

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390495 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.08.14

(22) Дата подачи заявки
2021.09.30

(51) Int. Cl. *C07K 16/30* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(54) **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛА И ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА, И ПРИМЕНЕНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ**

(31) 202011061863.1; 202111069020.0

(32) 2020.09.30; 2021.09.13

(33) CN

(86) PCT/CN2021/122031

(87) WO 2022/068914 2022.04.07

(71) Заявитель:

ЦЗЯНСУ ХЭНЖУЙ
ФАРМАСЬЮТИКАЛС КО.,
ЛТД.; ШАНХАЙ ХЭНЖУЙ
ФАРМАСЬЮТИКАЛ КО., ЛТД. (CN)

(72) Изобретатель:

Ван Чживань, У Тинтин, Лю Сюнь
(CN)

(74) Представитель:

Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.,
Алексеев В.В., Галухина Д.В. (RU)

(57) Предложены фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антитела и лекарственного средства, и применение фармацевтической композиции. В частности, предложена фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антитела к кладину и лекарственного средства.

A1

202390495

202390495

A1

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ КОНЬЮГАТ АНТИТЕЛА И ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА, И ПРИМЕНЕНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ КОМПОЗИЦИИ

Настоящая заявка испрашивает приоритет по заявке на патент Китая (202011061863.1), поданной 30 сентября 2020 года, и заявке на патент Китая (CN202111069020.0), поданной 13 сентября 2021 года.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к области фармацевтических композиций и, в частности, относится к фармацевтической композиции, содержащей конъюгат антитела и лекарственного средства, и ее применению в качестве противоракового лекарственного препарата.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Изложенное в данном документе представляет собой лишь общую информацию, относящуюся к настоящему изобретению, и необязательно может представлять собой известный уровень техники.

Клаудин-18 (CLDN18), белок, кодируемый геном клаудин 18 у человека, принадлежит к семейству белков с плотным клеточным соединением и может контролировать прохождение молекул между клетками слоя. Белок клаудин содержит четыре трансмембранные области и две внеклеточные петли в своей структуре, причем его N-конец и C-конец находятся в цитоплазме.

Существует два сплайс-варианта клаудина-18, клаудин 18.1 и клаудин 18.2, которые отличаются по последовательности восьмью аминокислотами в первых внеклеточных петлях. Клаудин 18.1 и клаудин 18.2 отличаются по распределению экспрессии. Клаудин 18.1 селективно экспрессируется в нормальных клетках легких, в то время как экспрессия клаудина 18.2 сильно ограничена в нормальных клетках, но он часто эктопически активируется и сверхэкспрессируется при различных опухолях (например, раке желудка, раке легкого, раке поджелудочной железы и т.д.). Клаудин 18.2 считается потенциальной терапевтической мишенью при раке желудка и других видах рака, и обнаружение мишени

также обеспечивает новый вариант лечения рака желудка.

Конъюгат антитела и лекарственного средства (ADC) связывает моноклональное антитело или фрагмент антитела с биологически активным цитотоксином через стабильное химическое линкерное соединение, полностью используя специфичность связывания антитела с поверхностными антигенами нормальных клеток и опухолевых клеток и высокую эффективность цитотоксина, а также устраняя недостаток первого, связанный с тем, что оно имеет плохой терапевтический эффект, и недостаток последнего, связанный с тем, что он имеет серьезные токсические побочные эффекты, и т. п. Это означает, что конъюгат антитела и лекарственного средства может более точно связываться с опухолевыми клетками и оказывать сниженное влияние на нормальные клетки по сравнению с обычными химиотерапевтическими лекарственными средствами, используемыми ранее.

В настоящее время некоторые антитела, нацеленные на клаудин 18.2, и лекарственные средства ADC описаны в патентах, таких как WO2016166122 и WO2016165762.

ADC имеют более сложные гетероструктуры, чем антитела, и, следовательно, для ADC-коомпозиций для терапевтических целей была поставлена более сложная задача.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей конъюгат антитела к клаудину 18.2 и лекарственного средства, и ее применению. Преимущество указанной композиции заключается в том, что она обладает хорошей стабильностью, хорошей морфологией лиофилизации и т. д.

В настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антитела к клаудину 18.2 и лекарственного средства и буфер, где антитело к клаудину 18.2 в конъюгате антитела к клаудину 18.2 и лекарственного средства содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

i) переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, идентичные соответствующим последовательностям переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 5, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие

аминокислотные последовательности, идентичные соответствующим последовательностям вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 6; или

ii) вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, идентичные соответствующим последовательностям вариабельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 3, и вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, идентичные соответствующим последовательностям вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 4;

буфер представляет собой буфер на основе соли гистидина.

В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного буфер представляет собой гистидин-ацетатный буфер.

В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного антитело к клаудину 18.2 содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где:

iii) вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17, соответственно, и вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, соответственно; или

iv) вариабельная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, соответственно, и вариабельная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного антитело к клаудину 18.2 представляет собой мышинное антитело, химерное антитело или гуманизированное антитело.

В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного антитело к клаудину 18.2 содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где содержатся такие вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи, где:

(1) вариабельная область тяжелой цепи имеет аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 или имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с ней, и переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4 или имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с ней;

(2) переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24 или имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с ней, и переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21 или имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с ней;

(3) переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5 или имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с ней, и переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6 или имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с ней; или

(4) переменная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31 или имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с ней, и переменная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28 или имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с ней.

В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного антитело к клаудину 18.2 представляет собой гуманизованное антитело, содержащее каркасную область, полученную из антитела человека, или ее вариант каркасной области, и вариант каркасной области имеет обратные мутации у вплоть до 10 аминокислот в каркасной области легкой цепи и/или каркасной области тяжелой цепи антитела человека.

В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного вариант каркасной области содержит мутации,

выбранные из (a) или (b):

(a) одна или более обратных мутаций аминокислот необязательно выбраны из группы, состоящей из 22S, 85I и 87H, содержащихся в вариательной области легкой цепи; и/или одна или более обратных мутаций аминокислот необязательно выбраны из группы, состоящей из 48I, 82T и 69M, содержащихся в вариательной области тяжелой цепи; или

(b) одна или более обратных мутаций аминокислот необязательно выбраны из группы, состоящей из 4L и 22S, содержащихся в вариательной области легкой цепи; и/или одна или более обратных мутаций аминокислот необязательно выбраны из группы, состоящей из 38K, 40R, 48I, 66K, 67A, 69L, 71L и 73K, содержащихся в вариательной области тяжелой цепи.

В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного вариант каркасной области содержит мутации, выбранные из:

(a-1) обратных мутаций аминокислот 22S, 85I и 87H, содержащихся в вариательной области легкой цепи, и обратных мутаций аминокислот 48I и 82T, содержащихся в вариательной области тяжелой цепи; или

(b-1) обратной мутации аминокислоты, выбранной из 4L, содержащейся в вариательной области легкой цепи;

где 82 в 82T вариательной области тяжелой цепи обозначает положение 82A согласно схеме Кабата.

В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного антитело к клаудину 18.2 содержит вариательную область тяжелой цепи и вариательную область легкой цепи, как показано в любом из следующих:

(vii) вариательная область тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 3; и вариательная область легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 4;

(viii) вариательная область тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 24, 25, 26 или 27, и вариательная область легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 21, 22 или 23;

(ix) вариательная область тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 5; и вариательная область легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 6; или

(x) вариательная область тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 31, 32, 33 или 34, и вариательная область легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 28, 29 или 30.

В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного антитело к клаудину 18.2 содержит вариательную область тяжелой цепи и вариательную область легкой цепи, как показано в любом из

следующих:

(xi) вариабельная область тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 31; и вариабельная область легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 29; или

(xii) вариабельная область тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 26; и вариабельная область легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 23.

В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного антитело к клаудину 18.2 содержит константную область тяжелой цепи антитела и константную область легкой цепи антитела.

В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи выбрана из группы, состоящей из константных областей IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека и их обычных вариантов, и константная область легкой цепи выбрана из группы, состоящей из константных областей κ - и λ -цепи антитела человека и их обычных вариантов. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи, представленную в SEQ ID NO: 7, и константную область легкой цепи, представленную в SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит: тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с тяжелой цепью, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35 или 42, и легкую цепь, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с легкой цепью, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36 или 39; или тяжелую цепь, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 100% идентичность с тяжелой цепью, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37 или 49, и легкую цепь, имеющую по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичность с легкой цепью, имеющей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38 или 46.

В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного антитело к клаудину 18.2 содержит тяжелую цепь и легкую цепь, как показано в любом из следующих:

(c) тяжелая цепь, имеющая последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35, и легкая цепь, имеющая последовательность, представленную в SEQ ID NO: 36;

(d) тяжелая цепь, имеющая последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, 43, 44 или 45, и легкая цепь, имеющая последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39, 40 или 41;

(e) тяжелая цепь, имеющая последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37, и легкая цепь, имеющая последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38; или

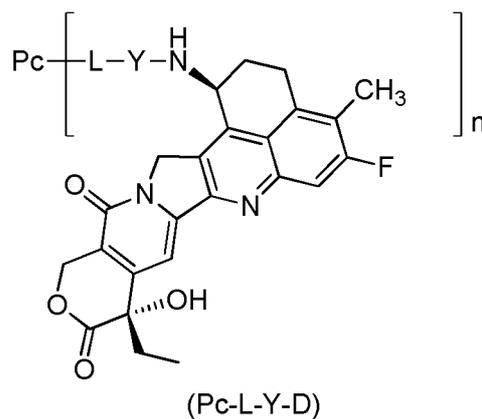
(f) тяжелая цепь, имеющая последовательность, представленную в SEQ ID NO: 49, 50, 51 или 52, и легкая цепь, имеющая последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46, 47 или 48.

В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного антитело к клаудину 18.2 содержит тяжелую цепь и легкую цепь, как показано в любом из следующих:

тяжелая цепь, представленная в SEQ ID NO: 44, и легкая цепь, представленная в SEQ ID NO: 41; или

тяжелая цепь, представленная в SEQ ID NO: 49, и легкая цепь, представленная в SEQ ID NO: 47.

В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного конъюгат антитела к клаудину 18.2 и лекарственного средства имеет структуру общей формулы (Pc-L-Y-D):



где:

Y выбран из группы, состоящей из $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$, $-O-CR^1R^2-(CR^aR^b)_m-$, $-O-CR^1R^2-$, $-NH-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ и $-S-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$;

R^a и R^b являются одинаковыми или различными, и каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, дейтерия, галогена, алкила, галогеналкила, дейтерированного алкила, алкокси, гидрокси, amino, циано, нитро, гидроксилалкила, циклоалкила и гетероциклила;

или R^a и R^b вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклоалкил или гетероциклил;

R^1 выбран из группы, состоящей из галогена, галогеналкила, дейтерированного алкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксиалкила, гетероциклила, арила и гетероарила;

R^2 выбран из группы, состоящей из водорода, галогена, галогеналкила, дейтерированного алкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксиалкила, гетероциклила, арила и гетероарила;

или R^1 и R^2 вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклоалкил или гетероциклил;

или R^a и R^2 вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклоалкил или гетероциклил;

m представляет собой целое число от 0 до 4;

n представляет собой десятичное или целое число от 1 до 10;

L представляет собой линкерное звено;

Pc представляет собой антители к клаудину 18.2.

В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного n представляет собой десятичное число или целое число и может составлять от 2 до 8, от 3 до 7, от 3,5 до 4,5, 2, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 6, 7, 8 или 9.

В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного конъюгат антителя к клаудину 18.2 и лекарственного средства имеет структуру общей формулы ($Pc-L-Y-D$),

где:

Y представляет собой $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$;

R^a и R^b являются одинаковыми или различными, и каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, дейтерия, галогена и C_{1-6} алкила;

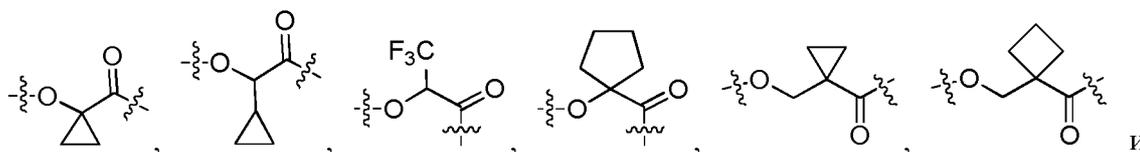
R^1 представляет собой C_{1-6} галогеналкил или C_{3-6} циклоалкил;

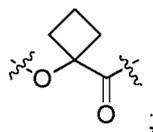
R^2 выбран из группы, состоящей из водорода, C_{1-6} галогеналкила и C_{3-6} циклоалкила;

или R^1 и R^2 вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют C_{3-6} циклоалкил;

m представляет собой 0 или 1.

В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного конъюгат антителя к клаудину 18.2 и лекарственного средства имеет структуру общей формулы ($Pc-L-Y-D$), где Y выбран из группы, состоящей из:





где O-конец Y присоединен к линкерному звену L.

В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного линкерное звено -L- представляет собой $-L^1-L^2-L^3-L^4-$;

L^1 выбран из группы, состоящей из $-(\text{сукцинимидил-3-ил-N})-\text{W}-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{NR}^3-\text{W}-\text{C}(\text{O})-$ и $-\text{C}(\text{O})-\text{W}-\text{C}(\text{O})-$, где W выбран из группы, состоящей из C_{1-8} алкила, C_{1-8} алкил-циклоалкила и линейного гетероалкила, имеющего от 1 до 8 атомов цепи, и указанный гетероалкил содержит от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из N, O и S, где каждый из указанных C_{1-8} алкила, C_{1-8} алкил-циклоалкила или линейного гетероалкила, имеющего от 1 до 8 атомов цепи, независимо необязательно дополнительно замещен одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксид, циано, амина, C_{1-6} алкила, C_{1-6} хлоралкила, дейтерированного C_{1-6} алкила, C_{1-6} алкокси и C_{3-6} циклоалкила;

L^2 выбран из группы, состоящей из $-\text{NR}^4(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{p^1}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$, $-\text{NR}^4(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{p^1}\text{CH}_2\text{C}(\text{O})-$, $-\text{S}(\text{CH}_2)_{p^1}\text{C}(\text{O})-$ и химической связи, где p^1 представляет собой целое число от 1 до 20;

L^3 представляет собой пептидный остаток, состоящий из 2-7 аминокислот, где аминокислотные остатки выбраны из группы, состоящей из аминокислотных остатков, образованных из аминокислот фенилаланина, глицина, валина, лизина, цитруллина, серина, глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты, и необязательно дополнительно замещены одним или более заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксид, циано, амина, C_{1-6} алкила, C_{1-6} хлоралкила, дейтерированного C_{1-6} алкила, C_{1-6} алкокси и C_{3-6} циклоалкила;

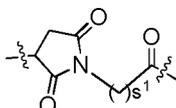
L^4 выбран из группы, состоящей из $-\text{NR}^5(\text{CR}^6\text{R}^7)_t-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5$, $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^5(\text{CH}_2)_t-$ и химической связи, где t представляет собой целое число от 1 до 6;

R^3 , R^4 и R^5 являются одинаковыми или различными, и каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, C_{1-6} алкила, C_{1-6} галогеналкила, дейтерированного C_{1-6} алкила и C_{1-6} гидроксиалкила;

R^6 и R^7 являются одинаковыми или различными, и каждый независимо выбран из

группы, состоящей из водорода, галогена, C₁₋₆ алкила, C₁₋₆ галогеналкила, дейтерированного C₁₋₆ алкила и C₁₋₆ гидроксилалкила.

В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного линкерное звено -L- представляет собой -L¹-L²-L³-L⁴-;

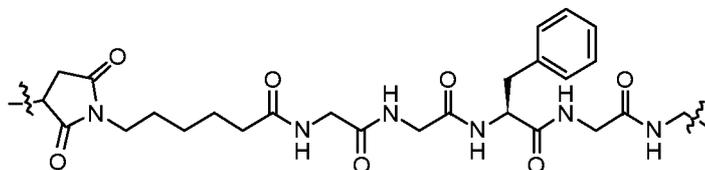
L¹ представляет собой , и s¹ представляет собой целое число от 2 до 8;
L² представляет собой химическую связь;

L³ представляет собой тетрапептидный остаток, предпочтительно тетрапептидный остаток GGFG (SEQ ID NO: 55);

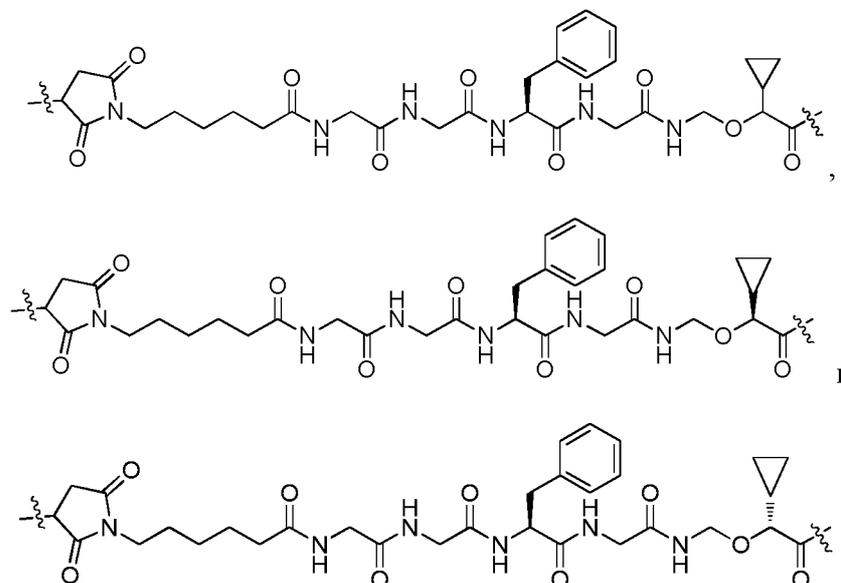
L⁴ представляет собой -NR⁵(CR⁶R⁷)t-, где R⁵, R⁶ и R⁷ являются одинаковыми или различными, и каждый независимо представляет собой водород или C₁₋₆ алкил, и t представляет собой 1 или 2;

где L¹-конец присоединен к Pс, и L⁴-конец присоединен к Y.

В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного -L- представляет собой:

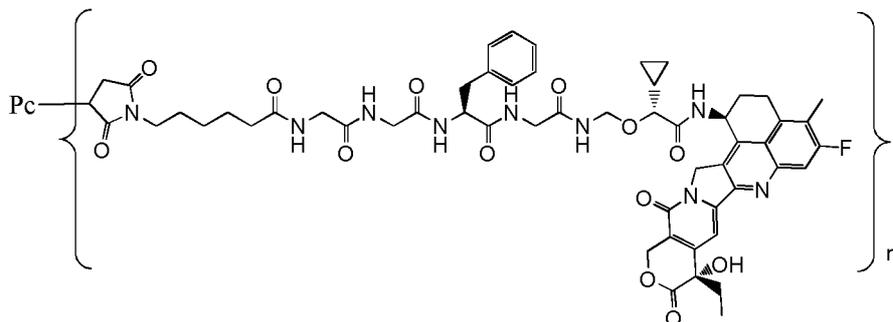
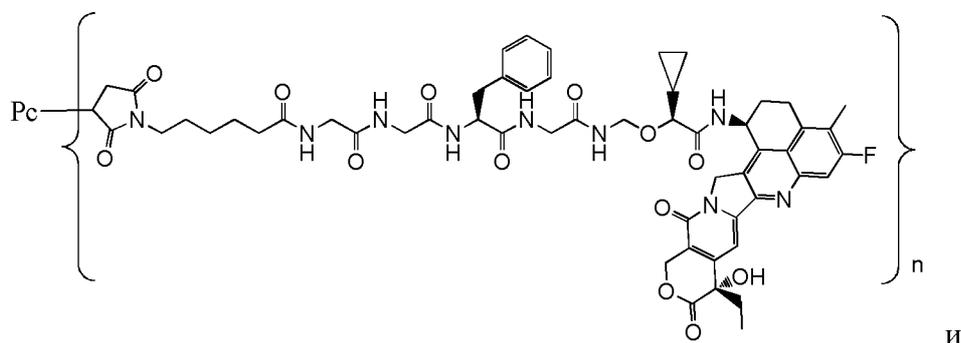
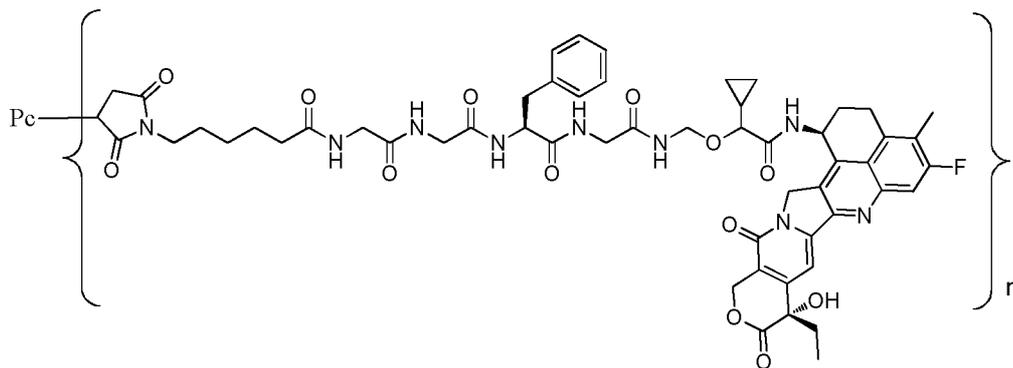


В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного L-Y- необязательно выбран из группы, состоящей из:



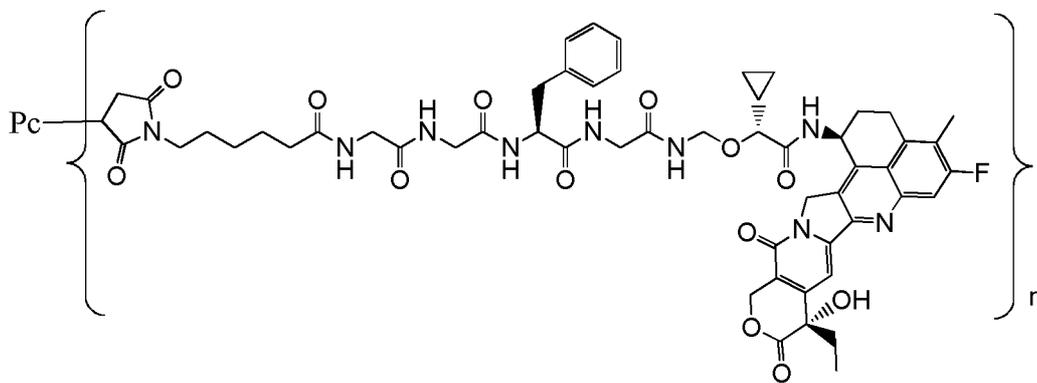
В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно

любому из вышперечисленного конъюгат антитела к клаудину 18.2 и лекарственного средства выбран из любой из следующих структур:



где Pc и n являются такими, как определено в общей формуле (Pc-L-Y-D).

В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышперечисленного конъюгат антитела к клаудину 18.2 и лекарственного средства имеет структуру формулы, представленной ниже:



где:

n представляет собой десятичное или целое число от 2 до 8;

Rc представляет собой антитело к клаудину 18.2.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция согласно любому из вышеперечисленного дополнительно содержит поверхностно-активное вещество. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество выбрано из группы, состоящей из полисорбата (такого как полисорбат 20 или полисорбат 80), полоксамера, тритона, додецилсульфоната натрия, лаурилсульфоната натрия, октилгликозида натрия, лаурилсульфобетаина, миристил-сульфобетаина, линолеил-сульфобетаина, стеарил-сульфобетаина, лаурил-саркозина, миристил-саркозина, линолеил-саркозина, стеарил-саркозина, линолеил-бетаина, миристил-бетаина, цетил-бетаина, лаурамидопропил-бетаина, кокарамидопропил-бетаина, линолеинамидопропил-бетаина, миристиламидопропил-бетаина, пальмитамидопропил-бетаина, изостеарамидопропил-бетаина, миристиламидопропил-диметиламина, пальмитамидопропил-диметиламина, изостеарамидопропил-диметиламина, метилкокоила натрия, метилолеилтаурата натрия, полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этилена и пропиленгликоля и т.п.

В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80 или полисорбат 20. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.

В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного поверхностно-активное вещество находится в концентрации от 0,05 до 0,5 мг/мл или от 0,1 до 0,2 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество находится в концентрации 0,05 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,15 мг/мл, 0,18 мг/мл, 0,19 мг/мл, 0,2 мг/мл, 0,21 мг/мл, 0,22 мг/мл, 0,3 мг/мл, 0,4 мг/мл или 0,5 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления поверхностно-активное вещество находится в концентрации 0,2 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция согласно любому из вышеперечисленного дополнительно содержит сахар. В некоторых вариантах осуществления сахар выбран из группы, состоящей из общего состава $(\text{C}_n\text{H}_{2n}\text{O})_n$ и его производных, включая моносахариды, дисахариды, трисахариды, полисахариды, сахарные спирты, восстанавливающие сахара, невосстанавливающие сахара и т.д. Сахар может быть выбран из группы, состоящей из глюкозы, сахарозы, трегалозы, лактозы, фруктозы, мальтозы, декстрана, глицерина, эритрита, глицерола, арабита, силита, сорбита, маннита,

меллибиозы, мелезитозы, раффинозы, маннотриозы, стахиозы, мальтозы, лактулозы, мальтулозы, глюцита, мальтита, лактита, изомальтулозы и т.д. В некоторых вариантах осуществления сахар выбран из группы, состоящей из сахарозы, маннита и трегалозы. В некоторых вариантах осуществления сахар представляет собой сахарозу.

В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного сахар находится в концентрации от 20 до 100 мг/мл или от 40 до 80 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления сахар находится в концентрации 20 мг/мл, 30 мг/мл, 40 мг/мл, 50 мг/мл, 60 мг/мл, 70 мг/мл, 80 мг/мл, 90 мг/мл или 100 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления сахар находится в концентрации 40 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного конъюгат антитела и лекарственного средства присутствует при концентрации белка (т.е. антитела) от 1 до 100 мг/мл или от 10 до 30 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитела и лекарственного средства присутствует при концентрации белка 5 мг/мл, 10 мг/мл, 20 мг/мл, 30 мг/мл, 40 мг/мл, 50 мг/мл, 60 мг/мл, 70 мг/мл, 80 мг/мл, 90 мг/мл или 100 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитела и лекарственного средства присутствует при концентрации белка 20 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного буфер находится в концентрации от 5 до 50 мМ или от 10 до 30 мМ. В некоторых вариантах осуществления буфер находится в концентрации 5 мМ, 10 мМ, 15 мМ, 20 мМ, 25 мМ, 30 мМ, 35 мМ, 40 мМ, 45 мМ или 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления буфер находится в концентрации 30 мМ.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция согласно любому из вышеперечисленного имеет рН от 5,0 до 6,5 или от 5,0 до 5,5. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция имеет рН 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 или 6,5. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция имеет рН от 5 до 5,4. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция имеет рН от 5,0 до 5,3.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция согласно любому из вышеперечисленного включает следующие компоненты:

(а) конъюгат антитела к кладину 18.2 и лекарственного средства при концентрации белка от 10 до 30 мг/мл, (b) от 0,1 до 0,2 мг/мл полисорбата, (c) от 40 до 80 мг/мл сахара и (d) от 10 до 30 мМ буфера на основе соли гистидина; причем фармацевтическая композиция имеет рН около 5,0-5,5.

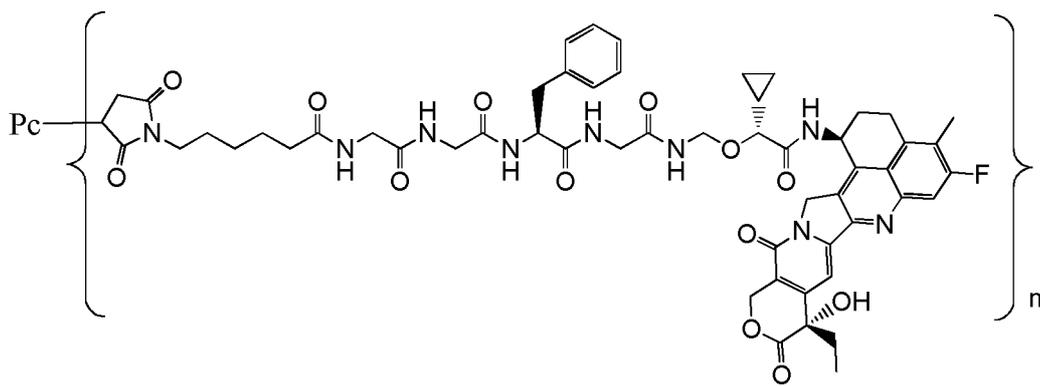
В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция согласно любому из вышеперечисленного включает следующие компоненты:

(a) конъюгат антитела к клаудину 18.2 и лекарственного средства при концентрации белка от 10 до 30 мг/мл, (b) от 0,1 до 0,2 мг/мл полисорбата 80, (c) от 40 до 80 мг/мл сахарозы и (d) от 10 до 30 мМ буфера на основе соли гистидина; причем фармацевтическая композиция имеет рН около 5,0-5,5.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция согласно любому из вышеперечисленного включает следующие компоненты:

(a) конъюгат антитела к клаудину 18.2 или лекарственного средства при концентрации белка 20 мг/мл, (b) 0,2 мг/мл полисорбата 80, (c) 40 мг/мл сахарозы и (d) 30 мМ гистидин-ацетатного буфера; причем фармацевтическая композиция имеет рН от 5,0 до 5,3.

В некоторых вариантах осуществления в фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного конъюгат антитела к клаудину 18.2 и лекарственного средства имеет структуру формулы, представленной ниже:



где:

n представляет собой десятичное или целое число от 2 до 8;

Pc представляет собой антитело к клаудину 18.2, содержащее тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 49, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 47; причем фармацевтическая композиция содержит конъюгат антитела и лекарственного средства при концентрации белка 20 мг/мл;

фармацевтическая композиция дополнительно содержит следующие компоненты:

0,2 мг/мл полисорбата 80, 40 мг/мл сахарозы и 30 мМ гистидин-ацетатного буфера; причем фармацевтическая композиция имеет рН от 5,0 до 5,3.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция согласно любому из вышеперечисленного представляет собой жидкую композицию. В некоторых вариантах осуществления жидкая композиция содержит воду в качестве растворителя.

В настоящем описании также предложен лиофилизированный препарат,

содержащий конъюгат антитела и лекарственного средства, где препарат может быть восстановлен с образованием фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного.

В настоящем изобретении также предложен лиофилизированный препарат, который представляет собой лиофилизированную форму фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного.

В настоящем изобретении также предложен способ получения лиофилизированного препарата, содержащего конъюгат антитела и лекарственного средства, включающий стадию лиофилизации фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного.

В настоящем изобретении также предложен лиофилизированный препарат, содержащий конъюгат антитела и лекарственного средства, полученный путем лиофилизации фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного.

В некоторых вариантах осуществления лиофилизация согласно любому из вышеперечисленного включает последовательные стадии предварительного замораживания, первичной сушки и вторичной сушки.

В некоторых вариантах осуществления процедура лиофилизации является следующей: предварительное замораживание при температуре 5 °С; предварительное замораживание при температуре минус 45 °С; первичная сушка при температуре минус 20 °С при уровне вакуума 20 Па и вторичная сушка при температуре 25 °С при уровне вакуума 1 Па. В некоторых вариантах осуществления процедура лиофилизации является следующей: предварительное замораживание при температуре 5 °С в течение периода 10 мин; предварительное замораживание при температуре минус 45 °С в течение периода 50 мин; первичная сушка при температуре минус 20 °С при уровне вакуума 20 Па в течение периода 120 мин и вторичная сушка при температуре 25 °С при уровне вакуума 1 Па в течение периода 60 мин.

В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный препарат является стабильным при 2-8 °С в течение по меньшей мере 3 месяцев, по меньшей мере 6 месяцев, по меньшей мере 12 месяцев, по меньшей мере 18 месяцев или по меньшей мере 24 месяцев. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный препарат является стабильным при 40 °С в течение по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 14 дней или по меньшей мере 28 дней.

В настоящем изобретении также предложен лиофилизированный препарат, который представляет собой восстановленную форму лиофилизированного препарата согласно любому из вышеперечисленного.

В настоящем изобретении также предложен восстановленный раствор, содержащий конъюгат антитела и лекарственного средства, полученный путем восстановления лиофилизированного препарата согласно любому из вышеперечисленного.

В некоторых вариантах осуществления восстановленный раствор, описанный выше, содержит следующие компоненты:

(a) конъюгат антитела к клаудину 18.2 и лекарственного средства при концентрации белка от 10 до 30 мг/мл, (b) от 0,1 до 0,2 мг/мл полисорбата, (c) от 40 до 80 мг/мл сахара и (d) от 10 до 30 мМ буфера на основе соли гистидина; причем восстановленный раствор имеет pH около 5,0-5,5.

В некоторых вариантах осуществления восстановленный раствор, описанный выше, содержит следующие компоненты:

(a) конъюгат антитела к клаудину 18.2 и лекарственного средства при концентрации белка от 10 до 30 мг/мл, (b) от 0,1 до 0,2 мг/мл полисорбата 80, (c) от 40 до 80 мг/мл сахарозы и (d) от 10 до 30 мМ буфера на основе соли гистидина; причем восстановленный раствор имеет pH около 5,0-5,5.

В некоторых вариантах осуществления восстановленный раствор, описанный выше, содержит следующие компоненты:

(a) конъюгат антитела к клаудину 18.2 и лекарственного средства при концентрации белка 20 мг/мл, (b) 0,2 мг/мл полисорбата 80, (c) 40 мг/мл сахарозы и (d) 30 мМ гистидин-ацетатного буфера; причем восстановленный раствор имеет pH от 5,0 до 5,3.

Настоящее изобретение также относится к изделию, содержащему контейнер, содержащий фармацевтическую композицию согласно любому из вышеперечисленного, лиофилизированный препарат согласно любому из вышеперечисленного или восстановленный раствор согласно любому из вышеперечисленного.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения опухоли или рака, включающему введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного, лиофилизированного препарата согласно любому из вышеперечисленного, восстановленного раствора согласно любому из вышеперечисленного или изделия согласно любому из вышеперечисленного.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к применению фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного, лиофилизированного препарата согласно любому из вышеперечисленного, восстановленного раствора согласно любому из вышеперечисленного или изделия согласно любому из вышеперечисленного в получении лекарственного препарата для лечения опухоли или рака.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции согласно любому из вышеперечисленного, лиофилизированному препарату согласно любому из вышеперечисленного, восстановленному раствору согласно любому из вышеперечисленного или изделию согласно любому из вышеперечисленного для применения в качестве лекарственного препарата.

В некоторых вариантах осуществления опухоль или рак предпочтительно представляют собой плоскоклеточную карциному головы и шеи, рак головы и шеи, рак головного мозга, нейроглиому, мультиформную глиобластому, нейробластому, карциному центральной нервной системы, нейроэндокринную опухоль, рак горла, рак носоглотки, рак пищевода, рак щитовидной железы, злокачественную плевральную мезотелиому, рак легкого, рак молочной железы, рак печени, гепатому, гепатоцеллюлярную карциному, гепатобилиарный рак, рак поджелудочной железы, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, рак кишечника, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак почки, светлоклеточную почечно-клеточную карциному, рак яичников, рак эндометрия, рак шейки матки, рак мочевого пузыря, рак предстательной железы, рак яичка, рак кожи, меланому, лейкоз, лимфому, рак кости, хондросаркому, миелому, множественную миелому, миелодиспластический синдром, опухоль Крукенберга, миелопролиферативную опухоль, плоскоклеточную карциному, саркому Юинга, системный амилоидоз легких цепей и карциному из клеток Меркеля.

В некоторых вариантах осуществления лимфома выбрана из группы, состоящей из ходжкинской лимфомы, неходжкинской лимфомы, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, В-крупноклеточной лимфомы, богатой Т-клетками/гистиоцитами, и лимфоплазмоцитарной лимфомы.

В некоторых вариантах осуществления рак легкого выбран из группы, состоящей из немелкоклеточного рака легкого и мелкоклеточного рака легкого.

В некоторых вариантах осуществления лейкоз выбран из группы, состоящей из хронического миелоидного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, лимфоцитарного лейкоза, лимфобластного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза и миелоидно-клеточного лейкоза.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 показаны результаты анализа FACS (метод анализа сортировки клеток с

активированной флуоресценцией) связывания гуманизированных антител с клаудином 18.2 человека на клеточном уровне.

На Фиг. 2 показан эндоцитоз гуманизированных антител клетками NUGC4.

На Фиг. 3А-3С показаны анализы для эффектов ADCC (антителозависимая клеточная цитотоксичность) антител в клетках NUGC4, экспрессирующих клаудин 18.2 на различных уровнях. На Фиг. 3А показаны анализы для эффектов ADCC антител в клетках NUGC4 дикого типа (экспрессирующих клаудин 18.2 при низких уровнях); на Фиг. 3В показаны анализы для эффектов ADCC антител в клетках NUGC4, экспрессирующих клаудин 18.2 при умеренных уровнях; на Фиг. 3С показаны анализы для эффектов ADCC антител в клетках NUGC4, экспрессирующих клаудин 18.2 при высоких уровнях.

На Фиг. 4 показаны результаты ингибирования опухолей с помощью ADC-1 по настоящему изобретению.

На Фиг. 5 показаны результаты ингибирования опухолей с помощью ADC-2 по настоящему изобретению.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Терминология

Чтобы облегчить понимание настоящего изобретения, некоторые технические и научные термины конкретно определены ниже. Если иное четко не указано в данном документе, все другие технические и научные термины, используемые в данном описании, имеют значения, обычно понятные специалистам в области техники, к которой относится настоящее изобретение.

«Конъюгат антитела и лекарственного средства (ADC)» получали путем соединения антитела или фрагмента антитела с цитотоксином с биологической активностью или низкомолекулярным лекарственным средством с активностью уничтожения клеток посредством стабильного химического линкерного соединения, в этом случае полностью реализуют специфичность связывания антитела с антигенами, специфичными для опухолевых клеток, или высокоэкспрессируемыми антигенами и высокая эффективность цитотоксина, и избегают токсических побочных эффектов в отношении нормальных клеток. Конъюгат антитела и лекарственного средства может точно связываться с опухолевыми клетками и оказывать сниженное влияние на

нормальные клетки по сравнению с обычными химиотерапевтическими лекарственными средствами, используемыми ранее.

«Буфер» относится к буферу, который противостоит изменениям pH за счет действия своих кислотно-основных сопряженных компонентов. Примеры буферов, которые контролируют pH в соответствующем диапазоне, включают ацетат, сукцинат, глюконат, соль гистидина, оксалат, лактат, фосфат, цитрат, тартрат, fumarат, глицилглицин и другие органические кислотные буферы.

«Буфер на основе соли гистидина» представляет собой буфер, содержащий ионы гистидина. Примеры буферов на основе соли гистидина включают буферы, такие как гистидин-гидрохлорид, гистидин-ацетат, гистидин-фосфат и гистидин-сульфат; предпочтительным является гистидин-ацетатный буфер. Гистидин-ацетатный буфер получали из гистидина и уксусной кислоты, а гистидин-гидрохлоридный буфер получали из гистидина и соляной кислоты.

«Цитратный буфер» представляет собой буфер, содержащий цитратные ионы. Примеры цитратных буферов включают лимонную кислоту-цитрат натрия, лимонную кислоту-цитрат калия, лимонную кислоту-цитрат кальция, лимонную кислоту-цитрат магния и т.п. Предпочтительный цитратный буфер представляет собой лимонную кислоту-цитрат натрия.

«Сукцинатный буфер» представляет собой буфер, содержащий сукцинатные ионы. Примеры сукцинатных буферов включают янтарную кислоту-сукцинат натрия, янтарную кислоту-сукцинат калия, янтарную кислоту-сукцинат кальция и т.п. Предпочтительным сукцинатным буфером является янтарная кислота-сукцинат натрия. В качестве примера, янтарная кислота-сукцинат натрия может быть получен из янтарной кислоты и гидроксида натрия или из янтарной кислоты и сукцината натрия.

«Фосфатный буфер» представляет собой буфер, содержащий фосфатные ионы. Примеры фосфатных буферов включают гидрофосфат динатрия-дигидрофосфат натрия, гидрофосфат динатрия-дигидрофосфат калия, гидрофосфат динатрия-лимонная кислота и т.п. Предпочтительным фосфатным буфером является гидрофосфат динатрия-дигидрофосфат натрия.

«Ацетатный буфер» представляет собой буфер, содержащий ацетатные ионы. Примеры ацетатных буферов включают уксусную кислоту-ацетат натрия, уксусную

кислоту-соль гистидина, уксусную кислоту-ацетат калия, уксусную кислоту-ацетат кальция, уксусную кислоту-ацетат магния и т.п. Предпочтительным ацетатным буфером является уксусная кислота-ацетат натрия.

«Фармацевтическая композиция» относится к смеси, содержащей один или более конъюгатов антитела и лекарственного средства, описанных в данном документе, или их физиологически/фармацевтически приемлемые соли или пролекарства и другие химические компоненты, и указанные другие компоненты представляют собой, например, физиологически/фармацевтически приемлемые носители и эксципиенты. Назначением фармацевтической композиции является поддержание стабильности активного ингредиента антитела и содействие введению в организм, что облегчает абсорбцию активного ингредиента, проявляя таким образом свою биологическую активность.

Используемые здесь термины «фармацевтическая композиция» и «состав» не исключают друг друга.

Если не указано иное, растворителем в фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, в форме раствора является вода.

«Лиофилизированный препарат» относится к составу или фармацевтической композиции, полученной путем лиофилизации фармацевтической композиции или состава в форме жидкости или раствора в вакууме.

Хотя в настоящем описании представлены диапазоны или значения содержания, специалистам в данной области техники будет понятно, что диапазоны или значения содержания охватывают приемлемые диапазоны погрешностей для конкретных определенных значений.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может достигать стабильного эффекта: фармацевтическая композиция, в которой конъюгат антитела и лекарственного средства по существу сохраняет свою физическую и/или химическую стабильность и/или биологическую активность после хранения; предпочтительно фармацевтическая композиция по существу сохраняет свою физическую и химическую стабильность, а также свою биологическую активность после хранения. Период хранения, как правило, выбирали на основании заранее определенного срока годности фармацевтической композиции. В настоящее время существует множество аналитических методик, доступных для измерения стабильности белка, и стабильность после хранения в

течение выбранного периода времени при выбранной температуре может быть измерена.

Стабильная композиция представляет собой композицию, в которой не наблюдается значительных изменений при следующих условиях: хранение при температуре охлаждения (2-8 °C) в течение по меньшей мере 3 месяцев, предпочтительно 6 месяцев, более предпочтительно 1 года и еще более предпочтительно до 2 лет. Кроме того, стабильные жидкие композиции включают жидкие композиции, которые проявляют желаемые признаки после хранения при температурах, включающих 25 °C, в течение периодов, включающих 1 месяц, 3 месяца и 6 месяцев. Типичными примерами стабильности являются следующие: как правило, не более чем около 10 %, предпочтительно не более чем около 5 % мономеров антител агрегируют или разлагаются, как измерено с помощью SEC-HPLC (эксклюзионная высокоэффективная жидкостная хроматография). Композиция представляет собой бледно-желтую, почти бесцветную и прозрачную жидкость, или бесцветную, или от прозрачной до слегка опалесцирующей при визуальном анализе. Концентрация, pH и осмоляльность композиции изменяются не более чем на ± 10 %. Как правило, наблюдается не более чем около 10 %, предпочтительно не более чем около 5 % снижения. Как правило, образуется не более чем около 10 %, предпочтительно не более чем около 5 % агрегации.

Конъюгат антитела и лекарственного средства «сохраняет свою физическую стабильность» в фармацевтической композиции, если он не демонстрирует значительного усиления агрегации, осаждения и/или денатурации при визуальном осмотре цвета и/или прозрачности или при измерении с помощью УФ (ультрафиолетовый)-рассеяния света, эксклюзионной хроматографии (SEC) и динамического рассеяния света (DLS). Изменения конформации белка могут быть оценены с помощью флуоресцентной спектроскопии (которая определяет третичную структуру белка) и спектроскопии FTIR (инфракрасная спектроскопия на основе преобразования Фурье) (которая определяет вторичную структуру белка).

Конъюгат антитела и лекарственного средства «сохраняет свою химическую стабильность» в фармацевтической композиции, если он не демонстрирует существенных химических изменений. Химическая стабильность может быть оценена путем обнаружения и количественного определения химически измененных форм белка. Процессы деградации, которые часто изменяют химическую структуру белков, включают

гидролиз или клипирование (оценивается с помощью таких методов, как эксклюзионная хроматография и CE-SDS (капиллярный электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия)), окисление (оценивается с помощью таких методов, как пептидное картирование в сочетании с масс-спектроскопией или MALDI/TOF/MS (временнoлетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией), дезамидирование (оценивается с помощью таких методов, как ионообменная хроматография, капиллярная изоэлектрическая фокусировка, пептидное картирование и измерение изоаспарагиновой кислоты) и изомеризацию (оценивается путем измерения содержания изоаспарагиновой кислоты, пептидного картирования и т. д.).

Конъюгат антитела и лекарственного средства «сохраняет свою биологическую активность» в фармацевтической композиции, если биологическая активность конъюгата антитела и лекарственного средства в данный момент времени находится в пределах заданного диапазона биологической активности, проявленной во время получения фармацевтической композиции.

Трехбуквенные и однобуквенные коды аминокислот, используемые в данном документе, описаны в *J. Biol. Chem.*, 243, p3558 (1968).

Термин «антитело» в настоящем документе используется в самом широком смысле и охватывает различные структуры антител, включая, но не ограничиваясь, моноклональные антитела, поликлональные антитела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), полноразмерные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты (также известные как антигенсвязывающие части), при условии, что они проявляют желаемую антигенсвязывающую активность. Полноразмерное антитело представляет собой иммуноглобулин (Ig), который содержит по меньшей мере две тяжелые цепи и две легкие цепи, связанные между собой дисульфидными связями. Константные области тяжелой цепи иммуноглобулинов отличаются по своему аминокислотному составу и расположению, и, таким образом, по своей антигенности. Соответственно, иммуноглобулины можно разделить на пять классов, иначе называемых изотипами иммуноглобулинов, а именно IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, при этом их соответствующие тяжелые цепи представляют собой μ -цепь, δ -цепь, γ -цепь, α -цепь и ϵ -цепь, соответственно. Ig одного класса может быть разделен на различные подклассы в зависимости от различий в аминокислотном составе шарнирных областей и

количества и положения дисульфидных связей тяжелых цепей; например, IgG может быть разделен на IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Легкие цепи классифицируются на κ - или λ -цепи по различиям в константных областях. Каждый из пяти классов Ig может иметь κ -цепь или λ -цепь.

В тяжелых и легких цепях полноразмерного антитела последовательности около 110 аминокислот вблизи N-конца значительно варьируются и, таким образом, называются переменными областями (сокращенно Fv-области); остальные аминокислотные последовательности вблизи C-конца являются относительно стабильными и, таким образом, называются константными областями. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно VH) и константной области тяжелой цепи (сокращенно CH). Константная область тяжелой цепи содержит три области (домена), т. е. CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно VL) и константной области легкой цепи (сокращенно CL). Переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи содержат гиперпеременные области (также называемые областями, определяющими комплементарность, сокращенно CDR или HVR) и каркасные области (сокращенно FR), последовательности которых относительно консервативны. Каждая VL и VH состоит из 3 CDR и 4 FR, расположенных от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Три области CDR легкой цепи обозначаются как LCDR1, LCDR2 и LCDR3, три области CDR тяжелой цепи обозначаются как HCDR1, HCDR2 и HCDR3.

«Обычный вариант» константной области тяжелой цепи антитела человека и константной области легкой цепи антитела человека, описанный в данном документе, относится к варианту константной области тяжелой цепи или константной области легкой цепи человека, который был раскрыт в предшествующем уровне техники и не изменяет структуру и функцию переменной области антитела. Иллюстративные варианты включают варианты константной области тяжелой цепи IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 с сайт-специфическими модификациями и аминокислотными заменами в константной области тяжелой цепи. Конкретные замены представляют собой, например, мутацию YTE, мутацию L234A и/или L235A, или мутацию S228P, 265A (например, D265A) и/или 297A (например, N297A), и/или мутации с получением структуры «выступ-во-впадину» (так что

тяжелая цепь антитела имеет комбинацию «выступ-Fc» и «впадина-Fc»), известную в данной области техники. Было подтверждено, что эти мутации придают антителу новые свойства, но не изменяют функцию вариабельной области антитела.

Термин «антигенсвязывающий фрагмент», или «функциональный фрагмент», или «антигенсвязывающая часть» относится к одному или более фрагментам интактного антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Показано, что фрагмент полноразмерного антитела может быть использован для выполнения антигенсвязывающей функции антитела. Иллюстративно, примеры связывающего фрагмента, включенного в термин «антигенсвязывающий фрагмент», включают (i) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F(ab')₂-фрагмент, двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VH и VL одного плеча антитела; (v) dsFv, стабильный антигенсвязывающий фрагмент, образованный VH и VL через межцепочечные дисульфидные связи между ними; (vi) диатело, биспецифическое антитело и мультиспецифическое антитело, содержащее такие фрагменты, как scFv, dvs и Fab. Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, эти два домена могут быть связаны рекомбинантным способом с использованием искусственного пептидного линкера, который позволяет им формироваться в виде единой белковой цепи, где пара VL и VH образует одновалентную молекулу, называемую одноцепочечным Fv (scFv) (см., например, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci USA 85:5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также включены в термин «антигенсвязывающий фрагмент» антитела. Такие фрагменты антител получают путем общепринятых методик, известных специалистам в данной области техники, и подвергают скринингу на пригодность таким же образом, как и интактные антитела. Антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены с использованием технологии рекомбинантной ДНК или путем ферментативного или химического расщепления интактных иммуноглобулинов.

Термин «аминокислотная разница» или «аминокислотная мутация» относится к наличию аминокислотных изменений или мутаций в варианте белка или полипептида по сравнению с исходным белком или полипептидом, включая наличие 1, 2, 3 или более

аминокислотных вставок, делеций или замен в последовательности исходного белка или полипептида.

Термин «каркасная область антитела» или «FR» относится к части варибельного домена VL или VH, которая служит каркасом для антигенсвязывающих петель (CDR) варибельного домена. Это, по существу, представляет собой варибельную область без CDR.

Термин «области, определяющие комплементарность», «CDR» или «гиперварибельная область» относится к одной из 6 гиперварибельных областей в пределах варибельного домена антитела, которые в основном способствуют связыванию антигена. В целом, существует три CDR (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) в каждой варибельной области тяжелой цепи и три CDR (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) в каждой варибельной области легкой цепи. Границы аминокислотных последовательностей CDR могут быть определены с использованием любой из множества хорошо известных схем, включая схему нумерации «Кабат» (см. Kabat et al. (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 5th edition, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD), схему нумерации «Чотиа» (см. Al-Lazikani et al. (1997) JMB 273: 927–948) и схему нумерации ImMunoGenTics (IMGT) (см. Lefranc M.P., Immunologist, 7, 132–136(1999); Lefranc, M.P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 55–77(2003)) и т.п. Например, для классического формата, согласно схеме Кабата, аминокислотные остатки CDR в варибельной области тяжелой цепи (VH) пронумерованы как 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); аминокислотные остатки CDR в варибельной области легкой цепи (VL) пронумерованы как 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3). Согласно схеме Чотиа аминокислоты CDR в VH пронумерованы как 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и аминокислотные остатки в VL пронумерованы как 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 91-96 (LCDR3). Согласно определениям CDR путем объединения схемы Кабата и схемы Чотиа, CDR состоит из аминокислотных остатков 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в VH человека и аминокислотных остатков 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) в VL человека. Согласно схеме IMGT, аминокислотные остатки CDR в VH примерно пронумерованы как 26-35 (CDR1), 51-57 (CDR2) и 93-102 (CDR3), и аминокислотные остатки CDR в VL примерно пронумерованы как 27-32 (CDR1), 50-52 (CDR2) и 89-97 (CDR3). Согласно схеме IMGT,

CDR антитела могут быть определены с помощью программы IMGT/DomainGap Align. Согласно схеме AbM аминокислоты CDR в VH пронумерованы как 26-32 (HCDR1), 50-58 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и аминокислотные остатки в VL пронумерованы как 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3). Варибельная область тяжелой и варибельная область легкой цепи антитела по настоящему изобретению, а также его CDR соответствуют схеме нумерации по Кабату.

«Идентичность» аминокислотной последовательности относится к проценту идентичных аминокислотных остатков в первой последовательности и второй последовательности, когда аминокислотные последовательности выровнены (при необходимости допускается введение гэпов для достижения максимальной процентной идентичности последовательности); консервативные замены не считаются частью идентичности последовательности. С целью определения процента идентичности аминокислотных последовательностей, выравнивания могут осуществляться различными способами, которые входят в область техники, например, с использованием компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить параметры, подходящие для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания всей длины выровненных последовательностей.

Сконструированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно получить и очистить обычными методами. Например, последовательности кДНК (комплементарная ДНК), кодирующие тяжелую и легкую цепи, можно клонировать и рекомбинировать в вектор экспрессии GS. Векторы экспрессии рекомбинантного иммуноглобулина могут быть стабильно трансфицированы в клетки СНО (клетки яичника китайского хомяка). В качестве более рекомендуемых в предшествующем уровне техники системы экспрессии млекопитающих могут привести к гликозилированию антител, в частности, в высококонсервативном N-концевом сайте области Fc. Стабильные клоны получены путем экспрессии антител, связывающихся с антигеном. Положительные клоны размножали в бессывороточной среде биореактора для получения антител. Культура с секретлируемым антителом может быть очищена с использованием обычных методик. Например, очистку проводили с использованием

колонки А или G Sepharose FF, содержащей скорректированный буфер. Неспецифически связанные фракции вымывали. Связанное антитело элюировали методом градиента pH, и фрагменты антител детектировали с помощью SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) и собирали. Антитело можно фильтровать и концентрировать обычными методами. Растворимые смеси и полимеры также можно удалить обычными методами, такими как молекулярные сита и ионный обмен. Полученный продукт должен быть немедленно заморожен, например, при минус 70 °С, или лиофилизирован.

«Консервативная модификация» или «консервативная замена или замещение» относятся к замене аминокислот в белке другими аминокислотами, имеющими схожие характеристики (например, заряд, размер боковой цепи, гидрофобность/гидрофильность или конформация и жесткость каркаса), так что изменения часто могут быть сделаны без изменения биологической активности белка. Специалистам в данной области техники известно, что, как правило, замена одной аминокислоты в несущественной области полипептида существенно не изменяет биологическую активность (см., например, Watson et al. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p224, (4th edition)). Кроме того, замена аминокислот с аналогичной структурой или функцией вряд ли нарушит биологическую активность. Иллюстративные консервативные замены являются следующими:

Таблица а. Аминокислотные консервативные замены

Исходный остаток	Консервативная замена
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys; His
Asn (N)	Gln; His; Asp
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala; Val
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln

Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

Термин «голое антитело» относится к антителу, которое не конъюгировано с гетерологичным фрагментом (например, цитотоксическим фрагментом) или радиоактивной меткой. В настоящем изобретении содержание конъюгата антитела и лекарственного средства выражается в виде концентрации белка, то есть в виде массы/объема белка (части антитела) в конъюгате.

Термин «линкерное звено» или «линкер» относится к химическому структурному фрагменту или связи, который связан на одном конце с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, а на другом конце с лекарственным средством или который связан с другими линкерами до того, как он связан с лекарственным средством. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения они указаны как L и L¹-L⁴, причем L¹-конец связан с антителом, и L⁴-конец связан со структурным звеном Y, а затем с соединением или токсином. Линкер включает удлиняющее звено, спейсерное звено и аминокислотное звено и может быть синтезирован способами, известными в данной области техники, такими как описанными в US2005-0238649A1. Линкер может представлять собой «расщепляемый линкер», благоприятствующий высвобождению лекарственных средств в клетках. Например, могут быть использованы кислотолабильные линкеры (например, гидразоны), линкеры, чувствительные к протеазе (например, чувствительные к пептидазе), фотолабильные линкеры, диметильные линкеры или дисульфидсодержащие линкеры (Chari et al., Cancer Research 52: 127–131(1992); патент США № 5208020).

Термин «алкил» относится к насыщенной алифатической углеводородной группе, которая представляет собой линейную или разветвленную группу, содержащую от 1 до 20 атомов углерода, предпочтительно алкилу, содержащему от 1 до 12 атомов углерода, более предпочтительно алкилу, содержащему от 1 до 10 атомов углерода, и наиболее предпочтительно алкилу, содержащему от 1 до 6 атомов углерода. Неограничивающие примеры включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, трет-бутил, втор-бутил, н-пентил, 1,1-диметилпропил, 1,2-диметилпропил, 2,2-диметилпропил, 1-этилпропил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, н-гексил, 1-этил-2-метилпропил, 1,1,2-триметилпропил, 1,1-диметилбутил, 1,2-диметилбутил, 2,2-диметилбутил, 1,3-диметилбутил, 2-этилбутил, 2-метилпентил, 3-метилпентил, 4-метилпентил, 2,3-диметилбутил, н-гептил, 2-метилгексил, 3-метилгексил, 4-метилгексил, 5-метилгексил, 2,3-диметилпентил, 2,4-диметилпентил, 2,2-диметилпентил, 3,3-диметилпентил, 2-этилпентил, 3-этилпентил, н-октил, 2,3-диметилгексил, 2,4-диметилгексил, 2,5-диметилгексил, 2,2-диметилгексил, 3,3-диметилгексил, 4,4-диметилгексил, 2-этилгексил, 3-этилгексил, 4-этилгексил, 2-метил-2-этилпентил, 2-метил-3-этилпентил, н-нонил, 2-метил-2-этилгексил, 2-метил-3-этилгексил, 2,2-диэтилпентил, н-децил, 3,3-диэтилгексил, 2,2-диэтилгексил и их различные разветвленные изомеры и т.д. Более предпочтительно представляет собой низший алкил, который содержит от 1 до 6 атомов углерода, и неограничивающие примеры включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, изобутил, трет-бутил, втор-бутил, н-пентил, 1,1-диметилпропил, 1,2-диметилпропил, 2,2-диметилпропил, 1-этилпропил, 2-метилбутил, 3-метилбутил, н-гексил, 1-этил-2-метилпропил, 1,1,2-триметилпропил, 1,1-диметилбутил, 1,2-диметилбутил, 2,2-диметилбутил, 1,3-диметилбутил, 2-этилбутил, 2-метилпентил, 3-метилпентил, 4-метилпентил, 2,3-диметилбутил и т.п. Алкил может быть замещенным или незамещенным. При замещении заместитель может быть замещен в любом доступном месте соединения, и заместитель предпочтительно представляет собой одну или более из групп, независимо выбранных из группы, состоящей из алкила, алкенила, алкинила, алкокси, алкилтио, алкиламино, галогена, сульфгидрила, гидрокси, нитро, циано, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила, гетероарила, циклоалкокси, гетероциклоалкокси, циклоалкилтио, гетероциклоалкилтио и оксо.

Термин «гетероалкил» относится к алкилу, содержащему один или более

гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из N, O и S, где алкил является таким, как определено выше.

Термин «алкилен» относится к насыщенной линейной или разветвленной алифатической углеводородной группе, имеющей два остатка, полученных из исходного алкана путем удаления двух атомов водорода из одного и того же атома углерода или двух разных атомов углерода. Алкилен представляет собой линейную или разветвленную группу, содержащую от 1 до 20 атомов углерода, предпочтительно от 1 до 12 атомов углерода и более предпочтительно от 1 до 6 атомов углерода. Неограничивающие примеры алкилена включают, но не ограничиваются, метилен (-CH₂-), 1,1-этилиден (-CH(CH₃)-), 1,2-этилиден (-CH₂CH₂-), 1,1-пропилиден (-CH(CH₂CH₃)-), 1,2-пропилиден (-CH₂CH(CH₃)-), 1,3-пропилиден (-CH₂CH₂CH₂-), 1,4-бутилиден (-CH₂CH₂CH₂CH₂-), 1,5-бутилиден (-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-), и т.д. Алкилен может быть замещенным или незамещенным. При замещении заместитель может быть замещен в любом доступном месте соединения, и заместитель предпочтительно замещен одним или более заместителями, независимо необязательно выбранными из группы, состоящей из алкила, алкенила, алкинила, алкокси, алкилтио, алкиламино, галогена, сульфгидрила, гидрокси, нитро, циано, циклоалкила, гетероциклила, арила, гетероарила, циклоалкокси, гетероциклоалкокси, циклоалкилтио, гетероциклоалкилтио и оксо.

Термин «алкокси» относится к группе -O-(алкил) и -O-(незамещенный циклоалкил), где алкил или циклоалкил является таким, как определено выше. Неограничивающие примеры алкокси включают: метокси, этокси, пропокси, бутокси, циклопропилокси, циклобутокси, циклопентилокси и циклогексилокси. Алкокси может быть необязательно замещен или незамещен, и когда он замещен, заместитель предпочтительно представляет собой одну или более групп, независимо выбранных из группы, состоящей из алкила, алкенила, алкинила, алкокси, алкилтио, алкиламино, галогена, сульфгидрила, гидрокси, нитро, циано, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила, гетероарила, циклоалкокси, гетероциклоалкокси, циклоалкилтио и гетероциклоалкилтио.

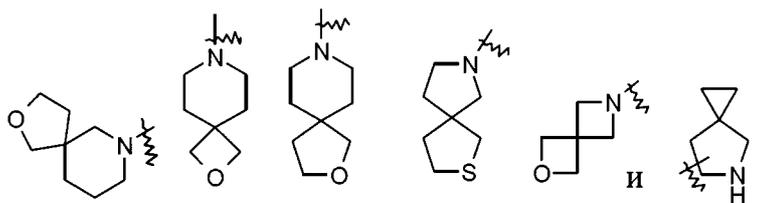
Термин «циклоалкил» относится к насыщенному или частично ненасыщенному моноциклическому или полициклическому углеводородному заместителю. Циклоалкильное кольцо содержит от 3 до 20 атомов углерода, предпочтительно от 3 до 12 атомов углерода, более предпочтительно от 3 до 10 атомов углерода и наиболее

предпочтительно от 3 до 7 атомов углерода. Неограничивающие примеры моноциклического циклоалкила включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклопентенил, циклогексил, циклогексенил, циклогексаденил, циклогептил, циклогептатриенил, циклооктил и т. п. Полициклический циклоалкил включает спироциклоалкил, конденсированный циклоалкил и мостиковый циклоалкил.

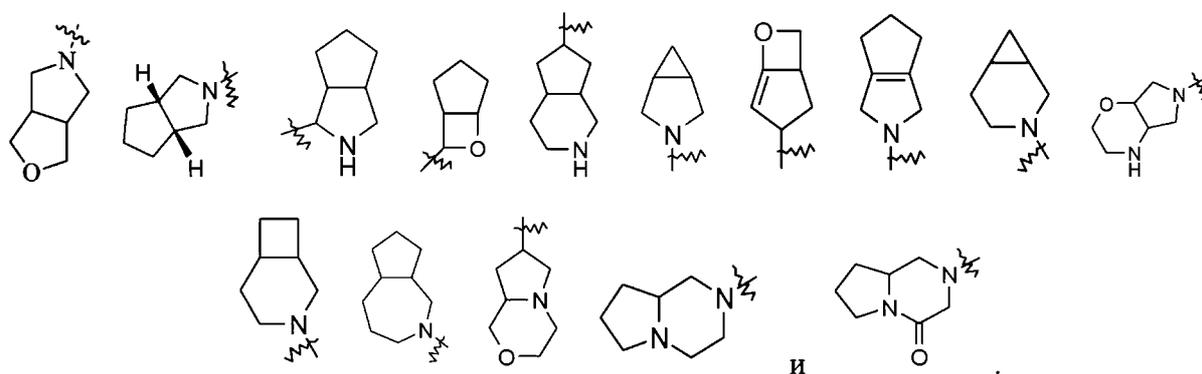
Термин «гетероциклил» относится к насыщенному или частично ненасыщенному моноциклическому или полициклическому углеводородному заместителю, содержащему от 3 до 20 кольцевых атомов, где один или более кольцевых атомов представляют собой гетероатомы, выбранные из группы, состоящей из азота, кислорода и $S(O)_m$ (где m представляет собой целое число от 0 до 2), за исключением циклической части -O-O-, -O-S- или -S-S-, и остальные кольцевые атомы представляют собой атомы углерода. Гетероциклил предпочтительно содержит от 3 до 12 кольцевых атомов, из которых от 1 до 4 представляют собой гетероатомы; более предпочтительно циклоалкильное кольцо содержит от 3 до 10 кольцевых атомов. Неограничивающие примеры моноциклического гетероциклила включают пирролидинил, пиперидинил, пиперазинил, морфолинил, тиоморфолинил, гомопиперазинил и т.д. Полициклический гетероциклил включает спирогетероциклил, конденсированный гетероциклил и мостиковый гетероциклил.

Термин «спирогетероциклил» относится к 5-20-членной полициклической гетероциклильной группе, в которой моноциклические кольца имеют общий один атом (называемый спироатомом), где один или более кольцевых атомов представляют собой гетероатомы, выбранные из группы, состоящей из азота, кислорода и $S(O)_m$ (где m представляет собой целое число от 0 до 2), а остальные кольцевые атомы представляют собой атомы углерода. Он может содержать одну или более двойных связей, но ни одно из колец не имеет полностью сопряженной π -электронной системы. Он предпочтительно является 6-14-членным и более предпочтительно 7-10-членным. В соответствии с количеством спироатомов, являющихся общими между кольцами, спирогетероциклил может являться моноспирогетероциклилом, бисспирогетероциклилом или полиспирогетероциклилом, предпочтительно моноспирогетероциклилом и бисспирогетероциклилом и более предпочтительно 4-членным/4-членным, 4-членным/5-членным, 4-членным/6-членным, 5-членным/5-членным или 5-членным/6-членным моноспирогетероциклилом. Неограничивающие примеры

спирогетероциклила включают:

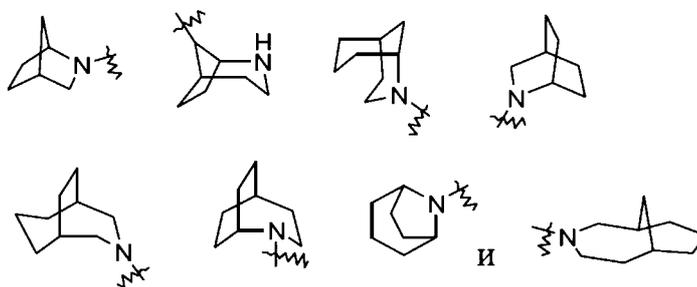


Термин «конденсированный гетероциклил» относится к 5-20-членной полициклической гетероциклической кольцевой системе, в которой каждое кольцо имеет общую пару соседних атомов с другими кольцами в системе. В конденсированном гетероциклиле одно или более колец могут содержать одну или более двойных связей, но ни одно из них не имеет полностью сопряженной π -электронной системы; один или более кольцевых атомов являются гетероатомами, выбранными из группы, состоящей из азота, кислорода и $S(O)_m$ (где m представляет собой целое число от 0 до 2), и другие кольцевые атомы являются атомами углерода. Предпочтительно конденсированный гетероциклил является 6-14-членным и более предпочтительно 7-10-членным. В соответствии с количеством колец, которые образуют конденсированный гетероциклил, конденсированный гетероциклил может быть бициклическим, трициклическим, тетрациклическим или полициклическим, предпочтительно бициклическим или трициклическим и более предпочтительно 5-членным/5-членным или 5-членным/6-членным бициклическим. Неограничивающие примеры конденсированного гетероциклила включают:

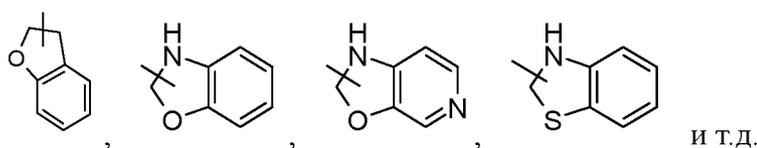


Термин «мостиковый гетероциклил» относится к 5-14-членной полициклической гетероциклической группе, в которой любые два кольца имеют общих два атома, которые непосредственно не связаны. Мостиковый гетероциклил может содержать одну или более двойных связей, но ни одно из колец не имеет полностью сопряженной π -электронной

системы; один или более кольцевых атомов являются гетероатомами, выбранными из группы, состоящей из азота, кислорода и $S(O)_m$ (где m представляет собой целое число от 0 до 2), и другие кольцевые атомы являются атомами углерода. Мостиковый гетероциклил предпочтительно является 6-14-членным и более предпочтительно 7-10-членным. В соответствии с количеством колец, которые образуют мостиковый гетероциклил, мостиковый гетероциклил может быть бициклическим, трициклическим, тетрациклическим или полициклическим, предпочтительно бициклическим, трициклическим или тетрациклическим и более предпочтительно бициклическим или трициклическим. Неограничивающие примеры мостикового гетероциклила включают:



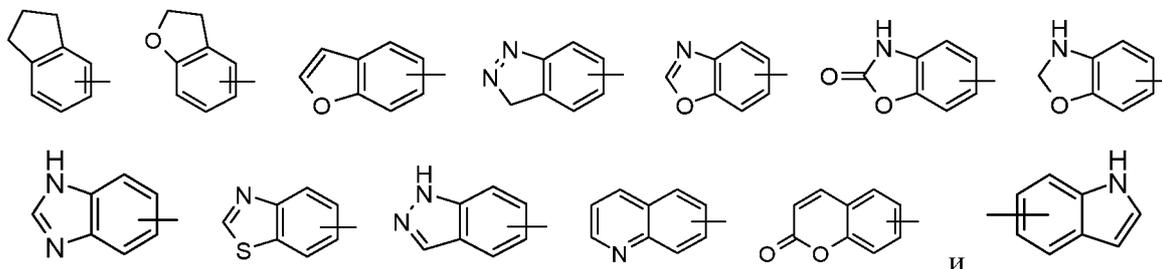
Гетероциклическое кольцо может быть конденсировано с арильным, гетероарильным или циклоалкильным кольцом, причем кольцо, присоединенное к исходной структуре, представляет собой гетероциклил; его неограничивающие примеры включают:



Гетероциклил может быть необязательно замещенным или незамещенным. При замещении, заместитель предпочтительно представляет собой одну или более групп, независимо выбранных из группы, состоящей из алкила, алкенила, алкинила, алкокси, алкилтио, алкиламино, галогена, сульфгидрила, гидроксигруппы, нитро, циано, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила, гетероарила, циклоалкокси, гетероциклоалкокси, циклоалкилтио, гетероциклоалкилтио и оксо.

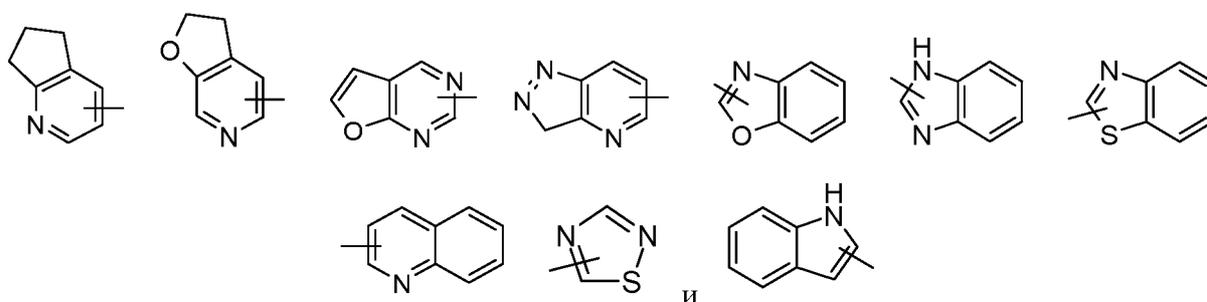
Термин «арил» относится к 6-14-членной полностью углеродной моноциклической или конденсированной полициклической (т.е., кольца, имеющие общую пару соседних атомов углерода) группе, имеющей сопряженную π -электронную систему. Арил предпочтительно представляет собой 6-10-членный, например, фенил и нафтил,

предпочтительно фенил. Арильное кольцо может быть конденсировано с гетероарильным, гетероциклическим или циклоалкильным кольцом, причем кольцо, присоединенное к исходной структуре, представляет собой арильное кольцо; его неограничивающие примеры включают:



Арил может быть замещенным или незамещенным. При замещении, заместитель предпочтительно представляет собой одну или более групп, независимо выбранных из группы, состоящей из алкила, алкенила, алкинила, алкокси, алкилтио, алкиламино, галогена, сульфидрила, гидроксигруппы, нитро, циано, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила, гетероарила, циклоалкокси, гетероциклоалкокси, циклоалкилтио и гетероциклоалкилтио.

Термин «гетероарил» относится к гетероароматической системе, содержащей от 1 до 4 гетероатомов и от 5 до 14 кольцевых атомов, где гетероатомы выбраны из группы, состоящей из кислорода, серы и азота. Гетероарил предпочтительно представляет собой 5-10-членный, более предпочтительно 5- или 6-членный, такой как фуранил, тиенил, пиридил, пирролил, N-алкилпирролил, пиримидинил, пирозинил, имидазолил и тетразолил. Гетероарильное кольцо может быть конденсировано с арильным, гетероциклическим или циклоалкильным кольцом, причем кольцо, присоединенное к исходной структуре, представляет собой гетероарильное кольцо; его неограничивающие примеры включают:



Гетероарил может быть необязательно замещенным или незамещенным. При замещении, заместитель предпочтительно представляет собой одну или более групп, независимо выбранных из группы, состоящей из алкила, алкенила, алкинила, алкокси,

алкилтио, алкиламино, галогена, сульфгидрила, гидрокси, нитро, циано, циклоалкила, гетероциклоалкила, арила, гетероарила, циклоалкокси, гетероциклоалкокси, циклоалкилтио и гетероциклоалкилтио.

Термин «аминозащитная группа» представляет собой группу, которая используется для защиты аминогруппы на молекуле от изменения при взаимодействии с другими частями молекулы и которая может быть легко удалена. Неограничивающие примеры включают 9-флуоренилметоксикарбонил, трет-бутоксикарбонил, ацетил, бензил, аллил, п-метоксибензил и т.д. Эти группы могут быть необязательно замещены 1-3 заместителями, выбранными из группы, состоящей из галогена, алкокси и нитро. Аминозащитная группа предпочтительно представляет собой 9-флуоренилметоксикарбонил.

Термин «циклоалкилалкил» относится к алкилу, в котором водород замещен одной или более циклоалкильными группами, предпочтительно одной циклоалкильной группой, где алкил является таким, как определено выше, и циклоалкил является таким, как определено выше.

Термин «галогеналкил» относится к алкилу, в котором водород замещен одним или более галогенами, где алкил является таким, как определено выше.

Термин «дейтерированный алкил» относится к алкилу, в котором водород замещен одним или более атомами дейтерия, где алкил является таким, как определено выше.

Термин «гидрокси» относится к группе -ОН.

Термин «галоген» относится к фтору, хлору, бромю или йоду.

Термин «амино» относится к -NH₂.

Термин «нитро» относится к -NO₂.

Термин «необязательный» или «необязательно» означает, что событие или обстоятельство, описанное далее, может, но не обязательно, иметь место, и что такое описание включает случаи, когда событие или обстоятельство происходит или не происходит. Например, «необязательно содержащий 1-3 переменные области тяжелой цепи антитела» означает, что переменная область тяжелой цепи антитела конкретной последовательности может, но не обязательно, присутствовать.

Термин «замещен» означает, что один или более, предпочтительно вплоть до 5, более предпочтительно от 1 до 3 атомов водорода в группе независимо замещены

соответствующим количеством заместителей. Само собой разумеется, что заместитель находится только в своем возможном химическом положении, и специалисты в данной области техники смогут определить (экспериментально или теоретически) возможное или невозможное замещение без особых усилий. Например, оно может быть нестабильным, когда амино или гидроксильные, имеющие свободный водород, связаны с атомом углерода, имеющим ненасыщенную (например, олефиновую) связь.

Термин «нагрузка лекарственным средством» относится к среднему количеству цитотоксических лекарственных средств, нагруженных на каждое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в молекулах ADC, и она также может быть выражена в виде отношения количества лекарственных средств к количеству антител. Нагрузка лекарственным средством может составлять от 0 до 12, предпочтительно от 1 до 10, более предпочтительно от 2 до 8 и наиболее предпочтительно от 3,5 до 4,5 цитотоксических лекарственных средств (D), связанных с каждым антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (Pc). В вариантах осуществления настоящего изобретения нагрузка лекарственным средством обозначается n , и иллюстративное значение n может представлять собой рассчитанное среднее значение одного или более из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. Среднее количество лекарственных средств на молекулу ADC после реакций сочетания может быть охарактеризовано обычными методами, такими как спектроскопия в УФ/видимом спектре, масс-спектрометрия, анализы ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ) и HPLC (высокоэффективная жидкостная хроматография).

В одном варианте осуществления настоящего изобретения цитотоксическое лекарственное средство связано с N-концевой аминогруппой, ϵ -аминогруппой лизинового остатка и/или сульфгидрильной группой антитела или его антигенсвязывающего фрагмента через линкерное звено. Как правило, количество молекул лекарственного средства, которые могут быть связаны с антителом в реакции сочетания, будет меньше теоретического максимума.

Нагрузка цитотоксическим лекарственным средством может контролироваться с помощью следующих неограничивающих способов, включая:

- (1) контроль молярного соотношения линкерного реагента к моноклональному антителу,
- (2) контроль времени и температуры реакции и

(3) выбор различных реагентов реакции.

Для получения обычных фармацевтических композиций см. Китайскую фармакопею (Chinese Pharmacopoeia).

Термин «носитель», как используется для фармацевтической композиции по настоящему изобретению, относится к системе, которая может изменять то, как лекарственное средство попадает в организм человека, и распределение лекарственного средства в организме человека, контролировать скорость высвобождения лекарственного средства и доставлять лекарственное средство в орган-мишень. Система высвобождения и нацеливания на основе носителя лекарственного средства может уменьшить разложение и потерю лекарственного средства, уменьшить побочные эффекты и улучшить биодоступность. Например, полимерные поверхностно-активные вещества, которые могут быть использованы в качестве носителей, могут самостоятельно собираться благодаря своим уникальным амфифильным структурам с образованием различных форм агрегатов, таких как мицеллы, микроэмульсии, гели, жидкие кристаллы и везикулы, в качестве предпочтительных примеров. Агрегаты имеют способность инкапсулировать молекулы лекарственного средства и имеют хорошую проницаемость для мембран, и поэтому могут быть использованы как превосходные носители лекарственного средства.

«Введение», «обработка» и «лечение», когда они применяются к животным, людям, экспериментальным субъектам, клеткам, тканям, органам или биологическим жидкостям, относятся к приведению экзогенного лекарственного средства, терапевтического агента, диагностического агента или композиции в контакт с животными, людьми, субъектами, клетками, тканями, органами или биологическими жидкостями. Термины «введение», «обработка» и «лечение» могут относиться, например, к терапевтическим, фармакокинетическим, диагностическим, исследовательским и экспериментальным способам. Обработка клеток включает приведение реагента в контакт с клетками и приведение реагента в контакт с жидкостью, где жидкость находится в контакте с клетками. Термины «введение», «обработка» и «лечение» также относятся к лечению, например, клеток реагентами, диагностическими агентами, связывающим композициям или другой клеткой *in vitro* и *ex vivo*. «Лечение» применительно к людям, ветеринарным или исследовательским субъектам, относится к терапевтическому лечению, превентивным или профилактическим мерам и исследовательским и диагностическим применениям.

«Лечение» относится к введению терапевтического агента, такого как композиция, содержащая любое из соединений конъюгации по настоящему изобретению, либо внутрь, либо снаружи пациенту с одним или более симптомами заболевания, в отношении которого известно, что терапевтический агент оказывает терапевтический эффект. Как правило, терапевтический агент вводят в количестве, эффективном для облегчения одного или более симптомов заболевания у пациента или популяции, получающих лечение, для индуцирования регрессии таких симптомов или для ингибирования развития таких симптомов в любой клинически измеримой степени. Количество терапевтического агента, эффективное для облегчения симптомов любого конкретного заболевания (также называемое «терапевтически эффективным количеством»), может варьироваться в зависимости от множества факторов, таких как степень болезни, возраст и вес пациента, а также от способности лекарственного средства производить желаемый терапевтический эффект у пациента. Облегчение симптома заболевания может быть оценено с помощью любых методов клинического тестирования, обычно используемых врачами или другими специалистами в области здравоохранения для оценки тяжести или прогрессирования симптома. Хотя варианты осуществления настоящего изобретения (например, способы лечения или изделия) могут быть не эффективными в облегчении симптомов каждого заболевания, представляющего интерес, они должны уменьшать симптомы заболевания, представляющего интерес, у статистически значимого числа пациентов, как определено в соответствии с любыми статистическими методами тестирования, известными в данной области техники, такими как t-критерий Стьюдента, критерий хи-квадрат, U-критерий Манна и Уитни, критерий Краскела-Уоллиса (H-критерий), критерий Джонкхиера-Терпстра и критерий Уилкоксона.

«Эффективное количество» включает количество, достаточное для облегчения или предотвращения появления симптома или состояния медицинского заболевания. Эффективное количество также относится к количеству, достаточному для обеспечения или облегчения диагностики. Эффективное количество для конкретного пациента или ветеринарного субъекта может варьироваться в зависимости от таких факторов, как состояние, подлежащее лечению, общее состояние здоровья пациента, способ, и путь, и дозировка введения, а также тяжесть побочных эффектов. Эффективное количество может представлять собой максимальную дозу или режим введения, чтобы избежать

значительных побочных эффектов или токсических эффектов.

«Обмен» относится к обмену системы растворителей, которая солюбилизирует антитело или ADC. Например, систему с высоким содержанием солей или гипертонических растворителей, содержащую антитело или ADC, заменяют, путем осуществления физических операций, буферной системой стабильного состава, так что белок антитела присутствует в стабильном составе. Физические операции включают, но не ограничиваются, ультрафильтрацию, диализ или восстановление после центрифугирования.

Примеры

Настоящее изобретение дополнительно описано ниже со ссылкой на примеры, которые, однако, не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. Экспериментальные способы в примерах по настоящему изобретению, в которых конкретные условия не указаны, как правило, выполняют в обычных условиях, например, со ссылкой на *Antibodies: A Laboratory Manual* («Антитела: лабораторное руководство») и *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* («Молекулярное клонирование: лабораторное руководство») от Cold Spring Harbor Laboratory, или в условиях, рекомендованных производителем исходного материала или товаров. Реагенты без указания конкретного происхождения являются коммерчески доступными общепринятыми реагентами.

I. Конъюгаты антитела и лекарственного средства

Получение антител к клаудину 18.2

Пример 1-1: Конструирование штамма клеток с высокой экспрессией клаудина 18.2

Лентивирусные экспрессионные векторные плазмиды pCDH-hClaudin18.2 и лентивирусную систему упаковывающих векторов pVSV-G или pCMV-dR8.91 трансфицировали в вирусные упаковывающие клетки 293T с использованием трансфекционного реагента Lipofectamine 3000. Супернатант среды, содержащий вирусы, собирали, фильтровали и центрифугировали на сверхвысокой скорости. Штамм клеток перстневидно-клеточной карциномы желудка человека NUGC4 был инфицирован концентрированным вирусом, подвергнут скринингу с использованием пурамицина в течение двух-трех недель и затем подвергнут одноклеточной сортировке FACS.

Уровни экспрессии клаудина 18.2 определяли в соответствии с оценками ИНС (имуногистохимия) опухоли. Клетки, экспрессирующие клаудин 18.2 на уровне, аналогичном опухоли с оценкой ИНС опухоли, равной 3, считали клетками с высокой экспрессией, и клетки, экспрессирующие клаудин 18.2 на уровне, аналогичном опухоли с оценкой ИНС опухоли, равной 2, считали клетками с умеренной экспрессией.

Согласно уровням экспрессии клаудина 18.2 на поверхности клеток NUGC4, инфицированных лентивирусом, определяемым FACS, были выбраны штаммы моноклональных клеток, экспрессирующие клаудин 18.2 на высоких уровнях, NUGC4/hClaudin18.2. В то же время уровни экспрессии клаудина 18.2 на поверхности клеток NUGC4 дикого типа также определяли с помощью FACS, и отбирали клональные штаммы клеток NUGC4, экспрессирующие клаудин 18.2 на умеренных уровнях. Клетки NUGC4 дикого типа представляли собой клетки, экспрессирующие клаудин 18.2 на низких уровнях.

Выбранные штаммы моноклональных клеток размножали и хранили замороженными в банке для последующих экспериментов.

Последовательность банка генов (Genbank) клаудина 18.2: NP_001002026 (SEQ ID NO: 1):

```
MAVTACQQLGFVVSLIGIAGIIAATCMDQWSTQDLYNNPVTAVFNYQGLWRSCVRESSG
FTECRGYFTLLGLPAMLQAVRALMIVGIVLGAIGLLVSIFALKCIRIGSMEDSAKANMTLT
SGIMFIVSGLCAIAGVSVFANMLVTNFWMSTANMYTGMGGMVQTVQTRYTFGAALFV
GWVAGGLTLIGGVMMCIACRGLAPEETNYKAVSYHASGHSVAYKPGGFKASTGFGSNT
KNKKIYDGGARTEDEVQSYPSKHDYV.
```

Последовательность ДНК клаудина 18.2 (SEQ ID NO: 2):

```
AGAATTGCGC   TGTCCACTTG   TCGTGTGGCT   CTGTGTGCGAC   ACTGTGCGCC
ACCATGGCCG   TGA CTGCCTG   TCAGGGCTTG   GGGTTCGTGG   TTCACTGAT
TGGGATTGCG   GGCATCATTG   CTGCCACCTG   CATGGACCAG   TGGAGCACCC
AAGACTTGTA   CAACAACCCC   GTAACAGCTG   TTTTCAACTA   CCAGGGGCTG
TGGCGCTCCT   GTGTCCGAGA   GAGCTCTGGC   TTCACCGAGT   GCCGGGGCTA
CTTCACCCTG   CTGGGGCTGC   CAGCCATGCT   GCAGGCAGTG   CGAGCCCTGA
TGATCGTAGG   CATCGTCCTG   GGTGCCATTG   GCCTCCTGGT   ATCCATCTTT
GCCCTGAAAT   GCATCCGCATTGGCAGCATG   GAGGACTCTG   CCAAAGCCAA
```

CATGACACTG	ACCTCCGGGA	TCATGTTCAT	TGTCTCAGGT	CTTTGTGCAA
TTGCTGGAGT	GTCTGTGTTT	GCCAACATGC	TGGTGACTION	CTTCTGGATG
TCCACAGCTA	ACATGTACAC	CGGCATGGGT	GGGATGGTGC	AGACTGTTCA
GACCAGGTAC	ACATTTGGTG	CGGCTCTGTT	CGTGGGCTGG	GTCGCTGGAG
GCCTCACACT	AATTGGGGGT	GTGATGATGT	GCATCGCCTG	CCGGGGCCTG
GCACCAGAAG	AAACCAACTA	CAAAGCCGTT	TCTTATCATG	CCTCAGGCCA
CAGTGTTGCC	TACAAGCCTG	GAGGCTTCAA	GGCCAGCACT	GGCTTTGGGT
CCAACACCAA	AAACAAGAAG	ATATACGATG	GAGGTGCCCG	CACAGAGGAC
GAGGTACAAT	CTTATCCTTC	CAAGCACGAC	TATGTGTAAT	GCTCTAAGAC
CTCTCAGCACGGGCGGAAGA	AACTCCCGGA	GAGCTCACCC	AAAAACAAG	
GAGATCCCAT	CTAGATTTCT	TCTTGCTTTT	GACTIONACAGC	TGGAAGTTAG
AAAAGCCTCG	ATTCATCTT	TGGAGAGGCC	AAATGGTCTT	AGCCTCAGTC
TCTGTCTCTA	AATATTCCAC	CATAAAACAG	CTGAGTTATT	TATGAATTAG
AGGCTATAGC	TCACATTTTC	AATCCTCTAT	TTCTTTTTTT	AAATATAACT
TTCTACTCTG	ATGAGAGAAT	GTGGTTTTAA	TCTCTCTCTC	ACATTTTGAT
GATTTAGACA	GACTCCCCCT	CTTCCTCCTA	GTCAATAAAC	CCATTGATGA
TCTATTTCCC	AGCTTATCCC	CAAGAAAACT	TTTGAAAGGA	AAGAGTAGAC
CCAAAGATGT	TATTTTCTGC	TGTTTGAATT	TTGTCTCCCC	ACCCCCAACT
TGGCTAGTAA	TAAACACTTA	CTGAAGAAGA	AGCAATAAGA	GAAAGATATT
TGTAATCTCT	CCAGCCCATG	ATCTCGGTTT	TCTTACACTG	TGATCTTAAA
AGTTACCAAA	CCAAAGTCAT	TTTCAGTTTG	AGGCAACCAA	ACCTTTCTAC
TGCTGTTGAC	ATCTTCTTAT	TACAGCAACA	CCATTCTAGG	AGTTTCTCTGA
GCTCTCCACT	GGAGTCCTCT	TTCTGTGCGG	GGTCAGAAAT	TGTCCCTAGA
TGAATGAGAA	AATTATTTTT	TTAATTTAA	GTCCTAAATA	TAGTTAAAAT
AAATAATGTT	TTAGTAAAAT	GATACACTAT	CTCTGTGAAA	TAGCCTCACC
CCTACATGTG	GATAGAAGGA	AATGAAAAAA	TAATTGCTTT	GACATTGTCT
ATATGGTACT	TTGTAAAGTC	ATGCTTAAGT	ACAAATTCCA	TGAAAAGCTC
ACTGATCCTA	ATTCTTTCCC	TTTGAGGTCT	CTATGGCTCT	GATTGTACAT
GATAGTAAGT	GTAAGCCATG	TAAAAAGTAA	ATAATGTCTG	GGCACAGTGG
CTCACGCCTG	TAATCCTAGCACTTTGGGAG	GCTGAGGAGG	AAGGATCACT	
TGAGCCCAGA	AGTTCGAGAC	TAGCCTGGGCAACATGGAGAAGCCCTGTCT		

CTACAAAATA CAGAGAGAAA AAATCAGCCA GTCATGGTGG CCTACACCTG
TAGTCCCAGC ATTCCGGGAG GCTGAGGTGG GAGGATCACT TGAGCCCAGG
GAGGTTGGGG CTGCAGTGAG CCATGATCAC ACCACTGCAC TCCAGCCAGG
TGACATAGCGAGATCCTGTC TAAAAAATA AAAAATAAAT AATGGAACAC
AGCAAGTCCT AGGAAGTAGGTTAAACTAA TTCTTTAAA AAAAAAAAAA
GTTGAGCCTG AATTAAATGT AATGTTTCCA AGTGACAGGT ATCCACATTT
GCATGGTTAC AAGCCACTGC CAGTTAGCAG TAGCACTTTC CTGGCACTGT
GGTCGGTTTT GTTTTGT TTTT GCTTTGTTTA GAGACGGGGT CTCACTTTCC
AGGCTGGCCT CAAACTCCTG CACTCAAGCA ATTCTTCTAC CCTGGCCTCC
CAAGTAGCTG GAATTACAGG TGTGCGCCAT CACAAC TAGC TGGTGGTCAG
TTTTGTTACT CTGAGAGCTG TTCACTTCTC TGAATTCACC TAGAGTGGTT
GGACCATCAG ATGTTTGGGC AAAACTGAAA GCTCTTTGCA ACCACACACC
TTCCCTGAGC TTACATCACT GCCCTTTTGA GCAGAAAGTC TAAATTCCTT
CCAAGACAGT AGAATTCCAT CCCAGTACCA AAGCCAGATA GGCCCCCTAG
GAAACTGAGG TAAGAGCAGT CTCTAAAAAC TACCCACAGC AGCATTGGTG
CAGGGGAACT TGGCCATTAG GTTATTATTT GAGAGGAAAG TCCTCACATC
AATAGTACAT ATGAAAGTGACCTCCAAGGG GATTGGTGAA TACTCATAAG
GATCTTCAGG CTGAACAGAC TATGTCTGGG GAAAGAACGG ATTATGCCCC
ATTAATAAC AAGTTGTGTT CAAGAGTCAG AGCAGTGAGCTCAGAGGCC
TTCTCACTGA GACAGCAACA TTAAACCAA ACCAGAGGAA GTATTTGTGG
AACTCACTGC CTCAGTTTGG GTAAAGGATG AGCAGACAAG TCAACTAAAG
AAAAAAGAAAAGCAAGGAGGAGGGTTGAGC AATCTAGAGC ATGGAGTTTG
TTAAGTGCTC TCTGGATTTG AGTTGAAGAG CATCCATTTG AGTTGAAGGC
CACAGGGCAC AATGAGCTCT CCCTTCTACC ACCAGAAAGT CCCTGGTCAG
GTCTCAGGTA GTGCGGTGTG GCTCAGCTGG GTTTTTAATT AGCGCATTCT
STATCCAACA TTTAATTGTT TGAAAGCCTC CATATAGTTA GATTGTGCTT
TGTAATTTTG TTGTTGTTGC TCTATCTTAT TGTATATGCA TTGAGTATTA
ACCTGAATGT TTTGTTACTT AAATATTA AAAA AACTGTTA TCCTACAGTT.

Пример 1-2: Получение моноклонального антитела к клаудину 18.2 человека

1. Иммунизация

Моноклональное антитело к клаудину 18.2 человека продуцировали путем иммунизации мышей.

Лабораторные белые мыши SJL, самки, в возрасте 6–8 недель (Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd., номер лицензии на животноводческое производство: SCXK(Beijing)2012-0001). Условия содержания: SPF (свободный от патогенной флоры). Приобретенных мышей содержали в лабораторной среде в течение 1 недели, в 12/12-часовом цикле освещения/темноты, при температуре 20-25 °С, с влажностью 40-60 %. Акклиматизированных мышей иммунизировали согласно следующей схеме. Антигены для иммунизации представляли собой клетки huClaudin18.2-НЕК293 (штамм клеток НЕК-293, стабильно трансфицированный плазмидой клаудина 18.2 человека).

Схема иммунизации: Перед первой клеточной иммунизацией каждой мыши внутрибрюшинно (IP) вводили 0,1 мл адьюванта TiterMax® Gold (Sigma Cat No. T2684), и через полчаса вводили 0,1 мл разбавленной физиологическим раствором клеточной жидкости в концентрации 1×10^8 /мл. Клетки равномерно пипетировали, и затем проводили инокуляцию в дни 0, 14, 28, 42 и 56. Кровь собирали в дни 21, 35, 49 и 63, и титр антител в сыворотке крови мышей определяли с помощью ELISA. После 4-5 иммунизации мышей, у которых титр антител в сыворотке крови был высоким и достигал плато, отбирали для слияния спленоцитов. Мышей иммунизировали бустерной дозой 1×10^7 клеток путем внутрибрюшинной инъекции (IP) за 3 дня до слияния спленоцитов.

2. Слияние клеток селезенки

Лимфоциты селезенки и клетки миеломы, клетки Sp2/0 (ATCC® CRL-8287™), подвергали слиянию, следуя процедуре слияния, опосредованной ПЭГ (полиэтиленгликоль), для получения гибридомных клеток. Полученные гибридомные клетки ресуспендировали в полной среде (среда IMDM, содержащая 20% FBS (фетальная бычья сыворотка), $1 \times \text{НАТ}$ (гипоксантин-аминоптеринтимидин) и $1 \times \text{ОПИ}$) при плотности $0,5-1 \times 10^6$ /мл и высевали в 96-луночный планшет при 100 мкл/лунку. Планшет инкубировали при 37 °С с 5% CO_2 в течение 3-4 дней, дополняли полной средой НАТ при 100 мкл/лунку и инкубировали в течение еще 3-4 дней с образованием клонов. Супернатант удаляли и добавляли полную среду НТ (среда IMDM, содержащая 20% FBS, $1 \times \text{НТ}$ (гипоксантин-тимидин) и $1 \times \text{ОПИ}$) при 200 мкл/лунку. Планшет инкубировали при

37 °C с 5% CO₂ в течение 3 дней с последующим анализом ELISA.

3. Скрининг гибридомных клеток

Супернатанты культуры анализировали с использованием комбинированного метода ELISA в соответствии с плотностью, при которой выращивали гибридомные клетки. Клетки, которые имели хорошую способность связывания с клетками huClaudin18.2-HEK293, но не связывались с HEK293, отбирали, размножали и замораживали. Субклонирование проводили 2-3 раза с получением одноклеточных клонов.

Для каждого субклонирования клеток также проводили анализ связывания клеток. Гибридомные клоны получали с помощью вышеуказанного процесса скрининга, и антитела дополнительно получали с использованием способа культивирования клеток без сыворотки. Антитела очищали в соответствии с примером очистки для применения в тестовых примерах.

Пример 1-3: Гуманизация мышинных антител

Отбирали штаммы моноклональных гибридомных клеток mAb1901 и mAb1902 с высокой активностью *in vitro*. Содержащиеся в них последовательности моноклональных антител клонировали с последующей гуманизацией, рекомбинантной экспрессией и оценкой активности.

Клонирование последовательности из гибридомы осуществляли следующим образом. Собирали гибридомные клетки в логарифмической фазе роста, и РНК экстрагировали с использованием тризола (Invitrogen, 15596-018) (в соответствии с процедурами в инструкции к набору) и проводили обратную транскрипцию (PrimeScript™ Reverse Transcriptase, Takara, кат. № 2680A). КДНК (комплементарная ДНК), полученную обратной транскрипцией, амплифицировали с помощью PCR (полимеразная цепная реакция) с использованием набора mouse Ig-Primer Set (Novagen, TB326 Rev.B 0503), а затем отправляли на секвенирование в компанию, осуществляющую секвенирование. Аминокислотные последовательности, соответствующие полученным последовательностям ДНК, представлены в SEQ ID NO: 3-6:

Вариабельная область мышинной тяжелой цепи mAb1901 (SEQ ID NO: 3)

EVQLMESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAPEMGLEWIAYISRGSSTIYY
ADTVKGRFTMSRDNAKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTSV

TVSS;

Вариабельная область мышиноной легкой цепи mAb1901 (SEQ ID NO: 4)

DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGAST
RASGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYHCQNDLYYPLTFGAGTKLELK;

Вариабельная область мышиноной тяжелой цепи mAb1902 (SEQ ID NO: 5)

EVQLQESGAELVKPGASVKLSCKASGYIFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGMIHPNSGST
NYNEKFKGKATLTLDKSSSTAYMQLSSLPSEDSAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTLTVS
S;

Вариабельная область мышиноной легкой цепи mAb1902 (SEQ ID NO: 6)

DIVLTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYYCQNAITYPFTFGSGTKLEIK;

Вышеуказанные вариабельные области мышиноной тяжелой цепи и легкой цепи были соединены с константной областью тяжелой цепи антитела IgG1 человека и константной областью легкой к-цепи человека, описанными ниже, соответственно, с образованием химерных антител ch1901 и ch1902.

Константные области каждого антитела были выбраны из группы, состоящей из следующих последовательностей:

Константная область тяжелой цепи антитела IgG1 человека: (SEQ ID NO: 7)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK;

Константная область легкой к-цепи человека: (SEQ ID NO: 8)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC.

Мышиные моноклональные антитела гуманизируют в соответствии со способами, описанными во многих публикациях в данной области техники. Вкратце, константные домены человека использовали вместо исходных (мышинное антитело) константных

доменов, и последовательности антител зародышевой линии человека отбирали на основе гомологии мышинных и человеческих антител для трансплантации CDR. В настоящем изобретении выбраны молекулы-кандидаты с хорошей активностью для гуманизации, и результаты являются следующими.

1. CDR мышинных антител

Аминокислотные остатки CDR VH/VL в таблице 1 идентифицировали с использованием схемы нумерации по Кабату и аннотировали.

Последовательности CDR мышинных антител описаны в таблице 1:

Таблица 1. Последовательности CDR мышинных антител

Антитело	mAb1901
HCDR1	DYGIH (SEQ ID NO: 9)
HCDR2	YISRGSSTIYYADTVKG (SEQ ID NO: 10)
HCDR3	GGYDTRNAMDY (SEQ ID NO: 11)
LCDR1	KSSQSLNLSGNQKNYLA (SEQ ID NO: 12)
LCDR2	GASTRAS (SEQ ID NO: 13)
LCDR3	QNDLYYPLT (SEQ ID NO: 14)
Антитело	mAb1902
HCDR1	SYWMH (SEQ ID NO: 15)
HCDR2	MIHPNSGSTNYNEKFKGR (SEQ ID NO: 16)
HCDR3	LKTGNSFDY (SEQ ID NO: 17)
LCDR1	KSSQSLNLSGNQKNYLT (SEQ ID NO: 18)
LCDR2	WASTRES (SEQ ID NO: 19)
LCDR3	QNAYTYPFT (SEQ ID NO: 20)

2. Выбор последовательностей FR области зародышевой линии человека

На основании полученной типичной структуры VH/VL CDR мышинного антитела сравнивали последовательности вариабельной области тяжелой цепи и легкой цепи с базой данных антител Germine для получения матрицы зародышевой линии человека с высокой гомологией. Каркасную область легкой цепи зародышевой линии человека получали из гена легкой к-цепи человека.

2.1. Дизайн гуманизации mAb1901 и обратной мутации

Подходящую зародышевую линию антитела человека отбирали для проведения гуманизации на мышинном антителе mAb1901. CDR мышинного антитела mAb1901 прививали в выбранную матрицу гуманизации для замены гуманизированных переменных областей с последующей рекомбинацией с константной областью IgG с образованием полного антитела. Между тем, в область FR в V-области гуманизированного антитела вводили обратные мутации. Иллюстративные обратные мутации и их комбинации являются следующими:

Таблица 2. Гуманизированные антитела mAb1901 и обратные мутации*

Переменные области легкой цепи гуманизированного антитела mAb1901		Переменные области тяжелой цепи гуманизированного антитела mAb1901	
VL1	Нет	VH1	Нет
VL2	N22S	VH2	N82T
VL3	N22S, V85I, Y87H	VH3	V48I, N82T
		VH4	I69M, N82T

* Все положения аминокислот в таблице пронумерованы в соответствии со схемой нумерации по Кабату; в N82T переменной области тяжелой цепи 82 относится к положению 82A в соответствии со схемой по Кабату.

Таблица 3. Последовательности переменной области легкой цепи и тяжелой цепи гуманизированных антител mAb1901

Название переменной области (SEQ ID NO:)	Последовательность
VL1 (SEQ ID NO: 21)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSGNQKNYLAW YQQKPGQPPKLLIYGASTRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSL QAEDVAVYYCQNDLYYPLTFGQGTKLEIK
VL2 (SEQ ID NO: 22)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLNSGNQKNYLAW YQQKPGQPPKLLIYGASTRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSL QAEDVAVYYCQNDLYYPLTFGQGTKLEIK
VL3	DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLLNSGNQKNYLAW

(SEQ ID NO:23)	YQQKPGQPPLLIYGASTRASGVPDRFSGSGSGTDFLTITSSL QAEDVAIYHCQNDLYYPLTFGQGTKLEIK
VH1 (SEQ ID NO:24)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAP GKGLEWVAYISRGSSSTIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTITVTVSS
VH2 (SEQ ID NO:25)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAP GKGLEWVAYISRGSSSTIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQ MTSLRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTITVTVSS
VH3 (SEQ ID NO:26)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAP GKGLEWIAYISRGSSSTIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQM TSLRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTITVTVSS
VH4 (SEQ ID NO:27)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQAP GKGLEWVAYISRGSSSTIYYADTVKGRFTMSRDNKNSLYLQ MTSLRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTITVTVSS

Соответствующую переменную область тяжелой цепи в приведенной выше таблице связывали с константной областью тяжелой цепи IgG1 человека, представленной в SEQ ID NO: 7, с образованием тяжелой цепи полноразмерного антитела, и переменную область легкой цепи связывали с константной областью легкой к-цепи человека, представленной в SEQ ID NO: 8, с образованием легкой цепи полноразмерного антитела. В других вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи также могут быть соединены с другими константными областями тяжелой цепи и константными областями легкой цепи, соответственно, с образованием полноразмерного антитела.

2.2. Дизайн гуманизации mAb1902 и обратной мутации

Подходящую зародышевую линию антитела человека отбирали для проведения гуманизации на мышинном антителе mAb1902. CDR мышинного антитела mAb1902 прививали в выбранную матрицу гуманизации для замены гуманизованных переменных областей с последующей рекомбинацией с константной областью IgG с образованием полного антитела. Между тем, в область FR в V-области гуманизованного антитела вводили обратные мутации. Иллюстративные обратные мутации и их

комбинации являются следующими:

Таблица 4. Гуманизированные антитела mAb1902 и дизайн обратной мутации для них*

Вариабельные области легкой цепи гуманизированного антитела mAb1902		Вариабельные области тяжелой цепи гуманизированного антитела mAb1902	
VL11	Нет	VH11	Нет
VL12	M4L	VH12	I69L, R71L, T73K
VL13	M4L, N22S	VH13	M48I, R66K, V67A, I69L, R71L, T73K
		VH14	R38K, A40R, M48I, R66K, V67A, I69L, R71L, T73K

* Все положения аминокислот в таблице пронумерованы в соответствии со схемой нумерации по Кабату.

Таблица 5. Последовательности вариабельной области легкой цепи и тяжелой цепи гуманизированного антитела mAb1902

Название вариабельной области (SEQ ID NO:)	Последовательность
VL11 (SEQ ID NO: 28)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAE DVAVYYCQNAYTYPFTFGQGTKLEIK
VL12 (SEQ ID NO: 29)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAE DVAVYYCQNAYTYPFTFGQGTKLEIK
VL13 (SEQ ID NO: 30)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQ QKPGQPPKLLIYWASTRESGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAE DVAVYYCQNAYTYPFTFGQGTKLEIK
VH11 (SEQ ID NO: 31)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQA PGQRLEWMGMHPNSGSTNYNEKFKGRVTITRDTSASTAYME LSSLRSEDTAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTITVTVSS
VH12 (SEQ ID NO: 32)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQA PGQRLEWMGMHPNSGSTNYNEKFKGRVTLTLDKSASTAYM

	ELSSLRSEDVAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTVTVSS
VH13 (SEQ ID NO: 33)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQA PGQRLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSASTAYME LSSLRSEDVAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTVTVSS
VH14 (SEQ ID NO: 34)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVKQR PGQRLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSASTAYME LSSLRSEDVAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTVTVSS

Соответствующую переменную область тяжелой цепи в приведенной выше таблице связывали с константной областью тяжелой цепи IgG1 человека, представленной в SEQ ID NO: 7, с образованием тяжелой цепи полноразмерного антитела, и переменную область легкой цепи связывали с константной областью легкой к-цепи человека, представленной в SEQ ID NO: 8, с образованием легкой цепи полноразмерного антитела.

Химерное антитело ch1901

Тяжелая цепь ch1901: (SEQ ID NO: 35)

EVQLMESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSDYGIHWVRQAPEMGLEWIAYISRGSSTIYY
ADTVKGRFTMSRDNAKNTLFLQMTSLRSEDVAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTSTV
TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
DKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK;

Легкая цепь ch1901: (SEQ ID NO: 36)

DIVMTQSPSSLSVSAAGEKVTMSCKSSQSLLSGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGAST
RAGVPRFTGSGSGTDFLTITSSVQAEDLAIYHCQNDLYPLTFGAGTKLELKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC;

Химерное антитело ch1902

Тяжелая цепь ch1902: (SEQ ID NO: 37)

EVQLQESGAELVKPGASVKLSCKASGYIFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGMIHPNSGST

NYNEKFKGKATLTLDKSSSTAYMQLSSLPSEDSAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTLTVS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK;

Легкая цепь ch1902 (SEQ ID NO: 38)

DIVLTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNLSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
 ESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAIYYCQNAAYTYPFTFGSGTKLEIKRTVAAPSV
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS
 LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC.

Таблица 6. Гуманизированные антитела mAb1901

Легкие и тяжелые цепи	H1	H2	H3	H4
L1	h1901-1	h1901-2	h1901-3	h1901-4
L2	h1901-5	h1901-6	h1901-7	h1901-8
L3	h1901-9	h1901-10	h1901-11	h1901-12

Последовательности легкой цепи и тяжелой цепи полноразмерных антител являются следующими:

Таблица 7. Последовательности легкой цепи и тяжелой цепи гуманизированных антител mAb1901

Название переменной области (SEQ ID NO:)	Последовательность
L1 (SEQ ID NO: 39)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYGASTRASGVPDRFSGSGSGTDFTLTI SSLQAEDVAVYYCQNDLYYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC

<p>L2 (SEQ ID NO: 40)</p>	<p>DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLNLSGNQKNYLAW YQQKPGQPPKLLIYGASTRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAVYYCQNDLYYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
<p>L3 (SEQ ID NO: 41)</p>	<p>DIVMTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLNLSGNQKNYLAW YQQKPGQPPKLLIYGASTRASGVDPDRFSGSGSGTDFTLTISS LQAEDVAIYHCQNDLYYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC</p>
<p>H1 (SEQ ID NO: 42)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQA PGKGLEWVAYISRGSSSTIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYL QMNSLRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK</p>
<p>H2 (SEQ ID NO: 43)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQA PGKGLEWVAYISRGSSSTIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYL QMTSLRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD</p>

	SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
H3 (SEQ ID NO: 44)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQA PGKGLEWIAYISRGSSSTIYYADTVKGRFTISRDNANKNSLYL QMTSLRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TQKSLSLSPGK
H4 (SEQ ID NO: 45)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYGIHWVRQA PGKGLEWVAYISRGSSSTIYYADTVKGRFTMSRDNANKNSLY LQMTSLRAEDTAVYYCARGGYDTRNAMDYWGQGTTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK

Таблица 8. Гуманизированные антитела mAb1902

Легкие и тяжелые цепи	H11	H12	H13	H14
L11	h1902-1	h1902-2	h1902-3	h1902-4
L12	h1902-5	h1902-6	h1902-7	h1902-8
L13	h1902-9	h1902-10	h1902-11	h1902-12

Последовательности легкой цепи и тяжелой цепи полноразмерных антител являются следующими:

Таблица 9. Последовательности легкой цепи и тяжелой цепи гуманизированных антител mAb1901

Название переменной области (SEQ ID NO:)	Последовательность
L11 (SEQ ID NO: 46)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLTW YQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISL QAEDVAVYYCQNAYTYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
L12 (SEQ ID NO: 47)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSGNQKNYLTWY QQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQ AEDVAVYYCQNAYTYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
L13 (SEQ ID NO: 48)	DIVLTQSPDSLAVSLGERATISCKSSQSLNLSGNQKNYLTWY QQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQ AEDVAVYYCQNAYTYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
H11 (SEQ ID NO: 49)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQ APGQRLEWMGMIHPNSGSTNYNEKFKGRVTITRDTASASTAY MELSSLRSEDVAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTITVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL

	VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
H12 (SEQ ID NO: 50)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQ APGQRLEWMGMIHPNSGSTNYNEKFKGRVTLTLDKSASTA YMELSSLRSED TAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
H13 (SEQ ID NO: 51)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQ APGQRLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSASTAY MELSSLRSED TAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
H14 (SEQ ID NO: 52)	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVVKQ RPGQRLEWIGMIHPNSGSTNYNEKFKGKATLTLDKSASTAY MELSSLRSED TAVYYCARLKTGNSFDYWGQGTTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL

	TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
--	---------------------------------------

Антитело положительного контроля согласно настоящему изобретению представляет собой IMAВ-362 (из WO2016166122).

Тяжелая цепь (SEQ ID NO: 53)

QVQLQPGAE LVRPGASVKL SCKASGYTFT SYWINWVKQRPGGLEWIGN
 IYPSDSYTNV NQKFKDKATL TVDKSSSTAY MQLSSPTSED SAVYYCTRSW
 RGNSFDYWGGTTLTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY
 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI
 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD
 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVY
 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD
 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFCSCVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK;

Легкая цепь (SEQ ID NO: 54)

DIVMTQSPSS LTVTAGEKVT MSCKSSQSL NSGNQKNYLT WYQQKPGQPP
 KLLIYWASTR ESGVPDRFTG SGSGTDFTLT ISSVQAEDLA VYYCQNDYSY
 PFTFGSGTKL EIKRTVAAPS VFIFPPSDEQ LKSGTASVVC LLNMFYPREA
 KVQWKVDNAL QSGNSQESVT EQDSKDSTYS LSSTLTLSKA
 DYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC.

Вышеуказанные антитела клонировали, экспрессировали и очищали с использованием обычных способов клонирования генов и рекомбинантной экспрессии.

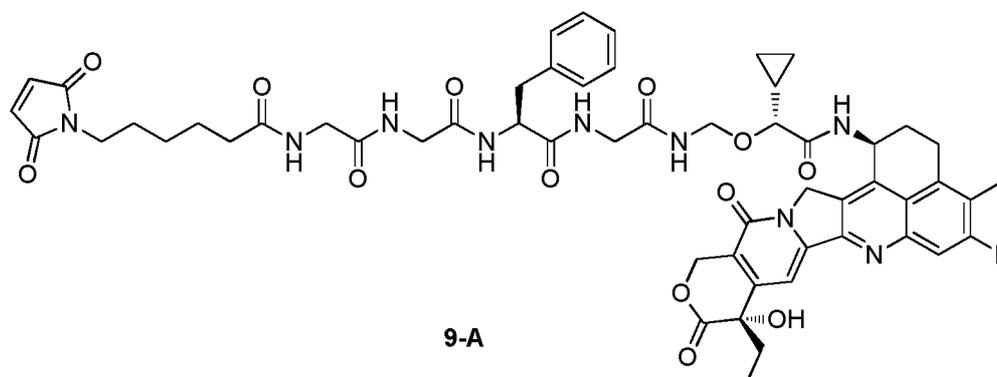
Получение конъюгатов ADC на основании антитела к клаудину 18.2

Лекарственное средство

Лекарственный фрагмент конъюгатов ADC на основании антитела к клаудину 18.2 по настоящему изобретению может представлять собой любое подходящее лекарственное средство. Особенно подходящие лекарственные средства описаны, например, в публикации PCT № WO2020063676A1, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Соединение 9A согласно настоящему изобретению представляет собой

N-((2R,10S)-10-бензил-2-циклопропил-1-(((1S,9S)-9-этил-5-фтор-9-гидрокси-4-метил-10,13

-диоксо-2,3,9,10,13,15-гексагидро-1Н,12Н-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-б]хинолин-1-ил)амино)-1,6,9,12,15-пентаоксо-3-окса-5,8,11,14-тетраазагексадец-16-ил)-6-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)гексанамид, которые имеет структуру, представленную ниже:



Анализ нагрузки лекарственным средством исходного раствора ADC

1. Метод UV-HPLC

Кюветы, содержащие буфер сукцинат натрия, помещали отдельно в эталонную ячейку и ячейку образца, и вычитали значение оптической плотности холостого растворителя. Затем в ячейку образца помещали кювету, содержащую раствор тестируемого образца, и определяли значения оптической плотности при 280 нм и 370 нм.

Расчет: нагрузку исходного раствора ADC определяли с помощью спектроскопии в ультрафиолетовой области спектра (прибор: спектрофотометр в ультрафиолетовой области спектра Thermo nanodrop 2000), исходя из принципа, что суммарное значение оптической плотности исходного раствора ADC при определенной длине волны представляет собой сумму значений оптической плотности лекарственного средства и моноклонального антитела при этой длине волны, а именно:

$$(1) A_{280 \text{ нм}} = \epsilon_{\text{mab-280}} b C_{\text{mab}} + \epsilon_{\text{лекарственное средство-280}} b C_{\text{лекарственное средство}}$$

$\epsilon_{\text{лекарственное средство-280}}$: средний молярный коэффициент ослабления лекарственного средства при 280 нм составляет 5100;

$C_{\text{лекарственное средство}}$: концентрация лекарственного средства;

$\epsilon_{\text{mab-280}}$: средний молярный коэффициент ослабления исходного раствора моноклонального антитела при 280 нм составляет 214600;

C_{mab} : концентрация исходного раствора моноклонального антитела;

b : оптическая длина пути составляет 1 см.

Аналогично, уравнение для значения общей оптической плотности образца при 370 нм может быть представлено как:

$$(2) A_{370 \text{ нм}} = \epsilon_{\text{mab-370}} b C_{\text{mab}} + \epsilon_{\text{лекарственное средство-370}} b C_{\text{лекарственное средство}}$$

$\epsilon_{\text{лекарственное средство-370}}$: средний молярный коэффициент ослабления лекарственного

средства при 370 нм составляет 19000;

$C_{\text{лекарственное средство}}$: концентрация лекарственного средства;

$\epsilon_{\text{mab-370}}$: коэффициент ослабления моноклонального антитела при 370 нм составляет 0;

C_{mab} : концентрация исходного раствора моноклонального антитела;

b : оптическая длина пути составляет 1 см.

Нагрузка лекарственным средством может быть рассчитана с использованием как уравнения (1), так и (2), а также коэффициентов ослабления моноклонального антитела и лекарственного средства при обеих длинах волн и их концентраций.

Нагрузка лекарственным средством = $C_{\text{лекарственное средство}}/C_{\text{mab}}$.

2. Метод RP-HPLC

Голое антитело и тестируемый образец ADC (в концентрации 1 мг/мл) восстанавливали 4 мкл DDT (sigma) на водяной бане при 37 °C в течение 1 часа, а затем переносили во вставку. Анализ проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Agilent 1200 с Agilent PLRP-S 1000A 8 мкм 4,6×250 мм, выбранной в качестве хроматографической колонки, температурой колонки 80 °C, детектором DAD (детектор с диодной матрицей) при длине волны 280 нм, скоростью потока 1 мл/мин и объемом введения 40 мкл. Сравнение проводили между спектрами образца и голого антитела для идентификации мест расположения легкой цепи и тяжелой цепи, а затем проводили интеграцию на спектре тестируемого образца для вычисления значения DAR.

Приготовление растворов:

1) 0,25 М раствор DTT (дителиотреитол):

Пример получения: 5,78 мг DTT взвешивали в 150 мкл очищенной воды и полностью растворяли с получением 0,25 М раствора DTT, который затем хранили при минус 20 °C.

2) Подвижная фаза А (0,1% TFA (трифторуксусная кислота) в воде):

Пример получения: 1000 мл очищенной воды отмеряли с помощью градуированного цилиндра и добавляли 1 мл TFA (sigma). Раствор хорошо перемешивали перед использованием и хранили при 2-8 °C в течение 14 дней.

3) Подвижная фаза В (0,1% TFA в ацетонитриле):

Пример получения: 1000 мл ацетонитрила измеряли с помощью градуированного цилиндра и добавляли 1 мл TFA. Раствор хорошо перемешивали перед использованием и хранили при 2-8 °C в течение 14 дней.

Анализ данных:

Сравнение проводили между спектрами образца и голого антитела для идентификации мест расположения легкой цепи и тяжелой цепи, а затем проводили интеграцию на спектре тестируемого образца для вычисления значения DAR.

Формула расчета выглядит следующим образом:

Таблица 10. Таблица маркеров нагрузки лекарственным средством для легких цепей и тяжелых цепей ADC

Наименование	Количество связанных лекарственных средств
LC	0
LC+1	2
HC	0
HC+1	2
HC+2	4
HC+3	6

Общая площадь пика LC = площадь пика LC + площадь пика LC+1;

Общая площадь пика HC = площадь пика HC + площадь пика HC+1 + площадь пика HC+2 + площадь пика HC+3;

$LC\ DAR = \Sigma(\text{количество связанных лекарственных средств} \times \text{процентная площадь пика}) / \text{общая площадь пика LC};$

$HC\ DAR = \Sigma(\text{количество связанных лекарственных средств} \times \text{процентная площадь пика}) / \text{общая площадь пика HC};$

$DAR = LC\ DAR + HC\ DAR.$

Пример 1-4: ADC-1/ADC-2

К буферу PBS (фосфатно-солевой буферный раствор), содержащему антитело h1902-5 (0,05 М буфер PBS с pH 6,5; 10,0 мг/мл, 320,0 мл, 21,62 мкмоль), добавляли при 37 °C водный раствор трис(2-карбок시에тил)фосфина (ТСЕР) (10 мМ, 11,03 мл, 110,3 мкмоль). Смесь подвергали реакции на водяной бане с шейкером при 37 °C в течение 3 ч, а затем реакцию прекращали.

Реакционную смесь охлаждали до 25 °C на водяной бане, а затем к реакционной смеси добавляли раствор соединения 9-А (350 мг, 303 моль) в 13,2 мл ацетонитрила и 6,6 мл ДМСО (диметилсульфоксид). Смесь подвергали реакции на водяной бане при 25 °C

в течение 3 ч, а затем реакцию прекращали.

Реакционную смесь очищали через ультрафильтрационную мембрану для удаления мелких молекул. Очистку проводили с использованием 5 л 50 мМ буфера PBS с pH 6,5 (4% ацетонитрил и 2% ДМСО), а затем 5 л 10 мМ буфера на основе янтарной кислоты с pH 5,3. Затем к очищенному раствору добавляли сахарозу до 60 мг/мл и твин-20 до 0,2 мг/мл для получения ADC-1 (10 мМ сукцинатный буфер с pH 5,3; 10 мг/мл, 2,626 г), выход: 81,81 %. Затем ADC-1 составляли в виде лиофилизированного порошка 20 мг/флакон.

Среднее значение, рассчитанное методом UV-HPLC: $n = 6,8$.

ADC-2 ($n = 7,1$) можно получить с использованием вышеуказанного способа с антителом h1901-11 (вместо h1902-5) и соединением 9-A.

Пример 1-5: ADC-3

К водному буферу PBS, содержащему антитело h1901-11 (0,05 М водный буфер PBS с pH 6,5; 10,0 мг/мл, 1 мл, 67,5 нмоль), добавляли при 37 °C подготовленный водный раствор ТСЕР (10 мМ, 10,1 мкл, 101 нмоль). Смесь подвергали реакции на водяной бане при 37 °C в течение 3 ч, а затем реакцию прекращали. Реакционную смесь охлаждали до 25 °C на водяной бане.

Соединение 9-A (0,58 мг, 540 нмоль) растворяли в 34 мкл ДМСО и добавляли полученный раствор к вышеуказанной реакционной смеси. Смесь подвергали реакции на водяной бане с шейкером при 25 °C в течение 3 ч, а затем реакцию прекращали. Реакционную смесь обессоливали и очищали через гелевую колонку Sephadex G25 (элюирующая фаза: 0,05 М водный буфер PBS с pH 6,5, содержащий 0,001 М ЭДТА) с получением ADC-3 в буфере PBS (0,72 мг/мл, 11,2 мл), который затем хранили при 4 °C. Среднее значение, рассчитанное методом RP-HPLC: $n = 2,51$.

Пример 1-6: ADC-4

К водному буферу PBS, содержащему антитело h1901-11 (0,05 М водный буфер PBS с pH 6,5; 10,0 мг/мл, 1 мл, 67,5 нмоль), добавляли при 37 °C подготовленный водный раствор ТСЕР (10 мМ, 16,9 мкл, 169 нмоль). Смесь подвергали реакции на водяной бане с шейкером при 37 °C в течение 3 ч, а затем реакцию прекращали. Реакционную смесь охлаждали до 25 °C на водяной бане.

Соединение 9-А (0,73 мг, 680 нмоль) растворяли в 43 мкл ДМСО и добавляли полученный раствор к вышеуказанной реакционной смеси. Смесь подвергали реакции на водяной бане с шейкером при 25 °С в течение 3 ч, а затем реакцию прекращали. Реакционную смесь обессоливали и очищали через гелевую колонку Sephadex G25 (элюирующая фаза: 0,05 М водный буфер PBS с рН 6,5, содержащий 0,001 М ЭДТА) с получением ADC-4 в буфере PBS (0,62 мг/мл, 12,5 мл), который затем хранили при 4 °С. Среднее значение, рассчитанное методом RP-HPLC: $n = 4,06$.

Пример 1-7: ADC-5

К водному буферу PBS антитела h1901-11 (0,05 М водный буфер PBS с рН 6,5; 10,0 мг/мл, 1 мл, 67,5 нмоль) добавляли при 37 °С подготовленный водный раствор ТСЕР (10 мМ, 35,8 мкл, 358 нмоль). Смесь подвергали реакции на водяной бане с шейкером при 37 °С в течение 3 ч, а затем реакцию прекращали. Реакционную смесь охлаждали до 25 °С на водяной бане.

Соединение 9-А (1,09 мг, 1015 нмоль) растворяли в 64 мкл ДМСО и добавляли полученный раствор к вышеуказанной реакционной смеси. Смесь подвергали реакции на водяной бане с шейкером при 25 °С в течение 3 ч, а затем реакцию прекращали. Реакционную смесь обессоливали и очищали через гелевую колонку Sephadex G25 (элюирующая фаза: 0,05 М водный буфер PBS с рН 6,5, содержащий 0,001 М ЭДТА) с получением ADC-5 в буфере PBS (0,54 мг/мл, 12,5 мл), который затем хранили при 4 °С. Среднее значение, рассчитанное методом RP-HPLC: $n = 6,8$.

Пример 1-8: ADC-6

К водному буферу PBS антитела h1902-5 (0,05 М водный буфер PBS с рН 6,5; 10,0 мг/мл, 1,08 мл, 72,9 нмоль) добавляли при 37 °С подготовленный водный раствор ТСЕР (10 мМ, 10,9 мкл, 109 нмоль). Смесь подвергали реакции на водяной бане с шейкером при 37 °С в течение 3 ч, а затем реакцию прекращали. Реакционную смесь охлаждали до 25 °С на водяной бане.

Соединение 9-А (0,63 мг, 587 нмоль) растворяли в 40 мкл ДМСО и добавляли полученный раствор к вышеуказанной реакционной смеси. Смесь подвергали реакции на водяной бане с шейкером при 25 °С в течение 3 ч, а затем реакцию прекращали. Реакционную смесь обессоливали и очищали через гелевую колонку Sephadex G25

(элюирующая фаза: 0,05 М водный буфер PBS с pH 6,5, содержащий 0,001 М ЭДТА) с получением ADC-6 в буфере PBS (0,7 мг/мл, 13,0 мл), который затем хранили при 4 °С. Среднее значение, рассчитанное методом RP-HPLC: n = 2,69.

Пример 1-9: ADC-7

К водному буферу PBS антитела h1902-5 (0,05 М водный буфер PBS с pH 6,5; 10,0 мг/мл, 1,08 мл, 72,9 нмоль) добавляли при 37 °С подготовленный водный раствор ТСЕР (10 мМ, 18,3 мкл, 183 нмоль). Смесь подвергали реакции на водяной бане с шейкером при 37 °С в течение 3 ч, а затем реакцию прекращали. Реакционную смесь охлаждали до 25 °С на водяной бане.

Соединение 9-А (0,79 мг, 736 нмоль) растворяли в 50 мкл ДМСО и добавляли полученный раствор к вышеуказанной реакционной смеси. Смесь подвергали реакции на водяной бане с шейкером при 25 °С в течение 3 ч, а затем реакцию прекращали. Реакционную смесь обессоливали и очищали через гелевую колонку Sephadex G25 (элюирующая фаза: 0,05 М водный буфер PBS с pH 6,5, содержащий 0,001 М ЭДТА) с получением ADC-7 в буфере PBS (0,6 мг/мл, 14,0 мл), который затем хранили при 4 °С. Среднее значение, рассчитанное методом RP-HPLC: n = 4,25.

Пример 1-10: ADC-8

К водному буферу PBS антитела h1902-5 (0,05 М водный буфер PBS с pH 6,5; 10,0 мг/мл, 1,08 мл, 72,9 нмоль) добавляли при 37 °С подготовленный водный раствор ТСЕР (10 мМ, 38,7 мкл, 387 нмоль). Смесь подвергали реакции на водяной бане с шейкером при 37 °С в течение 3 ч, а затем реакцию прекращали. Реакционную смесь охлаждали до 25 °С на водяной бане.

Соединение 9-А (1,18 мг, 1099 нмоль) растворяли в 70 мкл ДМСО и добавляли полученный раствор к вышеуказанной реакционной смеси. Смесь подвергали реакции на водяной бане с шейкером при 25 °С в течение 3 ч, а затем реакцию прекращали. Реакционную смесь обессоливали и очищали через гелевую колонку Sephadex G25 (элюирующая фаза: 0,05 М водный буфер PBS с pH 6,5, содержащий 0,001 М ЭДТА) с получением ADC-8 в буферном растворе PBS (0,56 мг/мл, 14,2 мл), который затем хранили при 4 °С. Среднее значение, рассчитанное RP-HPLC: n = 7,01.

Пример 1-11: ADC-9

К буферу гистидин-ацетат-трис/ЭДТА (буфер на основе 10 мМ гистидин-ацетат-триса с pH 7,2 и 2,5 мМ ЭДТА; 20,6 г/л, 6,49 л, 0,91 ммоль), содержащему антитело h1902-5, добавляли при 12 °С подготовленный гистидиновый буфер TSEP (10 мМ гистидиновый буфер; 1,717 мМ, 1,16 л, 1,99 ммоль). Смесь перемешивали на водяной бане при постоянной температуре 12 °С в течение 2 ч, а затем реакцию прекращали с получением раствора промежуточного соединения I.

Соединение 9-А (4,72 г, 4,39 ммоль) растворяли в 0,38 л ДМСО с получением раствора соединения 9-А в ДМСО. К вышеуказанному раствору промежуточного соединения I добавляли предварительно 0,38 л ДМСО, а затем раствор соединения 9-А в ДМСО. Смесь перемешивали на водяной бане при постоянной температуре 12 °С в течение 1 ч, а затем реакцию прекращали.

Реакционную смесь очищали с помощью катионной хроматографической колонки Capto S Impact, которую промывали 9 объемами колонки с 0,05 М ацетатным буфером, содержащим 10% (об./об.) ДМСО (pH = 5,0), и 6 объемами колонки с 0,05 М ацетатным буфером (pH = 5,0), с последующим элюированием 0,05 М уксусной кислотой и 0,30 М хлоридно-натриевым буфером (pH = 5,5) для удаления свободных токсинов и остаточного растворителя из реакционной смеси. Катионный элюат подвергали 7-кратной объемной равнообъемной ультрафильтрации (в качестве ультрафильтрационной мембраны использовали полицеллюлозную мембрану 30 кДа) при 22 °С с получением ADC-9 в качестве продукта. Среднее значение, рассчитанное методом RP-HPLC: n = 4,1.

Биологическая оценка

Тестовый пример 1: Анализ связывания ELISA на клеточном уровне

Для тестирования связывающих свойств антител к клаудину 18.2 использовали клеточный анализ ELISA. Стабильно трансфицированные клетки NUGC4, экспрессирующие клаудин 18.2, культивировали в 96-луночном клеточном планшете (Corning, 3599). При росте до 90% плотности клетки иммобилизовали 4% параформальдегидом в течение 1 ч. Планшет промывали 3 раза буфером PBST (PBS с pH 7,4, содержащий 0,05% твин-20) и добавляли блокирующий раствор на основе разбавленного PBS 5% обезжиренного молока (порошкообразное обезжиренное молоко от

Brightdairy) при 200 мкл/лунку. Планшет инкубировали в инкубаторе при 37 °С в течение 2,5 ч или оставляли стоять при 4 °С в течение ночи (16-18 ч) для блокирования. После блокировки блокирующий раствор удаляли. Планшет промывали 3 раза буфером PBST, а затем добавляли тестируемое антитело, которое разбавляли разбавителем образца (PBS с рН 7,4, содержащий 1% обезжиренное молоко) до различных концентраций, при 50 мкл/лунку. Планшет инкубировали в инкубаторе при 37 °С в течение 2 ч. После инкубации планшет промывали 5 раз PBST и добавляли меченное HRP (хреносодержащая пероксидаза) вторичное анти-человеческое антитело козы (Jackson Immuno Research, 109-035-003), которое разбавляли разбавителем образца, при 100 мкл/лунку. Планшет инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. Планшет промывали 6 раз PBST, а затем добавляли хромогенный ТМВ (тетраметилбензидиновый) субстрат (KPL, 52-00-03) при 50 мкл/лунку. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 10-15 мин, и реакцию останавливали добавлением 1 М H₂SO₄ при 50 мкл/лунку. Оптическую плотность при 450 нм считывали с помощью считывающего устройства для микропланшетов MD Versa Max ТМ и рассчитывали значение EC50 связывания антитела к клаудину 18.2 с клаудином 18.2.

Таблица 11. Связывающая активность антител

Антитело	IMAB362	ch1901	ch1902
E _{max}	1,175	1,399	1,272
EC50 (нМ)	0,108	0,098	0,074

Таблица 12. Связывающая активность гуманизированных антител mAb1901

Антитело	E _{max}	EC50 (нМ)
IMAB362	1,115	0,086
h1901-2	1,039	0,076
h1901-3	1,1055	0,22
h1901-4	0,986	0,201
h1901-6	0,937	0,091
h1901-7	0,921	0,166
h1901-8	1,047	0,091

h1901-11	1,44	0,076
h1901-12	1,22	0,116

Таблица 13. Связывающая активность гуманизированных антител mAb1902

Антитело	E _{max}	EC ₅₀ (нМ)
IMAB362	0,88	0,187
h1902-1	0,87	0,113
h1902-2	0,88	0,107
h1902-3	0,84	0,175
h1902-4	0,82	0,087
h1902-5	0,9	0,098
h1902-6	0,78	0,141
h1902-7	0,75	0,121
h1902-8	0,89	0,132
h1902-9	0,75	0,137
h1902-10	0,89	0,133

Тестовый пример 2: Анализ связывания антител на клеточном уровне

Стабильно трансфицированные клетки NUGC4, экспрессирующие клаудин 18.2, суспендировали в буфере FACS (2% фетальная бычья сыворотка (Gibco, 10099141), PBS с pH 7,4 (Sigma, P4417-100TAB)) с получением клеточной суспензии 1×10^6 клеток/мл, которую затем добавляли к 96-луночному круглодонному планшету (Corning, 3795) при 100 мкл/лунку. После центрифугирования и удаления супернатанта, тестируемое антитело к клаудину 18.2, которое разбавляли буфером FACS до различных концентраций, добавляли при 50 мкл/лунку. Планшет инкубировали в темноте в холодильнике при 4 °C в течение 1 ч. Планшет 3 раза промывали буфером FACS путем центрифугирования при 300 g и добавляли антитело козы к IgG человека, покрытое Alexa Fluor 488 (H+L) (Invitrogen, A-11013), в рабочей концентрации. Планшет инкубировали в темноте в холодильнике при 4 °C в течение 40 мин. Планшет промывали 3 раза буфером FACS путем центрифугирования при 300 g и тестировали на проточном цитометре BD FACS CantoII на

геометрическую среднюю интенсивность флуоресценции. Рассчитывали значения EC50 связывания антител с клаудином 18.2 со стабильно трансфицированными клетками NUGC4, экспрессирующими клаудин 18.2. Результаты показаны на Фиг. 1.

Тестовый пример 3: Анализ эндоцитоза антител

Тестируемое антитело к клаудину 18.2, предварительно меченное DyLight 488 NHS Ester (thermofisher, 46403), добавляли к 1×10^6 /мл стабильно трансфицированных клеток NUGC4, экспрессирующих клаудин 18.2, в конечной концентрации 5 мкг/мл. Смесь инкубировали в темноте на льду в течение 1 ч и 3 раза промывали предварительно охлажденным буфером FACS (PBS с pH 7,4, 2% фетальная бычья сыворотка) путем центрифугирования. После удаления супернатанта остаток добавляли к предварительно нагретой полной среде с последующей инкубацией в клеточном инкубаторе при 37 °C с 5% CO₂. Клетки извлекали через 0, 0,5, 1, 2 и 4 ч и хранили в темноте на льду. После того, как все образцы были собраны, каждый из них центрифугировали при 300 g при низкой температуре для удаления супернатанта. Добавляли элюирующий буфер (pH 1,7, 0,05 M глицин, 0,1 M хлорид натрия), а затем смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 7 мин, промывали один раз буфером FACS путем центрифугирования при 300 g и тестировали на проточном цитометре BD FACS CantoII на геометрическую среднюю интенсивность флуоресценции. Рассчитывали эффективность эндоцитоза антитела к клаудину 18.2 стабильно трансфицированными клетками NUGC4, экспрессирующими клаудин 18.2. Результаты (см. фиг. 2) показывают, что гуманизированные антитела обладают хорошей эффективностью эндоцитоза.

Тестовый пример 4: Анализ аффинности антител на основе проточной цитометрии

В день эксперимента клетки HEK293/hClaudin18.2 собирали в 96-луночный планшет с U-образным дном по 1×10^5 - 2×10^5 клеток на лунку. Добавляли антитело к клаудину 18.2 человека, которое было 2-кратно разбавлено последовательно (12 точек концентрации) от начальной концентрации 5 мкг/мл, и планшет инкубировали при 4 °C в течение 1 ч. IMAV362 использовали в качестве положительного контроля, и также устанавливали отрицательный контроль без антитела. Антитело удаляли путем центрифугирования и добавляли FITC (флуоресцеин изотиоцианат)-меченное антитело к

Fc IgG человека (200×) при 100 мкл/лунку. Планшет инкубировали в темноте при 4 °C в течение 30 мин и дважды промывали PBS + 2% FBS перед анализом методом проточной цитометрии. BD FACS CantoII запускали и предварительно нагревали, а затем запускали программное обеспечение BD FACSDiva, чтобы начать новый эксперимент. Тестировали образец отрицательного контроля HEK293/hClaudin18.2, и напряжения FSC и SSC были скорректированы до соответствующих значений и сохранены. Холостой образец В и стандартную кривую 1 тестировали в соответствии с инструкциями для набора Quantum™ FITC-5 MESF Kit, и напряжение FITC регулировали до соответствующего значения и сохраняли. Образцы в 96-луночном планшете с U-образным дном тестировали при сохраненном напряжении и записывали данные. Экспериментальные данные анализировали с использованием программного обеспечения Flowjo для получения геометрического (Geo) среднего, и стандартную кривую MESF (молекулы эквивалентного растворимого флуорохрома)-геометрическое среднее подгоняли в соответствии с инструкциями для набора Quantum™ FITC-5 MESF Kit. Молярную концентрацию антитела к клаудину 18.2 человека, связанного с клетками HEK293/hClaudin18.2, и концентрацию свободного антитела рассчитывали в соответствии со значением флуоресценции концентрации FITC-меченного антитела к Fc IgG человека, и V_{max} и константу диссоциации KD антитела рассчитывали с помощью графиков Скэтчарда. Результаты представлены в таблице 14.

Таблица 14. Аффинность гуманизированных антител на клеточном уровне

Антитело	IMAB362	h1901-11	h1902-5
KD (нМ)	10,2	6,8	1,64

Тестовый пример 5. Оценка эффекта ADCC антител

Различные клетки NUGC4 (экспрессирующие клаудин 18.2 на высоких, умеренных и низких уровнях) расщепляли, центрифугировали при 1000 об/мин, ресуспендировали и подсчитывали. Клетки ресуспендировали при плотности 3×10^5 клеток/мл в RPMI 1640 без фенолового красного (Gibco, 11835-030) с добавлением 10% FBS (новозеландская эмбриональная бычья сыворотка со сверхнизким IgG, Gibco, 1921005PJ). Клетки добавляли в 96-луночный планшет (Corning, 3903) при 25 мкл/лунку (7500 клеток/лунку). Антитело разбавляли в среде без фенолового красного с получением 3-кратного

разбавления антитела, которое затем добавляли к клеточному планшету при 25 мкл/лунку. Планшет инкубировали в инкубаторе при 37 °C с 5% CO₂ в течение 0,5 ч.

Эффекторные клетки (клетки FcR3A-V158-NFAT-RE-Jurkat) собирали, центрифугировали при 1000 об/мин, ресуспендировали и подсчитывали. Клетки ресуспендировали при плотности 3×10^6 клеток/мл в RPMI 1640 без фенолового красного с добавлением 10% FBS (новозеландская фетальная бычья сыворотка со сверхнизким IgG), и в планшет добавляли по 25 мкл/лунку ($7,5 \times 10^4$ клеток/лунку). Планшет инкубировали в инкубаторе при 37 °C с 5% CO₂ в течение 6 ч.

Bright-Glo (Promega, E2610) добавляли в планшет по 75 мкл/лунку, и определяли химическую люминесценцию с помощью считывающего устройства для микропланшетов (PerkinElmer, VITOR3).

Результаты (см. Таблицу 15 и фиг. 3A-3C) показывают, что как антитела h1901-11, так и антитела h1902-5 демонстрируют высокую активность ADCC в клетках NUGC4, экспрессирующих клаудин 18.2 при низких уровнях (фиг. 3A), при умеренных уровнях (фиг. 3B) и при высоких уровнях (фиг. 3C).

Таблица 15. Эффект ADCC антител в клетках NUGC4, экспрессирующих клаудин 18.2 на различных уровнях

Единица IC₅₀ (нг/мл)

Уровень экспрессии клаудин 18.2	h1901-11	h1902-5	IMAB362
Низкий	22,42	35,46	183,4
Умеренный	15,35	30,00	210,4
Высокий	26,17	32,16	132,6

Тестовый пример 6: Анализ клеточной активности молекул ADC

Анализы жизнеспособности клеток на основе люминесценции CellTiter-Glo использовали для тестирования молекул ADC на эффекты уничтожения *in vitro* штамма клеток рака желудка человека в этом эксперименте. В день 1 собирали клетки NUGC4 с низкой экспрессией клаудина 18.2, клетки NUGC4 с умеренной экспрессией клаудина 18.2 и клетки NUGC4 с высокой экспрессией клаудина 18.2, доводили до плотности $2,5 \times 10^4$ /мл и добавляли в 96-луночный белый прозрачный планшет по 90 мкл/лунку с около 2500 клетками на лунку. Клетки культивировали в течение ночи в инкубаторе при 37 °C с

5% CO₂. На день 2 образцы разбавляли 4-кратно серийно от начальной концентрации 5 мкМ в 96-луночном планшете с U-образным дном для получения 9 точек концентрации, и разбавленные образцы добавляли в клеточный планшет по 10 мкл/лунку. Клетки культивировали при 37 °С в 5% CO₂ в течение 6 дней. На день 8 планшет для культивирования клеток извлекали и добавляли реагент Cell Titer-Glo при 50 мкл/лунку. Планшет оставляли стоять при комнатной температуре в течение 2-3 минут и анализировали на считывающем устройстве для микропланшетов PHERAstar FS на предмет показаний флуоресценции. Анализ данных выполнялся с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. См. таблицу 16.

Таблица 16. Эксперимент по уничтожению клеток *in vitro* с помощью ADC

ADC	Клетки NUGC4 с низкой экспрессией клаудина 18.2		Клетки NUGC4 с умеренной экспрессией клаудина 18.2		Клетки NUGC4 с высокой экспрессией клаудина 18.2	
	EC50 (нМ)	E _{max}	EC50 (нМ)	E _{max}	EC50 (нМ)	E _{max}
ADC-1	126,8	66,7	23,6	82,1	1,3	91,5
ADC-2	109,0	69,8	16,8	82,3	1,9	91,1
ADC-3	более 500	49,0			94	78,7
ADC-4	299	61,03			12	84,97
ADC-5	142	69,91			3,5	95,89
ADC-6	более 500	45,22			11	78,00
ADC-7	284	61,09			3,9	88,51
ADC-8	154	66,74			1,3	97,15

Тестовый пример 7: Оценка эффективности молекул ADC *in vivo*

Голых мышей Balb/c подкожно инокулировали в правый бок клетками рака желудка человека NUGC4 (экспрессирующими клаудин 18.2 на умеренных уровнях) (5×10^6 , содержащие 50% матригеля/мышь). Мышей разделяли в общей сложности на 8 групп по 8 в день 0. Средний объем опухоли составлял около 84,41 мм³.

Каждой мышке внутрибрюшинно вводили ADC в концентрации 0,1 мл/10 г массы тела в дни 0, 4 и 11, выполняя в общей сложности 3 инъекции.

Каждой мыши внутрибрюшинно вводили ADC в концентрации 0,1 мл/10 г массы тела со дня группировки с интервалами в 5 дней, в общей сложности 4 инъекции.

Объемы опухоли и массы тела измеряли два раза в неделю, а результаты записывали.

Использовали статистическое программное обеспечение Excel 2003. Средние значения рассчитывали как среднее (avg); значения CO (стандартное отклонение) рассчитывали как STDEV (квадратный корень дисперсии выборки); значения SEM (стандартная ошибка среднего) рассчитывали как STDEV/SQRT (квадратный корень); и разность значения P между группами рассчитывали как TTEST.

Объем опухоли (V) рассчитывали как: $V = 1/2 \times L_{\text{длинная}} \times L_{\text{короткая}}^2$

Относительный объем (RTV) = VT/V_0

Степень ингибирования опухоли (%) = $(CRTV - TRTV)/CRTV$ (%),

где V_0 и V_T представляют собой объем опухоли в начале эксперимента (день первого введения определяется как день 0) и объем опухоли в конце эксперимента, соответственно; CRTV и TRTV представляют собой относительные объемы опухоли группы холостого контроля (носитель) и экспериментальных групп, соответственно, в конце эксперимента. Результаты показаны в таблице 17 и Фиг. 4 и 5.

Таблица 17. Результаты ингибирования опухолей с помощью ADC

Группа	Средний объем опухоли (мм ³)		Средний объем опухоли (мм ³)		Относительный объем опухоли		% степень ингибирования опухоли D32
	D0	SEM	D32	SEM	D0	SEM	
Группа холостого контроля	83,33	0,82	2067,0	102,24	24,83	1,27	-
ADC-2, 10 мг/кг	83,93	1,65	263,13	44,17	3,11	0,51	87,47 %**
ADC-2, 3 мг/кг	84,35	1,83	328,95	45,04	3,86	0,48	84,45 %**
ADC-1 10 мг/кг	83,60	1,61	123,80	20,99	1,48	0,25	94,04 %**
ADC-1 3 мг/кг	86,84	1,91	356,41	55,18	4,06	0,58	83,65 %**

по сравнению с контрольной группой холостого раствора: **p < 0,01.

II. Композиция

Приборы, используемые при получении композиции, и метод определения и расчета результатов показаны ниже.

SEC молекулярная эксклюзионная хроматография:

Это метод анализа разделения растворенного вещества по относительному отношению между размером пор геля и размером спирали молекулы образца полимера.

$SEC\% \text{ (SEC процентное содержание мономера)} = A \text{ мономера}/A \text{ общая} \times 100\%$ (A мономер представляет собой площадь пика для основного пика мономера в образце, и A общая представляет собой сумму площадей всех пиков).

Прибор для SEC измерения: Agilent 1260; колонка: вода, XBrige BEH200Å SEC (300×7,8 мм 3,5 мкм).

Капиллярный гель-электрофорез CE:

Это способ перемещения геля в капилляр в качестве поддерживающей среды для электрофореза и разделения в соответствии с молекулярной массой образца при определенном напряжении.

Сниженный процент чистоты CE = $A \text{ основной пик}/A \text{ общая} \times 100\%$ (A основной пик представляет собой площадь основного пика легкой цепи + площадь основного пика тяжелой цепи, и A общая представляет собой сумму всех площадей пика).

Прибор для определения CE: Beckman, модель: plus800.

Измерение осмотического давления:

Для измерения осмотического давления использовали метод определения точки замерзания. Точку замерзания раствора измеряли с помощью высокочувствительного термочувствительного элемента на основе пропорционального соотношения между величиной понижения температуры замерзания и молярной концентрацией раствора, а затем преобразовывали в осмотическое давление через электрический заряд. Производитель прибора: Loser, модель: OM815.

Определение концентрации белка:

Поскольку лекарственное средство в конъюгате антитела и лекарственного средства поглощало свет при 280 нм, концентрацию белка корректировали с использованием следующих формул:

$$A_{280} = C_d \times \epsilon_{280d} + C_{mab} \times \epsilon_{280mab};$$

$$A_{370} = C_d \times \epsilon_{370d};$$

где C_d представляет собой концентрацию лекарственного средства, C_{tab} представляет собой концентрацию белка, ϵ_{280d} представляет собой коэффициент ослабления лекарственного средства при 280 нм, ϵ_{280tab} представляет собой коэффициент ослабления белка при 280 нм, и ϵ_{370d} представляет собой коэффициент ослабления лекарственного средства при 370 нм. $\epsilon_{280tab} = 1,49 \text{ мг}^{-1} \times \text{см}^{-1} \times \text{мл}$, $\epsilon_{280d} = 5000$ (молярный коэффициент ослабления лекарственного средства при 280 нм)/1074,13 (молекулярная масса лекарственного средства) = $4,65 \text{ мг}^{-1} \times \text{см}^{-1} \times \text{мл}$, $\epsilon_{370d} = 19000$ (молярный коэффициент ослабления лекарственного средства при 370 нм)/1074,13 (молекулярная масса лекарственного средства) = $17,69 \text{ мг}^{-1} \times \text{см}^{-1} \times \text{мл}$, где вышеуказанные коэффициенты ослабления являются массовыми коэффициентами ослабления.

Прибор для измерения концентрации белка: спектрофотометр в УФ/видимом спектре; модель: Nano Drop oneC; длина оптического пути: 1 мм.

Пример 2-1: Скрининг буферной системы и значений pH композиций

Получали композиции, содержащие 20 мг/мл (концентрация белка) ADC-9 и следующие различные буферные системы, а также 0,1 мг/мл полисорбата 80 (PS80).

- 1) 10 мМ лимонная кислота-цитрат натрия (CA), pH 5,5
- 2) 10 мМ янтарная кислота-сукцинат натрия (SA), pH 5,0
- 3) 10 мМ янтарная кислота-сукцинат натрия, pH 5,5
- 4) 10 мМ гистидин гидрохлорид (His-HCl), pH 5,5
- 5) 10 мМ гистидин гидрохлорид, pH 6,0
- 6) 10 мМ гистидин гидрохлорид, pH 6,5
- 7) 10 мМ гистидин-ацетат (His-AA), pH 5,0
- 8) 10 мМ гистидин-ацетат, pH 5,5
- 9) 10 мМ фосфат (PB), pH 6,5.

Каждую из композиций фильтровали, бутилировали, закрывали пробками и закупоривали крышками. Образцы отбирали для тестирования высокотемпературной стабильности (40 °C) и тестирования на встряхивание (25 °C, 300 об/мин) и исследовали на внешний вид, SEC и сниженный CE. Результаты представлены в таблице 18.

После 11 дней встряхивания только образцы 2), 3), 7) и 9) были прозрачными по внешнему виду. Через 15 дней хранения при 40 °C образцы 1), 2), 3), 7) и 8) были

прозрачными по внешнему виду. То есть образцы 2), 3) и 7) были лучше с точки зрения внешнему виду.

Через 15 дней хранения при 40 °С образцы анализировали с помощью SEC, и результаты показали, что в образцах 4), 5), 6), 7) и 8) наблюдалось снижение на около 4 % в мономере, и в других композициях наблюдалось снижение на 7-10 % в мономере.

Через 15 дней хранения при 40 °С образцы анализировали с помощью сниженного SE, и результаты показывают, что образцы 4), 5), 7) и 8) показали снижение на около 1-2 % в основном пике, что лучше, чем у других образцов.

Согласно приведенным выше результатам, образец 7), а именно композиция на основе 10 mM His-AA с pH 5,0, была лучше, чем другие композиции, с точки зрения внешнего вида и характеристик в этих химических анализах, и поэтому 10 mM His-AA с pH 5,0 была выбран в качестве конечного буфера.

Таблица 18. Результаты определения pH и стабильности буферов

№	Буферный раствор и pH	Условия хранения	Внешний вид	SEC% Мономер	Δ мономер	Сниженный SE%	Основной пик
1	10 mM SA, pH 5,5	D0	Прозрачный	94,4	N/A (нет данных)	98,5	N/A
		Встряхивание D11	Прозрачный, редкие частицы	92,0	минус 2,4	98,6	0,1
		40 °C D15	Прозрачный	83,5	минус 10,9	94,5	минус 4,0
2	10 mM SA, pH 5,0	D0	Прозрачный	95,1	N/A	98,4	N/A
		Встряхивание D11	Прозрачный	93,7	минус 1,4	98,8	0,5
		40 °C D15	Прозрачный	87,7	минус 7,4	94,0	минус 4,3
3	10 mM SA, pH 5,5	D0	Прозрачный	94,4	N/A	98,1	N/A
		Встряхивание D11	Прозрачный	92,3	минус 2,1	98,4	0,3
		40 °C D15	Прозрачный	87,2	минус 7,2	94,9	минус

							3,1
4	10 mM His-HCl, pH 5,5	D0	Слегка опалесцирующий	94,6	N/A	98,2	N/A
		Встряхивание D11	Слегка опалесцирующий, содержащий частицы +	93,9	минус 0,7	97,7	минус 0,5
		40 °C D15	Прозрачный, редкие частицы	90,7	минус 3,9	96,9	минус 1,2
5	10 mM His-HCl, pH 6,0	D0	Прозрачный	94,1	N/A	98,0	N/A
		Встряхивание D11	Мелкие частицы +++	92,8	минус 1,3	97,1	минус 0,8
		40 °C D15	Небольшое количество мелких частиц	90,1	минус 4,1	96,3	минус 1,6
6	10 mM His-HCl, pH 6,5	D0	Опалесцирующий	93,5	N/A	98,2	N/A
		Встряхивание D11	Опалесцирующий ++, мелкие частицы +++	91,5	минус 2,0	96,3	минус 1,9
		40 °C D15	Частицы оседают на дно	88,8	минус 4,7	94,7	минус 3,5
7	10 mM His-AA, pH 5,0	D0	Прозрачный	95,5	N/A	98,4	N/A
		Встряхивание D11	Прозрачный	95,2	минус 0,4	99,0	0,6
		40 °C D15	Прозрачный	91,6	минус 4,0	96,4	минус 2,0
8	10 mM His-AA, pH 5,0	D0	Слегка опалесцирующий	94,8	N/A	98,4	N/A
		Встряхивание D11	Прозрачный, редкие частицы	93,8	минус 1,0	98,3	минус 0,1
		40 °C D15	Прозрачный	90,9	минус 3,9	96,6	минус 1,8

9	10 mM PB, pH 6,5	D0	Прозрачный	91,9	N/A	97,4	N/A
		Встряхивание D11	Прозрачный	87,2	минус 4,7	98,0	0,6
		40 °C D15	Небольшое количество мелких частиц	83,6	минус 8,3	93,7	минус 3,7

Примечание: в таблице «D» обозначает день; например, D3 обозначает 3 день, и так далее, и D0 обозначает начало эксперимента; то же самое применимо ниже.

Пример 2-2: Скрининг типа и концентрации поверхностно-активного вещества

Получали композиции, содержащие различные типы и концентрации полисорбата и содержащие 10 mM буфера His-AA с pH 5,0, 80 мг/мл сахарозы и ADC-9 при концентрации белка 20 мг/мл. Каждую из композиций фильтровали, бутилировали, закрывали пробками и закупоривали крышками. Образцы отбирали для тестирования высокотемпературной стабильности (40 °C) и тестирования на замораживание-оттаивание. Тестирование на замораживание-оттаивание проводили с помощью 5 циклов замораживания-оттаивания (FT5C, от 35 °C-2 до 8 °C) с последующим трехдневным хранением при комнатной температуре (25 °C D3). Образцы исследовали на внешний вид, SEC и сниженный CE. См. Таблицу 19 для получения подробной информации о дизайне композиций.

Результаты приведены в таблице 20 и показывают, что композиция, содержащая 0,2 мг/мл PS80, имела наилучший внешний вид и характеристики в химических анализах в этих условиях.

Согласно вышеуказанным результатам, 0,2 мг/мл PS80 был выбран в качестве типа и концентрации поверхностно-активного вещества.

Таблица 19. Композиции для скрининга типа и концентрации полисорбата

Дозированная форма	Полисорбат	Буфер	Концентрация белка ADC
Раствор композиции	PS80 0,2 мг/мл	10 mM His-AA, pH 5,0 + 80 мг/мл сахарозы	20 мг/мл
	PS80 0,4 мг/мл		
	PS20 0,2 мг/мл		
	PS20 0,4 мг/мл		

Примечание: PS20 представляет собой полисорбат 20.

Таблица 20. Результаты скрининга типа полисорбата

Тип полисорбата	Условия	Внешний вид	SEC%	Сниженный CE%
PS80 0,2 мг/мл	D0	Прозрачный	95,5	98,6
	FT5C+25 °C D3	Прозрачный	95,8	97,9
	40 °C M1	Прозрачный	89,2	93,4
PS80 0,4 мг/мл	D0	Прозрачный	95,5	98,3
	FT5C+25 °C D3	Небольшое количество туманоподобных частиц	95,8	98,6
	40 °C M1	Мелкие частицы	86,4	89,9
PS20 0,2 мг/мл	D0	Прозрачный	95,7	98,1
	FT5C+25 °C D3	Небольшое количество туманоподобных частиц	95,9	98,2
	40 °C M1	Мелкие частицы	88,4	91,7
PS20 0,4 мг/мл	D0	Прозрачный	95,7	98,6
	FT5C+25 °C D3	Прозрачный	95,5	97,0
	40 °C M1	Частицы оседают на дно	89,6	92,9

Примечание: в таблице «М» обозначает месяц, «M1» обозначает 1 месяц и так далее, и то же самое относится к последующему.

Пример 2-3: Скрининг типа сахара

Получали композиции, содержащие сахарозу, трегалозу, маннит, а также содержащие 10 мМ буфер His-AA (pH 5,0), 0,2 мг/мл PS80 и 20 мг/мл (концентрация белка) ADC-9. Каждую из композиций фильтровали, бутилировали, закрывали пробками и закупоривали крышками. Образцы отбирали для тестирования высокотемпературной стабильности (40 °C) и тестирования циклов замораживания-оттаивания при -35 °C/4 °C с

последующим хранением при комнатной температуре в течение 3 дней и исследовали на внешний вид, SEC и сниженный CE.

Результаты представлены в таблице 21. Когда композиции, содержащие различные типы сахара, находились в условиях замораживания-оттаивания, образец с сахарозой имел лучший внешний вид, чем образец с трегалозой или маннитом. Результаты анализа SEC показывают, что образец с сахарозой или трегалозой был лучше, чем образец с маннитом; через один месяц хранения при 40 °C образец с сахарозой имел лучший внешний вид, чем образец с трегалозой или маннитом. Результаты SEC и сниженного CE также показывают, что образец с сахарозой был немного лучше, чем образец с трегалозой.

Таблица 21. Результаты скрининга композиций растворов типа сахара

Концентрация сахара	Условия	Внешний вид	SEC%	Сниженный CE%
80 мг/мл сахарозы	D0	Прозрачный	95,5	98,6
	FT5C+25 °C D3	Прозрачный	95,8	97,9
	40 °C M1	Прозрачный	89,2	93,4
80 мг/мл трегалозы	D0	Прозрачный	95,5	97,7
	FT5C+25 °C D3	Прозрачный	95,2	98,0
	40 °C M1	Мелкие частицы	88,0	91,8
50 мг/мл маннита	D0	Прозрачный	95,0	98,6
	FT5C+25 °C D3	Небольшое количество туманоподобных частиц	89,5	98,6
	40 °C M1	Мелкие частицы	88,4	92,9

Получали композиции, содержащие сахарозу, трегалозу, маннит, а также содержащие 10 mM буфер His-AA (pH 5,0), 0,2 мг/мл PS80 и 20 мг/мл (концентрация белка) ADC-9. Каждую из композиций фильтровали, бутилировали, наполовину закрывали пробкой, лиофилизировали, закрывали пробкой, закупоривали крышками, помещали в высокотемпературную среду (40 °C) для тестирования стабильности и исследовали на внешний вид, SEC и сниженный CE. См. параметры процесса лиофилизации 1 в таблице

22 для процесса лиофилизации.

Таблица 22. Параметры процесса лиофилизации 1

Параметр процесса лиофилизации	Начальная температура (°C)	Начальное время (мин)	Время выдержки (ч)	Степень вакуумирования (Па)
Предварительное замораживание	5	10	1	N/A
Предварительное замораживание	минус 45	50	2,5	N/A
Первичная сушка	минус 20	120	45	20
Вторичная сушка	25	60	8	1

После одного месяца хранения при 40 °C результаты SEC (см. Таблицу 23) показывают, что образец с сахарозой был немного лучше, чем образец с трегалозой, и был лучше, чем образец с маннитом. Результаты сниженного CE (см. таблицу 23) показывают, что образец с сахарозой был сопоставим с образцом с трегалозой и был лучше, чем образец с маннитом.

Таблица 23. Результаты скрининга лиофилизата типа сахара

Концентрация сахара	Условия хранения	SEC%	Сниженный CE%
80 мг/мл сахарозы	Перед лиофилизацией	96,2	98,8
	40 °C M1	95,9	98,63
80 мг/мл трегалозы	Перед лиофилизацией	96,1	98,76
	40 °C M1	95,1	98,89
50 мг/мл маннита	Перед лиофилизацией	96,0	98,79
	40 °C M1	89,9	97,37

Пример 2-4: Эксперименты по оптимизации внешнего вида лиофилизированных образцов

Исходный раствор готовили в соответствии со следующим 10 mM His-AA с pH 5,0, 80 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл PS80 и 20 мг/мл (концентрация белка) ADC-9 и фильтровали, бутилировали, а затем лиофилизировали в соответствии с параметрами процесса

лиофилизации 1 (см. Таблицу 22). Лиофилизированный образец исследовали с точки зрения внешнего вида. Лиофилизированный образец представлял собой белый порошковый осадок с плоской поверхностью, но край дна порошкового осадка слегка сократился.

Концентрацию сахара в образце дополнительно снижали до 60 мг/мл. Исходный раствор готовили в соответствии со следующим 10 мМ His-AA с pH 5,0, 60 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл PS80 и 20 мг/мл (концентрация белка) ADC-9 и фильтровали, бутилировали, а затем лиофилизировали в соответствии с параметрами процесса лиофилизации 1 (см. Таблицу 22). После лиофилизации поверхность порошкового осадка была плоской и без складок, и край дна порошкового осадка слегка сократился.

Концентрация сахара была снижена до 40 мг/мл, но при этой концентрации готовый продукт имел чрезмерно низкое осмотическое давление; существует риск низкого осмотического давления при клиническом введении. Для обеспечения осмотического давления готового продукта ионную силу буфера повышали до 30 мМ. Исходный раствор готовили в соответствии со следующим: 30 мМ His-AA с pH 5,0, 40 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл PS80 и 20 мг/мл (концентрация белка) ADC-9 и фильтровали, бутилировали, а затем лиофилизировали в соответствии с параметрами процесса лиофилизации 1. После лиофилизации поверхность порошкового осадка была плоской и не опускалась, а край дна порошкового осадка был полным.

Результаты для трех композиций приведены в таблице 24.

Таблица 24. Внешний вид лиофилизированных образцов

Композиция	Внешний вид после лиофилизации
10 мМ His-AA с pH 5,0, 80 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл PS80 и 20 мг/мл (концентрация белка) ADC-9	Поверхность порошкового осадка была плоской, а край дна сократился
10 мМ His-AA с pH 5,0, 60 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл PS80 и 20 мг/мл (концентрация белка) ADC-9	Поверхность порошкового осадка была плоской, а край дна слегка сократился
30 мМ His-AA с pH 5,0, 40 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл PS80 и 20 мг/мл (концентрация белка) ADC-9	Поверхность порошкового осадка была плоской, а край дна был полным

Пример 2-5: Стабильность лиофилизированных образцов

Исходные растворы получали в соответствии с композициями, приведенными в таблице 25, и фильтровали, бутилировали, а затем лиофилизировали в соответствии с параметрами процесса лиофилизации 1 (см. таблицу 22). Лиофилизированные образцы оставляли стоять при 40 °С в условиях М1, а затем восстанавливали и обнаруживали изменения в их стабильности.

Результаты исследования стабильности представлены в таблице 25 и показывают, что в лиофилизированном образце композиции 3 наблюдалось снижение на около 3,7 % в сниженном СЕ в условиях 40 °С М1, и в двух других композициях не наблюдалось существенных изменений в каждом химическом анализе; они имели значительно лучшую стабильность, чем композиция 3. Перед лиофилизацией исходный раствор композиции 2 имел рН 5,04. После лиофилизации восстановленный раствор имел рН 5,27.

Таблица 25. Результаты тестирования стабильности композиций

№	Композиция	Условия хранения	SEC% мономера	Сниженный СЕ%	Внешний вид после восстановления
1	10 мМ His-АА с рН 5,0, 80 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл PS80 и 20 мг/мл (концентрация белка) ADC-9	Перед лиофилизацией	96,2	98,8	N/A
		Восстановление после лиофилизации	96,0	98,3	Прозрачный
		40 °С М1	95,9	98,6	N/A
2	30 мМ His-АА с рН 5,0, 40 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл PS80 и 20 мг/мл (концентрация белка) ADC-9	Перед лиофилизацией	98,2	98,8	N/A
		Восстановление после лиофилизации	N/A	N/A	Прозрачный
		40 °С М1	98,0	98,3	N/A
3	10 мМ SA с рН 5,0,	Перед	95,3	98,73	N/A

80 мг/мл сахарозы, 0,4 мг/мл PS80 и 20 мг/мл (концентрация белка) ADC-9	лиофилизацией			
	Восстановление после лиофилизации	95,3	98,29	Прозрачный
	40 °С M1	95,1	95,06	N/A

Пример 2-6: Стабильность растворов композиций лиофилизированных препаратов

Препараты получали в соответствии с составами, приведенными в таблице 26, и фильтровали, бутилировали, закрывали пробками, закупоривали крышками и подвергали тестированиям циклов замораживания-оттаивания при -35 °С/4 °С с последующим хранением при комнатной температуре в течение 3 дней, 11-дневным тестированиям на встряхивание и тестированиям на высокотемпературную стабильность (40 °С). Образцы исследовали в соответствующих условиях на предмет изменений внешнего вида, SEC и сниженного SE.

Результаты тестирования стабильности приведены в таблице 26 и показывают, что после снижения концентрации сахарозы и повышения ионной силы буфера не наблюдалось существенных различий в изменениях внешнего вида и чистоте между композицией 2 и композицией 1, и что в условиях высокой температуры у композиции 2 несколько меньше уменьшался сниженный SE, чем у композиции 1.

Таблица 26. Результаты тестирования стабильности препаратов

№	Композиция	Условия хранения	Внешний вид	SEC%	Сниженный SE%
1	10 мМ His-AA с pH 5,0, 80 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл PS80 и 20 мг/мл (концентрация белка) ADC-9	D0	Прозрачный	95,5	98,6
		FT5C+25 °С D3	Прозрачный	95,8	97,9
		Встряхивание D11	Прозрачный	95,1	98,5
		40 °С M1	Прозрачный	89,2	93,4
2	30 мМ His-AA с pH 5,0, 40 мг/мл сахарозы, 0,2 мг/мл PS80 и 20 мг/мл	D0	Прозрачный	97,4	98,7
		FT5C+25 °С D3	Прозрачный	97,3	98,6

	(концентрация белка) ADC-9	Встряхивание D11	Прозрачный	97,9	98,7
		40 °C M1	Прозрачный	92,4	96,2

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антитела к клаудину 18.2 и лекарственного средства и буфер, где антитело к клаудину 18.2 в конъюгате антитела к клаудину 18.2 и лекарственного средства содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

i) переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, идентичные соответствующим последовательностям переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 5, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, идентичные соответствующим последовательностям переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 6; или

ii) переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, идентичные соответствующим последовательностям переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 3, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие аминокислотные последовательности, идентичные соответствующим последовательностям переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 4;

буфер представляет собой буфер на основе соли гистидина, предпочтительно гистидин-ацетатный буфер.

2. Фармацевтическая композиция по п. 1, где антитело к клаудину 18.2 содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

iii) переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 17, соответственно, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, соответственно; или

iv) переменная область тяжелой цепи содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, представленные в SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11, соответственно, и переменная область легкой цепи содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, представленные в SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO: 14, соответственно;

предпочтительно антитело к клаудину 18.2 содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

v) переменная область тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 31, и переменная область легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 29; или

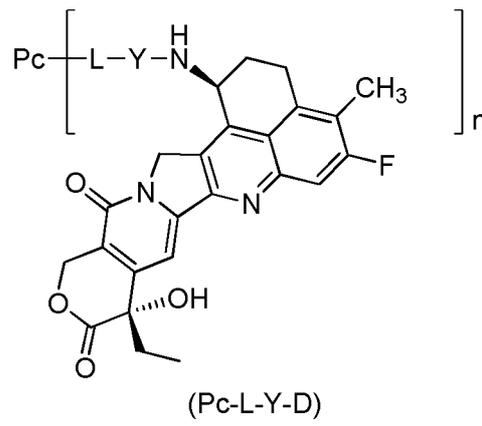
vi) переменная область тяжелой цепи представлена в SEQ ID NO: 26, и переменная область легкой цепи представлена в SEQ ID NO: 23;

более предпочтительно антитело к клаудину 18.2 содержит:

vii) тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 49, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 47; или

viii) тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 44, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 41.

3. Фармацевтическая композиция по п. 1 или п. 2, где конъюгат антитела к клаудину 18.2 и лекарственного средства имеет структуру общей формулы (Pc-L-Y-D):



где:

Y выбран из группы, состоящей из $-O-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$, $-O-CR^1R^2-(CR^aR^b)_m-$, $-O-CR^1R^2-$, $-NH-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$ и $-S-(CR^aR^b)_m-CR^1R^2-C(O)-$;

R^a и R^b являются одинаковыми или различными, и каждый независимо выбран из группы, состоящей из водорода, дейтерия, галогена, алкила, галогеналкила, дейтерированного алкила, алкокси, гидроксид, амино, циано, нитро, гидроксилалкила, циклоалкила и гетероцикла;

или R^a и R^b вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклоалкил или гетероцикл;

R^1 выбран из группы, состоящей из галогена, галогеналкила, дейтерированного алкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксилалкила, гетероцикла, арила и гетероарила;

R^2 выбран из группы, состоящей из водорода, галогена, галогеналкила, дейтерированного алкила, циклоалкила, циклоалкилалкила, алкоксилалкила, гетероцикла, арила и гетероарила;

или R^1 и R^2 вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют циклоалкил или гетероцикл;

или R^a и R^b вместе с атомом углерода, к которому они присоединены, образуют

циклоалкил или гетероциклил;

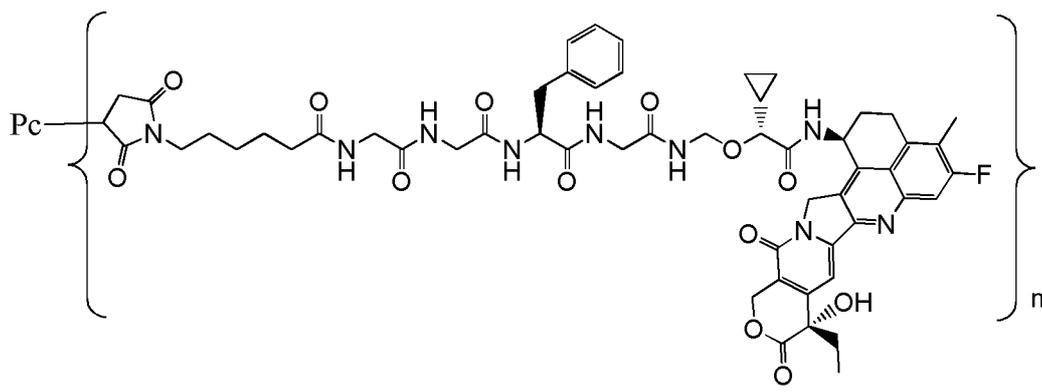
m представляет собой целое число от 0 до 4;

n представляет собой десятичное или целое число от 1 до 10;

L представляет собой линкерное звено;

Rc представляет собой антитело к клаудину 18.2;

предпочтительно конъюгат антитела к клаудину 18.2 и лекарственного средства имеет структуру формулы, показанной ниже:



где:

n представляет собой десятичное или целое число от 2 до 8;

Rc представляет собой антитело к клаудину 18.2.

4. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-3, дополнительно содержащая поверхностно-активное вещество;

предпочтительно поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат;

более предпочтительно поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80 или полисорбат 20;

наиболее предпочтительно поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.

5. Фармацевтическая композиция по п. 4, где концентрация поверхностно-активного вещества составляет от 0,05 до 0,5 мг/мл, предпочтительно от 0,1 до 0,2 мг/мл и более предпочтительно 0,2 мг/мл.

6. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-5, дополнительно содержащая сахар;

предпочтительно сахар выбран из группы, состоящей из сахарозы, маннита и трегалозы;

более предпочтительно сахар представляет собой сахарозу.

7. Фармацевтическая композиция по п. 6, где концентрация сахара составляет от 20 до 100 мг/мл, предпочтительно от 40 до 80 мг/мл и более предпочтительно 40 мг/мл.

8. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-7, где конъюгат антитела к

клаудину 18.2 и лекарственного средства присутствует при концентрации белка от 1 до 100 мг/мл, предпочтительно от 10 до 30 мг/мл и более предпочтительно 20 мг/мл.

9. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-8, где концентрация буфера составляет от 5 до 50 мМ, предпочтительно от 10 до 30 мМ и более предпочтительно 30 мМ.

10. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-9, имеющая рН от 5,0 до 6,5, предпочтительно от 5,0 до 5,5, более предпочтительно от 5,0 до 5,3.

11. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 1-10, содержащая следующие компоненты:

(а) конъюгат антитела к клаудину 18.2 и лекарственного средства при концентрации белка от 10 до 30 мг/мл, (b) от 0,1 до 0,2 мг/мл полисорбата, (с) от 40 до 80 мг/мл сахара и (d) от 10 до 30 мМ буфера на основе соли гистидина; причем фармацевтическая композиция имеет рН от 5,0 до 5,5;

предпочтительно содержащая следующие компоненты:

(а) конъюгат антитела к клаудину 18.2 и лекарственного средства при концентрации белка 20 мг/мл, (b) 0,2 мг/мл полисорбата 80, (с) 40 мг/мл сахарозы и (d) 30 мМ гистидин-ацетатного буфера; причем фармацевтическая композиция имеет рН от 5,0 до 5,3.

12. Фармацевтическая композиция, содержащая:

конъюгат антитела к клаудину 18.2 и лекарственного средства при концентрации белка 20 мг/мл,

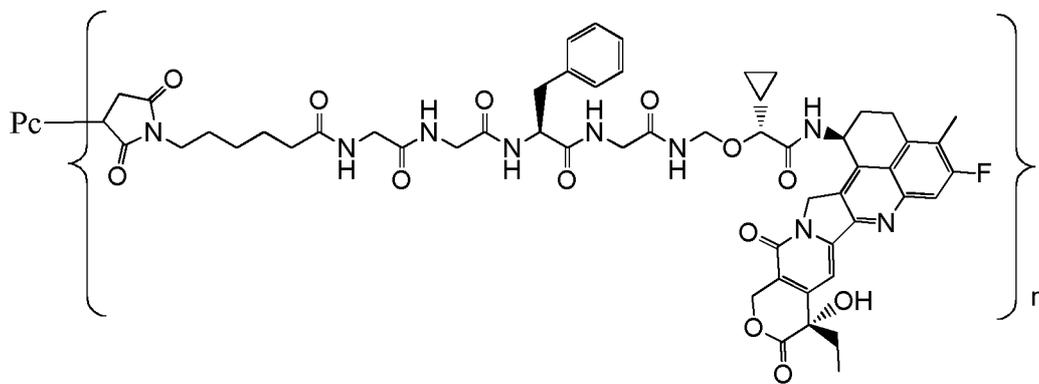
0,2 мг/мл полисорбата 80,

40 мг/мл сахарозы и

30 мМ гистидин-ацетатного буфера;

причем фармацевтическая композиция имеет рН от 5,0 до 5,3;

причем указанный конъюгат антитела к клаудину 18.2 и лекарственного средства имеет структуру формулы, показанной ниже:



где:

n представляет собой десятичное или целое число от 2 до 8;

Рс представляет собой антитело к клаудину 18.2, содержащее тяжелую цепь, представленную в SEQ ID NO: 49, и легкую цепь, представленную в SEQ ID NO: 47.

13. Лиофилизированный препарат, содержащий конъюгат антитела и лекарственного средства, где препарат может быть восстановлен с образованием фармацевтической композиции по любому из пп. 1-12.

14. Способ получения лиофилизированного препарата, содержащего конъюгат антитела и лекарственного средства, включающий стадию лиофилизации фармацевтической композиции по любому из пп. 1-12.

15. Лиофилизированный препарат, содержащий конъюгат антитела и лекарственного средства, где препарат получен путем лиофилизации фармацевтической композиции по любому из пп. 1-12.

16. Восстановленный раствор, содержащий конъюгат антитела и лекарственного средства, где восстановленный раствор получен путем восстановления лиофилизированного препарата по п. 13 или п. 15;

предпочтительно восстановленный раствор содержит следующие компоненты:

(а) конъюгат антитела к клаудину 18.2 и лекарственного средства при концентрации белка от 10 до 30 мг/мл, (b) от 0,1 до 0,2 мг/мл полисорбата, (с) от 40 до 80 мг/мл сахара и (d) от 10 до 30 мМ буфера на основе соли гистидина; причем восстановленный раствор имеет рН около 5,0-5,5;

более предпочтительно фармацевтическая композиция содержит следующие компоненты:

(а) конъюгат антитела к клаудину 18.2 и лекарственного средства при концентрации белка 20 мг/мл, (b) 0,2 мг/мл полисорбата 80, (с) 40 мг/мл сахарозы и (d) 30 мМ гистидин-ацетатного буфера; причем восстановленный раствор имеет рН от 5,0 до 5,3.

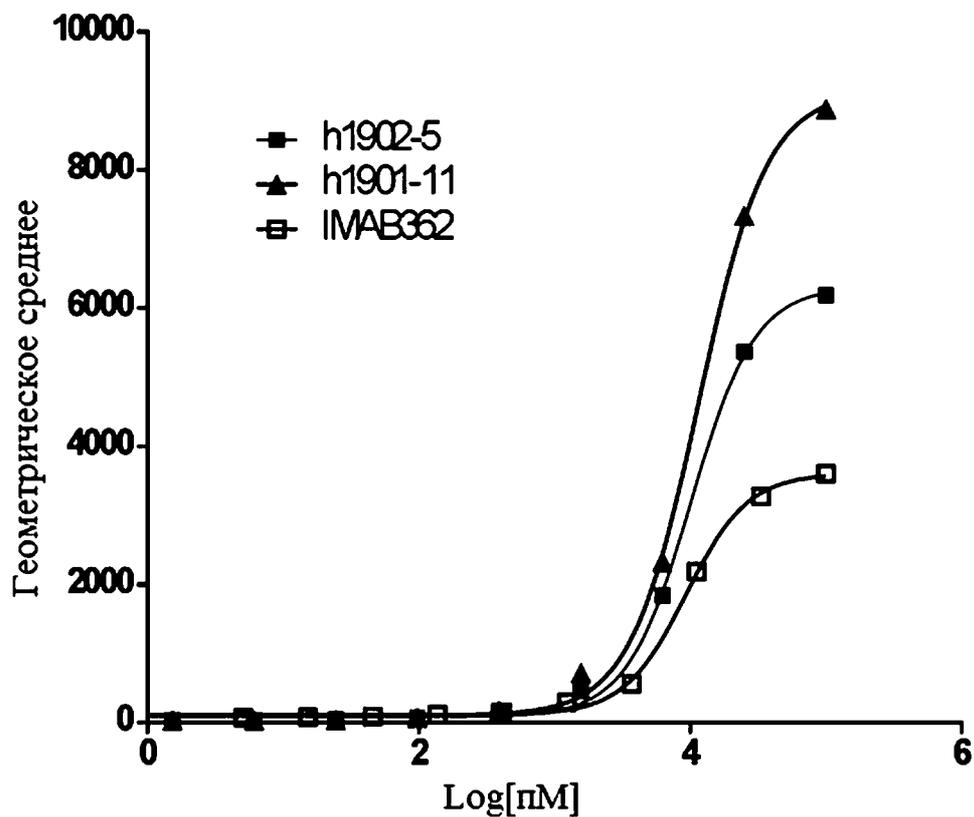
17. Изделие, содержащее контейнер, содержащий фармацевтическую композицию по любому из пп. 1-12, лиофилизированный препарат по п. 13 или п. 15 или восстановленный раствор по п. 16.

18. Способ лечения опухоли или рака, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп. 1-12, или лиофилизированного препарата по п. 13 или п. 15, или восстановленного раствора по п. 16, или изделия по п. 17;

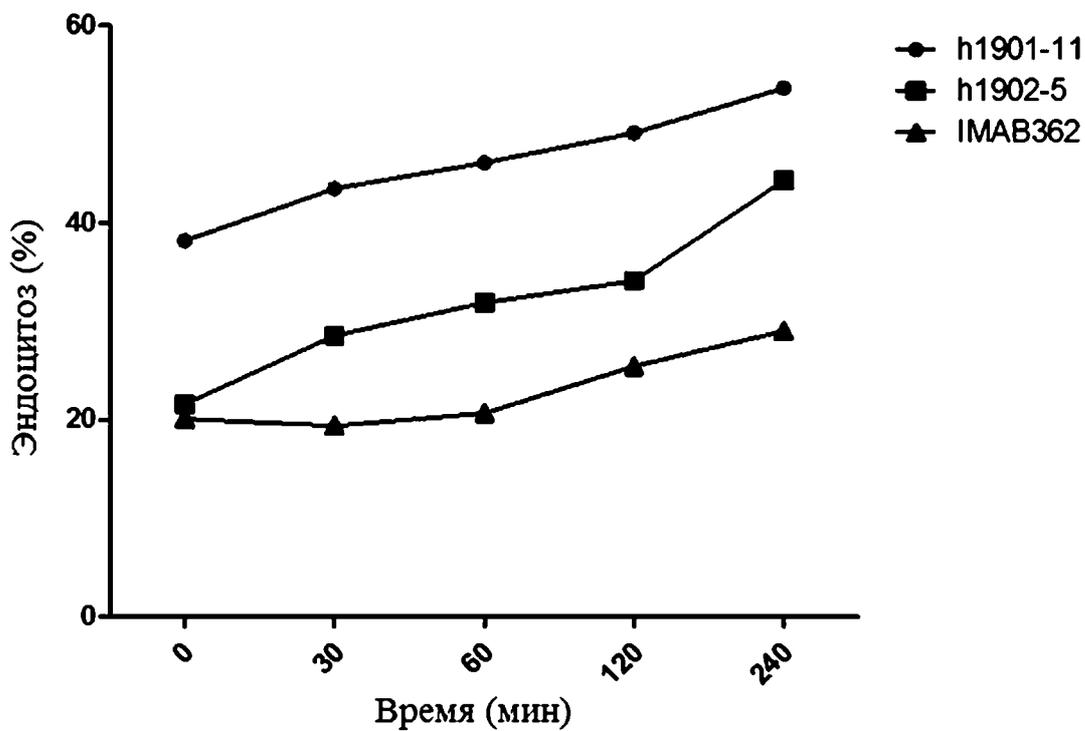
где опухоль или рак предпочтительно выбраны из группы, состоящей из плоскоклеточной карциномы головы и шеи, рака головы и шеи, рака головного мозга, нейроглиомы, мультиформной глиобластомы, нейробластомы, карциномы центральной нервной системы, нейроэндокринной опухоли, рака горла, рака носоглотки, рака

пищевода, рака щитовидной железы, злокачественной плевральной мезотелиомы, рака легкого, рака молочной железы, рака печени, гепатомы, гепатобилиарного рака, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака желудочно-кишечного тракта, рака кишечника, рака толстой кишки, колоректального рака, рака почки, светлоклеточной почечно-клеточной карциномы, рака яичника, рака эндометрия, рака шейки матки, рака мочевого пузыря, рака предстательной железы, рака яичек, рака кожи, меланомы, лейкоза, лимфомы, рака кости, хондросаркомы, миеломы, множественной миеломы, миелодиспластического синдрома, опухоли Крукенберга, миелопролиферативной опухоли, плоскоклеточной карциномы, саркомы Юинга, системного амилоидоза легких цепей и карциномы из клеток Меркеля;

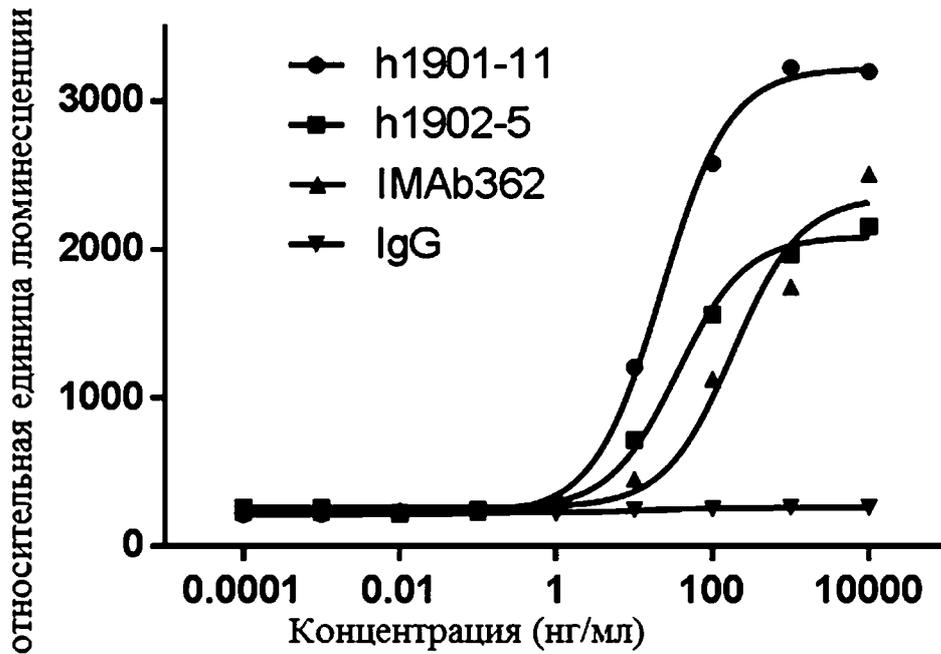
более предпочтительно лимфома выбрана из группы, состоящей из ходжкинской лимфомы, неходжкинской лимфомы, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, первичной медиастинальной В-крупноклеточной лимфомы, мантийноклеточной лимфомы, мелкоклеточной лимфоцитарной лимфомы, В-крупноклеточной лимфомы, богатой Т-клетками/гистиоцитами, и лимфоплазмоцитарной лимфомы; рак легкого выбран из группы, состоящей из немелкоклеточного рака легкого и мелкоклеточного рака легкого; лейкоз выбран из группы, состоящей из хронического миелоидного лейкоза, острого миелоидного лейкоза, лимфоцитарного лейкоза, лимфобластного лейкоза, острого лимфобластного лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза и миелоидно-клеточного лейкоза.



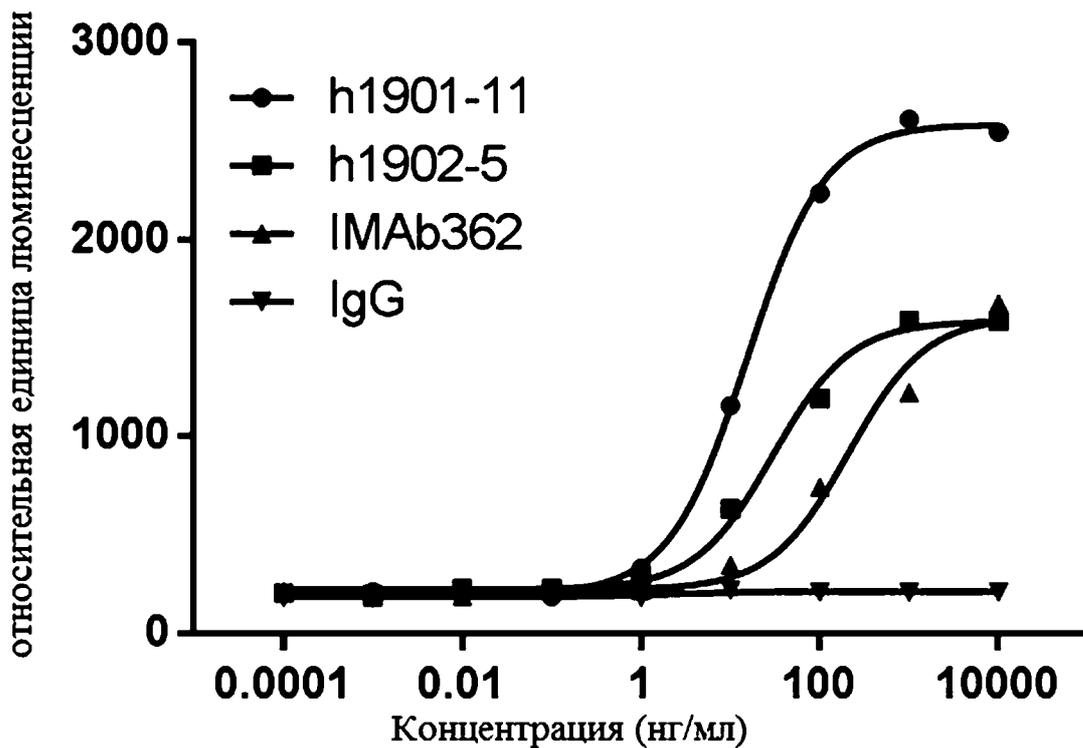
ФИГУРА 1



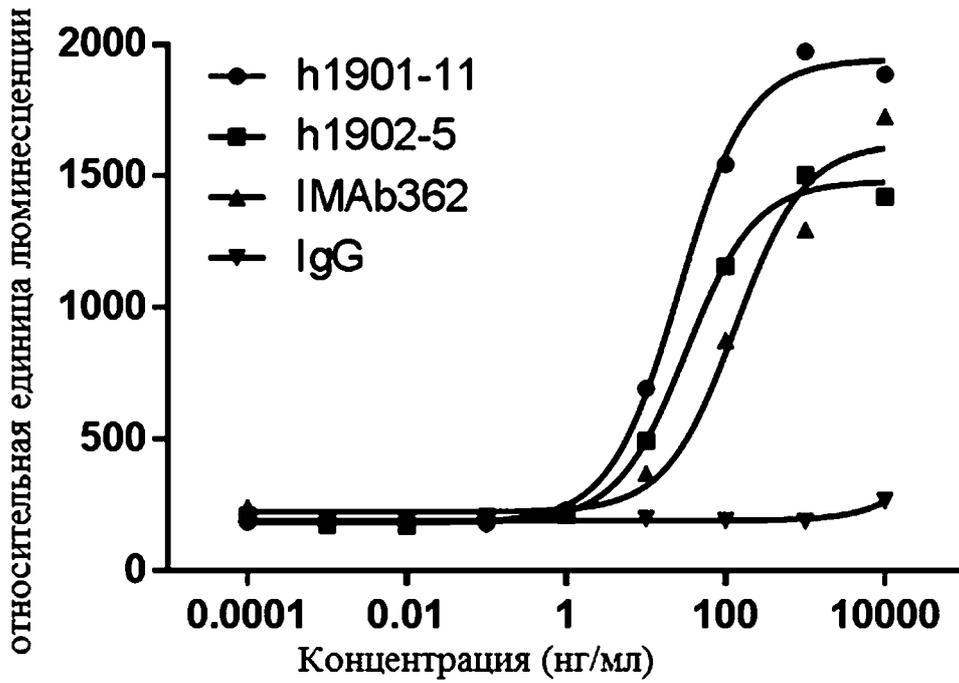
ФИГУРА 2



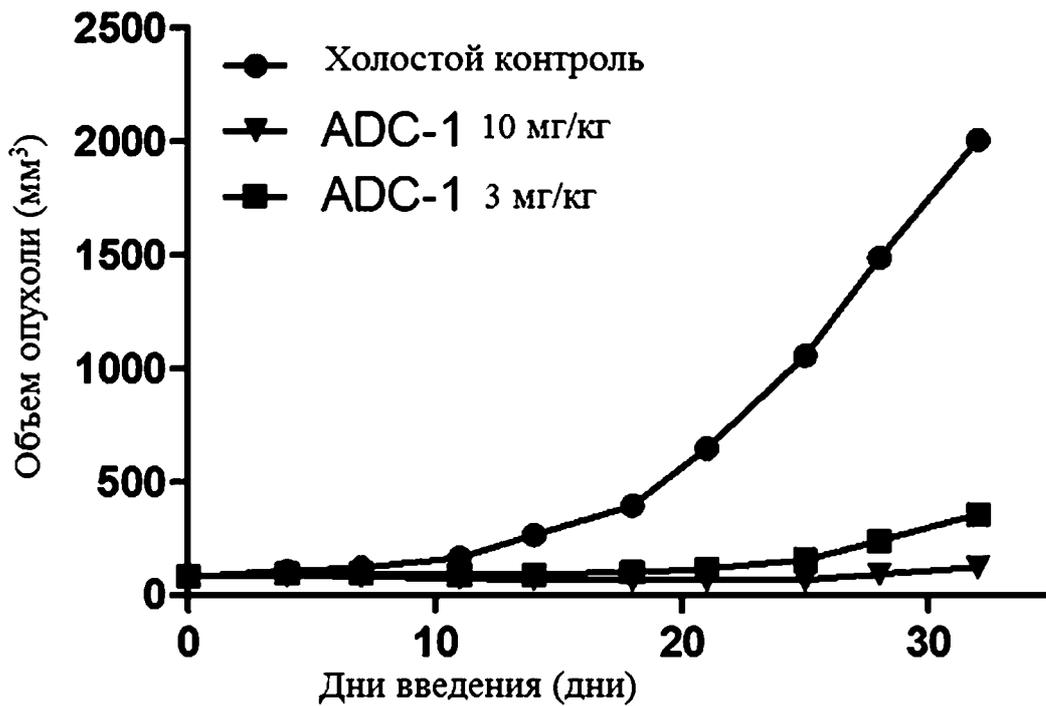
ФИГУРА 3А



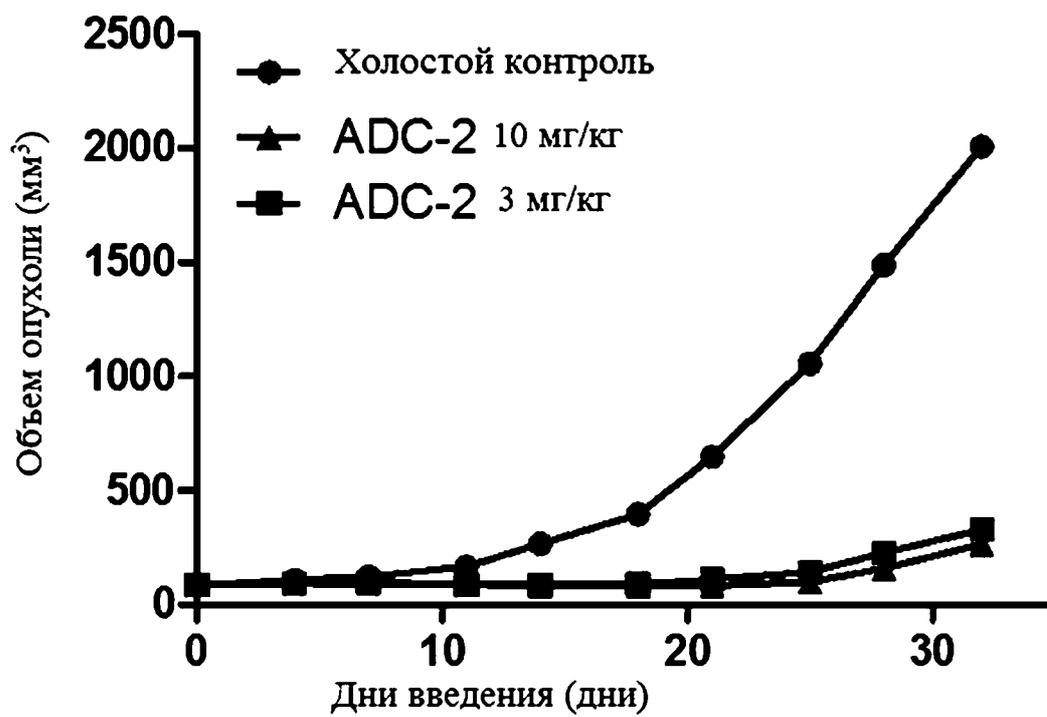
ФИГУРА 3В



ФИГУРА 3С



ФИГУРА 4



ФИГУРА 5