(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 043811 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.26

(21) Номер заявки
201591710

(22) Дата подачи заявки
2014.03.12

(51) Int. Cl. ***C07K 16/00*** (2006.01)
A01N 43/04 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07D 487/00 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ ЦИКЛОДЕКСТРИН И КОНЪЮГАТ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

(31) **61/780,185; 61/782,231**
(32) **2013.03.13; 2013.03.14**
(33) **US**
(43) **2016.03.31**
(86) **PCT/US2014/024466**
(87) **WO 2014/165119 2014.10.09**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СИДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Ли Хой, Цзян Шань, Уоллэйс Мари, Мейер Дэймон (US)

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

(56) US-A1-20120238731
US-A1-20120028944
US-A1-20050084536
WO-A1-2011130613

(57) В изобретении описаны композиции, в том числе жидкие и лиофилизированные композиции, содержащие конъюгат антитело-бензодиазепиновый лекарственный препарат (ADC) и циклодекстрин. Также описаны способы очистки смесей, содержащих конъюгаты антитело-бензодиазепиновый лекарственный препарат и примеси, присутствие которых обусловлено технологией получения лекарственного препарата.

043811 B1

043811 B1

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 61/780185, поданной 13 марта 2013 г., и предварительной заявке на патент США № 61/782231, поданной 14 марта 2013 г., содержание которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте для всех целей.

Уровень техники

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) могут быть эффективным средством доставки лекарственного средства в участок-мишень в ткани или организме. Распознавание мишени, такой как опухоль, с помощью антитела минимизирует воздействие токсичных химиотерапевтических агентов на нецелевые ткани и ограничивает нежелательные эффекты, связанные с токсичностью "свободных" лекарственных средств (т.е. не связанных с носителем, таким как антитело). ADC могут быть получены несколькими способами. Перед введением человеку или другому индивиду, конъюгат очищают для удаления свободных лекарственных средств и других примесей.

В связи с очень высокой активностью лекарственных средств, содержащих бензодиазепин, удаление примесей, относящихся к лекарственному средству, из смеси, содержащей ADC бензодиазепина и примеси, относящиеся к бензодиазепиновому препарату, должно быть весьма эффективным. Настоящее изобретение удовлетворяет указанную потребность и другие потребности.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлен график, демонстрирующий процент высокомолекулярных (HMW) соединений, представленных в различных препаратах p2H12-1, хранящихся при 25°C. % HMW определяют в моменты времени 0, 7 и 14 дней.

На фиг. 2 представлен график, демонстрирующий процент высокомолекулярных (HMW) соединений, представленных в различных препаратах h1F6-1, хранящихся при 25°C. % HMW определяют в моменты времени 0, 7 и 14 дней.

На фиг. 3 представлен график, демонстрирующий процент высокомолекулярных (HMW) соединений, представленных в различных препаратах h2H12-3, хранящихся при 40°C. % HMW определяют в моменты времени 0, 3 и 7 дней.

На фиг. 4 представлен график, демонстрирующий процент высокомолекулярных (HMW) соединений, представленных в различных препаратах h1F6-3, хранящихся при 40°C. % HMW определяют в моменты времени 0, 3 и 7 дней.

На фиг. 5 представлен график, демонстрирующий процент высокомолекулярных (HMW) соединений, представленных в различных препаратах h2H12-2, хранящихся при 40°C. % HMW определяют в моменты времени 0, 3 и 7 дней.

На фиг. 6 представлен график, демонстрирующий процент высокомолекулярных (HMW) соединений, представленных в различных препаратах h1F6-2, хранящихся при 40°C. % HMW определяют в моменты времени 0, 3 и 7 дней.

На фиг. 7 представлен график, демонстрирующий процент кислотных соединений, представленных в различных препаратах h2H12-1, хранящихся при 25°C. Процент кислотных соединений определяют в моменты времени 0, 7 и 14 дней.

На фиг. 8 представлен график, демонстрирующий процент кислотных соединений, представленных в различных препаратах h21F6-1, хранящихся при 25°C. Процент кислотных соединений определяют в моменты времени 0, 7 и 14 дней.

На фиг. 9 представлен график, демонстрирующий процент кислотных соединений, представленных в различных препаратах h2H12-3, хранящихся при 40°C. Процент кислотных соединений определяют в моменты времени 0, 3 и 7 дней.

На фиг. 10 представлен график, демонстрирующий процент кислотных соединений, представленных в различных препаратах h1F6-3, хранящихся при 40°C. Процент кислотных соединений определяют в моменты времени 0, 3 и 7 дней.

На фиг. 11 представлен график, демонстрирующий процент кислотных соединений, представленных в различных препаратах h2H12-2, хранящихся при 40°C. Процент кислотных соединений определяют в моменты времени 0, 3 и 7 дней.

На фиг. 12 представлен график, демонстрирующий процент кислотных соединений, представленных в различных препаратах h21F6-2, хранящихся при 40°C. Процент кислотных соединений определяют в моменты времени 0, 3 и 7 дней.

На фиг. 13 представлен график, демонстрирующий процент высокомолекулярных (HMW) соединений, представленных в различных препаратах h1F6-1, хранящихся при 25°C. % HMW соединений определяют в моменты времени 0 и 7 дней.

На фиг. 14 представлен график, демонстрирующий концентрацию гидроксипропил-бета-циклодекстрина в процессе диафильтрации. Буфер для диафильтрации содержал 3% мас./об. циклодекстрина. Данные показывают, что мембрана проницаема для циклодекстрина.

На фиг. 15 представлен график, демонстрирующий удаление гашеных молекул лекарственное средство-линкер, присутствующих в реакционной смеси, используемой для конъюгирования, после гашения, при поддержании концентрации циклодекстрина 10% мас./об. (ромбы) или 3% мас./об. (квадраты).

На фиг. 16 представлен график, демонстрирующий удаление гашеных молекул лекарственное средство-линкер, присутствующих в реакционной смеси, используемой для конъюгирования, после гашения, при поддержании концентрации циклодекстрина 3% мас./об.

На фиг. 17 представлен график, демонстрирующий удаление гашеных молекул лекарственное средство-линкер, присутствующих в реакционной смеси, используемой для конъюгирования, после гашения, при поддержании концентрации циклодекстрина 3% мас./об.

На фиг. 18 представлен график, демонстрирующий удаление гашеных молекул лекарственное средство-линкер, присутствующих в реакционной смеси, используемой для конъюгирования, после гашения, при поддержании концентрации циклодекстрина 3% мас./об.

Общие сведения

Настоящее изобретение основано, частично, на обнаружении того, что удаление примесей, относящихся к бензодиазепиновому лекарственному препарату, из смеси, содержащей ADC бензодиазепина и примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству (также обозначаемой в описании, как смесь ADC), является неэффективным вследствие природы бензодиазепиновых средств, и на обнаружении того, что добавление циклодекстрина к смеси позволяет проводить эффективный клиренс примесей, относящихся к бензодиазепиновому лекарственному средству. Авторы настоящего изобретения обнаружили, в частности, что добавление циклодекстрина к смеси, содержащей ADC бензодиазепина и примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству, перед выполнением тангенциальной проточной фильтрации позволяет проводить эффективный клиренс примесей, относящихся к бензодиазепиновому лекарственному препарату.

Настоящее изобретение также основано, частично, на открытии, что циклодекстрин-содержащие композиции в составе ADC бензодиазепина проявляют исключительную стабильность по сравнению с препаратами, не содержащими циклодекстрин. Повышенная стабильность может быть подтверждена, например, с помощью одного или более из перечисленного ниже: (i) уменьшение скорости и степени агрегации, (ii) уменьшение роста кислотных соединений и (iii) снижение химической деградации препарата.

Сущность изобретения

В описании предоставляются способы удаления примесей, присутствие которых обусловлено бензодиазепиновым лекарственным средством, из смесей, содержащих ADC бензодиазепина и примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству, путем тангенциальной поточной фильтрации с использованием циклодекстрина. Способы включают воздействие на смесь, содержащую ADC бензодиазепина и примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству, с помощью тангенциальной поточной фильтрации. Применение циклодекстрина во время фильтрации облегчает процесс разделения.

Таким образом, в описании предоставляются способы удаления примесей, присутствие которых обусловлено бензодиазепиновым лекарственным средством, из смеси, содержащей ADC бензодиазепина и примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству, способы включают воздействие на смесь, содержащую ADC бензодиазепина и примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственномусредству, с помощью тангенциальной поточной фильтрации, где циклодекстрин используют для облегчения процесса очистки. В предпочтительных аспектах циклодекстрин добавляют в количестве, достаточном для поддержания в значительной степени растворимости компонентов в смеси ADC и предотвращения агрегации. Циклодекстрин может, например, присутствовать в смеси в начале процесса тангенциальной поточной фильтрации или, альтернативно, может быть добавлен в смесь только после начала тангенциальной поточной фильтрации (предпочтительно перед удалением значительной части примесей). В некоторых аспектах способы включают воздействие на смесь, содержащую ADC бензодиазепина и примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству, с помощью тангенциальной поточной фильтрации при поддержании концентрации по меньшей мере приблизительно 1% мас./об. циклодекстрина, по меньшей мере приблизительно 2% мас./об. циклодекстрина или по меньшей мере приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина в смеси. Настоящее изобретение также относится к способам, включающим получение смеси, содержащей ADC бензодиазепина, примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству, и циклодекстрин, где циклодекстрин представлен в концентрации по меньшей мере приблизительно 1% мас./об., и осуществление тангенциальной поточной фильтрации смеси при поддержании концентрации по меньшей мере приблизительно 1% мас./об. циклодекстрина в смеси; способы включают получение смеси, содержащей ADC бензодиазепина, примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству, и циклодекстрин, где циклодекстрин представлен в концентрации по меньшей мере приблизительно 2% мас./об., и осуществление тангенциальной поточной фильтрации смеси при поддержании концентрации по меньшей мере приблизительно 2% мас./об. циклодекстрина в смеси; и способы включают получение смеси, содержащей ADC бензодиазепина, примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству, и циклодекстрин, где циклодекстрин представлен в концентрации по меньшей мере приблизительно 3% мас./об., и осуществление тангенциальной поточной фильтрации смеси при поддержании концентрации по меньшей мере приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина в смеси.

Тангенциальная поточная фильтрация может представлять собой, например, диафильтрацию с постоянным объемом или периодическую диафильтрацию. Устройство для проведения тангенциальной поточной фильтрации может включать в себя, например, насос, емкость для фильтрации, имеющую входной патрубок, выпускной патрубок для фильтрата, выпускной патрубок для ретентата, ультрафильтрационную мембрану с размером пор приблизительно 50 кДа или меньше, которая разделяет емкость для фильтрации на входной отсек и выходной отсек, так что весь фильтрат должен поступать во входной патрубок и проходить через ультрафильтрационную мембрану перед вытеканием из емкости для фильтрации через выпускной патрубок для фильтрата, емкость для образца, предназначенную для хранения реакционной смеси, используемой для конъюгации, и емкость для буфера, гидравлически соединенную с емкостью для образца. В предпочтительных аспектах емкость для буфера содержит по меньшей мере приблизительно 1% мас./об. циклодекстрина, по меньшей мере приблизительно 2% мас./об. циклодекстрина или по меньшей мере приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина. Ультрафильтрационная мембрана может иметь диапазон размера пор, включающий, например, размер пор приблизительно 30 кДа. Ультрафильтрационная мембрана может быть изготовлена из различных материалов, в том числе из регенерированной целлюлозы.

Смесь, которую очищают с помощью тангенциальной поточной фильтрации, может представлять собой реакционную смесь, используемую для конъюгации, в том числе любую из реакционных смесей, используемых для конъюгации, описанных в настоящем документе. Примесь, относящаяся к бензодиазепиновому лекарственному средству, может представлять собой любую из примесей, описанных в настоящем документе. Примесь, относящаяся к бензодиазепиновому лекарственному средству, может быть гашеной или негашеной. Например, способы могут включать стадии контактирования антитела или антитела-линкера с соединением линкер-бензодиазепиновое лекарственное средство в условиях, достаточных для образования реакционной смеси, используемой для конъюгации, содержащей ADC бензодиазепина. В некоторых случаях реакционная смесь, используемая для конъюгации, может быть введена в контакт с гасящей добавкой для получения гашеной реакционной смеси, используемой для конъюгации. Негашеную или гашеную смесь, используемую для конъюгации, подвергают тангенциальной поточной фильтрации, как описано в настоящем документе. Альтернативно, способы могут включать стадии контактирования антитела или антитела-линкера со свободным лекарственным средством в условиях, достаточных для получения реакционной смеси, используемой для конъюгации, содержащей ADC бензодиазепина. В некоторых случаях реакционная смесь, используемая для конъюгации, может быть введена в контакт с гасящей добавкой для получения гашеной реакционной смеси, используемой для конъюгации. Негашеную или гашеную конъюгационную смесь подвергают тангенциальной поточной фильтрации, как описано в настоящем документе. Примесь, относящаяся к бензодиазепиновому лекарственному средству, может представлять собой, например, гашеную или негашеную молекулу лекарственное средство-линкер или гашеную или негашеную молекулу лекарственного средства. Способы по настоящему изобретению эффективны для удаления примесей, относящихся к бензодиазепиновому лекарственному средству.

Предпочтительно количество примесей, относящихся к бензодиазепиновому лекарственному средству, уменьшают до уровня приблизительно 1 мкМ или меньше, 0,5 мкМ или меньше, 0,1 мкМ или меньше или 0,05 мкМ или меньше.

Бета- и гамма-циклодекстрины, в том числе химически модифицированные бета- и гамма-циклодекстрины, являются особенно эффективными для использования в настоящем изобретении. Циклодекстрин может представлять собой, например, гидроксипропил-бета-циклодекстрин или сульфобутиловый эфир бета-циклодекстрина. В некоторых аспектах, если циклодекстрин представляет собой гамма-циклодекстрин, поддерживают концентрацию циклодекстрина по меньшей мере приблизительно 1% мас./об. во время тангенциальной поточной фильтрации, и если циклодекстрин представляет собой бета-циклодекстрин, поддерживают концентрацию циклодекстрина по меньшей мере приблизительно 2% мас./об. или по меньшей мере приблизительно 3% мас./об. во время тангенциальной поточной фильтрации.

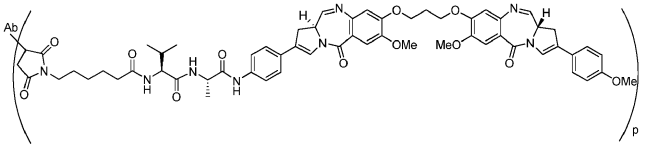
Также предоставляются фармацевтические композиции, содержащие ADC бензодиазепина и циклодекстрин в концентрации от приблизительно до приблизительно 30% мас./об., предпочтительно в концентрации от приблизительно 5% мас./об. или 6% мас./об. до приблизительно 30% мас./об. или от приблизительно 6% мас./об. до приблизительно 10% мас./об. Композиции могут быть в водной или неводной форме. Композиции могут содержать дополнительные вспомогательные вещества, такие как лиопротектор (предпочтительно сахар, такой как сахароза). Лиопротектор может быть в любой концентрации, обеспечивающей его эффективное действие, например, от приблизительно 4 до приблизительно 8% (мас./об.), предпочтительно приблизительно 6% (мас./об.). Значение pH композиции представляет собой физиологически подходящее значение pH. Примерные значения pH составляют приблизительно от 6,0 до 8,0 или приблизительно от 6,5 до 7,5, или приблизительно от 7 до 7,5. Композиции обычно содержат буферный агент. Буферный агент может быть выбран из широкого спектра буферных агентов, включая трис, ацетат, гистидин, цитрат, фосфат и сукцинат. Трис, например, может быть представлен в концентрации приблизительно 20 мМ. Концентрация ADC бензодиазепина в композиции может варьировать в широких пределах. В предпочтительных аспектах ADC представлен в концентрации от приблизительно

0,5 до приблизительно 30 мг/мл, от приблизительно 0,5 до приблизительно 10 мг/мл, от приблизительно 1 до приблизительно 10 мг/мл, от приблизительно 2 до приблизительно 10 мг/мл, от приблизительно 2 до приблизительно 5 мг/мл, предпочтительно приблизительно 3 мг/мл. Бета- и гамма-циклодекстрины являются особенно эффективными для использования в композициях, включая химически модифицированные бета- и гамма-циклодекстрины. Циклодекстрин может представлять собой, например, гидроксипропил-бета-циклодекстрин или сульфобутиловый эфир бета-циклодекстрина.

Предоставляются фармацевтические композиции, содержащие ADC PBD, где концентрация ADC составляет от приблизительно 2 до приблизительно 5 мг/мл; гидроксипропил-циклодекстрин в концентрации от приблизительно 5% мас./об. до приблизительно 10% мас./об.; сахар в концентрации от приблизительно 4% до приблизительно 8%; и по меньшей мере один буферный агент; где композиция находится в водном растворе, и в которой концентрация по меньшей мере одного буферного агента является эффективной для поддержания физиологически подходящего значения pH (например, от приблизительно 6 до приблизительно 8, более предпочтительно от приблизительно 7 до приблизительно 8 или от приблизительно 7 до приблизительно 7,5).

Предоставляются фармацевтические композиции, содержащие ADC PBD, где концентрация ADC составляет приблизительно 3 мг/мл; гидроксипропил-циклодекстрин представлен в концентрации приблизительно 6%; сахароза представлена в концентрации приблизительно 6%, трис представлен в концентрации приблизительно 20 мМ, и где значение pH композиции составляет приблизительно от 7 до 7,5 (например, приблизительно 7,3).

В способах и композициях, представленных в описании, ADC может иметь любую из формул, описанных в настоящем документе. ADC может представлять собой, например, ADC PBD. Например, ADC может иметь формулу



или представлять собой его фармацевтически приемлемую соль; где Ab представляет собой моноклональное антитело и p представляет собой среднее число молекул лекарственное средство-линкер на антитело и составляет приблизительно 2. В других аспектах ADC может содержать моноклональное антитело, конъюгированное с димером индолинобензодиазепина, или моноклональное антитело, конъюгированное с димером оксазолидинобензодиазепина. В способах и композиции, описанной в настоящем документе, антитело может представлять собой любое антитело, в том числе любое моноклональное антитело, в том числе гуманизированные антитела 2H12 или 1F6, описанные в настоящем документе. Конъюгация антитела с молекулой лекарственное средство-линкер может быть осуществлена любым из способов, известных в данной области, включая конъюгацию с использованием атома серы введенного остатка цистеина.

В описании также предоставляются способы получения стабилизированной лиофилизированной композиции конъюгата антитело-лекарственное средство. Способы могут включать получение водной композиции, которая описана в настоящем документе; и лиофилизацию водного раствора с образованием лиофилизированной композиции конъюгата антитело-лекарственное средство. Также предоставляются стабилизированные лиофилизированные композиции конъюгата антитело-лекарственное средство, полученные таким образом.

В описании также предоставляются способы предотвращения химической деградации и фрагментации молекулы бензодиазепиновый лекарственный препарат-линкер, прикрепленной к антителу. Способы могут включать объединение молекулы бензодиазепиновый лекарственный препарат-линкер, прикрепленной к антителу, с по меньшей мере приблизительно 6% мас./об. гамма-циклодекстрина или химически модифицированного бета-циклодекстрина, как описано в любом из вариантов осуществления, представленных в описании.

Определения

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в описании, имеют значение, обычно понимаемое специалистом с обычной квалификацией в данной области, относящейся к описанным способам и композициям. В данном контексте следующие термины и фразы имеют значения, приписанные им, если не указано иное.

Термин "гетероцикл" в данном контексте относится к моноциклической, бициклической или полициклической кольцевой системе, имеющей от 3 до 14 атомов в кольце (также обозначаемых как члены кольца), где по меньшей мере один атом кольца по меньшей мере в одном кольце представляет собой гетероатом, выбранный из N, O, P или S (и ко всем комбинациям и подкомбинациям диапазонов и конкретных значений атомов углерода и гетероатомов в ней). Гетероцикл может иметь от 1 до 4 кольцевых гетероатомов, независимо выбранных из N, O, P или S. Один или несколько атомов N, C или S в гетероцикле могут быть окислены. Моноциклический гетероцикл предпочтительно имеет от 3 до 7 членов кольца (например от 2 до 6 атомов углерода и от 1 до 3 гетероатомов, независимо выбранных из N, O, P

или S), и бициклический гетероцикл предпочтительно имеет от 5 до 10 членов кольца (например от 4 до 9 атомов углерода и от 1 до 3 гетороатомов, независимо выбранных из N, O, P или S). Кольцо, которое включает гетероатом, может быть ароматическим или неароматическим.

Термин "карбоцикл" в данном контексте относится к насыщенной или ненасыщенной ароматической немоноциклической, бициклической или полициклической кольцевой системе, имеющей от 3 до 14 атомов в кольце (и ко всем комбинациям и подкомбинациям диапазонов и конкретных значений атомов углерода в ней), где все атомы кольца являются атомами углерода. Моноциклические карбоциклы предпочтительно имеют от 3 до 6 атомов в кольце, более предпочтительно 5 или 6 атомов в кольце. Карбоциклы предпочтительно имеют от 3 до 8 атомов углерода в кольце.

Фраза "фармацевтически приемлемая соль" в данном контексте относится к фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям соединения. Соединение может содержать по меньшей мере одну аминогруппу, и, соответственно, соли присоединения кислоты могут быть образованы с аминогруппой. Типичные соли включают, но не ограничиваются ими, соли сульфата, трифторацетата, цитрата, ацетата, оксалата, хлорида, бромида, иодида, нитрата, бисульфата, фосфата, кислого фосфата, изоникотината, лактата, салицилата, кислого цитрата, тартрата, олеата, танната, пантотената, битартрата, аскорбата, сукцината, малеата, гентизината, фумарата, глюконата, глюкуронат, сахарата, формиата, бензоата, глутамата, метансульфоната, этансульфоната, бензолсульфоната, п-толуолсульфоната и памоата (т.е. 1,1'-метилен-бис-(2-гидрокси-3-нафтоата)).

