

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **048197**

(13) **B1**

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

- (45) Дата публикации и выдачи патента  
**2024.11.06**
- (21) Номер заявки  
**202191201**
- (22) Дата подачи заявки  
**2019.10.15**
- (51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 9/08* (2006.01)  
*A61K 9/19* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)

---

(54) **ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ, ВКЛЮЧАЮЩИЕ КОНЬЮГАТЫ  
АНТИ-191P4D12 АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО, И СПОСОБЫ ИХ  
ПРИМЕНЕНИЯ**

---

- (31) **62/774,819**
- (32) **2018.12.03**
- (33) **US**
- (43) **2022.01.26**
- (86) **PCT/US2019/056214**
- (87) **WO 2020/117373 2020.06.11**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЭДЖЕНСИС, ИНК.; СИДЖЕН ИНК.  
(US)**
- (72) Изобретатель:  
**Макгарви Орла (СН), Рагнасвами  
Гаятхри, Сун Инцин, Ван  
Схравендейк Мэри Роуз (US)**
- (74) Представитель:  
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,  
Черкас Д.А., Игнатъев А.В., Путинцев  
А.И., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)**
- (56) **US-A1-20120078028  
US-A1-20150353640  
US-A1-20180030144  
WO-A1-2018017714**

- 
- (57) Предложена фармацевтическая композиция, включающая конъюгат антитело-лекарственное средство, включающий антитело или его антиген-связывающий фрагмент, который связывается с 191P4D12 конъюгированным с одной или несколькими единицами монометилауристатина Е (ММАЕ), и фармацевтически приемлемый эксципиент, включающий L-гистидин, полисорбат-20 (TWEEN-20), дигидрат трегалозы и HCl. Также предложен способ профилактики или лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества указанной фармацевтической композиции.

**B1**

**048197**

**048197  
B1**

### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета на основании предварительной патентной заявки США № 62/774819, поданной 3 декабря 2018 года, раскрытие которой включено в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте.

#### **1. Область, к которой относится изобретение**

В настоящем изобретении представлены фармацевтические композиции, включающие конъюгаты анти-191P4D12 антитело-лекарственное средство. Также в настоящем изобретении представлены способы применения фармацевтических композиций.

#### **2. Предпосылки создания изобретения**

Лекарственные вещества обычно вводят как часть композиции в комбинации с одним или несколькими другими агентами, которые выполняют различные и специальные фармацевтические функции. Фармацевтические эксципиенты имеют различные функции и вносят свой вклад в фармацевтические композиции самым разным образом, например, способствуя сольюбилизации, разбавлению, загущению, стабилизации, консервации, приданию цвета, вкуса и т.д. Свойства, которые могут быть приняты во внимание при формулировании композиции активного лекарственного вещества, включают биодоступность, легкость изготовления, легкость введения и стабильность лекарственной формы. Из-за изменчивости свойств активных лекарственных веществ, формулируемых в препараты, для лекарственных форм типично требуются фармацевтические эксципиенты, которые специально подбирают для активного лекарственного вещества для достижения выгодных физических и фармацевтических свойств.

Таким образом, существует потребность в фармацевтических композициях конъюгатов анти-191P4D12 антитело-лекарственное средство, имеющих выгодные физические и фармацевтические свойства. Настоящее изобретение удовлетворяет эту потребность и обеспечивает соответствующие преимущества.

#### **3. Сущность изобретения**

В одном аспекте в настоящем изобретении представлена фармацевтическая композиция, включающая (а) конъюгат антитело-лекарственное средство, включающий антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которое(который) связывается с 191P4D12 конъюгированным с одной или несколькими единицами монометилауростатина Е (ММАЕ), где антитело или его антиген-связывающий фрагмент включает переменную область тяжелой цепи, включающую определяющие комплементарность области (CDR), включающие аминокислотные последовательности CDR переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, включающую CDRs, включающие аминокислотные последовательности CDR переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8; и (b) фармацевтически приемлемый эксципиент, включающий L-гистидин, полисорбат-20 (TWEEN-20) и по меньшей мере одно из дигидрата трегалозы и сахарозы.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент включает CDR H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, CDR H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; CDR L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, CDRL2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13 и CDR L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент включает переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность от 20-й аминокислоты (глутаминовая кислота) до 136-й аминокислоты (серин) SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность от 23-й аминокислоты (аспарагиновая кислота) до 130-й аминокислоты (аргинин) SEQ ID NO: 8.

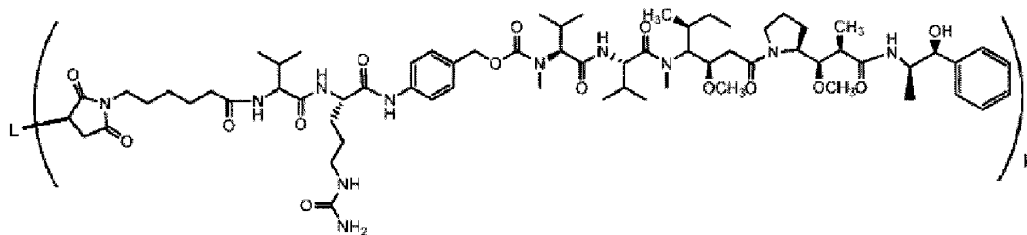
В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность от 20-й аминокислоты (глутаминовая кислота) до 466-й аминокислоты (лизин) SEQ ID NO: 7, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность от 23-й аминокислоты (аспарагиновая кислота) до 236-й аминокислоты (цистеин) SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления антиген-связывающий фрагмент представляет собой Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv или scFv фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой полностью человеческое антитело.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент получают рекомбинантно.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство имеет следующую структуру:



где L- представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент, и р имеет значение от 1 до 10.

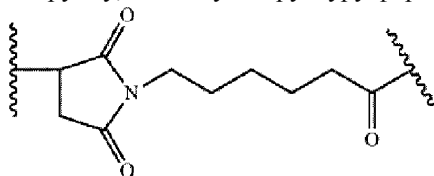
В некоторых вариантах осуществления р имеет значение от 2 до 8.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент связан с каждой единицей монометилакрилатина Е (ММАЕ) через линкер.

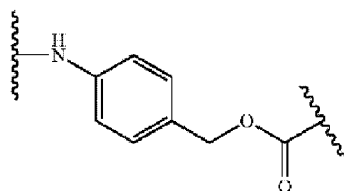
В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой фермент-расщепляемый линкер, и в одном варианте осуществления линкер образует связь с атомом серы антитела или его антиген-связывающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления линкер имеет формулу:  $-A_a-W_w-Y_y-$ ; где -A- представляет собой удлиняющий компонент, а имеет значение 0 или 1; -W- представляет собой аминокислотный компонент, w представляет собой целое число от 0 до 12; и -Y- представляет собой спейсерный компонент, у имеет значение 0, 1 или 2.

В некоторых вариантах осуществления удлиняющий компонент имеет структуру формулы (1), показанную ниже; аминокислотный компонент представляет собой валин цитруллин, и спейсерный компонент представляет собой РАВ группу, имеющую структуру формулы (2), показанную ниже:



Формула (1)



Формула (2).

В некоторых вариантах осуществления удлиняющий компонент образует связь с атомом серы антитела или его антиген-связывающего фрагмента; и где спейсерный компонент связан с ММАЕ через карбаматную группу.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство включает от 1 до 10 единиц ММАЕ на антитело или его антиген-связывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство включает от 2 до 8 единиц ММАЕ на антитело или его антиген-связывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает конъюгат антитело-лекарственное средство при концентрации от около 1 до около 20 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает конъюгат антитело-лекарственное средство при концентрации от около 5 до около 15 мг/мл. В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает конъюгат антитело-лекарственное средство при концентрации от около 8 до около 12 мг/мл. Еще в некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает конъюгат антитело-лекарственное средство при концентрации около 10 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления L-гистидин присутствует в количестве от около 5 до около 50 мМ. В других вариантах осуществления L-гистидин присутствует в количестве от около 10 до около 40 мМ. В других вариантах осуществления L-гистидин присутствует в количестве от около 15 до около 35 мМ. В других вариантах осуществления L-гистидин присутствует в количестве от около 15 до около 30 мМ. В других вариантах осуществления L-гистидин присутствует в количестве от около 15 до около 25 мМ. Еще в некоторых вариантах осуществления L-гистидин присутствует при около 20 мМ.

В некоторых вариантах осуществления концентрация TWEEN-20 находится в пределах от около 0,001 до около 0,1% (об./об.). В других вариантах осуществления концентрация TWEEN-20 находится в пределах от около 0,0025 до около 0,075% (об./об.). В других вариантах осуществления концентрация

TWEEN-20 находится в пределах от около 0,005 до около 0,05% (об./об.). В других вариантах осуществления концентрация TWEEN-20 находится в пределах от около 0,01 до около 0,03% (об./об.). Еще в некоторых вариантах осуществления концентрация TWEEN-20 составляет около 0,02% (об./об.).

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем изобретении, включает дигидрат трегалозы. В некоторых вариантах осуществления дигидрат трегалозы присутствует в количестве от около 1 до около 20% (мас./об.). В некоторых вариантах осуществления дигидрат трегалозы присутствует в количестве от около 2 до около 15% (мас./об.). В других вариантах осуществления дигидрат трегалозы присутствует в количестве от около 3 до около 10% (мас./об.). Еще в некоторых вариантах осуществления дигидрат трегалозы присутствует в количестве от около 4 до около 6% (мас./об.). Еще в некоторых вариантах осуществления дигидрат трегалозы присутствует при около 5,5% (мас./об.).

В некоторых вариантах осуществления дигидрат трегалозы присутствует в количестве от около 50 мМ до около 300 мМ. В некоторых вариантах осуществления дигидрат трегалозы присутствует в количестве от около 75 мМ до около 250 мМ. В других вариантах осуществления дигидрат трегалозы присутствует в количестве от около 100 мМ до около 200 мМ. Еще в некоторых вариантах осуществления дигидрат трегалозы присутствует в количестве от около 130 мМ до около 150 мМ. Еще в некоторых вариантах осуществления дигидрат трегалозы присутствует при около 146 мМ.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает сахарозу. В некоторых вариантах осуществления сахара присутствует в количестве от около 1 до около 20% (мас./об.). В некоторых вариантах осуществления сахара присутствует в количестве от около 2 до около 15% (мас./об.). В других вариантах осуществления сахара присутствует в количестве от около 3 до около 10% (мас./об.). В других вариантах осуществления сахара присутствует в количестве от около 4 до около 6% (мас./об.). Еще в некоторых вариантах осуществления сахара присутствует при около 5,5% (мас./об.).

В некоторых вариантах осуществления сахара присутствует в количестве от около 50 мМ до около 300 мМ. В других вариантах осуществления сахара присутствует в количестве от около 75 мМ до около 250 мМ. В других вариантах осуществления сахара присутствует в количестве от около 100 мМ до около 200 мМ. Еще в некоторых вариантах осуществления сахара присутствует в количестве от около 130 мМ до около 150 мМ. Еще в некоторых вариантах осуществления сахара присутствует при около 146 мМ.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция имеет pH в диапазоне от около 5,5 до около 6,5. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция имеет pH в диапазоне от около 5,7 до около 6,3. В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция имеет pH около 6,0.

В некоторых вариантах осуществления pH измеряют при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления pH измеряют при температуре от около 15°C до около 27°C. В других вариантах осуществления pH измеряют при около 4°C. В других вариантах осуществления pH измеряют при около 25°C.

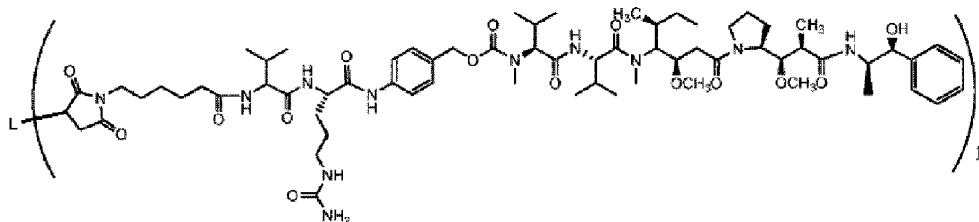
В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем изобретении, включает хлористоводородную кислоту (HCl). В некоторых вариантах осуществления pH доводят при помощи HCl.

В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем изобретении, включает янтарную кислоту. В некоторых вариантах осуществления pH доводят при помощи янтарной кислоты.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем изобретении, включает около 20 мМ L-гистидина, около 0,02% (мас./об.) TWEEN-20 и по меньшей мере одно из около 5,5% (мас./об.) дигидрата трегалозы или около 5% (мас./об.) сахарозы. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем изобретении, дополнительно включает HCl или янтарную кислоту. В некоторых вариантах осуществления pH находится на уровне около 6,0 при комнатной температуре. В других вариантах осуществления pH находится на уровне около 6,0 при 25°C.

В некоторых конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем изобретении, включает:

(a) конъюгат антитело-лекарственное средство, имеющий следующую структуру:

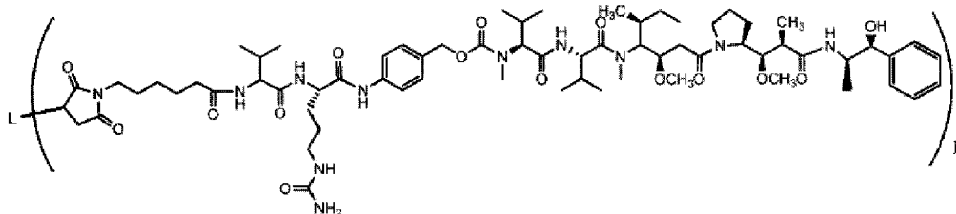


где L- представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент и р имеет значение от 1 до 10; и (b) фармацевтически приемлемый эксципиент, включающий около 20 мМ L-гистидина, около 0,02% (мас./об.) TWEEN-20, около 5,5% (мас./об.) дигидрата трегалозы и HCl, где pH находится на уровне около 6,0 при 25°C.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство присутствует при концентрации около 10 мг/мл.

В других конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем изобретении, включает:

(a) конъюгат антитело-лекарственное средство, включающий следующую структуру:



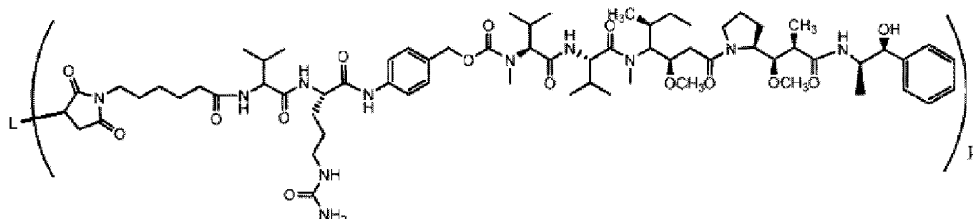
где L- представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент и р имеет значение от 1 до 10; и

(b) фармацевтически приемлемый эксципиент, включающий около 20 мМ L-гистидина, около 0,02% (мас./об.) TWEEN-20, около 5,5% (мас./об.) дигидрата трегалозы и янтарную кислоту, где pH находится на уровне около 6,0 при 25°C.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство присутствует при концентрации около 10 мг/мл в фармацевтической композиции, представленной в настоящем изобретении.

Еще в некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем изобретении, включает:

(a) конъюгат антитело-лекарственное средство, включающий следующую структуру:



где L- представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент и р имеет значение от 1 до 10; и

(b) фармацевтически приемлемый эксципиент, включающий около 20 мМ L-гистидина, около 0,02% (мас./об.) TWEEN-20, около 5,0% (мас./об.) сахарозы и HCl, где pH находится на уровне около 6,0 при 25°C.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство присутствует при концентрации около 10 мг/мл в фармацевтической композиции, представленной в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем изобретении, находится в жидкой форме.

В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем изобретении, является лиофилизированной.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлена лиофилизированная композиция, полученная методом сушки вымораживанием фармацевтической композиции, представленной в настоящем описании.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию хранят при -80°C, 4°C, 25°C или 37°C.

В другом аспекте в настоящем изобретении представлен способ профилактики или лечения заболевания или расстройства у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, представленной в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак легкого, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак пищевода, рак головы или рак шеи.

В конкретном варианте осуществления рак представляет собой рак толстой кишки. В конкретном варианте осуществления рак представляет собой рак поджелудочной железы. В конкретном варианте

осуществления рак представляет собой рак яичника. В конкретном варианте осуществления рак представляет собой рак легкого. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого. В конкретном варианте осуществления рак представляет собой рак мочевого пузыря. В конкретном варианте осуществления рак представляет собой прогрессирующий рак мочевого пузыря. В конкретном варианте осуществления рак представляет собой метастатический рак мочевого пузыря. В конкретном варианте осуществления рак представляет собой рак молочной железы. В конкретном варианте осуществления рак представляет собой рак пищевода. В конкретном варианте осуществления рак представляет собой рак головы. В конкретном варианте осуществления рак представляет собой рак шеи. В конкретном варианте осуществления рак имеет опухолевые клетки, экспрессирующие 191P4D12.

В некоторых вариантах осуществления способ, представленный в настоящем изобретении, дополнительно включает введение субъекту второго терапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор PD-1 или ингибитор PD-L1. В других вариантах осуществления ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор PD-1. Еще в некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 представляет собой пембролизумаб или ниволумаб. В других вариантах осуществления ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой ингибитор PD-L1. В других вариантах осуществления ингибитор PD-L1 выбран из группы, состоящей из атезолизумаба, авелумаба и дурвалумаба.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство, сформулированный в фармацевтическую композицию, вводят при дозе от 1 до 10 мг/кг массы тела субъекта. В других вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство, сформулированный в фармацевтическую композицию, вводят при дозе от 1 до 5 мг/кг массы тела субъекта. Еще в некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство, сформулированный в фармацевтическую композицию, вводят при дозе от 1 до 2,5 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство, сформулированный в фармацевтическую композицию, вводят при дозе от 1 до 1,25 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство, сформулированный в фармацевтическую композицию, вводят при дозе от около 1 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство, сформулированный в фармацевтическую композицию, вводят при дозе от около 1,25 мг/кг массы тела субъекта.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство, сформулированный в фармацевтическую композицию, вводят путем внутривенной (в/в) инъекции или инфузии.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство, сформулированный в фармацевтическую композицию, вводят путем внутривенной (в/в) инъекции или инфузии в течение около 30 минут два раза каждые три недели. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство, сформулированный в фармацевтическую композицию, вводят путем внутривенной (в/в) инъекции или инфузии в течение около 30 минут в дни 1 и 8 каждого трехнедельного цикла. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение ингибитора иммунной контрольной точки путем внутривенной (в/в) инъекции или инфузии в день 1 каждого трехнедельного цикла. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой пембролизумаб, и при этом пембролизумаб вводят в количестве около 200 мг в течение около 30 минут. В других вариантах осуществления ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой атезолизумаб, и при этом атезолизумаб вводят в количестве около 1200 мг в течение около 60 минут или 30 минут.

В других вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство, сформулированный в фармацевтическую композицию, вводят путем внутривенной (в/в) инъекции или инфузии в течение около 30 минут три раза каждые четыре недели. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство, сформулированный в фармацевтическую композицию, вводят путем внутривенной (в/в) инъекции или инфузии в течение около 30 минут в дни 1, 8 и 15 каждого четырехнедельного цикла. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение ингибитора иммунной контрольной точки путем внутривенной (в/в) инъекции или инфузии. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой пембролизумаб. В других вариантах осуществления ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой атезолизумаб.

#### 4. Описание чертежей

Фиг. 1A, 1B, 1C и 1D представляют результаты SDS-PAGE анализа для 14-дневного испытания стабильности для композиций F1-F14 при 40°C.

Фиг. 1E представляет результаты испытания методом PR-HPLC, описанного в разделе 6.1.

Фиг. 1F, 1G и 1H представляет результаты анализа методом эксклюзионной ВЭЖХ для композиций F1-F14 при 40°C.

Фиг. 2A представляет результаты испытания встряхиванием для композиций F4, F9 и F14 при T0.

Фиг. 2B представляет SDS-PAGE результаты испытания с использованием цикла замораживание-

размораживание для композиций F4, F9 и F14.

Фиг. 2С представляет кумулятивное число частиц на мл, измеренное с использованием системы НАС для композиций F4, F9 и F14.

Фиг. 3А представляет результаты анализа остаточной влаги для композиций F4, F9 и F14.

Фиг. 3В представляет результаты A280 (концентрация) в 12-недельном одновременном испытании BDS и DP композиций.

Фиг. 3С представляет результаты A330 (мутность) в 12-недельном одновременном испытании BDS и DP композиций.

Фиг. 3D представляет результаты SDS-PAGE анализа BDS (до лиофилизации) при T0.

Фиг. 3E представляет результаты SDS-PAGE анализа BDS после хранения при -70°C или 2-8°C в течение 12 недель.

Фиг. 3F представляет результаты SDS-PAGE анализа DP после лиофилизации и восстановления при T0.

Фиг. 3G представляет результаты SDS-PAGE анализа DP (после лиофилизации и восстановления), который хранили при 25°C или 40°C в течение 12 недель.

Фиг. 3H представляет результаты SDS-PAGE анализа DP (после лиофилизации и восстановления), который хранили при 2-8°C в течение 12 недель.

Фиг. 3I представляет результаты анализа методом эксклюзионной ВЭЖХ для AGS-22M6E BDS, который хранили при 2-8°C и -70°C, и лиофилизованного AGS-22M6E, который хранили в условиях 2-8°C, 25°C/60% RH и 40°C/75%RH в течение 12 недель.

Фиг. 4 представляет результаты SDS-PAGE анализа для лиофилизованной композиции F4 при объемах наполнения 3,0 и 1,5 мл.

Фиг. 5А представляет нуклеотидную и аминокислотную последовательности 191P4D12 белка.

Фиг. 5В представляет нуклеотидную и аминокислотную последовательности тяжелой цепи и легкой цепи Na22-2(2,4)6.1.

Фиг. 5С представляет аминокислотные последовательности тяжелой цепи и легкой цепи Na22-2(2,4)6.1.

## 5. Подробное описание

Перед дальнейшим описанием настоящего изобретения следует понимать, что изобретение не ограничивается конкретными вариантами осуществления, изложенными в настоящем описании, и также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем документе, предназначена для описания конкретных вариантов осуществления только и не является ограничивающей.

### 5.1 Определения.

Методы и процедуры, описанные или на которые ссылаются в настоящем изобретении, включают такие, которые в целом хорошо поняты и/или обычно используются специалистами в данной области с использованием традиционной методологии, например, широко используемых методологий, описанных в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3d ed. 2001); *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al. eds., 2003); *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic* (An ed. 2009); *Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols* (Albitar ed. 2010); и *Antibody Engineering Vols 1 and 2* (Kontermann and Dübel eds., 2d ed. 2010).

Если не определено иначе, технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют значения, которые хорошо известны специалистами в данной области техники. Для целей интерпретации настоящего описания будет применено следующее описание терминов, и, когда это уместно, термины, используемые в единственном числе, также будут включать множественное число и наоборот. В случае, если любое описание представленного термина противоречит любому документу, включенному в настоящую заявку посредством ссылки, описание термина, представленное ниже, будет иметь преимуществовую силу.

Термины "антитело", "иммуноглобулин" или "Ig" используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо и используются в самом широком смысле и, в частности, охватывают, например, моноклональные антитела (включая агонистические, антагонистические, нейтрализующие антитела, полноразмерные или интактные моноклональные антитела), композиции антител с полиэпитопной или моноэпитопной специфичностью, поликлональные или моновалентные антитела, мультивалентные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела при условии, что они демонстрируют желаемую биологическую активность), образованные из по меньшей мере двух интактных антител, одноцепочечные антитела и их фрагменты, описанные ниже. Антитело может быть человеческим, гуманизированным, химерным и/или с созревшей аффинностью, а также антителом от другого вида, например, мыши и кролика и т.д. Термин "антитело" предназначен для включения полипептидного продукта В-клеток в полипептидах класса иммуноглобулинов, который способен связываться с специфическим молекулярным антигеном и состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, где каждая пара имеет одну тяжелую цепь (около 50-70 кДа) и одну легкую цепь (около 25 кДа), каждая аминокислотная часть каждой цепи включает переменную область от около 100 до около 130 или более аминокислот, а каждая карбокси-концевая часть каждой цепи включает константную область. См., например, *Antibody*

Engineering (Borrebæck ed., 2d ed. 1995); и Kuby, Immunology (3d ed. 1997). В конкретных вариантах осуществления специфический молекулярный антиген может связываться антителом, представленным в настоящем изобретении, включая полипептид или эпитоп. Антитела также включают, но не ограничиваются этим, синтетические антитела, рекомбинантно продуцируемые антитела, камелизованные антитела, интраантитела, анти-идиотипические (анти-Id) антитела и функциональные фрагменты (например, антиген-связывающие фрагменты) любых из вышеуказанных, которые относятся к части полипептида тяжелой или легкой цепи антитела, которая сохраняет некоторую или всю связывающую активность антитела, из которого был получен фрагмент. Неограничивающие примеры функциональных фрагментов (например, антиген-связывающих фрагментов) включают одноцепочечные Fv (scFv) (например, включая моноспецифические, биспецифические и т.д.), Fab фрагменты, F(ab') фрагменты, F(ab)<sub>2</sub> фрагменты, F(ab')<sub>2</sub> фрагменты, дисульфид-связанные Fv (dsFv), Fd фрагменты, Fv фрагменты, диатело, триатело, тетраатело и миниантитело. В частности, антитела, представленные в настоящем изобретении, включают молекулы иммуноглобулинов и иммунологически активные части молекул иммуноглобулинов, например, антиген-связывающие домены или молекулы, которые содержат антиген-связывающий сайт, который связывается с антигеном (например, одну или несколько CDR антитела). Такие фрагменты антител можно найти, например, в Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1989); Mol. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (Myers ed., 1995); Huston et al., 1993, Cell Biophysics 22:189-224; Plückthun and Skerra, 1989, Meth. Enzymol. 178:497-515; и Day, Advanced Immunochemistry (2d ed. 1990). Антитела, представленные в настоящем изобретении, могут представлять собой молекулу иммуноглобулина любого класса (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA) или любого подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2). Антитела могут быть агонистическими антителами или антагонистическими антителами.

Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в небольших количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифическими, направленными против одного антигенного сайта. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые могут включать разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене.

"Антиген" представляет собой структуру, с которой антитело может селективно связываться. Антиген-мишень может представлять собой полипептид, углевод, нуклеиновую кислоту, липид, гаптен или другое природное или синтетическое соединение. В некоторых вариантах осуществления антиген-мишень представляет собой полипептид. В некоторых вариантах осуществления антиген связан с клеткой, например присутствует на или в клетке, например раковой клетке.

"Интактное" антитело представляет собой антитело, включающее антиген-связывающий сайт, а также CL и по меньшей мере константные области тяжелой цепи CH1, CH2 и CH3. Константные области могут включать человеческие константные области или варианты их аминокислотных последовательностей. В некоторых вариантах осуществления интактное антитело имеет одну или несколько эффекторных функций.

Термины "антиген-связывающий фрагмент", "антиген-связывающий домен", "антиген-связывающая область" и подобные термины относятся к той части антитела, которая включает аминокислотные остатки, которые взаимодействуют с антигеном и сообщают связывающему агенту его специфичность и аффинность в отношении антигена (например, CDRs). "Антиген-связывающий фрагмент" в контексте настоящего изобретения включает "фрагмент антитела", который включает часть интактного антитела, такую как антиген-связывающая или переменную область интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают, без ограничения, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv фрагменты; диатела и ди-диатела (см., например, Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 6444-48; Lu et al., 2005, J. Biol. Chem. 280: 19665-72; Hudson et al., 2003, Nat. Med. 9: 129-34; WO 93/11161; и патенты США № 5837242 и 6492123); молекулы одноцепочечных антител (см., например, патенты США № 4946778; 5260203; 5482858; и 5476786); антитела с двойными переменными доменами (см., например, патент США № 7612181); антитела с одним переменным доменом (sdAbs) (см., например, Woolven et al., 1999, Immunogenetics 50: 98-101; и Streltsov et al., 2004, Proc Natl Acad Sci USA. 101: 12444-49); и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Термины "связывается" или "связывание" относятся к взаимодействию между молекулами, включая, например, образование комплекса. Взаимодействия могут быть, например, нековалентными взаимодействиями, включая водородные связи, ионные связи, гидрофобные взаимодействия и/или ван-дер-ваальсовы взаимодействия. Комплекс может также включать связывание двух или более молекул, удерживаемых вместе ковалентными или нековалентными связями, взаимодействиями или силами. Сила общих нековалентных взаимодействий между одним антиген-связывающим сайтом на антителе и одним эпитопом молекулы-мишени, такой как антиген, представляет собой сродство антитела или функционального фрагмента к этому эпитопу. Отношение скорости диссоциации ( $k_{off}$ ) к скорости ассоциации ( $k_{on}$ ) связывающей молекулы (например, антитела) с моновалентным антигеном ( $k_{off}/k_{on}$ ) представляет



собой константу диссоциации  $K_D$ , которая обратно пропорциональна аффинности. Чем ниже значение  $K_D$ , тем выше сродство антитела. Величина  $K_D$  варьируется для разных комплексов антитела и антигена и зависит как от  $k_{on}$ , так и от  $k_{off}$ . Константа диссоциации  $K_D$  для антитела, представленного в настоящем изобретении, может быть определена с использованием любого метода, представленного в настоящем изобретении, или любого другого метода, хорошо известного специалистам в данной области. Аффинность в одном сайте связывания не всегда отражает истинную силу взаимодействия между антителом и антигеном. Когда сложные антигены, содержащие несколько повторяющихся антигенных детерминант, такие как поливалентный антиген, вступают в контакт с антителами, содержащими несколько сайтов связывания, взаимодействие антитела с антигеном на одном сайте увеличивает вероятность реакции на втором сайте. Сила таких множественных взаимодействий между поливалентным антителом и антигеном называется авидностью.

В связи с описанным в настоящем изобретении антителом или его антиген-связывающим фрагментом такие термины, как "связываются с", "которые специфически связываются с", и аналогичные термины также используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо и относятся к связывающим молекулам антиген-связывающих доменов, которые специфически связываются с антигеном, например полипептид. Антитело или антиген-связывающий фрагмент, который связывается или специфически связывается с антигеном, может быть перекрестно-реактивным с родственными антигенами. В некоторых вариантах осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент, который связывается или специфически связывается с антигеном, не вступает в перекрестную реакцию с другими антигенами. Антитело или антиген-связывающий фрагмент, который связывается или специфически связывается с антигеном, можно идентифицировать, например, с использованием иммуноанализов, Octet®, Biacore® или других методов, известных специалистам в данной области. В некоторых вариантах осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент связывается или специфически связывается с антигеном, когда он связывается с антигеном с более высоким сродством, чем с любым перекрестно-реактивным антигеном, как определено экспериментальными методами, такими как радиоиммуноанализ (RIA) и иммуноферментный анализ (ELISA). Как правило, специфическая или селективная реакция будет по меньшей мере в два раза превышать фоновый сигнал или шум и может более чем в 10 раз превышать фоновый сигнал. Обсуждение специфичности связывания см., например, в *Fundamental Immunology* 332-36 (Paul ed., 2d ed. 1989 г.). В некоторых вариантах осуществления степень связывания антитела или антиген-связывающего фрагмента с "нецелевым" белком составляет менее примерно 10% от связывания связывающей молекулы или антиген-связывающего домена с его конкретным антигеном-мишенью, например, как определено с использованием анализа сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS) или RIA. Что касается таких терминов, как "специфическое связывание", "специфически связывается с" или "является специфическим в отношении" означает связывание, которое заметно отличается от неспецифического взаимодействия. Специфическое связывание можно измерить, например, путем определения связывания молекулы по сравнению со связыванием контрольной молекулы, которая обычно представляет собой молекулу аналогичной структуры, не обладающую связывающей активностью. Например, специфическое связывание можно определить путем конкуренции с контрольной молекулой, которая подобна мишени, например, избыток немеченой мишени. В этом случае специфическое связывание указывается, если связывание меченой мишени с зондом конкурентно ингибируется избытком немеченой мишени. Антитело или антиген-связывающий фрагмент, связывающиеся с антигеном, включают антитело или антиген-связывающий фрагмент, способные к связыванию антигена с достаточной аффинностью, таким образом связывающая молекула полезна, например, в качестве диагностического средства при таргетировании антигена. В некоторых вариантах осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент, которые связываются с антигеном, имеют константу диссоциации ( $K_D$ ) меньше чем или равную 1000 нМ, 800 нМ, 500 нМ, 250 нМ, 100 нМ, 50 нМ, 10 нМ, 5 нМ, 4 нМ, 3 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 0,9 нМ, 0,8 нМ, 0,7 нМ, 0,6 нМ, 0,5 нМ, 0,4 нМ, 0,3 нМ, 0,2 нМ или 0,1 нМ. В некоторых вариантах осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент связывается с эпитопом антигена, который является консервативным среди антигена из разных видов (например, среди видов человека и суно).

"Аффинность связывания" обычно относится к силе общей суммы нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, связывающего белка, такого как антитело) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, в контексте настоящего изобретения "аффинность связывания" относится к истинной аффинности связывания, которая отражает 1:1 взаимодействие между членами пары связывания (например, антителом и антигеном). Сродство связывающей молекулы X к ее партнеру по связыванию Y обычно можно представить константой диссоциации ( $K_D$ ). Аффинность можно измерить обычными методами, известными в данной области, включая описанные в настоящем изобретении. Антитела с низким сродством обычно связывают антиген медленно и имеют высокую тенденцию к диссоциации, тогда как антитела с высоким сродством обычно связываются с антигеном быстрее и имеют тенденцию оставаться связанными дольше. В данной области известны различные методы измерения аффинности связывания, любой из которых можно использовать для целей настоящего раскрытия. Конкретные иллюстративные варианты осуществления включают следующие. В одном варианте осуществления " $K_D$ " или "значение  $K_D$ " можно измерить с использованием

анализов, известных в данной области, например анализа связывания.  $K_D$  можно измерить в RIA, например, осуществляемого с Fab-версией интересующего антитела и его антигена (Chen et al., 1999, *J. Mol. Biol.* 293:865-81).  $K_D$  или значение  $K_D$  также можно измерить с использованием биослойной интерферометрии (BLI) или анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR) при помощи Octet®, используя, например, систему Octet®QK384, или при помощи Biacore®, используя, например, Biacore®TM-2000 или Biacore®TM-3000. "Скорость ассоциации", или " $k_{on}$ " также можно определить теми же методами биослойной интерферометрии (BLI) или поверхностного плазмонного резонанса (SPR), описанными выше, с использованием, например, системы Octet®QK384, Biacore®TM-2000 или Biacore®TM-3000.

В некоторых вариантах осуществления антитела или антиген-связывающие фрагменты могут включать "химерные" последовательности, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих от определенного вида или принадлежащих к определенному классу или подклассу антител, в то время как остальная часть цепи(цепей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, происходящих от другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагментах таких антител при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность (см. патент США № 4816567; и Morrison et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-55).

В некоторых вариантах осуществления антитела или антиген-связывающие фрагменты могут содержать части "гуманизированных" форм нечеловеческих (например, мышиных) антител, которые представляют собой химерные антитела, которые включают человеческие иммуноглобулины (например, рецепиентное антитело), в которых нативные остатки CDR заменены остатками из соответствующей CDR нечеловеческого вида (например, донорское антитело), такого как мышь, крыса, кролик или нечеловеческий примат, с желаемой специфичностью, аффинностью и способностью. В некоторых случаях один или несколько остатков FR области человеческого иммуноглобулина заменены соответствующими нечеловеческими остатками. Кроме того, гуманизированные антитела могут включать остатки, которых нет в рецепиентном антителе или в донорском антителе. Эти модификации сделаны для дальнейшего улучшения характеристик антител. Тяжелая или легкая цепь гуманизированного антитела может включать по существу все из по меньшей мере одной или нескольких переменных областей, в которых все или по существу все CDR соответствуют CDR иммуноглобулина нечеловеческого происхождения, и все или по существу все FR представляют собой области из последовательности иммуноглобулина человека. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело будет включать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), типично иммуноглобулина человека. Для получения дополнительных сведений см. Jones et al., 1986, *Nature* 321: 522-25; Riechmann et al., 1988, *Nature* 332: 323-29; Presta, 1992, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-96; Carter et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4285-89; патенты США № 6800738; 6719971; 6639055; 6407213; и 6054297.

В некоторых вариантах осуществления антитела или антиген-связывающие фрагменты могут включать части "полностью человеческого антитела" или "человеческого антитела", эти термины используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо и относятся к антителу, которое включает человеческую переменную область и, например, человеческую константную область. В конкретных вариантах осуществления термины относятся к антителу, которое включает переменную область и константную область человеческого происхождения. "Полностью человеческие" антитела в некоторых вариантах осуществления могут также включать антитела, которые связывают полипептиды и кодируются нуклеиновокислотными последовательностями, которые представляют собой встречающиеся в природе соматические варианты нуклеиновокислотной последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека. Термин "полностью человеческое антитело" включает антитела, включающие переменные и константные области, соответствующие последовательностям иммуноглобулинов зародышевой линии человека, как описано Kabat et al. (См. Kabat et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). "Человеческое антитело" представляет собой антитело, которое обладает аминокислотной последовательностью, которая соответствует последовательности антитела, продуцируемого человеком и/или полученного с использованием любого из способов получения человеческих антител. Это определение человеческого антитела специально исключает гуманизированное антитело, содержащее нечеловеческие антиген-связывающие остатки. Человеческие антитела можно получить с использованием различных методик, известных в данной области, включая библиотеки фагового дисплея (Hoogenboom and Winter, 1991, *J. Mol. Biol.* 227: 381; Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222: 581) и библиотеки дрожжевого дисплея (Chao et al., 2006, *Nature Protocols* 1:755-68). Также доступны способы получения человеческих моноклональных антител, описанные в Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* 77 (1985); Boerner et al., 1991, *J. Immunol.* 147 (1): 86-95; и van Dijk and van de Winkel, 2001, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74. Человеческие антитела могут быть получены путем введения антигена трансгенному животному, которое было модифицировано для продуцирования таких антител в ответ на антигенную стимуляцию, но чьи эндогенные локусы отключены, например, мышам (см., например, Jakobovits, 1995, *Curr. Opin Biotechnol.* 6(5):561-66; Brüggemann and Taussing, 1997, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8(4) :455-58; и патенты США № 6075181 и 6150584 относи-

тельно технологии XENOMOUSE™). См. также, например, Li et al., 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:3557-62 относительно человеческих антител, полученных с использованием гибридной технологии с В-клетками человека.

В некоторых вариантах осуществления антитела или антиген-связывающие фрагменты могут включать части "рекомбинантного человеческого антитела", при этом эта фраза включает человеческие антитела, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены с использованием рекомбинантных средств, таких как антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяин, антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител, антитела, выделенные у животного (например, мыши или коровы), которое является трансгенным и/или трансхромосомным для генов иммуноглобулина человека (см., например, Taylor, LD et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любыми другими способами, которые включают сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела могут иметь переменные и константные области, происходящие из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека (см. Kabat, EA et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). Однако в некоторых вариантах осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела подвергаются мутагенезу *in vitro* (или, когда используют животное, трансгенное по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, таким образом, аминокислотные последовательности VH и VL областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и происходят из последовательностей VH и VL зародышевой линии человека и родственны им, могут не существовать в природе в репертуаре человеческих антител зародышевой линии *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления антитела или антиген-связывающие фрагменты могут включать часть "моноклонального антитела", где указанный термин в контексте настоящего изобретения относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, например, индивидуальные антитела, составляющие популяцию, идентичны, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах, и каждое моноклональное антитело обычно распознает единственный эпитоп на антигене. В конкретных вариантах осуществления термин "моноклональное антитело" в контексте настоящего изобретения представляет собой антитело, продуцируемое одной гибридной или другой клеткой. Термин "моноклональное" не ограничивается каким-либо конкретным способом получения антитела. Например, моноклональные антитела, применимые в настоящем изобретении, могут быть получены с использованием гибридной технологии, впервые описанной Kohler et al., 1975, Nature 256:495, или могут быть получены с использованием методов рекомбинантной ДНК в бактериальных или эукариотических клетках животных или растений (см., например, патент США № 4816567). "Моноклональные антитела" также могут быть выделены из библиотек фаговых антител с использованием методов, описанных в Clackson et al., 1991, Nature 352: 624-28 и Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581-97, например. Другие способы получения клональных клеточных линий и экспрессируемых ими моноклональных антител хорошо известны в данной области. См., например, Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al. Eds., 5th ed. 2002).

Типичная 4-цепочечная единица антитела представляет собой гетеротетрамерный гликопротеин, состоящий из двух идентичных легких (L) цепей и двух идентичных тяжелых (H) цепей. В случае IgG размер четырехцепочечного звена обычно составляет около 150000 Дальтон. Каждая L-цепь связана с H-цепью одной ковалентной дисульфидной связью, в то время как две H-цепи связаны друг с другом одной или несколькими дисульфидными связями в зависимости от изоформа H-цепи. Каждая H и L цепь также имеет регулярно расположенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая H цепь имеет на N-конце переменный домен (VH), за которым следуют три константных домена (CH) для каждой из  $\alpha$  и  $\gamma$  цепей и четыре CH домена для  $\mu$  и  $\epsilon$  изоформ. Каждая L цепь имеет на N-конце переменный домен (VL), за которым следует константный домен (CL) на другом конце. VL выровнен с VH, а CL выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи (CH1). Считается, что определенные аминокислотные остатки образуют поверхность раздела между переменными доменами легкой цепи и тяжелой цепи. Спаривание VH и VL вместе образует единый антиген-связывающий сайт. Структуру и свойства различных классов антител см., например, в Basic and Clinical Immunology 71 (Stites et al. Eds., 8th ed. 1994); и Immunobiology (Janeway et al. eds., 5th ed. 2001).

Термин "Fab" или "Fab область" относится к области антитела, которая связывается с антигенами. Обычный IgG, как правило, включает две Fab-области, каждая из которых находится на одном из двух плеч Y-образной структуры IgG. Каждая Fab-область обычно состоит из одной переменной области и одной константной области каждой из тяжелой и легкой цепи. Более конкретно, переменная область и константная область тяжелой цепи в Fab области представляют собой области VH и CH1, а переменная область и константная область легкой цепи в Fab области представляют собой области VL и CL. VH, CH1, VL и CL в Fab области могут быть расположены различным образом для придания способности к связыванию антигена в соответствии с настоящим изобретением. Например, области VH и CH1 могут

находиться на одном полипептиде, а области VL и CL могут находиться на отдельном полипептиде, подобно Fab области обычного IgG. Альтернативно, все области VH, CH1, VL и CL могут быть на одном полипептиде и ориентированы в разном порядке, как более подробно описано в разделах ниже.

Термин "вариабельная область", "вариабельный домен", "V-область" или "V-домен" относится к части легкой или тяжелой цепи антитела, которая обычно расположена на amino-конце легкой или тяжелой цепи и имеет длину от около 120 до 130 аминокислот в тяжелой цепи и от около 100 до 110 аминокислот в легкой цепи, и используются для связывания и специфичности каждого конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. Вариабельная область тяжелой цепи может называться "VH". Вариабельная область легкой цепи может называться "VL". Термин "вариабельный" относится к тому факту, что определенные сегменты вариабельных областей сильно различаются по последовательности среди антител. V область опосредует связывание антигена и определяет специфичность конкретного антитела в отношении его конкретного антигена. Однако вариабельность неравномерно распределена по 110-аминокислотному диапазону вариабельных областей. Вместо этого V области состоят из менее вариабельных (например, относительно инвариантных) участков, называемых каркасными областями (FR), примерно из 15-30 аминокислот, разделенных более короткими областями с большей вариабельностью (например, крайней вариабельностью), называемыми "гипервариабельными областями", каждая из которых имеет длину около 9-12 аминокислот. Каждая из вариабельных областей тяжелой и легкой цепей содержит четыре FR, в значительной степени принимающих конфигурацию Р-листа, соединенные тремя гипервариабельными областями, которые образуют петли, соединяющие структуру bbb-листа, а в некоторых случаях образующие ее часть. Гипервариабельные области в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости посредством FR и вместе с гипервариабельными областями из другой цепи вносят вклад в формирование антиген-связывающего сайта антител (см., например, Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (5th ed. 1991)). Константные области не участвуют непосредственно в связывании антитела с антигеном, но проявляют различные эффекторные функции, такие как участие антитела в антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC). Вариабельные области сильно различаются по последовательности между разными антителами. В конкретных вариантах осуществления вариабельная область представляет собой вариабельную область человека.

Термин "нумерация остатков вариабельной области в соответствии с Kabat" или "нумерация аминокислотных положений согласно Kabat" и их варианты относятся к системе нумерации, используемой для вариабельных областей тяжелой цепи или вариабельных областей легкой цепи при компиляции антител в Kabat et al. al., выше. При использовании этой системы нумерации фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество или дополнительные аминокислоты, соответствующие укорочению или вставке в FR или CDR вариабельного домена. Например, вариабельный домен тяжелой цепи может включать одну аминокислотную вставку (остаток 52a по Kabat) после остатка 52 и три вставленных остатка (например, остатки 82a, 82b и 82c и т.д. согласно Kabat) после остатка 82. Нумерация остатков по Kabat может быть определена для данного антитела путем выравнивания областей гомологии последовательности антитела со "стандартной" пронумерованной по Kabat последовательностью. Система нумерации Kabat обычно используется для обозначения остатка в вариабельном домене (приблизительно остатки 1-107 легкой цепи и остатки 1-113 тяжелой цепи) (например, Kabat et al., выше). "Система нумерации ЕС" или "индекс ЕС" обычно используется для обозначения остатка в константной области тяжелой цепи иммуноглобулина (например, индекс ЕС, приведенный в Kabat et al., выше). "Индекс EU как в Kabat" относится к нумерации остатков человеческого антитела IgG 1 EU. Были описаны другие системы нумерации, например, AbM, Chothia, Contact, IMGT и AHon.

Термин "тяжелая цепь", когда он используется в отношении антитела, относится к полипептидной цепи примерно 50-70 кДа, где amino-концевой участок включает вариабельную область из примерно 120-130 или более аминокислот, а карбокси-концевая часть включает константную область. Константная область может быть одного из пяти различных типов (например, изотипов), называемых альфа ( $\alpha$ ), дельта ( $\delta$ ), эпсилон ( $\epsilon$ ), гамма ( $\gamma$ ) и мю ( $\mu$ ), в зависимости от аминокислотной последовательности константной области тяжелой цепи. Различные тяжелые цепи различаются по размеру:  $\alpha$ ,  $\delta$  и  $\gamma$  содержат примерно 450 аминокислот,  $\mu$  и  $\epsilon$  содержат примерно 550 аминокислот. В сочетании с легкой цепью эти отдельные типы тяжелых цепей дают пять хорошо известных классов (например, изотипов) антител, IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, соответственно, включая четыре подкласса IgG, а именно IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

Термин "легкая цепь", когда он используется в отношении антитела, относится к полипептидной цепи примерно 25 кДа, где amino-концевая часть включает вариабельную область из примерно 100-110 или более аминокислот, а карбокси-концевая часть включает константную область. Примерная длина легкой цепи составляет от 211 до 217 аминокислот. Существует два различных типа, называемых каппа ( $\kappa$ ) или лямбда ( $\lambda$ ), в зависимости от аминокислотной последовательности константных доменов.

В контексте настоящего изобретения термины "гипервариабельная область", "HVR", "определяющая комплементарность область" и "CDR" используются взаимозаменяемо. "CDR" относится к одной из трех гипервариабельных областей (H1, H2 или H3) внутри некаркасной области bbb-листовой структуры

VH иммуноглобулина (Ig или антитела) или к одной из трех гипервариабельных областей (L1, L2 или L3) в некаркасной области bbb-листовой структуры VL антитела. Соответственно, CDR представляют собой последовательности вариабельной области, вкрапленные в последовательности каркасных областей.

Области CDR хорошо известны специалистам в данной области и определены при помощи хорошо известных систем нумерации. Например, области, определяющие комплементарность (CDR), основаны на вариабельности последовательностей и наиболее часто используются (см., например, Kabat et al., выше). Chothia вместо этого относится к расположению структурных петель (см., например, Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196: 901-17). Конец Chothia CDR-H1 петли при нумерации с использованием системы нумерации Kabat варьируется между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это потому, что система нумерации Kabat помещает вставки в H35A и H35B; если ни 35A, ни 35B не присутствует, петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается на 33; если присутствуют и 35A, и 35B, петля заканчивается на 34). Гипервариабельные области AbM представляют собой компромисс между CDR по Kabat и структурными петлями Chothia и используются в программном обеспечении для моделирования антител Oxford Molecular's AbM (см., например, Antibody Engineering Vol. 2 (Kontermann and Dübel eds., 2d ed. 2010)). "Контактные" гипервариабельные области основаны на анализе имеющихся сложных кристаллических структур. Другая универсальная система нумерации, которая была разработана и широко принята, представляет собой ImMunoGeneTics (IMGT) Information System® (Lafranc et al., 2003, Dev. Comp. Immunol. 27(1): 55-77). IMGT представляет интегрированную информационную систему, специализирующуюся в области иммуноглобулинов (IG), Т-клеточных рецепторов (TCR) и главного комплекса гистосовместимости (МНС) человека и других позвоночных. В настоящем изобретении CDR указаны как с точки зрения аминокислотной последовательности, так и с точки зрения местоположения в легкой или тяжелой цепи. Поскольку "расположение" CDR в структуре вариабельного домена иммуноглобулина является консервативным для разных видов и присутствует в структурах, называемых петлями, с использованием систем нумерации, которые выравнивают последовательности вариабельных доменов в соответствии со структурными особенностями, CDR и каркасные остатки легко идентифицируются. Эта информация может быть использована для прививки и замены CDR остатков из иммуноглобулинов одного вида в акцепторном каркасе, как правило, человеческого антитела. Дополнительная система нумерации (AHon) была разработана Honegger and Plüchthun, 2001, J. Mol. Biol. 309: 657-70. Соответствие между системой нумерации, включая, например, нумерацию Kabat и систему уникальной нумерации IMGT, хорошо известно специалистам в данной области техники (см., например, Kabat, выше; Chothia and Lesk, выше; Martin, выше; Lefranc et al., выше). Остатки из каждой из этих гипервариабельных областей или CDR указаны ниже.

Таблица 30

	<b>Kabat</b>	<b>AbM</b>	<b>Chothia</b>	<b>Контактный метод</b>	<b>IMGT</b>
CDR L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36	L27--L38
CDR L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55	L56--L65
CDR L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96	L105-L117
CDR H1	H31--H35B (нумерация по Kabat)	H26--H35B	H26--H32,34	H30--H35B	H27--H38
CDR H1	H31--H35 (нумерация по Chothia)	H26--H35	H26--H32	H30--H35	
CDR H2	H50--H65	H50--H58	H52--H56	H47--H58	H56--H65
CDR H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101	H105-H117

Границы данной CDR могут варьироваться в зависимости от схемы, используемой для идентификации. Таким образом, если не указано иное, термины "CDR" и "определяющая комплементарность область" данного антитела или его области, такой как вариабельная область, а также отдельные CDR (например, "CDR-H1, CDR-H2) антитела или его области следует понимать как охватывающие область, определяющую комплементарность, как определено любой из известных схем, описанных выше. В некоторых случаях указывается схема для идентификации конкретной CDR или конкретных CDR, таких как CDR, определенные по Kabat, Chothia или контактному методом. В других случаях приводится конкретная аминокислотная последовательность CDR.

Гипервариабельные области могут включать следующие "удлиненные гипервариабельные области": 24-36 или 24-34 (L1), 46-56 или 50-56 (L2) и 89-97 или 89-96 (L3) в VL, и 26-35 или 26-35A (H1), 50-65 или 49-65 (H2) и 93-102, 94-102 или 95-102 (H3) в VH.

Термин "константная область" или "константный домен" относится к карбокси-концевой части легкой и тяжелой цепи, которая не участвует непосредственно в связывании антитела с антигеном, но проявляет различные эффекторные функции, такие как взаимодействие с Fc рецептором. Термин относится

к части молекулы иммуноглобулина, включающей более консервативную аминокислотную последовательность по сравнению с другой частью иммуноглобулина, варибельной областью, которая содержит сайт связывания антигена. Константная область может содержать области CH1, CH2 и CH3 тяжелой цепи и CL область легкой цепи.

Термин "каркас" или "FR" относится к остаткам варибельной области, фланкирующим CDR. FR остатки присутствуют, например, в химерных, гуманизированных, человеческих, доменных антителах, диателах, линейных антителах и биспецифических антителах. FR остатки представляют собой остатки варибельного домена, отличные от остатков гиперварибельной области или остатков CDR.

Термин "Fc область" в настоящем изобретении используется для определения С-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, включая, например, Fc области с нативной последовательностью, рекомбинантные Fc области и варианты Fc области. Хотя границы Fc области тяжелой цепи иммуноглобулина могут варьироваться, Fc область тяжелой цепи человеческого IgG часто определяется как простирающаяся от аминокислотного остатка в положении Cys226 или от Pro230 до его карбоксильного конца. С-концевой лизин (остаток 447 согласно системе нумерации ЕС) Fc области может быть удален, например, в процессе получения или очистки антитела или путем рекомбинантного конструирования нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела. Соответственно, композиция интактных антител может включать популяции антител с удаленными остатками K447, популяции антител без удаленных остатков K447 и популяции антител, содержащие смесь антител с остатком K447 и без него. "Функциональная Fc область" обладает "эффекторной функцией" Fc области с нативной последовательностью. Примеры "эффекторных функций" включают связывание C1q; CDC; связывание с Fc рецептором; ADCC; фагоцитоз; даунрегуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора) и т.д. Такие эффекторные функции обычно требуют, чтобы Fc область была объединена со связывающей областью или связывающим доменом (например, варибельной областью или доменом антитела), и их можно оценить с использованием различных анализов, известных специалистам в данной области. "Вариантная Fc-область" включает аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности Fc-области с нативной последовательностью на основании по меньшей мере одной модификации аминокислоты (например, замены, добавления или делеции). В некоторых вариантах осуществления вариантная Fc-область имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с Fc-областью с нативной последовательностью или с Fc-областью исходного полипептида, например, от примерно одной до примерно десяти аминокислотных замен или примерно от одной до около пяти аминокислотных замен в Fc-области с нативной последовательностью или в Fc-области исходного полипептида. Вариантная Fc-область в настоящем изобретении может обладать по меньшей мере примерно 80% гомологией с Fc-областью с нативной последовательностью и/или с Fc-областью исходного полипептида, или по меньшей мере примерно 90% гомологией с ними, например по меньшей мере примерно 95% гомологией с ними.

В контексте настоящего изобретения термин "эпитоп" относится к локализованной области антигена, с которой связывающаяся молекула (например, антитело) может специфически связываться. Эпитоп может быть линейным эпитопом или конформационным, нелинейным или прерывистым эпитопом. В случае полипептидного антигена, например, эпитоп может представлять собой смежные аминокислоты полипептида ("линейный" эпитоп), или эпитоп может включать аминокислоты из двух или более несмежных областей полипептида ("конформационный", "нелинейный" или "прерывистый" эпитоп). Специалистам в данной области будет понятно, что, как правило, линейный эпитоп может зависеть или не зависеть от вторичной, третичной или четвертичной структуры. Например, в некоторых вариантах осуществления связывающаяся молекула связывается с группой аминокислот независимо от того, уложены ли они в естественную трехмерную структуру белка. В других вариантах осуществления связывающаяся молекула требует, чтобы аминокислотные остатки, составляющие эпитоп, демонстрировали конкретную конформацию (например, изгиб, скручивание, поворот или складку) для распознавания и связывания эпитопа.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок" используются взаимозаменяемо и относятся к полимерам аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и может прерываться не аминокислотами. Термины также охватывают полимер аминокислот, который был модифицирован естественным путем или путем вмешательства; например, путем образования дисульфидной связи, гликозилирования, липидирования, ацетилирования, фосфорилирования или любых других манипуляций или модификаций. В определение также включены, например, полипептиды, содержащие один или несколько аналогов аминокислоты, включая, но не ограничиваясь этим, неприродные аминокислоты, а также другие модификации, известные в данной области. Понятно, что, поскольку полипептиды данного раскрытия могут быть основаны на антителах или других членах суперсемейства иммуноглобулинов, в некоторых вариантах осуществления "полипептид" может существовать в виде одной цепи или двух или более связанных цепей.

Термин "вектор" относится к веществу, которое используется для переноса или включения последовательности нуклеиновой кислоты, включая, например, последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей связывающую молекулу (например, антитело), как описано в настоящем изобретении, для

введения последовательности нуклеиновой кислоты в клетку-хозяин. Векторы, применимые для использования, включают, например, векторы экспрессии, плазмиды, фаговые векторы, вирусные векторы, эписомы и искусственные хромосомы, которые могут включать выбранные последовательности или маркеры, пригодные для стабильной интеграции в хромосому клетки-хозяина. Кроме того, векторы могут включать один или несколько селективируемых маркерных генов и соответствующие последовательности контроля экспрессии. Селективируемые маркерные гены, которые могут быть включены, например, обеспечивают резистентность к антибиотикам или токсинам, дополняют ауксотрофный дефицит или поставляют важные питательные вещества, которых нет в культуральной среде. Последовательности контроля экспрессии могут включать конститутивные и индуцибельные промоторы, энхансеры транскрипции, терминаторы транскрипции и т.п., которые хорошо известны в данной области. Когда две или более молекулы нуклеиновой кислоты должны коэкспрессироваться (например, тяжелая и легкая цепи антитела или VH и VL антитела), обе молекулы нуклеиновой кислоты могут быть встроены, например, в один вектор экспрессии или в отдельные векторы экспрессии. Для экспрессии одного вектора кодирующие нуклеиновые кислоты могут быть функционально связаны с одной общей последовательностью контроля экспрессии или связаны с различными последовательностями контроля экспрессии, такими как один индуцибельный промотор и один конститутивный промотор. Введение молекул нуклеиновой кислоты в клетку-хозяин можно подтвердить методами, хорошо известными в данной области. Такие методы включают, например, анализ нуклеиновых кислот, такой как Нозерн-блоттинг или амплификация мРНК полимеразной цепной реакцией (ПЦР), иммуноблоттинг для экспрессии генных продуктов или другие подходящие аналитические методы для проверки экспрессии введенной нуклеиновокислотной последовательности или ее соответствующего генного продукта. Специалистам в данной области должно быть понятно, что молекулы нуклеиновой кислоты экспрессируются в количестве, достаточном для получения желаемого продукта, и, кроме того, понятно, что уровни экспрессии могут быть оптимизированы для получения достаточной экспрессии с использованием способов, хорошо известных в данной области.

Термин "хозяин" в контексте настоящего изобретения относится к животному, такому как млекопитающее (например, человек).

Термин "клетка-хозяин" в контексте настоящего изобретения относится к конкретной рассматриваемой клетке, которая может быть трансфицирована молекулой нуклеиновой кислоты, и потомству или потенциальному потомству такой клетки. Потомство такой клетки может не быть идентичным родительской клетке, трансфицированной молекулой нуклеиновой кислоты, из-за мутаций или влияний окружающей среды, которые могут иметь место в последующих поколениях или интеграции молекулы нуклеиновой кислоты в геном клетки-хозяина.

"Выделенная нуклеиновая кислота" представляет собой нуклеиновую кислоту, например, РНК, ДНК или смешанные нуклеиновые кислоты, которая по существу отделена от других ДНК последовательностей генома, а также от белков или комплексов, таких как рибосомы и полимеразы, которые естественным образом сопутствуют нативной последовательности. "Выделенная" молекула нуклеиновой кислоты представляет собой молекулу, которая отделена от других молекул нуклеиновой кислоты, которые присутствуют в природном источнике молекулы нуклеиновой кислоты. Более того, "выделенная" молекула нуклеиновой кислоты, такая как молекула кДНК может практически не содержать другого клеточного материала или культуральной среды при получении рекомбинантными методами или по существу не содержать химических предшественников или других химических веществ в процессе химического синтеза. В конкретном варианте осуществления одну или несколько молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело, как описано в настоящем изобретении, выделяют или очищают. Термин охватывает нуклеиновокислотные последовательности, которые были удалены из их естественного окружения, и включает рекомбинантные или клонированные изоляты ДНК и химически синтезированные аналоги или аналоги, биологически синтезированные гетерологичными системами. По существу чистая молекула может включать выделенные формы молекулы.

"Полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота", используемые взаимозаменяемо, относятся к полимерам нуклеотидов любой длины и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут быть дезоксирибонуклеотидами, рибонуклеотидами, модифицированными нуклеотидами или основаниями и/или их аналогами или любым субстратом, который может быть включен в полимер при помощи ДНК- или РНК-полимеразы или реакции синтеза. Полинуклеотид может включать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. Термин "олигонуклеотид" в контексте настоящего изобретения относится к коротким, обычно одноцепочечным синтетическим полинуклеотидам, которые обычно, но не обязательно, имеют длину менее примерно 200 нуклеотидов. Термины "олигонуклеотид" и "полинуклеотид" не являются взаимоисключающими. Приведенное выше описание полинуклеотидов в равной степени и полностью применимо к олигонуклеотидам. Клетка, которая продуцирует связывающую молекулу по настоящему изобретению, может включать родительскую гибридную клетку, а также бактериальные и эукариотические клетки-хозяева, в которые были введены нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело. Если не указано иное, левый конец любой одноцепочечной полинуклеотидной последовательности, описанной в настоящем изобретении, является 5'-концом; левое направление двухцепочечных полинуклеотидных последовательностей называется 5'-направлением. Направление добавления 5' к 3'

растущих транскриптов РНК называется направлением транскрипции; области последовательности на цепи ДНК, содержащие ту же последовательность, что и транскрипт РНК, которые находятся от 5' к 5' концу РНК транскрипта, называются "апстрим последовательностями"; области последовательности на цепи ДНК, содержащие ту же последовательность, что и транскрипт РНК, которые находятся от 3' к 3' концу транскрипта РНК, называются "даунстрим последовательностями".

Термин "фармацевтически приемлемый" в контексте настоящего изобретения означает одобренный регулирующим органом Федерального правительства или правительства штата или указанный в Фармакопее США, Европейской фармакопее или другой общепризнанной фармакопее для применения для животных и, в частности, людей.

"Экципиент" означает фармацевтически приемлемое вещество, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, растворитель или инкапсулирующий материал. Экципиенты включают, например, инкапсулирующие вещества или добавки, такие как ускорители абсорбции, антиоксиданты, связующие, буферы, носители, покрывающие агенты, красители, разбавители, дезинтегрирующие агенты, эмульгаторы, создающие объем вещества, наполнители, ароматизаторы, увлажнители, смазывающие вещества, отдушки, консерванты, пропелленты, агенты, способствующие высвобождению, стерилизующие агенты, подсластители, солнобилизаторы, смачивающие агенты и их смеси. Термин "экципиент" может также относиться к разбавителю, адьюванту (например, адьюванту Фрейнда (полному или неполному) или носителю).

В некоторых вариантах осуществления экципиенты представляют собой фармацевтически приемлемые экципиенты. Примеры фармацевтически приемлемых экципиентов включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту; низкомолекулярный полипептид (например, менее примерно 10 аминокислотных остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как L-гистидин, глицин, глутамин, аспарагин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, сахарозу, дигидрат трегалозы, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахарные спирты, такие как маннит или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, полиэтиленгликоль (PEG) и PLURONICS™. Другие примеры фармацевтически приемлемых экципиентов описаны в Remington and Gennaro, Remington's Pharmaceutical Sciences (18-е изд., 1990).

В одном варианте каждый компонент является "фармацевтически приемлемым" в том смысле, что он совместим с другими ингредиентами фармацевтической композиции и подходит для использования в контакте с тканью или органом человека и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции, иммуногенности или других проблем или осложнений, соизмеримо с разумным соотношением польза/риск. См., например, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2005; Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th ed.; Rowe et al., Eds.; The Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association: 2009; Handbook of Pharmaceutical Additives, 3rd ed.; Ash and Ash Eds.; Gower Publishing Company: 2007; Pharmaceutical Preformulation and Formulation, 2nd ed.; Gibson Ed.; CRC Press LLC: Boca Raton, FL, 2009. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые экципиенты нетоксичны для клеток или млекопитающих, подвергающихся их воздействию в используемых дозировках и концентрациях. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый экципиент представляет собой водный pH-буферный раствор.

В некоторых вариантах осуществления экципиенты представляют собой стерильные жидкости, такие как вода и масла, включая масла нефтяного, животного, растительного или синтетического происхождения, такие как арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло, кунжутное масло и т.п. Вода является иллюстративным экципиентом, когда композицию (например, фармацевтическую композицию) вводят внутривенно. Солевые растворы и водные растворы декстрозы и глицерина также можно использовать в качестве жидких экципиентов, особенно для растворов для инъекций. Экципиент также может включать крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. Композиция, если желательна, также может содержать незначительные количества смачивающих или эмульгирующих агентов или pH буферных агентов. Композиции могут принимать форму растворов, суспензий, эмульсий, таблеток, пилюль, капсул, порошков, композиций с замедленным высвобождением и т.п.

Композиции, включающие фармацевтические соединения, могут содержать связывающую молекулу (например, антители), например, в выделенной или очищенной форме, вместе с подходящим количеством экципиентов.

Аббревиатура "ММАЕ" относится к монометилауристатину Е.

Если не указано иное, термин "алкил" относится к насыщенному линейному или разветвленному углеводороду, включающему от около 1 до около 20 атомов углерода (и все комбинации и субкомбинации диапазонов и конкретных количеств атомов углерода в указанных пределах), предпочтительно от около 1 до около 8 атомов углерода. Примеры алкильных групп включают метил, этил, n-пропил, изо-



пропил, н-бутил, изобутил, втор-бутил, трет-бутил, н-пентил, 2-пентил, 3-пентил, 2-метил-2-бутил, н-гексил, н-гептил, н-октил, н-нонил, н-децил, 3-метил-2-бутил, 3-метил-1-бутил, 2-метил-1-бутил, 1-гексил, 2-гексил, 3-гексил, 2-метил-2-пентил, 3-метил-2-пентил, 4-метил-2-пентил, 3-метил-3-пентил, 2-метил-3-пентил, 2,3-диметил-2-бутил и 3,3-диметил-2-бутил. Алкильные группы, отдельно или как часть другой группы, могут быть необязательно замещены одной или несколькими группами, предпочтительно 1-3 группами (и любыми дополнительными заместителями, выбранными из галогена), включая, но не ограничиваясь этим, -галоген, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил), -O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкенил), -O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкинил), -арил, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -SR', -SO<sub>3</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, =O, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> и -CN, где каждый R' независимо выбран из -H, -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила, -C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкенила, -C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкинила или -арила, и где указанные -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил), -O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкенил), -O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкинил), -арильные, -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкильные, -C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкенильные и -C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкинильные группы могут быть необязательно дополнительно замещены одной или несколькими группами, включающими, но не ограничивающимися этим, -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил, -C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкенил, -C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкинил, -галоген, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил), -O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкенил), -O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкинил), -арил, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR", -C(O)N(R")<sub>2</sub>, -NHC(O)R", -SR", -SO<sub>3</sub>R", -S(O)<sub>2</sub>R", -S(O)R", -OH, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R"), -N(R")<sub>2</sub> и -CN, где каждый R" независимо выбран из -H, -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила, -C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкенила, -C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкинила или -арила.

Если не указано иное, термины "алкенил" и "алкинил" относятся к линейным и разветвленным углеродным цепям, включающим от около 2 до около 20 атомов углерода (и все комбинации и субкомбинации диапазонов и конкретных количеств атомов углерода в указанных пределах), предпочтительно от около 2 до около 8 атомов углерода. Алкенильная цепь содержит по меньшей мере одну двойную связь в цепи, а алкинильная цепь содержит по меньшей мере одну тройную связь в цепи. Примеры алкенильных групп включают, но не ограничиваются этим, этилен или винил, аллил, -1-бутенил, -2-бутенил, -изобутиленил, -1-пентенил, -2-пентенил, -3-метил-1-бутенил, -2-метил-2-бутенил и -2,3-диметил-2-бутенил. Примеры алкинильных групп включают, но не ограничиваются этим, ацетиленовую группу, пропаргил, ацетиленил, пропинил, -1-бутинил, -2-бутинил, -1-пентинил, -2-пентинил и -3-метил-1-бутинил. Алкенильные и алкинильные группы, отдельно или как часть другой группы, могут быть необязательно замещены одной или несколькими группами, предпочтительно 1-3 группами (и любыми дополнительными заместителями, выбранными из галогена), включая, но не ограничиваясь этим, -галоген, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил), -O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкенил), -O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкинил), -арил, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -SR', -SO<sub>3</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, =O, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> и -CN, где каждый R' независимо выбран из -H, -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила, -C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкенила, -C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкинила или -арила, и где указанные -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил), -O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкенил), -O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкинил), -арильные, -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкильные, -C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкенильные и -C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкинильные группы могут быть необязательно дополнительно замещены одним или несколькими заместителями, включающими, но не ограничиваясь этим, -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил, -C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкенил, -C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкинил, -галоген, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил), -O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкенил), -O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкинил), -арил, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR", -C(O)N(R")<sub>2</sub>, -NHC(O)R", -SR", -SO<sub>3</sub>R", -S(O)<sub>2</sub>R", -S(O)R", -OH, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R"), -N(R")<sub>2</sub> и -CN, где каждый R" независимо выбран из -H, -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила, -C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкенила, -C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкинила или -арила.

Если не указано иное, термин "алкилен" относится к насыщенному с разветвленной или прямой цепью углеводородному радикалу, включающему от около 1 до около 20 атомов углерода (и все комбинации и субкомбинации диапазонов и конкретных количеств атомов углерода в указанных пределах), предпочтительно от около 1 до около 8 атомов углерода, и имеющему два одновалентных радикальных центра, образованных путем удаления двух атомов водорода от одного и того же или разных атомов углерода исходного алкана. Типичные алкилены включают, но не ограничиваются этим, метилен, этилен, пропилен, бутилен, пентилен, гексилен, гептилен, октилен, нонилен, декален, 1,4-циклогексilen и т.п. Алкиленовые группы, отдельно или как часть другой группы, могут быть необязательно замещены одной или несколькими группами, предпочтительно 1-3 группами (и любыми дополнительными заместителями, выбранными из галогена), включая, но не ограничиваясь этим, -галоген, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил), -O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкенил), -O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкинил), -арил, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR', -C(O)N(R')<sub>2</sub>, -NHC(O)R', -SR', -SO<sub>3</sub>R', -S(O)<sub>2</sub>R', -S(O)R', -OH, =O, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R'), -N(R')<sub>2</sub> и -CN, где каждый R' независимо выбран из -H, -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила, -C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкенила, -C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкинила или -арила, и где указанные -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил), -O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкенил), -O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкинил), -арильные, -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкильные, -C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкенильные и -C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкинильные группы могут быть необязательно дополнительно замещены одним или несколькими заместителями, включающими, но не ограничиваясь этим, -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил, -C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкенил, -C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкинил, -галоген, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил), -O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкенил), -O-(C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкинил), -арил, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH<sub>2</sub>, -C(O)NHR", -C(O)N(R")<sub>2</sub>, -NHC(O)R", -SR", -SO<sub>3</sub>R", -S(O)<sub>2</sub>R", -S(O)R", -OH, -N<sub>3</sub>, -NH<sub>2</sub>, -NH(R"), -N(R")<sub>2</sub> и -CN, где каждый R" независимо выбран из -H, -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкила, -C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкенила, -C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub> алкинила или -арила.

Если не указано иное, термин "алкенилен" относится к необязательно замещенной алкиленовой группе, содержащей по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь. Примеры алкениленовых групп включают, например, этенилен (-CH=CH-) и пропенилен (-CH=CHCH<sub>2</sub>-).

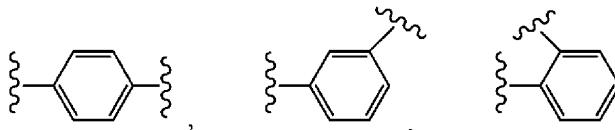
Если не указано иное, термин "алкинилен" относится к необязательно замещенной алкиленовой

группе, содержащей по меньшей мере одну углерод-углеродную тройную связь. Примеры алкиниленовых групп включают, например, ацетилен ( $-C\equiv C-$ ), пропаргил ( $-CH_2C\equiv C-$ ) и 4-пентинил ( $-CH_2CH_2CH_2C\equiv CH-$ ).

Если не указано иное, термин "арил" относится к одновалентному ароматическому углеводородному радикалу, включающему 6-20 атомов углерода (и все комбинации и субкомбинации диапазонов и конкретных количеств атомов углерода в указанных пределах), полученному путем удаления одного атома водорода от одного атома углерода исходной ароматической кольцевой системы. Некоторые арильные группы представлены в иллюстративных структурах как "Ar". Типичные арильные группы включают, но не ограничиваются этим, радикалы, полученные из бензола, замещенного бензола, фенила, нафталина, антрацена, бифенила и т.п.

Арильная группа, отдельно или как часть другой группы, может быть необязательно замещенной одной или несколькими, предпочтительно 1-5 или даже 1-2 группами, включая, но не ограничиваясь этим, -галоген,  $-C_1-C_8$  алкил,  $-C_2-C_8$  алкенил,  $-C_2-C_8$  алкинил,  $-O-(C_1-C_8)$  алкил,  $-O-(C_2-C_8)$  алкенил,  $-O-(C_2-C_8)$  алкинил, -арильные,  $-C(O)R'$ ,  $-OC(O)R'$ ,  $-C(O)OR'$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-C(O)NHR'$ ,  $-C(O)N(R')_2$ ,  $-NHC(O)R'$ ,  $-SR'$ ,  $-SO_3R'$ ,  $-S(O)_2R'$ ,  $-S(O)R'$ ,  $-OH$ ,  $-NO_2$ ,  $-N_3$ ,  $-NH_2$ ,  $-NH(R')$ ,  $-N(R')_2$  и  $-CN$ , где каждый  $R'$  независимо выбран из  $-H$ ,  $-C_1-C_8$  алкила,  $-C_2-C_8$  алкенила,  $-C_2-C_8$  алкинила или -арила, и где указанные  $-C_1-C_8$  алкильные,  $-C_2-C_8$  алкенильные,  $-C_2-C_8$  алкинильные,  $O-(C_1-C_8)$  алкил,  $-O-(C_2-C_8)$  алкенил,  $-O-(C_2-C_8)$  алкинил и -арильные группы могут быть необязательно дополнительно замещены одним или несколькими заместителями, включающими, но не ограничиваясь этим,  $-C_1-C_8$  алкил,  $-C_2-C_8$  алкенил,  $-C_2-C_8$  алкинил, -галоген,  $-O-(C_1-C_8)$  алкил,  $-O-(C_2-C_8)$  алкенил,  $-O-(C_2-C_8)$  алкинил, -арил,  $-C(O)R''$ ,  $-OC(O)R''$ ,  $-C(O)OR''$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-C(O)NHR''$ ,  $-C(O)N(R'')_2$ ,  $-NHC(O)R''$ ,  $-SR''$ ,  $-SO_3R''$ ,  $-S(O)_2R''$ ,  $-S(O)R''$ ,  $-OH$ ,  $-N_3$ ,  $-NH_2$ ,  $-NH(R'')$ ,  $-N(R'')_2$  и  $-CN$ , где каждый  $R''$  независимо выбран из  $-H$ ,  $-C_1-C_8$  алкила,  $-C_2-C_8$  алкенила,  $-C_2-C_8$  алкинила или -арила.

Если не указано иное, термин "арилен" относится к необязательно замещенной арильной группе, которая является двухвалентной (т.е. образованной путем удаления двух атомов водорода от одного и того же или разных атомов углерода исходной ароматической кольцевой системы) и может быть в орто, мета или пара конфигурациях, как показано в следующих структурах с фенилом в качестве примера арильной группы.



Типичные " $-(C_1-C_8)$  алкилен)арил", " $-(C_2-C_8)$  алкенилен)арил", и " $-(C_2-C_8)$  алкинилен)арил" группы включают, но не ограничиваются этим, бензил, 2-фенилэтан-1-ил, 2-фенилэтен-1-ил, нафтилметил, 2-нафтилэтан-1-ил, 2-нафтилэтен-1-ил, нафтобензил, 2-нафтофенилэтан-1-ил и т.п.

Если не указано иное, термин "гетероцикл" относится к моноциклической, бициклической или полициклической кольцевой системе, содержащей от 3 до 14 кольцевых атомов (также называемых кольцевыми членами), где по меньшей мере один кольцевой атом в по меньшей мере одном кольце представляет собой гетероатом, выбранный из N, O, P или S (и все комбинации и субкомбинации диапазонов и конкретных количеств атомов углерода и гетероатомов в указанных пределах). Гетероцикл может содержать от 1 до 4 кольцевых гетероатомов, независимо выбранных из N, O, P или S. Один или несколько N, S или S атомы в гетероцикле могут быть окислены. Моноциклический гетероцикл предпочтительно содержит от 3 до 7 кольцевых членов (например, 2-6 атомов углерода и 1-3 гетероатома, независимо выбранных из N, O, P или S), а бициклический гетероцикл предпочтительно содержит от 5 до 10 кольцевых членов (например, 4-9 атомов углерода и 1-3 гетероатома, независимо выбранных из N, O, P или S). Кольцо, которое включает гетероатом, может быть ароматическим или неароматическим. Если не указано иное, гетероцикл присоединен к боковой группе по любому гетероатому или атому углерода, что приводит к стабильной структуре. Гетероциклы описаны в Paquette, "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), в частности, глава 1, 3, 4, 6, 7 и 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present), в частности, том 13, 14, 16, 19 и 28; и J. Am. Chem. Soc. 82:5566 (1960). Примеры "гетероциклических" групп включают, в качестве примера, а не ограничения, пиридил, дигидропиридил, тетрагидропиридил (пиперидил), тиазолил, пиримидинил, фуранил, тиенил, пирролил, пиразолил, имидазолил, тетразолил, бензофуранил, тианафталилен, индолил, индоленил, хинолинил, изохинолинил, бензимидазолил, пиперидинил, 4-пиперидонил, пирролидинил, 2-пирролидонил, пирролинил, тетрагидрофуранил, бис-тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил, бис-тетрагидропиранил, тетрагидрохинолинил, тетрагидроизохинолинил, декагидрохинолинил, октагидроизохинолинил, азоцинил, триазинил, 6H-1,2,5-тиадиазинил, 2H,6H-1,5,2-дигтиазинил, тиенил, тиантренил, пиранил, изобензофуранил, хроменил, ксантенил, феноксатинил, 2H-пирролил, изотиазолил, изоксазолил, пиразинил, пиридазинил, индолизинил, изоиндолил, 3H-индолил, 1H-индазолил, пуринил, 4H-хинолизинил, фталазинил, нафтиридинил, хиноксалинил, хиназолинил, циннолинил, птеридинил, 4H-карбазолил, карбазолил, bbb-карболинил, фенантридинил, акридинил, пиримидинил, фенантролинил,

феназинил, фенотиазинил, фуразанил, феноксазинил, изохроманил, хроманил, имидазолидинил, имидазолинил, пиразолидинил, пиразолинил, пиперазинил, индолинил, изоиндолинил, хинуклидинил, морфолинил, оксазолидинил, бензотриазолил, бензизоксазолил, оксиндолил, бензоксазолинил и изагиноил. Предпочтительные "гетероциклические" группы включают, но не ограничиваются этим, бензофуранил, бензотиофенил, индолил, бензопиразолил, кумаринил, изохинолинил, пирролил, тиофенил, фуранил, тиазолил, имидазолил, пиразолил, триазолил, хинолинил, пиримидинил, пиридинил, пиридонил, пиразинил, пиридазинил, изотиазолил, изоксазолил и тетразолил. Гетероциклическая группа, отдельно или как часть другой группы, может быть необязательно замещена одной или несколькими группами, предпочтительно 1-2 группами, включая, но не ограничиваясь этим,  $-C_1-C_8$  алкил,  $-C_2-C_8$  алкенил,  $-C_2-C_8$  алкинил, -галоген,  $-O-(C_1-C_8)$  алкил),  $-O-(C_2-C_8)$  алкенил),  $-O-(C_2-C_8)$  алкинил), -арил,  $-C(O)R'$ ,  $-OC(O)R'$ ,  $-C(O)OR'$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-C(O)NHR'$ ,  $-C(O)N(R')_2$ ,  $-NHC(O)R'$ ,  $-SR'$ ,  $-SO_3R'$ ,  $-S(O)_2R'$ ,  $-S(O)R'$ ,  $-OH$ ,  $-N_3$ ,  $-NH_2$ ,  $-NH(R')$ ,  $-N(R')_2$  и  $-CN$ , где каждый  $R'$  независимо выбран из  $-H$ ,  $-C_1-C_8$  алкила,  $-C_2-C_8$  алкенила,  $-C_2-C_8$  алкинила или -арила, и где указанные  $-O-(C_1-C_8)$  алкил),  $-O-(C_2-C_8)$  алкенил),  $-O-(C_2-C_8)$  алкинил),  $-C_1-C_8$  алкильные,  $-C_2-C_8$  алкенильные,  $-C_2-C_8$  алкинильные и -арильные группы могут быть необязательно дополнительно замещены одним или несколькими заместителями, включающими, но не ограничиваясь этим,  $-C_1-C_8$  алкил,  $-C_2-C_8$  алкенил,  $-C_2-C_8$  алкинил, -галоген,  $-O-(C_1-C_8)$  алкил),  $-O-(C_2-C_8)$  алкенил),  $-O-(C_2-C_8)$  алкинил), -арил,  $-C(O)R''$ ,  $-OC(O)R''$ ,  $-C(O)OR''$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-C(O)NHR''$ ,  $-C(O)N(R'')_2$ ,  $-NHC(O)R''$ ,  $-SR''$ ,  $-SO_3R''$ ,  $-S(O)_2R''$ ,  $-S(O)R''$ ,  $-OH$ ,  $-N_3$ ,  $-NH_2$ ,  $-NH(R'')$ ,  $-N(R'')_2$  и  $-CN$ , где каждый  $R''$  независимо выбран из  $-H$ ,  $-C_1-C_8$  алкила,  $-C_2-C_8$  алкенила,  $-C_2-C_8$  алкинила или арила.

В качестве примера, а не ограничения, углерод-связанные гетероциклы могут быть связаны в следующих положениях: положение 2, 3, 4, 5 или 6 пиридина; положение 3, 4, 5 или 6 пиридазина; положение 2, 4, 5 или 6 пиримидина; положение 2, 3, 5 или 6 пиазина; положение 2, 3, 4 или 5 фурана, тетрагидрофурана, тиофурана, тиофена, пиррола или тетрагидропиррола; положение 2, 4 или 5 оксазола, имидазола или тиазола; положение 3, 4 или 5 изоксазола, пиазола или изотиазола; положение 2 или 3 азиридина; положение 2, 3 или 4 азетидина; положение 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 хинолина; или положение 1, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 изохинолина. Еще более типично, углерод-связанные гетероциклы включают 2-пиридил, 3-пиридил, 4-пиридил, 5-пиридил, 6-пиридил, 3-пиридазинил, 4-пиридазинил, 5-пиридазинил, 6-пиридазинил, 2-пиримидинил, 4-пиримидинил, 5-пиримидинил, 6-пиримидинил, 2-пиразинил, 3-пиразинил, 5-пиразинил, 6-пиразинил, 2-тиазолил, 4-тиазолил или 5-тиазолил.

В качестве примера, а не ограничения, азот-связанные гетероциклы могут быть связаны в положении 1 азиридина, азетидина, пиррола, пирролидина, 2-пирролина, 3-пирролина, имидазола, имидазолидина, 2-имидазолина, 3-имидазолина, пиазола, пиазолина, 2-пиазолина, 3-пиазолина, пиперидина, пиперазина, индола, индолина или 1Н-индазола; положении 2 изоиндола или изоиндолина; положении 4 морфолина; и положении 9 карбазола или bbb-карболина. Еще более типично, азот-связанные гетероциклы включают 1-азиридил, 1-азетидил, 1-пирролил, 1-имидазолил, 1-пиазолил и 1-пиперидинил.

Если не указано иное, термин "карбоцикл" относится к насыщенной или ненасыщенной неароматической моноциклической, бициклической или полициклической кольцевой системе, содержащей от 3 до 14 кольцевых атомов (и все комбинации и субкомбинации диапазонов и конкретных количеств атомов углерода в указанных пределах), где все из кольцевых атомов являются атомами углерода. Моноциклические карбоциклы предпочтительно содержат от 3 до 6 кольцевых атомов, еще более предпочтительно 5 или 6 кольцевых атомов. Бициклические карбоциклы предпочтительно содержат от 7 до 12 кольцевых атомов, например, расположенных в виде бицикло [4,5], [5,5], [5,6] или [6,6] системы, или 9 или 10 кольцевых атомов расположенных в виде бицикло [5,6] или [6,6] системы. Термин "карбоцикл" включает, например, моноциклическое карбоциклическое кольцо, конденсированное с арильным кольцом (например, моноциклическое карбоциклическое кольцо, конденсированное с бензольным кольцом). Карбоциклы предпочтительно содержат от 3 до 8 углеродных кольцевых атомов. Карбоциклические группы, отдельно или как часть другой группы, могут быть необязательно замещены, например, одной или несколькими группами, предпочтительно 1 или 2 группами (и любыми дополнительными заместителями, выбранными из галогена), включая, но не ограничиваясь этим, -галоген,  $-C_1-C_8$  алкил,  $-C_2-C_8$  алкенил,  $-C_2-C_8$  алкинил,  $-O-(C_1-C_8)$  алкил),  $-O-(C_2-C_8)$  алкенил),  $-O-(C_2-C_8)$  алкинил), -арил,  $-C(O)R'$ ,  $-OC(O)R'$ ,  $-C(O)OR'$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-C(O)NHR'$ ,  $-C(O)N(R')_2$ ,  $-NHC(O)R'$ ,  $-SR'$ ,  $-SO_3R'$ ,  $-S(O)_2R'$ ,  $-S(O)R'$ ,  $-OH$ ,  $=O$ ,  $-N_3$ ,  $-NH_2$ ,  $-NH(R')$ ,  $-N(R')_2$  и  $-CN$ , где каждый  $R'$  независимо выбран из  $-H$ ,  $-C_1-C_8$  алкила,  $-C_2-C_8$  алкенила,  $-C_2-C_8$  алкинила или -арила, и где указанные  $-C_1-C_8$  алкильные,  $-C_2-C_8$  алкенильные,  $-C_2-C_8$  алкинильные,  $-O-(C_1-C_8)$  алкил),  $-O-(C_2-C_8)$  алкенил),  $-O-(C_2-C_8)$  алкинил) и -арильные группы могут быть необязательно дополнительно замещены одним или несколькими заместителями, включающими, но не ограничиваясь этим,  $-C_1-C_8$  алкил,  $-C_2-C_8$  алкенил,  $-C_2-C_8$  алкинил, -галоген,  $-O-(C_1-C_8)$  алкил),  $-O-(C_2-C_8)$  алкенил),  $-O-(C_2-C_8)$  алкинил), -арил,  $-C(O)R''$ ,  $-OC(O)R''$ ,  $-C(O)OR''$ ,  $-C(O)NH_2$ ,  $-C(O)NHR''$ ,  $-C(O)N(R'')_2$ ,  $-NHC(O)R''$ ,  $-SR''$ ,  $-SO_3R''$ ,  $-S(O)_2R''$ ,  $-S(O)R''$ ,  $-OH$ ,  $-N_3$ ,  $-NH_2$ ,  $-NH(R'')$ ,  $-N(R'')_2$  и  $-CN$ , где каждый  $R''$  независимо выбран из  $-H$ ,  $-C_1-C_8$  алкила,  $-C_2-C_8$  алкенила,  $-C_2-C_8$  алкинила или -арила.

Примеры моноциклических карбоциклических заместителей включают циклопропил, -циклобутил, -циклопентил, -1-циклопент-1-енил, -1-циклопент-2-енил, -1-циклопент-3-енил, циклогексил, -1-циклогекс-1-енил, -1-циклогекс-2-енил, -1-циклогекс-3-енил, -циклогептил, -циклооктил, -1,3-

циклогексадинил, -1,4-циклогексадинил, -1,3-циклогептадиенил, -1,3,5-циклогептатриенил и -циклооктадиенил.

"Карбоцикло", используемый отдельно или как часть другой группы, относится к необязательно замещенной карбоциклической группе, определенной выше, которая является двухвалентной (т.е. образованной путем удаления двух атомов водорода от одного и того же или разных атомов углерода исходной карбоциклической кольцевой системы).

Если контекст не диктует иное, дефис (-) означает точку присоединения к боковой цепи молекулы. Соответственно, термин "-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкилен)арил" или "-C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкилен(арил)" относится к C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкиленовому радикалу, определенному выше, где алкиленовый радикал присоединен к боковой цепи молекулы по любому из атомов углерода алкиленового радикала, и один из атомов водорода, связанных с атомом углерода алкиленового радикала, замещен арильным радикалом, определенным выше.

Когда конкретная группа является "замещенной", эта группа может иметь один или несколько заместителей, предпочтительно от одного до пяти заместителей, более предпочтительно от одного до трех заместителей, наиболее предпочтительно от одного до двух заместителей, независимо выбранных из перечня заместителей. Однако группа обычно может иметь любое количество заместителей, выбранных из галогена. Таким образом указаны замещаемые группы. Подразумевается, что определение любого заместителя или переменной в конкретном месте в молекуле является независимым от его определений в другом месте этой молекулы. Должно быть понятно, что заместители и паттерны замещения в соединениях по настоящему изобретению может выбрать обычный специалист в данной области для получения соединений, которые являются химически стабильными и которые могут быть легко синтезированы способами, известными в данной области, а также способами, описанными в настоящем изобретении.

Используемые защитные группы относятся к группам, которые селективно блокируют, временно или постоянно, один реакционноспособный участок в многофункциональном соединении. Подходящие гидрокси-защитные группы для использования в настоящем изобретении являются фармацевтически приемлемыми, и может потребоваться или может не потребоваться их отщепление от исходного соединения после введения субъекту для того, чтобы соединение было активным. Расщепление происходит в результате обычных метаболических процессов в организме. Гидрокси-защитные группы хорошо известны в данной области, см. Protective Groups in Organic Synthesis by T. W. Greene and P. G. M. Wuts (John Wiley & sons, 3<sup>rd</sup> Edition), включенный в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте и для всех целей, и включают, например, простые эфирные (например, алкиловые эфиры и силиловые эфиры, включая, например, диалкилсилиловый эфир, триалкилсилиловый эфир, диалкилалкоксисилиловый эфир), сложноэфирные, карбонатные, карбаматные, сульфонатные и фосфатные защитные группы. Примеры гидрокси-защитных групп включают, но не ограничиваются этим, метиловый эфир; метоксиметиловый эфир, метилтиометиловый эфир, (фенилдиметилсилил)метоксиметиловый эфир, бензилоксиметиловый эфир, п-метоксибензилоксиметиловый эфир, п-нитробензилоксиметиловый эфир, о-нитробензилоксиметиловый эфир, (4-метоксибензилоксиметиловый эфир) метиловый эфир, гваяколметиловый эфир, трет-бутоксиметиловый эфир, 4-пентенилоксиметиловый эфир, силкоксиметиловый эфир, 2-метоксиэтоксиметиловый эфир, 2,2,2-трихлорэтоксиметиловый эфир, бис(2-хлорэтокси)метиловый эфир, 2-(триметилсилил)этоксиметиловый эфир, метоксиметиловый эфир, тетрагидропираниловый эфир, 1-метоксициклогексильный эфир, 4-метокситетрагидропирираниловый эфир, 4-метокситетрагидропирираниловый эфир S,S-диоксид, 1-[(2-хлор-4-метил)фенил]-4-метоксиперидин-4-ильный эфир, 1-(2-фторфенил)-4-метоксиперидин-4-ильный эфир, 1,4-диоксан-2-ильный эфир, тетрагидрофураниловый эфир, тетрагидропирифураниловый эфир; замещенные этиловые эфиры, такие как 1-этоксииэтиловый эфир, 1-(2-хлорэтокси)этиловый эфир, 1-[2-(триметилсилил)этокси]этиловый эфир, 1-метил-1-метоксииэтиловый эфир, 1-метил-1-бензилоксииэтиловый эфир, 1-метил-1-бензилокси-2-фторэтиловый эфир, 1-метил-1-феноксииэтиловый эфир, 2-триметилсилиловый эфир, трет-бутиловый эфир, аллиловый эфир, пропаргильные эфиры, п-хлорфениловый эфир, п-метоксифениловый эфир, бензиловый эфир, п-метоксибензиловый эфир 3,4-диметоксибензиловый эфир, триметилсилиловый эфир, триэтилсилиловый эфир, трипропилсилиловый эфир, диметилизопропилсилиловый эфир, диэтилизопропилсилиловый эфир, диметилгексилсилиловый эфир, трет-бутилдиметилсилиловый эфир, дифенилметилсилиловый эфир, бензоилформиатный сложный эфир, ацетатный сложный эфир, хлорацетатный сложный эфир, дихлорацетатный сложный эфир, трихлорацетатный сложный эфир, трифторацетатный сложный эфир, метоксиацетатный сложный эфир, трифенилметоксиацетатный сложный эфир, фенилацетатный сложный эфир, бензоатный сложный эфир, алкил метил карбонат, алкил 9-флуоренилметил карбонат, алкилэтилкарбонат, алкил 2,2,2-трихлорэтилкарбонат, 1,1-диметил-2,2,2-трихлорэтилкарбонат, алкилсульфонат, метансульфонат, бензилсульфонат, тозилат, метиленацеталь, этилиденацеталь и трет-бутилметилиденкеталь. Предпочтительные защитные группы представлены формулами -R<sup>a</sup>, -Si(R<sup>a</sup>)(R<sup>a</sup>)(R<sup>a</sup>), -C(O)R<sup>a</sup>, -C(O)OR<sup>a</sup>, -C(O)NH(R<sup>a</sup>), -S(O)<sub>2</sub>R<sup>a</sup>, -S(O)<sub>2</sub>OH, P(O)(OH)<sub>2</sub> и -P(O)(OH)OR<sup>a</sup>, где R<sup>a</sup> представляет собой C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> алкил, C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> алкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> алкинил, -C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> алкилен(карбоцикл), -C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> алкенилен(карбоцикл), -C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> алкинилен(карбоцикл), -C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> арил, -C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> алкилен(арил), -C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> алкенилен(арил), -C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> алкинилен(арил), -C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> алкилен(гетероцикл), -C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> алкенилен(гетероцикл) или -C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub> алкинилен(гетероцикл), где указанные алкильный, алкенильный, алкинильный, алкилен, алкени-

леновый, алкиниленовый, арильный, карбоциклический и гетероциклический радикалы, отдельно или как часть другой группы, необязательно замещены.

Термин "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество" в контексте настоящего изобретения относится к количеству связывающей молекулы (например, антитела) или фармацевтической композиции, представленной в настоящем изобретении, которое является достаточным для получения желаемого результата.

Термины "субъект" и "пациент" можно использовать взаимозаменяемо. В контексте настоящего изобретения, в некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, такое как не являющееся приматом (например, корова, свинья, лошадь, кошка, собака, крыса и т.д.) или примат (например, обезьяна и человек). В конкретных вариантах осуществления субъектом является человек. В одном варианте осуществления субъектом является млекопитающее, например человек, у которого диагностировано состояние или расстройство. В другом варианте осуществления субъект представляет собой млекопитающее, например человека, подверженного риску развития состояния или расстройства.

"Вводить" или "введение" относится к действию инъекции или иной физической доставки вещества в том виде, в котором оно существует вне тела, пациенту, например, путем доставки через слизистые оболочки, внутрикжно, внутривенно, внутримышечно и/или любым другим способом физической доставки, описанным в настоящем изобретении или известным в данной области техники.

Термины "лечить", "лечение" и "лечащий" относятся к снижению или облегчению прогрессирующего, тяжести и/или продолжительности заболевания или состояния в результате применения одного или нескольких видов лечения. Лечение можно определить путем оценки, произошло или нет уменьшение, облегчение и/или уменьшение тяжести одного или нескольких симптомов, связанных с основным заболеванием, таким образом, улучшение наблюдается у пациента, несмотря на то, что пациент все еще может страдать от основного расстройства. Термин "лечение" включает как лечение, так и облегчение заболевания. Термины "вылечивать", "вылечивание" и "вылечивающий" относятся к положительным эффектам, которые субъект получает от терапии, которая не обязательно приводит к излечению от болезни.

Термины "предотвращать", "предотвращение" и "профилактика" относятся к снижению вероятности начала (или рецидива) заболевания, расстройства, состояния или ассоциированного симптома(симптомов) (например, рака).

Термин "рак" или "раковая клетка" используется для обозначения ткани или клетки, обнаруженной в новообразовании, которая обладает характеристиками, которые отличают ее от нормальной ткани или клеток ткани. Среди таких характеристик, помимо прочего, следующие: степень анаплазии, неправильная форма, нечеткость очертаний клеток, размер ядра, изменения в структуре ядра или цитоплазмы, другие фенотипические изменения, присутствие клеточных белков, указывающих на злокачественное или предраковое состояние, повышенное количество митозов и способность метастазировать. Слова, относящиеся к "раку", включают карциному, саркому, опухоль, эпителиому, лейкоз, лимфому, полип и скirros, трансформацию, новообразование и т.п.

Термины "около" и "приблизительно" означают в пределах 20%, в пределах 15%, в пределах 10%, в пределах 9%, в пределах 8%, в пределах 7%, в пределах 6%, в пределах 5%, в пределах 4%, в пределах 3%, в пределах 2%, в пределах 1% или меньше от заданного значения или диапазона.

Как используется в настоящем раскрытии и формуле изобретения, формы единственного числа включают формы множественного числа, если контекст явно не диктует иное.

Должно быть понятно, что варианты осуществления, описанные в настоящем изобретении, с использованием термина "включающий", также предусматривают аналогичные варианты осуществления, описанные с использованием термина "состоящий из" и/или "состоящий по существу из". Также должно быть понятно, что варианты осуществления, описанные в настоящем изобретении с использованием фразы "состоящий по существу из", также предусматривают аналогичные варианты осуществления, описанные с использованием фразы "состоящий из".

Термин "и/или", используемый в такой фразе, как "А и/или В", предназначен для включения как А, так и В; А или В; А (только); и В (только). Аналогичным образом, термин "и/или", используемый в такой фразе, как "А, В и/или С", предназначен для охвата каждого из следующих вариантов осуществления: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (только); В (только); и С (только).

## 5.2 Фармацевтические композиции.

В одном аспекте в настоящем изобретении представлены "фармацевтические композиции", которые включают конъюгат антитело-лекарственное средство, представленный в настоящем изобретении, и один или несколько фармацевтически приемлемых или физиологически приемлемых эксципиентов. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство представлен в комбинации, или отдельно, с одним или несколькими дополнительными средствами. Также представлена композиция, включающая такое одно или несколько дополнительных средств и один или несколько фармацевтически приемлемых или физиологически приемлемых эксципиентов. В конкретных вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство и дополнительное средство (средства) присутствуют в терапевтически приемлемом количестве. Фармацевтические композиции можно использовать в соответствии со способами и применениями, представленными в настоящем изобретении. Таким обра-

зом, например, фармацевтические композиции можно вводить *ex vivo* или *in vivo* субъекту для осуществления способов лечения и применений, представленных в настоящем изобретении. Фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, могут быть сформулированы таким образом, чтобы они были совместимы с предполагаемым способом или путем введения; примеры путей введения описаны в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления представлены фармацевтические композиции конъюгатов антитело-лекарственное средство, которые модулируют рак или опухоль.

В некоторых аспектах фармацевтические композиции могут также включать другие терапевтически активные средства или соединения, раскрытые в настоящем изобретении или известные специалистам, которые можно использовать в лечении или профилактике различных заболеваний и расстройств, описанных в настоящем изобретении (например, рака). Как описано выше, дополнительные терапевтически активные средства или соединения могут присутствовать в отдельной фармацевтической композиции (композициях).

Фармацевтические композиции типично включают терапевтически эффективное количество по меньшей мере одного из конъюгатов антитело-лекарственное средство, представленных в настоящем изобретении, и один или несколько фармацевтически приемлемых агентов для формулирования композиции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция также включает одно или несколько дополнительных средств, описанных в настоящем изобретении.

В одном варианте осуществления, фармацевтическая композиция включает конъюгат антитело-лекарственное средство, представленный в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает терапевтически эффективное количество конъюгата антитело-лекарственное средство, представленного в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает фармацевтически приемлемый эксципиент.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство в фармацевтической композиции, представленной в настоящем изобретении, выбран из конъюгатов антитело-лекарственное средство, описанных в разделе 5.3 ниже.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает конъюгат антитело-лекарственное средство при концентрации 0,1-100 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает конъюгат антитело-лекарственное средство при концентрации от 1 до 20 мг/мл. В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает конъюгат антитело-лекарственное средство при концентрации от 5 до 15 мг/мл. В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает конъюгат антитело-лекарственное средство при концентрации от 8 до 12 мг/мл. В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает конъюгат антитело-лекарственное средство при концентрации от 9 до 11 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает конъюгат антитело-лекарственное средство при концентрации около 9,5 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает конъюгат антитело-лекарственное средство при концентрации около 9,6 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает конъюгат антитело-лекарственное средство при концентрации около 9,7 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает конъюгат антитело-лекарственное средство при концентрации около 9,8 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает конъюгат антитело-лекарственное средство при концентрации около 9,9 мг/мл. Еще в некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает конъюгат антитело-лекарственное средство при концентрации около 10 мг/мл. Еще в некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает конъюгат антитело-лекарственное средство при концентрации около 10,1 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает конъюгат антитело-лекарственное средство при концентрации около 10,2 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает конъюгат антитело-лекарственное средство при концентрации около 10,3 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает конъюгат антитело-лекарственное средство при концентрации около 10,3 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает конъюгат антитело-лекарственное средство при концентрации около 10,4 мг/мл. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция включает конъюгат антитело-лекарственное средство при концентрации около 10,5 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем изобретении, включает L-гистидин, TWEEN-20 и по меньшей мере одно из дигидрата трегалозы или сахарозы. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем изобретении, дополнительно включает хлористоводородную кислоту (HCl) или янтарную кислоту.

В некоторых вариантах осуществления концентрации L-гистидина, полезного в фармацевтических композициях, представленных в настоящем изобретении, находится в пределах от 5 до 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация L-гистидина в фармацевтических композициях, представленных в настоящем изобретении, находится в пределах от 10 до 40 мМ. В некоторых вариантах осуще-











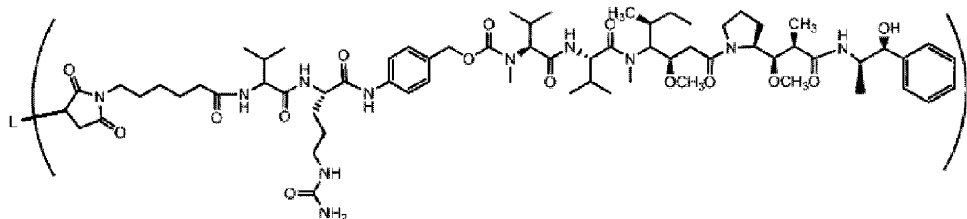
при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления рН находится на уровне около 6,0 при 25°C.

В других конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем изобретении, включает около 20 мМ L-гистидина, около 0,02% (мас./об.) TWEEN-20, около 5,5% (мас./об.) дигидрата трегалозы и янтарную кислоту. В некоторых вариантах осуществления рН находится на уровне около 6,0 при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления рН находится на уровне около 6,0 при 25°C.

В некоторых конкретных вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем изобретении, включает около 20 мМ L-гистидина, около 0,02% (мас./об.) TWEEN-20, около 5% (мас./об.) сахарозы и янтарную кислоту. В некоторых вариантах осуществления рН находится на уровне около 6,0 при комнатной температуре. В некоторых вариантах осуществления рН находится на уровне около 6,0 при 25°C.

В конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем изобретении, включает

(a) конъюгат антитело-лекарственное средство, включающий следующую структуру:

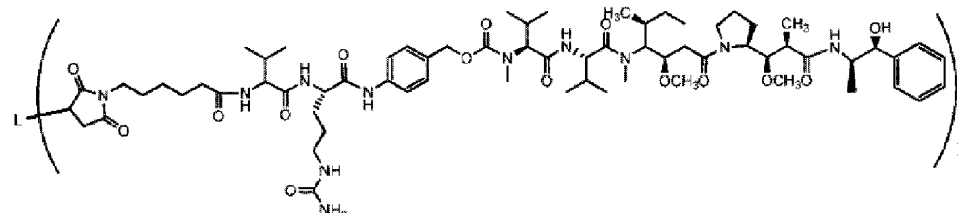


где L- представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент и р имеет значение от 1 до 10; и

(b) фармацевтически приемлемый эксципиент, включающий около 20 мМ L-гистидина, около 0,02% (мас./об.) TWEEN-20, около 5,5% (мас./об.) дигидрата трегалозы и HCl, где конъюгат антитело-лекарственное средство присутствует при концентрации около 10 мг/мл и где рН находится на уровне около 6,0 при 25°C.

В другом конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем изобретении, включает:

(a) конъюгат антитело-лекарственное средство, включающий следующую структуру:



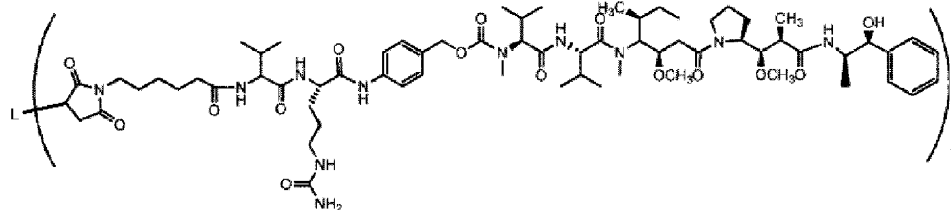
где L- представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент и р имеет значение от 1 до 10; и

(b) фармацевтически приемлемый эксципиент, включающий около 20 мМ L-гистидина, около 0,02% (мас./об.) TWEEN-20, около 5,5% (мас./об.) дигидрата трегалозы и янтарную кислоту,

где конъюгат антитело-лекарственное средство присутствует при концентрации около 10 мг/мл и где рН находится на уровне около 6,0 при 25°C.

Еще в одном конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем изобретении, включает:

(a) конъюгат антитело-лекарственное средство, включающий следующую структуру:



где L- представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент и р имеет значение от 1 до 10; и

(b) фармацевтически приемлемый эксципиент, включающий около 20 мМ L-гистидина, около 0,02% (мас./об.) TWEEN-20, около 5,0% (мас./об.) сахарозы и HCl,

где конъюгат антитело-лекарственное средство присутствует при концентрации около 10 мг/мл и где рН находится на уровне около 6,0 при 25°C.

Хотя представлены некоторые числа (и их числовые диапазоны), подразумевается, что в некоторых вариантах осуществления также рассматриваются числовые значения в пределах, например, 2%, 5%, 10%, 15% или 20% от указанных чисел (или числовых диапазонов). Другие иллюстративные фармацевтические композиции представлены в экспериментальном разделе ниже.

Основной растворитель в носителе может быть либо водным, либо неводным по природе. Кроме того, носитель может содержать другие фармацевтически приемлемые эксципиенты для изменения или поддержания pH, осмолярности, вязкости, стерильности или стабильности фармацевтической композиции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый носитель представляет собой водный буфер. В других вариантах осуществления носитель включает, например, хлорид натрия и/или цитрат натрия.

Фармацевтические композиции, представленные в настоящем изобретении, могут содержать еще другие фармацевтически приемлемые агенты для формулирования композиций для модификации или поддержания скорости высвобождения конъюгата антитело-лекарственное средство и/или дополнительного средства, как описано в настоящем изобретении. Такие агенты для формулирования композиций включают вещества, которые известны специалистам в данной области техники для получения композиций с замедленным высвобождением. Дополнительные ссылки, относящиеся к фармацевтически и физиологически приемлемым агентам для формулирования композиций, см., например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042) pages 1435-1712, The Merck Index, 12th Ed. (1996, Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ); и Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms (1993, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa.). Дополнительные фармацевтические композиции, подходящие для введения, известны в данной области и применимы в способах и композициях, представленных в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем изобретении, находится в жидкой форме. В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем изобретении, является лиофилизированной.

Фармацевтическая композиция может храниться в стерильном флаконе в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества или дигидратированного или лиофилизированного порошка. Такие композиции могут храниться либо в готовой к использованию форме, либо в лиофилизированной форме, требующей восстановления перед использованием, либо в жидкой форме, требующей разбавления перед использованием, либо в другой приемлемой форме. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция предоставляется в одноразовом контейнере (например, одноразовом флаконе, ампуле, шприце или автоинъекторе (подобном, например, EpiPen®)), тогда как в других вариантах осуществления обеспечивается многоразовый контейнер (например, многоразовый флакон). Любое устройство для доставки лекарственных средств можно использовать для доставки пептидов и других средств, описанных в настоящем изобретении, включая имплантаты (например, имплантируемые насосы) и катетерные системы, которые известны квалифицированным специалистам. Инъекции депо, которые обычно вводят подкожно или внутримышечно, также можно использовать для высвобождения пептидов и/или других средств, описанных в настоящем изобретении, в течение определенного периода времени. Композиции для депо инъекций обычно бывают либо на твердой, либо на масляной основе и обычно содержат по меньшей мере один из компонентов композиции, указанных в настоящем изобретении. Квалифицированным специалистам известны возможные композиции и применения депо инъекций. В некоторых вариантах осуществления предусматривается использование технологии депо доставки Nano Precision Medical (Nano Precision Medical; Emeryville, Ca). В технологии используется мембрана из нанотрубок из диоксида титана, которая обеспечивает скорость высвобождения макромолекул нулевого порядка, таких как белковые и пептидные терапевтические средства. Биосовместимая мембрана размещается в небольшом подкожном имплантате, который обеспечивает долгосрочную (например, до одного года) доставку терапевтических макромолекул с постоянной скоростью.

Фармацевтическая композиция может быть сформулирована таким образом, чтобы она была совместима с предполагаемым путем введения. Таким образом, фармацевтические композиции включают эксципиенты, подходящие для введения путями, включающими парентеральный (например, подкожный (п/к), внутривенный, внутримышечный или внутрибрюшинный), внутрикожный, пероральный (например, прием внутрь), ингаляционный, внутриполостный, внутричерепной и трансдермальный (местный). Другие примеры путей введения описаны в настоящем изобретении.

Фармацевтические композиции могут быть в форме стерильной водной или масляной суспензии для инъекций. Эта суспензия может быть сформулирована с использованием подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов, описанных в настоящем изобретении или известных специалистам в данной области. Стерильный препарат для инъекций может также представлять собой стерильный раствор или суспензию для инъекций в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. Приемлемые разбавители, растворители и дисперсионные среды, которые можно использовать, включают воду, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, NJ) или фосфатно-солевой

буферный раствор (PBS), этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси. Кроме того, стерильные нелетучие масла обычно используются в качестве растворителя или суспендирующей среды. Для этой цели можно использовать любое мягкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Более того, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, находят применение при получении инъекционных препаратов. Пролонгированная абсорбция определенных инъекционных композиций может достигаться путем включения агента, замедляющего абсорбцию (например, моностеарата алюминия или желатина).

В одном варианте осуществления фармацевтические композиции, представленные в настоящем изобретении, можно вводить парентерально путем инъекции, инфузии или имплантации для местного или системного введения. Парентеральное введение, как используется в настоящем изобретении, включает внутривенное, внутриартериальное, интраперитонеальное, интратекальное, интравентрикулярное, интрауретральное, интратермальное, интракраниальное, внутримышечное, интрасиновиальное и подкожное введение.

В одном варианте осуществления фармацевтические композиции, представленные в настоящем изобретении, можно сформулировать в виде любых лекарственных форм, которые подходят для парентерального введения, включая растворы, суспензии, эмульсии, мицеллы, липосомы, микросферы, наносистемы и твердые формы, подходящие для растворов или суспензий в жидкости перед инъекцией. Такие лекарственные формы можно получить обычными способами, известными специалистам в области фармацевтики (см., например, Remington, The Science and Practice of Pharmacy, выше).

В одном варианте осуществления фармацевтические композиции, предназначенные для парентерального введения, могут включать один или несколько фармацевтически приемлемых эксципиентов, включая, но не ограничиваясь этим, водные носители, смешивающиеся с водой носители, неводные носители, antimicrobные агенты или консерванты против роста микроорганизмов, стабилизаторы, усилители растворимости, изотонические агенты, буферные агенты, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие агенты, смачивающие или эмульгирующие агенты, комплексообразующие агенты, секвестрирующие или хелатирующие агенты, крипротекторы, лиопротекторы, загустители, агенты, регулирующие pH, и инертные газы.

В одном варианте осуществления подходящие водные носители включают, но не ограничиваются этим, воду, солевой раствор, физиологический раствор или фосфатно-солевой буферный раствор (PBS), раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, изотонический раствор декстрозы для инъекций, стерильную воду для инъекций, раствор декстрозы и лактата Рингера для инъекций. Неводные носители включают, но не ограничиваются этим, жирные масла растительного происхождения, касторовое масло, кукурузное масло, хлопковое масло, оливковое масло, арахисовое масло, масло мяты перечной, сафлоровое масло, кунжутное масло, соевое масло, гидрогенизированные растительные масла, гидрогенизированное соевое масло, среднецепочечные триглицериды кокосового масла и пальмовое масло. Смешивающиеся с водой носители включают, но не ограничиваются этим, этанол, 1,3-бутандиол, жидкий полиэтиленгликоль (например, полиэтиленгликоль 300 и полиэтиленгликоль 400), пропиленгликоль, глицерин, N-метил-2-пирролидон, N,N-диметилацетамид и диметилсульфоксид.

В одном варианте осуществления подходящие противомикробные агенты или консерванты включают, но не ограничиваются этим, фенолы, крезолы, ртутные соединения, бензиловый спирт, хлорбутанол, метил- и пропил-пара-гидроксibenзоаты, тимерозал, бензалконий хлорид (например, бензетоний хлорид), метил- и пропилпарабены, и сорбиновую кислоту. Подходящие изотонические агенты включают, но не ограничиваются этим, хлорид натрия, глицерин и декстрозу. Подходящие буферные агенты включают, но не ограничиваются этим, фосфат и цитрат. Подходящими антиоксидантами являются вещества, которые описаны в настоящем изобретении, включая бисульфит и метабисульфит натрия. Подходящие местные анестетики включают, но не ограничиваются этим, гидрохлорид прокаина. Подходящими суспендирующими и диспергирующими агентами являются вещества, которые описаны в настоящем изобретении, включая карбоксиметилцеллюлозу натрия, гидроксипропилметилцеллюлозу и поливинилпирролидон. Подходящие эмульгирующие агенты включают вещества, которые описаны в настоящем изобретении, включая полиоксиэтиленсорбитан монолаурат, полиоксиэтиленсорбитан моноолеат 80 и триэтаноламин олеат. Подходящие связывающие или хелатирующие агенты включают, но не ограничиваются этим, EDTA. Подходящие агенты для регулирования pH включают, но не ограничиваются этим, гидроксид натрия, хлористоводородную кислоту, лимонную кислоту и молочную кислоту. Подходящие комплексообразующие агенты включают, но не ограничиваются этим, циклодекстрины, в том числе  $\alpha$ -циклодекстрин,  $\beta$ -циклодекстрин, гидроксипропил- $\beta$ -циклодекстрин, сульфобутиловый эфир- $\beta$ -циклодекстрин и сульфобутиловый эфир 7-циклодекстрин (CAPTISOL®, CyDex, Lenexa, KS).

В одном варианте осуществления фармацевтические композиции, представленные в настоящем изобретении, можно сформулировать для введения однократных или многократных доз. Одноразовые композиции упаковывают в ампулы, флаконы или шприцы. Многодозовые композиции для парентерального введения могут содержать противомикробный агент в бактериостатических или фунгистатических концентрациях. Все парентеральные композиции должны быть стерильными, как известно и практикует-

ся в данной области.

В одном варианте осуществления фармацевтические композиции представлены в виде готовых к использованию стерильных растворов. В другом варианте осуществления фармацевтические композиции представлены в виде стерильных сухих растворимых продуктов, включая лиофилизированные порошки и таблетки для подкожных инъекций, которые должны быть восстановлены при помощи носителя перед использованием. В еще одном варианте осуществления фармацевтические композиции представлены в виде готовых к использованию стерильных суспензий. В еще одном варианте осуществления фармацевтические композиции представлены в виде стерильных сухих нерастворимых продуктов, подлежащих восстановлению при помощи носителя перед использованием. В еще одном варианте осуществления фармацевтические композиции представлены в виде готовых к использованию стерильных эмульсий.

В одном варианте осуществления фармацевтические композиции, представленные в настоящем изобретении, можно сформулировать в виде лекарственных форм с немедленным или модифицированным высвобождением, включая формы с отсроченным, замедленным, импульсным, контролируемым, направленным и запрограммированным высвобождением.

В одном варианте осуществления фармацевтические композиции можно сформулировать в виде суспензии, твердой, полутвердой или тиксотропной жидкости для введения в виде имплантированного депо. В одном варианте осуществления фармацевтические композиции, представленные в настоящем изобретении, диспергированы в твердой внутренней матрице, которая окружена внешней полимерной мембраной, которая нерастворима в жидкостях организма, но позволяет активному ингредиенту фармацевтических композиций диффундировать через нее.

В одном варианте осуществления подходящие внутренние матрицы включают полиметилметакрилат, полибутилметакрилат, пластифицированный или непластифицированный поливинилхлорид, пластифицированный нейлон, пластифицированный полиэтилентерефталат, натуральный каучук, полиизопрен, полиизобутилен, полибутадиен, полиэтилен, этилен-винилацетатные сополимеры, силиконовые каучуки, полидиметилсилоксаны, силикон-карбонатные сополимеры, гидрофильные полимеры, такие как гидрогели сложных эфиров акриловой и метакриловой кислоты, коллаген, сшитый поливиниловый спирт и сшитый частично гидролизованный поливинилацетат.

В одном варианте осуществления подходящие внешние полимерные мембраны включают полиэтилен, полипропилен, сополимеры этилена/пропилена, сополимеры этилена/этилакрилата, сополимеры этилена/винилацетата, силиконовые каучуки, полидиметилсилоксаны, неопреновый каучук, хлорированный полиэтилен, поливинилхлорид, сополимеры винилхлорида с винилацетатом, винилиденхлоридом, этиленом и пропиленом, иономерный полиэтилентерефталат, бутилкаучук, эпихлоргидриновые каучуки, сополимер этилена/винилового спирта, сополимер этилена/винилоксиэтанола и тройной сополимер этилена/винилацетата/винилового спирта.

Водные суспензии содержат активные вещества в смеси с эксципиентами, подходящими для их получения. Такими эксципиентами являются суспендирующие агенты, например карбоксиметилцеллюлоза натрия, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовая камедь и аравийская камедь; диспергирующие или смачивающие агенты могут представлять собой природный фосфатид, например лецитин, или продукты конденсации алкиленоксида с жирными кислотами, например полиоксиэтиленстеарат, или продукты конденсации этиленоксида с длинноцепочечными алифатическими спиртами, например гептадекаэтиленоксицетанол, или продукты конденсации этиленоксида с неполными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и гексита, такими как полиоксиэтиленсорбит моноолеат, или продукты конденсации этиленоксида с неполными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и ангидридов гексита, например полиэтиленсорбитан моноолеат. Водные суспензии также могут содержать один или несколько консервантов.

Масляные суспензии можно сформулировать путем суспендирования активного ингредиента в растительном масле, например арахисовом масле, оливковом масле, кунжутном масле или кокосовом масле, или в минеральном масле, таком как жидкий парафин. Масляные суспензии могут содержать загуститель, например пчелиный воск, твердый парафин или цетиловый спирт. Подсластители, такие как указанные выше, и ароматизаторы могут быть добавлены для получения приятного на вкус перорального препарата.

Диспергируемые порошки и гранулы, подходящие для получения водной суспензии путем добавления воды, обеспечивают активный ингредиент в смеси с диспергирующим или смачивающим агентом, суспендирующим агентом и одним или несколькими консервантами. Примеры подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов приведены в настоящем изобретении.

Фармацевтические композиции, представленные в настоящем изобретении, также могут быть в форме эмульсий масло-в-воде. Масляная фаза может представлять собой растительное масло, например оливковое масло или арахисовое масло, или минеральное масло, например жидкий парафин, или их смеси. Подходящими эмульгирующими агентами могут быть природные камеди, например аравийская камедь или трагакантовая камедь; встречающиеся в природе фосфатиды, например, соевые бобы, лецитин и сложные или неполные сложные эфиры, полученные из жирных кислот; ангидриды гексита, например сорбитан моноолеат; и продукты конденсации неполных сложных эфиров с этиленоксидом, например

полиоксиэтиленсорбитан моноолеат.

Фармацевтические композиции могут также включать эксципиенты для защиты композиции от быстрого разложения или выведения из организма, например, композиции с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, липосомы, гидрогели, пролекарства и микрокапсулированные системы доставки. Например, можно использовать вещество для задержки высвобождения, такое как глицеринмоностеарат или глицеринстеарат, отдельно или в комбинации с воском. Длительная абсорбция фармацевтических композиций для инъекций может достигаться путем включения агента, замедляющего абсорбцию, например моностеарата алюминия или желатина. Предотвратить действие микроорганизмов можно с использованием различных антибактериальных и противогрибковых средств, например парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.п.

Фармацевтическую композицию, представленную в настоящем изобретении, можно хранить при  $-80^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$  или  $37^{\circ}\text{C}$ .

Лиофилизированная композиция может быть получена путем лиофилизации жидкой фармацевтической композиции, представленной в настоящем изобретении. В конкретном варианте осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем изобретении, представляет собой лиофилизированную фармацевтическую композицию. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции представляют собой лиофилизированные порошки, которые могут быть восстановлены для введения в виде растворов, эмульсий и других смесей. Они также могут быть восстановлены и сформулированы в виде твердых веществ или гелей.

В некоторых вариантах осуществления получение лиофилизированной композиции, представленной в настоящем изобретении, включает дозирование полученного нерасфасованного раствора для лиофилизации, асептическую фильтрацию, заполнение флаконов, замораживание флаконов в камере сублимационной сушки с последующей лиофилизацией, укупориванием и запечатыванием.

Лиофилизатор можно использовать для получения лиофилизированной композиции. Например, можно использовать пилотную установку VirTis Genesis Model EL. Агрегат включает камеру с тремя рабочими полками (с общей полезной площадью полок около 0,4 квадратных метров), внешний конденсатор и систему механической вакуумной откачки. Каскадное механическое охлаждение позволяет охлаждать полки до  $-70^{\circ}\text{C}$  или ниже, а внешний холодильник до  $-90^{\circ}\text{C}$  или ниже. Температура полки и давление в камере регулируются автоматически до  $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$  и  $\pm 2$  микрон (миллиТорр), соответственно. Устройство оборудовано емкостным манометром, вакуумметром Пирани, датчиком давления (для измерения от 0 до 1 атмосферы) и датчиком относительной влажности.

Лиофилизированный порошок можно получить путем растворения конъюгата антитело-лекарство, представленного в настоящем изобретении, или его фармацевтически приемлемого производного в подходящем растворителе. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный порошок является стерильным. Последующая стерильная фильтрация раствора с последующей лиофилизацией в стандартных условиях, известных специалистам в данной области, обеспечивает желаемую композицию. В одном варианте осуществления полученный раствор будет распределен по флаконам для лиофилизации. Каждый флакон будет содержать одну или несколько доз конъюгата антитело-лекарственное средство. Лиофилизированный порошок можно хранить в соответствующих условиях, например при температуре от около  $4^{\circ}\text{C}$  до комнатной температуры.

Восстановление этого лиофилизированного порошка водой для инъекций обеспечивает композицию для парентерального введения. Для восстановления лиофилизированный порошок добавляют к стерильной воде или другому подходящему эксципиенту. Такое количество может быть определено эмпирически и скорректировано в соответствии с конкретными потребностями.

Пример процедуры восстановления проиллюстрирован следующим образом: (1) вставить в 5-мл или 3-мл шприц иглу калибра 18 или 20 и заполнить шприц водой категории Вода для инъекций (WFI); (2) отмерить необходимое количество WFI, используя градуировку шприца, убедившись, что в шприце не было пузырьков воздуха; (3) вставьте иглу через резиновую пробку; (4) ввести все содержимое шприца в контейнер по стенке флакона, вынуть шприц и иглу и поместить в контейнер для острых предметов; (4) непрерывно вращать флакон, чтобы тщательно солибилизовать все содержимое флакона до полного восстановления (например, около 20-40 секунд) и минимизировать чрезмерное перемешивание белкового раствора, которое может привести к вспениванию.

### 5.3 Конъюгат анти-191P4D12 антитело-лекарственное средство.

Фармацевтические композиции, препараты и лекарственные формы, представленные в настоящем изобретении, включают конъюгаты анти-191P4D12 антитело-лекарственное средство. Конъюгат анти-191P4D12 антитело-лекарственное средство, представленный в настоящем изобретении, включает антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которое (который) связывается с 191P4D12, конъюгированным с одной или несколькими единицами цитотоксических средств (или единицами лекарственного средства). Цитотоксические средства (или единицы лекарственного средства) могут быть ковалентно связаны непосредственно или через линкерный компонент (LU).

В некоторых вариантах осуществления соединения, представляющее собой конъюгат антитело-лекарственное средство, имеет следующую формулу: L-(LU-D)<sub>p</sub> (I) или его фармацевтически приемлемая

соль или сольват; где:

L является компонентом, представляющим собой антитело, например, анти-191P4D12 антитело или его антиген-связывающий фрагмент, представленный в разделе 5.3.1 ниже, и

(LU-D) представляет собой фрагмент линкер-лекарственное средство, где:

LU- представляет собой линкерный компонент, и

D является компонентом, представляющим собой лекарственное средство, обладающее цитостатической или цитотоксической активностью против клетки-мишени; и

r представляет собой целое число от 1 до 20.

В некоторых вариантах осуществления r имеет значение от 1 до 10, от 1 до 9, от 1 до 8, от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2. В некоторых вариантах осуществления r имеет значение от 2 до 10, от 2 до 9, от 2 до 8, от 2 до 7, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4 или от 2 до 3. В других вариантах осуществления r имеет значение около 1. В других вариантах осуществления r имеет значение около 2. В других вариантах осуществления r имеет значение около 3. В других вариантах осуществления r имеет значение около 4. В других вариантах осуществления r имеет значение около 5. В других вариантах осуществления r имеет значение около 6. В других вариантах осуществления r имеет значение около 7. В других вариантах осуществления r имеет значение около 8. В других вариантах осуществления r имеет значение около 9. В других вариантах осуществления r имеет значение около 10.

В некоторых вариантах осуществления соединение, представляющее собой конъюгат антитело-лекарственное средство, имеет следующую формулу:  $L-(A_a-W_w-Y_y-D)_p$  (II)

или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, где:

L является компонентом, представляющим собой антитело, например, анти-191P4D12 антитело или антиген-связывающий фрагмент, представленным в разделе 5.3.1 ниже; и

$-A_a-W_w-Y_y-$  представляет собой линкерный компонент (LU), где:

$-A-$  представляет собой удлиняющий компонент,

а имеет значение 0 или 1,

каждый  $-W-$  независимо представляет собой аминокислотный компонент,

w представляет собой целое число от 0 до 12,

$-Y-$  представляет собой саморасщепляющийся спейсерный компонент,

у имеет значение 0, 1 или 2;

D представляет собой лекарственный компонент, обладающий цитостатической или цитотоксической активностью против клетки-мишени; и

r представляет собой целое число от 1 до 20.

В некоторых вариантах осуществления a имеет значение 0 или 1, w имеет значение 0 или 1 и у имеет значение 0, 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления a имеет значение 0 или 1, w имеет значение 0 или 1 и у имеет значение 0 или 1. В некоторых вариантах осуществления r имеет значение от 1 до 10, от 1 до 9, от 1 до 8, от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2. В некоторых вариантах осуществления r имеет значение от 2 до 8, от 2 до 7, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4 или от 2 до 3. В других вариантах осуществления r имеет значение 1, 2, 3, 4, 5 или 6. В некоторых вариантах осуществления r is 2 или 4. В некоторых вариантах осуществления когда w не равен 0, у имеет значение 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления когда w имеет значение от 1 до 12, у имеет значение 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления w имеет значение от 2 до 12 и у имеет значение 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления a имеет значение 1 и w и у имеют значение 0.

Для композиций, содержащих множество антител или их антиген-связывающих фрагментов, нагрузка лекарственным средством, представленная символом r, означает среднее число молекул лекарственного средства на единицу антитела. Нагрузка лекарственным средством может варьироваться от 1 до 20 молекул лекарственного средства (D) на антитело. Среднее количество молекул лекарственного средства на антитело при подготовке реакций конъюгации может быть охарактеризовано обычными методами, такими как масс-спектрометрия, анализ ELISA и ВЭЖХ. Также может быть определено количественное распределение конъюгатов антитело-лекарственное средство с точки зрения r. В некоторых случаях выделение, очистка и характеристика гомогенных конъюгатов антитело-лекарство, где r представляет собой определенное значение, из конъюгатов антитело-лекарство с другими нагрузками лекарственным средством, могут быть достигнуты такими методами, как обращенно-фазовая ВЭЖХ или электрофорез. В иллюстративных вариантах осуществления r составляет от 2 до 8.

5.3.1 Анти-191P4D12 антитела или антиген-связывающие фрагменты.

В одном варианте осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент, который связывается с 191P4D12-родственными белками, представляет собой антитело или антиген-связывающий фрагмент, который специфически связывается с 191P4D12 белком, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 (см. фиг. 5A). Соответствующая кДНК, кодирующая 191P4D12 белок, имеет последовательность SEQ ID NO: 1 (см. фиг. 5A).

Антитело, которое специфически связывается с 191P4D12 белком, включающим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, включает антитела, которые могут связываться с другими 191P4D12-родственными белками. Например, антитела, которые связываются с 191P4D12 белком, включающим



аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, могут связываться с 191P4D12-родственными белками, такими как 191P4D12 варианты и их гомологи или аналоги.

В некоторых вариантах осуществления анти-191P4D12 антитело, представленное в настоящем изобретении, представляет собой моноклональн антитело.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (последовательность κДНК SEQ ID NO: 3), и/или легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (последовательность κДНК SEQ ID NO: 5), как показано в фиг. 5B.

В некоторых вариантах осуществления анти-191P4D12 антитело или его антиген-связывающий фрагмент включает переменную область тяжелой цепи, включающую определяющие комплементарность области (CDR), включающие аминокислотные последовательности CDRs переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, включающую CDR, включающие аминокислотные последовательности CDRs переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8. SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8 показаны на фиг. 5C и представлены ниже:

SEQ ID NO:7

MELGLCWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYNMN  
WVRQAPGKGLEWVSYISSSSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLSLQMNLRDEDTAVY  
YCARAYYYGMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD  
KRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPE  
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL  
PAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE  
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  
K

SEQ ID NO:8

MDMRVPAQLLGLLLWFPGRCDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIGSW  
LAWYQQKPGKAPKFLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAN  
SFPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN  
ALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR  
GEC

В некоторых вариантах осуществления анти-191P4D12 антитело или его антиген-связывающий фрагмент включает переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотные последовательности переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 22 (которая представляет собой аминокислотную последовательность от 20-й аминокислоты (глутаминовая кислота) до 136-й аминокислоты (серин) SEQ ID NO: 7), и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотные последовательности переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 23 (которая представляет собой аминокислотную последовательность от 23-й аминокислоты (аспарагиновая кислота) до 130-й аминокислоты (аргинин) SEQ ID NO: 8). В других вариантах осуществления анти-191P4D12 антитело или его антиген-связывающий фрагмент включает переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотных последовательностей переменной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 22 (которая представляет собой аминокислотную последовательность от 20-й аминокислоты (глутаминовая кислота) до 136-й аминокислоты (серин) SEQ ID NO: 7), и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотных последовательностей переменной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 23 (которая представляет собой аминокислотную последовательность от 23-й аминокислоты (аспарагиновая кислота) до 130-й аминокислоты (аргинин) SEQ ID NO: 8). SEQ ID NO: 22 и SEQ ID NO: 23 представлены ниже:

SEQ ID NO:22

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYNMNWVRQAPGKGLEWVSYISSS  
SSTIYYADSVKGRFTISRDNKNSLSLQMNLRDEDTAVYYCARAYYYGMDVWGQGT  
ITVTVSS

SEQ ID NO:23

DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIGSWLAWYQQKPGKAPKFLIYAASLQ  
SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPPTFGGGTKVEIKR

Последовательности CDR можно определить в соответствии с хорошо известными системами нумерации. Как описано выше, CDR области хорошо известны специалистам в данной области и определены при помощи хорошо известных систем нумерации.

Например, области, определяющие комплементарность (CDR), по Kabat основаны на вариабельности последовательностей и наиболее часто используются (см., например, Kabat et al., выше). Chothia вместо этого относится к расположению структурных петель (см., например, Chothia and Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196: 901-17). Конец CDR-H1 петли Chothia при нумерации с использованием системы нумерации Kabat варьируется между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это потому, что система нумерации Kabat помещает вставки в H35A и H35B; если ни 35A, ни 35B не присутствует, петля заканчивается на 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается на 33; если присутствуют и 35A, и 35B, петля заканчивается на 34). Гипервариабельные области AbM представляют собой компромисс между CDR по Kabat и структурными петлями Chothia и используются в программном обеспечении для моделирования антител Oxford Molecular's AbM (см., например, *Antibody Engineering Vol. 2* (Kontermann and Dübel eds., 2d ed. 2010)). "Контактные" гипервариабельные области основаны на анализе имеющихся сложных кристаллических структур. Другая универсальная система нумерации, которая была разработана и широко принята, представляет собой ImMunoGeneTics (IMGT) Information System® (Lafranc et al., 2003, *Dev. Comp. Immunol.* 27(1):55-77). IMGT представляет интегрированную информационную систему, специализирующуюся в области иммуноглобулинов (IG), T-клеточных рецепторов (TCR) и главного комплекса гистосовместимости (MHC) человека и других позвоночных. В настоящем изобретении CDR указаны как с точки зрения аминокислотной последовательности, так и с точки зрения местоположения в легкой или тяжелой цепи. Поскольку "расположение" CDR в структуре вариабельного домена иммуноглобулина является консервативным для разных видов и присутствует в структурах, называемых петлями, с использованием систем нумерации, которые выравнивают последовательности вариабельных доменов в соответствии со структурными особенностями, CDR и каркасные остатки легко идентифицируются. Эта информация может быть использована для прививки и замены CDR остатков из иммуноглобулинов одного вида в акцепторном каркасе, как правило, человеческого антитела. Дополнительная система нумерации (AHon) была разработана Honegger and Plückthun, 2001, *J. Mol. Biol.* 309: 657-70. Соответствие между системой нумерации, включая, например, нумерацию Kabat и систему уникальной нумерации IMGT, хорошо известно специалистам в данной области техники (см., например, Kabat, выше; Chothia and Lesk, выше; Martin, выше; Lafranc et al., выше). Остатки из каждой из этих гипервариабельных областей или CDR указаны в табл. 30 выше.

В некоторых вариантах осуществления анти-191P4D12 антитело или его антиген-связывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую определяющие комплементарность области (CDRs), включающие аминокислотные последовательности CDRs вариабельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 7, в соответствии с нумерацией Kabat, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR, включающие аминокислотные последовательности CDRs вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8, в соответствии с нумерацией Kabat.

В некоторых вариантах осуществления анти-191P4D12 антитело или его антиген-связывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую определяющие комплементарность области (CDR), включающие аминокислотные последовательности CDRs вариабельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 7, в соответствии с нумерацией AbM, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR, включающие аминокислотные последовательности CDRs вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8, в соответствии с нумерацией AbM.

В других вариантах осуществления анти-191P4D12 антитело или его антиген-связывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую определяющие комплементарность области (CDR), включающие аминокислотные последовательности CDRs вариабельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 7, в соответствии с нумерацией Chothia, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR, включающие аминокислотные последовательности CDRs вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8, в соответствии с нумерацией Chothia.

В других вариантах осуществления анти-191P4D12 антитело или его антиген-связывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую определяющие комплементарность области (CDR), включающие аминокислотные последовательности CDRs вариабельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 7, в соответствии с нумерацией по Контактной системе, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR, включающие аминокислотные последовательности CDRs вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8, в соответствии с нумерацией по Контактной системе.

Еще в некоторых вариантах осуществления анти-191P4D12 антитело или его антиген-связывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи, включающую определяющие комплементарность области (CDR), включающие аминокислотные последовательности CDRs вариабельной области тяжелой цепи, представленной в SEQ ID NO: 7, в соответствии с нумерацией IMGT, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR, включающие аминокислотные последовательности CDRs вариабельной области легкой цепи, представленной в SEQ ID NO: 8, в соответствии с нумерацией IMGT.

Как описано выше, последовательности CDR в соответствии с различными системами нумерации могут быть легко определены, например, с использованием онлайн инструментов, таких как представленные Antigen receptor Numbering And Receptor Classification (ANARCI). Например, последовательности

CDR тяжелой цепи в SEQ ID NO: 7 и последовательности CDR легкой цепи в SEQ ID NO: 8, в соответствии с нумерацией Kabat, определенные при помощи ANARCI, представлены в табл. 31 ниже.

Таблица 31

	VH SEQ ID NO:7	VL SEQ ID NO:8
CDR1	SYNM N (SEQ ID NO:9)	RASQGISGW LA (SEQ ID NO:12)
CDR2	YISSSSSTIYYADSV KG (SEQ ID NO:10)	AATLQS (SEQ ID NO:13)
CDR3	AYYYGMDV (SEQ ID NO:11)	QQANSFPPT (SEQ ID NO:14)

В качестве другого примера, последовательности CDR тяжелой цепи в SEQ ID NO: 22 и последовательности CDR легкой цепи в SEQ ID NO: 23 в соответствии с нумерацией IMGT, определенные при помощи ANARCI, представлены в табл. 32 ниже.

Таблица 32

	VH SEQ ID NO:7	VL SEQ ID NO:8
CDR1	GFTFSSYN (SEQ ID NO:16)	QGISGW (SEQ ID NO:19)
CDR2	ISSSSSTI (SEQ ID NO:17)	AAS (SEQ ID NO:20)
CDR3	ARAYYYGMDV (SEQ ID NO:18)	QQANSFPPT (SEQ ID NO:21)

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент включает CDR H1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, CDR H2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, CDR H3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, CDR L1, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: NO: 12, CDR L2, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: NO: 13 и CDR L3, включающую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: NO: 14.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент включает переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность от 20-й аминокислоты (глутаминовая кислота) до 136-й аминокислоты (серин) SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, включающую аминокислотную последовательность от 23-й аминокислоты (аспарагиновая кислота) до 130-й аминокислоты (аргинин) SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления антитело включает тяжелую цепь, включающую аминокислотную последовательность от 20-й аминокислоты (глутаминовая кислота) до 466-й аминокислоты (лизин) SEQ ID NO: 7, и легкую цепь, включающую аминокислотную последовательность от 23-й аминокислоты (аспарагиновая кислота) до 236-й аминокислоты (цистеин) SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления предусматривается модификация (модификации) аминокислотной последовательности антител, описанных в настоящем изобретении. Например, может быть желательно оптимизировать аффинность связывания и/или другие биологические свойства антитела, включая, но не ограничиваясь этим, специфичность, термостабильность, уровень экспрессии, эффекторные функции, гликозилирование, пониженную иммуногенность или растворимость. Таким образом, в дополнение к антителам, описанным в настоящем изобретении, предполагается, что могут быть получены варианты антител. Например, варианты антител могут быть получены путем внесения соответствующих нуклеотидных изменений в кодирующую ДНК и/или путем синтеза желаемого антитела или полипептида. Специалистам в данной области должно быть понятно, что изменения аминокислот могут изменять посттрансляционные процессы антитела, такие как изменение количества или положения сайтов гликозилирования или изменение характеристик прикрепления к мембране.

В некоторых вариантах осуществления антитела, представленные в настоящем изобретении, химически модифицированы, например, путем ковалентного присоединения к антителу молекулы любого типа. Производные антител могут включать антитела, которые были химически модифицированы, например, гликозилированием, ацетилированием, пегилированием, фосфорилированием, амидированием, дериватизацией известными защитными/блокирующими группами, протеолитическим расщеплением, связыванием с клеточным лигандом или другим белком и т.д. Любую из многочисленных химических модификаций можно осуществить известными методами, включая, но не ограничиваясь этим, специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формулирование, метаболический синтез туникамина и т.д. Кроме того, антитело может содержать одну или несколько неклассических аминокислот.

Изменения могут представлять собой замену, делецию или вставку одного или нескольких кодонов, кодирующих один домен антитела или полипептида, что приводит к изменению в аминокислотной последовательности по сравнению с исходным антителом или полипептидом. Аминокислотные замены могут быть результатом замены одной аминокислоты другой аминокислотой, включающей подобные структурные и/или химические свойства, такой как замена лейцина серином, например, консервативные аминокислотные замены. Можно использовать стандартные методы, известные специалистам в данной области, для введения мутаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую молекулу, представ-

ленную в настоящем изобретении, включая, например, сайт-направленный мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез, который приводит к аминокислотным заменам. Вставки или делеции необязательно могут включать от около 1 до 5 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления замена, делеция или вставка включает меньше чем 25 аминокислотных замен, меньше 20 аминокислотных замен, меньше 15 аминокислотных замен, меньше 10 аминокислотных замен, меньше 5 аминокислотных замен, меньше 4 аминокислотных замен, меньше 3 аминокислотных замен или меньше 2 аминокислотных замен по сравнению с исходной молекулой. В конкретном варианте осуществления замена представляет собой консервативную аминокислотную замену на одном или нескольких прогнозируемых несущественных аминокислотных остатках. Допускаемое изменение можно определить систематически осуществляя вставки, делеции или замены аминокислот в последовательности и тестируя полученные варианты на активность, проявляемую исходным антителом.

Вставки в аминокислотной последовательности включают amino- и/или карбокси-концевые слияния, имеющие длину от одного остатка до полипептидов, содержащих несколько остатков, а также вставки внутри последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым метионильным остатком.

Антитела, полученные путем консервативных аминокислотных замен, включены в настоящее изобретение. При консервативной аминокислотной замене аминокислотный остаток заменяется аминокислотным остатком, включающим боковую цепь с подобным зарядом. Как описано выше, семейства аминокислотных остатков, включающих боковые цепи с подобными зарядами, определены в данной области техники. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Альтернативно, мутации могут быть введены произвольным образом вдоль всей или части кодирующей последовательности, например путем насыщающего мутагенеза, и полученные мутанты можно скринировать на биологическую активность для идентификации мутантов, которые сохраняют активность. После мутагенеза кодируемый белок можно экспрессировать и можно определить активность белка, можно осуществить консервативные (например, в рамках группы аминокислот с подобными свойствами и/или боковыми цепями) замены так, чтобы свойства сохранялись или не изменялись существенно.

Аминокислоты могут быть сгруппированы в соответствии со схожестью свойств их боковых цепей (см., например, Lehninger, *Biochemistry* 73-75 (2d ed. 1975)): (1) неполярные: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M); (2) незаряженные полярные: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q); (3) кислотные: Asp (D), Glu (E); и (4) основные: Lys (K), Arg (R), His (H). Альтернативно, природные остатки можно разделить на группы на основании общих свойств боковых цепей: (1) гидрофобные: Норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) кислотные: Asp, Glu; (4) основные: His, Lys, Arg; (5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: Gly, Pro; и (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Например, любой цистеиновый остаток, не участвующий в поддержании надлежащей конформации антитела, также может быть заменен, например, другой аминокислотой, такой как аланин или серин, для улучшения окислительной стабильности молекулы и предотвращения aberrантной сшивки.

Изменения можно осуществить с использованием способов, известных в данной области, таких как олигонуклеотид-опосредованный (сайт-направленный) мутагенез, сканирование аланином и ПЦР мутагенез. Можно осуществить сайт-направленный мутагенез (см., например, Carter, 1986, *Biochem J.* 237: 1-7; и Zoller et al., 1982, *Nucl. Acids Res.* 10: 6487-500), кассетный мутагенез (см., например, Wells et al., 1985, *Gene* 34: 315-23) или другие известные методы с клонированной ДНК для получения вариантной ДНК анти-анти-MSLN антитела.

Ковалентные модификации антител включены в объем настоящего раскрытия. Ковалентные модификации включают взаимодействие целевых аминокислотных остатков антитела с органическим дериватизирующим агентом, который способен взаимодействовать с выбранными боковыми цепями или N- или C-концевыми остатками антитела. Другие модификации включают дезамидирование глутаминильных и аспарагинильных остатков до соответствующих глутаминильных и аспартильных остатков, соответственно, гидроксильное пролина и лизина, фосфорилирование гидроксильных групп серильных или треонинильных остатков, метилирование α-аминогрупп боковых цепей лизина, аргинина и гистидина (см., например, Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties* 79-86 (1983)), ацетилирование N-концевого амина и амидирование любой C-концевой карбоксильной группы.

Другие типы ковалентной модификации антитела, включенные в объем настоящего раскрытия, включают изменение нативного паттерна гликозилирования антитела или полипептида (см., например, Beck et al., 2008, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9: 482-501; и Walsh, 2010, *Drug Discov. Today* 15: 773-80), и связывание антитела с одним из множества небелковых полимеров, например полиэтиленгликолем (PEG),

полипропиленгликолем или полиоксиалкиленами, способом, описанным, например, в патентах США № 4640835; 4496689; 4301144; 4670417; 4791192; или 4179337.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент, представленный в настоящем изобретении, включает тяжелую цепь, имеющую более чем 70% гомологии с тяжелой цепью, представленной в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент, представленный в настоящем изобретении, включает тяжелую цепь, имеющую более чем 75% гомологии с тяжелой цепью, представленной в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент, представленный в настоящем изобретении, включает тяжелую цепь, имеющую более чем 80% гомологии с тяжелой цепью, представленной в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент, представленный в настоящем изобретении, включает тяжелую цепь, имеющую более чем 85% гомологии с тяжелой цепью, представленной в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент, представленный в настоящем изобретении, включает тяжелую цепь, имеющую более чем 90% гомологии с тяжелой цепью, представленной в SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент, представленный в настоящем изобретении, включает тяжелую цепь, имеющую более чем 95% гомологии с тяжелой цепью, представленной в SEQ ID NO: 7.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент, представленный в настоящем изобретении, включает легкую цепь, имеющую более чем 70% гомологии с легкой цепью, представленной в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент, представленный в настоящем изобретении, включает легкую цепь, имеющую более чем 75% гомологии с легкой цепью, представленной в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент, представленный в настоящем изобретении, включает легкую цепь, имеющую более чем 80% гомологии с легкой цепью, представленной в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент, представленный в настоящем изобретении, включает легкую цепь, имеющую более чем 85% гомологии с легкой цепью, представленной в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент, представленный в настоящем изобретении, включает легкую цепь, имеющую более чем 90% гомологии с легкой цепью, представленной в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент, представленный в настоящем изобретении, включает легкую цепь, имеющую более чем 95% гомологии с легкой цепью, представленной в SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления анти-191P4D12 антитело, представленное в настоящем изобретении, включает CDR области тяжелой и легкой цепи антитела, обозначенного как Ha22-2(2,4)6.1, полученного с использованием гибридомы, депонированной в American Type Culture Collection (ATCC) под номером доступа: PTA-11267, или CDR области тяжелой и легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности, которые гомологичны аминокислотным последовательностям CDR областей тяжелой и легкой цепи Ha22-2(2,4)6.1, и при этом антитела сохраняют желаемые функциональные свойства анти-191P4D12 антитела, обозначенного как Ha22-2(2,4)6.1, полученного с использованием гибридомы, депонированной в American Type Culture Collection (ATCC) под номером доступа: PTA-11267.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антиген-связывающий фрагмент, представленный в настоящем изобретении, включает гуманизованную вариабельную область тяжелой цепи и гуманизованную вариабельную область легкой цепи, где:

(a) вариабельная область тяжелой цепи включает CDRs, включающие аминокислотные последовательности CDRs вариабельной области тяжелой цепи, представленные в антителе, полученном с использованием гибридомы, депонированной в American Type Culture Collection (ATCC) под номером доступа: PTA-11267;

(b) вариабельная область легкой цепи включает CDRs, включающие аминокислотные последовательности CDRs вариабельной области легкой цепи, представленные в антителе, полученном с использованием гибридомы, депонированной в American Type Culture Collection (ATCC) под номером доступа: PTA-11267.

В некоторых вариантах осуществления анти-191P4D12 антитело, представленное в настоящем изобретении, включает вариабельные области тяжелой и легкой цепи антитела, обозначенного как Ha22-2(2,4)6.1, полученного с использованием гибридомы, депонированной в American Type Culture Collection (ATCC) под номером доступа: PTA-11267 (см. фиг. 3), или вариабельные области тяжелой и легкой цепи, включающие аминокислотные последовательности, которые гомологичны аминокислотным последовательностям вариабельных областей тяжелой и легкой цепи Ha22-2(2,4)6.1, и при этом антитела сохраняют желаемые функциональные свойства анти-191P4D12 антитела, представленного в настоящем изобретении. В качестве константной области антитела по изобретению, можно выбрать любой подкласс константной области. В одном варианте осуществления можно использовать константную область человеческого IgG1 в качестве константной области тяжелой цепи и константную область каппа Ig человека в качестве константной области легкой цепи.



антитела, полученного с использованием гибридомы, депонированной в American Type Culture Collection (ATCC) под номером доступа: РТА-11267. В других вариантах осуществления тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% гомологична аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела, полученного с использованием гибридомы, депонированной в American Type Culture Collection (ATCC) под номером доступа: РТА-11267. Еще в некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% гомологична аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела, полученного с использованием гибридомы, депонированной в American Type Culture Collection (ATCC) под номером доступа: РТА-11267. В других вариантах осуществления тяжелая цепь может быть на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологична аминокислотной последовательности тяжелой цепи антитела, полученного с использованием гибридомы, депонированной в American Type Culture Collection (ATCC) под номером доступа: РТА-11267.

В некоторых вариантах осуществления легкая цепь включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 85% гомологична аминокислотной последовательности легкой цепи антитела, полученного с использованием гибридомы, депонированной в American Type Culture Collection (ATCC) под номером доступа: РТА-11267. В других вариантах осуществления легкая цепь включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% гомологична аминокислотной последовательности легкой цепи антитела, полученного с использованием гибридомы, депонированной в American Type Culture Collection (ATCC) под номером доступа: РТА-11267. Еще в некоторых вариантах осуществления легкая цепь включает аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% гомологична аминокислотной последовательности легкой цепи антитела, полученного с использованием гибридомы, депонированной в American Type Culture Collection (ATCC) под номером доступа: РТА-11267. В других вариантах осуществления легкая цепь может быть на 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% гомологична аминокислотной последовательности легкой цепи антитела, полученного с использованием гибридомы, депонированной в American Type Culture Collection (ATCC) под номером доступа: РТА-11267.

Сконструированные антитела, представленные в настоящем изобретении, включают такие, в которых были осуществлены модификации каркасных остатков в VH и/или VL (например, для улучшения свойств антитела). Обычно такие модификации каркаса осуществляют для снижения иммуногенности антитела. Например, один из подходов заключается в "обратной мутации" одного или нескольких остатков каркасной области в соответствующую последовательность зародышевой линии. Более конкретно, антитело, которое претерпело соматическую мутацию, может содержать каркасные остатки, которые отличаются от последовательности зародышевой линии, из которой получено антитело. Такие остатки можно идентифицировать путем сравнения каркасных последовательностей антитела с последовательностями зародышевой линии, из которых происходит антитело. Чтобы вернуть последовательности каркасной области к их конфигурации зародышевой линии, соматические мутации могут быть "обратно мутированы" к последовательности зародышевой линии, например, посредством сайт-направленного мутагеназа или ПЦР-опосредованного мутагеназа (например, "обратно мутированы" от лейцина до метионина). Такие антитела с обратной мутацией также входят в объем настоящего изобретения.

Другой тип модификации каркасной области включает мутацию одного или нескольких остатков в каркасной области или даже в одной или нескольких областях CDR для удаления T-клеточных эпитопов, чтобы тем самым снизить потенциальную иммуногенность антитела. Этот подход также называется "деиммунизацией" и более подробно описан в публикации патента США № 2003/0153043 Carr et al.

В дополнение к, или альтернативно, модификациям, осуществленным в каркасной или CDR областях, антитела по изобретению могут быть сконструированы для включения модификаций в Fc области, как правило, для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как период полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, связывание с Fc рецептором и/или антиген-зависимая клеточная цитотоксичность. Кроме того, анти-191P4D12 антитело, представленное в настоящем изобретении, может быть химически модифицировано (например, одна или несколько химических групп могут быть присоединены к антителу) или модифицировано для изменения его гликозилирования, опять же для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела. Каждый из этих вариантов осуществления более подробно описан ниже.

В одном варианте осуществления шарнирную область CH1 модифицируют таким образом, что количество цистеиновых остатков в шарнирной области изменяется, например, увеличивается или уменьшается. Этот подход описан более подробно в патенте США № 5677425, Bodmer et al. Количество цистеиновых остатков в шарнирной области CH1 изменяют, например, для облегчения сборки легкой и тяжелой цепей или для увеличения или уменьшения стабильности анти-191P4D12 антитела.

В другом варианте осуществления шарнирная область Fc антитела мутирована для уменьшения биологического периода полужизни анти-191P4D12 антитела. Более конкретно, одну или несколько аминокислотных мутаций вводят в граничную область CH2-CH3 домена Fc-шарнирного фрагмента, чтобы антитело имело нарушенное связывание Staphylococcal белка A (SpA) по сравнению со связыванием SpA нативного Fc-шарнирного домена. Этот подход более подробно описан в патенте США № 6165745, Ward et al.

В другом варианте осуществления анти-191P4D12 антитело модифицируют для увеличения его биологического периода полужизни. Возможны разные подходы. Например, могут быть введены мутации, как описано в патенте США № 6277375, Ward. Альтернативно, чтобы увеличить биологический период полужизни, антитело можно изменить в области CH1 или CL, чтобы содержать связывающий рецептор спасения эпитоп, взятый из двух петель CH2 домена Fc области IgG, как описано в патентах США №№ 5869046 и 6121022 Presta et al.

В других вариантах осуществления Fc область изменяют путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка другим аминокислотным остатком для изменения эффекторной функции(функций) антитела. Например, одна или несколько аминокислот, выбранных из конкретных аминокислотных остатков, могут быть заменены другим аминокислотным остатком, чтобы антитело имело измененное сродство к эффекторному лиганду, но сохраняло антиген-связывающую способность исходного антитела. Эффекторный лиганд, сродство к которому изменяется, может быть, например, Fc рецептором или C1 компонентом комплемента. Этот подход более подробно описан в патентах США № 5624821 и 5648260, оба Winter et al.

Реактивность анти-191P4D12 антител с 191P4D12-родственным белком можно установить различными хорошо известными способами, включая вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию, ELISA и FACS-анализы с использованием, при необходимости, 191P4D12-родственных белков, клеток, экспрессирующих 191P4D12, или их экстрактов. Анти-191P4D12 антитело или его фрагмент можно пометить детектируемым маркером или конъюгировать со второй молекулой. Подходящие детектируемые маркеры включают, но не ограничиваются этим, радиоизотоп, флуоресцентное соединение, биолюминесцентное соединение, хемилюминесцентное соединение, хелатор металлов или фермент. Кроме того, биспецифические антитела, специфические в отношении двух или более эпитопов 191P4D12, получают с использованием способов, обычно известных в данной области. Гомодимерные антитела также могут быть получены методами перекрестного связывания, известными в данной области (например, Wolff et al., Cancer Res. 53: 2560-2565).

Еще в одном конкретном варианте осуществления анти-191P4D12 антитело, представленное в настоящем изобретении, представляет собой антитело, включающее тяжелую и легкую цепи антитела, обозначенного как Ha22-2(2,4)6.1. Тяжелая цепь Ha22-2(2,4)6.1 состоит из аминокислотной последовательности от 20-го E остатка до 466-го K остатка SEQ ID NO: 7, а легкая цепь Ha22-2(2,4)6.1 состоит из аминокислотной последовательности от 23-го D остатка до 236-го C остатка последовательности SEQ ID NO: 8.

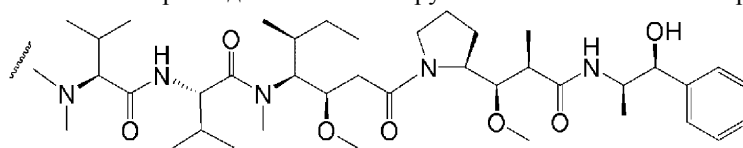
Гибридома, продуцирующая антитело, обозначенное Ha22-2(2,4)6.1, была отправлена (через Federal Express) в Американскую коллекцию типовых культур (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108, 18 августа 2010 г., и ей присвоен регистрационный номер PTA-11267.

### 5.3.2 Цитотоксические средства (лекарственные компоненты).

В некоторых вариантах осуществления ADC содержит антитело или его антиген-связывающий фрагмент, конъюгированный с доластатинами или пептидными аналогами и производными доластатина, ауристатинами (патенты США № 5635483; 5780588). Было показано, что доластатин и ауристатин влияют на динамику микротрубочек, гидролиз GTP, ядерное и клеточное деление (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45 (12): 3580-3584) и обладают противораковыми свойствами (US 5663149) и противогрибковой активностью (Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). Доластатиновый или ауристатиновый лекарственный компонент может быть присоединен к антителу через N (амино) конец или C (карбокси) конец пептидного лекарственного компонента (WO 02/088172).

Иллюстративные варианты осуществления ауристатина включают связанные по N-концу монометилауристатиновые лекарственные компоненты DE и DF, описанные в "Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research", Объем 45, Abstract Number 623, presented March 28, 2004, и описанные в патентной публикации США № 2005/0238649, раскрытие которой явным образом включено посредством ссылки во всей полноте.

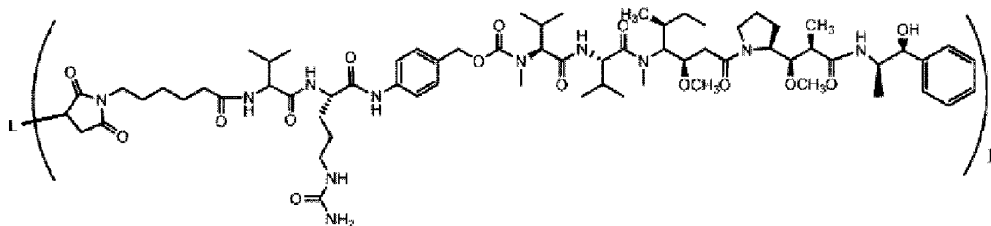
В некоторых вариантах осуществления ауристатин представляет собой MMAE (где волнистая линия указывает ковалентное присоединение к линкеру конъюгата антитело-лекарственное средство).



MMAE

В некоторых вариантах осуществления иллюстративный вариант осуществления, включающий MMAE и линкерный компонент (описанный далее), имеет следующую структуру (где L представляет антитело и p имеет значение от 1 до 12):





Типично, лекарственные компоненты на основе пептидов можно получить путем образования пептидной связи между двумя или более аминокислотами и/или пептидными фрагментами. Такие пептидные связи можно получить, например, в соответствии со способом жидкофазного синтеза (см. E. Schröder and K. Lübke, "The Peptides", объем 1, pp 76-136, 1965, Academic Press), который хорошо известен в области химии пептидов. Лекарственные компоненты ауристин/доластин можно получить в соответствии со способами: US 5635483; US 5780588; Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463-5465; Pettit et al (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13: 243-277; Pettit, G.R., et al. *Synthesis*, 1996, 719-725; Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5: 859-863; и Doronina (2003) *Nat Biotechnol* 21(7): 778-784.

### 5.3.3 Линкеры.

Типично, конъюгаты антитело-лекарственное средство включают линкерный компонент между лекарственным компонентом (например, MMAE) и антителом (например, анти-191P4D12 антителом или его антиген-связывающим фрагментом). В некоторых вариантах осуществления линкер является расщепляемым во внутриклеточных условиях, таким образом, расщепление линкера отделяет лекарственный компонент от антитела в внутриклеточной среде. Еще в некоторых вариантах осуществления линкерный компонент является нерасщепляемым, и лекарственное средство высвобождается, например, посредством разложения антитела.

В некоторых вариантах осуществления линкер расщепляется посредством расщепляющего агента, который присутствует в внутриклеточной среде (например, в лизосоме или эндосоме или кавеолах). Линкер может представлять собой, например, пептидный линкер, который расщепляется посредством внутриклеточного фермента пептидазы или протеазы, включая, но не ограничиваясь этим, лизосомальную или эндосомальную протеазу. В некоторых вариантах осуществления пептидный линкер имеет в длину по меньшей мере две аминокислоты или по меньшей мере три аминокислоты. Расщепляющие агенты могут включать катепсины В и D и плазмин, все из которых, как известно, гидролизуют дипептидные производные лекарственных средств, что приводит к высвобождению активного лекарственного средства внутри клеток-мишеней (см., например, Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83: 67-123). Наиболее типичными являются пептидные линкеры, которые расщепляются ферментами, присутствующими в 191P4D12-экспрессирующих клетках. Например, можно использовать пептидный линкер, который расщепляется тиол-зависимой протеазой катепсин-В, которая высоко экспрессируется в раковой ткани (например, линкер Phe-Leu или Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 15)). Другие примеры таких линкеров описаны, например, в патенте США № 6214345, включенном в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте и для всех целей. В конкретном варианте осуществления пептидный линкер, расщепляемый внутриклеточной протеазой, представляет собой линкер Val-Cit или линкер Phe-Lys (см., например, патент США 6214345, в котором описан синтез доксорубина с линкером Val-Cit). Одним из преимуществ использования внутриклеточного протеолитического высвобождения терапевтического средства является то, что средство обычно ослабляется, когда оно конъюгировано, и стабильность конъюгатов в сыворотке обычно высока.

В других вариантах осуществления расщепляемый линкер является чувствительным к pH, то есть чувствительным к гидролизу при определенных значениях pH. Обычно pH-чувствительный линкер гидролизуется в кислых условиях. Например, может быть использован кислотолabile линкер, который гидролизуется в лизосоме (например, гидразон, семикарбазон, тиосемикарбазон, цис-аконитовый амид, ортоэфир, ацеталь, кеталь и т.п.). (См., например, патенты США № 5122368; 5824805; 5622929; Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83: 67-123; Neville et al., 1989, *Biol. Chem.* 264: 14653-14661.) Такие линкеры относительно стабильны в условиях нейтрального pH, например, в крови, но нестабильны при pH ниже 5,5 или 5,0, приблизительно pH лизосомы. В некоторых вариантах осуществления гидролизующий линкер представляет собой тиоэфирный линкер (такой как, например, простой тиоэфир, присоединенный к терапевтическому средству через ацилгидразоновую связь (см., например, патент США № 5622929).

В других вариантах осуществления линкер может расщепляться в восстанавливающих условиях (например, дисульфидный линкер). В данной области известны различные дисульфидные линкеры, включая, например, те, которые могут быть образованы с использованием SATA (N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат), SPDP (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат), SPDB (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)бутират) и SMPT (N-сукцинимидил-оксикарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридилдитио)голуол), SPDB и SMPT. (См., например, Thorpe et al., 1987, *Cancer Res.* 47: 5924-5931;

Wawrzynczak et al., In *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer* (CW Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. См. также патент США № 4880935).

В других конкретных вариантах осуществления линкер представляет собой малонатный линкер (Johnson et al., 1995, *Anticancer Res.* 15: 1387-93), малеимидобензоильный линкер (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3 (10): 1299-1304) или 3'-N-амидный аналог (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3 (10): 1305-12).

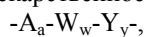
В других вариантах осуществления линкерный компонент не расщепляется, и лекарственное средство высвобождается в результате разложения антитела. (См. публикацию США № 2005/0238649, включенную в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте и для всех целей).

Типично, линкер по существу не является чувствительным к внеклеточному окружению. В контексте настоящего изобретения "по существу не является чувствительным к внеклеточному окружению" в контексте линкера, означает, что не более чем около 20%, типично не более чем около 15%, более типично не более чем около 10%, и даже более типично не более чем около 5%, не более чем около 3% или не более чем около 1% линкеров, в образце конъюгата антитело-лекарственное средство, расщепляются когда конъюгат антитело-лекарственное средство присутствует во внеклеточном окружении (например, в плазме). Является ли линкер по существу нечувствительным к внеклеточному окружению, можно определить, например, путем инкубации с плазмой конъюгата антитело-лекарственное средство в течение предварительно определенного периода времени (например, 2, 4, 8, 16 или 24 часов) и затем определения количества свободного лекарственного средства, присутствующего в плазме.

В других вариантах осуществления, не являющихся взаимоисключающими, линкер промотирует клеточную интернализацию. В некоторых вариантах осуществления линкер промотирует клеточную интернализацию, когда он конъюгирован с терапевтическим средством (т.е. в виде фрагмента линкер-терапевтическое средство в соединении, представляющем собой конъюгат антитело-лекарственное средство, как описано в настоящем изобретении). Еще в некоторых вариантах осуществления линкер промотирует клеточную интернализацию, когда он конъюгирован как с ауристатиновым соединением, так и с анти-191P4D12 антителом или его антиген-связывающим фрагментом.

Различные примеры линкеров, которые можно использовать в композициях и способах по настоящему изобретению, описаны в WO 2004-010957, публикации США № 2006/0074008, публикации США № 20050238649 и публикации США № 2006/0024317 (каждая из которых включена в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте и для всех целей).

"Линкерный компонент" (LU) представляет собой бифункциональное соединение, которое можно использовать для связывания лекарственного компонента и антитела с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления линкерный компонент имеет формулу:



где: -A- представляет собой удлиняющий компонент,

a имеет значение 0 или 1,

каждый -W- независимо представляет собой аминокислотный компонент,

w представляет собой целое число от 0 до 12,

-Y- представляет собой саморасщепляющийся спейсерный компонент, и

y имеет значение 0, 1 или 2.

В некоторых вариантах осуществления a имеет значение 0 или 1, w имеет значение 0 или 1 и y имеет значение 0, 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления a имеет значение 0 или 1, w имеет значение 0 или 1 и y имеет значение 0 или 1. В некоторых вариантах осуществления когда w имеет значение от 1 до 12, y имеет значение 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления w имеет значение от 2 до 12 и y имеет значение 1 или 2. В некоторых вариантах осуществления a имеет значение 1, и w и y имеют значение 0.

#### 5.3.3.1 Удлиняющий компонент.

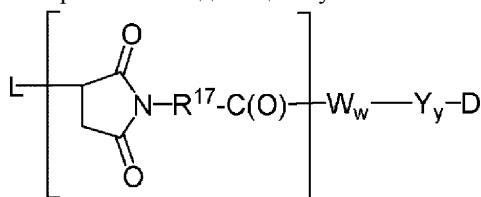
Удлиняющий компонент (A), когда присутствует, способен связывать антитело с аминокислотным компонентом (-W-), если присутствует, со спейсерным компонентом (-Y-), если присутствует; или с лекарственным компонентом (-D). Полезные функциональные группы, которые могут присутствовать в анти-191P4D12 антителе или его антиген-связывающем фрагменте (например, Na22-2(2,4)6.1) либо естественным образом, либо в результате химических манипуляций включают, но не ограничиваются этим, сульфгидрил, amino, гидроксил, аномерную гидроксильную группу углевода и карбоксил. Подходящими функциональными группами являются сульфгидрил и amino. В одном примере сульфгидрильные группы могут быть образованы в результате восстановления внутримолекулярных дисульфидных связей анти-191P4D12 антитела или его антиген-связывающего фрагмента. В другом варианте осуществления сульфгидрильные группы могут быть образованы в результате взаимодействия amino группы лизинового фрагмента анти-191P4D12 антитела или антиген-связывающего фрагмента с 2-иминотиолоном (реагент Трота) или другими сульфгидрил-образующими реагентами. В некоторых вариантах осуществления анти-191P4D12 антитело или его антиген-связывающий фрагмент представляет собой рекомбинантное антитело, и оно сконструировано так, чтобы содержать один или несколько лизинов. В некоторых других вариантах осуществления рекомбинантное анти-191P4D12 антитело сконструировано так, чтобы содер-

жать дополнительные сульфгидрильные группы, например, дополнительные цистеины.

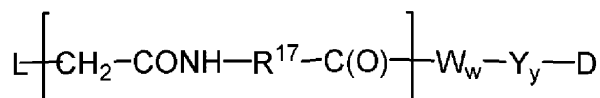
В одном варианте осуществления удлиняющий компонент образует связь с атомом серы антителя. Атом серы может происходить из сульфгидрильной группы антителя. Репрезентативные удлиняющие компоненты этого варианта осуществления показаны в квадратных скобках формул IIIa и IIIb ниже, где L-, -W-, -Y-, -D, w и y имеют значение, определенное выше, и R<sup>17</sup> выбран из -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкенилен-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкинилен-, карбоцикло-, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкилен)-, O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкенилен)-, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкинилен)-, -арилен-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-арилен-, -C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> алкенилен-арилена, -C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> алкинилен-арилена, -арилен-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-, -арилен-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> алкенилен-, -арилен-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> алкинилен-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-(карбоцикло)-, -C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> алкенилен-(карбоцикло)-, -C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> алкинилен-(карбоцикло)-, -(карбоцикло)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-, -(карбоцикло)-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> алкенилен-, -(карбоцикло)-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> алкинилена, -гетероцикло-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-(гетероцикло)-, -C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> алкенилен-(гетероцикло)-, -C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> алкинилен-(гетероцикло)-, -(гетероцикло)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-, -(гетероцикло)-C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> алкенилен-, -(гетероцикло)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкинилен-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>- или -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-, и r представляет собой целое число от 1 до 10, где указанные радикалы алкил, алкенил, алкинил, алкилен, алкенилен, алкинилен, арил, карбоцикл, карбоцикло, гетероцикло и арил, отдельно или как часть другой группы, необязательно замещены. В некоторых вариантах осуществления указанные радикалы алкил, алкенил, алкинил, алкилен, алкенилен, алкинилен, арил, карбоцикл, карбоцикло, гетероцикло и арил, отдельно или как часть другой группы, являются незамещенными.

В некоторых вариантах осуществления R<sup>17</sup> выбран из -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-, -карбоцикло-, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкилен)-, -арилен-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-арилен-, -арилен-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-(карбоцикло)-, -(карбоцикло)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-, -C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub> гетероцикло-, -C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-(гетероцикло)-, -(гетероцикло)-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-, -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>- и -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-; и r представляет собой целое число от 1 до 10, где указанные алкиленовые группы являются незамещенными, а остальные группы являются необязательно замещенными.

Как должно быть понятно из всех иллюстративных вариантов осуществления, что даже если это явно не указано, от 1 до 20 лекарственных единиц могут быть связаны с единицей антителя (p=1-20).

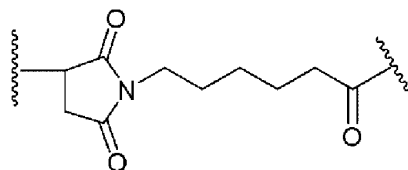


IIIa

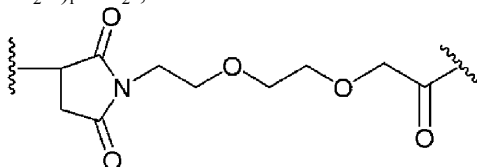


IIIb

Иллюстративный удлиняющий компонент представляет собой компонент формулы IIIa, где R<sup>17</sup> представляет собой -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-:

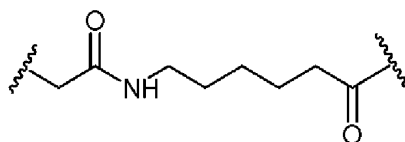


Другой иллюстративный удлиняющий компонент представляет собой компонент формулы IIIa, где R<sup>17</sup> представляет собой -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>r</sub>-CH<sub>2</sub>-; и r имеет значение 2:

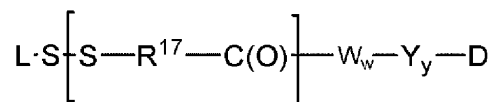


Иллюстративный удлиняющий компонент представляет собой компонент формулы IIIa, где R<sup>17</sup> представляет собой арилен- или арилен-C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> алкилен-. В некоторых вариантах осуществления арильная группа представляет собой незамещенную фенильную группу.

Еще один иллюстративный удлиняющий компонент представляет собой компонент формулы IIIb, где R<sup>17</sup> представляет собой -(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-:

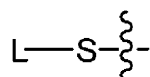


В некоторых вариантах осуществления удлиняющий компонент связан с антителом через дисульфидную связь между атомом серы антитела и атомом серы удлиняющего компонента. Репрезентативный удлиняющий компонент этого варианта осуществления показан в квадратных скобках формулы IV, где  $R^{17}$ , L-, -W-, -Y-, -D, w и y имеют значение, определенное выше.



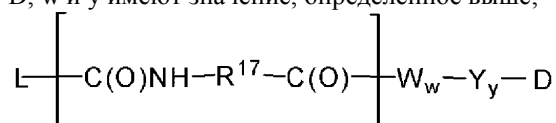
IV

Следует отметить, что в настоящем изобретении S группа в формуле ниже относится к атому серы антитела, если контекст не диктует иное.

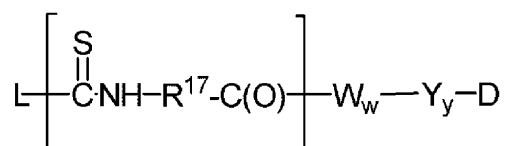


В некоторых структурных описаниях сера-связанного ADC антитело обозначено как "L". Он также может обозначаться как "Ab-S". Включение "S" просто указывает на серную связь и не означает, что конкретный атом серы несет несколько фрагментов линкер-лекарственное средство. Левая скобка структур, использующих описание "Ab-S", также может быть помещена слева от атома серы, между Ab и S, что могло бы быть эквивалентным описанием ADC изобретения, описанного в настоящем изобретении.

Еще в некоторых вариантах осуществления удлиняющий компонент содержит реакционный сайт, который может образовывать связь с первичной или вторичной аминогруппой антитела. Примеры этих реакционных сайтов включают, но не ограничиваются этим, активированные сложные эфиры, такие как сукцинимидные эфиры, 4-нитрофениловые эфиры, пентафторфениловые эфиры, тетрафторфениловые эфиры, ангидриды, хлорангидриды, сульфонилхлориды, изоцианаты и изотиоцианаты. Репрезентативные удлиняющие компоненты этого варианта осуществления показаны в квадратных скобках формул Va и Vb, где  $-R^{17}$ , L-, -W-, -Y-, -D, w и y имеют значение, определенное выше;

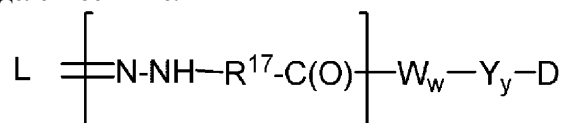


Va

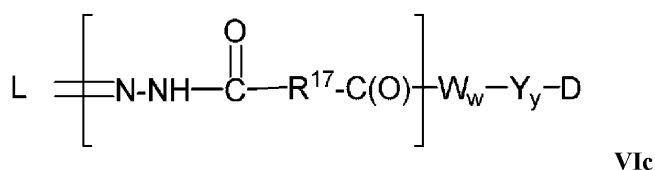
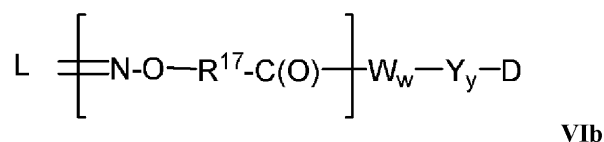


Vb

В некоторых вариантах осуществления удлиняющий компонент содержит реакционный сайт, который реагирует с (-CHO) группой модифицированного углевода, которая может присутствовать в антителе. Например, углевод можно слегка окислить с использованием реагента, такого как периодат натрия, и полученный (-CHO) фрагмент окисленного углевода можно конденсировать с удлиняющим компонентом, который содержит функциональную группу, такую как гидразид, оксим, первичный или вторичный амин, гидразин, тиосемикарбазон, гидразин карбоксилат и арилгидразид, например, которые описаны Kaneko et al., 1991, *Bioconjugate Chem.* 2:133-41. Репрезентативные удлиняющие компоненты этого варианта осуществления показаны в квадратных скобках формул VIa, VIb и VIc, где  $-R^{17}$ , L-, -W-, -Y-, -D, w и y имеют значение, определенное выше.



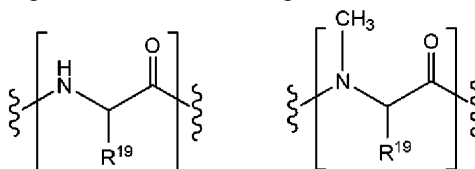
VIa



### 5.3.3.2 Аминокислотный компонент.

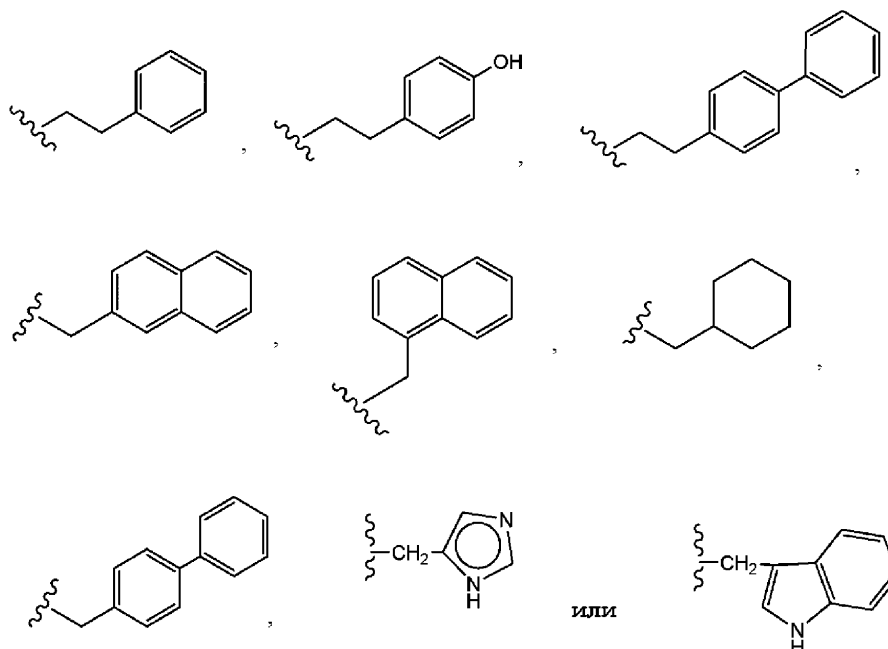
Аминокислотный компонент (-W-), если присутствует, связывает удлиняющий компонент со спейсерным компонентом, если спейсерный компонент присутствует, связывает удлиняющий компонент с лекарственным компонентом, если спейсерный компонент отсутствует, и связывает антитело с лекарственным компонентом, если удлиняющий компонент и спейсерный компонент отсутствуют.

W<sub>w</sub>- может представлять собой, например, монопептидный, дипептидный, трипептидный, тетрапептидный, пентапептидный, гексапептидный, гептапептидный, октапептидный, нонапептидный, декапептидный, ундекапептидный или додекапептидный компонент. Каждый -W- компонент независимо имеет формулу, показанную ниже в квадратных скобках, и w представляет собой целое число от 0 до 12:



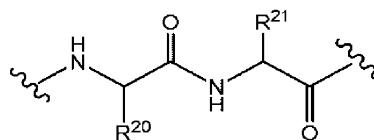
или

где R<sup>19</sup> представляет собой водород, метил, изопропил, изобутил, втор-бутил, бензил, *n*-гидроксibenзил, -CH<sub>2</sub>OH, -CH(OH)CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>COOH, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHC(=NH)NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCOCH<sub>3</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCHO, -(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NHCONH<sub>2</sub>, -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>, 2-пиридилметил-, 3-пиридилметил-, 4-пиридилметил-, фенил, циклогексил



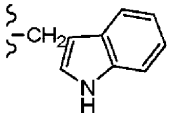
В некоторых вариантах осуществления аминокислотный компонент может ферментативно расщепляться одним или несколькими ферментами, включая рак или опухоль-ассоциированную протеазу, для высвобождения лекарственного компонента (-D), который в одном варианте осуществления протонируется *in vivo* при высвобождении с обеспечением лекарственного средства (D).

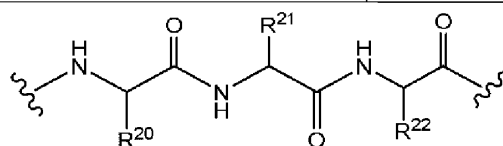
В некоторых вариантах осуществления аминокислотный компонент включает природные аминокислоты. В других вариантах осуществления аминокислотный компонент включает не природные аминокислоты. Иллюстративные W<sub>w</sub> компоненты представлены формулами VII-IX ниже:



VII

где  $R^{20}$  и  $R^{21}$  являются следующими:

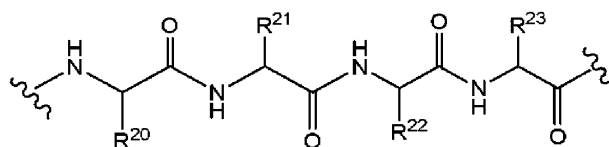
$R^{20}$	$R^{21}$
бензил	$(CH_2)_4NH_2$ ;
метил	$(CH_2)_4NH_2$ ;
изопропил	$(CH_2)_4NH_2$ ;
изопропил	$(CH_2)_3NHCONH_2$ ;
бензил	$(CH_2)_3NHCONH_2$ ;
изобутил	$(CH_2)_3NHCONH_2$ ;
втор-бутил	$(CH_2)_3NHCONH_2$ ;
	$(CH_2)_3NHCONH_2$ ;
бензил	метил;
бензил	$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ ;



VIII

где  $R^{20}$ ,  $R^{21}$  и  $R^{22}$  являются следующими:

$R^{20}$	$R^{21}$	$R^{22}$
бензил	бензил	$(CH_2)_4NH_2$ ;
изопропил	бензил	$(CH_2)_4NH_2$ ; и
H	бензил	$(CH_2)_4NH_2$ ;



IX

где  $R^{20}$ ,  $R^{21}$ ,  $R^{22}$  и  $R^{23}$  являются следующими:

$R^{20}$	$R^{21}$	$R^{22}$	$R^{23}$
H	бензил	изобутил	H; и
метил	изобутил	метил	изобутил.

Примеры аминокислотных компонентов включают, но не ограничиваются этим, компоненты формулы VII выше, где:  $R^{20}$  представляет собой бензил и  $R^{21}$  представляет собой  $-(CH_2)_4NH_2$ ;  $R^{20}$  представляет собой изопропил и  $R^{21}$  представляет собой  $-(CH_2)_4NH_2$ ; или  $R^{20}$  представляет собой изопропил и  $R^{21}$  представляет собой  $-(CH_2)_3NHCONH_2$ .

Другой иллюстративный аминокислотный компонент представляет собой компонент формулы VIII, где  $R^{20}$  представляет собой бензил,  $R^{21}$  представляет собой бензил и  $R^{22}$  представляет собой  $-(CH_2)_4NH_2$ .

Полезные  $-W_w$ - компоненты могут быть сконструированы и оптимизированы по их селективности в отношении ферментативного расщепления определенным ферментом например опухоль-ассоциированной протеазой. В одном варианте осуществления  $-W_w$ -компонент представляет собой компонент, расщепление которого катализируется катепсином В, С и D или протеазой плазмином.

В одном варианте осуществления  $-W_w$ - представляет собой дипептид, трипептид, тетрапептид или пентапептид. Когда  $R^{19}$ ,  $R^{20}$ ,  $R^{21}$ ,  $R^{22}$  или  $R^{23}$  является отличным от водорода, атом углерода, к которому присоединен  $R^{19}$ ,  $R^{20}$ ,  $R^{21}$ ,  $R^{22}$  или  $R^{23}$ , является хиральным.

Каждый атом углерода, к которому присоединен  $R^{19}$ ,  $R^{20}$ ,  $R^{21}$ ,  $R^{22}$  или  $R^{23}$ , независимо находится в (S) или (R) конфигурации.

В одном конкретном варианте осуществления аминокислотный компонент представляет собой валин-цитруллин (vc или Val-Cit). В другом конкретном варианте осуществления аминокислотный компонент представляет собой фенилаланин-лизин (т.е. fk). Еще в одном конкретном варианте осуществления аминокислотный компонент представляет собой N-метилвалин-цитруллин. Еще в одном конкретном варианте осуществления аминокислотный компонент представляет собой 5-аминовалериановую кислоту, гомофенилаланин лизин, тетраизохинолинкарбоксилат лизин, циклогексилаланин лизин, изонепекотовую кислоту лизин, бета-аланин лизин, глицин серин валин глутамин и изонепекотовую кислоту.

### 5.3.3.3 Спейсерный компонент.

Спейсерный компонент (-Y-), если присутствует, связывает аминокислотный компонент с лекарственным компонентом, когда аминокислотный компонент присутствует. Альтернативно, спейсерный компонент связывает удлиняющий компонент с лекарственным компонентом, когда аминокислотный компонент отсутствует. Спейсерный компонент также связывает лекарственный компонент с антителом, когда аминокислотный компонент и удлиняющий компонент отсутствуют.

Спейсерные компоненты подразделяются на два общих типа: не саморасщепляющиеся или саморасщепляющиеся. Не саморасщепляющийся спейсерный компонент представляет собой такой, в котором часть или весь спейсерный компонент остается связанным с лекарственным компонентом после отщепления, в частности ферментативного, аминокислотного компонента от конъюгата антитело-лекарственное средство. Примеры не саморасщепляющегося спейсерного компонента включают, но не ограничиваются этим, (глицин-глицин) спейсерный компонент и глициновый спейсерный компонент (оба показаны на схеме 1) (ниже). Когда конъюгат, содержащий глицин-глициновый спейсерный компонент или глициновый спейсерный компонент, подвергается ферментативному расщеплению ферментом (например, опухольная клетка-ассоциированной протеазой, раковая клетка-ассоциированной протеазой или лимфоцит-ассоциированной протеазой), глицин-глицин-лекарственный компонент или глицин-лекарственный компонент отщепляется от L-Aa-Ww-. В одном варианте осуществления независимая реакция гидролиза происходит в клетке-мишени, расщепляя связь глицин-лекарственный компонент и высвобождая лекарственное средство.

Схема 1.



В некоторых вариантах осуществления не саморасщепляющийся спейсерный компонент (-Y-) представляет собой -Gly-. В некоторых вариантах осуществления не саморасщепляющийся спейсерный компонент (-Y-) представляет собой -Gly-Gly-.

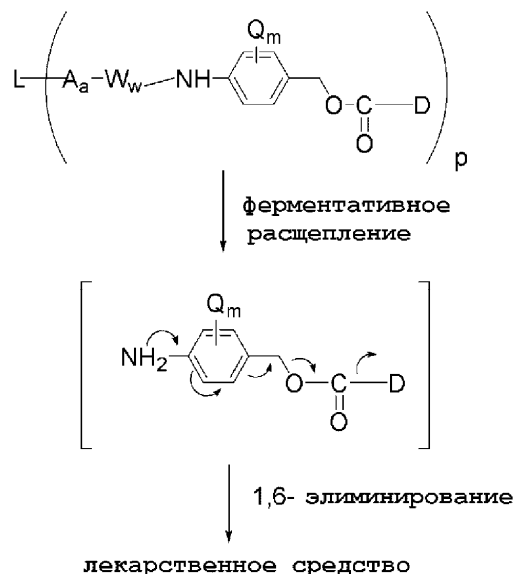
В одном варианте осуществления спейсерный компонент отсутствует (-Y<sub>y</sub> - где y=0).

Альтернативно, конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий саморасщепляющийся спейсерный компонент, может высвобождать -D. В контексте настоящего изобретения термин "саморасщепляющийся спейсер" относится к бифункциональной химической группе, которая способна ковалентно связывать вместе две находящиеся на расстоянии друг от друга химические группы в стабильную трехчленную молекулу. Он будет самопроизвольно отделяться от второй химической группы, если его связь с первой группой расщепляется.

В некоторых вариантах осуществления -Y<sub>y</sub>- представляет собой группу п-аминобензилового спирта (PAB) (см. схемы 2 и 3), фениленовая часть которой замещена Q<sub>m</sub>, где Q представляет собой -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил, -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкенил, -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкинил, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил), -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкенил), -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкинил), -галоген, -нитро или -циано; и m представляет собой целое число от 0 до 4. Алкильные, алкенильные и алкинильные группы, отдельно или как часть другой группы, могут быть необязательно замещены.

В некоторых вариантах осуществления -Y- представляет собой РАВ группу, которая связана с -W<sub>w</sub>- через атом азота амино РАВ группы и связана непосредственно с -D через карбонатную, карбаматную или эфирную группу. Не желая связывать это с конкретной теорией или механизмом, схема 2 представляет возможный механизм высвобождения лекарственного средства РАВ группы, которая связана непосредственно с -D через карбаматную или карбонатную группу, как описано в Toki et al., 2002, J. Org. Chem. 67:1866-1872.

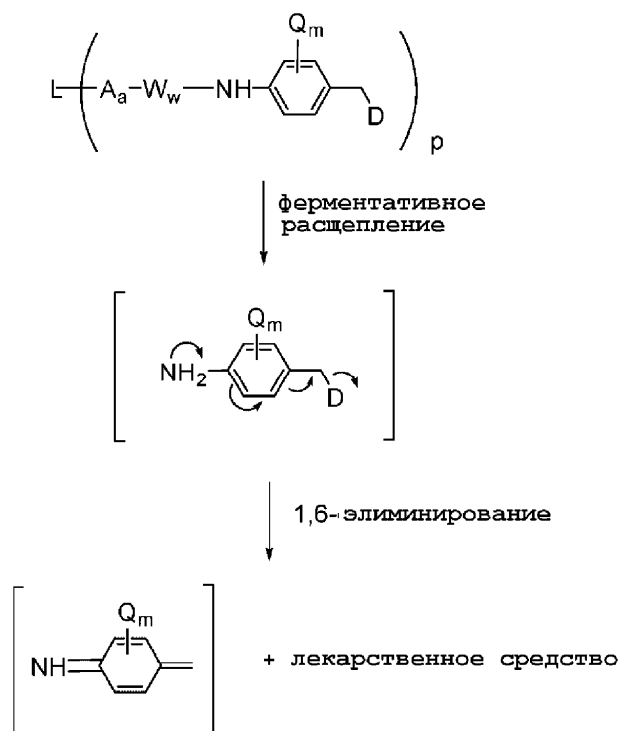
Схема 2.



На схеме 2, Q представляет собой -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил, -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкенил, -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкинил, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил), -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкенил), -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкинил), -галоген, -нитро или -циано; m представляет собой целое число от 0 до 4; и p имеет значение от 1 до около 20. Алкильные, алкенильные и алкинильные группы, отдельно или как часть другой группы, могут быть необязательно замещены.

Не желая связывать это с конкретной теорией или механизмом, схема 3 представляет возможный механизм высвобождения лекарственного средства РАВ группы, которая связана непосредственно с -D через эфирную или аминую связь, где D включает кислородную или азотную группу, которая является частью лекарственного компонента.

Схема 3.



На схеме 3 Q представляет собой -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил, -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкенил, -C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкинил, -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкил), -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкенил), -O-(C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub> алкинил), -галоген, -нитро или -циано; m представляет собой целое число



от 0 до 4; и  $p$  имеет значение от 1 до около 20. Алкильные, алкенильные и алкинильные группы, отдельно или как часть другой группы, могут быть необязательно замещены.

Другие примеры саморасщепляющихся спейсеров включают, но не ограничиваются этим, ароматические соединения, которые с электронной точки зрения подобны РАВ группе, например 2-аминоимидазол-5-метанольные производные (Hay et al., 1999, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) и орто или пара-аминобензилацетали. Можно использовать спейсеры, которые подвергаются циклизации при гидролизе амидной связи, например замещенные и незамещенные амиды 4-аминомасляной кислоты (Rodrigues et al., 1995, Chemistry Biology 2: 223), подходяще замещенные бицикло[2.2.1] и бицикло[2.2.2] кольцевые системы (Storm et al., 1972, J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) и амиды 2-аминофенилпропионовой кислоты (Amsberry et al., 1990, J. Org. Chem. 55: 5867). Элиминирование амин-содержащих лекарственных средств, которые замещены в  $\alpha$ -положении глицина (Kingsbury et al., 1984, J. Med. Chem. 27: 1447), также являются примерами саморасщепляющихся спейсеров.

В одном варианте осуществления спейсерный компонент представляет собой разветвленный бис(гидроксиметил)-стирольный (BHMS) компонент, показанный на схеме 4, который можно использовать для включения и высвобождения нескольких лекарственных средств.

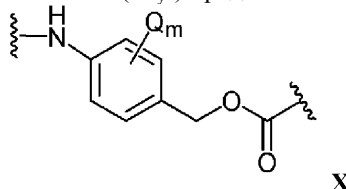
Схема 4.



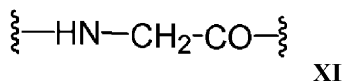
На схеме 4 Q представляет собой  $-C_1-C_8$  алкил,  $-C_1-C_8$  алкенил,  $-C_1-C_8$  алкинил,  $-O-(C_1-C_8)$  алкил),  $-O-(C_1-C_8)$  алкенил),  $-O-(C_1-C_8)$  алкинил), -галоген, -нитро или -циано;  $m$  представляет собой целое число от 0 до 4;  $p$  имеет значение 0 или 1; и  $p$  имеет значение от 1 до около 20. Алкильные, алкенильные и алкинильные группы, отдельно или как часть другой группы, могут быть необязательно замещены.

В некоторых вариантах осуществления  $-D$  компоненты являются одинаковыми. Еще в одном варианте осуществления  $-D$  компоненты являются разными.

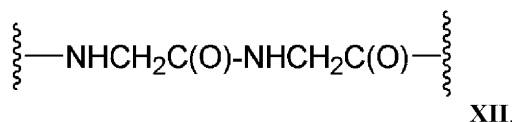
В одном аспекте спейсерные компоненты ( $-Y_y-$ ) представлены формулами X-XII:



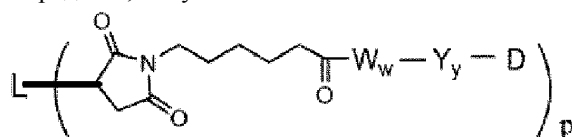
где Q представляет собой  $-C_1-C_8$  алкил,  $-C_1-C_8$  алкенил,  $-C_1-C_8$  алкинил,  $-O-(C_1-C_8)$  алкил),  $-O-(C_1-C_8)$  алкенил),  $-O-(C_1-C_8)$  алкинил), -галоген, -нитро или -циано; и  $m$  представляет собой целое число от 0 до 4. Алкильные, алкенильные и алкинильные группы, отдельно или как часть другой группы, могут быть необязательно замещены.



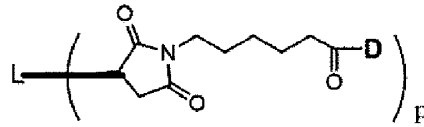
и



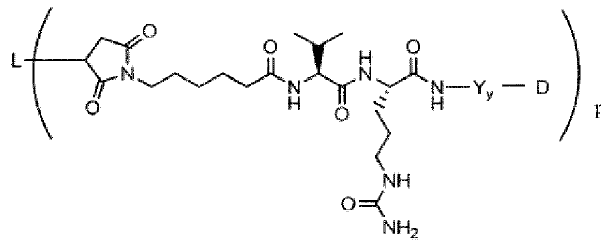
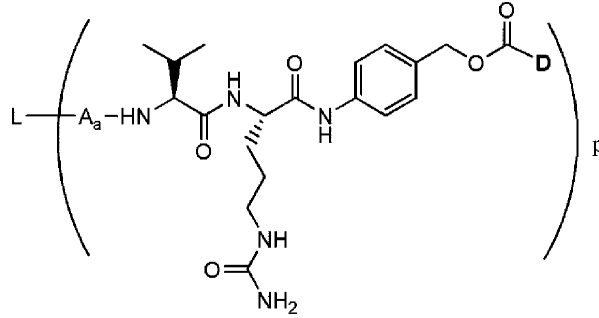
Варианты осуществления формулы I и II, включающие соединения, представляющие собой конъюгаты антитело-лекарственное средство, могут включать:



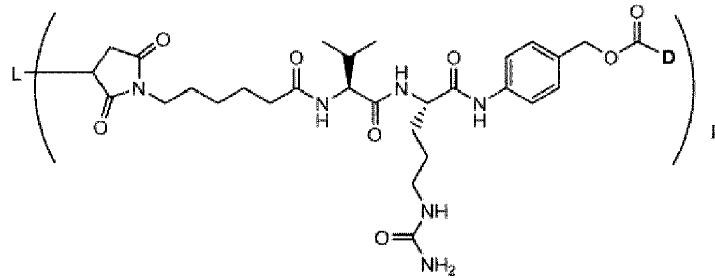
где  $w$  и  $y$  каждый имеет значение 0, 1 или 2, и



где w и y каждый имеет значение 0



и



#### 5.3.3.4 Нагрузка лекарственным средством.

Нагрузка лекарственным средством представлена символом  $p$  и представляет собой среднее количество молекул лекарственного средства на антитело в молекуле. Нагрузка лекарственным средством может составлять от 1 до 20 молекул лекарственного средства ( $D$ ) на антитело. ADC, представленные в настоящем изобретении, включают множество антител или антиген-связывающих фрагментов, конъюгированных с рядом молекул лекарственного средства, например от 1 до 20. Среднее количество молекул лекарственного средства на антитело в препаратах ADC в результате реакций конъюгации можно определить обычно используемыми способами, такими как масс-спектропия и анализ ELISA. Количественное распределение ADC, выраженное как  $p$ , также может быть определено. В некоторых случаях выделение, очистка и определение характеристик гомогенного ADC, где  $p$  представляет собой определенное значение, из ADC с другими нагрузками лекарственным средством, можно осуществить такими средствами, как электрофорез.

В некоторых вариантах осуществления нагрузка лекарственным средством для ADC, представленного в настоящем изобретении, составляет от 1 до 20. В некоторых вариантах осуществления нагрузка лекарственным средством для ADC, представленного в настоящем изобретении, составляет от 1 до 18. В некоторых вариантах осуществления нагрузка лекарственным средством для ADC, представленного в настоящем изобретении, составляет от 1 до 15. В некоторых вариантах осуществления нагрузка лекарственным средством для ADC, представленного в настоящем изобретении, составляет от 1 до 12. В некоторых вариантах осуществления нагрузка лекарственным средством для ADC, представленного в настоящем изобретении, составляет от 1 до 10. В некоторых вариантах осуществления нагрузка лекарственным средством для ADC, представленного в настоящем изобретении, составляет от 1 до 9. В некоторых вариантах осуществления нагрузка лекарственным средством для ADC, представленного в настоящем изобретении, составляет от 1 до 8. В некоторых вариантах осуществления нагрузка лекарственным средством для ADC, представленного в настоящем изобретении, составляет от 1 до 7. В некоторых вариантах

осуществления нагрузка лекарственным средством для ADC, представленного в настоящем изобретении, составляет от 1 до 6. В некоторых вариантах осуществления нагрузка лекарственным средством для ADC, представленного в настоящем изобретении, составляет от 1 до 5. В некоторых вариантах осуществления нагрузка лекарственным средством для ADC, представленного в настоящем изобретении, составляет от 1 до 4. В некоторых вариантах осуществления нагрузка лекарственным средством для ADC, представленного в настоящем изобретении, составляет от 1 до 3. В некоторых вариантах осуществления нагрузка лекарственным средством для ADC, представленного в настоящем изобретении, составляет от 2 до 12. В некоторых вариантах осуществления нагрузка лекарственным средством для ADC, представленного в настоящем изобретении, составляет от 2 до 10. В некоторых вариантах осуществления нагрузка лекарственным средством для ADC, представленного в настоящем изобретении, составляет от 2 до 9. В некоторых вариантах осуществления нагрузка лекарственным средством для ADC, представленного в настоящем изобретении, составляет от 2 до 8. В некоторых вариантах осуществления нагрузка лекарственным средством для ADC, представленного в настоящем изобретении, составляет от 2 до 7. В некоторых вариантах осуществления нагрузка лекарственным средством для ADC, представленного в настоящем изобретении, составляет от 2 до 6. В некоторых вариантах осуществления нагрузка лекарственным средством для ADC, представленного в настоящем изобретении, составляет от 2 до 5.

В некоторых вариантах осуществления нагрузка лекарственным средством для ADC, представленного в настоящем изобретении, составляет от 1 до около 8; от около 2 до около 6; от около 3 до около 5; от около 3 до около 4; от около 3,1 до около 3,9; от около 3,2 до около 3,8; от около 3,2 до около 3,7; от около 3,2 до около 3,6; от около 3,3 до около 3,8; или от около 3,3 до около 3,7.

В некоторых вариантах осуществления меньше теоретического максимума молекул лекарственного средства конъюгируют с антителом в реакции конъюгации. Антитело может содержать, например, лизиновые остатки, которые не взаимодействуют с промежуточным соединением лекарственное средство-линкер или линкерным реагентом. Обычно антитела не содержат много свободных и реакционноспособных тиоловых групп цистеина, которые можно связывать с молекулой лекарственного средства; действительно, большинство тиоловых остатков цистеина в антителах существует в виде дисульфидных мостиков. В некоторых вариантах осуществления антитело можно восстановить при помощи восстанавливающего агента, такого как дитиотреитол (DTT) или трикарбонилэтилфосфин (TCEP), в частичных или полных восстановительных условиях для образования реакционноспособных тиоловых групп цистеина. В некоторых вариантах осуществления антитело подвергают денатурирующим условиям для выявления реакционноспособных нуклеофильных групп, таких как лизин или цистеин. В некоторых вариантах осуществления линкерный компонент или лекарственный компонент конъюгируют через лизиновый остаток на антителе. В некоторых вариантах осуществления линкерный компонент или лекарственный компонент конъюгируют через цистеиновый остаток на антителе.

В некоторых вариантах осуществления аминокислота, которая присоединяется к линкерному компоненту или лекарственному компоненту, находится в тяжелой цепи антитела или его антиген-связывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления аминокислота, которая присоединяется к линкерному компоненту или лекарственному компоненту, находится в легкой цепи антитела или его антиген-связывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления аминокислота, которая присоединяется к линкерному компоненту или лекарственному компоненту, находится в шарнирной области антитела или его антиген-связывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления аминокислота, которая присоединяется к линкерному компоненту или лекарственному компоненту, находится в Fc области антитела или его антиген-связывающего фрагмента. В других вариантах осуществления аминокислота, которая присоединяется к линкерному компоненту или лекарственному компоненту, находится в константной области (например, CH1, CH2 или CH3 тяжелой цепи или CH1 легкой цепи) антитела или его антиген-связывающего фрагмента. Еще в некоторых вариантах осуществления аминокислота, которая присоединяется к линкерному компоненту или лекарственному компоненту, находится в каркасных областях VH антитела или его антиген-связывающего фрагмента. Еще в некоторых вариантах осуществления аминокислота, которая присоединяется к линкерному компоненту или лекарственному компоненту, находится в каркасных областях VL антитела или его антиген-связывающего фрагмента.

Нагрузку (отношение лекарственное средство/антитело) ADC можно контролировать различными способами, например, путем: (i) ограничения молярного избытка промежуточного соединения лекарственное средство-линкер или линкерного реагента относительно антитела, (ii) ограничения времени или температуры реакции конъюгации, (iii) частичных или ограничивающих восстановительных условий для модификации тиола цистеина, (iv) конструирования рекомбинантными методами аминокислотной последовательности антитела таким образом, чтобы модифицировать количество и положение цистеиновых остатков для контроля количества и/или положения присоединений фрагментов линкер-лекарственное средство (например, тιοMAb или тιοFAB, полученные как раскрыто в настоящем изобретении и в WO2006/034488 (включен в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте)).

Должно быть понятно, что если более одной нуклеофильной группы взаимодействует с промежуточным соединением лекарственное средство-линкер или линкерным реагентом, затем с реагентом, представляющим собой лекарственное средство, в этом случае полученный продукт представляет собой

смесь ADC соединений с распределением одной или нескольких молекул лекарственного средства, присоединенных к молекуле антитела. Среднее количество молекул лекарственного средства на антитело можно рассчитать из смеси путем анализа антител двойным методом ELISA, который является специфическим для антитела и специфическим для лекарственного средства. Отдельные молекулы ADC могут быть идентифицированы в смеси методом масс-спектропии и разделены методом ВЭЖХ, например хроматографией гидрофобного взаимодействия (см., например, Hamblett, K.J., et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Объем 45, March 2004; Alley, S.C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Объем 45, March 2004). В некоторых вариантах осуществления гомогенный ADC с одним значением нагрузки может быть выделен из смеси для конъюгации при помощи электрофореза или хроматографии.

### 5.3.3 Получение конъюгатов антитело-лекарственное средство.

Получение конъюгатов антитело-лекарственное средство, представленных в настоящем изобретении, можно осуществить любым способом, известным специалистам. Вкратце, конъюгаты антитело-лекарственное средство включают анти-191P4D12 антитело или его антиген-связывающий фрагмент в качестве антитела как компонента конъюгата, лекарственное средство и, необязательно, линкер, который соединяет лекарственное средство и связывающий агент. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой анти-191P4D12 антитело, включающее CDR области антитела, обозначенного как Ha22-2(2,4)6.1, описанного выше. В конкретном варианте осуществления антитело представляет собой анти-191P4D12 антитело, включающее переменные области тяжелой и легкой цепи антитела, обозначенного как Ha22-2(2,4)6.1, описанного выше. В конкретном варианте осуществления антитело представляет собой анти-191P4D12 антитело, включающее тяжелую и легкую цепь антитела, обозначенного как Ha22-2(2,4)6.1, описанного выше.

Известен ряд различных реакций для ковалентного присоединения лекарственных средств и/или линкеров к связывающим агентам. Это часто достигается путем взаимодействия аминокислотных остатков связывающего агента, например молекулы антитела, включая аминокислоты лизина, свободные карбоновокислотные группы глутаминовой и аспарагиновой кислоты, сульфгидрильные группы цистеина и различные фрагменты ароматических аминокислот. Одним из наиболее часто используемых неспецифических методов ковалентного присоединения является карбодимидная реакция для связывания карбокси (или амино) группы соединения с амино (или карбокси) группами антитела. Кроме того, бифункциональные агенты, такие как диальдегиды или сложные имидозиферы, используются для связывания аминокислотной группы соединения с аминокислотными группами молекулы антитела. Также для присоединения лекарственных средств к связывающим агентам доступна реакция основания Шиффа. Этот метод включает периодатное окисление лекарственного средства, содержащего гликолевые или гидроксильные группы, с образованием альдегида, который затем взаимодействует со связывающим агентом. Присоединение происходит за счет образования основания Шиффа с аминокислотными группами связывающего агента. Изотиоцианаты также можно использовать в качестве связывающих агентов для ковалентного присоединения лекарственных средств к связывающим агентам. Другие методы известны специалистам в данной области и входят в объем настоящего изобретения.

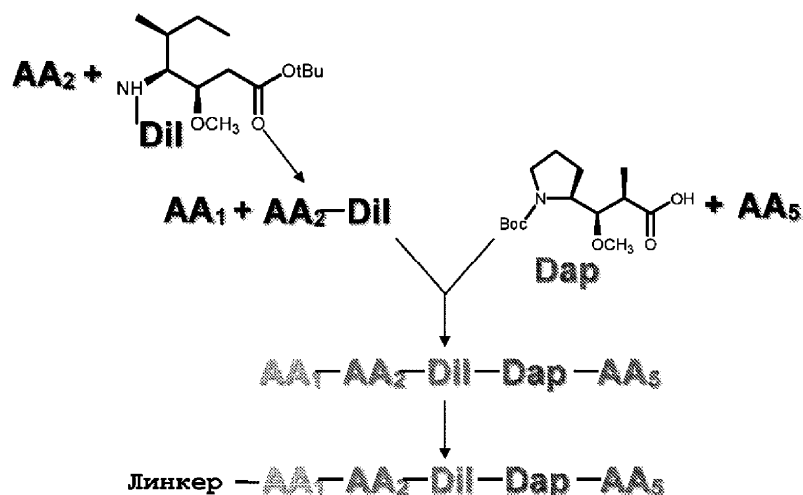
В некоторых вариантах осуществления промежуточное соединение, которое является предшественником линкера, взаимодействует с лекарственным средством в соответствующих условиях. В некоторых вариантах осуществления реакционноспособные группы используются в лекарственном средстве и/или промежуточном соединении. Продукт реакции между лекарственным средством и промежуточным соединением или дериватизированное лекарственное средство затем взаимодействует с антителом против 191P4D12 в соответствующих условиях.

Каждый из конкретных компонентов конъюгатов антитело-лекарственное средство описан более подробно в настоящем изобретении. Синтез и структура иллюстративных линкерных компонентов, удлиняющих компонентов, аминокислотных компонентов, саморасщепляющегося спейсерного компонента и лекарственных компонентов также описаны в патентных заявках США №№ 2003-0083263, 2005-0238649 и 2005-0009751, каждая из которых включена в настоящее изобретение посредством ссылки во всей полноте и для всех целей.

Иллюстративный способ для получения конъюгатов антитело-лекарственное средство, представленных в настоящем изобретении, кратко описан ниже.

Ha22-2(2,4)6.1 антитело конъюгируют с ауристатиновым производным MMAE с использованием *vc* (Val-Cit) линкера, описанного в настоящем изобретении, для создания конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) (обозначенного AGS-22M6E) с использованием следующих протоколов. Конъюгацию *vc* (Val-Cit) линкера с MMAE (Seattle Genetics, Inc., Seattle, WA) осуществляли с использованием общего способа, показанного на схеме 5 ниже, для создания цитотоксического *vc*MMAE (см. патент США № 7659241).

Схема 5. Общий способ синтеза *vc*MMAE.



где:

AA1=Аминокислота 1;

AA2=Аминокислота 2;

AA5=Аминокислота 5;

DII=Долаизолейцин;

DAP=Долапролин;

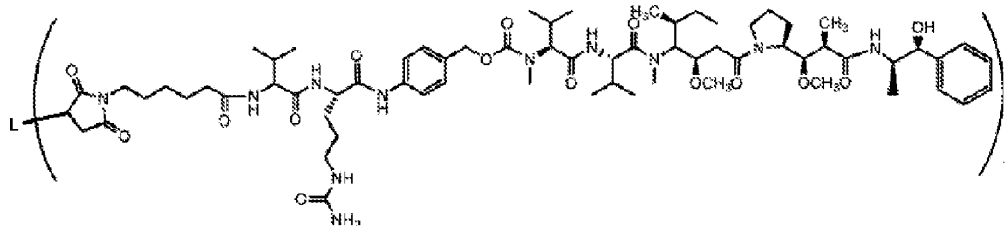
Линкер=Val-Cit (vc).

Затем конъюгат антитело-лекарственное средство AGS-22M6E получали с использованием следующих протоколов.

Вкратце, к 15 мг/мл раствора Na22-2(2,4)6.1 антитела в 10 мМ ацетата при pH 5,0, 1% сорбита, добавляют 3% L-аргинина с 20% объема 0,1 М TrisCl при pH 8,4, 25 мМ EDTA и 750 мМ NaCl для доведения pH раствора до 7,5, 5 мМ EDTA и 150 мМ хлорида натрия. Антитело затем частично восстанавливают путем добавления 2,3 молярных эквивалента TCEP (относительно молей MAб) и затем перемешивают при 37°C в течение 2 часов.

Раствор частично восстановленного антитела затем охлаждают до 5°C и добавляют 4,4 молярных эквивалента vcMMAE (относительно молей антитела) в виде 6% (об./об.) раствора в DMSO. Смесь перемешивают в течение 60 минут при 5°C, затем в течение 15 дополнительных минут после добавления 1 молярного эквивалента N-ацетилцистеина относительно vcMMAE. Избыток гашеного vcMMAE и других компонентов реакционной смеси удаляют ультрафильтрацией/диафильтрацией конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) с использованием 10 объемов 20 мМ гистидина, pH 6,0.

Полученный конъюгат антитело-лекарственное средство AGS-22M6E имеет следующую формулу:



где L представляет собой Na22-2(2,4)6.1 и p имеет значение от 1 до 20.

#### 5.4 Способы применения фармацевтических композиций.

В одном аспекте в настоящем изобретении представлен способ профилактики или лечения заболевания или расстройства у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, представленной в настоящем изобретении. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или расстройство представляет собой рак. В некоторых вариантах осуществления рак имеет опухолевые клетки, экспрессирующие 191P4D12. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак легкого, рак мочевого пузыря, рак молочной железы, рак пищевода, рак головы или рак шеи. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак толстой кишки. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак яичника. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак легкого. В некоторых вариантах осуществления рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак мочевого пузыря. В некото-

рых вариантах осуществления рак представляет собой прогрессирующий рак мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой метастатический рак мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой уротелиальный рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой прогрессирующий уротелиальный рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак пищевода. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак головы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак шеи. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой прогрессирующий или метастатический рак.

В некоторых вариантах осуществления изобретения лечение фармацевтической композицией, представленной в настоящем изобретении, показано субъектам, которые прошли один или несколько курсов химиотерапии. Альтернативно, фармацевтическую композицию, представленную в настоящем изобретении, комбинируют с химиотерапией или режимом облучения для субъектов, которые не получали химиотерапевтического лечения. Кроме того, в некоторых вариантах осуществления применение фармацевтической композиции, представленной в настоящем изобретении, может позволить использовать уменьшенные дозировки сопутствующей химиотерапии, особенно для субъектов, которые плохо переносят токсичность химиотерапевтического средства. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, раскрытую в настоящем изобретении, вводят пациентам с метастатическим уротелиальным раком, у которых наблюдается прогрессирование или рецидив заболевания во время или после лечения ингибитором иммунных контрольных точек.

Способы введения фармацевтической композиции, представленной в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются этим, парентеральное введение (например, внутривенное, внутримышечное, интраперитонеальное, внутривенное и подкожное), эпидуральное и слизистое (например, интраназальный и пероральный пути). В конкретном варианте осуществления представленную в настоящем изобретении фармацевтическую композицию вводят интраназально, внутримышечно, внутривенно или подкожно. Фармацевтическую композицию, представленную в настоящем изобретении, можно вводить любым удобным путем, например инфузией или болюсной инъекцией, путем абсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые оболочки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку носа, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т.д.) и можно вводить вместе с другими биологически активными веществами. Введение может быть системным или местным. Кроме того, можно также использовать ингаляционное введение, например, с использованием ингалятора или распылителя, а также композицию с распыляющим агентом. См., например, патенты США № 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 и 4880078; и публикации PCT № WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 и WO 99/66903, которые все включены в настоящее изобретение посредством ссылки во всей полноте.

В конкретном варианте осуществления может быть желательным введение фармацевтической композиции, представленной в настоящем изобретении, локально в область, нуждающуюся в лечении. Это можно осуществить, в качестве примера, а не ограничения, путем местной инфузии, местного введения (например, с использованием интраназального спрея), инъекции или путем введения имплантата, при этом указанный имплантат представляет собой пористый, непористый или гелеобразный материал, включая мембраны, такие как сиапластические мембраны или волокна. В некоторых вариантах осуществления изобретения при введении фармацевтической композиции, представленной в настоящем изобретении, необходимо соблюдать осторожность при использовании материалов, которые не абсорбируются конъюгатом антитело-лекарственное средство, представленным в настоящем изобретении.

В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем изобретении, может быть доставлена в везикуле, в частности в липосомах (см. Langer, 1990, *Science* 249: 1527-1533; Treat et al., *Liposomes in Therapy of Infective Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, Pp. 317-327; см. в основном там же).

В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем изобретении, может доставляться в системе контролируемого высвобождения или замедленного высвобождения. В одном варианте осуществления можно использовать насос для достижения контролируемого или замедленного высвобождения (см. Langer, *supra*; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:20; Buchwald et al., 1980, *Surgery* 88:507; Saudek et al., 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). В другом варианте осуществления можно использовать полимерные материалы для достижения контролируемого или замедленного высвобождения профилактического или терапевтического средства (например, конъюгат антитело-лекарственное средство, представленный в настоящем изобретении) или фармацевтической композиции, представленной в настоящем изобретении, (см. например, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, *J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23: 61; см. также Levy et al., 1985, *Science* 228: 190; During et al., 1989, *Ann. Neurol.* 25: 351; Howard et al., 1989, *J. Neurosurg.* 71: 105); патент США № 5679377; патент США № 5916597; патент США № 5912015; патент США № 5989463; патент США № 5128326; публикацию PCT № WO 99/15154; и публикацию PCT № WO 99/20253. Примеры полимеров, используемых в

композициях замедленного высвобождения, включают, но не ограничиваются этим, поли(2-гидроксиэтилметакрилат), поли(метилметакрилат), поли(акриловая кислота), поли(этилен-ко-винилацетат), поли(метакриловая кислота), полигликолиды (PLG), полиангидриды, поли(N-винилпирролидон), поли(виниловый спирт), полиакриламид, поли(этиленгликоль), полилактиды (PLA), поли(лактид-ко-гликолиды) (PLGA) и полиортоэферы. В одном варианте осуществления полимер, используемый в композиции замедленного высвобождения, является инертным, не содержащим вымываемых примесей, стабильным при хранении, стерильным и биоразлагаемым. Еще в одном варианте осуществления систему контролируемого или замедленного высвобождения можно разместить вблизи терапевтической мишени, т.е. носовых проходов или легких, таким образом, потребуется только часть системной дозы (см., например, Goodson, *Medical Applications of Controlled Release*, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)). Системы контролируемого высвобождения обсуждаются в обзоре Langer (1990, *Science* 249:1527-1533). Любой способ, известный специалистам в данной области, можно использовать для получения композиций с замедленным высвобождением, включающих конъюгат антитело-лекарственное средство, или фармацевтической композиции, представленной в настоящем изобретении. См., например, патент США № 4526938, публикацию PCT WO 91/05548, публикацию PCT WO 96/20698, Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," *Radiotherapy & Oncology* 39: 179-189, Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50: 372-397, Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24: 853-854, и Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24: 759-760, которые все включены в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте.

Количество представленной в настоящем изобретении фармацевтической композиции, которое будет эффективным для профилактики и/или лечения рака, может быть определено стандартными клиническими методами. Кроме того, необязательно можно использовать анализы *in vitro*, чтобы помочь определить оптимальные диапазоны доз. Точная применяемая доза также будет зависеть от пути введения и серьезности заболевания или расстройства и должна определяться в соответствии с мнением практикующего врача и обстоятельствами каждого субъекта. Эффективные дозы можно экстраполировать из кривых доза-ответ, полученных из тест-систем *in vitro* или на моделях животных.

В некоторых вариантах осуществления терапевтические способы, представленные в настоящем изобретении, предполагают введение одного ADC, а также комбинаций или коктейлей различных ADC, содержащих разные анти-191P4D12 антитела или разные лекарственные компоненты. В некоторых вариантах осуществления такие способы имеют определенные преимущества, поскольку, например, они содержат ADC, которые нацелены на разные эпитопы, используют разные эффекторные механизмы или комбинируют непосредственно цитотоксические антитела с антителами, которые зависят от иммунной эффекторной функциональности. Такие методы могут обеспечивать синергетический терапевтический эффект. Кроме того, фармацевтическую композицию, представленную в настоящем изобретении, можно вводить одновременно с другими терапевтическими методами, включая, но не ограничиваясь этим, различные химиотерапевтические и биологические средства, андроген-блокаторы, иммуномодуляторы (например, IL-2, GM-CSF), хирургическое вмешательство или облучение.

В одном варианте осуществления существует синергизм, когда опухоли, включая опухоли человека, лечат фармацевтической композицией, представленной в настоящем изобретении, в сочетании с химиотерапевтическими средствами, облучением или их комбинациями.

Способ ингибирования роста опухолевых клеток с использованием фармацевтической композиции, представленной в настоящем изобретении, и комбинации с химиотерапией или облучением, или и тем и другим, включает введение фармацевтической композиции по настоящему изобретению до, во время или после начала химиотерапии или лучевой терапии, а также любой комбинации их введения (т.е. до и во время, до и после, во время и после, или до, во время и после начала химиотерапии и/или лучевой терапии). В зависимости от протокола лечения и конкретных потребностей пациента, метод осуществляют таким образом, чтобы обеспечить наиболее эффективное лечение и в конечном итоге продлить жизнь пациента.

Введение химиотерапевтических средств можно осуществлять различными способами, в том числе системно парентеральным и энтеральным путями. В одном воплощении химиотерапевтическое средство вводят отдельно. Конкретные примеры химиотерапевтических средств или химиотерапии включают цисплатин, дакарбазин (DTIC), дактиномицин, мехлорэтамин (азотистый иприт), стрептозоцин, циклофосфамид, кармустин (BCNU), ломустин (CCNU), доксорубин (адриамицин), этопозид, метотрексат, 5-фторурацил, винбластин, винкристин, блеомицин, паклитаксел (таксол), доцетаксел (таксотер), алдеслейкин, аспарагиназу, бусульфан, карбоплатин, кладрибин, дакарбазин, флоксурин, флударабин, гидроксимочевину, ифосфамид, интерферон альфа, леупролид, мегестрол, мелфалан, меркаптопурин, пликамицин, митотан, пегаспаргазу, пентостатин, пипоброман, пликамицин, стрептозоцин, тамоксифен, тенипозид, тестолактон, тиогуанин, тиотепа, урацил иприт, винорелбин, гемцитабин, хлорамбуцил, таксол и их комбинации.

Источник излучения, используемый в комбинации с фармацевтической композицией, представленной в настоящем изобретении, может быть либо внешним, либо внутренним по отношению к пациенту, которого лечат. Когда источник находится вне пациента, терапия известна как внешняя лучевая терапия (EBRT). Когда источник излучения находится внутри пациента, лечение называется брахитерапией (BT).

Вышеописанные терапевтические схемы могут быть также объединены с дополнительными средствами и/или схемами лечения рака, например, дополнительной химиотерапией, противораковыми вакцинами, ингибиторами сигнальной трансдукции, средствами, применимыми при лечении аномального роста клеток или рака, антителами (например, анти-CTLA-4 антителами, как описано в WO/2005/092380 (Pfizer)) или другими лигандами, которые ингибируют рост опухоли путем связывания с IGF-1R и цитокинами.

Когда млекопитающее подвергают дополнительной химиотерапии, можно использовать химиотерапевтические средства, описанные выше. Кроме того, можно использовать ингибиторы фактора роста, модификаторы биологического ответа, антигормональную терапию, селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов (SERM), ингибиторы ангиогенеза и антиандрогены. Например, антигормоны, например антиэстрогены, такие как Nolvadex (тамоксифен), или антиандрогены, такие как Casodex (4'-циано-3-(4-фторфенилсульфонил)-2-гидрокси-2-метил-3'--(трифторметил)пропионанилид).

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, представленную в настоящем изобретении, используют в комбинации со вторым терапевтическим средством, например, для лечения рака.

В некоторых вариантах осуществления второе терапевтическое средство представляет собой ингибитор иммунных контрольных точек. Используемый здесь термин "ингибитор иммунных контрольных точек" или "ингибитор контрольных точек" относится к молекулам, которые полностью или частично снижают, ингибируют, препятствуют или модулируют один или несколько белков контрольных точек. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, белки контрольных точек регулируют активацию или функцию Т-клеток. Известны многочисленные белки контрольных точек, такие как CTLA-4 и его лиганды CD80 и CD86; и PD-1 с его лигандами PD-L1 и PD-L2 (Pardoll, Nature Reviews Cancer, 2012, 12, 252-264). Эти белки, по-видимому, ответственны за костимуляторные или ингибирующие взаимодействия Т-клеточных ответов. Белки иммунных контрольных точек, по-видимому, регулируют и поддерживают самотолерантность, а также продолжительность и амплитуду физиологических иммунных ответов. Ингибиторы иммунных контрольных точек включают антитела или происходят из антител.

В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки является ингибитором CTLA-4. В одном варианте ингибитор CTLA-4 представляет собой анти-CTLA-4 антитело. Примеры анти-CTLA-4 антител включают, но не ограничиваются этим, антитела, описанные в патентах США № 5811097; 5811097; 5855887; 6051227; 6207157; 6682736; 6984720; и 7605238, которые все полностью включены в настоящую заявку. В одном варианте осуществления анти-CTLA-4 антитело представляет собой тремелимумаб (также известный как тицилимумаб или CP-675,206). В другом варианте осуществления анти-CTLA-4 антитело представляет собой ипилимумаб (также известный как MDX-010 или MDX-101). Ипилимумаб представляет собой полностью человеческое моноклональное антитело IgG, которое связывается с CTLA-4. Ипилимумаб продается под торговым наименованием Yervoy™.

В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки является ингибитором PD-1/PD-L1. Примеры ингибиторов PD-1/PD-L1 включают, но не ограничиваются этим, ингибиторы, описанные в патентах США № 7488802; 7943743; 8008449; 8168757; 8217149 и публикациях патентных заявок США № WO2003042402, WO2008156712, WO2010089411, WO2010036959, WO2011066342, WO2011159877, WO2011082400 и WO2011161699, которые все включены в настоящую заявку во всей их полноте.

В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки является ингибитором PD-1. В одном варианте осуществления ингибитор PD-1 представляет собой анти-PD-1 антитело. В одном варианте осуществления анти-PD-1 антитело представляет собой BGB-A317, ниволумаб (также известный как ONO-4538, BMS-936558 или MDX1106) или пембролизумаб (также известный как MK-3475, SCH 900475 или ламбролизумаб). В одном варианте осуществления анти-PD-1 антитело представляет собой ниволумаб. Ниволумаб представляет собой человеческое IgG4 моноклональное анти-PD-1 антитело и поставляется на рынок под торговым названием Opdivo™. В другом варианте осуществления анти-PD-1 антитело представляет собой пембролизумаб. Пембролизумаб представляет собой гуманизованное моноклональное IgG4 антитело и поставляется на рынок под торговым названием Keytruda™. Еще в одном варианте осуществления анти-PD-1 антитело представляет собой CT-011, гуманизованное антитело. CT-011, вводимый отдельно, не показал ответ в лечении острого миелоидного лейкоза (AML) при рецидиве. Еще в одном варианте осуществления анти-PD-1 антитело представляет собой AMP-224, слитый белок. В другом варианте осуществления PD-1 антитело представляет собой BGB-A317. BGB-A317 представляет собой моноклональное антитело, в котором способность связываться с Fc гамма рецептором I специально сконструирована и который имеет уникальную сигнатуру связывания с PD-1 с высокой аффинностью и превосходной специфичностью в отношении мишени.

В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки является ингибитором PD-L1. В



одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой анти-PD-L1 антитело. В одном варианте осуществления анти-PD-L1 антитело представляет собой MEDI4736 (дурвалумаб). В другом варианте осуществления анти-PD-L1 антитело представляет собой BMS-936559 (также известный как MDX-1105-01). Еще в одном варианте осуществления ингибитор PD-L1 представляет собой атезолизумаб (также известный как MPDL3280A и Tecentriq®).

В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки является ингибитором PD-L2. В одном варианте осуществления ингибитор PD-L2 представляет собой анти-PD-L2 антитело. В одном варианте осуществления анти-PD-L2 антитело представляет собой rHIgM12B7A.

В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки является ингибитором гена-3 активации лимфоцитов (LAG-3). В одном варианте осуществления ингибитор LAG-3 представляет собой IMP321, растворимый Ig слитый белок (Brignone et al., J. Immunol., 2007, 179, 4202-4211). В другом варианте осуществления ингибитор LAG-3 представляет собой BMS-986016.

В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки является ингибитором B7. В одном варианте осуществления ингибитор B7 представляет собой ингибитор B7-H3 или ингибитор B7-H4. В одном варианте осуществления ингибитор B7-H3 представляет собой MGA271, анти-B7-H3 антитело (Loo et al., Clin. Cancer Res., 2012, 3834).

В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки является ингибитором TIM3 (Т-клеточного иммуноглобулинового домена и муцинового домена 3) (Четыресекаде et al., J. Exp. Med., 2010, 207, 2175-86; Sakuishi et al., J. Exp. Med., 2010, 207, 2187-94).

В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки является агонистом OX40 (CD134). В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой анти-OX40 антитело. В одном варианте осуществления анти-OX40 антитело представляет собой анти-OX-40. В другом варианте осуществления анти-OX40 антитело представляет собой MEDI6469.

В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки является агонистом GITR. В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой анти-GITR антитело. В одном варианте осуществления анти-GITR антитело представляет собой TRX518.

В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки является агонистом CD137. В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой анти-CD137 антитело. В одном варианте осуществления анти-CD137 антитело представляет собой урелумаб. В другом варианте осуществления анти-CD137 антитело представляет собой PF-05082566.

В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки является агонистом CD40. В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой анти-CD40 антитело. В одном варианте осуществления анти-CD40 антитело представляет собой CF-870,893.

В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки представляет собой рекомбинантный человеческий интерлейкин-15 (rhIL-15).

В одном варианте осуществления ингибитор контрольной точки является ингибитором IDO. В одном варианте осуществления ингибитор IDO представляет собой INCB024360. В другом варианте осуществления ингибитор IDO представляет собой индоксимод.

В некоторых вариантах осуществления комбинированные терапии, представленные в настоящем изобретении, включают два или более ингибиторов контрольных точек, описанных в настоящем изобретении (включая ингибиторы контрольных точек одного и того же или разных классов). Кроме того, комбинированные терапии, описанные в настоящем изобретении, можно использовать в комбинации с одним или несколькими вторыми активными средствами, описанными в настоящем изобретении, если необходимо, для лечения заболеваний, описанных в настоящем изобретении и известных в данной области.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольной точки вводят до введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению. В других вариантах осуществления ингибитор контрольной точки вводят одновременно (например, в тот же период введения) с фармацевтической композицией, представленной в настоящем изобретении. Еще в некоторых вариантах осуществления ингибитор контрольной точки вводят после введения фармацевтической композиции, представленной в настоящем изобретении.

В некоторых вариантах осуществления количество ингибитора контрольной точки можно определить стандартными клиническими методами.

Дозу ингибитора контрольной точки, которая приводит к сывороточному титру от около 0,1 мкг/мл до около 450 мкг/мл, и в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 0,1 мкг/мл, по меньшей мере 0,2 мкг/мл, по меньшей мере 0,4 мкг/мл, по меньшей мере 0,5 мкг/мл, по меньшей мере 0,6 мкг/мл, по меньшей мере 0,8 мкг/мл, по меньшей мере 1 мкг/мл, по меньшей мере 1,5 мкг/мл, так как по меньшей мере 2 мкг/мл, по меньшей мере 5 мкг/мл, по меньшей мере 10 мкг/мл, по меньшей мере 15 мкг/мл, по меньшей мере 20 мкг/мл, по меньшей мере 25 мкг/мл, по меньшей мере 30 мкг/мл, по меньшей мере 35 мкг/мл, по меньшей мере 40 мкг/мл, по меньшей мере 50 мкг/мл, по меньшей мере 75 мкг/мл, по меньшей мере 100 мкг/мл, по меньшей мере 125 мкг/мл, по меньшей мере 150 мкг/мл, по меньшей мере 200 мкг/мл, по меньшей мере 250 мкг/мл, по меньшей мере 300 мкг/мл, по меньшей мере 350 мкг/мл, по меньшей мере 400 мкг/мл или по меньшей мере 450 мкг/мл, можно вводить человеку для профилактики

и/или лечения рака. Должно быть понятно, что точная доза ингибитора контрольной точки для использования также будет зависеть от пути введения и тяжести рака у субъекта и должна определяться в соответствии с мнением лечащего врача и обстоятельствами конкретного пациента.

В некоторых вариантах осуществления доза ингибитора контрольной точки (например, ингибитора PD-1 или ингибитора PD-L1), вводимая пациенту типично составляет от 0,1 мг/кг до 100 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет от около 1 мг/кг до около 75 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет от 1 мг/кг до 20 мг/кг массы тела субъекта, например от 1 мг/кг до 5 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 1 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 1,5 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 2 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 2,5 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 3 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 3,5 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 4 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 4,5 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 5 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 5,5 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 6 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 6,5 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 7 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 7,5 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 8 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 8,5 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 9,0 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 10,0 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 15,0 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 20,0 мг/кг массы тела субъекта.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, представленная в настоящем изобретении, поставляется в виде сухого стерилизованного лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере и может быть восстановлена, например, водой или физиологическим раствором до подходящей концентрации для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство поставляется в виде сухого стерильного лиофилизированного порошка в герметично закрытом контейнере при стандартной дозе по меньшей мере 0,1 мг, по меньшей мере 0,5 мг, по меньшей мере 1 мг, по меньшей мере 2 мг или по меньшей мере 3 мг, так как по меньшей мере 5 мг, по меньшей мере 10 мг, по меньшей мере 15 мг, по меньшей мере 25 мг, по меньшей мере 30 мг, по меньшей мере 35 мг, по меньшей мере 45 мг, по меньшей мере 50 мг, по меньшей мере 60 мг, по меньшей мере 75 мг, по меньшей мере 80 мг, по меньшей мере 85 мг, по меньшей мере 90 мг, по меньшей мере 95 мг или по меньшей мере 100 мг. Лيوфилизированный конъюгат антитело-лекарственное средство можно хранить при температуре от 2 до 8°C в его исходном контейнере, и конъюгат антитело-лекарственное средство можно вводить в срок не более 12 часов, например не более 6 часов, не более 5 часов, не более 3 часов или не более 1 часа после восстановления. В альтернативном варианте осуществления фармацевтическая композиция, включающая конъюгат антитело-лекарственное средство, представленный в настоящем изобретении, поставляется в жидкой форме в герметично закрытом контейнере с указанием количества и концентрации конъюгата антитело-лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления жидкая форма конъюгата антитело-лекарственное средство поставляется герметично закрытом контейнере по меньшей мере 0,1 мг/мл, по меньшей мере 0,5 мг/мл или по меньшей мере 1 мг/мл и так как по меньшей мере 5 мг/мл, по меньшей мере 10 мг/мл, по меньшей мере 15 мг/мл, по меньшей мере 25 мг/мл, по меньшей мере 30 мг/мл, по меньшей мере 40 мг/мл, по меньшей мере 50 мг/мл, по меньшей мере 60 мг/мл, по меньшей мере 70 мг/мл, по меньшей мере 80 мг/мл, по меньшей мере 90 мг/мл или по меньшей мере 100 мг/мл.

В некоторых вариантах осуществления количество профилактического или терапевтического средства (например, конъюгата антитело-лекарственное средство, представленного в настоящем изобретении) или фармацевтической композиции, представленной в настоящем изобретении, которое будет эффективным для профилактики и/или лечения рака, можно определить стандартными клиническими способами.

Соответственно, дозу конъюгата антитело-лекарственное средство в фармацевтической композиции, которая приводит к сывороточному титру от около 0,1 мкг/мл до около 450 мкг/мл и в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 0,1 мкг/мл, по меньшей мере 0,2 мкг/мл, по меньшей мере

0,4 мкг/мл, по меньшей мере 0,5 мкг/мл, по меньшей мере 0,6 мкг/мл, по меньшей мере 0,8 мкг/мл, по меньшей мере 1 мкг/мл, по меньшей мере 1,5 мкг/мл, так как по меньшей мере 2 мкг/мл, по меньшей мере 5 мкг/мл, по меньшей мере 10 мкг/мл, по меньшей мере 15 мкг/мл, по меньшей мере 20 мкг/мл, по меньшей мере 25 мкг/мл, по меньшей мере 30 мкг/мл, по меньшей мере 35 мкг/мл, по меньшей мере 40 мкг/мл, по меньшей мере 50 мкг/мл, по меньшей мере 75 мкг/мл, по меньшей мере 100 мкг/мл, по меньшей мере 125 мкг/мл, по меньшей мере 150 мкг/мл, по меньшей мере 200 мкг/мл, по меньшей мере 250 мкг/мл, по меньшей мере 300 мкг/мл, по меньшей мере 350 мкг/мл, по меньшей мере 400 мкг/мл или по меньшей мере 450 мкг/мл, можно вводить человеку для профилактики и/или лечения рака. Должно быть понятно, что точная доза для использования в композиции также будет зависеть от пути введения и тяжести рака у субъекта, и должна определяться в соответствии с мнением лечащего врача и обстоятельствами конкретного пациента.

Эффективные дозы можно экстраполировать из кривых доза-ответ, полученных в системах испытаний *in vitro* или на животных моделях.

Для фармацевтической композиции, включающей конъюгат антитело-лекарственное средство, представленный в настоящем изобретении, доза конъюгата антитело-лекарственное средство, вводимая пациенту, типично составляет от 0,1 мг/кг до 100 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет от около 1 мг/кг до около 75 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет от 1 мг/кг до 20 мг/кг массы тела субъекта, например от 1 мг/кг до 5 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 1 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 1,25 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 1,5 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 2 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 2,5 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 3 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 3,5 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 4 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 4,5 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 5 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 5,5 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 6 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 6,5 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 7 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 7,5 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 8 мг/кг массы тела субъекта. В некоторых вариантах осуществления доза, вводимая пациенту, составляет около 8,5 мг/кг массы тела субъекта.

В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство, сформулированный в фармацевтическую композицию, представленную в настоящем изобретении, вводят на основании фактической массы тела пациента на исходном уровне, и дозы не будут изменяться, если масса тела пациента не изменится на  $\geq 10\%$  от исходного уровня предыдущего цикла, или будут соблюдены критерии корректировки дозы. В некоторых вариантах осуществления будет использоваться фактическая масса тела, за исключением пациентов с массой тела более 100 кг, в таких случаях доза будет рассчитана на основе массы тела 100 кг. В некоторых вариантах осуществления максимальные дозы составляют 100 мг для пациентов, получающих уровень дозы 1,00 мг/кг, и 125 мг для пациентов, получающих уровень дозы 1,25 мг/кг.

В одном варианте осуществления приблизительно 100 мг/кг или меньше, приблизительно 75 мг/кг или меньше, приблизительно 50 мг/кг или меньше, приблизительно 25 мг/кг или меньше, приблизительно 10 мг/кг или меньше, приблизительно 5 мг/кг или меньше, приблизительно 1 мг/кг или меньше, приблизительно 0,5 мг/кг или меньше, или приблизительно 0,1 мг/кг или меньше конъюгата антитело-лекарственное средство, сформулированного в фармацевтическую композицию, представленную в настоящем изобретении, вводят 5 раз, 4 раза, 3 раза, 2 раза или 1 раз для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую конъюгат антитело-лекарственное средство, представленный в настоящем изобретении, вводят примерно 1-12 раз, при этом дозы можно вводить по мере необходимости, например, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, раз в два месяца, три раза в месяц и т.д., как определит лечащий врач. В некоторых вариантах осуществления более низкую дозу (например, 0,1-15 мг/кг) можно вводить более часто (например, 3-6 раз). В других вариантах осуществления более высокую дозу (например, 25-100 мг/кг) можно вводить реже (например, 1-3 раза).

В некоторых вариантах осуществления одну дозу конъюгата антитело-лекарственное средство, сформулированного в фармацевтическую композицию, представленную в настоящем изобретении, вводят пациенту для профилактики и/или лечения рака 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,



тении, пациенту представляет собой интраназальный, внутримышечный, внутривенный или их комбинацию, но другие пути, описанные в настоящем изобретении, также приемлемы. Каждую дозу можно вводить одним и тем же или разными путями введения. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство, сформулированный в фармацевтическую композицию, представленную в настоящем изобретении, можно вводить разными путями введения одновременно или после других доз одного или нескольких дополнительных терапевтических средств.

В некоторых более конкретных вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство, сформулированный в фармацевтическую композицию, представленную в настоящем изобретении, вводят при дозе около 1 мг/кг, около 1,25 мг/кг или около 1,5 мг/кг массы тела субъекта путем внутривенной (в/в) инъекции или инфузии.

В некоторых более конкретных вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство, сформулированный в фармацевтическую композицию, представленную в настоящем изобретении, вводят при дозе около 1 мг/кг, 1,25 мг/кг или около 1,5 мг/кг массы тела субъекта путем внутривенной (в/в) инъекции или инфузии в течение около 30 минут два раза каждые три недели. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство, сформулированный в фармацевтическую композицию, вводят путем внутривенной (в/в) инъекции или инфузии в течение около 30 минут в дни 1 и 8 каждого трехнедельного цикла. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение ингибитора иммунной контрольной точки путем внутривенной (в/в) инъекции или инфузии один или несколько раз каждые три недели. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение ингибитора иммунной контрольной точки путем внутривенной (в/в) инъекции или инфузии в День 1 каждого трехнедельного цикла. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой пембролизумаб, и при этом пембролизумаб вводят в количестве около 200 мг в течение около 30 минут. В других вариантах осуществления ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой атезолизумаб, и при этом атезолизумаб вводят в количестве около 1200 мг в течение около 60 минут или 30 минут. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство вводят пациентам с уротелиальным раком, у которых произошло прогрессирование заболевания или рецидив в процессе или после лечения ингибитором иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство вводят пациентам с метастатическим уротелиальным раком, у которых произошло прогрессирование заболевания или рецидив в процессе или после лечения ингибитором иммунной контрольной точки.

В других более конкретных вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство, сформулированный в фармацевтическую композицию, представленную в настоящем изобретении, вводят при дозе около 1 мг/кг, 1,25 мг/кг или около 1,5 мг/кг массы тела субъекта путем внутривенной (в/в) инъекции или инфузии в течение около 30 минут три раза каждые четыре недели. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство, сформулированный в фармацевтическую композицию, вводят путем внутривенной (в/в) инъекции или инфузии в течение около 30 минут в дни 1, 8 и 15 каждого четырехнедельного цикла. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение ингибитора иммунной контрольной точки путем внутривенной (в/в) инъекции или инфузии один или несколько раз каждые четыре недели. В некоторых вариантах осуществления ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой пембролизумаб. В других вариантах осуществления ингибитор иммунной контрольной точки представляет собой атезолизумаб. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство вводят пациентам с уротелиальным раком, у которых произошло прогрессирование заболевания или рецидив в процессе или после лечения ингибитором иммунной контрольной точки. В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство вводят пациентам с метастатическим уротелиальным раком, у которых произошло прогрессирование заболевания или рецидив в процессе или после лечения ингибитором иммунной контрольной точки.

Для краткости в настоящем изобретении используются некоторые аббревиатуры. Одним примером является однобуквенная аббревиатура для представления аминокислотных остатков. Аминокислоты и их соответствующие трехбуквенные и однобуквенные аббревиатуры представлены ниже:

аланин	Ala	(A)
аргинин	Arg	(R)
аспарагин	Asn	(N)
аспарагиновая кислота	Asp	(D)
цистеин	Cys	(C)
глутаминовая кислота	Glu	(E)
глутамин	Gln	(Q)
глицин	Gly	(G)
гистидин	His	(H)
изолейцин	Ile	(I)
лейцин	Leu	(L)
лизин	Lys	(K)
метионин	Met	(M)
фенилаланин	Phe	(F)
пролин	Pro	(P)
серин	Ser	(S)
треонин	Thr	(T)
триптофан	Trp	(W)
тирозин	Tyr	(Y)
валин	Val	(V)

Изобретение в общем виде раскрыто в настоящем документе с использованием утвердительного способа изложения для описания многочисленных вариантов осуществления. Изобретение также конкретно включает варианты осуществления, в которых конкретный предмет исключен, полностью или частично, например вещества или материалы, стадии и условия способа, протоколы, процедуры, количественные анализы или анализ. Таким образом, даже несмотря на то, что изобретение, как правило, не выражено с точки зрения того, что изобретение не включает, аспекты, которые явно не включены в изобретение, тем не менее, раскрыты в настоящем изобретении.

В настоящем изобретении описаны конкретные варианты осуществления представленного изобретения, включая лучший из известных авторам изобретения способ осуществления изобретения. После прочтения вышеприведенного описания варианты раскрытых вариантов осуществления могут стать очевидными для лиц, работающих в данной области техники, и ожидается, что специалисты в данной области техники могут использовать такие варианты при необходимости. Соответственно, предполагается, что изобретение будет реализовано на практике иначе, чем конкретно описано в настоящем изобретении, и что изобретение включает все модификации и эквиваленты объекта изобретения, изложенного в прилагаемой формуле изобретения, как это разрешено применимым законодательством. Более того, любая комбинация вышеописанных элементов во всех их возможных вариациях охватывается изобретением, если иное не указано в настоящем изобретении или же явно не противоречит контексту.

Все публикации, патентные заявки, номера доступа и другие ссылки, указанные в данном описании, полностью включены в настоящую заявку посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация или патентная заявка были специально и индивидуально указаны для включения посредством ссылки. Обсуждаемые в настоящем изобретении публикации представлены исключительно для их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто в настоящем изобретении не должно толковаться как признание того, что настоящее изобретение не имеет права датировать такую публикацию более ранней датой в силу предшествующего изобретения. Кроме того, указанные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, которые могут нуждаться в независимом подтверждении.

Был описан ряд вариантов осуществления изобретения. Тем не менее, следует понимать, что возможны различные модификации без отклонения от сущности и объема изобретения. Соответственно, описания в экспериментальном разделе предназначены для иллюстрации, но не ограничения объема изобретения, описанного в формуле изобретения.

## 6. Примеры

Ниже приводится описание различных методов и материалов, использованных в исследованиях, которые представлены для того, чтобы рядовые специалисты в данной области могли иметь полное рас-

крытие и описание получения и применения настоящего изобретения, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы изобретения считают своим изобретением, и не предназначены для демонстрации того, что эксперименты, описанные ниже, были осуществлены и что это все эксперименты, которые могут быть осуществлены. Следует понимать, что иллюстративные описания, изложенные в настоящем времени, не обязательно выполнялись, но, скорее, описания могут выполняться для получения данных и т.п., связанных с идеями настоящего изобретения. Были предприняты усилия для обеспечения точности используемых числовых данных (например, количества, температуры и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения.

#### 6.1 Пример 1. Скрининг pH и буферов.

AGS-22M6E формулировали при 10 мг/мл в четырнадцати буферах-кандидатах (все при 20 мМ, как показано в табл. 1 ниже). Оценивали композиции с использованием 20 мМ натрийцитратного буфера, который титровали до pH 5,2 и 5,7 с использованием лимонной кислоты, 20 мМ Гистидинового буфера, который титровали до pH 5,5, 6,0 и 6,5 с использованием HCl. Кроме того, оценивали три разных аниона в системах с гистидиновым буфером - хлорид, фосфат и сукцинат. Жидкие композиции подвергали условиям хранения при температуре 40°C в течение 2 недель, взбалтыванию при комнатной температуре (комн. темп.) в течение 24 часов и циклам замораживание-размораживание (Fz/Th) (замораживание при -70°C и размораживание при 20°C-25°C, 1, 3 и 10 циклов).

Таблица 1

Композиция №	Буфер	pH	Дигидрат трегалозы (%)	Сахароза (%)	Tween 20 конц. (масс/об%)
F1	20 мМ цитрата натрия/ лимонная кислота	5,2	5,5	0	0,02
F2		5,7			
F3	5,5				
F4	6				
F5	6,5				
F6	20 мМ цитрата натрия/ лимонная кислота	5,2	0	5	
F7		5,7			
F8	20 мМ гистидина/HCl	5,5			
F9		6			
F10		6,5			
F11	20 мМ гистидина/ Фосфорная кислота	5,5	5,5	0	
F12		6			
F13	20 мМ гистидина/ Янтарная кислота	5,5			
F14		6			

Примечание: 5% сахарозы (мол.масса 342) = 146 мМ; 5,5% дигидрата трегалозы (мол.масса 378) = 146 мМ.

Получение композиции и план исследования описаны более подробно ниже.

Белковый продукт, используемый для исследования композиций.

Четыре пробирки, каждая содержащая около 50 мл AGS-22M6E (Lot#AGS22M6-VCE-02), в общей сложности около 2,5 граммов, были получены замороженными. AGS-22M6E был при 12,5 мг/мл в 20мМ гистидинового pH 6,0 буфера, содержащего 5% сахарозы и 0,02% полисорбата-20. Материал хранился при -70°C до использования.

Получение буферов для формулирования композиций.

Исходные растворы, включающие лимонную кислоту (0,1 М), цитрат натрия (0,1М) и L-гистидин (0,2 М), янтарную кислоту (0,25М), дигидрат трегалозы (40%), сахарозу (40%), хлористоводородную кислоту (2М) и фосфорную кислоту (2М), были получены в соответствии с табл. 2, представленной ниже:

Таблица 2

Исходные растворы	MW (г/моль)	Желаемая концентрация (моль/л)	Объем (л)	Требуемая масса (г)
Лимонная кислота моногидрат	210,14	0,1	1,0	21,01
Цитрат натрия дигидрат	294,1	0,1	2,0	58,82
L-гистидин	155,15	0,2	1,5	46,55
Дигидрат трегалозы	378,33	40%	1,5	600,00
Трегалоza	342,30	40%	1,0	400,00

Янтарная кислота	118,09	0,25	0,8	23,62	
Для отмеривания:					
Исходные растворы	Начальная конц. (М)	Конечная конц. (М)	Конечный объем (мл)	Концентрированная кислота (мл)	Вода (мл)
Хлористоводородная кислота	12,1	2,0	500	82,6	417,4
Фосфорная кислота	14,8	2,0	500	67,6	432,4

Реагенты отвешивали в соответствии с таблицей выше. Добавляли подходящий объем Milli-Q воды для растворения реагентов. Растворы фильтровали через 0,22 мкм фильтры.

Получение буферов для композиций для диализа 1,0 л каждой композиции подготавливали для диализа и флаконов с плацебо в соответствии с табл. 3 ниже:

Таблица 3

Композиция №	pH	0,1М моногидрата лимонной кислоты (мл)	0,1М Цитрата натрия дигидрата (мл)	0,2М L-гистидина (мл)	40% Дигидрата трегалозы (мл)	40% Сахарозы (мл)	Вода (мл)	Регулирование pH при помощи	Общий объем (мл)
F1	5,2	61	139		137,5		662,5		1000
F2	5,7	37	163		137,5		662,5		1000
F3	5,5			100	137,5		762,5	2М HCl	1000
F4	6,0			100	137,5		762,5	2М HCl	1000
F5	6,5			100	137,5		762,5	2М HCl	1000
F6	5,2	61	139			125	675		1000
F7	5,7	37	163			125	675		1000
F8	5,5			100		125	775	2М HCl	1000
F9	6,0			100		125	775	2М HCl	1000
F10	6,5			100		125	775	2М HCl	1000
F11	5,5			100	137,5		762,5	2М Фосфорной кислоты	1000
F12	6,0			100	137,5		762,5	2М Фосфорной кислоты	1000
F13	5,5			100	137,5		762,5	0,25М Янтарной кислоты	1000
F14	6,0			100	137,5		762,5	0,25М Янтарной кислоты	1000
								кислоты	

pH доводили подходящей кислотой до целевого pH  $\pm 0,1$ . Буферы хранили при 4°C до использования. Получение композиции.

4 пробирки, каждая содержащая 50 мл AGS-22M6E (Lot#AGS22M6-VCE-02), размораживали на водяной бане при комнатной температуре, затем объединяли в 250-мл бутылки. 11 мл распределяли для каждой композиции и добавляли в диализные кассеты. Кассеты помещали в химические стаканы, содержащие ~40-кратный избыток буфера для формулирования композиции и перемешивали в течение ночи при 2-8°C. Буфер сливали и добавляли свежий буфер и перемешивали в течение ночи при 2-8°C. Вещество удаляли из кассет и переносили в 50-мл пробирки, определяли концентрации и объемы регулировали соответствующим буфером для композиции, чтобы конечная концентрация была 10 мг/мл. В качестве плацебо использовали соответствующие буферы, используемые для формулирования продукта.

Распределение композиции по флаконам и закупоривание флаконов.

Стерильную фильтрацию и наполнение осуществляли в вытяжном шкафу с ламинарным потоком



воздуха Baker SG600. Композиции и плацебо подвергали стерильной фильтрации асептическим методом (0,22 мкм PVDF шприцевые фильтры Millipore Millex-GV, # SLGV033RS). Стерильные закупоренные флаконы (2-мл стерильные закупоренные флаконы Hollister-Stier, № 7505ZA) разгерметизировали в вытяжном шкафу, и пробки удаляли асептическим методом. Флаконы заполняли 1,0 мл сформулированного продукта или плацебо, а затем снова закупоривали.

Требования к материалам и схема анализа проб.

Требования к материалам и схема анализа проб являются следующими:

Таблица 4

Концентрация (мг/мл)	Условия	# флаконов	Объем наполнения	Общий объем наполнения	Общее количество белка (мг)	Всего мл на композицию	Всего мг на композицию
10	40°C	5	1	5,0	50		
10	1 цикл замораживания/размораживания при -70°C /25°C	1	1	1,0	10		
10	3 цикла замораживания/размораживания при -70°C /25°C	1	1	1,0	10		
10	10 циклов замораживания/размораживания при -70°C /25°C	1	1	1,0	10		
10	Анализ Tween 20	1	1	1,0	10		
10	Встряхивание при комн. темп. в течение 24 часов	1	1	1,0	10	10	100
# конц. белка для испытания	# буферов для испытания	Общее # флаконов		Общий объем наполнения (мл)	Белок в флаконах (мг)	Требуемое колич. белка (мг)	Общее количество проб: 112
1	14	140		140,0	1400	1680	
<b>Условия</b>			<b>Дни в условиях хранения</b>				
			<b>0</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>14</b>	
40°C			X	X	X	X	
1 цикл замораживания/размораживания при -70°C /25°C				X			

3 цикла замораживания/размораживания при $-70 < C/25 < C$			X	
10 циклов замораживания/размораживания при $-70 < C/25 < C$				X
Встряхивание при комн. темп. в течение 24 часов	X			

Момент времени и анализы.

Момент времени и анализы представлены в табл. 5 ниже.

Таблица 5

Аналитический анализ	T=0	T=3д	T=7д	T=14д	1 X Fz/Th при -70°C /25°C	3 X Fz/Th при -70°C /25°C	10 X Fz/Th при -70°C /25°C	Встряхивание при комн. темп. в течение 24 часов
	13-апр.-10	16-апр.-10	20-апр.-10	4/272010				
pH	X	X						
Осмоляльность	X	X						
Внешний вид	X	X	X	X	X	X	X	X
A280	X	X	X	X	X	X	X	X
Мутность (A330)	X	X	X	X	X	X	X	X
SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях	X	X	X	X	X	X	X	X
SDS-PAGE в восстанавливающих условиях	X	X	X	X	X	X	X	X
SE-HPLC	X	X	X	X	X	X	X	X
ОФ-ВЭЖХ	X			X				
Эффективность & CIEF*	Предоставить образцы для испытания							

План испытания стабильности жидкой композиции при 40°C.

Флаконы с композициями и плацебо помещали вертикально в инкубатор, установленный на 40°C. В каждый момент времени один флакон с активным веществом и один флакон с плацебо для каждой композиции извлекали из условий хранения в соответствии со схемой анализа проб. Образцы замораживали

при  $-70^{\circ}\text{C}$  и анализировали по партиям в конце исследования. Перед анализом образцы размораживали при комнатной температуре. Набор из 3 аликвот каждого образца (70 мкл аликвоты для каждого образца) замораживали при  $-70^{\circ}\text{C}$  после фильтрования через 0,22 мкм фильтр. После аналитического испытания любое оставшееся вещество хранили при  $2-8^{\circ}\text{C}$  в течение ночи, если было необходимо повторное испытание. После завершения всех анализов оставшиеся вещества хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Две замороженные аликвоты использовали для анализов sIEF и активности.

План испытания стабильности при замораживании-размораживании ( $-70^{\circ}\text{C}$ ).

Один флакон для каждой композиции (заполнение 1,0 мл) помещали вертикально в  $-70^{\circ}\text{C}$  морозильник на по меньшей мере 4 часа, что обеспечивало возможность замораживания. Для размораживания каждый флакон извлекали из условий хранения и размораживали при комнатной температуре до тех пор, пока больше не оставалось льда, и затем флакон осторожно взбалтывали. Это составляло один полный цикл замораживание-размораживание. Осуществляли один, три и десять циклов замораживание-размораживание для каждого флакона с образцом испытываемой композиции. После конечного цикла замораживание-размораживание все образцы оценивали в аналитическом испытании. Набор из 3 аликвот каждого образца (70 мкл аликвоты для каждого образца) мгновенно замораживали при  $-70^{\circ}\text{C}$ . После аналитического испытания любое оставшееся вещество хранили при  $2-8^{\circ}\text{C}$  в течение ночи, если было необходимо повторное испытание. После завершения всех анализов оставшиеся вещества хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Две замороженные аликвоты использовали для анализов sIEF и активности.

План испытания с использованием взбалтывания.

Один флакон для каждой композиции устанавливали вертикально в стандартный морозильный бокс. Бокс затем соединяли с IKA-VIBRAMAX-VXR орбитальным шейкером, установленным на 500 об/мин при комнатной температуре в течение 24 часов. Образцы затем извлекали и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$  до использования в анализе.

Стандарт композиции.

1,2 мл AGS-22M6E (Lot#AGS22M6-VCE-02) исходного вещества (12,5 мг/мл в 20 mM Гистидинового pH 6,0 буфера, содержащего 5% сахарозы и 0,02% полисорбата-20) брали и разделяли на аликвоты при 200 мкл/флакон, затем хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$  в виде стандарта композиции для этого испытания.

Внешний вид, A280 (концентрация белка и нагрузка лекарственным средством), A330 (мутность), эксклюзионную ВЭЖХ, SDS-PAGE в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях, ОФ-ВЭЖХ-NPI, анализ iCIEF и активности использовали для оценки стабильности AGS-22M6E.

Внешний вид: все образцы показали отсутствие цвета, отсутствие помутнения и отсутствие мелких твердых частиц в течение всего испытания. Отсутствие мелких твердых частиц наблюдали даже при встряхивании.

Анализ A280 (концентрация белка): результаты анализа A280 показаны в табл. 6 ниже.

Таблица 6

Образец	A280			
	Дни при 40°C			
	0	3	7	14
F1	0,6549	0,6274	0,6805	0,6449
F2	0,6818	0,7017	0,6929	0,6853
F3	0,7069	0,6491	0,7130	0,6990
F4	0,7056	0,7147	0,7106	0,7217
F5	0,7123	0,6837	0,7138	0,7201
F6	0,6616	0,6789	0,6935	0,6830
F7	0,6594	0,6558	0,6672	0,6730
F8	0,6986	0,6903	0,7037	0,7017
F9	0,6834	0,7002	0,7063	0,7061
F10	0,6888	0,6839	0,6937	0,7023
F11	0,7032	0,7109	0,7074	0,6950
F12	0,7040	0,6622	0,7088	0,7255

F13		0,6736	0,6754	0,6874	0,6818
F14		0,6944	0,6745	0,6878	0,7003
A280					
Образец	0	1X FzTh	3X FzTh	10X FzTh	Встряхивание 24ч
F1	0,6549	0,6582	0,6951	0,65725	0,66017
F2	0,6818	0,6809	0,6761	0,68321	0,67565
F3	0,7069	0,6963	0,6958	0,69771	0,70847
F4	0,7056	0,7048	0,6817	0,69875	0,68629
F5	0,7123	0,7027	0,6961	0,70278	0,71533
F6	0,6616	0,6651	0,6715	0,68515	0,66747
F7	0,6594	0,6622	0,6585	0,63399	0,65046
F8	0,6986	0,6969	0,7042	0,69579	0,69878
F9	0,6834	0,6893	0,6876	0,67558	0,69247
F10	0,6888	0,6862	0,6921	0,68071	0,68312
F11	0,7032	0,6967	0,6905	0,68287	0,70169
F12	0,7040	0,6892	0,7064	0,69924	0,68928
F13	0,6736	0,6746	0,6745	0,65992	0,66715
F14	0,6944	0,6831	0,7003	0,67608	0,68892
Концентрация (мг/мл)					
Дни при 40°C					
Образец	0	3	7	14	
F1		9,01	8,63	9,36	8,87
F2		9,38	9,65	9,53	9,43
F3		9,72	8,93	9,81	9,62
F4		9,71	9,83	9,77	9,93
F5		9,80	9,40	9,82	9,90
F6		9,10	9,34	9,54	9,40
F7		9,07	9,02	9,18	9,26
F8		9,61	9,50	9,68	9,65
F9		9,40	9,63	9,71	9,71
F10		9,47	9,41	9,54	9,66
F11		9,67	9,78	9,73	9,56
F12		9,68	9,11	9,75	9,98
F13		9,27	9,29	9,46	9,38

Образец	Концентрация (мг/мл)				
	0	1X FzTh	3X FzTh	10X FzTh	Встряхивание 24ч
F1	9,01	9,05	9,56	9,04	9,08
F2	9,38	9,37	9,30	9,40	9,29
F3	9,72	9,58	9,57	9,60	9,75
F4	9,71	9,69	9,38	9,61	9,44
F5	9,80	9,67	9,57	9,67	9,84
F6	9,10	9,15	9,24	9,42	9,18
F7	9,07	9,11	9,06	8,72	8,95
F8	9,61	9,59	9,69	9,57	9,61
F9	9,40	9,48	9,46	9,29	9,53
F10	9,47	9,44	9,52	9,36	9,40
F11	9,67	9,58	9,50	9,39	9,65
F12	9,68	9,48	9,72	9,62	9,48
F13	9,27	9,28	9,28	9,08	9,18
F14	9,55	9,40	9,63	9,30	9,48

Как показано, никаких изменений концентрации белка не наблюдали.

Анализ А330 (мутность): Результаты анализа А330 показаны в табл. 7 ниже.

Таблица 7

Образец	А330					
	Дни при 40°С					
	0		3	7	14	
	Плацебо	Активн. вещество	Активн. вещество	Активн. вещество	Плацебо	Активн. вещество
F1	-0,0006	0,0591	0,1030	0,1053	0,0131	0,1223
F2	-0,0040	0,0727	0,0934	0,1067	0,0363	0,1070
F3	-0,0063	0,0585	0,0632	0,0715	0,0018	0,0736
F4	-0,0036	0,0601	0,0667	0,0730	0,0053	0,0757
F5	0,0027	0,0659	0,0720	0,0917	0,0030	0,0823
F6	0,0028	0,1018	0,0970	0,1196	0,0004	0,1269
F7	0,0029	0,0705	0,0885	0,0925	0,0073	0,1031
F8	0,0019	0,0620	0,0598	0,0801	0,0112	0,0860
F9	0,0041	0,0681	0,0776	0,0982	0,0193	0,1046
F10	0,0013	0,0628	0,0760	0,0905	0,0156	0,0886

F11	0,0036	0,0773	0,0649	0,0722	0,0100	0,0782
F12	0,0014	0,0652	0,0641	0,0861	0,0131	0,0796
F13	0,0142	0,0655	0,0660	0,0708	0,0121	0,0936
F14	0,0112	0,0659	0,0637	0,0701	0,0122	0,0857
A330						
Образец	1X FzTh	3X FzTh	10X FzTh		Встряхивание 24ч	
	Активн. вещество	Активн. вещество	Плацебо	Активн. вещество	Плацебо	Активн. вещество
F1	0,0638	0,0787	0,0042	0,0755	0,0083	0,0698
F2	0,0683	0,0757	0,0075	0,0774	0,0089	0,0719
F3	0,0631	0,0645	0,0008	0,0620	0,0235	0,0669
F4	0,0593	0,0908	0,0005	0,0600	0,0036	0,0577
F5	0,0647	0,0598	0,0049	0,0685	0,0099	0,0615
F6	0,0805	0,0796	-0,0001	0,0728	0,0180	0,0737
F7	0,0714	0,0777	0,0025	0,0745	0,0100	0,0695
F8	0,0630	0,0750	0,0006	0,0696	0,0053	0,0568
F9	0,0670	0,0737	0,0034	0,0715	0,0022	0,0692
F10	0,0595	0,0750	0,0007	0,0752	0,0050	0,0676
F11	0,0559	0,0763	0,0016	0,0694	0,0013	0,0629
F12	0,0625	0,0679	0,0006	0,0695	0,0028	0,0695
F13	0,0616	0,0701	0,0028	0,0820	-0,0009	0,0759
F14	0,0611	0,0745	-0,0017	0,1033	0,0108	0,0972

Как показано, композиции F1 и F6 показали наиболее значимые увеличения мутности со временем. При T=0 более высокая мутность была отмечена для композиции F6, которую не наблюдали в других композициях.

SDS-PAGE анализ: результаты SDS-PAGE анализа показаны на фиг. 1A, 1B, 1C и 1D. Минорные низкомолекулярные (LMW) полосы (~35кДа) наблюдали в SDS-PAGE в восстанавливающих условиях в F1 и F6 через 14 дней. В анализе SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях F1, F2, F6 и F7 также продемонстрировали минорные высокомолекулярные (HMW) полосы (~200кДа), не присутствовавшие ранее при T=0.

ОФ-ВЭЖХ анализ: табл. 8 и фиг. 1E показывают результаты ОФ-ВЭЖХ анализа. Никакого свободного SGD1010 (следовое расщепление лекарственного средства MMAE) не обнаружено методом ОФ-ВЭЖХ при t=0 для любой из композиций, однако через 14 дней при 40°C SGD1010 (от 0,17 до 1,59 мкМ) был отмечен и был несколько быстрее при более высоком рН для гистидиновых, чем для цитратных композиций, при этом гистидин/янтарная кислота работали несколько лучше, чем гистидин/фосфорная кислота и гистидин/HCl.

Таблица 8

Композиция #	Буфер	pH	Дигидрат трегалозы (%)	Сазароза (%)	Площадь	мкМ SGD1010		
F1	20мМ цитрата натрия /лимонная кислота	5,2	5,5	0	0	0,00		
					28	0,17		
F2	5,7	0			0,00			
		31			0,18			
F3	5,5	0			0,00			
		101			0,60			
F4	20мМ гистидина/HCl	6			0	0,00		
					127	0,76		
F5	6,5	0			0,00			
		136			0,81			
F6	20мМ цитрата натрия /лимонная кислота	5,2			0	5	0	0,00
							30	0,18
F7	5,7	0					0,00	
		34					0,20	
F8	5,5	0	0,00					
		96	0,57					
F9	20мМ гистидина/HCl	6	0	0,00				
			267	1,59				
F10	6,5	0	0,00					
		124	0,74					
F11	20мМ гистидина/ фосфорная кислота	5,5	5,5	0			0	0,00
							111	0,66
F12	6	0					0,00	
		135					0,80	
F13	20мМ гистидина/ янтарная кислота	5,5			0	0,00		
					89	0,53		
F14	6	0			0,00			
		106			0,63			

Эксклюзионная ВЭЖХ: Как показано в табл. 9 ниже и на фиг. 1F, 1G и 1H, повышающиеся уровни НМВ агрегатов были очевидны в эксклюзионной ВЭЖХ для всех композиций при pH 5,2-5,7, при этом цитратные композиции показали больше агрегатов, чем гистидин при соответствующем pH. При одинаковых pH цитрат показал больше агрегатов, чем гистидин. Гистидиновые композиции при pH 6,0 показали более высокую стабильность, чем композиции при pH 5,5 и при pH 6,5. Не было никакой разницы между трегалозой и сахарозой.



Композиция	Дней при 40°C	Главный пик времени удержания	% от общей интегрированной площади			Интегрированная площадь			Итого
			Пре-пики	Главный пик	Пост-пики	Пре-пики	Главный пик	Пост-пики	
1	0	19,5	1,8	96,5	1,7	83	4500	79	4661
	3	19,5	36,8	61,9	1,3	1812	3050	63	4924
	7	19,6	40,1	58,3	1,5	1953	2839	73	4866
	14	19,6	43,1	55,5	1,4	2095	2696	68	4858
2	0	19,5	1,8	96,6	1,6	93	4936	83	5112
	3	19,6	18,5	79,9	1,6	889	3832	77	4797
	7	19,6	24,3	74,0	1,7	1299	3949	90	5338
	14	19,6	29,4	68,6	1,9	1442	3363	95	4901
3	0	19,5	1,6	96,7	1,7	82	5078	89	5249
	3	19,5	5,0	90,8	4,2	253	4603	211	5067
	7	19,5	5,5	91,0	3,5	268	4463	171	4903
	14	19,5	6,5	91,0	2,5	311	4333	120	4764
4	0	19,5	1,7	96,5	1,8	81	4636	85	4802
	3	19,5	3,1	95,1	1,8	149	4571	87	4808
	7	19,5	3,9	93,9	2,2	201	4797	110	5108
	14	19,5	6,3	90,5	3,2	314	4536	162	5012
5	0	19,5	1,6	96,8	1,6	85	4991	82	5158
	3	19,5	3,5	94,6	1,9	167	4534	92	4793
	7	19,5	5,5	90,5	4,0	282	4622	206	5109
	14	19,5	6,3	91,4	2,3	308	4430	110	4847
6	0	19,5	2,2	95,8	2,0	97	4242	88	4427
	3	19,6	35,6	63,0	1,4	1754	3100	68	4921
	7	19,6	38,9	59,5	1,6	1908	2915	78	4902
	14	19,6	41,6	56,5	1,9	2047	2783	96	4926
7	0	19,5	1,8	96,7	1,6	89	4867	78	5034
	3	19,6	18,6	79,8	1,7	906	3895	81	4882
	7	19,6	24,2	74,2	1,7	1145	3515	78	4739
	14	19,6	28,5	69,6	1,9	1360	3318	90	4768
8	0	19,5	1,6	96,4	2,0	82	4968	104	5154
	3	19,5	3,9	94,1	1,9	184	4421	91	4696
	7	19,5	5,4	92,2	2,4	259	4388	113	4760
	14	19,5	6,7	90,8	2,5	322	4343	119	4785
9	0	19,6	1,2	96,5	2,3	60	4987	121	5168
	3	19,5	3,3	94,6	2,1	158	4504	98	4760
	7	19,5	4,2	93,6	2,3	209	4659	113	4981
	14	19,5	5,2	92,1	2,7	249	4408	130	4787
10	0	19,5	1,6	96,7	1,7	82	4914	85	5081
	3	19,5	3,4	94,8	1,9	155	4387	87	4629
	7	19,5	4,8	92,9	2,3	229	4466	111	4807
	14	19,5	5,9	91,5	2,6	276	4312	122	4710
11	0	19,5	1,6	96,8	1,6	82	4989	83	5154
	3	19,5	3,6	94,4	2,0	168	4415	93	4676
	7	19,5	5,3	92,5	2,2	250	4400	106	4756
	14	19,6	12,9	84,8	2,3	625	4107	111	4843
12	0	19,6	1,7	96,4	1,8	97	5340	101	5538
	3	19,5	3,3	94,7	1,9	159	4504	92	4755
	7	19,5	4,3	93,6	2,1	214	4637	104	4955
	14	19,5	6,3	89,7	4,0	319	4538	204	5060
13	0	19,5	1,9	96,7	1,7	93	4806	84	4969
	3	19,5	7,1	91,0	1,9	326	4184	86	4596
	7	19,5	9,8	88,1	2,1	456	4083	97	4636
	14	19,5	12,6	85,0	2,4	598	4041	114	4753
14	0	19,5	1,6	96,6	1,7	82	4834	86	5002
	3	19,5	4,5	93,6	1,9	204	4265	88	4557
	7	19,5	5,7	92,2	2,2	267	4342	102	4711
	14	19,5	6,9	89,7	3,3	349	4503	167	5018

Никаких существенных изменений не наблюдали между любыми из композиций как после 24 часов встряхивания при комнатной температуре, так и после одного, трех и десяти циклов замораживание-размораживание, как продемонстрировали анализы A330, SDS-PAGE и эксклюзионная ВЭЖХ (данные не показаны). Это гарантирует, что образцы исследуемых композиций можно объединять в разные моменты времени и хранить при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

На основании результатов, полученных из этого исследования, композиции F4, F9 и F14 были выбраны как оптимальные из 14 испытанных композиций и были поэтому выбраны в качестве 3 композиций для дальнейшей оценки в последующих испытаниях.

6.2 Пример 2. Испытание нерасфасованного лекарственного вещества (BDS) с замораживанием-размораживанием и встряхиванием.

Композиции F4, F9 и F14 были получены как описано в разделе 6.1 выше. Каждую из композиций F4, F9 и F14 подвергали 1, 3 и 10 циклам замораживания при  $-20^{\circ}\text{C}$  и  $-70^{\circ}\text{C}$  с последующим разморажи-

ванием при температуре между 20°C-25°C. Образцы анализировали путем визуального наблюдения, измерения концентрации (A280), определения мутности (A330), эксклюзионной ВЭЖХ, SDS-PAGE (R&NR). Для испытания с 10 циклами замораживание-размораживание образцы также анализировали методом ОФ-ВЭЖХ NPI.

Требования к веществам и схема анализа проб показаны в табл. 10 ниже:

Таблица 10					
Концентрация (мг/мл)	Условия	# флаконов	Объем наполнения	Общий объем наполнения	Общий белок (мг)
10	T=0	1	3,5	3,5	35
10	1 цикл Fz/Th при -20°C/25°C	1	1	1,0	10
10	3 цикла Fz/Th при -20°C/25°C	1	1	1,0	10
10	10 циклов Fz/Th при -20°C/25°C	1	1	1,0	10
10	1 цикл Fz/Th при -70°C/25°C	1	1	1,0	10
10	3 цикла Fz/Th при -70°C/25°C	1	1	1,0	10
10	10 циклов Fz/Th при -70°C/25°C	1	1	1,0	10
10	Встряхивание при комн. темп. в течение 24 часов	1	3,5	3,5	35
# конц. белка для испытания	# буферов для испытания	Общее # флаконов	Общий объем наполнения (мл)	Белок в флаконах (мг)	Требуемое количество белка (мг)
1	3	24	39	390	468

Примечание:

флаконы: 5-мл стерильные поликарбонатные флаконы с закручивающимся колпачком (Nalgene 5-ml, #3500-05).

BDS Fz/Th: 1 мл наполнения в 5-мл поликарбонатном флаконе.

BDS встряхивание: 3,5 мл наполнения в 5-мл поликарбонатном флаконе.

Табл. 11 ниже представляет анализы и моменты времени.

Таблица 11

Аналитический анализ	T=0	1X Fz/Th при 70°C /25°C	3X Fz/Th при 70°C /25°C	10X Fz/Th при 70°C /25°C	1X Fz/Th при -20°C /25°C	3X Fz/Th при 20°C /25°C	10X Fz/Th при 20°C /25°C	Встряхивание при комн. темп. в течение 24 часов
pH	X							
Осмоляльность	X							
Внешний вид	X	X	X	X	X	X	X	X
A280	X	X	X	X	X	X	X	X
Мутность (A330)	X	X	X	X	X	X	X	X
Non-SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях	X	X	X	X	X	X	X	X
SDS-PAGE в восстанавливающих условиях	X	X	X	X	X	X	X	X
экслюзионная ВЭЖХ	X	X	X	X	X	X	X	X
ОФ-ВЭЖХ-NP	X	X	X	X	X	X	X	X
ИАС	X							X
Эффективность & CIEF		Предоставить образцы для испытания						

Испытание со взбалтыванием при комнатной температуре в течение 24 часов также осуществляли для каждой композиции и все испытываемые образцы анализировали на внешний вид, концентрацию (A280), мутность (A330), методом экслюзионной ВЭЖХ и ИАС.

Выбранные образцы из описанного выше исследования также использовали для исследований iCIEF и активности.

Распределение по флаконам и укупоривание композиции, план испытания взбалтыванием, план испытания замораживанием-размораживанием и стандарт композиции описаны ниже.

Распределение по флаконам и укупоривание композиции.

Стерильную фильтрацию и наполнение осуществляли в вытяжном шкафу с ламинарным потоком воздуха Baker SG600. Композиции и плацебо подвергали стерильной фильтрации асептическим методом (0,22 мкм PVDF шприцевые фильтры Millipore Millex-GV, # SLGV033RS). Отфильтрованный AGS-22M6E и отфильтрованные буферы для композиции (плацебо) переносили в стерильные поликарбонатные флаконы с закручивающимся колпачком (Nalgene 5-мл, #3500-05) с использованием 5-мл электронной пипетки со стерильными наконечниками.

План испытания взбалтыванием.

Один флакон на композицию помещали вертикально в стандартный морозильный бокс. Бокс затем соединяли с IKA-VIBRAMAX-VXR орбитальным шейкером, установленным при 500 об/мин при комнатной температуре в течение 24 часов. Затем образцы извлекали и хранили при 70°C до использования в анализе. Набор из 3 аликвот каждого образца (70 мкл аликвоты для каждого образца) замораживали при -70°C после фильтрования через 0,22 мкм фильтр. После аналитического испытания любое оставшееся вещество хранили при 2-8°C в течение ночи, если было необходимо повторное испытание. После завершения всех анализов оставшиеся вещества хранили при -70°C. Две замороженные аликвоты использовали для анализов CIEF и активности.

План испытания стабильности при замораживании-размораживании (-70°C и -20°C).

1 флакон на композицию (наполнение 1 мл в 5-мл поликарбонатном флаконе) помещали вертикаль-

но в  $-70^{\circ}\text{C}$  и  $-20^{\circ}\text{C}$  морозильник на по меньшей мере 4 часа, что обеспечивало возможность замораживания. Для размораживания каждый флакон извлекали из условий хранения и размораживали при комнатной температуре ( $20-25^{\circ}\text{C}$ ) до тех пор, пока больше не оставалось льда, затем флакон осторожно взбалтывали. Это составляло один полный цикл замораживание-размораживание. Осуществляли десять циклов замораживание-размораживание для каждого флакона с образцом испытываемой композиции. После конечного цикла замораживание-размораживание все образцы оценивали в аналитическом испытании. Образцы анализировали следующим образом: Внешний вид, A280/A248, Мутность (A330), Эксклюзионная ВЭЖХ, ОФ-ВЭЖХ-NPI и SDS-PAGE (R & NR). Набор из 3 аликвот каждого образца (70 мкл аликвоты для каждого образца) замораживали при  $-70^{\circ}\text{C}$  после фильтрования через 0,22 мкм фильтр. После аналитического испытания любое оставшееся вещество хранили при  $2-8^{\circ}\text{C}$  в течение ночи, если было необходимо повторное испытание. После завершения всех анализов оставшиеся вещества хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Две замороженные аликвоты использовали для анализов cIEF и активности.

Стандарт композиции.

15 мл AGS-22M6E исходного вещества при 12,8 мг/мл в 5,0% сахарозы, 0,02% Tween 20, pH 6,0 брали и разделяли на аликвоты при 500 мкл/флакон, затем хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$  как стандарт композиции для этого исследования.

Результаты.

Внешний вид: внешний вид всех образцов анализировали в этом испытании и отсутствие мелких твердых частиц наблюдали даже при встряхивании.

A280 и A330 анализ: A280 и A330 данные для композиций, подвергаемых различным условиям в этом испытании, представлены в табл. 12 ниже. Как показано, не было никаких изменений концентрации белка как в условиях встряхивания, так и замораживания-размораживания. Кроме того, не было никакого повышения мутности после замораживания-размораживания или встряхивания.

Таблица 12

Момент времени	Композиция	Фактор разведения	A330	A280	A280 (с вычетом Плацебо A280)	Конц.(мг/мл)	A330 неразведенный
T=0, BDS	4	20	0,012	0,741	0,728	<b>10,01</b>	0,083
	9	20	0,021	0,811	0,795	<b>10,94</b>	0,091
	14	20	0,004	0,820	0,789	<b>10,86</b>	0,103
Встряхивание	4	20	0,011	0,749	0,736	<b>10,12</b>	0,089
	9	20	0,027	0,827	0,811	<b>11,16</b>	0,960
	14	20	0,001	0,820	0,789	<b>10,86</b>	0,107
1X -20C FzTh	4	20	0,006	0,765	0,752	<b>10,34</b>	0,097
	9	20	0,026	0,812	0,796	<b>10,96</b>	0,098
	14	20	0,005	0,823	0,792	<b>10,90</b>	0,112
3X -20C FzTh	4	20	0,003	0,779	0,766	<b>10,54</b>	0,096
	9	20	0,030	0,819	0,803	<b>11,05</b>	0,098
	14	20	0,003	0,821	0,790	<b>10,87</b>	0,108
10X -20C FzTh	4	20	0,001	0,783	0,770	<b>10,59</b>	0,097
	9	20	0,031	0,822	0,806	<b>11,08</b>	0,109
	14	20	0,008	0,818	0,787	<b>10,83</b>	0,128
1X -70C FzTh	4	20	0,002	0,780	0,767	<b>10,55</b>	0,114
	9	20	0,028	0,839	0,823	<b>11,32</b>	0,120
	14	20	0,001	0,816	0,785	<b>10,80</b>	0,108
3X -70C FzTh	4	20	0,004	0,789	0,776	<b>10,67</b>	0,095
	9	20	0,031	0,846	0,830	<b>11,42</b>	0,097
	14	20	0,003	0,830	0,799	<b>11,00</b>	0,107
10X -70C FzTh	4	20	0,006	0,797	0,784	<b>10,78</b>	0,091
	9	20	0,031	0,833	0,817	<b>11,24</b>	0,090
	14	20	0,002	0,827	0,796	<b>10,95</b>	0,093

SDS-PAGE анализ: результаты SDS-PAGE анализа показаны на фиг. 2A и 2B. Как показано, нет ни-

каких изменений, наблюдаемых в SDS-PAGE, в образцах для испытания встряхиванием и в образцах для испытания замораживанием-размораживанием. Оба восстанавливающий и невосстанавливающий гели сопоставимы со стандартом композиции.

ОФ-ВЭЖХ анализ: для образцов после 10 циклов замораживания-размораживания осуществляли ОФ-ВЭЖХ анализ. Никакого SGD1010 пика не наблюдали ни в какой из композиций, анализируемых методом ОФ-ВЭЖХ (данные не показаны).

Анализ эксклюзионной ВЭЖХ: результаты анализа эксклюзионной ВЭЖХ представлены в табл. 13 ниже. Как показано, не было никакой разницы между T0 и образцами после встряхивания или замораживания-размораживания для любой из трех композиций (F4, F9 и 14) или плацебо.

Таблица 13

Название образца	Условия	% от общей интегрированной площади				Интегрированная площадь			
		Главный пик Время удерживания	Пики перед главным пиком	Главный пик	Пики после главного пика	Пики перед главным пиком	Главный пик	Пики после главного пика	Итого
F4, BDS	T0	19,6	1,3	95,7	3,0	66	4955	154	5175
	Встряхивание 24ч при комн. темп.	19,5	1,2	96,2	2,6	64	4937	134	5134
	1 F/T -20°C	19,6	1,2	95,9	2,9	63	4913	150	5125
	3 F/T -20°C	19,5	1,2	96,1	2,7	63	4960	138	5161
	10 F/T -20°C	19,5	1,2	96,3	2,4	64	4935	125	5123
	1 F/T -70°C	19,6	1,2	96,0	2,7	63	4929	141	5132
	3 F/T -70°C	19,5	1,2	96,2	2,5	64	5006	132	5202

	10 F/T -70°C	19,6	1,3	95,9	2,8	68	4981	143	5192
F9, BDS	T0	19,6	1,3	95,6	3,1	66	5002	164	5232
	Встряхивание 24ч при комн. темп.	19,6	1,3	96,4	2,3	65	4980	120	5164
	1 F/T -20°C	19,5	1,3	95,8	2,9	71	5007	152	5229
	3 F/T -20 °C	19,5	1,2	96,5	2,3	63	4997	119	5179
	10 F/T -20 оC	19,6	1,2	96,1	2,7	64	4944	137	5145
	1 F/T -70 °C	19,6	1,3	96,3	2,4	64	4918	125	5107
	3 F/T -70 °C	19,5	1,2	96,3	2,5	63	4978	127	5168
	10 F/T -70 °C	19,5	1,2	96,1	2,6	65	4996	136	5197
F14, BDS	T0	19,6	1,3	95,7	3,0	72	5190	161	5423
	Встряхивание 24ч при комн. темп.	19,6	1,3	96,1	2,6	67	5052	138	5256
	1 F/T -20°C	19,6	1,4	95,7	2,9	74	5090	154	5319
	3 F/T -20°C	19,5	1,2	96,1	2,7	65	5047	142	5254
	10 F/T -20°C	19,6	1,3	96,3	2,4	66	5028	127	5221
	1 F/T -70°C	19,6	1,2	96,4	2,4	66	5106	125	5297
	3 F/T -70 °C	19,5	1,2	96,3	2,4	65	5075	129	5269
	10 F/T -70 °C	19,6	1,3	95,5	3,2	71	5096	169	5336

SEC профили, полученные для каждой из BDS композиций при каждом из условий испытания, были проанализированы (данные не показаны). Не было никакой разницы для любой из композиций при

любом условии по сравнению с BDS при T=0.

Табл. 14 ниже представляет ИАС данные для BDS образцов для каждой из 3 испытанных композиций. Сравнение результатов для образцов до и после встряхивания при комнатной температуре в течение 24 часов показывает, что меньше чем 100 частиц были в пределах от 10 мкм до 25 мкм, при этом меньше 2 частиц были в пределах 25 мкм для всех композиций.

Таблица 14

			Среднее значение от 3 экспериментов определения общего кумулятивного количества частиц/мл							
			Размер (мкм)							
Условие	Название образца	Композиция	2	5	7,5	10	15	20	25	
Без встряхивания	Плацебо	4	47	10	7	5	5	3	2	
		9	73	30	17	8	5	2	0	
		14	73	17	12	10	3	0	0	
	AGS22 M6E	4	382	77	32	15	2	2	0	
		9	135	45	28	18	7	0	0	
		14	365	138	68	47	15	3	2	
	Плацебо	4	298	127	78	47	23	3	0	
		9	365	155	88	60	13	2	0	
	Встряхивание при ком. темп.  в течение 24 часов		14	407	118	47	25	5	0	0
			4	368	127	62	42	18	5	2
		AGS22 M6E	9	557	192	108	73	20	3	2
			14	967	333	165	97	32	12	2

Композиции F9 и F14 показали слегка повышенное кумулятивное количество после взбалтывания, при этом F4 показала сопоставимые результаты до и после взбалтывания, как показано на фиг. 2С (все количества для частиц 10 и 25 мкм ниже предела USP).

В целом, результаты продемонстрировали, что все три BDS испытанные композиции показали отличную стабильность после циклов замораживания-размораживания и после взбалтывания, и никаких изменений наблюдали ни в одном из образцов по сравнению с T=0 при использовании любого из аналитических методов.

### 6.3 Пример 3. Одновременное испытание BDS и композиции лекарственного продукта (DP).

Это испытание осуществляли вместе с испытанием, описанным в разделе 6.2 выше. Формулирование композиций и материалы, используемые для этого испытания, такие же, как описано в разделе 6.2.

Необходимые материалы и схема анализа проб показаны в таблице ниже.

Таблица 15

Концентрация (мг/мл)	Условие	# флаконов	Объем наполнения	Общий объем наполнения	Общий белок (мг)	Всего мл на композицию	Всего мг на композицию
10	BDS при 2-8°C	5	1	5,0	50		
10	BDS при -70°C	6	1	6,0	60		
10	DP при 2-8°C	8	5	40,0	400		
10	DP при 25°C /60%RH	6	5	30,0	300		
10	DP при 40°C /75%RH	6	5	30,0	300	111	1110
# конц. белка для испытания	# буферов для испытания	Общее # флаконов	Общий объем наполнения (мл)	Белок флаконах (mg)	Требуемое количество белка (мг)		
1	3	93	333	3330	3996		

Моменты времени и анализы описаны в таблице ниже.

Таблица 16

Аналитический Анализ	До лиофилизации	T=0	T=2 нед.	T=4 нед.	T=8 нед.	T=12 нед.
	T=0,1	1-июнь-10	15-июнь-10	29-июнь-10	27-июль-10	24-август-10
pH	X	X				



Осмоляльность	X	X				
Внешний вид (до восстановления)		X	X	X	X	X
Внешний вид (BDS или После восстановления)	X	X	X	X	X	X
Время восстановления (DP только)		X	X	X	X	X
A280	X	X	X	X	X	X
Мутность (A330)	X	X	X	X	X	X
SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях	X	X	X	X	X	X
SDS-PAGE в восстанавливающих условиях	X	X	X	X	X	X
эксклюзионная ВЭЖХ	X	X	X	X	X	X
ОФ-ВЭЖХ-NPI	X	X	X	X	X	X
Остаточная влага (DP только)		X				X
Эффективность & CIEF*	Предоставить образцы для испытания					

Примечание: образцы для испытания жидкой формы замораживали при  $-70^{\circ}\text{C}$  до получения лиофилизированных образцов. Замороженные жидкие образцы затем помещали в условия одновременно с лиофилизированными образцами, чтобы  $t=0$  было одинаковым для жидких и лиофилизированных испытываемых образцов.

Конкретные параметры циклов лиофилизации описаны в таблице ниже. После лиофилизации флаконы закупоривали в вакууме при 50 мТ.

Таблица 17

Стадия #	Стадия	Температура или скорость изменения	Время (мин)	Давление (мТорр)
1	Нагрузка/Уравновешивание	5°C	60	
2	Изменение от 5°C до 0°C	0,5°C/мин	10	
3	Удерживание	0°C	60	
4	Изменение от 0°C до -45°C	1°C/мин	45	
5	Удерживание	-45°C	840	
6	Создание вакуума	-45°C	60	50
7	Изменение от -45°C до -15°C	0,3°C/мин	100	50
8	Удерживание	-15°C	5040	50
9	Изменение от -15°C до 35 °C	0,2°C/мин	250	50
10	Удерживание	35°C	360	50
11	Изменение от 35°C до 5°C	0,5°C/мин	60	50
12	Удерживание	5°C удерживание	60	50

План испытания стабильности жидких композиций при 2-8°C и -70°C.

Флаконы с композициями и плацебо помещали вертикально в морозильник, установленный на -70°C, и инкубатор, установленный на 2-8°C. В каждый момент времени один флакон с активным веществом и один флакон с плацебо для каждой композиции извлекали из условий хранения в соответствии со схемой анализа проб для аналитического испытания. После аналитического испытания любое оставшееся вещество хранили при 2-8°C, если было необходимо повторное испытание. Аликвоты хранили при -70°C и использовали для испытания cIEF и активности.

План испытания стабильности жидких композиций при 2-8°C, 25°C и 40°C.

Флаконы с композициями и плацебо помещали вертикально в инкубатор, установленный на 2-8°C, инкубатор установленный на 25°C/60%RH, и инкубатор установленный на 40°C/75%RH. В каждый момент времени один флакон с активным веществом и один флакон с плацебо для каждой композиции извлекали из условий хранения в соответствии со схемой анализа проб для аналитического испытания. После аналитического испытания любое оставшееся вещество хранили при 2-8°C, если было необходимо повторное испытание. Аликвоты хранили при -70°C и использовали для испытания cIEF и активности.

Стандарт композиции, используемый в этом испытании, является таким же, как в разделе 6.2 выше.

Анализ цикла лиофилизации: типичный цикл лиофилизации включает стадии замораживания, первичной сушки и вторичной сушки. Во время процесса замораживания и сушки за сублимацией льда можно следить по нескольким отдельным индикаторам, таким как показания датчиков термпар, помещенных во флаконы с образцами плацебо, расхождение и последующее совпадение показаний емкостного манометра и манометра Пирани, и измерение "точки росы", которое отслеживает изменение относительной влажности в свободном пространстве камеры.

Сравнивая среднюю температуру термпары продукта, разницу показаний емкостного манометра/датчика Пирани и профиль точки росы, можно продемонстрировать, что каждый из них хорошо коррелирует с другими.

Стабильность BDS композиций: стабильность BDS композиции при условиях хранения при 2-8°C и -70°C и при 2-8°C, 25°C и 40°C оценивали при T=0, в моменты времени неделя 2, 4, 8 и 12. Жидкие и восстановленные лиофилизованные образцы анализировали на концентрацию (A280), мутность (A330), методами эксклюзионной ВЭЖХ, SDS-PAGE (R и NR) и ОФ-ВЭЖХ NPI в каждый момент времени. Для лиофилизованного лекарственного продукта (DP) осмоляльность измеряли до лиофилизации и после восстановления при t=0 только; внешний вид лепешки и время восстановления измеряли в каждый момент времени; и осуществляли определение методом Карла Фишера (остаточной влаги) при T=0 и T=12 недель только.

Внешний вид и время восстановления: Образования лепешек для всех трех композиций были сопоставимыми. Как активные вещества, так и плацебо для всех трех композиций образовывали белые слегка растрескавшиеся лепешки с глянцевой поверхностью. Все сохраняли интактную структуру. Не было никакой разницы между активными веществами и плацебо. Не было никакой разницы между этими композициями. Для всех композиций, которые хранили в разных условиях в течение 2, 4, 8 и 12 недель, внешний вид лепешки был одинаковым до T=0, как показано в таблице ниже.

Таблица 18

	Композиция	Концентрация белка мг/мл	Внешний вид лепешки	Время восстановления (секунды)^			Внешний вид
				40°C	25°C	2-8°C	
2 недели	4	10	Белая лепешка, слегка растрескавшаяся, глянцевої поверхностью	23	19	21	Прозрачная, бесцветная, отсутствие мелких твердых частиц
	9	10		17	21	25	
	14	10		21	22	22	
	4	Плацебо	22				
	9		21				
	14		22				
4 недели	4	10	Белая лепешка, слегка растрескавшаяся, глянцевої поверхностью	29	25	23	Прозрачная, бесцветная, отсутствие мелких твердых частиц
	9	10		17	23	21	
	14	10		20	21	27	
	4	Плацебо	29				
	9		26				
	14		20				
8 недель	4	10	Белая лепешка, слегка растрескавшаяся, глянцевої поверхностью	25	28	29	Прозрачная, бесцветная, отсутствие мелких твердых частиц
	9	10		25	23	31	
	14	10		24	22	33	
	4	Плацебо	28				
	9		22				
	14		19				
12 недель	4	10	Белая лепешка, слегка растрескавшаяся, глянцевої поверхностью	22	28	24	Прозрачная, бесцветная, отсутствие мелких твердых частиц
	9	10		20	22	27	
	14	10		23	25	23	
	4	Плацебо	28				
	9		20				
	14		28				

Анализ влаги: после лиофилизации один флакон с активным веществом и один флакон с плацебо из каждой композиции брали для определения остаточной влаги. Как показано в таблице ниже и на фиг. 3А, содержание остаточной влаги для композиций активных веществ и плацебо F4 и F14 было очень схожим, от 0,24 до 0,70%. F9 имела более высокое содержание остаточной влаги в каждый момент времени по сравнению с F4 и F14.

Таблица 19

		% остаточной влаги				SD			
		t=0	t=12 нед.; 2-8°C	t=12 нед.; 25°C	t=12 нед.; 40°C	T=0	2-8°C	25°C	40°C
Активное вещество	F4	0,24	0,25	0,42	0,54	0,03	0,01	0,02	0,03
	F9	0,76	0,55	0,61	0,75	0,02	0,00	0,02	0,02
	F14	0,24	0,24	0,29	0,55	0,01	0,02	0,01	0,01
Плацебо	F4	0,29	0,28	0,56	0,70	0,01	0,02	0,02	0,01
	F9	0,77	0,73	1,15	1,14	0,01	0,03	0,01	0,02
	F14	0,21	0,22	0,44	0,69	0,01	0,02	0,01	0,01

Результаты представляют собой среднее значение от трех определений на 1 флакон.

После того, как образцы инкубировали в различных условиях в течение 12 недель, остаточную влажность для каждой композиции снова определяли как для активных веществ, так и для плацебо. Остаточная влажность для всех трех композиций, хранящихся при 2-8°C в течение 12 недель, была аналогичной t=0. F4 и F14 имели повышенную влажность по сравнению с t=0 после хранения при 25°C и 40°C в течение 12 недель.

Для всех тестируемых временных точек после восстановления с использованием 4,7 мл WFI все восстановленные композиции и плацебо были бесцветными и прозрачными. Никаких видимых частиц не наблюдалось. Образцы BDS, хранящиеся при всех условиях во все моменты времени, также были прозрачными и бесцветными. Никаких видимых частиц не наблюдалось.

A280 и анализ осмоляльности: перед заполнением и лиофилизацией концентрации белка в композициях проверяли в двух повторах, и было найдено, что они находятся в пределах  $\pm 1$  мг/мл от целевой концентрации 10 мг/мл. После восстановления с использованием 4,7 мл WFI концентрации белка в композициях были в пределах  $\pm 1$  мг/мл BDS до лиофилизации (см. табл. 20 ниже, BDS, t=0). Осмоляльность полученных образцов и буфера также проверяли в двух повторах перед заполнением и после восстановления. Осмоляльность до лиофилизации и после восстановления составляла от 187 до 194 мОсм/кг.

Результаты определения концентрации белка в образцах BDS и DP, хранящихся в различных условиях, показаны в табл. 20 ниже и на фиг. 3В. При большинстве условий не было изменений в концентрации белка. Однако образцы BDS, хранящиеся при 2-8°C, показали неожиданное увеличение концентрации белка. Возможны две причины: 1) конденсат, присутствующий во флаконах, может не полностью исчезнуть после переворачивания. Хотя были предприняты усилия для улавливания всего конденсата с боковых стенок флаконов, некоторое количество конденсата могло остаться в крышке флакона; 2) некоторое испарение образца может произойти, если флакон имеет дефектную резьбу, хотя эта проблема не наблюдалась в предыдущем испытании, в котором эти флаконы заполняли 4 мл лекарственного вещества и хранили при 2-8°C в течение 12 недель.

(Данные 12-недельного одновременного испытания BDS и DP композиции A280 и концентрации)

		A280					Концентрация (мг/мл)					
		BDS - Недели при -70°C										
Композиция	0	2	4	8	12	0	2	4	8	12		
4	0,757	0,737	0,735	0,740	0,727	10,4	10,1	10,1	10,2	10,0		
9	0,735	0,725	0,749	0,727	0,736	10,1	10,0	10,3	10,0	10,1		
14	0,743	0,740	0,746	0,764	0,742	10,2	10,2	10,3	10,5	10,2		
		BDS - Недели при 2-8°C										
Композиция	0	2	4	8	12	0	2	4	8	12		
4	0,757	0,749	0,763	0,801	0,812	10,4	10,3	10,5	11,0	11,2		
9	0,735	0,748	0,776	0,817	0,918	10,1	10,3	10,7	11,2	12,6		
14	0,743	0,759	0,778	0,823	0,824	10,2	10,4	10,7	11,3	11,3		
		A280					Концентрация (мг/мл)					
		Лиофил. DP - Недели при 2-8°C										
Композиция	0	0,1	2	4	8	12	0	0,1	2	4	8	12
4	0,757	0,757	0,745	0,778	0,773	0,747	10,4	10,4	10,2	10,7	10,6	10,3
9	0,735	0,769	0,743	0,777	0,782	0,769	10,1	10,6	10,2	10,7	10,8	10,6
14	0,743	0,800	0,766	0,815	0,751	0,769	10,2	11,0	10,5	11,2	10,3	10,6
		Лиофил. DP - Недели при 25°C										
Композиция	0	0,1	2	4	8	12	0	0,1	2	4	8	12
4	0,757	0,757	0,751	0,765	0,761	0,751	10,4	10,4	10,3	10,5	10,5	10,3
9	0,735	0,769	0,751	0,778	0,768	0,774	10,1	10,6	10,3	10,7	10,6	10,6

14	0,743	0,800	0,743	0,784	0,770	0,765	10,2	11,0	10,2	10,8	10,6	10,5
<b>Лиофил. DP - Недели при 40°C</b>												
<b>Композиция</b>	<b>0</b>	<b>0,1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>0,1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>12</b>
4	0,757	0,757	0,746	0,766	0,758	0,736	10,4	10,4	10,3	10,5	10,4	10,1
9	0,735	0,769	0,750	0,776	0,763	0,766	10,1	10,6	10,3	10,7	10,5	10,5
14	0,743	0,800	0,772	0,807	0,771	0,755	10,2	11,0	10,6	11,1	10,6	10,4

Таблица 21

(Данные 12-недельного одновременного испытания осмоляльности BDS и DP композиций)

	Композиция	Показание 1	Показание 2	Среднее значение	Плацебо
T=0, лиофил.	4	193	194	194	191
	9	197	195	196	192
	14	193	194	194	186
T=0, BDS	4	189	190	190	188
	9	189	190	190	186
	14	188	186	187	180

A330 анализ: A330 измерения флаконов как с BDS и DP восстановленным активным веществом, так и с плацебо показаны в табл. 22 ниже и на фиг. 3С. A330 значение для флакона с активным веществом было несколько выше, чем для плацебо, указывая на то, что AGS-22МБЕ белок способствует появлению мутности композиции. Не было никакого существенного повышения мутности как для образцов активного вещества, так и плацебо, хранимых при всех условиях.

Таблица 22

BDS - недели при -70°C					
Композиция	0	2	4	8	12
4	0.083	0.085	0.084	0.101	0.091
9	0.091	0.090	0.085	0.096	0.086
14	0.103	0.094	0.097	0.104	0.103
4 Плацебо	0.009				
9 Плацебо	0.010				
14 Плацебо	0.010				

BDS - недели при 2-8°C					
Композиция	0	2	4	8	12
4	0.083	0.088	0.082	0.104	0.111
9	0.091	0.090	0.091	0.103	0.114
14	0.103	0.099	0.095	0.111	0.112
4 Плацебо	0.009	0.005	0.004	0.017	0.008
9 Плацебо	0.010	0.009	0.005	0.018	0.015
14 Плацебо	0.010	0.005	0.002	0.022	0.011

Lyо DP - недели при 2-8°C						
Композиция	0	0,1	2	4	8	12
4	0.083	0.104	0.109	0.107	0.128	0.124
9	0.091	0.104	0.105	0.104	0.111	0.117
14	0.103	0.114	0.120	0.116	0.130	0.120
4 Плацебо	0.009	0.009				
9 Плацебо	0.010	0.030				
14 Плацебо	0.010	0.020				

Lyо DP - недели при 25°C						
Композиция	0	0,1	2	4	8	12
4	0.083	0.104	0.108	0.103	0.107	0.120
9	0.091	0.104	0.111	0.104	0.105	0.116
14	0.103	0.114	0.117	0.105	0.124	0.119
4 Плацебо	0.009	0.009				
9 Плацебо	0.010	0.030				
14 Плацебо	0.010	0.020				

Lyо DP - недели при 40°C						
Композиция	0	0,1	2	4	8	12
4	0.083	0.104	0.114	0.101	0.109	0.119
9	0.091	0.104	0.110	0.103	0.107	0.109
14	0.103	0.114	0.109	0.105	0.149	0.118
4 Плацебо	0.009	0.009	0.012	0.008	0.015	0.016
9 Плацебо	0.010	0.030	0.013	0.013	0.020	0.017
14 Плацебо	0.010	0.020	0.007	0.009	0.014	0.014

0 нед. означает до лиофилизации (lyo) (BDS t=0)  
0,1 нед. означает после лиофилизации (ранее обозначалось как t=0 lyo)

SDS-PAGE анализ: фиг. 3D и 3E показывают SDS-PAGE анализ для BDS T=0 (до лиофилизации) и образцы при 2-8°C и -70°C условиях хранения T=12 недель. Фиг. 3F, 3G, 3H показывают SDS-PAGE анализ для DP при T=0 и T=12 недель образцов при условиях хранения 2-8°C, 25°C и 40°C. Никаких очевидных изменений не наблюдали для всех композиций после 12 недель хранения при всех условиях.

ОФ-ВЭЖХ анализ: все из BDS и DP образцов в этом исследовании также испытывали методом ОФ-ВЭЖХ NP1. Никакого SGD1010 пика не наблюдали ни в одной из композиций при любых условиях (данные не показаны). Для всех контролей, анализируемых в каждый момент времени, степени извлечения SGD1010 в стандарте композиции составляли около 100%. В моменты времени T=4 недели, 8 недель и 12

недель, хотя новое разведение из 10 мМ исходного раствора SGD1010 использовали со свежеприготовленным разбавителем, пик SGD1010 расщеплялся, а SGD1010, добавленный в стандарт композиции, не расщеплялся (данные не показаны). Это было устойчивым на протяжении всей последовательности (данные не показаны). В расчетном извлечении использовали объединенную площадь расщепленных пиков.

Эксклюзионная ВЭЖХ: табл. 23 ниже представляет данные эксклюзионной ВЭЖХ для стандарта композиции в каждый момент времени для этого исследования. Данные показывают уровень вариации в процентах главного пика и пиков после главного пика в разных экспериментах для одного и того же образца.

Таблица 23

Стандарт композиции		% от общей интегрированной площади				Интегрированная площадь			
Недели	Инъекция	Главный пик Время удерживания	Пики перед главным пиком	Главный пик	Пики после главного пика	Пики перед главным пиком	Главный пик	Пики после главного пика	Итого
0 нед.	1	19,6	1,3	95,8	2,9	423	30906	924	32253
	2	19,6	1,3	95,8	2,9	404	30758	934	32096
	3	19,5	1,3	96,0	2,7	410	30915	876	32200
	средн.	19,5	1,3	95,9	2,8	412	30860	911	32183

	% CV	0,0	2,2	0,1	3,5	2,4	0,3	3,4	0,2
2 нед.	1	20,7	1,2	95,7	3,1	422	32516	1047	33986
	2	19,8	1,2	95,7	3,0	403	31099	986	32488
	3	19,7	1,2	95,7	3,1	405	31201	1007	32613
	средн.	19,7	1,2	95,7	3,1	410	31606	1013	33029
	% CV	0,0	0,1	0,0	1,0	2,6	2,5	3,1	2,5
4 нед.	1	19,8	1,2	95,3	3,6	379	30322	1133	31834
	2	19,8	1,2	95,4	3,4	382	30449	1100	31931
	3	19,8	1,2	95,5	3,3	400	30918	1066	32384
	средн.	19,8	1,2	95,4	3,4	387	30563	1100	32050
	% CV	0,0	2,0	0,1	3,9	3,0	1,0	3,0	0,9
8 нед.	1	20,2	1,2	95,5	3,3	411	31427	1074	32911
	2	20,2	1,2	95,6	3,1	407	31417	1033	32857
	3	20,1	1,3	95,7	3,0	417	31657	999	33073
	средн.	20,2	1,2	95,6	3,1	412	31500	1035	32947
	% CV	0,1	0,8	0,1	3,9	1,2	0,4	3,6	0,3
всего	средн.	19,9	1,2	<b>95,6</b>	3,1	405	31132	1015	32552
	станд. откл.	0,3	0,0	0,21	0,2	13,8	585,6	76,3	596,1
	% CV	1,7	2,6	<b>0,22</b>	7,7	3,4	1,9	7,5	1,8

**% от общей  
интегрированной  
площади**

**Интегрированная площадь**

Образец	Недели	Главный пик Время удерживания	Пики перед главным пиком	Главный пик	Пики после главного пика	Пики перед главным пиком	Главный пик	Пики после главного пика	Итого
Стандарт композиции	0	19,5	1,3	95,9	2,8	412,1	30859,	911,3	32183
	2	19,7	1,2	95,7	3,1	409,9	31605,	1013,4	33029
	4	19,8	1,2	95,4	3,4	386,7	30562,	1100,0	32050
	8	20,2	1,2	95,6	3,1	411,6	31500,	1035,2	32947
Среднее значение	12	19,4	1,2	95,1	3,6	384,5	29485,9	1125,2	30996

Таблица 24 ниже представляет данные эксклюзивной ВЭЖХ, представляющие процент НМВ пи-



ков, главного пика и LMW пиков для BDS образцов, хранимых в условиях 2-8°C и -70°C в течение 12 недель (данные не показаны). Изменения процентов главного пика и пиков после главного пика в различных моментах времени были очень схожими с изменениями, наблюдаемыми в стандарте композиции (данные не показаны). Поэтому можно сделать вывод, что никаких серьезных изменений не происходит, и что все 3 композиции были стабильными через 12 недель при 2-8° и -70°C в жидкой форме. Никакой существенной разницы между композициями не наблюдали.

Таблица 24

Название образца	Недели при 2-8 °C	Главный пик Время удерживания	% от общей интегрированной площади			Интегрированная площадь			
			Пики перед главным пиком	Главный пик	Пики после главного пика	Пики перед главным пиком	Главный пик	Пики после главного пика	Итого
F4	0	19,6	1,3	95,9	2,9	412	31291	940	32642
	2	19,7	1,3	95,6	3,1	445	32429	1056	33930
	4	19,8	1,3	95,4	3,3	425	32200	1119	33744
	8	20,2	1,3	95,9	2,8	479	35060	1032	36571
	12	19,4	1,3	95,3	3,4	449	33754	1216	35419
F9	0	19,6	1,3	95,9	2,8	413	31522	932	32866
	2	19,7	1,3	95,6	3,1	433	32137	1037	33607
	4	19,8	1,3	95,5	3,2	438	32540	1100	34078

	8	20,1	1,3	95,9	2,8	493	35546	1044	37082
	12	19,4	1,3	95,4	3,3	494	36686	1285	38465
F14	0	19,6	1,3	95,8	2,9	439	32730	981	34150
	2	19,7	1,3	95,6	3,1	444	31954	1021	33418
	4	19,8	1,3	95,5	3,2	461	33355	1120	34936
	8	20,1	1,4	95,9	2,8	503	35252	1013	36768
	12	19,4	1,3	95,5	3,2	473	34069	1125	35667
			<b>% от общей интегрированной площади</b>			<b>Интегрированная площадь</b>			
<b>Название образца</b>	<b>Недел и при 70 °С</b>	<b>Главны й пик Время удержив ания</b>	<b>Пики перед главн ым пиком</b>	<b>Главн ый пик</b>	<b>Пики после главног о пика</b>	<b>Пики перед главн ым пиком</b>	<b>Главн ый пик</b>	<b>Пики после главног о пика</b>	<b>Итого</b>
F4	0	19,6	1,3	95,9	2,9	412	31291	940	32642
	2	19,7	1,3	95,5	3,2	434	31610	1069	33112
	4	19,8	1,3	95,4	3,3	427	31179	1070	32677
	8	20,1	1,3	95,9	2,8	439	31922	941	33302
	12	19,4	1,3	95,4	3,3	396	29995	1041	31432
F9	0	19,6	1,3	95,9	2,8	413	31522	932	32866
	2	19,7	1,3	95,6	3,1	429	31119	1019	32567
	4	19,8	1,3	95,4	3,3	426	31384	1079	32889
	8	20,1	1,3	95,9	2,8	442	32178	938	33559
	12	19,4	1,3	95,4	3,3	397	30027	1051	31475
F14	0	19,6	1,3	95,8	2,9	439	32730	981	34150
	2	19,7	1,3	95,6	3,1	431	31071	1000	32502
	4	19,8	1,3	95,4	3,3	437	31571	1097	33105
	8	20,1	1,3	95,9	2,8	454	32541	952	33947
	12	19,4	1,3	95,4	3,3	412	30512	1046	31970

Табл. 25 ниже показывает данные эксклюзионной ВЭЖХ, которые представляют процент НМВ пиков, главного пика и LMW пиков для лиофилизированного AGS-22M6E, который хранили в условиях 2-8°C, 25°C/60% RH и 40°C/75%RH в течение 12 недель. Фиг. 3I показывает данные эксклюзионной в виде графиков для AGS-22M6E BDS и DP, хранимых в разных условиях. Изменения процентов главного пика и пиков после главного пика в разные моменты времени были очень схожими с изменениями, наблюдаемыми в стандарте композиции, указывая на то, что никаких существенных изменений не происходило в образцах композиций. Наложения хроматограмм эксклюзионной ВЭЖХ для разных DP композиций, хранимых в разных условиях, также анализировали (данные не показаны). Не было никакой разницы до и после лиофилизации. Все 3 композиции были стабильны через 12 недель при 2-8°C, 25° и 40°C в лиофилизированной форме. Все композиции работали одинаково и давали продукт высокого качества после лиофилизации, в дополнение к приемлемым профилям стабильности, наблюдаемым для соответствующего BDS в каждом случае, как при T=0, так и после испытаний с использованием встряхивания и замораживания-размораживания.

Таблица 25

			% от общей интегрированной площади			Интегрированная площадь			
Название образца	Недели при 2-8°C	Главный пик Время удерживания	Пики перед главным пиком	Главный пик	Пики после главного пика	Пики перед главным пиком	Главный пик	Пики после главного пика	Итого
F4	0	19,6	1,3	95,9	2,9	412	31291	940	32642
	0,1	19,6	1,2	95,8	2,9	418	32092	972	33483
	2	19,7	1,2	95,7	3,1	400	31564	1027	32991
	4	19,8	1,2	95,6	3,2	413	33168	1106	34687

	8	20,1	1,3	95,8	2,9	449	32603	997	34049
	12	19,4	1,3	95,2	3,5	403	30358	1124	31885
F9	0	19,6	1,3	95,9	2,8	413	31522	932	32866
	0,1	19,6	1,2	95,9	2,9	418	32453	972	33842
	2	19,8	1,3	95,5	3,2	432	31657	1068	33157
	4	19,8	1,3	95,4	3,3	441	32915	1145	34502
	8	20,1	1,3	95,8	2,9	459	33035	1000	34494
	12	19,4	1,3	95,2	3,5	411	31112	1149	32672
F14	0	19,6	1,3	95,8	2,9	439	32730	981	34150
	0,1	19,6	1,3	95,8	2,9	450	33238	1005	34693
	2	19,8	1,3	95,4	3,2	461	32915	1110	34486
	4	19,8	1,3	95,4	3,3	472	34323	1178	35972
	8	20,1	1,3	95,8	2,9	468	33414	999	34881
	12	19,4	1,3	95,3	3,4	424	31239	1108	32771
			<b>% от общей интегрированной площади</b>		<b>Интегрированная площадь</b>				
<b>Название образца</b>	<b>Недел и при 25 °С</b>	<b>Главны й пик Время удержив ания</b>	<b>Пики перед главным пиком</b>	<b>Главны й пик</b>	<b>Пики после главног о пика</b>	<b>Пики перед главны м пиком</b>	<b>Главны й пик</b>	<b>Пики после главног о пика</b>	<b>Итого</b>
F4	0	19,6	1,3	95,9	2,9	412	31291	940	32642
	0,1	19,6	1,2	95,8	2,9	418	32092	972	33483
	2	19,8	1,2	95,6	3,2	406	31761	1069	33236

	4	19,8	1,2	95,4	3,3	410	32451	1138	33999
	8	20,2	1,3	95,7	3,0	431	32611	1019	34061
	12	19,4	1,3	95,2	3,5	420	30805	1142	32367
F9	0	19,6	1,3	95,9	2,8	413	31522	932	32866
	0,1	19,6	1,2	95,9	2,9	418	32453	972	33842
	2	19,7	1,3	95,4	3,3	438	31863	1089	33389
	4	19,8	1,3	95,4	3,4	440	32810	1155	34405
	8	20,2	1,3	95,7	3,0	454	32933	1015	34402
	12	19,4	1,3	95,2	3,5	417	31201	1153	32770
F14	0	19,6	1,3	95,8	2,9	439	32730	981	34150
	0,1	19,6	1,3	95,8	2,9	450	33238	1005	34693
	2	19,7	1,3	95,4	3,2	456	32561	1104	34121
	4	19,8	1,3	95,3	3,3	470	33734	1180	35383
	8	20,1	1,4	95,7	3,0	480	33192	1027	34698
	12	19,4	1,3	95,2	3,4	445	31605	1142	33192
							% от общей интегрированной площади		
						Интегрированная площадь			
<b>Название образца</b>	<b>Неделя при 40 °С</b>	<b>Главный пик Время удерживания</b>	<b>Пики перед главным пиком</b>	<b>Главный пик</b>	<b>Пики после главного пика</b>	<b>Пики перед главным пиком</b>	<b>Главный пик</b>	<b>Пики после главного пика</b>	<b>Итого</b>

F4	0	19,6	1,3	95,9	2,9	412	31291	940	32642
	0,1	19,6	1,2	95,8	2,9	418	32092	972	33483
	2	19,8	1,3	95,4	3,4	414	31498	1120	33032
	4	19,8	1,3	95,4	3,3	448	32735	1144	34327
	8	20,2	1,4	95,5	3,1	455	32159	1045	33659
	12	19,4	1,4	95,1	3,5	450	30523	1137	32109
F9	0	19,6	1,3	95,9	2,8	413	31522	932	32866
	0,1	19,6	1,2	95,9	2,9	418	32453	972	33842
	2	19,8	1,3	95,4	3,3	428	32091	1103	33622
	4	19,8	1,2	95,6	3,2	414	32985	1120	34518
	8	20,2	1,3	95,6	3,1	426	32104	1039	33569
	12	19,4	1,3	95,1	3,6	422	30813	1158	32393
F14	0	19,6	1,3	95,8	2,9	439	32730	981	34150
	0,1	19,6	1,3	95,8	2,9	450	33238	1005	34693
	2	19,7	1,3	95,5	3,2	436	32383	1099	33918
	4	19,8	1,3	95,5	3,2	450	33290	1126	34866
	8	20,2	1,5	95,5	3,0	507	32935	1044	34486
	12	19,4	1,5	95,1	3,5	475	30996	1132	32604

#### 6.4 Пример 4. Развитие цикла лиофилизации.

Композиция F4, описанная в разделах выше, была выбрана для этого последующего испытания улучшения цикла лиофилизации. Параметры цикла лиофилизации показаны в таблице ниже. После завершения лиофилизации флаконы закупоривали в вакууме при 50 мТ. Лоток с флаконами удаляли из лиофилизатора и флаконы индивидуально герметично закрывали алюминиевыми крышками.

Таблица 26

Стадия #	Стадия	Температура или скорость изменения	Время (мин)	Давление (мТорр)
1	Нагрузка/Уравновешивание	5°C	60	
2	Изменение от 5°C до 0°C	0,5°C/мин	10	
3	Удерживание	0°C	60	
4	Изменение от 0°C до -45°C	1°C/мин	45	
5	Удерживание	-45°C	120	
6	Создание вакуума	-45°C	60	50
7	Изменение от -45°C до -15°C	0,3°C/мин	100	50
8	Удерживание	-15°C	2710	50
9	Изменение от -15°C до 35°C	0,2°C/мин	250	50
10	Удерживание	35°C	420	50
11	Изменение от 35°C до 5°C	0,5°C/мин	60	50
12	Удерживание	5°C удерживание	60	50

План испытания лиофилизированной композиции.

Для каждой конфигурации объема наполнения 5 флаконов заполняли продуктом в дополнение к 5 флаконам с плацебо. 2 флакона каждого из активного продукта и плацебо тестировали для каждого объема наполнения при T=0 (1 флакон тестировали на остаточную влагу и 1 флакон восстанавливали и тестировали с использованием анализов, описанных в кратком описании испытания). Кроме того, 2 флакона каждого из активного продукта и плацебо испытывали на контроль температуры в процессе лиофилизации.

Стандарт композиции, используемый для этого испытания, представлял собой AGS-22M6E исходное вещество при 12,8 мг/мл в 5,0% сахарозы, 0,02% Tween 20, pH 6,0.

Результаты.

Анализ цикла лиофилизации: общее консервативное время цикла составило 2,6 дня, что значительно короче, чем время цикла 4,7 дня, установленное для объема наполнения 5 мл (см. раздел 6.3 выше). Однако время цикла в 2,6 дня для настоящего исследования не является репрезентативным для оптимизированного времени цикла для любого объема наполнения. После тщательной оценки отдельных показаний, связанных с циклом, можно было определить оптимизированное время цикла для любого объема наполнения. Поскольку монитор точки росы реагирует на влагу, выделяющуюся из обоих объемов наполнения, его использовали в этом исследовании для оценки более оптимального времени сушки для объема наполнения 3,0 мл или 1,5 мл. Точно так же датчик Пирани, хотя обычно является отличным индикатором конечной точки времени первичной сушки, в этом случае служит только ориентиром, поскольку он также реагирует на сублимацию льда из всех флаконов на полке. Напротив, для целей данного исследования мониторинг температуры продукта является наиболее надежным инструментом для оценки времени высыхания для каждого отдельного объема наполнения. В этом исследовании термодатчики помещали как во флаконы с активным веществом, так и во флаконы с плацебо, и для обоих объемов наполнения наблюдалось точное соответствие температурных профилей продукта для активного вещества и плацебо.

Имея подтверждение, что температура продукта дает точное измерение времени сушки, сравнение данных для двух объемов наполнения (данные не показаны) показывает, что объем наполнения 1,5 мл высыхает примерно за 1,3 дня, что значительно быстрее, чем у объема наполнения 3,0 мл, который высыхает примерно за 1,8 дня.

Внешний вид лепешки: все лепешки представляли собой идеальные лепешки, совсем немного сморщенные, с глянцевой поверхностью. Все они сохранили неповрежденную структуру. В большинстве флаконов лепешки не имели трещин. Когда флаконы переворачивали, лепешки не оставались прилипшими к флаконам, а падали целыми во флаконах. В некоторых флаконах наблюдались мелкие трещины по краю круга мениска, где лепешка примыкала к флакону. Не было разницы в образовании лепешки между активным веществом и плацебо для обоих объемов наполнения. Внешний вид лепешки был также сопоставим с внешним видом лепешки, зарегистрированным для лиофилизированного продукта объемом 5 мл в испытании раздела 6.3.

Анализ A280: перед заполнением и лиофилизацией концентрацию белка в композиции проверяли в двух повторах, и было обнаружено, что она близка к целевой концентрации 10 мг/мл. После восстановления с использованием 2,8 мл и 1,4 мл WFI, соответственно, концентрации белка для композиций при заполнении 3,0 мл и 1,5 мл также были близки к таковым до лиофилизации (см. таблицу ниже).

Таблица 27

Образец	Фактор разведения (df)	A330nm	A280nm	[белок] мг/мл	Среднее значение (мг/мл)
До лиофилизации	20	0,00026	0,73176	10,06	10,1
		0,00000	0,74046	10,19	
F4 10мг/мл, T=0, 3мл	20	0,00126	0,82283	11,30	11,3
		0,00000	0,81551	11,22	
F4 10мг/мл, T=0, 1,5мл	20	0,00429	0,78214	10,70	10,7

Остаточная влага, время восстановления, A330, осмоляльность и внешний вид: после завершения лиофилизации один флакон каждого объема наполнения из флаконов с активным веществом и плацебо брали для определения остаточной влаги. Как показано в табл. 28 ниже, остаточная влага в флаконах с активным веществом составляла от 0,18% для объема наполнения 3,0 мл до 0,29% для объема наполнения 1,5 мл. Была определена несколько более высокая остаточная влага для плацебо, при 0,34% для обоих объемов наполнения. Время восстановления было меньше чем 1 мин для всех испытанных флаконов, при несколько большем времени, зарегистрированном для 3,0 мл объемов наполнения (в среднем 36 сек), по сравнению с образцами с объемом наполнения 1,5 мл (в среднем 20 с). Не было никакой существенной разницы во времени восстановления между флаконами с активным веществом и плацебо. Аналогичным образом, что касается внешнего вида, сообщалось, что все восстановленные образцы, как активного вещества, так и плацебо, были прозрачными и бесцветными с отсутствием мелких твердых частиц.

Таблица 28

Условие	Ллиофил. объем наполнения	Время восстановления <sup>^</sup> (сек)		Мутность (A330)		Осмоляльность (мОсм/кг) <sup>1</sup>		% остаточной влаги*	
		Активное вещество	Плацебо	Активное вещество	Плацебо	Активное вещество	Плацебо	Активное вещество	Плацебо
T=0	3,0	38	35	0,0645	0,0139	194	186	0,18	0,34
	1,5	22	18	0,0555	0,0097	190	189	0,29	0,34
До лиофилизации				0,0610	0,0142	190	181		
				0,0492	0,0089				



Измерения мутности (A330) флаконов с активным веществом и плацебо также показаны в приведенной выше таблице. Как показано, для образцов как до, так и после лиофилизации значения A330 для флакона с активным веществом были немного выше, чем для плацебо, подтверждая более ранние результаты, обсужденные в разделе 6.3, где было показано, что AGS-22M6E способствует мутности композиции.

Осмоляльность образцов композиций и буфера проверяли в двух повторах перед заполнением и после восстановления. Табл. 28 выше представляет эти данные, показывая, что не было заметной разницы в осмоляльности до лиофилизации или после восстановления. Они также были сопоставимы с осмоляльностью, определенной для образцов с объемом наполнения 5,0 мл в разделе 6.3.

Фиг. 4 показывает анализ SDS-PAGE для каждого объема наполнения, как в восстанавливающих, так и в невосстанавливающих условиях, по сравнению со стандартом композиции. Результаты показывают, что изменение объема наполнения не влияло на профиль SDS-PAGE.

Табл. 29 ниже представляет данные эксклюзионной ВЭЖХ, включая процентные доли HMW пиков, главных пиков и LMW пиков для образцов, лиофилизированных при каждом объеме наполнения. Независимо от оцениваемого объема наполнения лиофилизированные образцы вели себя одинаково, и не было никакой разницы в площадях главных пиков, измеренных до и после лиофилизации. Никаких изменений не наблюдалось ни для одного объема наполнения, и эти профили были сопоставимы с лиофилизированным объемом наполнения 5 мл в исследовании, описанном в разделе 6.3.

Таблица 29

Название образца	Проценты пиков (%)				Площадь пика (mAu)			
	Главный пик Время удерживания	Пики перед главным пиком	Главный пик	Пики после главного пика	Пики перед главным пиком	Главный пик	Пики после главного пика	Итого
Стандартный образец	19,8	1,4	95,2	3,4	429	29155	1045	30629
F4, активное вещество, лиофил., объем наполнения 3,0 мл	19,8	1,3	95,4	3,3	481	34059	1174	35714
F4, активное вещество, лиофил., объем наполнения 1,5 мл	19,8	1,4	95,1	3,5	487	32359	1198	34043

Из вышеизложенного будет понятно, что, хотя конкретные варианты осуществления были описаны с целью иллюстрации, возможны различные модификации без отклонения от сущности и объема того, что представлено в настоящем изобретении. Все ссылки, указанные выше, полностью включены в настоящее изобретение посредством ссылки.

#### 7. Перечень последовательностей.

Настоящее описание подается вместе с копией Перечня последовательностей в компьютерно-читаемой форме (CRT). CRF под названием "14369-244-228\_SEQ\_LISTING.txt", который был создан 11 октября 2019 г. и имеет размер 39693 байта, полностью включен в настоящее изобретение посредством ссылки.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

#### 1. Фармацевтическая композиция, включающая

(а) конъюгат антитело-лекарственное средство, включающий антитело или его антиген-связывающий фрагмент, который связывается с 191P4D12, конъюгированным с одной или несколькими единицами монометилауристатина E (ММАЕ), где антитело или его антиген-связывающий фрагмент включает переменную область тяжелой цепи, включающую аминокислотную последовательность в диапазоне от 20-й аминокислоты (глутаминовая кислота) до 136-й аминокислоты (серин) SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность в диапазоне от 23-й аминокислоты (аспарагиновая кислота) до 130-й аминокислоты (аргинин) SEQ ID NO: 8; и где CDR определены в соответствии с системами нумерации Kabat, AbM, Chothia, Contact или IMGT; и

(b) фармацевтически приемлемый эксципиент, включающий L-гистидин в пределах от 10 до 40 мМ, полисорбат-20 (TWEEN-20) в пределах от 0,005 до 0,05% (мас./об.), дигидрат трегалозы в пределах от 4 до 7% (мас./об.), и HCl, где pH находится в пределах от 5,7 до 6,3 при 27°C.

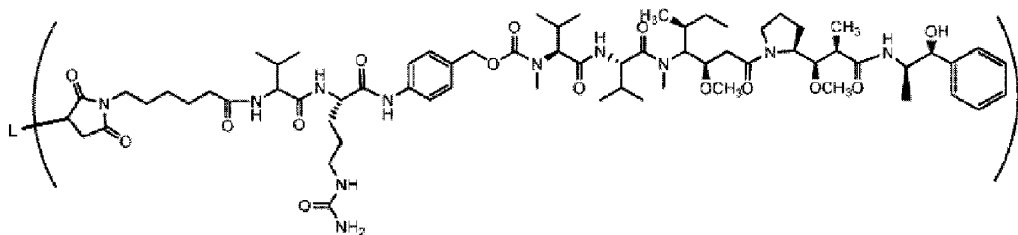
2. Фармацевтическая композиция по п.1, где:

антитело содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность от 20-й аминокислоты (глутаминовая кислота) до 466-й аминокислоты (лизин) SEQ ID NO: 7, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность от 23-й аминокислоты (аспарагиновая кислота) до 236-й аминокислоты (цистеин) SEQ ID NO: 8.

3. Фармацевтическая композиция по п.1, где антигенсвязывающий фрагмент представляет собой Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv или scFv, предпочтительно, где антигенсвязывающий фрагмент получен рекомбинантным путем.

4. Фармацевтическая композиция по п.1 или 2, где антитело представляет собой полностью человеческое антитело, предпочтительно, где антитело получено рекомбинантным путем.

5. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-4, где конъюгат антитело-лекарственное средство имеет следующую структуру:

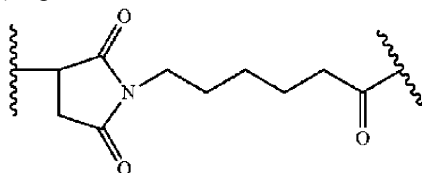


где L- представляет собой антитело или его антиген-связывающий фрагмент и р имеет значение от 1 до 10, предпочтительно, где р имеет значение от 2 до 8, более предпочтительно, где р равен 3,8.

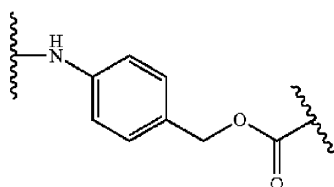
6. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связаны с каждой единицей монометилауристата Е (ММАЕ) через линкер, предпочтительно где:

(i) линкер представляет собой расщепляемый ферментом линкер, и где линкер образует связь с атомом серы антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; или

(ii) линкер имеет формулу: -A<sub>а</sub>-W<sub>в</sub>-Y<sub>г</sub>-; где -A- представляет собой удлиняющий компонент, а равно 0 или 1; -W- представляет собой аминокислотный компонент, w представляет собой целое число от 0 до 12; и -Y- представляет собой спейсерный компонент, у равен 0, 1 или 2, предпочтительно, где удлиняющий компонент имеет структуру формулы (1), приведенной ниже; аминокислотный компонент представляет собой валин-цитруллин; и спейсерный компонент представляет собой группу PAB, содержащую структуру формулы (2), приведенной ниже:



Формула (1)



Формула (2),

или удлиняющий компонент образует связь с атомом серы антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; и где спейсерный компонент связан с ММАЭ через карбаматную группу.

7. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-6, содержащая конъюгат антитело-лекарственное средство в концентрации от 1 до 20 мг/мл, от 5 до 15 мг/мл, от 8 до 12 мг/мл или примерно 10 мг/мл.

8. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-7, где L-гистидин присутствует в пределах от 10 до 40 мМ, от 15 до 35 мМ, от 15 до 30 мМ, от 15 до 25 мМ или примерно 20 мМ.

9. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-8, где концентрация TWEEN-20 находится в пределах от 0,005 до 0,05% (об./об.), от 0,01 до 0,03% (об./об.) или примерно 0,02% (об./об.).

10. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-9, где дигидрат трегалозы присутствует в

пределах от 4 до 6% (мас./об.) или примерно 5,5% (мас./об.).

11. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-10, которая имеет значение рН в пределах от 5,7 до 6,3, предпочтительно, которая имеет рН примерно 6,0.

12. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-10, где:

(i) рН измерено при комнатной температуре;

(ii) рН измерено при 25°C; или

(iii) рН регулируется при помощи HCl.

13. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-12, содержащая примерно 20 мМ L-гистидина, примерно 0,02% (мас./об.) TWEEN-20 и примерно 5,5% (мас./об.) дигидрата трегалозы.

14. Фармацевтическая композиция по п.13, где:

(i) рН составляет 6,0 при комнатной температуре; или

(ii) рН составляет 6,0 при 25°C.

15. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-14, которая находится в жидкой форме или лиофилизирована.

16. Лيوфилизированная композиция, полученная методом сушки вымораживанием фармацевтической композиции по любому из пп.1-15.

17. Способ профилактики или лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по любому из пп.1-14.

18. Способ по п.17, где рак представляет собой рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак яичника, рак легкого, рак мочевого пузыря, уротелиальный рак, рак молочной железы, рак пищевода, рак головы или рак шеи.

19. Способ по п.18, где:

(i) рак представляет собой рак легкого, предпочтительно, где рак легкого представляет собой мелкоклеточный рак легкого; или

(ii) рак представляет собой рак мочевого пузыря или уротелиальный рак, предпочтительно, где рак мочевого пузыря представляет собой прогрессирующий рак мочевого пузыря или прогрессирующий уротелиальный рак, метастатический рак мочевого пузыря или метастатический уротелиальный рак.

20. Способ по любому из пп.17-19, где рак имеет опухолевые клетки, экспрессирующие 191P4D12.

21. Способ по любому из пп.17-20, дополнительно включающий введение субъекту второго терапевтического агента.

22. Способ по п.21, где второй терапевтический агент представляет собой ингибитор контрольных иммунных точек, предпочтительно, где ингибитор контрольных иммунных точек представляет собой:

(i) ингибитор PD-1, предпочтительно, где ингибитор PD-1 представляет собой ниволумаб; или

(ii) ингибитор PD-L1, предпочтительно, где ингибитор PD-L1 выбран из группы, состоящей из атезолизумаба, авелумаба и дурвалумаба.

23. Способ по любому из пп.17-22, где конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащийся в фармацевтической композиции, вводят в дозе: от 1 до 10 мг/кг массы тела субъекта, от 1 до 5 мг/кг массы тела субъекта, от 1 до 2,5 мг/кг массы тела субъекта, от 1 до 1,25 мг/кг массы тела субъекта, примерно 1 мг/кг массы тела субъекта или примерно 1,25 мг/кг массы тела субъекта.

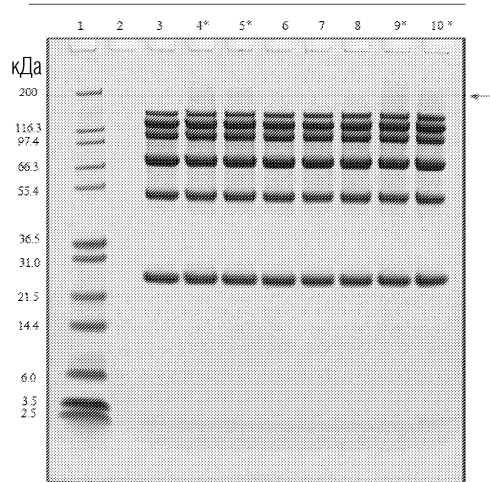
24. Способ по п.23, где конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащийся в фармацевтической композиции, вводят посредством внутривенной (в/в) инъекции или инфузии; предпочтительно, где конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащийся в фармацевтической композиции, вводят посредством внутривенной (в/в) инъекции или инфузии в течение примерно 30 мин два раза за каждый трехнедельный цикл, более предпочтительно, где конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащийся в фармацевтической композиции, вводят посредством внутривенной (в/в) инъекции или инфузии в течение примерно 30 мин в дни 1 и 8 каждого трехнедельного цикла.

25. Способ по п.23, дополнительно включающий введение ингибитора иммунных контрольных точек путем внутривенной (в/в) инъекции или инфузии в день 1 каждого трехнедельного цикла.

26. Способ по п.23, где конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащийся в фармацевтической композиции, вводят посредством внутривенной (в/в) инъекции или инфузии в течение примерно 30 мин три раза в течение каждого четырехнедельного цикла, предпочтительно, где конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащийся в фармацевтической композиции, вводят посредством внутривенной (в/в) инъекции или инфузии в течение примерно 30 мин в дни 1, 8 и 15 каждого четырехнедельного цикла, более предпочтительно дополнительно включающий введение ингибитора иммунных контрольных точек посредством внутривенной (в/в) инъекции или инфузии.

27. