

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202090627** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2020.06.10**

(51) Int. Cl. **G01N 21/00** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2018.09.05**

---

(54) **СПОСОБЫ ОЦЕНКИ КОНЪЮГАТОВ АНТИТЕЛА И ЛЕКАРСТВЕННОГО  
ПРЕПАРАТА**

---

(31) **62/556,153**

(32) **2017.09.08**

(33) **US**

(86) **PCT/US2018/049599**

(87) **WO 2019/050981 2019.03.14**

(71) Заявитель:

**РИДЖЕНЕРОН**

**ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Скиннер Андриа, Кулиба Наталлиа  
(US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) В изобретении предложены способы оценки DAR ADC-продуктов, которые имеют преимущества по сравнению с известными способами. В частности, способы по данному описанию можно использовать в высокоэффективных применениях и/или без необходимости разведения образцов ADC во время оценки.

**A1**

**202090627**

**202090627**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-560990EA/023

### СПОСОБЫ ОЦЕНКИ КОНЬЮГАТОВ АНТИТЕЛА И ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

#### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[1] Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/556153, поданной 8 сентября 2017 г., содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

#### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[2] Конъюгаты антитела и лекарственного препарата (ADC - от англ. «antibody-drug-conjugates») представляют собой развивающийся класс лекарственных молекул. Их способность определять местоположение конкретной мишени и доставлять эффективный лекарственный препарат делает их перспективным вариантом для разработки нацеленного на мишень терапевтического продукта. ADC получают путем химического связывания эффективных лекарственных молекул с моноклональным антителом посредством выбранного химического линкера. Среднее число лекарственных молекул, конъюгированных с моноклональным антителом, называется соотношением лекарственного препарата и антитела (DAR - от англ. «drug-to-antibody ratio»). DAR является важным качественным атрибутом ADC-продуктов, так как оно может влиять на эффективность, безопасность и/или стабильность продукта. Соответственно, необходимы способы оценки DAR ADC-продуктов надежным и высокоэффективным образом.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[3] В настоящем описании предложены способы оценки DAR ADC-продуктов, которые имеют преимущества по сравнению с известными способами. В частности, способы по данному описанию можно использовать в высокоэффективных применениях и/или без необходимости разведения образцов ADC во время оценки.

#### УФ-видимая спектроскопия и закон Бугера - Ламберта - Бера

[4] DAR традиционно определяли, используя УФ-видимую спектроскопию (смотрите, например, Chen, Methods Mol. Biol. 1045:267-73 (2013)). В основе этого анализа лежит закон Бугера - Ламберта - Бера, прямо пропорциональная зависимость между поглощением и концентрацией вещества:

$$A = \epsilon cl,$$

где  $A$  - поглощение,  $\epsilon$  - коэффициент экстинкции (физическая константа вещества),  $l$  - длина пути через ячейку, содержащую аналит, а  $c$  - концентрация.

[5] Определение DAR для ADC-продукта с помощью УФ-видимой спектроскопии основано на разнице максимума поглощения для антитела (например, 280 нм) и максимума поглощения для лекарственного препарата (например, 252 нм). Например, среднее значение DAR можно рассчитать, используя разницу в измеренном поглощении на 280 нм и 252 нм для конъюгированного материала. Хотя метод УФ-видимой спектроскопии широко используется в промышленности, он не обладает

производительностью, необходимой для скрининговых исследований лекарственных составов. Также его нельзя использовать без разведения образцов, что приводит к появлению погрешностей, связанных с разведением образцов.

[6] Таким образом, настоящее описание основано, по меньшей мере частично, на альтернативных способах определения DAR с применением эксклюзионной хроматографии (например, СВЭЖХ) и наклонной спектроскопии. Изучали характеристики этих способов и сравнивали их с УФ-видимой спектроскопией в отношении воспроизводимости, точности и чувствительности. Полученные данные свидетельствуют в пользу применения способов определения DAR на основе СВЭЖХ для преодоления ограничений производительности традиционных способов УФ-видимой спектроскопии. Кроме того, способ на основе наклонной спектроскопии можно использовать для анализа образцов ADC без разведения образцов.

