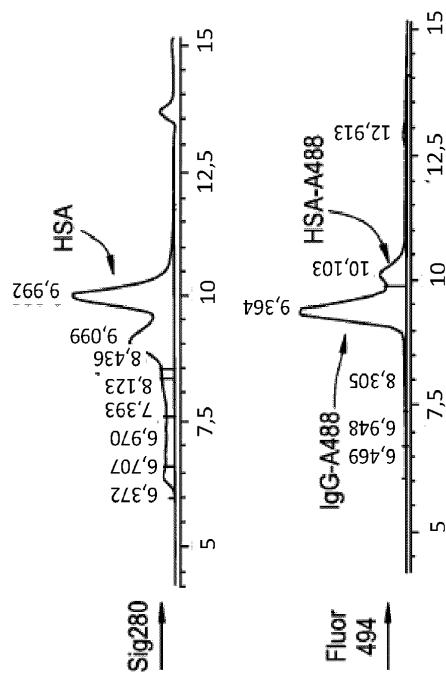


12/24

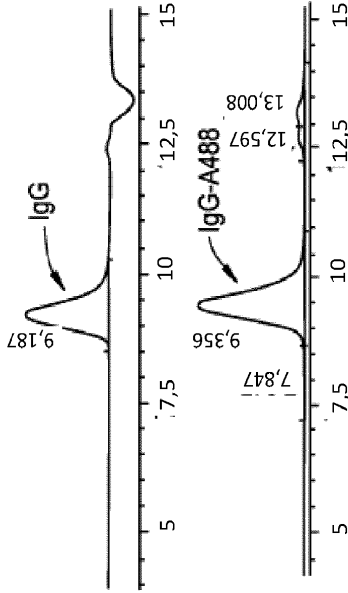
ФИГ. 6D
S239C PBS, день 7



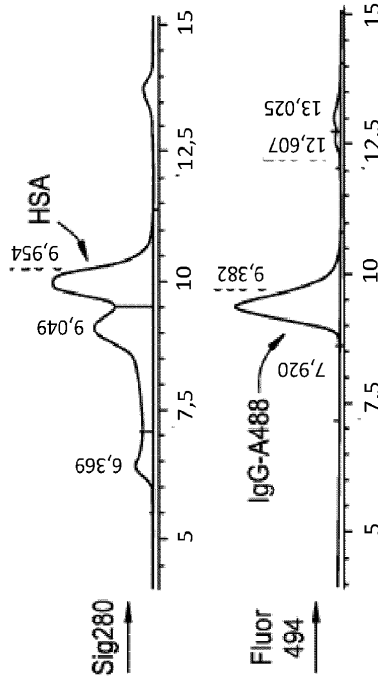
ФИГ. 6C
S239C NHS, день 7



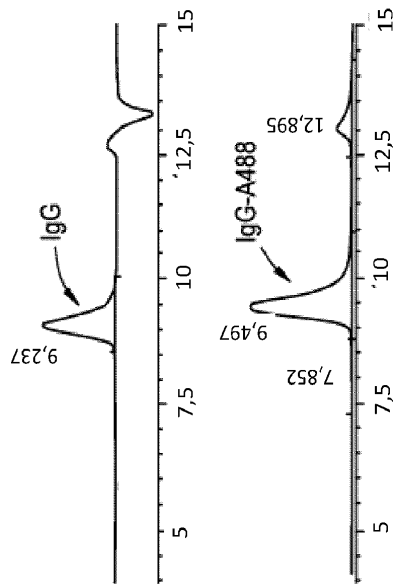
ФИГ. 7В
LC-V205C PBS, день 0



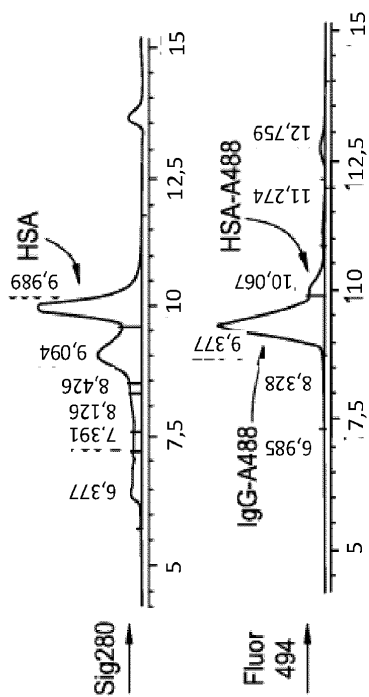