Фармацевтически приемлемая соль может предусматривать присоединение другой молекулы, такой как ион ацетата, ион сукцината или другой противоион. Противоион может представлять собой любую органическую или неорганическую функциональную группу, которая стабилизирует заряд на исходном соединении. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может иметь более чем один заряженный атом в своей структуре. В случаях, когда несколько заряженных атомов являются частью фармацевтически приемлемой соли, может существовать несколько противоионов. Таким образом, фармацевтически приемлемая соль может иметь один или несколько заряженных атомов и/или один или более противоионов.

"Полипептид" или "полипептидная цепь" представляет собой полимер, состоящий из аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями, произведенный естественным образом или синтезированный. Полипептиды, состоящие из менее чем приблизительно 10 аминокислотных остатков, обычно называют "пептидами".

"Белок" представляет собой макромолекулу, содержащую одну или несколько полипептидных цепей. Белок может также содержать непептидные компоненты, такие как углеводные группы. Углеводы и другие непептидные заместители могут быть добавлены к белку клеткой, в которой продуцируется белок, и они будут изменяться в зависимости от типа клетки. Белки определены в описании в терминах аминокислотных структур их основных цепей; заместители, такие как углеводные группы, обычно не указывают конкретно, но, тем не менее, они могут быть представлены.

Термины "аминоконцевой" и "карбоксиконцевой" используются в описании для обозначения положений в полипептидах. Если позволяет контекст, термины используются со ссылкой на конкретную последовательность или часть полипептида для обозначения близости или относительного положения. Например, определенная последовательность, расположенная в карбоксиконцевом направлении от референсной последовательности внутри полипептида, располагается ближе к карбоксильному концу относительно референсной последовательности, но не обязательно на карбоксильном конце полного полипептида.

Термин "антитело" используется в описании для обозначения иммуноглобулиновых белков, которые продуцируются организмом в ответ на наличие антигена и связываются с антигеном, а также антиген-связывающих фрагментов и их вариантов, полученных с помощью методов генной инженерии. Таким образом, термин "антитело" включает, например, интактные моноклональные антитела, содержащие полноразмерные иммуноглобулиновые тяжелые и легкие цепи (например, антитела, полученные с использованием гибридомной технологии) и антиген-связывающие фрагменты антител, такие как фрагменты $F(ab')_2$ и Fab. Генно-инженерные интактные антитела и фрагменты, такие как химерные антитела, гуманизированные антитела, одноцепочечные Fv-фрагменты, одноцепочечные антитела, диатела, миниантитела, линейные антитела, поливалентные или мультиспецифические (например биспецифические) гибридные антитела и т.п. также включены. Таким образом, термин "антитело" используется расширительно для включения любого белка, который содержит антигенсвязывающий участок антитела, и способен к специфическому связыванию с антигеном.

Термин "генно-инженерные антитела" обозначает антитела, в которых аминокислотная последовательность была изменена, по сравнению с последовательностью нативного антитела. В связи с важностью технологий рекомбинантной ДНК в создании антител, не нужно ограничиваться последовательностями аминокислот, обнаруживаемых в естественных антителах; антитела могут быть перестроены для получения желаемых характеристик. Возможные варианты многочисленны и варьируют от замены только одной или нескольких аминокислот до полной реконструкции, например, вариабельной или константной области. Изменения в константной области, как правило, осуществляют для улучшения или измене-

ния характеристик, таких как, например, связывание комплемента, взаимодействие с клетками, и других эффекторных функций. Как правило, изменения в вариабельной области осуществляют для улучшения антигенсвязывающих характеристик, повышения стабильности вариабельной области или снижения риска иммуногенности.

"Антигенсвязывающий сайт антитела" представляет собой ту часть антитела, которая является достаточной для связывания с антигеном. Наименьший такой участок обычно представляет собой вариабельный домен или его генетически сконструированный вариант. Однодоменные сайты связывания могут быть получены из антител верблюда (см. Muyldermans and Lauwereys, J. Mol. Recog. 12: 131-140, 1999; Nguyen et al., EMBO J. 19:921-930, 2000) или из VH-доменов антител других видов для создания однодоменных антител ("dAb"; см. Ward et al., Nature 341 :544-546, 1989; патент США № 6248516, Winter et al.). В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающий сайт представляет собой полипептидную область, имеющую только 2 участка, определяющих комплементарность (CDR), встречающегося в природе или не встречающегося в природе (например, мутагенизированного) вариабельного домена тяжелой цепи или вариабельного домена легкой цепи, или их комбинации (например, Pessi et al., Nature 362:367-369, 1993; Qiu et al., Nature Biotechnol. 25:921-929, 2007). Обычно антигенсвязывающий сайт антитела содержит как вариабельный домен тяжелой цепи (VH), так и вариабельный домен легкой цепи (VL), которые связываются с общим эпитопом. В контексте настоящего изобретения антитело может включать в себя один или несколько компонентов в дополнение к антигенсвязывающему сайту, таких как, например, второй антигенсвязывающий сайт антитела (который может связываться с тем же или с другим эпитопом или с тем же или другим антигеном), пептидный линкер, константная область иммуноглобулина, шарнирная область иммуноглобулина, амфипатическая спираль (смотрите Pack and Pluckthun, Biochem. 31:1579-1584, 1992), непептидный линкер, олигонуклеотид (смотрите Chaudri et al., FEBS Letters 450:23-26, 1999), цитостатическое или цитотоксическое лекарственное средство и т.п., и может быть мономерным или мультимерным белком. Примеры молекул, содержащих антигенсвязывающий сайт антитела, известны в данной области и включают, например, Fv, одноцепочечные Fv (scFv), Fab, Fab', $F(ab')_2$, F(ab)c, диатела, dAb, миниантитела, наноантитела, слияния Fab-scFv, биспецифические $(scFv)_4$-IgG и биспецифические $(scFv)_2$-Fab (см., например, Hu et al, Cancer Res. 56: 3055-3061, 1996; Atwell et al, Molecular Immunology 33: 1301-1312, 1996; Carter and Merchant, Curr. Opin. Biotechnol. 8: 449-454, 1997; Zuo et al., Protein Engineering 13: 361-367, 2000; и Lu et al., J. Immunol. Methods 267:213-226, 2002).

В данном контексте термин "иммуноглобулин" относится к белку, состоящему из одного или нескольких полипептидов, по существу кодируемых геном(ами) иммуноглобулинов. Одна форма иммуноглобулина составляет основную структурную единицу нативных (т.е. природных) антител у позвоночных. Указанная форма представляет собой тетрамер и состоит из двух идентичных пар иммуноглобулиновых цепей, каждая пара имеет одну легкую цепь и одну тяжелую цепь. В каждой паре вариабельные области легкой и тяжелой цепей (VL и VH) вместе отвечают преимущественно за связывание с антигеном, и константные области отвечают преимущественно за эффекторные функции антитела. Пять классов иммуноглобулинового белка (IgG, IgA, IgM, IgD и IgE) были идентифицированы у высших позвоночных. IgG составляет основной класс; обычно он является вторым наиболее распространенным белком, обнаруживаемым в плазме крови. У человека IgG состоит из четырех подклассов, называемых IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Константные области тяжелой цепи класса IgG обозначают греческой буквой у. Например, иммуноглобулины подкласса IgG1 содержат константную область тяжелой цепи γ1. Каждая тяжелая цепь иммуноглобулина имеет константную область, которая состоит из белковых доменов константной области (CH1, шарнир, CH2 и CH3; IgG3 также содержит домен CH4), которые по существу инвариантны для данного подкласса в виде. Последовательности ДНК, кодирующие человеческие и нечеловеческие иммуноглобулиновые цепи, известны в данной области (смотрите, например, Ellison et al, DNA 1:11-18, 1981; Ellison et al., Nucleic Acids Res. 10:4071-4079, 1982; Kenten et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6661-6665, 1982; Seno et al., Nuc. Acids Res. 11:719-726, 1983; Riechmann et al., Nature 332:323-327, 1988; Amster et al., Nuc. Acids Res. 8:2055-2065, 1980; Rusconi and Kohler, Nature 314:330-334, 1985; Boss et al., Nuc. Acids Res. 12:3791-3806, 1984; Bothwell et al., Nature 298:380-382, 1982; van der Loo et al., Immuno genetics 42:333-341, 1995; Karlin et al, J. Mol. Evol. 22: 195-208, 1985; Kindsvogel et al., DNA 1 :335-343, 1982; Breiner et al., Gene 18: 165-174, 1982; Kondo et al., Eur. J. Immunol. 23:245-249, 1993; и по каталогу GenBank № J00228). Для обзора структуры и функции иммуноглобулинов смотрите Putnam, The Plasma Proteins, Vol V, Academic Press, Inc., 49-140, 1987; и Padlan, Mol. Immunol. 31: 169-217, 1994. Термин "иммуноглобулин" используется в описании в его обычном смысле и обозначает интактное антитело, составляющие его цепи или фрагменты цепей, в зависимости от контекста.

Полноразмерные иммуноглобулиновые "легкие цепи" (приблизительно 25 кДа или 214 аминокислот) кодируются на аминоконце геном вариабельной области (кодирующим приблизительно 110 аминокислот) и геном константной области каппа или лямбда на карбоксильном конце. Полноразмерные иммуноглобулиновые "тяжелые цепи" (приблизительно 50 кДа или 446 аминокислот) кодируются геном вариабельной области (кодирующим приблизительно 116 аминокислот) и геном константной области гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон (кодирующим приблизительно 330 аминокислот), последний оп-

ределяет изотип антитела в виде IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, соответственно. В легких и тяжелых цепях вариабельные и константные области соединены "J"-областью из приблизительно 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также включает "D"-область из приблизительно 10 или более аминокислот (смотрите в целом Fundamental Immunology (Paul, ed., Raven Press, N.Y., 2nd ed. 1989), Ch. 7).

Вариабельная область легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина (также обозначаемая в описании как "вариабельный домен легкой цепи" ("VL-домен") или "вариабельный домен тяжелой цепи" ("VH-домен") соответственно) состоит из "каркасного" участка, прерываемого тремя гипервариабельными участками, также называемыми "участками, определяющими комплементарность" или "CDR". Каркасные участки служат для выравнивания CDR при специфическом связывании с эпитопом антигена. Таким образом, термин "гипервариабельный участок" или "CDR" относится к аминокислотным остаткам антитела, которые преимущественно ответственны за связывание антигена. Начиная от аминоконца и заканчивая карбоксиконцом, оба домена, VL и VH, содержат следующие каркасные (FR) и CDR участки: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Приписывание аминокислот к каждому домену проводится в соответствии с определениями Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991), или Chothia & Lesk., Mol. Biol. 196:901-917, 1987; Chothia et al., Nature 342:878-883, 1989. Kabat также предоставляет широко используемую систему нумерации (нумерация по Kabat), в которой соответствующим остаткам в разных тяжелых цепях или в разных легких цепях присваивается одинаковый номер. CDR 1, 2 и 3 VL-домена также обозначаются в описании, соответственно, как CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3; CDR 1, 2 и 3 VH-домена также обозначаются в описании, соответственно, как CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3.

Если контекст не подразумевает иное, термин "моноклональное антитело", используемый в описании, не ограничивается антителами, полученными с помощью гибридомной технологии. Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, которое получено из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, и не относится к способу, с помощью которого он получен.

Термин "химерное антитело" относится к антителу, имеющему вариабельные домены, полученные от первого вида, и константные участки, полученные от второго вида. Химерные иммуноглобулины или антитела можно сконструировать, например, путем генной инженерии из сегментов иммуноглобулиновых генов, принадлежащих к разным видам. Термин "гуманизированное антитело", согласно приведенному ниже определению, не охватывает химерные антитела. Хотя гуманизированные антитела являются химерными по своей конструкции (т.е. содержат области, полученные от более чем одного вида белка), они содержат в себе дополнительные особенности (т.е. вариабельные участки, содержащие донорные остатки CDR и акцепторные остатки каркасной области), не обнаруживаемые в химерных иммуноглобулинах или антителах, как определено далее.

Термин "гуманизированный VH-домен" или "гуманизированный VL-домен" относится к иммуноглобулиновому VH-или VL-домену, содержащему несколько или все CDR, полученные полностью или в основном из нечеловеческого донорского иммуноглобулина (например, мыши или крысы) и последовательности каркасных участков вариабельной области, полученные полностью или в основном из последовательностей иммуноглобулина человека. Нечеловеческий иммуноглобулин, предоставляющий CDR, называется "донором" и человеческий иммуноглобулин, обеспечивающий каркас, называется "акцептором". В отдельных случаях гуманизированные антитела могут сохранять нечеловеческие остатки в каркасных участках вариабельных доменов для улучшения соответствующих характеристик связывания (например, могут потребоваться мутации в каркасных участках для сохранения аффинности связывания при гуманизации антитела).

"Гуманизированное антитело" представляет собой антитело, содержащее один или оба, гуманизированный VH-домен и гуманизированный VL-домен. Константная область(и) иммуноглобулинов не обязательно представлена, но если есть, она полностью или в основном получена из константных областей иммуноглобулина.

CDR в гуманизированном антителе происходит "в основном из" соответствующего CDR нечеловеческого антитела, если по меньшей мере 60%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95 или 100% соответствующих остатков (в соответствии с определением Kabat) являются идентичными в соответствующих CDR. В конкретных вариантах осуществления гуманизированного VH- или VL-домена, в которых CDR по существу получены из нечеловеческого иммуноглобулина, CDR гуманизированного VH- или VL-домена имеют не более шести (например, не более пяти, не более четырех, не более трех, не более двух или не более одной) аминокислотных замен среди всех трех CDR, по сравнению с соответствующими нечеловеческими CDR VH или VL. Каркасные последовательности вариабельной области VH- или VL-домена антитела или, если представлены, последовательности константной области иммуноглобулина, происходят "в основном из" каркасной последовательности VH или VL человека или константной области иммуноглобулина человека, соответственно, если по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95 или 100% соответствующих остатков согласно определению Kabat являются идентичными. Таким образом, все части гуманизированного антитела, за исключением, возможно, CDR, происходят полностью или в основном из соответствующих частей природных последо-

вательностей иммуноглобулина человека.

Специфическое связывание антитела с его целевым антигеном подразумевает аффинность по меньшей мере 10^6, 10^7, 10^8, 10^9 или 10^{10} M^{-1}. Специфическое связывание заметно выше по величине и отличается от неспецифического связывания, происходящего по меньшей мере с одной посторонней мишенью. Специфическое связывание может быть результатом образования связей между определенными функциональными группами или может быть результатом определенного пространственного соответствия (например, типа "ключ и замок") тогда как неспецифическое связывание, как правило, является результатом действия сил Ван-дер-Ваальса. Однако специфическое связывание необязательно подразумевает, что моноклональное антитело связывается с одной и только одной мишенью.

Что касается белков, которые описаны в настоящем документе, ссылка на аминокислотные остатки, соответствующие тем остаткам, которые указаны с помощью SEQ ID NO, включает посттрансляционные модификации таких остатков.

Термин "стабилизированный" в контексте композиций конъюгата антитело-лекарственное средство, которые описаны в настоящем документе, относится к композиции, в которой конъюгат антитело-лекарственное средство в общем и целом сохраняет свою физическую и химическую идентичность и целостность при хранении. Различные аналитические методы для измерения стабильности белка доступны в данной области (см., например, Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301 (Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. 1991) и Jones, Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90, 1993). Типичные методики измерения стабильности белка также описаны в настоящем документе (смотрите примеры ниже). Стабильность можно измерить при выбранной температуре в течение выбранного периода времени. Для быстрого тестирования препарат можно хранить при более высокой температуре или температуре "ускоренной деградации", например, при 40°C в течение от 1 недели до 1 месяца или больше, при этом измеряют стабильность. В примерах осуществления композиция является устойчивой к образованию побочных продуктов компонента белка антитела, например, высокомолекулярных продуктов агрегации, низкомолекулярных продуктов деградации или фрагментации, кислых соединений, химических продуктов распада или их смесей. Термин "стабильность" относится к продолжительности времени, в течение которого молекулярные частицы, такие как антитело, сохраняют свою первоначальную химическую идентичность, например, первичную, вторичную и/или третичную структуру.

Термин "побочный продукт" включает нежелательные продукты, которые занижают или сокращают долю терапевтического конъюгата антитело-лекарственное средство в данной композиции. Типичные побочные продукты включают агрегаты конъюгата антитело-лекарственное средство, фрагменты конъюгата антитело-лекарственное средство (например, образующиеся при деградации белка антитела путем деамидирования или гидролиза или химической деградации и фрагментации лекарственного средства-линкера), кислые варианты конъюгата антитело-лекарственное средство или их смеси.

Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) представляет собой антитело, конъюгированное с цитотоксическим лекарственным средством, как правило, через линкер. Линкер может содержать расщепляемую часть или может быть ненерасщепляемым. Расщепляемые линкеры включают в себя, например, линкеры, содержащие дисульфиды, которые расщепляются посредством дисульфидного обмена, кислотно-лабильные линкеры, которые расщепляются при кислом значении pH, и линкеры, которые расщепляются гидролазами (например, гликозил-гидролазами, такими как глюкуронидазы), эстеразами и пептидазами (например, пептидные линкеры и глюкуронидные линкеры). Нерасщепляемые линкеры, как полагают, высвобождают лекарственное средство за счет механизма протеолитической деградации антитела.

Термин "высокомолекулярные агрегаты" включает агрегаты конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), а также агрегаты, содержащие фрагменты ADC (например, образующиеся при деградации полипептида, например, путем гидролиза), и агрегаты, содержащие смеси ADC и таких фрагментов. Наличие высокомолекулярных агрегатов можно определить, например, с помощью гель-хроматографии (SEC). Обычно высокомолекулярные агрегаты представляют собой комплексы, которые имеют молекулярную массу, которая больше, чем молекулярная масса терапевтического мономерного ADC. В случае ADC, в котором компонент антитела представляет собой тетрамер, состоящий из двух идентичных пар цепей иммуноглобулина, каждая пара имеет одну легкую цепь и одну тяжелую цепь (например, изотипа IgG), молекулярная масса таких агрегатов составляет больше, чем приблизительно 150 кДа. Однако в случае ADC, в котором компонент антитела имеет молекулярную массу больше или меньше, чем молекулярная масса белка типичного моноспецифического, тетрамерного антитела, состоящего из двух легких цепей иммуноглобулина и двух тяжелых цепей иммуноглобулина (например, одноцепочечные антитела или биспецифические антитела), размер таких агрегатов может изменяться соответствующим образом.

Термин "низкомолекулярный продукт деградации" включает, например, фрагменты конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), такие как, например, фрагменты, образующиеся при деамидировании или гидролизе. Наличие низкомолекулярных продуктов деградации можно выявить, например, с помощью гель-хроматографии (SEC). Обычно низкомолекулярные продукты деградации имеют молекулярную массу, которая меньше, чем молекулярная масса терапевтического мономерного ADC. В случае

ADC, в котором компонент антитела представляет собой тетрамер, состоящий из двух идентичных пар цепей иммуноглобулина, каждая пара имеет одну легкую цепь и одну тяжелую цепь (например, изотипа IgG), молекулярная масса таких агрегатов составляет меньше, чем приблизительно 150 кДа. Однако в случае ADC, в котором компонент антитела имеет молекулярную массу больше или меньше, чем молекулярная масса белка типичного моноспецифического, тетрамерного антитела, состоящего из двух легких цепей иммуноглобулина и двух тяжелых цепей иммуноглобулина (например, одноцепочечные антитела или биспецифические антитела), размер таких продуктов деградации может изменяться соответствующим образом.

"Кислый вариант" исследуемого конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) представляет собой вариант ADC, который является более кислым, чем экспериментальный PI ADC.

Наличие кислых вариантов можно выявить, например, с помощью катионообменной хроматографии или метода капиллярного изоэлектрофокусирования с детекцией в капилляре (icIEF). Примером кислого варианта является дезамидированный вариант. Деамидированные варианты белковой молекулы представляют собой варианты, в которых один или несколько нейтральных амидов боковой цепи(ей) превратились в остаток с общим кислотным характером (например, один остаток или несколько остатков аспарагина исходного полипептида превратились в аспартат).

Термин "разбавитель" в данном контексте относится к раствору, подходящему для изменения или достижения типичной или соответствующей концентрации или концентраций, которые описаны в настоящем документе.

Термин "контейнер" относится к чему-либо, в чем объект или жидкость может помещаться или содержаться, например, для хранения (например, резервуар, приемник, сосуд или т.п.).

Термин "путь введения" включает принятые в данной области пути доставки терапевтического белка, такие как, например, парентеральный, внутривенный, внутримышечный или подкожный путь введения. При введении ADC для лечения рака, может быть желательным введение в системный кровоток путем внутривенного или подкожного введения. Для лечения рака, характеризующегося солидной опухолью, введение может быть ограниченно непосредственно опухолью, если это желательно.

Термин "лечение" относится к введению терапевтического агента пациенту, который имеет заболевание, с целью излечения, заживления, частичного устранения симптомов, замедления развития заболевания, ослабления симптомов, изменения, устранения заболевания, улучшения состояния, выздоровления или воздействия на заболевание.

Термин "пациент" включает человека и других млекопитающих, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

Термин "эффективное количество", "эффективная доза" или "эффективная дозировка" относится к количеству, которое достаточно для достижения или по меньшей мере частичного достижения желаемого эффекта, например, достаточного для ингибирования появления или улучшения одного или нескольких симптомов заболевания или нарушения. Эффективное количество фармацевтической композиции вводят в "эффективном" режиме. Термин "эффективный режим" относится к сочетанию количества композиции, которую вводят, и частоты введения дозы для осуществления профилактического или терапевтического лечения заболевания или нарушения.

Термин "дозированная лекарственная форма" (или "стандартная лекарственная форма") в данном контексте относится к физически дискретной единице, подходящей в качестве однократных доз для пациента, который получает лечение, каждая единица содержит заданное количество активного соединения (ADC согласно настоящему изобретению), рассчитанного для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем, разбавителем или вспомогательным веществом. Спецификация дозированных лекарственных форм по изобретению продиктована и непосредственно зависит от уникальных характеристик активного соединения и от конкретного терапевтического эффекта, который должен быть достигнут, и от ограничений, существующих в области изготовления смесей такого активного соединения для лечения пациентов.

Фактические уровни доз ADC в композиции по настоящему изобретению могут быть изменены таким образом, чтобы получить количество ADC, которое является эффективным для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, и не является токсичным для пациента. Выбранный уровень доз будет зависеть от различных фармакокинетических факторов, включая активность конкретных композиций по настоящему изобретению, которые используют, путь введения, скорость экскреции конкретного используемого соединения, продолжительность лечения, другие препараты, соединения и/или материалы, используемые в сочетании с конкретными композициями, возраст, пол, вес, заболевание, общее состояние здоровья и анамнез пациента, получающего лечение, и подобные факторы, хорошо известные в области медицины.

"Цитотоксический эффект" относится к истощению, элиминации и/или гибели клетки-мишени. "Цитотоксический агент" относится к агенту, который оказывает цитотоксическое действие на клетки.

"Цитостатический эффект" означает ингибирование клеточной пролиферации. "Цитостатический агент" означает агент, который оказывает цитостатическое действие на клетку, таким образом ингибирует рост и/или распространение специфической субпопуляции клеток.

Две аминокислотные последовательности имеют "100% идентичность аминокислотных последовательностей", если аминокислотные остатки двух аминокислотных последовательностей являются одинаковыми, при их выравнивании для определения максимального соответствия. Сравнение последовательностей можно осуществить с помощью стандартного программного обеспечения, такого как программное обеспечение, включенное в пакет программ LASERGENE bioinformatics, который производится DNASTAR (Madison, Wisconsin). Другие способы сравнения двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей путем определения оптимального выравнивания хорошо известны специалистам в данной области техники (смотрите, например, Peruski and Peruski, The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research (ASM Press, Inc. 1997); Wu et al. (eds.), "Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins," в Methods in Gene Biotechnology 123-151 (CRC Press, Inc. 1997); Bishop (ed.), Guide to Human Genome Computing (2nd ed., Academic Press, Inc. 1998)). Считают, что две аминокислотные последовательности имеют "существенную идентичность последовательностей", если две последовательности имеют по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательности относительно друг друга.

Процентные значения идентичности последовательностей определяют для последовательностей антител, максимально выровненных по системе нумерации Kabat. После выравнивания, если исследуемый участок антитела (например, полный вариабельный домен тяжелой или легкой цепи) сравнивают с аналогичным участком референсного антитела, процент идентичности последовательностей между исследуемым и референсным участками антител представляет собой число положений, занятых одной и той же аминокислотой в обоих, исследуемом и референсном, участках антител, деленное на общее число выравненных положений двух участков, без учета пропусков, умноженное на 100 для преобразования в процентное отношение.

Термин "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который находится в такой форме, которая обеспечивает биологическую активность активного ингредиента, который должен быть эффективным (при введении индивиду) и который не содержит дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для индивида, которому вводят композицию. Такие композиции являются стерильными.

Композиции или способы, "содержащие" один или более из перечисленных элементов, могут включать другие элементы, не перечисленные конкретно.

Ссылка на числовой диапазон в описании (например, "X до Y" или "от X до Y") включает в себя конечные точки, определяющие диапазон, и все значения, находящиеся в пределах диапазона.

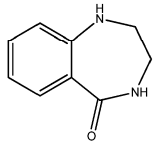
Если иное не следует из контекста, когда значение выражено, как "приблизительно" X или "примерно" X, указанное значение X следует понимать с точностью до ±10%.

Описание иллюстративных вариантов осуществления

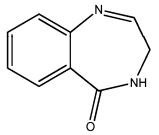
Конъюгаты антитело-бензодиазепиновое лекарственное средство

Конъюгат антитело-бензодиазепиновое лекарственное средство относится к антителу, конъюгированному с димером бензодиазепина, обычно, хотя и необязательно, с помощью линкера. Термин "бензодиазепиновое лекарственное средство-линкер" относится к димеру бензодиазепина, прикрепленному к линкеру. Линкерный компонент соединения бензодиазепиновое лекарственное средство-линкер обычно имеет функциональную группу для присоединения к антителу. Соединение бензодиазепина имеет в своей центральной части бензольное кольцо, конденсированное с диазепиновым кольцом. Типичные кольцевые структуры бензольного кольца, конденсированного с диазепиновым кольцом, представляют собой следующие структуры:

3,4-дигидро-1H-бензо[e][1,4]диазепин-5(2H)-он



3H-бензо[e][1,4]диазепин-5(4H)-он

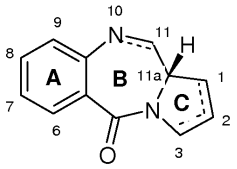


Соединения бензодиазепина отличаются по числу, типу и положению заместителей в обоих кольцах и по степени насыщения диазепинового кольца. Они также отличаются по числу дополнительных колец, конденсированных с бензольным и/или диазепиновым кольцом. Определение "соединения бензодиазепина" включает соединения, в которых бензольное или диазепиновое кольцо конденсировано с одним или несколькими ароматическими или неароматическими карбоциклическими или гетероциклическими кольцами. Димер бензодиазепина представляет собой соединение, которое образовано путем соединения вместе двух звеньев бензодиазепина, с помощью связывающей группы.

Антитело, как компонент конъюгата антитело-бензодиазепиновое лекарственное средство, может быть конъюгировано с одной или несколькими молекулами бензодиазепиновое лекарственное средство-линкер, например от 1 до 20 молекул бензодиазепиновое лекарственное средство-линкер. В некоторых аспектах антитело, как компонент конъюгата антитело-бензодиазепиновое лекарственное средство, будет конъюгировано с 1, 2, 3 или 4 молекулами лекарственное средство-линкер. Конъюгация может осущест-

вляться через различные положения в молекуле антитела. В некоторых аспектах конъюгация будет осуществляться с помощью атома серы остатка цистеина. В некоторых аспектах остаток цистеина является остатком цистеина межцепочечных дисульфидов антитела. В других аспектах остаток цистеина встраивают в антитело. В некоторых аспектах остаток цистеина встраивают в антитело в положении 239 (IgGl человека), которое определено с помощью EU-индекса (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 и 1991)). В некоторых аспектах предусматривается в среднем две молекулы лекарственное средство-линкер на антитело в смеси или композиции ADC бензодиазепина, и молекулы лекарственное средство-линкер будут конъюгированы с остатком цистеина, введенным в антитело в положении 239 (IgGl человека), которое определено согласно EU-индексу (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 и 1991)).

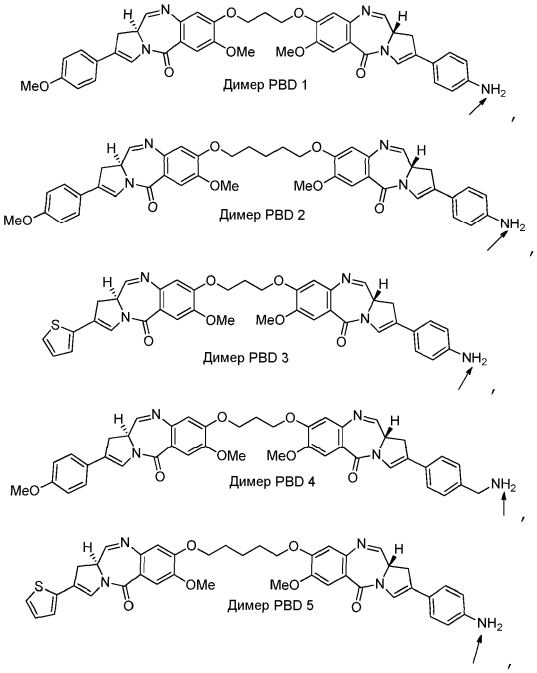
В одном аспекте димер бензодиазепина представляет собой димер пирролобензодиазепина (PBD). PBD имеют общую структуру:

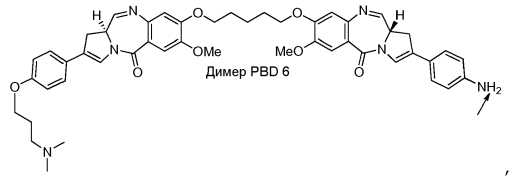


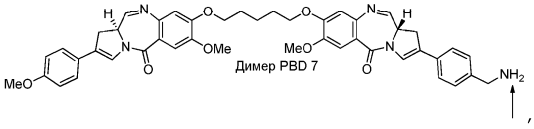
PBD различаются по количеству, типу и положению заместителей в обоих, ароматическом кольце A и пиррольном кольце C, и по степени насыщения кольца C. В кольце B имеется либо имин (N=C), карбиноламин (NH-CH(OH)), либо эфир карбиноламина (NH-CH(OR)) в положении N10-C11, которое является электрофильным центром, ответственным за алкилирование ДНК. Все известные натуральные продукты имеют (S)-конфигурацию в хиральном положении C11a, которая обеспечивает правостороннее скручивание, если смотреть в направлении от C-кольца к A-кольцу. Указанное скручивание придает им соответствующую трехмерную форму, изоспиральную малой бороздке B-формы ДНК, приводящую к плотному прилеганию в сайте связывания.

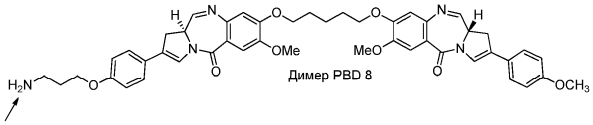
Способность PBD к образованию аддукта в малой бороздке обеспечивает их способность препятствовать процессингу ДНК, следовательно, обеспечивает их использование в качестве противоопухолевых агентов. Биологическая активность указанных молекул может быть усилена, например, путем соединения вместе двух звеньев PBD (например, с помощью C8/C'-гидроксильных групп через гибкий алкиленовый линкер). Считают, что димеры PBD создают селективные к последовательности ДНК повреждения, такие как палиндромная 5'-Pu-GATC-Py-3' межнитевая поперечная сшивка, которые, как полагают, в основном обуславливают их биологическую активность.

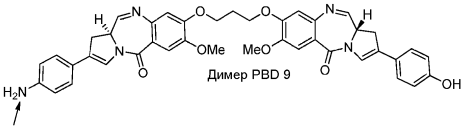
Типичные димеры PBD, которые можно использовать в качестве конъюгатов, представляют собой следующие димеры:

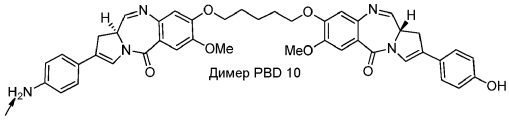


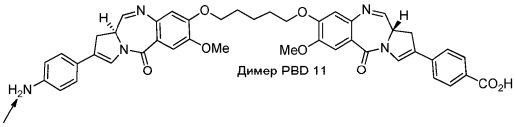


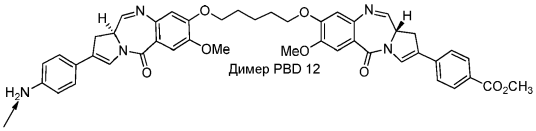


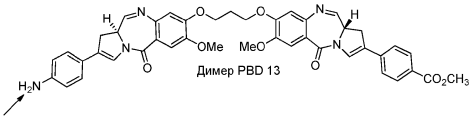


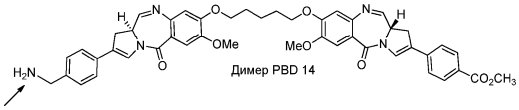


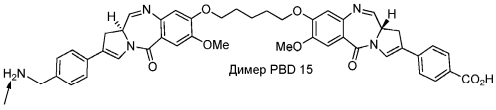


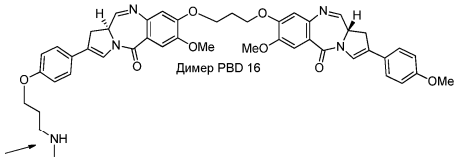




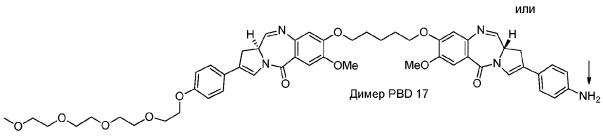








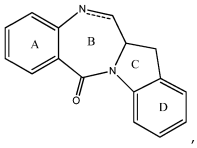
или



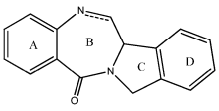
или их соль (например, фармацевтически приемлемую соль).

Димер PBD может быть связан с антителом в любом положении, подходящем для конъюгации с линкером. Например, в некоторых вариантах осуществления димер PBD будет иметь заместитель в положении C2 (например, первичный или вторичный амин), который обеспечивает "якорь" для связывания соединения с антителом. Положение C2 отмечено стрелкой в типичных структурах, показанных выше. В альтернативных вариантах осуществления положение N10 димера PBD будет обеспечивать "якорь" для связывания соединения с антителом.

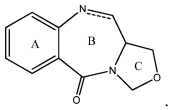
В другом аспекте димер бензодиазепина представляет собой димер индолинобензодиазепина или димер оксазолидинобензодиазепина. Индолинобензодиазепины (IBD) и оксазолидинобензодиазепины (OBD) имеют общую структуру:



,



и

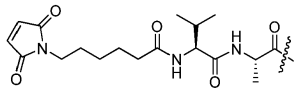


.

Индолинобензодиазепины и оксазолидинобензодиазепины различаются по количеству, типу и положению заместителей в кольцах. Как и в случае PBD, два звена индолинобензодиазепина или два звена оксазолидинобензодиазепина могут быть соединены вместе с образованием димеров, например, за счет эфирных групп A-колец двух мономерных звеньев. Как и в случае PBD, димер индолинобензодиазепина или димер оксазолидинобензодиазепина может быть связан с антителом в любом положении, подходящем для конъюгации с линкером.

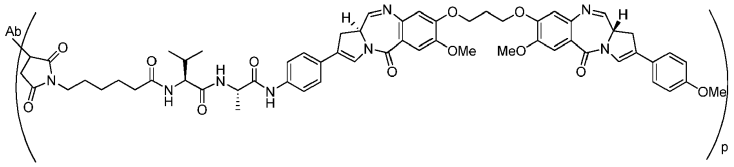
ADC бензодиазепина, который содержит димер в качестве лекарственного компонента, также может быть обозначен как ADC PBD. Аналогичным образом, ADC бензодиазепина, который содержит димер индолинобензодиазепина в качестве лекарственного компонента, может быть обозначен как IBD ADC, и ADC, который содержит димер оксазолидинобензодиазепина в качестве лекарственного компонента, может быть обозначен как OBD ADC. Обычно ADC бензодиазепина, включая ADC PBD, ADC IBD и ADC OBD, содержат линкер между бензодиазепиновым лекарственным средством и антителом. Линкер может содержать расщепляемую часть (например, аминокислоту или непрерывную последовательность аминокислот, которая является целевым субстратом для фермента) или может представлять собой нерасщепляемый линкер (например, линкер, высвобождаемый деградацией антитела). Линкер может дополнительно содержать малеимидную группу для связывания с антителом, в том числе, например, малеимидокапроил. Линкер может содержать альтернативную группу для связывания с антителом, в том числе, например, N-гидроксисукцинимидиловый эфир или лабильный дисульфид, в том числе, например, тиопиридилдисульфид. Димеры PBD, димеры IBD, димеры OBD, линкеры и их конъюгаты известны в данной области (см., например, WO 2010/091150, WO 2012/112708, WO 2012/128868, WO 2011/023883 и WO 2009/016516).

Типичный линкер для связывания антитела с димером бензодиазепина, включая любой димер из описанных в настоящем документе димеров, представлен ниже, в котором волнистой линией показано место присоединения лекарственного средства, и антитело присоединяется через малеимидную группу.



.

Типичные конъюгаты на основе PBD антитело-лекарственное средство включают конъюгаты антитело-лекарственное средство, согласно приведенной ниже формуле:



или их соль (например, фармацевтически приемлемая соль), где Ab представляет собой антитело (например, моноклональное антитело) и содержание лекарственного вещества представлено с помощью p, числа молекул лекарственного средства-линкера на антитело. В зависимости от контекста, p может представлять собой среднее число молекул лекарственное средство-линкер на антитело, также называемое средним содержанием лекарственного вещества. p изменяется в диапазоне от 1 до 20 и предпочтительно составляет от 1 до 8. В некоторых аспектах, если p представляет собой среднее содержание лекарственного вещества, p изменяется в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 5. В некоторых аспектах p составляет приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4 или приблизительно 5. В некоторых аспектах антитело конъюгируют с линкером лекарственного средства с помощью атома серы остатка цистеина. В некоторых аспектах остаток цистеина является остатком цистеина межцепочечных дисульфидных связей антитела. В других аспектах остаток цистеина встраивают в антитело. В некоторых аспектах остаток цистеина встраивают в антитело в положении 239 (IgG1), которое установлено по

нумерации согласно EU-индексу (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991)). В некоторых таких аспектах p составляет приблизительно 2. Способы создания таких ADC известны в данной области (см., например, International Publication No. WO 2011/130613).

Реакция конъюгации

Настоящее изобретение относится, в частности, к способам удаления примесей, присутствие которых обусловлено бензодиазепиновым лекарственным средством, из смеси, содержащей ADC бензодиазепина и примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству. Примесь, присутствие которой обусловлено бензодиазепиновым лекарственным средством, представляет собой любую примесь, относящуюся к лекарственному средству, появляющуюся в результате реакции конъюгации антитела с димером бензодиазепина или с молекулой бензодиазепиновое лекарственное средство-линкер. Примеси, присутствие которых обусловлено бензодиазепиновым лекарственным средством, могут содержать, например, свободные лекарственные средства бензодиазепинового димера, молекулы бензодиазепиновый лекарственный препарат-линкер, гашеные молекулы бензодиазепиновое лекарственное средство-линкер или продукты деградации молекул бензодиазепиновое лекарственное средство-линкер. Примеси, присутствие которых обусловлено бензодиазепиновым лекарственным средством, не являются бензодиазепиновыми лекарственными средствами, конъюгированными с антителами или молекулами лекарственное средство-линкер, конъюгированными с антителами.

В некоторых аспектах настоящего изобретения антитело вводят в контакт с молекулой бензодиазепиновое лекарственное средство-линкер в условиях, достаточных для образования смеси, содержащей ADC бензодиазепина и примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству (также обозначаемой в описании как реакционная смесь, используемая для конъюгации). В других аспектах молекула антитело-линкер (антитело, конъюгированное с линкером) вводят в контакт со свободным бензодиазепиновым лекарственным средством в условиях, достаточных для создания смеси, содержащей ADC бензодиазепина и примеси, относящиеся к бензодиазепиновому средству (также обозначаемой в описании как реакционная смесь, используемая для конъюгации). В других аспектах молекулу антитело-линкер вводят в контакт с молекулой бензодиазепиновое лекарственное средство-линкер в условиях, достаточных для образования смеси, содержащей ADC бензодиазепина и примеси, относящиеся к бензодиазепиновому средству (также обозначаемой в описании как реакционная смесь, используемая для конъюгации). Общие способы конъюгирования антител с линкерами или с молекулами лекарственное средство-линкер известны в данной области и не описываются подробно. В некоторых аспектах конъюгация будет осуществляться с остатками лизина антитела. В других аспектах конъюгация будет осуществляться с нативным или встроенным цистеином, представленным в антителе (например, цистеин межцепочечных дисульфидов или остаток цистеина, введенный в тяжелую или легкую цепь антитела). В некоторых аспектах конъюгация будет осуществляться со встроенным цистеином, представленным в антителе, антитело будет редуцировано перед контактированием с молекулой бензодиазепиновое лекарственное средство-линкер, антитело будет частично повторно окислено (т.е. повторно окислено в отношении межцепочечных дисульфидов, но не в отношении встроенного цистеина) и молекулу бензодиазепиновое лекарственное средство-линкер будут конъюгировать с встроенным цистеином частично повторно окисленного антитела. В некоторых таких аспектах встроенный цистеин будет находиться в положении 239 (IgG1, нумерация согласно EU-индексу, как указано Kabat).

Специалисту в данной области понятно, что условия, используемые для конъюгации антитела или молекулы антитело-линкер и лекарственного средства или молекулы лекарственное средство-линкер будут зависеть, в частности, от особенностей средства и линкера. В целом, реакции конъюгации осуществляют при температуре от приблизительно 0 до приблизительно 40°C. В некоторых вариантах осуществления реакцию конъюгации проводят при приблизительно 4°C. В некоторых вариантах осуществления реакцию конъюгации проводят при приблизительно 25°C. В некоторых вариантах осуществления реакцию конъюгации проводят приблизительно при 37°C. Реакции конъюгации можно проводить в течение любого подходящего периода времени. В целом, смеси для реакции конъюгации инкубируют в подходящих условиях от нескольких минут до нескольких часов. Реакции можно проводить, например, в течение приблизительно 1 мин или приблизительно 5 мин, или приблизительно 30 мин, или приблизительно 1 1/2 ч, или приблизительно 4 ч, или приблизительно 12 ч, или приблизительно 24 ч. В целом, смеси, используемые для реакции конъюгации, создают со значением pH, изменяющимся в диапазоне от приблизительно 6 до приблизительно 9 или от приблизительно 7 до приблизительно 8. Различные буферные агенты можно использовать для поддержания определенного значения pH. Примеры подходящих буферных агентов включают, но не ограничиваются ими, 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES), 2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил]этансульфоновую кислоту (HEPES), 3-морфолинопропан-1-сульфоновую кислоту (MOPS), 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол (TRIS), цитрат натрия, ацетат натрия и борат натрия. Сорастворители (например, диметилацетамид, пропиленгликоль, диметилсульфоксид, диметилформамид, этанол, метанол, тетрагидрофуран, ацетон и уксусная кислота), соли (например, NaCl, KCl, $CaCl_2$, и соли Mn^{2+} и Mg^{2+}), хелатирующие агенты (например, этиленгликоль-бис(2-аминоэтиловый эфир)-N,N,N',N'-тетрауксусная кислота (EGTA), 2-({2-[бис(карбоксиметил)ами-

но]этил}(карбоксиметил)амино)уксусная кислота (ЭДТА) и 1,2-бис(о-аминофенокси)этан-N,N,N,N-тетрауксусная кислота (BAPTA)) также могут быть включены в состав при необходимости. Буферы, сорастворители, соли и хелатирующие агенты могут быть использованы в любой подходящей концентрации, которая может быть легко определена специалистом в данной области. В общем, буферы, сорастворители, соли и хелатирующие агенты включают в реакционные смеси в концентрациях, изменяющихся в диапазоне от приблизительно 1 мкМ до приблизительно 1 М или даже выше (например, 0-50% об./об. в зависимости от сорастворителя). Любое подходящее количество бензодиазепинового лекарственного препарата или соединения лекарственный препарат-линкер можно использовать для конъюгации.

В некоторых аспектах, после реакции конъюгации (например, конъюгации антитела с молекулой лекарственный препарат-линкер) и перед проведением тангенциальной поточной фильтрации, избыточные примеси, относящиеся к бензодиазепиновому средству, делают нереакционноспособными с использованием гасящей добавки. Гасящая добавка представляет собой реагент, не являющийся антителом, который способен устранить реакционную способность реакционно-способной группы путем ковалентного связывания с реакционно-способной группой. Специалисту в данной области будет понятно, что гасящую добавку выбирают исходя из природы лекарственного препарата или линкера. Например, тиол-содержащую добавку, такую как B-меркаптоэтанол или N-ацетилцистеин, можно использовать для гашения избытка соединения лекарственное средство-линкер, содержащего малеимидную группу или другую тиольную реактивную группу. Амин, такой как глицин, может быть использован для гашения избытка соединения лекарственное средство-линкер, содержащего N-гидроксисукцинимидный эфир. Как правило, гасящую добавку используют в избыточном количестве относительно количества антитела и соединения лекарственное средство-линкер.

В некоторых аспектах примесь, относящаяся к бензодиазепиновому лекарственному средству, будет представлять собой гашеную молекулу бензодиазепиновое лекарственное средство-линкер. Гашеная реакционная смесь, используемая для конъюгации, относится к реакционной смеси после проведения реакции конъюгации (например, конъюгации антитела с молекулой лекарственное средство-линкер, молекулы антитело-линкер с молекулой лекарственное средство-линкер или молекулы антитело-линкер с лекарственным препаратом), введения гасящей добавки и гашения примесей, относящихся к бензодиазепиновому лекарственному препарату. Как правило, термин "гашеная реакционная смесь, используемая для конъюгации", относится к смеси до проведения любых стадий очистки.

Димеры бензодиазепина по настоящему изобретению являются гидрофобными по своей природе. Авторы изобретения неожиданно обнаружили, что высокогидрофобные примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству, может быть сложно удалить из смесей ADC, даже в тех случаях, когда примесь, относящаяся к бензодиазепиновому лекарственному средству, и ADC солюбилизируют в смеси ADC. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству, имеющие значение SlogP меньше 7,50, легче удалить из смеси ADC с использованием существующих способов, чем примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству, имеющие значение SlogP больше, чем 7,50. Таким образом, в предпочтительных вариантах осуществления примесь, относящаяся к бензодиазепиновому лекарственному средству, будет иметь значение SlogP не больше чем 7,50, более предпочтительно значение SlogP не больше чем 7,0, еще более предпочтительно значение SlogP не больше чем 6,5 или 6,0, или даже 5,8.

Авторы изобретения также обнаружили, что гасящие добавки можно использовать для снижения гидрофобности примесей, относящихся к бензодиазепиновому лекарственному средству, что способствует очистке препарата. Путем выбора гасящих добавок, которые способствуют уменьшению гидрофобности соединения, с которым они связываются, можно улучшить клиренс примеси, относящейся к бензодиазепиновому лекарственному препарату, из смеси ADC. Соответственно, особенно предпочтительными гасящими добавками являются добавки, которые, при связывании с соединением, которое нужно погасить, способствуют уменьшению гидрофобности получаемого соединения. Например, особенно предпочтительная гасящая добавка будет уменьшать гидрофобность примеси, относящейся к бензодиазепиновому лекарственному средству (например, к лекарственному средству или молекуле лекарственное средство-линкер), к которой она присоединилась. В некоторых предпочтительных аспектах гашеная примесь, относящаяся к бензодиазепиновому лекарственному средству, будет иметь значение SlogP не больше чем 7,50, более предпочтительно значение SlogP не больше чем 7,0, еще более предпочтительно значение SlogP не больше чем 6,5 или 6,0, или даже 5,8. В некоторых таких аспектах негашеная примесь, относящаяся к бензодиазепиновому лекарственному средству, имеет более высокое значение SlogP, чем гашеная примесь, относящаяся к бензодиазепиновому лекарственному средству.

SlogP является показателем гидрофобности. SlogP определяется, как значение log коэффициента распределения октанол/вода (включая неявные водороды) и может быть рассчитано с помощью программы MOE от Chemical Computing group (SlogP values calculated using Wildman, S.A., Crippen, G.M.; Prediction of Physiochemical Parameters by Atomic Contributions; / Chem. Inf. Comput. Sci. 39 No. 5 (1999) 868-873).

Гасящие добавки, которые способствуют уменьшению гидрофобности соединения, с которым они связываются, включают заряженные гасящие добавки, а также незаряженные гасящие добавки, которые,

тем не менее, являются гидрофильными. Гидрофильные гасящие добавки включают тиол-сахара, такие как тиол-глюкоза, и пегилированные гасящие добавки, такие как пегилированные тиолы.

В качестве примера синтеза соединения лекарственное средство PBD-линкер, в WO 2011/130613 описан способ синтеза соединения лекарственное средство PBD-линкер с последующим конъюгированием соединения лекарственное средство PBD-линкер и антитела. Вкратце, антитела в PBS, содержащем 50 мМ бората натрия при pH 7,4 восстанавливают трис(карбоксиэтил) фосфингидрохлоридом (TCEP) при 37°C. Межцепочечные дисульфиды антитела преобразуют путем окисления дегидроаскорбиновой кислотой, оставляя созданные цистеины в тиольной форме доступными для алкилирования линкером лекарственного средства. Антитело с восстановленными дисульфидными связями затем алкилируют примерно 1,5 эквивалента малеимида соединения лекарственное средство-линкер на тиол антитела, в присутствии достаточного количества сорастворителя для солюбилизации соединения лекарственное средство-линкер. Приблизительно через 90 мин реакцию гасят добавлением приблизительно 3 эквивалентов N-ацетилцистеина относительно соединения лекарственное средство-линкер.

Независимо от используемых способов конъюгации, примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству, будут присутствовать в смеси. Как правило, но не во всех случаях, примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству, будут присутствовать в смеси в количестве приблизительно от 10 до 100 мкМ. В некоторых аспектах примесь, относящаяся к бензодиазепиновому лекарственному средству, будет представлять собой гашеное или негашеное соединение лекарственное средство-линкер, например, соединение лекарственное средство-линкер, гашеное N-ацетилцистеином. В других аспектах примесь, относящаяся к бензодиазепиновому лекарственному средству, будет представлять собой гашеное или негашеное свободное бензодиазепиновое лекарственное средство (т.е. лекарственное средство, не прикрепленное к линкеру или антителу). В других аспектах примесь, относящаяся к бензодиазепиновому лекарственному средству, будет представлять собой продукт деградации соединения бензодиазепиновое лекарственное средство-линкер, такой как, например, окисленное или гидролизованное производное соединения лекарственное средство-линкер.

Тангенциальная поточная фильтрация (TFF)

Обычно после реакции конъюгации и необязательного гашения смесь, содержащую ADC бензодиазепина и примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству, подвергают тангенциальной поточной фильтрации (TFF). Авторы изобретения обнаружили, что для эффективного удаления примесей, относящихся к лекарственному средству, из смеси, предпочтительно использовать циклодекстрин и поддерживать минимальный уровень циклодекстрина во время фильтрации. С целью оптимизации устранения примеси, относящейся к бензодиазепину, циклодекстрин поддерживают на уровне, который по существу обеспечивает растворимость компонентов (например, ADC) смеси ADC. Циклодекстрин предпочтительно добавляют в смесь до начала процесса фильтрации (например, после конъюгации и необязательного гашения, но перед началом тангенциальной поточной фильтрации) или в начале (или инициировании) процесса фильтрации. В некоторых аспектах циклодекстрин будут добавлять к смеси ADC после начала процесса фильтрации, но до удаления значительной части примесей. Солюбилизирующий компонент (например, циклодекстрин) предпочтительно добавляют в смесь перед проведением тангенциальной поточной фильтрации. Концентрацию циклодекстрина предпочтительно поддерживают на протяжении фильтрации на минимальном уровне.

Авторы изобретения обнаружили, что циклодекстрин является особенно предпочтительным солюбилизирующим компонентом для использования, поскольку его добавление не только улучшает удаление примесей, относящихся к бензодиазепиновому лекарственному средству, но его включение в лекарственную форму повышает стабильность лекарственной формы. Циклодекстрин можно добавлять в смесь, содержащую ADC бензодиазепина и примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству, после реакции конъюгации и необязательного гашения. В некоторых аспектах по меньшей мере приблизительно 1% мас./об. циклодекстрина (т.е. 10 г на литр) добавляют в реакционную смесь, используемую для конъюгации. В некоторых аспектах по меньшей мере приблизительно 2% мас./об. циклодекстрина (т.е. 20 г на литр) добавляют в реакционную смесь, используемую для конъюгации. В некоторых аспектах по меньшей мере приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина (т.е. 30 г на литр) добавляют в реакционную смесь, используемую для конъюгации. В некоторых аспектах от приблизительно 1% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 10% мас./об. циклодекстрина, от приблизительно 2% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 10% мас./об. циклодекстрина или от приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 10% мас./об. циклодекстрина, или от приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 6% мас./об. циклодекстрина, или от приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 4% мас./об. циклодекстрина добавляют в смесь циклодекстрина.

Тангенциальная поточная фильтрация относится к процессу фильтрации, в котором образец, который нужно очистить, циркулирует в замкнутой системе тангенциально вдоль поверхности полупроницаемой мембраны. Макромолекулы, которые являются слишком большими, чтобы пройти через поры мембраны, сохраняются на стороне впуска (сторона мембраны, где находится ретентат) мембраны, и молекулы, которые являются достаточно маленькими, чтобы пройти через поры, проходят на сторону мем-

браны, где находится фильтрат. В целом, определение, какие молекулы переносятся в фильтрат и какие молекулы остаются в ретентате, зависит в первую очередь от молекулярной массы, растворимости и размера пор фильтра. Другие факторы, такие как скорость подачи потока, трансмембранное давление, тип или состав мембраны, концентрации компонентов в движущейся смеси, температура и вязкость движущейся смеси, могут влиять на скорость и степень очистки. Общие способы использования устройств для тангенциальной поточной фильтрации и осуществления тангенциальной поточной фильтрации для устранения примесей, относящихся к лекарственному средству, из реакционных смесей, используемых для конъюгации, известны в данной области и могут быть оптимизированы с использованием сведений, содержащихся в настоящем изобретении, в сочетании со знаниями, известными в данной области техники, для удаления примесей, относящихся к бензодиазепиновому лекарственному средству.

В некоторых аспектах способом проведения тангенциальной поточной фильтрации будет являться диафильтрация. Во время диафильтрации буфер вводят в то время, как фильтрат удаляют. Диафильтрация может представлять собой, например, диафильтрацию с постоянным объемом или периодическую диафильтрацию. В предпочтительных вариантах осуществления поддерживают постоянный уровень циклодекстрина на протяжении диафильтрации. В предпочтительных вариантах осуществления циклодекстрин добавляют в смесь, содержащую ADC бензодиазепина и примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству, до начала или в начале процесса фильтрации. В некоторых аспектах поддерживают концентрацию циклодекстрина по меньшей мере приблизительно 1% мас./об. на протяжении фильтрации. В некоторых таких аспектах смесь ADC дополняют циклодекстрином до начала или в начале процесса фильтрации, так что смесь имеет концентрацию по меньшей мере приблизительно 1% мас./об. циклодекстрина и буфер для диафильтрации содержит по меньшей мере приблизительно 1% мас./об. циклодекстрина. В некоторых аспектах концентрацию по меньшей мере приблизительно 2% мас./об. циклодекстрина поддерживают в течение всей фильтрации. В некоторых таких аспектах смесь ADC дополняют циклодекстрином до начала или в начале процесса фильтрации, так что смесь имеет концентрацию по меньшей мере приблизительно 2% мас./об. циклодекстрина и буфер для диафильтрации содержит по меньшей мере приблизительно 2% мас./об. циклодекстрина. В некоторых аспектах концентрацию по меньшей мере приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина поддерживают в течение всей фильтрации. В некоторых таких аспектах смесь ADC дополняют циклодекстрином до начала или в начале процесса фильтрации, так что смесь имеет концентрацию по меньшей мере приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина и буфер для диафильтрации содержит по меньшей мере приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина. В некоторых аспектах концентрацию по меньшей мере приблизительно 1%, по меньшей мере приблизительно 2%, по меньшей мере приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина поддерживают в течение всей фильтрации. В некоторых таких аспектах смесь ADC дополняют циклодекстрином до начала или в начале процесса фильтрации, так что смесь имеет концентрацию по меньшей мере приблизительно 1, 2 или 3% мас./об. циклодекстрина и буфер для диафильтрации содержит по меньшей мере приблизительно 1, 2 или 3% мас./об. циклодекстрина. В других аспектах уровень от приблизительно 1% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 10% мас./об. циклодекстрина, от приблизительно 2% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 10% мас./об. циклодекстрина или от приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 10% мас./об. циклодекстрина, или от приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 6% мас./об. циклодекстрина, или от приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 4% мас./об. циклодекстрина поддерживается во время фильтрации. Предпочтительно циклодекстрин добавляют в смесь ADC до начала или в начале процесса фильтрации, хотя также предполагается, что циклодекстрин сначала вводят в смесь ADC после начала процесса фильтрации, но предпочтительно до удаления значительной части примесей. Добавление циклодекстрина можно осуществить, например, с помощью буфера для диафильтрации. Фраза "поддерживают на протяжении фильтрации" означает, что указанная концентрация циклодекстрина представлена в течение процесса фильтрации. В некоторых аспектах, таких как аспекты, в которых циклодекстрин добавляют после начала процесса фильтрации (предпочтительно до удаления значительной части примесей), циклодекстрин не будет представлен в начале процесса фильтрации, но будет поддерживаться в указанной концентрации после введения циклодекстрина.

Как отмечалось выше, буфер для диафильтрации может содержать по меньшей мере приблизительно 1%, по меньшей мере приблизительно 2%, по меньшей мере приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина или по меньшей мере приблизительно 4% мас./об. циклодекстрина. В некоторых аспектах буфер для диафильтрации будет содержать от приблизительно 1% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 10% мас./об. циклодекстрина, от приблизительно 2% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 10% мас./об. циклодекстрина или от приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 10% мас./об. циклодекстрина, или от приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 6% мас./об. циклодекстрина, или от приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 4% мас./об. циклодекстрина. Как правило, буфер для диафильтрации будет дополнительно содержать буферный агент. Подходящие буферы включают, но без ограничения, ацетатные буферы, фосфатные буферы, сукцинатные буферы, гистидиновые буферы, HEPES и MOPS. В одном аспекте буферный агент будет представлять собой трис-(2-амино-2-(гидроксиметил)-1,3-пропандиол). Типичные концентрации бу-

феров в случае буфера, используемого для диафильтрации, включают концентрации от приблизительно 5 до приблизительно 100 мМ, приблизительно 50 мМ, приблизительно 10 мМ до приблизительно 40 мМ или приблизительно 20 мМ. В некоторых вариантах осуществления используют трис-буфер в количестве от приблизительно 5 мМ до приблизительно 50 мМ, от приблизительно 10 мМ до приблизительно 40 мМ или приблизительно 20 мМ. Подходящее значение pH для буфера для диафильтрациии обычно находится в диапазоне от приблизительно 6,0 до приблизительно 8,0, но может быть выше или ниже. В некоторых аспектах значение pH находится в диапазоне от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,5 или от приблизительно 7 до 7,4. В некоторых аспектах значение pH составляет приблизительно 7,3 или приблизительно 7,2.

В некоторых аспектах, при использовании бета-циклодекстрина, поддерживают концентрацию по меньшей мере приблизительно 2%, по меньшей мере приблизительно 3% или по меньшей мере приблизительно 4% циклодекстрина во время фильтрации. В некоторых аспектах, при использовании гамма-циклодекстрина, поддерживают концентрацию по меньшей мере приблизительно 1% во время фильтрации.

Настоящее изобретение относится к способам удаления примесей, относящихся к бензодиазепиновому лекарственному средству, из смеси ADC тангенциальной проточной фильтрации. В некоторых аспектах устройство для тангенциальной проточной фильтрации содержит емкость для фильтрации, имеющую входной патрубок, выпускной патрубок для фильтрата (также называемый выпускным патрубком для пермеата), выпускной патрубок для ретентата, полупроницаемую ультрафильтрационную мембрану и насос. Фильтрационная мембрана разделяет емкость для фильтрации на входной отсек и выходной отсек, так что весь фильтрат должен поступать во входной патрубок и проходить через ультрафильтрационную мембрану перед вытеканием из емкости для фильтрации через выпускной патрубок для фильтрата. Фильтрационная мембрана, которую используют, может быть выполнена из любого материала или комбинации материалов, подходящих для использования со смесями ADC. Типичные мембраны включают ультрафильтрационные мембраны, выполненные из регенерированной целлюлозы или полиэфирсульфона (например, Millipore ULTRACEL® или BIOMAX® Membranes). Размер пор мембраны относится к среднему значению размера пор в фильтре. Для использования в настоящем изобретении, мембрана обычно имеет размер пор меньше 100 кДа, наиболее часто меньше приблизительно 50 кДа или приблизительно 30 кДа. Таким образом, в некоторых аспектах фильтрационная мембрана будет представлять собой ультрафильтрационную мембрану из регенерированной целлюлозы или полиэфирсульфона, имеющую размер пор меньше 100 кДа, наиболее часто меньше приблизительно 50 кДа или приблизительно 30 кДа.

В некоторых аспектах система для тангенциальной поточной фильтрации будет дополнительно содержать емкость для образца, предназначенную для хранения реакционной смеси, используемой для конъюгации, и емкость для буфера, гидравлически соединенную с емкостью для образца. В некоторых аспектах буфер предназначен для замещения объема фильтрата с такой же скоростью, как и скорость потока фильтрата, так что объем в системе остается постоянным. Смесь, которую очищают, будет поступать под давлением из емкости для образца, протекать вдоль фильтрационной мембраны, и возвращаться в емкость для образца. В некоторых аспектах линия будет содержать клапан, который можно использовать для уменьшения поступления смеси в емкость для образца. Частичное закрывание клапана увеличивает фракцию потока, проходящую через мембрану на слив (фильтрат), тогда как основная масса потока возвращается в емкость для образца (ретентат). Фильтрат, поступающий в слив, содержит буфер и те молекулы растворенного вещества, которые достаточно малы, чтобы пройти через поры мембраны. Буфер для диафильтрации добавляют в систему для замещения потери буфера в виде фильтрата, поэтому общий объем в системе остается постоянным. Поскольку буфер для диафильтрации не содержит растворенное вещество, которое удаляют, концентрация растворенного вещества постепенно уменьшается.

Согласно описанию, в некоторых аспектах по настоящему изобретению диафильтрация с постоянным объемом является режимом тангенциальной поточной фильтрации, который используется для очистки смеси ADC и устранения примесей, относящихся к бензодиазепиновому лекарственному средству. В диафильтрации с постоянным объемом, объем диафильтрации относится к общему объему раствора в любой момент времени, в частности, к начальному общему объему смеси. В некоторых аспектах образцы будут извлекать после одного или нескольких объемов диафильтрации с целью измерения концентрации примесей, относящихся к бензодиазепиновому лекарственному средству. Диафильтрацию обычно проводят при использовании некоторого количества объемов диафильтрации, которое определяют в предварительном эксперименте по проведению очистки до желаемого заданного уровня. Обычно диафильтрацию завершают после того, как концентрация примесей, относящихся к бензодиазепиновому лекарственному средству, достигает заданного уровня. В некоторых аспектах заданный уровень очистки составляет приблизительно 1 мкМ или меньше, предпочтительно приблизительно 0,5 мкМ или меньше, 0,2 мкМ или даже 0,1 мкМ или меньше.

В некоторых аспектах ретентат будет содержать от приблизительно 3 до приблизительно 10 мг/мл ADC бензодиазепина, от приблизительно 10 до приблизительно 30 мМ триса, от приблизительно 3% до приблизительно 10% мас./об. циклодекстрина при значении pH от приблизительно 6,5 до приблизитель-

но 7,5. В некоторых аспектах ретентат будет содержать приблизительно 3 мг/мл ADC бензодиазепина, приблизительно 20 мМ триса, приблизительно 3% циклодекстрина или приблизительно 4% циклодекстрина, при значении pH приблизительно 7,3.

Циклодекстрин

Циклодекстрины представляют собой нередуцирующие состоящие из остатков глюкозы, циклические олигосахариды, получаемые из крахмала. Существует три основных типа циклодекстринов, состоящих из 6, 7 или 8 глюкозных остатков (α-, β- и γ-циклодекстрины соответственно) связанных α-1,4 гликозидными связями. Циклодекстрины могут выполнять функцию молекулярных контейнеров путем захвата гостевой молекулы в свою внутреннюю полость с образованием соединений включения, α-Циклодекстрины имеют небольшую полость, тогда как β- и γ-циклодекстрины имеют полости большего размера.

Подходящие циклодекстрины для использования в настоящем изобретении включают альфа-, бета- и гамма-циклодекстрины, хотя бета- и гамма-циклодекстрины являются предпочтительными, учитывая, что их внутренние полости больше по размеру. Осуществляли химические модификации циклодекстринов, в частности β-циклодекстринов, для повышения растворимости исходного циклодекстрина. Гидроксиэтил-β-циклодекстрин, гидроксипропил-β-циклодекстрин (например 2-гидроксипропил-β-циклодекстрин), метилированный β-циклодекстрин, гликозил-β-циклодекстрин и сульфобутиловый эфир β-циклодекстрина являются примерами циклодекстринов, которые были химически модифицированы для повышения растворимости. В некоторых аспектах по настоящему изобретению используют β-циклодекстрин, в том числе химически модифицированные β-циклодекстрины. В некоторых аспектах химически модифицированный β-циклодекстрин представляет собой гидроксипропил-β-циклодекстрин или сульфобутиловый эфир β-циклодекстрина. В некоторых аспектах циклодекстрин представляет собой гамма-циклодекстрин, в том числе химически модифицированные гамма-циклодекстрины. В некоторых аспектах циклодекстрин будет представлять собой гидроксипропил-циклодекстрин (например, HP4.3-β-циклодекстрин, HP5.5-β-циклодекстрин, HP7.6-β-циклодекстрин и HP4.5-γ-циклодекстрин). В других аспектах циклодекстрин будет представлять собой сульфобутиловый эфир β-циклодекстринов (например, SBE6.6-β-циклодекстрин, SBE6.7-β-циклодекстрин, SBE6.8-β-циклодекстрин, SBE4.1-β-циклодекстрин и SBE4.6Et3.5-β-циклодекстрин). В других аспектах циклодекстрин будет представлять собой сульфобутиловый эфир γ-циклодекстринов (например, SBE4.3-γ-циклодекстрин, SBE4.6-γ-циклодекстрин, SBE5.2-γ-циклодекстрин и SBE5.6Et6.3-γ-циклодекстрин). В данном контексте "химически модифицированный бета-циклодекстрин" представляет собой бета-циклодекстрин, который был химически модифицирован таким образом, что он имеет, по меньшей мере, повышенную растворимость по сравнению с исходным циклодекстрином (т.е. немодифицированным циклодекстрином).

Составы

Настоящее изобретение относится к смесям, содержащим ADC бензодиазепина и примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству (в том числе к реакционным смесям, используемым для конъюгации, и к гашеным реакционным смесям, используемым для конъюгации), к составам ретентата TFF и к фармацевтическим композициям, содержащим ADC бензодиазепина и циклодекстрин. "Состав ретентата TFF" относится к смеси, которую очистили с помощью TFF, но не включили в конечную лекарственную форму.

Циклодекстрины обычно добавляют в смеси ADC в концентрациях по меньшей мере приблизительно 1% мас./об., по меньшей мере приблизительно 2% мас./об. циклодекстрина, по меньшей мере приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина или по меньшей мере приблизительно 4% мас./об. циклодекстрина (например, 1, 2, 3 или 4% мас./об.) В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к реакционной смеси, используемой для конъюгации, содержащей по меньшей мере приблизительно 1%, по меньшей мере приблизительно 2% мас./об. циклодекстрина, по меньшей мере приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина, по меньшей мере приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина, к гашеной реакционной смеси, используемой для конъюгации, содержащей по меньшей мере приблизительно 1%, по меньшей мере приблизительно 2% мас./об. циклодекстрина или по меньшей мере приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина, и/или к составу ретентата TFF, содержащему по меньшей мере приблизительно 1%, по меньшей мере приблизительно 2% мас./об. циклодекстрина или по меньшей мере приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина. В некоторых аспектах циклодекстрины представлены в смесях ADC (в том числе в реакционных смесях, используемых для конъюгации, и в гашеных реакционных смесях, используемых для конъюгации) и в составах ретентата TFF в концентрации от приблизительно 2% или приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 30% мас./об. циклодекстрина, от приблизительно 2% или приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 15% мас./об. циклодекстрина, от приблизительно 2% или приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 10% мас./об. циклодекстрина. В некоторых аспектах, где циклодекстрин представляет собой бета-циклодекстрин, присутствует по меньшей мере приблизительно 2% или приблизительно 3% циклодекстрина в смеси ADC или в составе ретентата TFF. В некоторых аспектах, где циклодекстрин представляет собой гамма-циклодекстрин, присутствует по меньшей мере приблизительно 1% или приблизительно 2%

циклодекстрина или приблизительно 3% циклодекстрина в смеси ADC или в составе ретентата TFF.

Циклодекстрины обычно представлены в фармацевтических композициях в концентрациях приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина или больше. В некоторых аспектах циклодекстрины представлены в фармацевтических композициях в концентрации приблизительно 5% мас./об. или больше, или приблизительно 6% мас./об. или больше. В некоторых аспектах циклодекстрины представлены в фармацевтических композициях в концентрации от 3% мас./об. циклодекстрина, приблизительно 5% мас./об. циклодекстрина или приблизительно 6% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 30% мас./об. циклодекстрина, или от приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина, приблизительно 5% мас./об. циклодекстрина или приблизительно 6% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 15% мас./об. циклодекстрина, или от приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина, приблизительно 5% мас./об. циклодекстрина или приблизительно 6% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 10% мас./об. циклодекстрина, или от приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина, приблизительно 5% мас./об. циклодекстрина или приблизительно 6% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 8% мас./об. циклодекстрина. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представлен в концентрации приблизительно 3% мас./об. В других вариантах осуществления циклодекстрин представлен в концентрации приблизительно 4% мас./об. В других вариантах осуществления циклодекстрин представлен в концентрации приблизительно 5% мас./об., приблизительно 6% мас./об., приблизительно 7% мас./об. или приблизительно 8% мас./об. В некоторых аспектах фармацевтические составы, описанные в настоящем документе, содержат 1 мкМ или меньше, 0,5 мкМ или меньше, 0,1 мкМ или меньше или 0,05 мкМ или меньше примесей, относящихся к бензодиазепиновому лекарственному препарату.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям ADC бензодиазепина и составам ретентата TFF, содержащим 1 мкМ или меньше, 0,5 мкМ или меньше, 0,1 мкМ или меньше или 0,05 мкМ или меньше примесей, обусловленных бензодиазепиновым лекарственным препаратом. Циклодекстрины могут быть представлены в таких композициях ADC бензодиазепина, в концентрации от приблизительно 1%, приблизительно 2% или приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 30% мас./об. циклодекстрина, от приблизительно 1%, приблизительно 2% или приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 15% мас./об. циклодекстрина, от приблизительно 1%, приблизительно 2% или приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 10% мас./об. циклодекстрина. В некоторых аспектах циклодекстрины представлены в фармацевтических композициях ADC бензодиазепина и в составах ретентата TFF, содержащих 1 мкМ или меньше, 0,5 мкМ или меньше, 0,1 мкМ или меньше или 0,05 мкМ или меньше примесей, относящихся к бензодиазепиновому лекарственному средству, в концентрации приблизительно 5% или больше, или приблизительно 6% или больше. В некоторых аспектах циклодекстрины представлены в таких составах в концентрации от приблизительно 1%, приблизительно 2%, приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина, приблизительно 5% мас./об. циклодекстрина или приблизительно 6% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 30% мас./об. циклодекстрина, или от приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина, приблизительно 5% мас./об. циклодекстрина или приблизительно 6% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 15% мас./об. циклодекстрина, или от приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина, приблизительно 5% мас./об. циклодекстрина или приблизительно 6% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 10% мас./об. циклодекстрина, или от приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина, приблизительно 5% мас./об. циклодекстрина или приблизительно 6% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 8% мас./об. циклодекстрина. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представлен в концентрации приблизительно 1% мас./об. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представлен в концентрации приблизительно 2% мас./об. В некоторых вариантах осуществления циклодекстрин представлен в концентрации приблизительно 3% мас./об. В других вариантах осуществления циклодекстрин представлен в концентрации приблизительно 4% мас./об. В других вариантах осуществления циклодекстрин представлен в концентрации приблизительно 5% мас./об., приблизительно 6% мас./об., приблизительно 7% мас./об. или приблизительно 8% мас./об.

Фармацевтические композиции

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим ADC бензодиазепина и циклодекстрин. Авторы изобретения установили, что циклодекстринсодержащие композиции, содержащие приблизительно 2% мас./об. циклодекстрина или больше, демонстрируют снижение скорости и степени агрегации, по сравнению с композициями, содержащими 0,5% мас./об. циклодекстрина или меньше в составе, и демонстрируют снижение роста кислых соединений, по сравнению с композициями, не содержащими циклодекстрин. Авторы изобретения также установили, что композиции, содержащие приблизительно 6% или больше мас./об. циклодекстрина, демонстрируют снижение химической деградации молекулы бензодиазепиновое лекарственное средство-линкер по сравнению с композициями, содержащими 2% или меньше мас./об. циклодекстрина в составе. Таким образом, настоящее изобретение основано в частности на открытии, что ADC бензодиазепина, содержащие приблизительно 6% мас./об. циклодекстрина, проявляют повышенную стабильность, по сравнению с составами, содержащими циклодекстрин в меньших количествах или вообще не содержащими циклодекстрин. Доказательством повышенной стабильности может служить одно или несколько из перечисленного ниже: (i) снижение ско-

рости и степени агрегации, (ii) уменьшение роста кислых соединений и (iii) уменьшение химической деградации лекарственного средства. В определенных аспектах настоящее изобретение относится к стабилизированным жидким или лиофилизированным композициям ADC бензодиазепина, предназначенным для терапевтического использования. В частности, предоставляются композиции, которые являются стабилизированными, благодаря чему терапевтический ADC бензодиазепина является стабильным в течение длительного периода времени и может быть введен с помощью различных способов введения. Такие композиции особенно эффективны, например, в виде ADC бензодиазепина, предназначенного для использования в лечении заболевания или нарушения (например, лечение рака) путем оказания цитотоксического или цитостатического эффекта на клетки-мишени, экспрессирующие антиген, распознаваемый антительным компонентом ADC.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к составу ADC бензодиазепина, содержащему ADC бензодиазепина, циклодекстрин, и необязательно по меньшей мере один буферный агент, где буферный агент представлен в количестве, достаточном для поддержания физиологически подходящего значения pH. Циклодекстрин может представлять собой любой из циклодекстринов, описанных в настоящем документе, но предпочтительно представляет собой бета- или гамма-циклодекстрин и более предпочтительно бета-циклодекстрин, который химически модифицирован для улучшения его растворимости, по сравнению с исходной молекулой. В некоторых аспектах циклодекстрин представляет собой гамма-циклодекстрин. В некоторых аспектах гамма-циклодекстрин химически модифицирован для улучшения его растворимости по сравнению с исходной молекулой. Особенно предпочтительными циклодекстринами являются гидроксипропил-бета-циклодекстрин или сульфобутиловый эфир бета-циклодекстрина. Циклодекстрин может быть представлен в составе в любой из концентраций, описанных в настоящем документе. В некоторых аспектах циклодекстрин будет представлять собой гамма-циклодекстрин (немодифицированная или химически модифицированная молекула) или химически модифицированный бета-циклодекстрин (например, метилированный бета-циклодекстрин, глюкозил-бета-циклодекстрин, гидроксипропил-бета-циклодекстрин или сульфобутил-бета-циклодекстрин) представлен в составе в концентрациях приблизительно 3% мас./об., приблизительно 4% мас./об., приблизительно 5% мас./об. или приблизительно 6% мас./об. или больше. В некоторых аспектах циклодекстрин будет представлять собой гамма-циклодекстрин (немодифицированная или химически модифицированная молекула) или химически модифицированный бета-циклодекстрин (например, метилированный бета-циклодекстрин, глюкозил-бета-циклодекстрин, гидроксипропил-бета-циклодекстрин или сульфобутил-бета-циклодекстрин), представленный в составе в концентрациях от приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина, приблизительно 5% мас./об. циклодекстрина или приблизительно 6% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 30% мас./об. циклодекстрина, или от приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина, приблизительно 5% мас./об. циклодекстрина или приблизительно 6% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 15% мас./об. циклодекстрина, или от приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина, приблизительно 5% мас./об. циклодекстрина или от приблизительно 6% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 10% мас./об. циклодекстрина, или от приблизительно 3% мас./об. циклодекстрина, приблизительно 5% мас./об. циклодекстрина или приблизительно 6% мас./об. циклодекстрина до приблизительно 8% мас./об. циклодекстрина.

Как отмечалось выше, водная композиция ADC бензодиазепина по настоящему изобретению необязательно содержит буферный агент для поддержания физиологически подходящего значения pH в водном растворе. Подходящее значение pH для стабилизированной водной композиции, которая описана в настоящем документе, включает, например, значение pH в диапазоне от приблизительно 6,0 до приблизительно 8,0 или от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,5. В определенных вариантах осуществления может быть желательно включение в композицию ADC со значением pH от приблизительно 6,8 до приблизительно 7,5; наиболее часто от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,5, от приблизительно 7,1 до приблизительно 7,5, от приблизительно 7,2 до приблизительно 7,5 или от приблизительно 7,3 до приблизительно 7,5. В конкретном варианте осуществления значение pH составляет приблизительно 7,3. В конкретном варианте осуществления значение pH составляет приблизительно 7,2. Подходящие буферы включают трис-(2-амино-2-(гидроксиметил)-1,3-пропандиол) и цитрат, а также другие физиологически приемлемые буферы, которые являются эффективными в указанном диапазоне значений pH и обеспечивают достижение приблизительно физиологического значения pH раствора во время приготовления лекарственной формы, в том числе после растворения лиофилизованной композиции с образованием водного раствора, как описано в настоящем документе. Примеры таких буферов включают фосфатный, ацетатный, сукцинатный и гистидиновый буферы. Типичные концентрации буферов для композиций согласно настоящему изобретению составляют от приблизительно 5 мМ до приблизительно 100 мМ, приблизительно 50 мМ, приблизительно 10 мМ до приблизительно 40 мМ, или приблизительно 20 мМ. В некоторых вариантах осуществления трис включают в количестве от приблизительно 5 мМ до приблизительно 50 мМ, от приблизительно 10 мМ до приблизительно 40 мМ, или приблизительно 20 мМ. Другие подходящие концентрации буферов для композиций согласно настоящему изобретению могут быть легко определены специалистом в данной области.

В конкретных вариантах осуществления композиции, такие как композиции, подходящие для лио-

филизации, восстановленные из лиофилизированной формы, или лиофилизированные композиции, предназначенные для восстановления в водную композицию, как описано в настоящем документе, могут содержать одно или несколько стабилизирующих веществ для защиты конъюгата антитело-лекарственное средство. Стабилизирующее вещество также упоминается в описании как лиопротектор. Как правило, подходящее стабилизирующее вещество представляет собой сахар или аминокислоту. Типичные стабилизирующие вещества включают сахарозу, трегалозу, маннит, сорбит, декстрозу, мальтозу, декстран, аргинин, глицин и гистидин. Обычно количество стабилизирующего вещества (например, лиопротектора) в композиции является таким, что после разведения полученная композиция является по существу изотонической. Кроме того, количество лиопротектора не должно быть слишком низким, вследствие чего неприемлемое количество продуктов деградации/агрегации ADC возникает после лиофилизации. Если лиопротектор представляет собой сахар (например, сахарозу или трегалозу), типичные концентрации лиопротектора в водной композиции могут изменяться от приблизительно 1% до приблизительно 10% (мас./об.), наиболее часто от приблизительно 2 до приблизительно 8% (мас./об.) и еще более часто от приблизительно 4 до приблизительно 8% (мас./об.). В конкретном варианте осуществления лиопротектор представляет собой сахарозу в концентрации приблизительно 6% (мас./об.).

В некоторых аспектах аргинин присутствует в композиции в количестве 0,5 М или меньше. В некоторых аспектах аргинин присутствует в композиции в количестве 0,2 М или 0,1 М или меньше. В некоторых аспектах аргинин отсутствует в композиции. В некоторых аспектах аминокислоты отсутствуют в композиции.

Дополнительные вспомогательные вещества, предназначенные для использования в композициях, включают, например, соли (например хлорид натрия), сурфактанты, (например полисорбат 80, полисорбат 20, полоксамеры), антиоксиданты (например аскорбиновая кислота, метионин, яблочная кислота) и другие вспомогательные вещества, такие как полиэтиленгликоли, пропиленгликоли, карбоксиметилцеллюлоза и винилпирролидон.

Концентрация ADC в фармацевтической композиции по настоящему изобретению, как правило, изменяется от приблизительно 0,1 или 0,5 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл или от приблизительно 1 до приблизительно 30 мг/мл. Наиболее часто, ADC представлен в концентрации от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 5 мг/мл, до приблизительно 10 мг/мл или до приблизительно 15 мг/мл; или в концентрации от приблизительно приблизительно 2 мг/мл до приблизительно 5 мг/мл или до приблизительно 10 мг/мл. В некоторых аспектах ADC представлен в концентрации от приблизительно 0,6 до приблизительно 3 мг/мл. В конкретных вариантах осуществления ADC представлен в концентрации приблизительно 1 мг/мл, приблизительно 2 мг/мл, приблизительно 3 мг/мл, приблизительно 4 мг/мл, приблизительно 5 мг/мл, приблизительно 6 мг/мл, приблизительно 7 мг/мл, приблизительно 8 мг/мл, приблизительно 9 или приблизительно 10 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления антительный компонент ADC в смесях ADC, реакционных смесях, используемых для конъюгации, гашеных реакционных смесях, используемых для конъюгации, составах ретентата TFF и в фармацевтических композициях, содержащих ADC бензодиазепина и циклодекстрин, описанных в настоящем документе, представляет собой моноклональное антитело, выбранное из указанного ниже: тетрамер, состоящий из двух идентичных пар цепей иммуноглобулина, каждая пара имеет одну легкую цепь и одну тяжелую цепь; Fv-фрагмент антитела; Fab-фрагмент антитела; Fab'(2)-фрагмент антитела, Fd-фрагмент антитела, одноцепочечное антитело (например, слияние scFv или scFv-Fc); или фрагмент однодоменного антитела (Dab). В конкретном варианте осуществления антитело содержит первую и вторую полипептидные цепи, где первая полипептидная цепь содержит вариабельный (VL) домен легкой цепи, слитый на карбоксильном конце с константной областью легкой цепи, и где вторая полипептидная цепь содержит вариабельный (VH) домен тяжелой цепи, слитый на карбоксильном конце с константной областью тяжелой цепи. В таких вариантах осуществления моноклональное антитело, как правило, представляет собой тетрамер, состоящий из двух идентичных пар цепей иммуноглобулина, каждая пара имеет одну легкую цепь и одну тяжелую цепь. Константная область тяжелой цепи может представлять собой природную константную область или мутантную форму природной константной области иммуноглобулина человека, имеющую пониженное связывание с Fcγ-рецептором по сравнению с природной константной областью иммуноглобулина человека. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой изотип, выбранный из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В конкретном варианте константная область тяжелой цепи является константной областью изотипа IgG1.

Различные способы получения антител, в том числе моноклональных антител, хорошо известны в данной области, и они не описываются в настоящем документе подробно. Антитела, предназначенные для использования в настоящем изобретении, могут представлять собой интактные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Предпочтительными антителами являются человеческие или гуманизированные антитела, в частности, человеческие или гуманизированные моноклональные антитела. В некоторых аспектах антитело будет специфически связываться с антигеном раковой клетки, который экспрессируется на поверхности раковой клетки. В других аспектах антитело будет связываться с активированными лимфоцитами, появление которых обусловлено аутоиммунным заболеванием. В некоторых аспектах антитело будет специфически связываться с CD19, CD20, CD30, CD33, CD70, Glypican-3, Liv-1

или с антигеном Lewis Y.

В конкретных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело анти-CD33, которое специфически связывается с внеклеточным доменом человеческого CD33. Примерной последовательности CD33 человека присвоен учетный номер P20138 в базе данных Swiss Prot. В определенных вариантах осуществления антитело анти-CD33 содержит участки, определяющие комплементарность, вариабельных доменов легкой и/или тяжелой цепи мышиного моноклонального антитела анти-CD33, называемого 2H12 (аминокислотные последовательности доменов VL и VH показаны в SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно). Соответственно, в некоторых вариантах антитело анти-CD33 содержит вариабельный домен (VL) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность CDR-L1, которая показана в SEQ ID NO: 5, аминокислотную последовательность CDR-L2, которая показана в SEQ ID NO: 6, и аминокислотную последовательность CDR-L3, которая показана в SEQ ID NO: 7; и/или вариабельный домен (VH) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность CDR-H1, которая показана в SEQ ID NO: 8, аминокислотную последовательность CDR-H2, которая показана в SEQ ID NO: 9, и аминокислотную последовательность CDR-H3, которая показана в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело анти-CD33 представляет собой гуманизированное антитело. Например, в конкретных вариантах антитела анти-CD33, содержащего VL- и/или VH-домены, как указано выше, VL-домен представляет собой гуманизированный VL-домен, полученный из VL-домена мышиного антитела 2H12, имеющий аминокислотную последовательность, которая показана в SEQ ID NO: 1, и/или VH-домен представляет собой гуманизированный VH-домен, полученный из VH-домена мышиного антитела 2H12, имеющий аминокислотную последовательность, которая показана в SEQ ID NO: 2. Особенно подходящие VL- и VH-домены имеют аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичны последовательностям SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4 соответственно. В определенных вариантах осуществления антитело анти-CD33 включает в себя первую и вторую полипептидные цепи, где первая полипептидная цепь содержит VL-домен, слитый по карбоксильному концу с константной областью легкой цепи (например, с константной областью легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21), и вторая полипептидная цепь содержит VH-домен, слитый по карбоксильному концу с константной областью тяжелой цепи (например, с константной областью тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 23). В таких вариантах антитело анти-CD33 обычно представляет собой тетрамер, состоящий из двух идентичных пар цепей иммуноглобулина, каждая пара имеет одну легкую цепь и одну тяжелую цепь. Показательные антитела анти-CD33, подходящие для использования согласно настоящему изобретению, также описаны в предварительной заявке США № 61/649110, поданной 18 мая 2012 г., раскрытие которой включено в описание в качестве ссылки во всей своей полноте для всех целей.

В других вариантах осуществления антитело представляет собой антитело анти-CD70, которое специфически связывается с внеклеточным доменом человеческого CD70. Примерной последовательности CD70 человека присвоен учетный номер P32970.2 в базе данных Swiss Prot. В определенных вариантах осуществления антитело анти-CD70 содержит участки, определяющие комплементарность, вариабельных доменов легкой и/или тяжелой цепи мышиного моноклонального антитела анти-CD70, называемого 1F6 (аминокислотные последовательности доменов VL и VH показаны в SEQ ID NO: 11 и 12, соответственно). В некоторых таких вариантах антитело анти-CD70 содержит вариабельный домен (VL) легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность CDR-L1, которая показана в SEQ ID NO: 15, аминокислотную последовательность CDR-L2, которая показана в SEQ ID NO: 16, и аминокислотную последовательность CDR-L3, которая показана в SEQ ID NO: 17; и вариабельный домен (VH) тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность CDR-H1, которая показана в SEQ ID NO: 18, аминокислотную последовательность CDR-H2, которая показана в SEQ ID NO: 19, и аминокислотную последовательность CDR-H3, которая показана в SEQ ID NO: 20. В некоторых вариантах осуществления антитело анти-CD70 представляет собой гуманизированное антитело. Например, в конкретных вариантах антитела анти-CD70, содержащего VL- и VH-домены, как указано выше, VL-домен представляет собой гуманизированный VL-домен, полученный из VL-домена мышиного антитела 1F6, имеющий аминокислотную последовательность, которая показана в SEQ ID NO: 11, и/или VH-домен представляет собой гуманизированный VH-домен, полученный из VH-домена мышиного антитела 1F6, имеющий аминокислотную последовательность, которая показана в SEQ ID NO: 12. Особенно подходящие VL- и VH-домены имеют аминокислотные последовательности, которые по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% идентичны последовательностям SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14 соответственно. В определенных вариантах осуществления антитело анти-CD70 включает в себя первую и вторую полипептидные цепи, где первая полипептидная цепь содержит VL-домен, слитый по карбоксильному концу с константной областью легкой цепи (например, с константной областью легкой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21), и вторая полипептидная цепь содержит VH-

домен, слитый по карбоксильному концу с константной областью тяжелой цепи (например, с константной областью тяжелой цепи, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22). В таких вариантах антитело анти-CD70 обычно представляет собой тетрамер, состоящий из двух идентичных пар цепей иммуноглобулина, каждая пара имеет одну легкую цепь и одну тяжелую цепь. Показательные антитела анти-CD70, подходящие для использования согласно настоящему изобретению, также описаны в патенте США № 8067546, раскрытие которого включено в описание путем ссылки во всей полноте для всех целей.

Показательные последовательности вариабельных доменов и CDR анти-CD33 и анти-CD70, а также показательные последовательности константных областей тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов, представлены в табл. 1 ниже.

Таблица 1

Описание	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
VL антитела мыши 2H12	DIKMTQSPSSMYASLGERVIINCKASQDINSYLSWFQQKPGKSPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYSLTISSLEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK	1
VH антитела мыши 2H12	QVQLQQSGPELVRPGTFVKISCKASGYTFTNYDINWVNQRPGQGLEWIGWIYPGDGSTKYNEKFKAKATLTADKSSSTAYLQLNNLTSENSAVYFCASGYEDAMDYWGQGTSVTVSS	2
Гуманизированный VL 2H12	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCKASQDINSYLSWFQQKPGKAPKTLIYRANRLVDGVPSRFSGSGSGQDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYDEFPLTFGGGTKVEIK	3
Гуманизированный VH 2H12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYDINWVRQAPGQGLEWIGWIYPGDGSTKYNEKFKAKATLTADTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCASGYEDAMDYWGQGTTVTVSS	4
2H12 CDR-L1	KASQDINSYLS	5
2H12 CDR-L2	RANRLVD	6
2H12 CDR-L3	LQYDEFPLT	7
2H12 CDR-H1	NYDIN	8
2H12 CDR-H2	WIYPGDGSTKYNEKFKA	9
2H12 CDR-H3	GYEDAMDY	10
VL антитела мыши 1F6	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSREVPWTFGGGTKLEIKR	11
VH антитела мыши 1F6	QIQLVQSGPEVKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADAFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTATYFCARDYGDYGMDYWGQGTSVTVSS	12
Гуманизированный VL 1F6	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSGYSFMHWYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQHSREVPWTFGQGTKVEIKR	13
Гуманизированный VH 1F6	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLKWMGWINTYTGEPTYADAFKGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARDYGDYGMDYWGQGTTVTVSS	14
1F6 CDR-L1	RASKSVSTSGYSFMH	15
1F6 CDR-L2	LASNLES	16
1F6 CDR-L3	QHSREVPWT	17

1F6 CDR-H1	NYGMN	18
1F6 CDR-H2	WINTYTGEPTYADAFKG	19
1F6 CDR-H3	DYGDYGMDY	20
Константная область легкой цепи человека	TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	21
Константная область тяжелой цепи человека (без С-концевого К)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	22
Константная область тяжелой цепи человека, S239C (без С-концевого К)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPCVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	23

Как отмечалось выше, типичные фармацевтические композиции по настоящему изобретению проявляют (i) снижение скорости и степени агрегации, по сравнению с композициями, содержащими 0,5% мас./об. циклодекстрина или меньше в композиции, (ii) уменьшение роста количества кислых соединений, по сравнению с композициями, не содержащими циклодекстрин, и/или (iii) уменьшение химической деградации соединения лекарственный препарат-линкер (например, бензодиазепиновое лекарственное средство), по сравнению с композициями, содержащими 2% или меньше мас./об. циклодекстрина в композиции. Таким образом, настоящее изобретение относится к способам получения композиции, которая имеет по меньшей мере одно из указанного: (i) повышенную устойчивость к химической деградации бензодиазепинового лекарственного средства, по сравнению с композициями, содержащими 2% или меньше мас./об. циклодекстрина в композиции, (ii) повышенную устойчивость к агрегации, по сравнению с композициями, содержащими 0,5% мас./об. циклодекстрина или меньше в композиции, и (iii) повышенную устойчивость к росту кислых соединений, по сравнению с композициями, не содержащими циклодекстрин. Таким образом, в некоторых аспектах фармацевтические композиции по настоящему изобретению, содержащие приблизительно 5% или приблизительно 6% мас./об. циклодекстрина или больше, проявляют по меньшей мере одно из указанного ниже: (i) повышенную устойчивость к химической деградации бензодиазепинового лекарственного средства, по сравнению с композициями, содержащими 2% циклодекстрина или меньше, (ii) повышенную устойчивость к агрегации, по сравнению с композициями, содержащими 0,5% циклодекстрина или меньше, и (iii) повышенную устойчивость к увеличению кислых соединений, по сравнению с композициями, содержащими 0,5% циклодекстрина или меньше. Таким образом, в некоторых аспектах фармацевтические композиции по настоящему изобретению, содержащие приблизительно 5% или приблизительно 6% мас./об. циклодекстрина или больше, проявляют (i) повышенную устойчивость к химической деградации бензодиазепинового лекарственного препарата, по сравнению с композициями, содержащими 2% циклодекстрина или меньше, и (ii) повышенную устойчивость к агрегации, по сравнению с композициями, содержащими 0,5% циклодекстрина или меньше. В других аспектах фармацевтические композиции по настоящему изобретению, содержащие приблизительно 5% или приблизительно 6% мас./об. циклодекстрина или больше, проявляют (i) повышенную устойчивость к химической деградации бензодиазепинового лекарственного средства, по сравнению с композициями, содержащими 2% или меньше циклодекстрина, (ii) повышенную устойчивость к агрегации, по сравнению с композициями, содержащими 0,5% или меньше циклодекстрина, и (iii) повышенную устойчивость к увеличению кислых соединений, по сравнению с композициями, содержащими 0,5% или меньше циклодекстрина.

В любой из смесей или композиций, описанных в настоящем документе (включая фармацевтические композиции), ADC бензодиазепина могут содержать гуманизированное антитело 2H12 или гумани-

зированное антитело 1F6, конъюгированное с димером PBD 1, димером PBD 2, димером PBD 3, димером PBD 4, димером PBD 5, димером PBD 6, димером PBD 7, димером PBD 8, димером PBD 9, димером PBD 10, димером PBD 11, димером PBD 12, димером PBD 13, димером PBD 14, димером PBD 15, димером PBD 16 или с димером PBD 17, которые описаны в настоящем документе. В некоторых аспектах конъюгация димера PBD с антителом будет осуществляться через остаток цистеина, встроенный в антитело. В некоторых аспектах остаток цистеина встраивают в антитело в положении 239 (IgG1 человека), которое определено по EU-индексу (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991)). В некоторых аспектах в композиции в среднем присутствует 2 молекулы лекарственное средство-линкер на антитело.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению предусматривает концентрированное лекарственное средство ADC (например, ADC анти-CD33 или анти-CD70), часто используемый в виде нерасфасованного лекарственного продукта. Кроме того, в определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению является устойчивой к замораживанию, лиофилизации и/или растворению.

В некоторых аспектах фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, хранят при температурах от приблизительно -80°C до приблизительно 8°C. В целом, фармацевтическая композиция является стабильной и сохраняет биологическую активность в указанных пределах значений. В определенных аспектах композиции, описанные в настоящем документе, обладают повышенной стабильностью, по сравнению с композициями, не содержащими циклодекстрин, когда их подвергают воздействию стрессовых условий (например, хранение при 25 или 40°C в течение длительного периода времени, такого как 7 и 14 дней).

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению подходят для доставки с помощью различных путей введения. В определенных вариантах осуществления фармацевтическую композицию вводят парентерально, например, внутривенно, внутримышечно или подкожно. При введении ADC для лечения рака, фармацевтическая композиция может быть доставлена в системный кровоток путем внутривенного или подкожного введения. В конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция составлена для внутривенного введения. Внутривенное введение можно осуществить, например, путем инфузии в течение периода времени, такого как 30-90 мин, или путем однократной болюсной инъекции. В некоторых аспектах введение будет осуществляться путем в/в струйного введения (т.е. в течение 30-60 с) в периферически введенный центральный катетер.

Эффективные дозы фармацевтических композиций по настоящему изобретению варьируют в зависимости от многих факторов, включающих способы введения, расположение мишени, физиологическое состояние пациента, является ли пациент человеком или животным, вводятся ли другие лекарства и является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Обычно пациент является человеком, но также можно лечить других млекопитающих, кроме человека. Лечебные дозы необходимо титровать для оптимизации безопасности и эффективности.

Примерные дозы композиций ADC по настоящему изобретению включают дозы от приблизительно 1,0 мкг/кг до приблизительно 5 мг/кг, от приблизительно 10 мкг/кг до приблизительно 3 мг/кг, от приблизительно 10 мкг/кг до приблизительно 2 мг/кг, от приблизительно 1,0 мкг/кг до 1,0 мг/кг или от приблизительно 1,0 до 500,0 мкг/кг массы тела индивидов.

Частота введения зависит, наряду с другими факторами, от периода полувыведения из кровотока конъюгата антитело-лекарственное средство, состояния пациента и способа введения. Частота введения может быть ежедневной, еженедельной, ежемесячной, ежеквартальной или с нерегулярными интервалами в ответ на изменения в состоянии пациента или на прогрессирование заболевания (например, рака), которое лечат. Примерная частота внутривенного введения составляет от двух раз в неделю до одного раза в квартал, в течение непрерывного курса лечения, хотя также возможно более или менее частое введение доз. Другие примерные значения частоты внутривенного введения составляют один раз в неделю или один раз в месяц в течение непрерывного курса лечения, хотя также возможно более или менее частое введение доз. При подкожном введении примерная частота введения дозы может быть от ежедневной до ежемесячной, хотя также возможно более или менее частое введение доз.

Особенно предпочтительно предоставление композиций по изобретению в виде стандартной лекарственной формы для облегчения введения и однородности дозировки. Композиции по изобретению могут быть представлены в жидкой или лиофилизированной форме, например, в капсулах, стеклянных флаконах, ампулах, упаковках лекарственных средств для многократного приема или т.п. Стандартная лекарственная форма может содержать любую композицию, описанную в данном документе. В некоторых аспектах ADC будет присутствовать в виде лиофилизированной таблетки или порошка, хранящегося в оранжевом стеклянном флаконе для однократного употребления, предназначенного для растворения при в/в введении. Растворение осуществляют подходящим растворителем (например, водой для инъекций) до желаемой концентрации. Обычно восстановленный лекарственный препарат разводят достаточным количеством растворителя, так что восстановленный раствор будет иметь такую же концентрацию компонентов, как композиция до лиофилизации. Восстановленный продукт можно дополнительно развести в зависимости от величины дозы, которую необходимо ввести пациенту. Последующее разведение

можно осуществить, например, физиологическим раствором для инъекций. В некоторых аспектах изобретения, сразу после восстановления или последующего дополнительного разбавления, ADC вводят в/в (например, с помощью медленного в/в струйного введения) в соответствующий инъекционный порт устройства для центрального венозного доступа. Инфузионную систему обычно промывают физиологическим раствором.

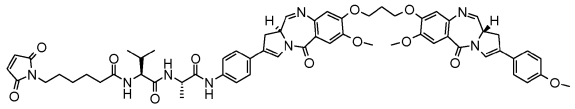
В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к терапевтическому продукту, который включает в себя стандартную фармацевтическую дозированную лекарственную форму, содержащую стабилизированную композицию ADC по настоящему изобретению (например, герметичный контейнер, содержащий композицию ADC, либо в жидкой, либо в лиофилизованной форме, как описано в настоящем документе). Терапевтический продукт может дополнительно включать этикетку по применению. В некоторых вариантах осуществления терапевтический продукт предоставляется в виде набора, дополнительно включающего, например, инструкции по использованию соответствующего объема, необходимого для достижения терапевтической дозы у пациента. Стандартная лекарственная форма, контейнер или набор могут быть разработаны для предоставления достаточного количества композиции для многократного использования или для однократного использования. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно включает разбавитель.

Если различные версии последовательности относятся к учетному номеру с разными датами, то имеется в виду версия, относящаяся к учетному номеру для действительной даты подачи указанной заявки. Действительная дата подачи заявки подразумевает более раннюю дату из существующих дат подачи заявки или дату регистрации приоритетной заявки, относящейся к учетному номеру, если это применимо. Аналогичным образом, если различные версии публикации изданы в разное время, имеется в виду версия, опубликованная последней от действительной даты подачи заявки, если не указано иное. Любой признак, стадия, элемент, вариант осуществления или аспект настоящего изобретения могут быть использованы в сочетании с любыми другими, если специально не указано иное. Хотя настоящее изобретение описано довольно подробно в качестве иллюстрации и примера в целях ясности и понимания, очевидно, что определенные изменения и модификации могут быть осуществлены в рамках прилагаемой формулы изобретения. Все патентные заявки, сайты, другие публикации, учетные номера и т.п., упомянутые выше или ниже, включены посредством ссылки во всей полноте, для всех целей, в той же степени, как если бы каждый отдельный предмет был указан специально и отдельно для включения посредством ссылки.

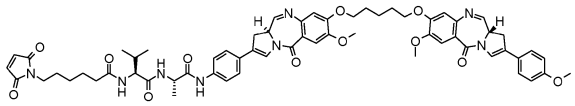
Примеры

Димеры PBD 1-4 и их синтез описаны в WO 2011/130613. Димеры PBD 5-10 и 16 можно синтезировать с использованием методов, описанных в WO 2011/130613 A1. Вкратце, димеры PBD 9 и 16 можно получить посредством C3-связанного бис-трифлата промежуточного соединения 8a, описанного в WO 2011/130613 A1. Необходимые C2-арильные группы в виде бороновых кислот или пинаколовых боронатов вводят в последовательно проводимые реакции сочетания Сузуки, с последующим восстановлением SEM-дилактама для высвобождения функциональных иминогрупп. Димеры PBD 5-8 и 10 получают аналогичным образом из C5-связанного бис-трифлата промежуточного соединения 8b, описанного в WO 2011/130613 A1. Димеры PBD 11-15, содержащие сложные эфиры или карбоновые кислоты в C2-арильных группах, можно получить с использованием методов, описанных в WO 2011/130613 A1 с небольшими модификациями. Димер PBD 13 можно получить из C3-связанного бис-трифлата промежуточного соединения 8a, описанного в WO 2011/130613 A1. Бис-трифлат десимметризуют посредством реакции сочетания Сузуки с соответствующим образом функционализированной бороновой кислотой или боратом пинакола для введения C2-арильной группы, несущей функциональную аминогруппу. Полученный монотрифлат затем восстанавливают триэтилборогибридом лития до SEM-карбинола, который затем используют во второй реакции сочетания Сузуки для введения C2 арильной группы, содержащей сложный метиловый эфир. В заключение SEM-карбинолы преобразуют в имины путем перемешивания с использованием силикагеля в течение 3 дней, как описано в WO 2011/130613 A1. Димеры PBD 12 и 14 можно получить тем же способом, начиная с C5-соединенного бис-трифлата 8b, описанного в WO 2011/130613 A1. Превращение сложных эфиров PBD в свободную карбоновую кислоту (11 и 15) можно осуществить с помощью омыления. Получение цистеиновых мутантов mAb IgG1 описано в целом в US 20100158909.

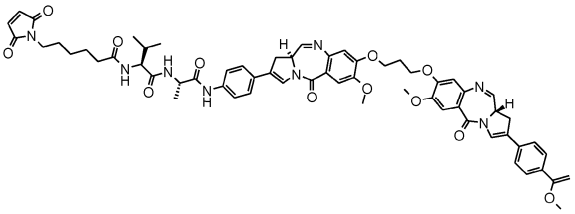
Соединения лекарственное средство PBD-линкер, используемые в следующих примерах, представлены ниже. Конъюгацию соединений лекарственное средство-линкер с антителами производят как описано в WO 2011/130613 A1.



Соединение 1

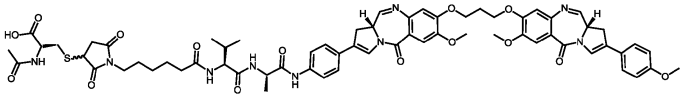


Соединение 2



Соединение 3

Гашеное соединение лекарственное средство-линкер, упоминаемое в следующих примерах, имеет следующую структуру:



Соединение 4

Соединения лекарственное средство PBD-линкер конъюгировали с антителом h2H12ec или h1F6ec через положение 239 тяжелой цепи.

(Обозначение "ec" после названия антитела означает антитело, имеющее встроенный цистеин в положении 239.) Вкратце, антитела h2H12 и h1F6, имеющие встроенный цистеин в положении 239 (нумерация согласно EU-индексу), восстанавливали, частично повторно окисляли (т.е. повторно окисляли в части межцепочечных дисульфидов) и конъюгировали с соединением лекарственное средство PBD-линкер согласно способам, описанным в WO 2011/130613, для получения ADC. Лекарственный препарат PBD-линкер конъюгировали с частично повторно окисленным антителом через встроенный остаток цистеина (в среднем 2 молекулы лекарственное средство-линкер на антитело). Термин "h2H12-1" означает гуманизированное антитело 2H12ec, конъюгированное с соединением 1, тогда как термин "h1F6-1" означает гуманизированное антитело 1F6ec, конъюгированное с соединением 1. Термин "h2H12-2" означает гуманизированное антитело 2H12ec, конъюгированное с соединением 2, тогда как термин "h1F6-2" означает гуманизированное антитело 1F6ec, конъюгированное с соединением 2. Термин "h2H12-3" означает гуманизированное антитело 2H12ec, конъюгированное с соединением 3, тогда как термин "h1F6-3" означает гуманизированное антитело 1F6ec, конъюгированное с соединением 3. Примеры 4-7 осуществляли с использованием либо антитела h2H12ec, либо антитела h1F6ec, конъюгированного с соединением 1 через введенный цистеин в положении 239.

Пример 1. Композиции на основе циклодекстрина уменьшали скорость и степень агрегации для всех шести PBD ADC

Композиции получали путем замены буфера в растворах исходных веществ на буферы тестируемых композиций с использованием диализа, колонки для замены буфера или метода центробежного фильтрования. Использовали композиции, которые указаны в комментариях к фигурам. Концентрация аргинина, если показано, что он присутствует, составляет 0,5 М. Конечная концентрация ADC находилась в пределах от 1,3 до 3,1 мг/мл, по данным измерений УФ-спектроскопии. Включенные в композиции ADC помещали в предварительно стерилизованные пробирки и хранили в следующих условиях, утвержденных ICH: 2-8°C, 25°C/65% относительной влажности и/или 40°C/75% относительной влажности. % HMW контролировали с использованием эксклюзионной хроматографии. На фиг. 1 композиции содержат h2H12-1 и хранение осуществляют при 25°C; на фиг. 2 композиции содержат h1F6-1 и хранение осуществляют при 25°C; на фиг. 3 композиции содержат h2H12-3 и хранение осуществляют при 40°C; на фиг. 4 композиции содержат h1F6-3 и хранение осуществляют при 40°C; на фиг. 5 композиции содержат h2H12-2 и хранение осуществляют при 40°C; на фиг. 6 композиции содержат h1F6-2 и хранение осуществляют при 40°C; на фиг. 13 композиции содержат h1F6-1 и хранение осуществляют при 25°C.

Пример 2. Композиции на основе HPBCD снижали рост количества кислых соединений для пяти из шести ADC PBD

Композиции получали путем замены буфера в растворах исходных веществ на буферы тестируемых композиций с использованием диализа, колонки для замены буфера или метода центробежного фильтро-

вания. Использовали композиции, которые указаны в комментариях к фигурам. Концентрация аргинина, если показано, что он присутствует, составляет 0,5 М. Конечная концентрация ADC находилась в пределах от 1,3 до 3,1 мг/мл, по данным измерений УФ-спектроскопии. Композицию помещали в предварительно стерилизованные пробирки и хранили в следующих условиях, утвержденных ICH: 2-8°C, 25°C/65% относительной влажности и/или 40°C/75% относительной влажности. Образцы анализировали в отношении распределения заряда в молекулах соединения (кислые соединения, % главного соединения, % соединений с основными свойствами) с помощью метода капиллярного изоэлектрического фокусирования с детекцией в капилляре. На фиг. 7 композиции содержат h2H12-1 и хранение осуществляют при 25°C; на фиг. 8 композиции содержат h1F6-1 и хранение осуществляют при 25°C; на фиг. 9 композиции содержат h2H12-3 и хранение осуществляют при 40°C; на фиг. 10 композиции содержат h1F6-3 и хранение осуществляют при 40°C; на фиг. 11 композиции содержат h2H12-2 и хранение осуществляют при 40°C; на фиг. 12 композиции содержат h1F6-2 и хранение осуществляют при 40°C.

Пример 3. Композиции на основе HPBCD уменьшают химическую деградацию соединения лекарственное средство-линкер

Композиции получали путем замены буфера в растворах исходных веществ на буферы тестируемых композиций с использованием диализа, колонки для замены буфера или метода центробежного фильтрования. В целом, композиции включали в себя начальный состав для контроля (преимущественно аргинина), буфер, 3% циклодекстрин и 6% циклодекстрин. Конечная концентрация ADC находилась в пределах от 1,3 до 3,1 мг/мл, по данным измерений УФ-спектроскопии. Композицию помещали в предварительно стерилизованные пробирки и хранили в следующих условиях, утвержденных ICH: 2-8°C, 25°C/65% относительной влажности и/или 40°C/75% относительной влажности. Стабильность соединения лекарственное средство-линкер измеряли по % продуктов распада с использованием метода восстановительной PLRP/MS или по % интактного соединения лекарственное средство-линкер с использованием карты расщепления пепсином. Результаты представлены согласно композициям, перечисленным в левой колонке. Результаты, представленные в табл. 2, показывают, что композиция, содержащая 6% циклодекстрина, проявляла меньшую степень деградации соединения лекарственное средство-линкер, чем композиция, содержащая 2% циклодекстрина, через 1 неделю хранения при 40°C. Результаты, представленные в табл. 3, показывают, что композиции h2H12-1, содержащие 6% циклодекстрина, проявляли меньшую степень деградации соединения лекарственное средство-линкер после 1 недели хранения при 25°C, и результаты, представленные в табл. 4, показывают, что композиции h1F6-1, содержащие 6% hpb-циклодекстрина, сохраняли более высокий уровень интактного соединения лекарственное средство-линкер после 1 недели инкубации при 40°C.

Таблица 2

Образец h1F6-1 (через 1 неделю хранения при 40°C)	% интактного соединения лекарственное средство-линкер по результатам теста расщепления пепсином
Исходное вещество (T0 контроль)	82
20 мМ трис, 2% циклодекстрина	63
20 мМ трис, 6% циклодекстрина	70

Таблица 3

Образец h2H12-1 (через 1 неделю хранения при 25°C)	% деграданта соединения лекарственное средство-линкер (фрагменты 168 Дальтон)
0,5 M Arg (t=0, контроль)	0,2
0,5 M Arg (25°C, t=1 неделя)	4,7
0,5 M Arg, 6% hpβCD (25°C, t=1 неделя)	3,0
6% hpβCD, 20 мМ фосфат калия (t=0, контроль)	0,6
6% hpβCD, 20 мМ фосфат калия (25°C, t=1 неделя)	1,4

Таблица 4

Образец h1F6-1 (через 1 неделю хранения при 40°C)	% интактного соединения лекарственное средство-линкер по результатам теста расщепления пепсином
Исходное вещество (T0, контроль)	85
0,5 M Arg (pH 7,2, 40°C, t=1 неделя)	63
20 мМ трис (pH 7,2, 40°C, t=1 неделя)	66
20 мМ 6% hpβCD (pH 7,2, 40°C, t=1 неделя)	69

Пример 4. Профиль концентрации циклодекстрина

В эксперименте проверяли полезность 3% мас./об. гидроксипропил-β-циклодекстрина (hpb-CD) в качестве компонента буфера для диафильтрации, для предотвращения агрегации гашеной реакционной смеси, используемой для конъюгации (QCR), содержащей h2H12-1, во время диафильтрации. Главной целью эксперимента было определить, является ли мембрана, которую используют для диафильтрации, проницаемой для hpb-CD. Если мембрана плохо проницаема для HPB-CD, его концентрация в партии будет превышать концентрацию в буфере для диафильтрации, тогда как если мембрана легко проницаема, концентрация hpb-CD в партии будет достигать концентрации в буфере для диафильтрации и оставаться на таком уровне.

В процессе диафильтрации (DF) использовали 88 см^2 кассету Ultracel Pellicon 3 от Millipore с молекулярномассовым размером пор 30 кДа. Объем партии для DF составлял 250 мл, скорость подачи потока составляла 40 мл/мин в течение всего процесса, и клапан, установленный на линии отвода ретентата, был отрегулирован для поддержания трансмембранного давления примерно 20 psi (138 кПа). Скорость добавления буфера для диафильтрации для поддержания постоянного объема партии составляла в начале 9 мл/мин, но на протяжении большей части процесса поддерживали скорость 13-14 мл/мин. Пробы отбирали после завершения каждого объема диафильтрации. Концентрацию hpb-CD измеряли в каждом образце с использованием метода ОФ ВЭЖХ с испарительным детектором светорассеяния.

Результаты показали, что концентрация hpb-CD возрастала от 0 в начале диафильтрации до 2,8-2,9 мас.% в течение 5 объемов диафильтрации, затем оставалась постоянной в течение дополнительных 5 объемов диафильтрации (фиг. 14). Профиль концентрации hpb-CD соответствует реагенту, который легко проникает через используемую ультрафильтрационную мембрану.

Пример 5. Тангенциальная поточная фильтрация с 3 и 10% мас./об. циклодекстрина

В эксперименте использовали QCR, содержащую h2H12-1, 50% об./об. пропиленгликоль, гашеное соединение лекарственный препарат-линкер (соединение 4) и NAC, в 50 мМ трис/5 мМ ЭДТА, pH 8,0. Указанную смесь доводили до 10% мас./об. hpb-CD путем добавления 25% объема 50% мас./об. раствора hpb-CD в 50 мМ трис/5 мМ ЭДТА, pH 8,0. Затем смесь подвергали диафильтрации в условиях, аналогичных условиям примера 4, но измененных соответствующим образом с учетом масштаба. Образцы отбирали после каждого объема диафильтрации и замораживали до проведения анализа. Концентрацию гашеного соединения лекарственное средство-линкер определяли в каждом образце. Концентрация гашеного соединения лекарственный препарат-линкер снижалась на протяжении диафильтрации в порядке, который соответствует достоверной модели удаления примесей в ходе диафильтрации с постоянным объемом, как показано с помощью линейной зависимости между ln(C/Co) и объемом диафильтрации #: C/C_0=exp (-SN). C и C_0 представляют собой концентрации измеряемого аналита, N представляет собой число объемов диафильтрации и S представляет собой фактор просеивания, определяемый как концентрация аналита на стороне мембраны, где находится пермеат, деленная на концентрацию аналита на стороне мембраны, где находится ретентат. Начальная концентрация составляла 16,3 мкМ, и конечная концентрация составляла 0,14 мкМ.

В присутствии 10% мас./об. hpb-CD, гашеное соединение лекарственное средство PBD-линкер эффективно очищают в процессе диафильтрации (фиг. 15). В отличие от предыдущих экспериментов, в которых очистка прекращалась после определенного количества объемов диафильтрации при отсутствии hpb-CD, в данном эксперименте очистка давала эффект до достижения очень низкого уровня примесей. Эксперимент показал, что эффективная и полная очистка может быть выполнена в условиях тестирования.

Эксперимент повторяли с использованием более низкой концентрации hpb-CD (фиг. 15). По суще-

ству идентичное удаление примесей наблюдали, когда 3% мас./об. hpb-CD заменяли на 10% мас./об.

Пример 6. Удаление примесей, относящихся к лекарственному средству, из смеси QCR

Эксперименты, описанные в примерах 4 и 5, показали, что гашеное соединение лекарственный препарат PBD-линкер можно удалить из смеси с помощью процесса диафильтрации с использованием циклодекстрина. Целью этого эксперимента было определить, позволяет ли указанный способ успешно удалить гашеное соединение лекарственное средство-линкер из QCR, имеющей более высокую начальную концентрацию гашеного соединения лекарственный препарат PBD-линкер.

Хранящееся замороженное восстановленное антитело (антитело h2H12, восстановленное по положению 239, но не по межцепочечным дисульфидам) размораживали. Добавляли пропиленгликоль (PG), затем лекарственное средство-линкер-PG/DMA (соединение 1), для получения реакционной смеси, используемой для конъюгации. Смесь содержала 50% (об./об.) PG, и избыток соединения лекарственное средство-линкер (соединение 4). Реакцию проводили приблизительно 90 мин, после чего добавляли 3,0 экв. NAC (относительно соединения лекарственное средство-линкер) и продолжали реакцию с гашеной реакционной смесью приблизительно 30 мин.

Добавляли достаточное количество 50% об./об. hpb-CD стокового раствора, чтобы довести концентрацию hpb-CD в гашеной реакции конъюгации до 3%. Процесс TFF начинали путем включения подающего насоса TFF, и осуществляли с использованием 88 $см^2$ мембраны из регенерированной целлюлозы. Как и в случае предыдущих процессов TFF растворов, содержащих высокий процент PG, начальную скорость потока ограничивали в связи с высоким трансмембранным давлением, но во время прохождения первого объема диафильтрации скорость подачи потока постепенно увеличивали в пределах рекомендованного рабочего диапазона мембраны. Затем клапан, установленный на линии отвода ретентата, устанавливали для поддержания показателя TMP 20 psi (138 кПа). Добавляли буфер для диафильтрации для поддержания постоянного объема. Процесс продолжали в течение 20 объемов диафильтрации, и образцы получали после каждого объема диафильтрации и замораживали для последующего анализа.

Измерение концентрации гашеного соединения лекарственное средство PBD-линкер (соединение 4) в растворе в образцах, полученных во время процесса очистки, показало, что материал был очищен с помощью процесса TFF. Концентрация исходно составляла 27,47 мкМ и снижалась до 0,03 мкМ после 20 объемов диафильтрации, что показывает, что гашеное соединение лекарственное средство PBD-линкер может быть удалено с помощью TFF из раствора QCR (фиг. 16). Анализ образца конечного продукта показал, что процесс не оказал неблагоприятного воздействия на среднее содержание лекарственного средства и распределение, целостность дисульфидных связей, распределение заряда в молекуле и на УФ-спектр (данные не представлены).

Пример 7. Удаление примесей, относящихся к лекарственному средству, из смеси QCR, содержащей ADC 2H12 или ADC h1F6

Процесс TFF осуществляли для гашеной реакционной смеси, используемой для конъюгации, с использованием 0,1 $м^2$ мембраны Ultracel Pellicon 3 (Millipore) с предельным значением пропускания 30 кДа. Показатель TMP поддерживали на уровне 20 psi (138 кПа), причем сначала показатель поддерживали на указанном уровне за счет скорости потока, затем с помощью клапана, установленного на линии отвода ретентата. Процесс TFF проводили для 20 объемов диафильтрации, причем образцы собирали для каждого 2-го объема диафильтрации. Концентрацию гашеного соединения лекарственный препарат PBD-линкер определяли в каждом образце.

В одном эксперименте с использованием смеси QCR, содержащей ADC 2H12, концентрация гашеного соединения лекарственный препарат PBD-линкер (соединение 4) снижалась от 29,56 до 0,02 мМ во время процесса TFF. График удаления примесей имел линейную форму, причем фактор просеивания составлял примерно 0,4. Данные по степени извлечения во время стадии TFF отсутствуют, но общая доля выхода % ADC составляла больше 95, так что потери во время процесса TFF составляли меньше 5 (фиг. 17).

Метод TFF является таким же эффективным, как и фильтрование через слой активированного угля для удаления гашеного соединения лекарственный препарат PBD-линкер, в присутствии 3% hpb-CD. На основании проверки содержания примесей, относящихся к лекарственному средству, во время процесса TFF, установили, что 14 объемов диафильтрации достаточно, чтобы обеспечить достижение достаточно низкого уровня примесей.

В одном эксперименте с использованием смеси QCR, содержащей ADC h1F6, концентрация гашеного соединения лекарственный препарат PBD-линкер (соединение 4) снижалась от 21,2 мМ до 0,1 мкМ во время процесса TFF. График удаления примесей имел линейную форму, причем фактор просеивания составлял примерно 0,6 (фиг. 18).

Пример 8. Очистка ADC бензодиазепина с использованием тангенциальной поточной фильтрации без циклодекстрина

Гашеное соединение лекарственное средство-линкер (соединение 4) очищали от QCR с использованием диафильтрации с постоянным объемом. Гашеную реакционную смесь, используемую для конъюгации, вводили в устройство для тангенциальной поточной фильтрации. Гашеная реакционная смесь, используемая для конъюгации, содержала трис, NaCl и 50% пропиленгликоль. Буфер для тангенциальной

поточной фильтрации также содержал трис, NaCl и 50% пропиленгликоль. После осуществления последовательности ультрафильтрация/диафильтрация в смеси оставалось 1,1 мкМ примеси, относящейся к бензодиазепиновому средству, причем очистка прекращалась после четырех объемов диафильтрации (данные не представлены).

Пример 9. Цитотоксичность

Исследования цитотоксичночти осуществляли, чтобы определить, сохраняли ли композиции ADC, содержащие 6% циклодекстрин, цитотоксическую активность. Результаты показали, что композиции ADC сохраняли цитотоксическую активность (данные не представлены).

Пример 10. Удаление примесей, относящихся к лекарственному средству, из негашеной реакционной смеси, используемой для конъюгации

Негашеное соединение лекарственное средство PBD-линкер со значением SlogP 7,57 (соединение 1) очищали от негашеной реакционной смеси, используемой для конъюгации, с помощью диафильтрации с постоянным объемом. Поддерживали концентрацию циклодекстрина 3%. Неожиданно обнаружили, что удаление негашеного соединения лекарственное средство PBD-линкер (данные не представлены) было не таким эффективным, как удаление гашеного соединения лекарственный препарат PBD-линкер, как показано в предыдущих примерах. Эксперимент показал, что уменьшение гидрофобности соединения лекарственное средство PBD-линкер (соединение 4 имеет значение SlogP 5,76) улучшает очистку соединения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ удаления примесей, относящихся к бензодиазепиновому лекарственному средству, из смеси, содержащей конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) бензодиазепина и примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству, включающий проведение тангенциальной поточной фильтрации указанной смеси при поддержании концентрации циклодекстрина в смеси от 3 до 30% мас./об, где способ производит стабилизированную смесь, причем стабилизация определена как снижение низкомолекулярных продуктов деградации, снижение роста кислотных соединений и/или снижение скорости и степени агрегации по сравнению со смесью, не содержащей циклодекстрин.

2. Способ по п.1, где циклодекстрин представлен в смеси в начале тангенциальной поточной фильтрации.

3. Способ по п.1, где циклодекстрин добавляют в смесь перед удалением значительной части примесей, относящихся к бензодиазепиновому лекарственному средству, и затем поддерживают концентрацию циклодекстрина в смеси от 5 до 30% мас./об.

4. Способ по любому из пп.1-3, где поддерживают концентрацию циклодекстрина в смеси от 6 до 10% мас./об.

5. Способ по любому из пп.1-3, где поддерживают концентрацию циклодекстрина в смеси 6% мас./об.

6. Способ по любому из предшествующих пунктов, где тангенциальная поточная фильтрация представляет собой диафильтрацию с постоянным объемом.

7. Способ по любому из пп.1-3, где устройство для тангенциальной поточной фильтрации представляет собой устройство, включающее в себя насос, емкость для фильтрации, имеющую входной патрубок, выпускной патрубок для фильтрата, выпускной патрубок для ретентата, ультрафильтрационную мембрану с размером пор 50 кДа или меньше, которая разделяет емкость для фильтрации на входной отсек и выходной отсек, так что весь фильтрат должен поступать во входной патрубок и проходить через ультрафильтрационную мембрану перед вытеканием из емкости для фильтрации через выпускной патрубок для фильтрата, емкость для образца, предназначенную для хранения смеси, содержащей ADC бензодиазепина и примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству, и емкость для буфера, гидравлически соединенную с емкостью для образца, и где буфер, находящийся в емкости для буфера, содержит 6% мас./об. циклодекстрина.

8. Способ по п.7, где буфер замещает фильтрационный объем со скоростью, равной скорости фильтрования, таким образом, что объем в устройстве для тангенциальной поточной фильтрации остается постоянным.

9. Способ по любому из пп.1-5, где фильтрация представляет собой периодическую диафильтрацию.

10. Способ по любому из предшествующих пунктов, дополнительно включающий стадии: (i) контактирования антитела с соединением бензодиазепиновое лекарственное средство-линкер в условиях, достаточных для создания реакционной смеси, содержащей ADC бензодиазепина и примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству, и (ii) контактирования реакционной смеси с гасящей добавкой для получения гашеной смеси, используемой для реакции конъюгации, где указанная смесь, подвергаемая тангенциальной поточной фильтрации, представляет собой гашеную реакционную смесь, используемую для проведения конъюгации.

11. Способ по любому из пп.1-10, где примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному

средству, представляют собой гашеные соединения бензодиазепиновое лекарственное средство-линкер.

12. Способ по п.11, где величина SlogP для гашеных соединений бензодиазепиновое лекарственное средство-линкер составляет не больше чем 7,50 или не больше чем 6,5.

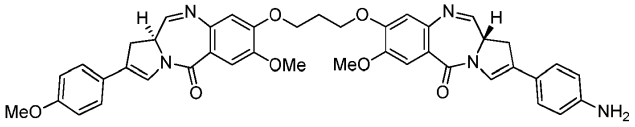
13. Способ по любому из предшествующих пунктов, где количество примесей, относящихся к бензодиазепиновому лекарственному средству, уменьшается до уровня 1 мкМ или меньше, 0,5 мкМ или меньше, 0,1 мкМ или меньше или 0,05 мкМ или меньше.

14. Способ по любому из предшествующих пунктов, где циклодекстрин представляет собой гидроксипропил-бета-циклодекстрин или сульфобутиловый эфир бета-циклодекстрина.

15. Способ по п.14, где циклодекстрин представляет собой гидроксипропил-бета-циклодекстрин.

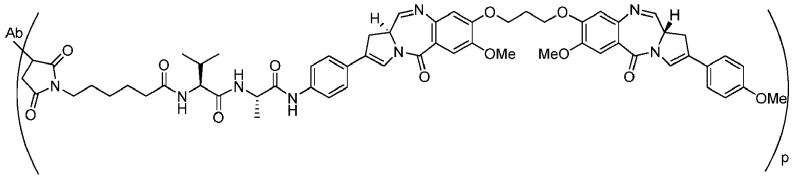
16. Способ по любому из предшествующих пунктов, где ADC бензодиазепина представляет собой моноклональное антитело, конъюгированное с димером пирролобензодиазепина, димером индолинобензодиазепина или димером оксазолидинобензодиазепина.

17. Способ по п.16, где димер пирролобензодиазепина представляет собой соединение, представленное ниже:



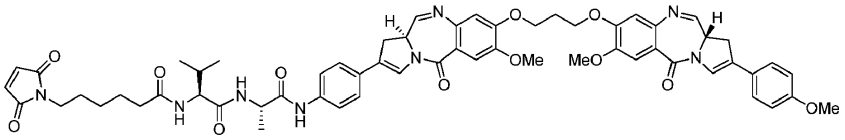
или его соль.

18. Способ по п.16, где ADC бензодиазепина представляет собой моноклональное антитело, конъюгированное с димером пирролобензодиазепина, причем ADC бензодиазепина имеет следующую формулу:



или его соль, где Ab представляет собой моноклональное антитело и p представляет собой среднее число молекул лекарственное средство-линкер на антитело в смеси и составляет приблизительно 2.

19. Способ по п.17 или 18, где примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству, представляют собой гашеное соединение лекарственное средство-линкер, где соединение лекарственное средство-линкер до гашения представляет собой соединение формулы



или его соль.

20. Способ по любому из пп.1-15, где ADC бензодиазепина представляет собой моноклональное антитело, конъюгированное с димером индолинобензодиазепина или с димером оксазолидинобензодиазепина.

21. Стабилизированная смесь, содержащая

ADC бензодиазепина и примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству,

и циклодекстрин в концентрации от приблизительно 3 до приблизительно 30% мас./об;

при этом примеси, относящиеся к бензодиазепиновому лекарственному средству, присутствуют в количестве 0,1 мкМ или меньше, и

при этом указанная стаблизированная смесь содержит от 0,5 до 30 мг/мл ADC бензодиазепина, где указанную стабилизированную смесь получают способом по любому из предшествующих пунктов, причем стабилизация определена как снижение низкомолекулярных продуктов деградации, снижение роста кислотных соединений и/или снижение скорости и степени агрегации по сравнению со смесью, не содержащей циклодекстрин.

22. Жидкая фармацевтическая композиция, содержащая

от 0,5 до 10 мг/мл ADC бензодиазепина;

0,1 мкМ или меньше примесей, относящихся к бензодиазепиновому лекарственному средству; и

β-циклодекстрин в концентрации от приблизительно 3% мас./об. до приблизительно 30% мас./об, при этом данная жидкая фармацевтическая композиция является стабилизированной, причем стабилизация определена как снижение низкомолекулярных продуктов деградации, снижение роста кислотных соединений и/или снижение скорости и степени агрегации по сравнению со смесью, не содержащей циклодекстрин.

23. Жидкая фармацевтическая композиция по п.22, где композиция дополнительно содержит по меньшей мере один буферный агент; где композиция представляет собой водный раствор и концентра-

ция в которой по меньшей мере одного буферного агента является эффективной для поддержания физиологически подходящего значения pH.

24. Жидкая фармацевтическая композиция по п.22 или 23, где композиция представляет собой водный раствор, а циклодекстрин представлен в концентрации от 5% мас./об. или от 6% мас./об. до 30% мас./об.

25. Жидкая фармацевтическая композиция по п.24, где циклодекстрин представлен в концентрации от 6% мас./об. до 10% мас./об.

26. Жидкая фармацевтическая композиция по любому из пп.22-25, где композиция представляет собой водный раствор, дополнительно содержащий лиопротектор так, что водный раствор является подходящим для лиофилизации.

27. Жидкая фармацевтическая композиция по п.26, где лиопротектор представляет собой сахар.

28. Жидкая фармацевтическая композиция по п.27, где сахар представляет собой сахарозу.

29. Жидкая фармацевтическая композиция по любому из пп.26-28, где лиопротектор представлен в концентрации от 4 до 8% (мас./об.).

30. Жидкая фармацевтическая композиция по п.29, где лиопротектор представлен в концентрации 6% (мас./об.).

31. Жидкая фармацевтическая композиция по любому из пп.22-30, где композиция представляет собой водный раствор, имеющий значение pH от 6,0 до 8,0.

32. Жидкая фармацевтическая композиция по п.31, при этом водный раствор имеет значение pH от 6,5 до 7,5.

33. Жидкая фармацевтическая композиция по п.32, при этом водный раствор имеет значение pH 7,3.

34. Жидкая фармацевтическая композиция по любому из пп.23-33, где по меньшей мере один буферный агент выбран из группы, состоящей из триса, ацетата, гистидина, цитрата, фосфата и сукцината.

35. Жидкая фармацевтическая композиция по п.34, где по меньшей мере один буферный агент представляет собой трис в концентрации 20 или 50 мМ.

36. Жидкая фармацевтическая композиция по любому из пп.22-35, где ADC бензодиазепина представлен в концентрации от 0,5, 1 или 2 до 10 мг/мл.

37. Жидкая фармацевтическая композиция по п.36, где концентрация ADC бензодиазепина составляет от 2 до 5 мг/мл.

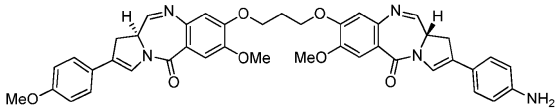
38. Жидкая фармацевтическая композиция по п.37, где концентрация ADC бензодиазепина составляет 3 мг/мл.

39. Жидкая фармацевтическая композиция по любому из пп.22-38, где β-циклодекстрин представляет собой гидроксипропил-бета-циклодекстрин или сульфобутиловый эфир бета-циклодекстрина.

40. Жидкая фармацевтическая композиция по любому из пп.22-38, где β-циклодекстрин представляет собой гидроксипропил-бета-циклодекстрин.

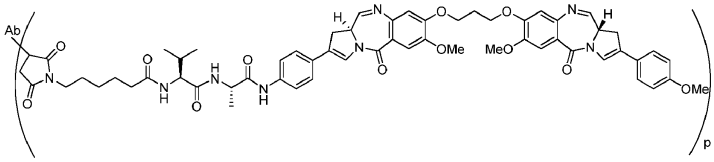
41. Жидкая фармацевтическая композиция по п.22, где ADC бензодиазепина представляет собой моноклональное антитело, конъюгированное с димером пирролобензодиазепина, димером индолинобензодиазепина или димером оксазолидинобензодиазепина.

42. Жидкая фармацевтическая композиция по п.41, где димер пирролобензодиазепина представляет собой следующее соединение:



или его фармацевтически приемлемую соль.

43. Жидкая фармацевтическая композиция по п.41, где ADC бензодиазепина представляет собой моноклональное антитело, конъюгированное с димером пирролобензодиазепина, и представляет собой следующее соединение:



или его фармацевтически приемлемую соль; где Ab представляет собой моноклональное антитело и p представляет собой среднее число молекул соединения лекарственное средство-линкер на антитело в композиции и составляет приблизительно 2.

44. Жидкая фармацевтическая композиция по любому из пп.22-40, где ADC бензодиазепина представляет собой моноклональное антитело, конъюгированное с димером индолинобензодиазепина или с димером оксазолидинобензодиазепина.

45. Жидкая фармацевтическая композиция по любому из пп.22-44, где компонент антитела ADC безодиазепина представляет собой антитело, которое специфически связывается с антигеном, который

экспрессируется на поверхности раковой клетки, или с внеклеточным доменом CD19 человека, CD33 человека или CD70 человека.

46. Жидкая фармацевтическая композиция по п.45, где антитело представляет собой антитело h2H12, имеющее вариабельную последовательность легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3, и вариабельную последовательность тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4, или антитело представляет собой антитело h1F6, имеющее вариабельную последовательность легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 13, и вариабельную последовательность тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14.

47. Жидкая фармацевтическая композиция по любому из пп.23-46, где антитело, как компонент ADC, содержит константную область тяжелой цепи изотипа IgG1.

48. Жидкая фармацевтическая композиция, содержащая

конъюгаты антитело-лекарственное средство пирролобензодиазепина (PBD ADC), где концентрация PBD ADC составляет от 2 до 5 мг/мл;

гидроксипропил-бета-циклодекстрин в концентрации от 5 до 10% мас./об.;

сахар в концентрации от 4 до 8% мас./об. и

по меньшей мере один буферный агент;

где композиция представляет собой водный раствор и концентрация в ней по меньшей мере одного буферного агента является достаточной для поддержания физиологически приемлемого значения pH.

49. Жидкая фармацевтическая композиция по п.48, где

концентрация PBD ADC составляет 3 мг/мл;

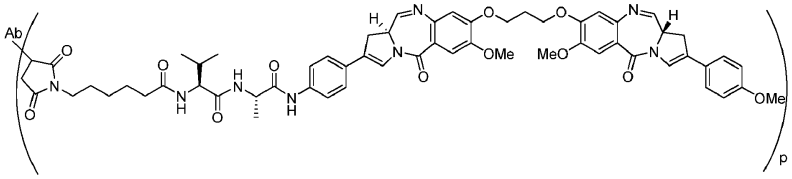
концентрация гидроксипропил-β-циклодекстрина составляет 6% мас./об;

сахар представляет собой сахарозу в концентрации приблизительно 6% мас./об.;

по меньшей мере один буферный агент представляет собой трис в концентрации 20 мМ и

значение pH составляет от 7,0 до 7,5 или составляет 7,2 или 7,3.

50. Жидкая фармацевтическая композиция по п.48 или 49, где PBD ADC представляет собой соединение формулы:



или его фармацевтически приемлемую соль; где Ab представляет собой моноклональное антитело и p представляет собой среднее число молекул соединения лекарственное средство-линкер на антитело в композиции и составляет приблизительно 2.

51. Жидкая фармацевтическая композиция по любому из пп.22-50, где бензодиазепиновое лекарственное средство, как компонент ADC или PBD ADC, конъюгируют с антителом, при том, что антитело представляет собой моноклональное антитело, с помощью встроенного остатка цистеина, представленного в моноклональном антителе, и межцепочечные дисульфидные связи антитела представляют собой по существу интактные.

52. Жидкая фармацевтическая композиция по п.51, где остаток цистеина находится в положении 239 тяжелой цепи IgG1, где нумерация соответствует EU-индексу, как указано Kabat.

53. Жидкая фармацевтическая композиция по любому из пп.48-52, где моноклональное антитело представляет собой гуманизированное моноклональное антитело анти-CD33 или анти-CD70.

54. Жидкая фармацевтическая композиция по п.53, где гуманизированное антитело анти-CD33 представляет собой антитело h2H12, имеющее вариабельную последовательность легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 3, и вариабельную последовательность тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 4, и гуманизированное антитело анти-CD70 представляет собой антитело h1F6, имеющее вариабельную последовательность легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 13, и вариабельную последовательность тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 14.

55. Способ получения стабилизированной, лиофилизованной бензодиазепиновой композиции конъюгата антитело-лекарственное средство, включающий стадии, на которых:

(a) предоставляют жидкую композицию по любому из пп.24-54 и лиопротектор, при этом данная жидкая композиция представляет собой водный раствор; и

(b) лиофилизируют водный раствор для создания лиофилизованной бензодиазепиновой композиции конъюгата антитело-лекарственное средство,

где стабилизация определена как снижение низкомолекулярных продуктов деградации, снижение роста кислотных соединений и/или снижение скорости и степени агрегации по сравнению со смесью, не содержащей циклодекстрин.

56. Стабилизированная лиофилизованная бензодиазепиновая композиция конъюгата антитело-лекарственное средство, полученная способом по п.55.

57. Водная фармацевтическая композиция бензодиазепинового конъюгата антитело-лекарственное средство, получаемая восстановлением стабилизированной, лиофилизованной бензодиазепиновой композиции конъюгата антитело-лекарственное средство по п.56 посредством добавления подходящего разбавителя, при этом разбавитель представляет собой воду для инъекций.

58. Способ предотвращения химической деградации и фрагментации соединения бензодиазепиновое лекарственное средство-линкер, прикрепленного к антителу, включающий создание композиции соединения бензодиазепиновое лекарственное средство-линкер, прикрепленного к антителу с 6% мас./об. гамма-циклодекстрина или бета-циклодекстрина.

59. Жидкая фармацевтическая композиция по п.22, при этом композиция представляет собой водный раствор, в котором ADC бензодиазепина представлен в концентрации от 1 до 5 мг/мл.

60. Жидкая фармацевтическая композиция по п.60, где ADC бензодиазепина в водном растворе представлен в концентрации 1, 2 или 3 мг/мл.

61. Жидкая фармацевтическая композиция по п.22, где композиция представляет собой водный раствор и при этом циклодекстрин в водном растворе представлен гидроксипропил-бета-циклодекстрином или сульфобутиловым эфиром бета-циклодекстрина в концентрации 6% мас./об.

62. Жидкая фармацевтическая композиция по п.22, где композиция представляет собой водный раствор, при этом водный раствор дополнительно содержит буферный агент, при этом буферный агент представляет собой трис в концентрации, эффективной для поддержания pH на уровне от приблизительно 7 до 7,5.

63. Жидкая фармацевтическая композиция по п.22, при этом композиция представляет собой водный раствор, при этом водный раствор дополнительно содержит буфер на основе трис в концентрации от 5 до 50 мМ.

64. Жидкая фармацевтическая композиция по п.22, при этом композиция представляет собой водный раствор, при этом водный раствор дополнительно содержит буферный агент, при этом буферный агент представляет собой трис в концентрации 20 или 50 мМ для поддержания pH на уровне 7,3.

65. Жидкая фармацевтическая композиция по п.64, отличающаяся тем, что водный раствор дополнительно содержит поверхностно-активное вещество.

66. Жидкая фармацевтическая композиция по п.65, в которой поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20 или полисорбат 80.

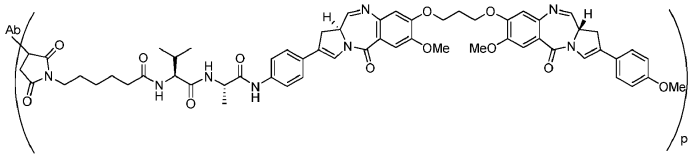
67. Лиофилизированная композиция ADC бензодиазепина, полученная в результате лиофилизации жидкой композиции по п.22, дополнительно содержащей лиопротектор, при этом жидкая композиция, подлежащая лиофилизации, представляет собой водный раствор.

68. Лиофилизированная композиция по п.67, отличающаяся тем, что количество лиопротектора в водной композиции, подлежащей лиофилизации, таково, что при восстановлении в водную композицию эта восстановленная водная композиция является по существу изотонической.

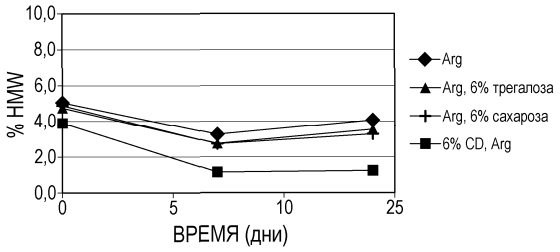
69. Лиофилизированная композиция по п.68, в которой лиопротектором является сахароза.

70. Лиофилизированная композиция по п.68, отличающаяся тем, что водная композиция, подлежащая лиофилизации, содержит 1, 2 или 3 мг/мл ADC бензодиазепина, 20 или 50 мМ трис, 6% мас./об. сахарозы, 6% мас./об. гидроксипропил-бета-циклодекстрина и необязательно полисорбат 20.

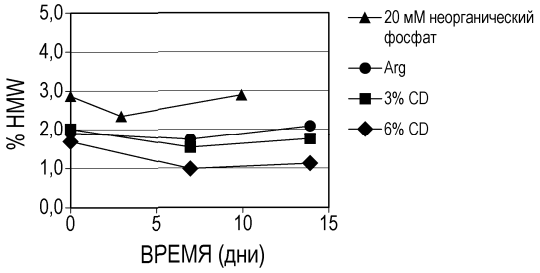
71. Лиофилизированная композиция по п.68, отличающаяся тем, что ADC бензодиазепина в водной композиции, подлежащей лиофилизации, представляет собой моноклональное антитело, конъюгированное с димером пирролобензодиазепина, представляющее собой следующее соединение:



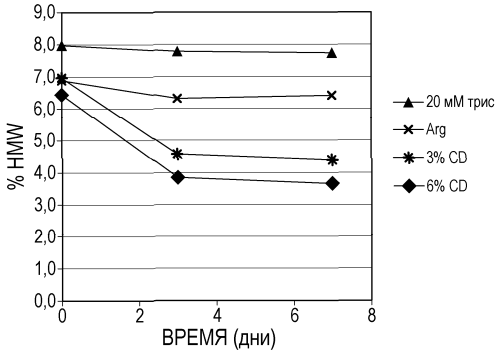
или его фармацевтически приемлемую соль; где Ab представляет собой моноклональное антитело и p представляет собой среднее число молекул соединения лекарственное средство-линкер на антитело в композиции и составляет приблизительно 2, при этом данное моноклональное антитело специфично связывается с антигеном раковой клетки, который экспрессируется на поверхности раковой клетки, и с внеклеточным доменом CD19 человека, CD33 человека или CD70 человека.



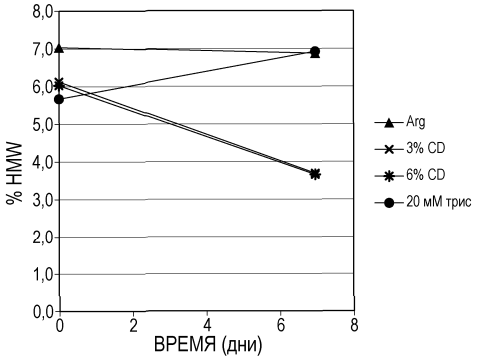
Фиг. 1



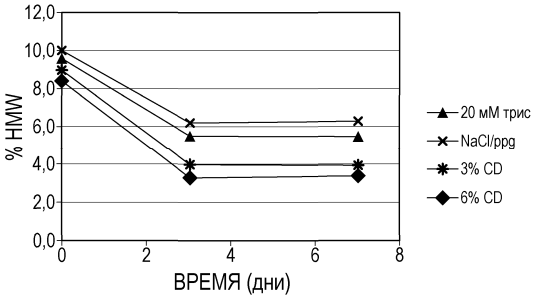
Фиг. 2



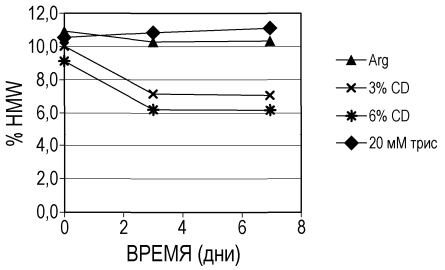
Фиг. 3



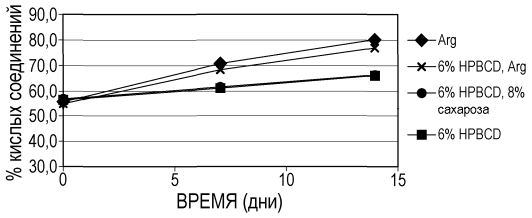
Фиг. 4



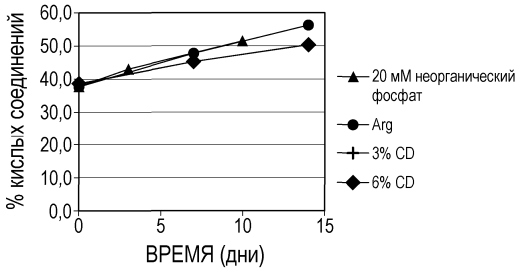
Фиг. 5



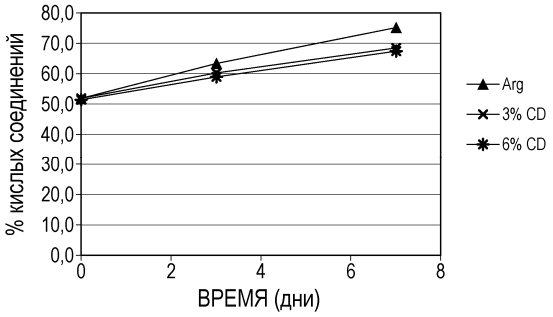
Фиг. 6



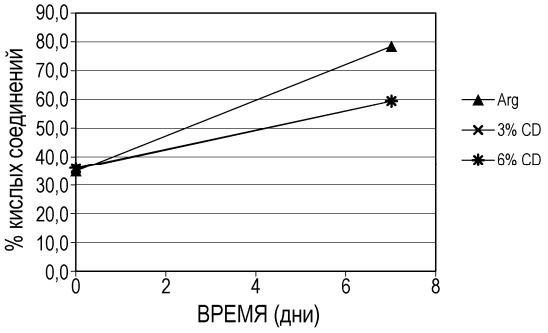
Фиг. 7



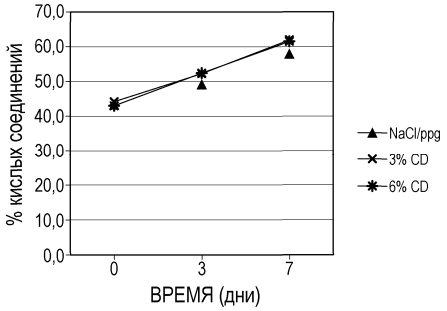
Фиг. 8



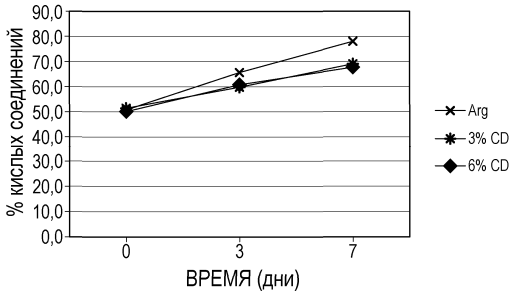
Фиг. 9



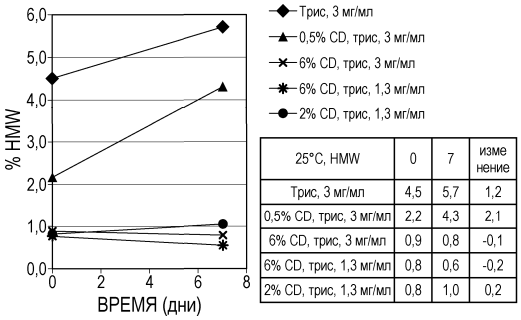
Фиг. 10



Фиг. 11

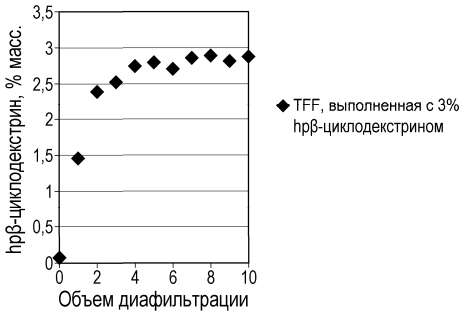


Фиг. 12

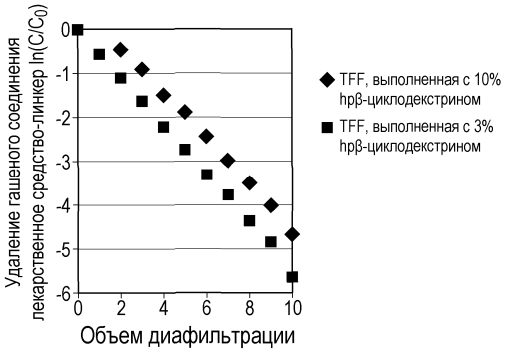


25°C, HMW	0	7	изме нение
Трис, 3 мг/мл	4,5	5,7	1,2
0,5% CD, трис, 3 мг/мл	2,2	4,3	2,1
6% CD, трис, 3 мг/мл	0,9	0,8	-0,1
6% CD, трис, 1,3 мг/мл	0,8	0,6	-0,2
2% CD, трис, 1,3 мг/мл	0,8	1,0	0,2

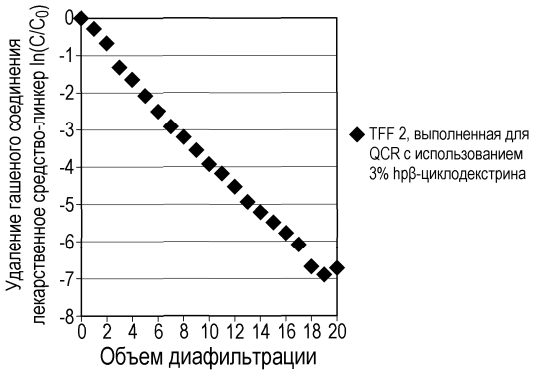
Фиг. 13



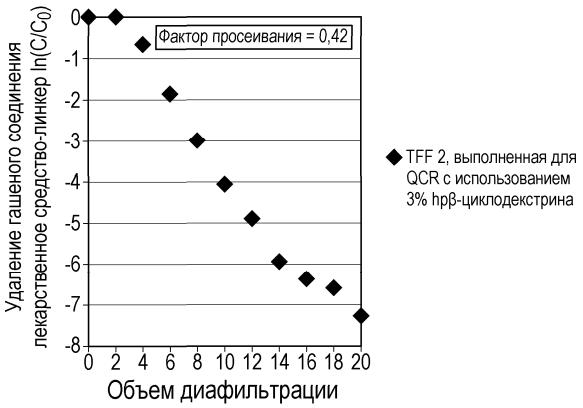
Фиг. 14



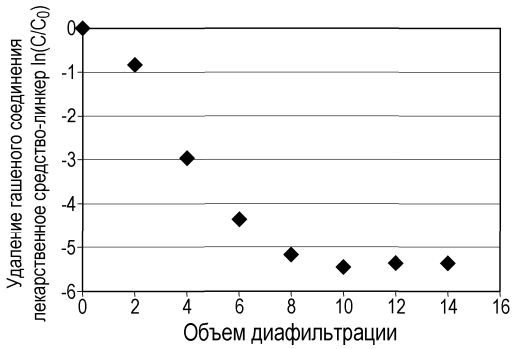
Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18