#### Способы на основе СВЭЖХ

[7] В одном варианте реализации для определения DAR используют эксклюзионную хроматографию. В некоторых вариантах реализации описанные в данном документе способы включают нанесение образца, содержащего конъюгат антитела и лекарственного препарата, на матрицу для эксклюзионной хроматографии. В некоторых вариантах реализации описанные в данном документе способы включают нанесение образца, содержащего конъюгат антитела и лекарственного препарата, на матрицу для эксклюзионной хроматографии и проведение через нее. В некоторых вариантах реализации все количество образца ADC наносят на эксклюзионную матрицу для анализа. Например, для оценки DAR использовали следующую методологию на основе СВЭЖХ.

<b>Колонка:</b>	<b>Waters Acquity UPLC BEH200 SEC (изделие # 186005225) 4,6 мм x 15 см, размер частиц 1,7 мкм, макс. давление: 1034 бар 2 колонки расположены в ряд</b>
Подвижная фаза:	перхлоратный ЭХ-буфер: 10 mM фосфата, pH 6,0 1 M NaClO <sub>4</sub>
<b>Информация по градиенту:</b>	<b>изократический</b>
<b>Скорость потока:</b>	<b>0,4 мл/мин</b>
<b>Время хроматографирования:</b>	<b>12 минут</b>
<b>Температура колонки:</b>	<b>не регулируется</b>
<b>Длинны волн обнаружения</b>	<b>280 нм и 252 нм (или A<sub>макс</sub> для конъюгированного лекарственного препарата)</b>
<b>Количество вводимой</b>	<b>6-150 мкг ADC (без разведения)</b>

<b>мишени</b>	
---------------	--

[8] Данные, полученные на 280 нм, интегрировали, используя метод интеграции Арех Трак с обнаружением плеча пика. Диапазон интеграции времени удержания зависит от молекулы, но обычно находится в пределах 3-9 минут. Пик с наибольшей высотой и площадью определяли как «нативный», «основной» или «мономерный» пик. Любые пики, элюируемые раньше «нативного» пика, определяли как «ВМ (высокомолекулярные)»-пики. Любые пики, элюируемые позже «нативного пика», определяли как «НМ (низкомолекулярные)»-пики.

[9] Относительную процентную долю каждого типа молекул рассчитывали из отношения площади отдельных пиков к суммарной площади всех пиков. Относительную процентную площадь следующих компонентов представляли как показатель чистоты: % суммы ВМ, % нативного (или основного или мономерного) и % суммы НМ. Общую площадь всех пиков суммировали и использовали в последующих расчетах DAR. При этом, в некоторых вариантах реализации, используют только площадь нативного пика.

[10] Данные, полученные на 252 нм, интегрировали, используя метод интеграции Арех Трак с обнаружением плеча пика. Диапазон интеграции времени удержания зависит от молекулы, но обычно находится в пределах 3-9 минут. Общую площадь всех пиков суммировали и использовали в последующих расчетах DAR. При этом, в некоторых вариантах реализации, используют только площадь нативного пика.

[11] DAR определяли из суммарной площади пика на 280 нм ( $A_{\text{макс}}$  для ADC) и суммарной площади пика на 252 нм ( $A_{\text{макс}}$  для лекарственного препарата). Хотя 252 нм является обычной  $A_{\text{макс}}$  для конъюгатов лекарственных препаратов, используемой для ADC, для конкретного конъюгата можно выбирать соответствующую длину волны, например, используя известные способы. Количество лекарственного препарата, связанного с антителом, можно определить по разнице суммарных площадей пиков на этих двух длинах волн, используя чистое антитело в качестве эталонного стандарта, в случае необходимости.

[12] Проверяли следующие два уравнения (которые были получены из закона Бугера - Ламберта - Бера), которые продемонстрировали сопоставимость.

Уравнение 1:

$$\text{DAR} = \frac{\epsilon_{252\text{nm}}^{\text{mAb}} * \text{Total Area}_{280\text{nm}} - \epsilon_{280\text{nm}}^{\text{mAb}} * \text{Total Area}_{252\text{nm}}}{\epsilon_{280\text{nm}}^{\text{drug}} * \text{Total Area}_{252\text{nm}} - \epsilon_{252\text{nm}}^{\text{drug}} * \text{Total Area}_{280\text{nm}}}$$

[13] Для уравнения 1 не требуется применение эталонного стандарта в виде чистого антитела. При этом необходимо систематическое определение коэффициентов экстинкции ( $\epsilon$ ) как для антитела, так и для лекарственного препарата на 252 нм. Коэффициент экстинкции на заданной длине волны можно легко рассчитать по закону Бугера - Ламберта - Бера, используя раствор антитела или лекарственного препарата, имеющий известную концентрацию, и измеряя поглощение на заданной длине волны.

Уравнение 2:

$$DAR = \frac{\epsilon_{280nm}^{mAb}}{Total Area_{280nm}^{mAb}} * \frac{Total Area_{252nm}^{ADC} * Total Area_{280nm}^{mAb} - Total Area_{280nm}^{ADC} * Total Area_{252nm}^{mAb}}{\epsilon_{252nm}^{drug} * Total Area_{280nm}^{ADC} - \epsilon_{280nm}^{drug} * Total Area_{252nm}^{ADC}}$$

[14] Для уравнения 2 не требуется определение коэффициента экстинкции для антитела на 252 нм, но требуется получение данных СВЭЖХ для эталонного стандарта в виде чистого антитела.

[15] Хотя в качестве примера была приведена СВЭЖХ, в описанных в данном документе способах можно использовать другие методики эксклюзионной хроматографии. Эксклюзионная хроматография в целом относится к разделению молекул по размеру, причем время хроматографического элюирования является характерным для конкретной молекулы. Дополнительные способы включают, например, ЭХ-ВЭЖХ, обращенно-фазовую (ОФ) ВЭЖХ, ОФ-СВЭЖХ.

[16] В некоторых вариантах реализации образец ADC не разводят перед анализом методом эксклюзионной хроматографии (например, ВЭЖХ или СВЭЖХ). В некоторых вариантах реализации не требуется разведение образца ADC перед анализом методом эксклюзионной хроматографии, так как все количество образца ADC наносят на матрицу для эксклюзионной хроматографии. В некоторых вариантах реализации анализируют образец, содержащий от около 1 мкг/мл до около 500 мкг/мл ADC.

#### Способы на основе наклонной хроматографии

[17] В некоторых вариантах реализации DAR определяют, рассчитывая концентрации антитела и лекарственного препарата в образце ADC. Например, наклонная спектроскопия является известным способом определения поглощения раствора при разных длинах пути. Затем значения поглощения при разных длинах пути можно использовать с учетом закона Бугера - Ламберта - Бера для расчета концентрации соединения в растворе. Способы и системы, в которых применяется наклонная спектроскопия, являются известными (смотрите, например, публикацию США № 20120130649) и коммерчески доступными (смотрите, например, SoloVPE (C Technologies, Inc., Bridgewater, NJ)). Такие способы и системы были адаптированы для измерения концентраций антитела и лекарства в препаратах ADC, из которых определяли DAR.

[18] Например, образец ADC можно поместить в сосуд, зонд можно перемещать относительно сосуда так, чтобы зонд находился в контакте с дном сосуда; зонд можно перемещать относительно сосуда так, чтобы зонд перемещался от дна сосуда через образец с заданным шагом так, чтобы получить заданную длину пути через раствор; считывание поглощения можно проводить на максимуме поглощения для антитела; зонд можно повторно перемещать относительно образца и проводить измерения; регрессионную линию можно строить по поглощению и длине пути так, чтобы получить наклон регрессионной линии; а концентрацию антитела можно определять путем деления наклона регрессионной линии на коэффициент экстинкции антитела. Эти этапы затем можно повторить, используя максимум поглощения для лекарственного препарата, чтобы определить концентрацию лекарственного препарата. DAR можно рассчитать из определенных концентрации лекарственного препарата и концентрации антитела.

[19] В некоторых вариантах реализации образец ADC не разводят перед анализом методом наклонной спектроскопии. В некоторых вариантах реализации анализируют образец, содержащий от около 0,1 мкг/мл до около 500 мкг/мл ADC.

Конъюгаты антитела и лекарственного препарата

[20] В контексте данного документа термин «конъюгат антитела и лекарственного препарата» относится к белку, созданному путем связывания антитела с биологически активными цитотоксической нагрузкой или лекарственным препаратом. Конъюгаты антитела и лекарственного препарата (ADC) в целом получают путем реакций химической модификации/сочетания, известных специалистам в данной области техники. Любой конъюгат антитела и лекарственного препарата можно анализировать, используя описанные в данном документе способы.

[21] В некоторых вариантах реализации конъюгат антитела и лекарственного препарата включает противоопухолевое антитело (смотрите, например, Adler et al., Hematol. Oncol. Clin. North Am. 26:447-81 (2012); Li et al., Drug Discov. Ther. 7:178-84 (2013); Scott et al., Cancer Immun. 12:14 (2012); и Sliwkowski et al., Science 341:1192-1198 (2013)). В таблице 1 представлен не исчерпывающий перечень определенных человеческих полипептидных антигенов, являющихся мишенями известных, доступных антител, и указаны определенные онкологические показания, при которых эти антитела предполагается использовать. Любые из антител в таблице 1 могут быть включены в конъюгат антитела и лекарственного препарата, оцениваемый способами по данному описанию.

Таблица 1:

<b>Человеческий антиген</b>	<b>Антитело (коммерческое или научное название)</b>	<b>Онкологическое показание</b>
CD2	Сиплизумаб	Неходжкинская лимфома
CD3	UCHT1	Периферическая или кожная Т-клеточная лимфома
CD4	HuMax-CD4	
CD19	SAR3419, MEDI-551	Диффузная В-крупноклеточная лимфома
CD19 и CD3 или CD22	Биспецифические антитела, такие как блинатумомаб, DT2219ARL	Неходжкинская лимфома
CD20	Ритуксимаб, велтузумаб, тозитумомаб, офатумомаб, ибритумомаб, обинутузумаб	В-клеточные злокачественные образования (неходжкинская лимфома, хронический лимфоцитарный лейкоз)

CD22 (SIGLEC2)	Инотузумаб, тетраксетан, CAT-8015, DCDT2980S, бектумомаб	Резистентный к химиотерапии волосатоклеточный лейкоз, лимфома Ходжкина
CD30	Брентуксимаб ведотин	
CD33	Гемтузумаб озогамицин (Милотарг)	Острый миелоидный лейкоз
CD37	TRU-016	Хронический лимфоцитарный лейкоз
CD38	Даратумумаб	Множественная миелома, гематологические опухоли
CD40	Лукатумумаб	Неходжкинская лимфома
CD52	Алемтузумаб (Кампат)	Хронический лимфоцитарный лейкоз
CD56 (NCAM1)	Лорвотузумаб	Мелкоклеточный рак легкого
CD66e (CEA)	Лабентузумаб	Опухоли молочной железы, толстой кишки и легкого
CD70	SGN-75	Неходжкинская лимфома
CD74	Милатузумаб	Неходжкинская лимфома
CD138 (SYND1)	BT062	Множественная миелома
CD152 (CTLA-4)	Ипилимумаб	Метастатическая меланома
CD221 (IGF1R)	AVE1642, IMC-A12, МК- 0646, R150, CP 751871	Глиома, рак легкого, молочной железы, головы и шеи, предстательной железы и щитовидной железы
CD254 (RANKL)	Деносумаб	Карцинома молочной железы и предстательной железы
CD261 (TRAILR1)	Мапатумумаб	Опухоли толстой кишки, легкого, поджелудочной железы и
CD262 (TRAILR2)	HGS-ETR2, CS-1008	гематологические злокачественные образования
CD326 (Epcam)	Эдреколомаб, 17-1A, IGN101, катумаксомаб, адекватумумаб	Рак толстой кишки и прямой кишки, злокачественные асциты, эпителиальные опухоли (молочной железы, толстой кишки, легкого)
CD309 (VEGFR2)	IM-2C6, CDP791	Солидные опухоли из эпителиальных клеток
CD319 (SLAMF7)	HuLuc63	Множественная миелома

CD340 (HER2)	Трастузумаб, пертузумаб, адо-трастузумаб эмтанзин	Рак молочной железы
CAIX (CA9)	cG250	Почечно-клеточная карцинома
EGFR (c-erbB)	Цетуксимаб, панитумумаб, нимотузумаб и 806	Солидные опухоли, включая глиому, опухоли легкого, молочной железы, толстой кишки и головы и шеи
EPHA3 (HEK)	KB004, ША4	Опухоли легкого, почки и толстой кишки, меланомы, глиомы и гематологические злокачественные образования
Эписиалин	Эпитумомаб	Эпителиальные опухоли яичника
FAP	Сибротузумаб и F19	Опухоли толстой кишки, легкого, поджелудочной железы и головы и шеи
HLA-DR бета	Аполизумаб	Хронический лимфоцитарный лейкоз, неходжкинская лимфома
FOLR-1	Фарлетузумаб	Опухоли яичника
5T4	Анатумомаб	Немелкоклеточный рак легкого
GD3/GD2	3F8, ch14.18, KW-2871	Нейроэктодермальные и эпителиальные опухоли
gpA33	huA33	Колоректальная карцинома
GPNMB	Глембатумумаб	Рак молочной железы
HER3 (ERBB3)	ММ-121	Опухоли молочной железы, толстой кишки, легкого, яичников и предстательной железы
Интегрин $\alpha V\beta 3$	Этарацизумаб	Сосудистая сеть опухоли
Интегрин $\alpha 5\beta 1$	Волоциксимаб	Сосудистая сеть опухоли
Антиген Льюиса Y	hu3S193, IgN311	Опухоли молочной железы, толстой кишки, легкого и предстательной железы
MET (HGFR)	AMG 102, METMAB SCH900105	Опухоли молочной железы, яичника и легкого
Муцин-1/CanAg	Пемтумомаб, ореговомаб, кантузумаб	Опухоли молочной железы, толстой кишки, легкого и яичника



PSMA	ADC, J591	Рак предстательной железы
Фосфатидилсерин	Бавитуксимаб	Солидные опухоли
TAG-72	Минретумомаб	Опухоли молочной железы, толстой кишки и легкого
Тенасцин	81С6	Глиома, опухоли молочной железы и предстательной железы
VEGF	Бевацизумаб	Сосудистая сеть опухоли

[22] В некоторых вариантах реализации конъюгат антитела и лекарственного препарата содержит лекарственный препарат, который представляет собой один или более из проапоптотических, цитостатических и/или цитотоксических агентов, в частности, например, включая агенты, применяемые и/или рекомендуемые для применения при лечении одного или более заболеваний, расстройств или патологических состояний, связанных с нежелательной клеточной пролиферацией. Во многих вариантах реализации лекарственный препарат представляет собой химиотерапевтический агент, применимый при лечении рака. В некоторых вариантах реализации химиотерапевтический агент может представлять собой или содержать один или более алкилирующих агентов, один или более антрациклинов, один или более цитоскелетных разрушителей (например, нацеленных на микротрубочки агентов, таких как таксаны, майтанзин и их аналоги), один или более эпотилонов, один или более ингибиторов гистондеацетилазы (HDAC), один или более ингибиторов топоизомеразы (например, ингибиторов топоизомеразы I и/или топоизомеразы II), один или более ингибиторов киназы, один или более нуклеотидных аналогов или аналогов нуклеотидных предшественников, один или более пептидных антибиотиков, один или более агентов на основе платины, один или более ретиноидов, один или более алкалоидов барвинка и/или один или более аналогов одного или более из следующего (т. е. которые обладают релевантной антипролиферативной активностью). В некоторых конкретных вариантах реализации химиотерапевтический агент может представлять собой или содержать один или более из актиномина, полностью транс-ретиноевой кислоты, ауристатины, азациитидина, азатиоприна, блеомицина, бортезомиба, карбоплатина, капецитабина, цисплатина, хлорамбуцила, циклофосфамида, куркумина, цитарабина, даунорубицина, доцетаксела, доксифлуридина, доксорубицина, эпирубицина, эпотилона, этопозиды, фторурацила, гемцитабина, гидроксимочевины, идарубицина, иматиниба, иринотекана, майтанзина и/или его аналогов (например, DM1), мехлорэтамины, меркаптопурина, метотрексата, митоксантрона, майтанзиноиды, оксалиплатина, паклитаксела, пеметрекседа, тенипозиды, тиогуанина, топотекана, валрубицина, винбластин, винкристины, виндезина, винорелбина и их комбинаций.

[23] В некоторых вариантах реализации конъюгат антитела и лекарственного препарата, оцениваемый способом по данному описанию, представляет собой hLL1-доксорубин, hRS7-SN-38, hMN-14-SN-38, hLL2-SN-38, hA20-SN-38, hPAM4-SN-38,

hLL1-SN-38, hRS7-Pro-2-P-Dox, hMN-14-Pro-2-P-Dox, hLL2-Pro-2-P-Dox, hA20-Pro-2-P-Dox, hPAM4-Pro-2-P-Dox, hLL1-Pro-2-P-Dox, P4/D10-доксорубицин, гемтузумаб озогамин, брентуксимаб ведотин, трастузумаб эмтанзин, инотузумаб озогамин, глембатумомаб ведотин, SAR3419, SAR566658, ВПВ015, ВТ062, СМС-544, SAR3419, CDX-011, SGN-75, SGN-CD19A, AMG-172, AMG-595, BAY-94-9343, ASG-5ME, ASG-22ME, ASG-16M8F, MDX-1203, MLN-0264, анти-PSMA ADC, RG-7450, RG-7458, RG-7593, RG-7596, RG-7598, RG-7599, RG-7600, RG-7636, АВТ-414, IMGN-853, IMGN-529, IMGN-901, ворзетузумаб мафодотин или лорвотузумаб мертанзин (смотрите, например, Sassoon et al., *Methods Mol. Biol.* 1045:1-27 (2013); Bouchard et al., *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 24: 5357-5363 (2014)).

### Применения

[24] Способы по данному описанию имеют ряд применений и включают, например, контроль качества на разных стадиях производства лекарственного вещества или лекарственного продукта, анализ препарата ADC до и/или после завершения производства лекарственного вещества или лекарственного продукта (например, до или после распределения в зону или помещение для фасовки и упаковки), до или после поставки лекарственного вещества или лекарственного продукта на рынок (например, до распределения по аптекам, лицам, осуществляющим уход или лечение, пациентам или другим конечным пользователям). В некоторых случаях препарат ADC представляет собой лекарственное вещество (активный фармацевтический ингредиент или «АФИ») или лекарственный продукт (АФИ, приготовленный для применения субъектом, таким как пациент-человек). В некоторых случаях препарат ADC получен на стадии производства или применения, которая предшествует поставке лицам, осуществляющим уход или лечение, или другим конечным пользователям; предшествует упаковке в отдельные дозированные формы, такие как шприцы, шприцы-ручки, флаконы или многодозовые флаконы; предшествует определению того, что партию можно поставлять на рынок, предшествует получению сертификата тестирования, сертификата безопасности материала (СБМ) или сертификата анализа (СА) препарата.

[25] Оценки, полученные описанными в данном документе способами, применимы для регуляции, контроля или осуществления ряда действий или этапов в процессе создания, распределения и мониторинга, и обеспечения безопасного и эффективного применения препарата ADC. Таким образом, в варианте реализации, например, с учетом оценки, например, в зависимости от соответствия критериям (например, конкретному DAR, среднему DAR и/или диапазону DAR), принимают решение или проводят этап. Описанные в данном документе способы могут включать принятие решения (а) относительно того, можно ли препарат ADC приготовить в форме лекарственного вещества или лекарственного продукта; (b) относительно того, можно ли препарат ADC подвергать повторной обработке (например, препарат можно повторно подвергать предыдущему этапу обработки); и/или (с) что препарат ADC не подходит для приготовления в форме лекарственного вещества или лекарственного продукта. В

некоторых случаях способы включают приготовление согласно этапу (а), повторную обработку согласно этапу (b) или принятие решения о непригодности препарата для поставки на рынок, например, посредством его маркировки или уничтожения, согласно этапу (с).

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ определения соотношения лекарственного препарата и антитела (DAR) в образце, содержащем конъюгат антитела и лекарственного препарата, включающий нанесение образца на матрицу для эксклюзионной хроматографии; регистрацию поглощения образца на первой длине волны ( $\lambda_1$ ), причем первая длина волны представляет собой предопределенный максимум поглощения антитела; регистрацию поглощения образца на второй длине волны ( $\lambda_2$ ), причем вторая длина волны представляет собой предопределенный максимум поглощения лекарственного препарата;

определение суммарного поглощения образца на первой и второй длинах волн; и расчет DAR с помощью следующего уравнения 1:

$$\text{DAR} = \frac{\varepsilon_{\lambda_2}^{\text{mAb}} * \text{Total Area}_{\lambda_1} - \varepsilon_{\lambda_1}^{\text{mAb}} * \text{Total Area}_{\lambda_2}}{\varepsilon_{\lambda_1}^{\text{drug}} * \text{Total Area}_{\lambda_2} - \varepsilon_{\lambda_2}^{\text{drug}} * \text{Total Area}_{\lambda_1}}$$

где  $\varepsilon_{\lambda_1}^{\text{mAb}}$  - коэффициент экстинкции антитела на первой длине волны;  $\varepsilon_{\lambda_2}^{\text{mAb}}$  - коэффициент экстинкции антитела на второй длине волны;  $\varepsilon_{\lambda_1}^{\text{drug}}$  - коэффициент экстинкции лекарственного препарата на первой длине волны;  $\varepsilon_{\lambda_2}^{\text{drug}}$  - коэффициент экстинкции лекарственного препарата на второй длине волны;  $\text{Total Area}_{\lambda_1}$  - суммарное поглощение образца на первой длине волны; и  $\text{Total Area}_{\lambda_2}$  - суммарное поглощение образца на второй длине волны.

2. Способ определения соотношения лекарственного препарата и антитела (DAR) в образце, содержащем конъюгат антитела и лекарственного препарата, включающий

измерение суммарного поглощения образца, содержащего конъюгат антитела и лекарственного препарата, путем

нанесения образца, содержащего конъюгат антитела и лекарственного препарата, на матрицу для эксклюзионной хроматографии;

регистрации поглощения образца на первой длине волны ( $\lambda_1$ ), причем первая длина волны представляет собой предопределенный максимум поглощения антитела;

регистрации поглощения образца на второй длине волны ( $\lambda_2$ ), причем вторая длина волны представляет собой предопределенный максимум поглощения лекарственного препарата;

определения суммарного поглощения образца на первой и второй длинах волн;

измерение суммарного поглощения образца, содержащего антитело, путем

нанесения образца, содержащего антитело, на матрицу для эксклюзионной хроматографии;

регистрации поглощения образца, содержащего антитело, на первой длине волны ( $\lambda_1$ );

регистрации поглощения образца, содержащего антитело, на второй длине волны ( $\lambda_2$ ); и

определения суммарного поглощения образца, содержащего антитело, на первой и второй длинах волн; и

расчет DAR с помощью следующего уравнения 2:

$$\text{DAR} = \frac{\varepsilon_{\lambda 1}^{\text{mAb}}}{\text{Total Area}_{\lambda 1}^{\text{mAb}}} * \frac{\text{Total Area}_{\lambda 2}^{\text{ADC}} * \text{Total Area}_{\lambda 1}^{\text{mAb}} - \text{Total Area}_{\lambda 1}^{\text{ADC}} * \text{Total Area}_{\lambda 2}^{\text{mAb}}}{\varepsilon_{\lambda 2}^{\text{drug}} * \text{Total Area}_{\lambda 1}^{\text{ADC}} - \varepsilon_{\lambda 1}^{\text{drug}} * \text{Total Area}_{\lambda 2}^{\text{ADC}}}$$

где  $\varepsilon_{\lambda 1}^{\text{mAb}}$  - коэффициент экстинкции антитела на первой длине волны;  $\varepsilon_{\lambda 1}^{\text{drug}}$  - коэффициент экстинкции лекарственного препарата на первой длине волны;  $\varepsilon_{\lambda 2}^{\text{drug}}$  - коэффициент экстинкции лекарственного препарата на второй длине волны;  $\text{Total Area}_{\lambda 1}^{\text{mAb}}$  - суммарное поглощение образца, содержащего антитело, на первой длине волны;  $\text{Total Area}_{\lambda 2}^{\text{mAb}}$  - суммарное поглощение образца, содержащего антитело, на второй длине волны;  $\text{Total Area}_{\lambda 1}^{\text{ADC}}$  - суммарное поглощение образца, содержащего конъюгат антитела и лекарственного препарата, на первой длине волны; и  $\text{Total Area}_{\lambda 2}^{\text{ADC}}$  - суммарное поглощение образца, содержащего конъюгат антитела и лекарственного препарата, на второй длине волны.

3. Способ определения соотношения лекарственного препарата и антитела (DAR) в образце, содержащем конъюгат антитела и лекарственного препарата, включающий

помещение образца в сосуд;

перемещение зонда относительно сосуда так, чтобы зонд находился в контакте с дном сосуда;

перемещение зонда относительно сосуда так, чтобы зонд перемещался от дна сосуда через образец с заданным шагом так, чтобы получить заданную длину пути через раствор;

регистрацию поглощения образца на первой длине волны ( $\lambda 1$ ), причем первая длина волны представляет собой predetermined максимум поглощения антитела;

повтор этапов перемещения зонда относительно образца и проведения измерения на первой длине волны;

построение регрессионной линии по поглощению при первой длине волны и длине пути так, чтобы получить наклон регрессионной линии;

определение концентрации антитела путем деления наклона регрессионной линии на коэффициент экстинкции антитела на первой длине волны;

регистрацию поглощения образца на второй длине волны ( $\lambda 2$ ), причем вторая длина волны представляет собой predetermined максимум поглощения лекарственного препарата;

повтор этапов перемещения зонда относительно образца и проведения измерения на второй длине волны;

построение регрессионной линии по поглощению при второй длине волны и длине пути так, чтобы получить наклон регрессионной линии;

определение концентрации лекарственного препарата путем деления наклона регрессионной линии на коэффициент экстинкции лекарственного препарата на второй длине волны; и

расчет DAR с помощью определенной концентрации лекарственного препарата и определенной концентрации антитела.

По доверенности