ФИГ. 7А
LC-V205C NHS, день 0



ФИГ. 7D
LC-V205C PBS, день 7

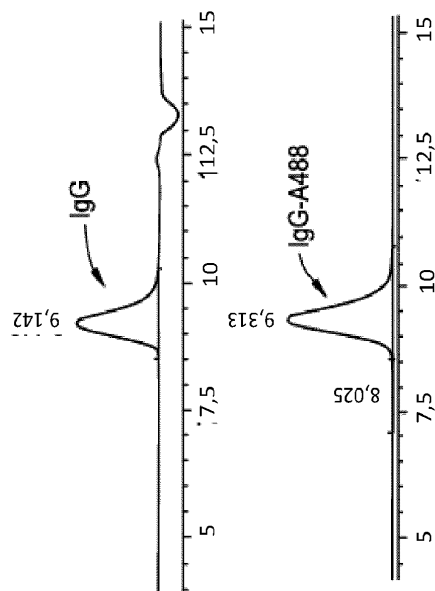


ФИГ. 7C
LC-V205C NHS, день 7



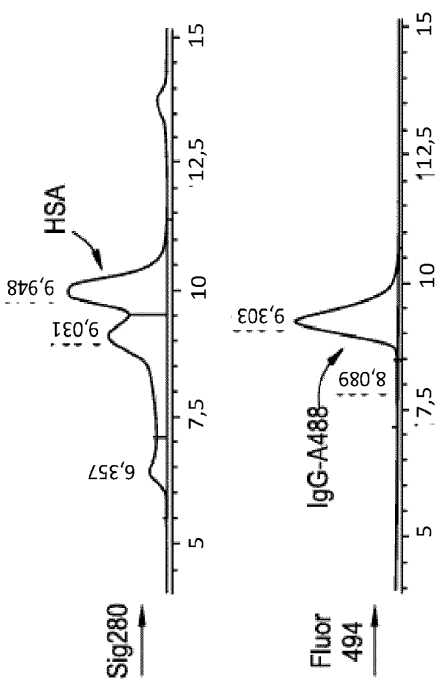
ФИГ. 8В

T289C PBS, день 0



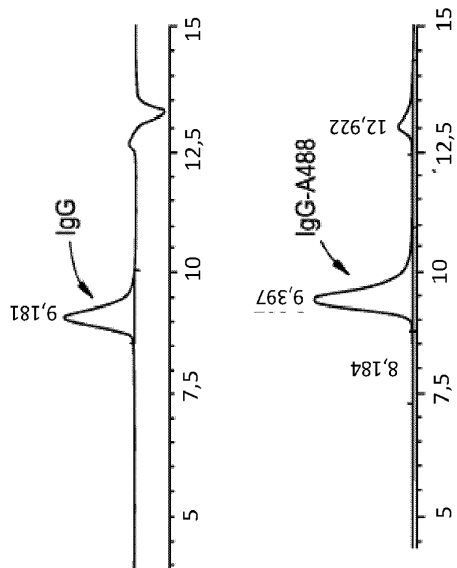
ФИГ. 8А

T289C NHS, день 0



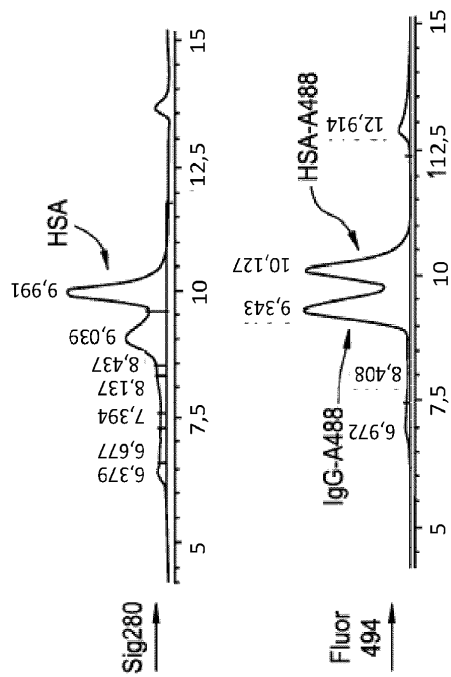
ФИГ. 8D

T289C PBS, день 7



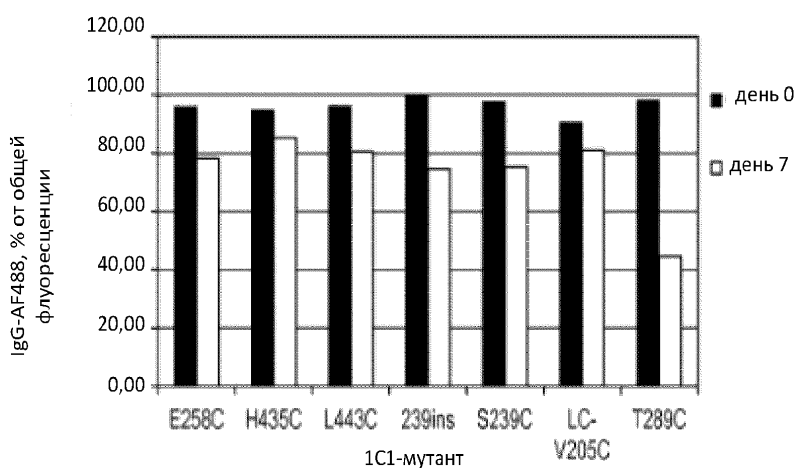
ФИГ. 8C

T289C NHS, день 7



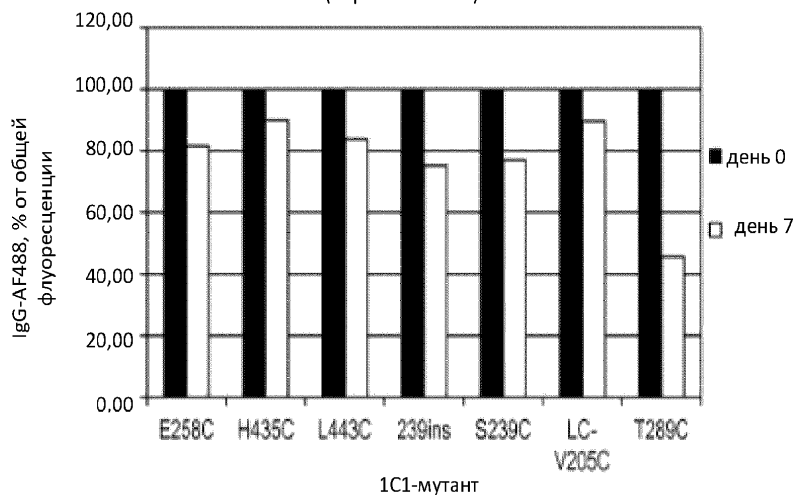
ФИГ. 9А

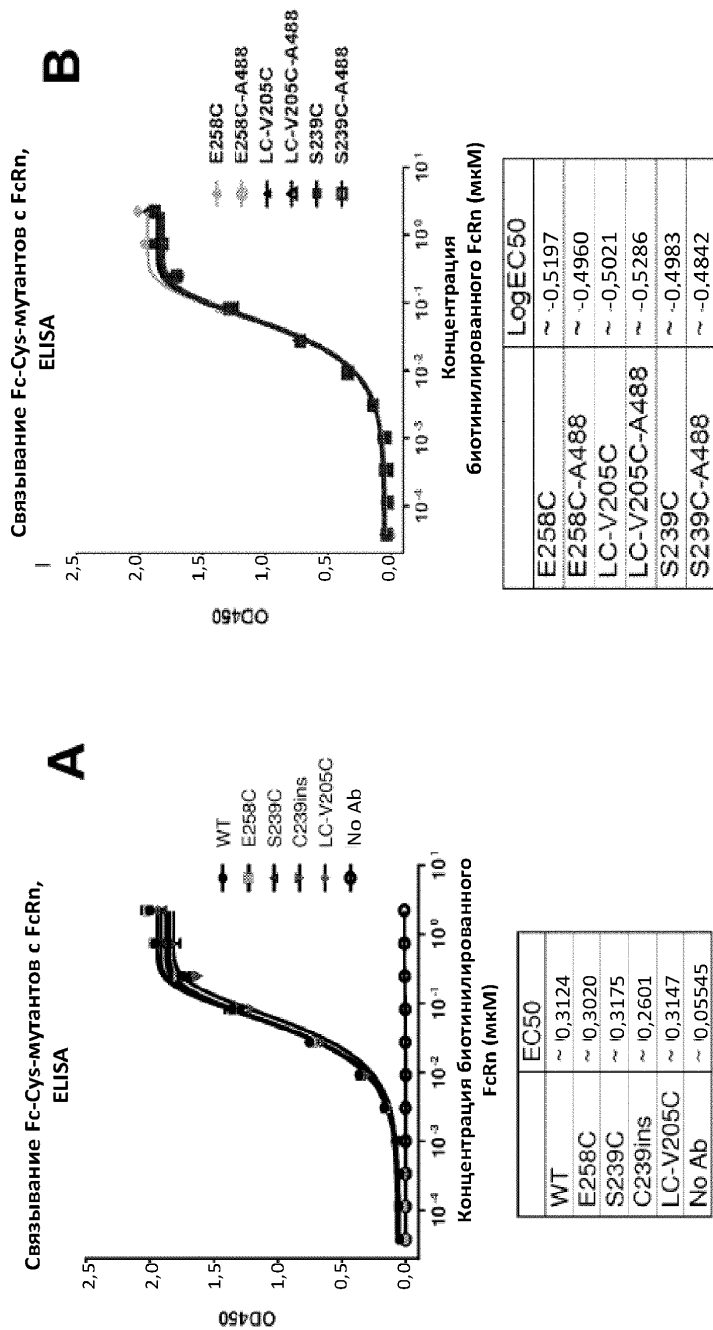
Процентное содержание IgG-A488
Инкубирование 1С1 мутанта-AF488 в сыворотке



ФИГ. 9В

Инкубирование 1С1 мутанта-AF488 в сыворотке
(нормализовано)

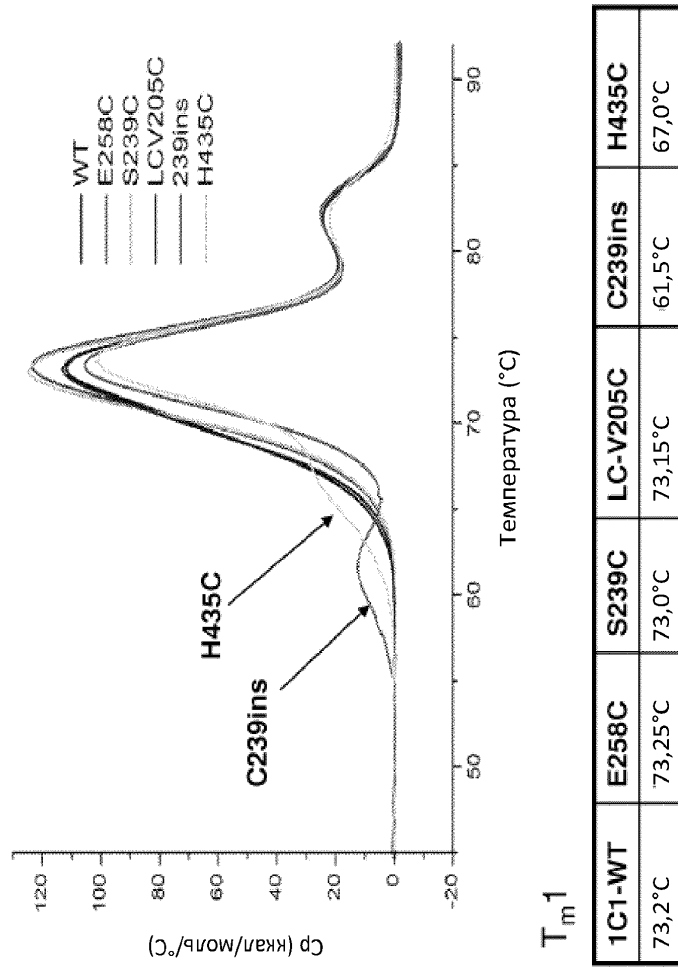




ФИГ. 10

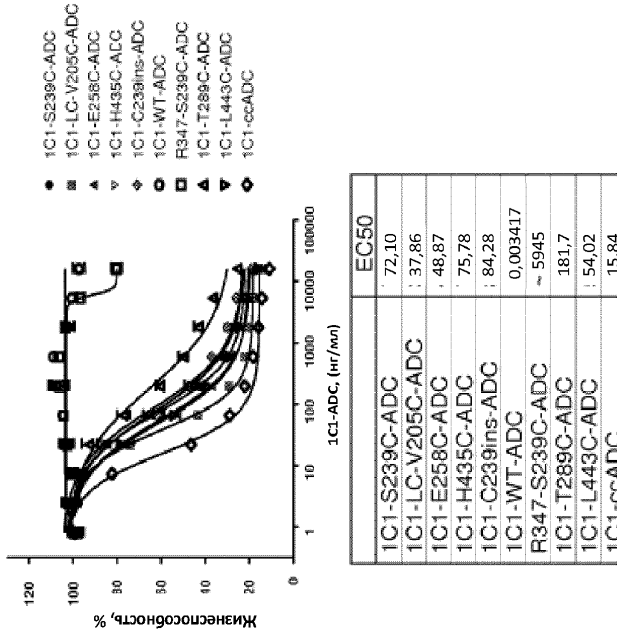
<u>FcR</u>	<u>wt</u> (K _D , HM)	<u>C239ins</u> (K _D , HM)	<u>S442C</u> (K _D , HM)	<u>L234F/S239A/S442C</u> (K _D , HM)
huFcγRI	~9	~133	~9	~16
huFcγRIIA	568	N/A	487	2540
huFcγRIIb	3360	N/A	2590	6310
huFcγRIIIA-158V	265	N/A	289	1455
huFcγRIIIA-158F	1300	N/A	1600	5700
huFcRn (pH6)	890	1050	1200	976

ФИГ. 11

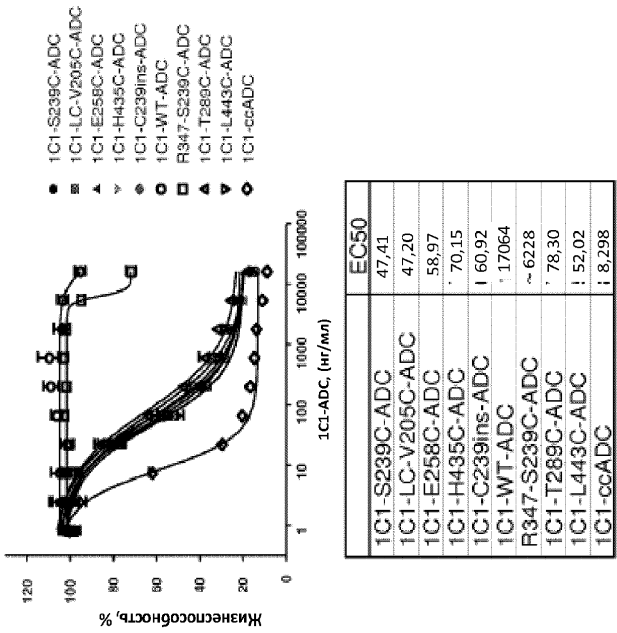


ФИГ. 12

День 3
Цитотоксичность ADC в отношении DU-145
после инкубирования в сыворотке, День 3



День 0
Цитотоксичность ADC в отношении DU-145
после инкубирования в сыворотке, День 0

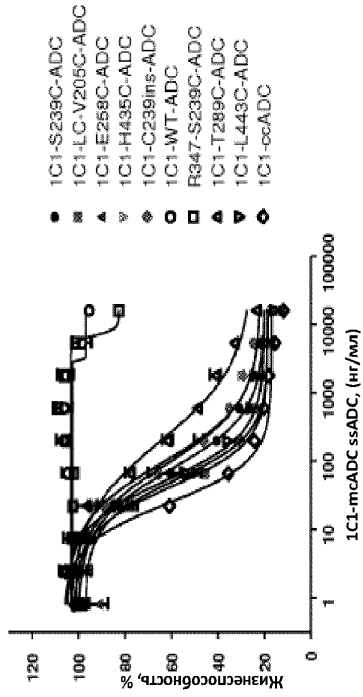


ФИГ. 13

C

День 7

Цитотоксичность ADC в отношении DU-145
после инкубирования в сыворотке, день 7



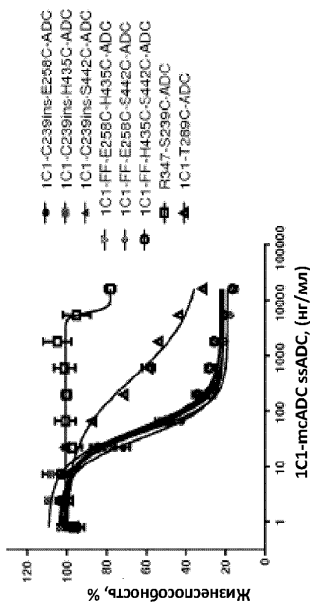
- 1C1-S239C-ADC
- 1C1-LC-V205C-ADC
- ▲ 1C1-E258C-ADC
- ▼ 1C1-H435C-ADC
- ◆ 1C1-C239Ins-ADC
- 1C1-WT-ADC
- R347-S239C-ADC
- ▲ 1C1-T289C-ADC
- ▼ 1C1-L443C-ADC
- ◆ 1C1-ccADC

	EC50
1C1-S239C-ADC	75,64
1C1-LC-V205C-ADC	42,26
1C1-E258C-ADC	53,85
1C1-H435C-ADC	95,25
1C1-C239Ins-ADC	91,04
1C1-WT-ADC	~ 3002
R347-S239C-ADC	~ 6870
1C1-T289C-ADC	199,3
1C1-L443C-ADC	51,23
1C1-ccADC	239,95

ФИГ. 13

День 3

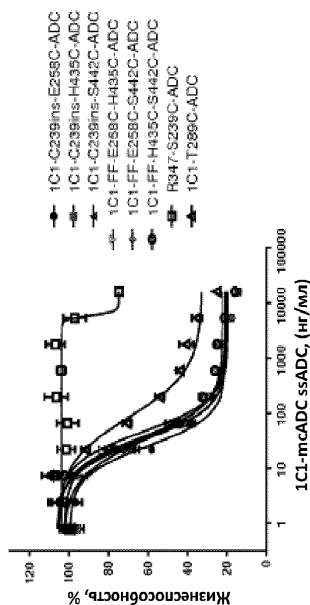
В
Цитотоксичность ADC в отношении DU-145
после инкубирования в сыворотке, день 3



ADC	EC50
1C1-C239ins-E258C-ADC	32,43
1C1-C239ins-H435C-ADC	44,75
1C1-C239ins-S442C-ADC	47,94
1C1-FF-E258C-H435C-ADC	43,41
1C1-FF-E258C-S442C-ADC	44,21
1C1-FF-H435C-S442C-ADC	48,12
R347-S239C-ADC	~5943
1C1-T289C-ADC	402,6

День 0

А
Цитотоксичность ADC в отношении DU-145
после инкубирования в сыворотке, день 0



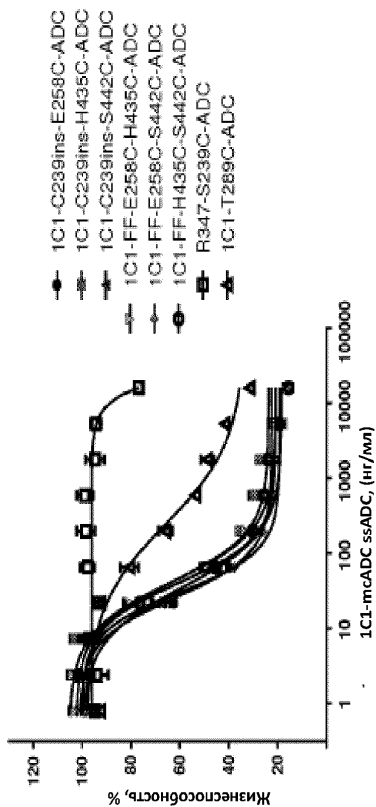
ADC	EC50
1C1-C239ins-E258C-ADC	25,20
1C1-C239ins-H435C-ADC	32,79
1C1-C239ins-S442C-ADC	46,01
1C1-FF-E258C-H435C-ADC	34,91
1C1-FF-E258C-S442C-ADC	31,70
1C1-FF-H435C-S442C-ADC	35,69
R347-S239C-ADC	~5901
1C1-T289C-ADC	85,00

ФИГ. 14

C

Цитотоксичность ADC в отношении DU-145
после инкубирования в сыворотке, День 7

День 7



	EC50
1C1-C239ins-E258C-ADC	25,87
1C1-C239ins-H435C-ADC	41,84
1C1-C239ins-S442C-ADC	35,11
1C1-FF-E258C-H435C-ADC	41,96
1C1-FF-E258C-S442C-ADC	30,66
1C1-FF-H435C-S442C-ADC	40,67
R347-S239C-ADC	~ 48535
1C1-T289C-ADC	243,4

ФИГ. 14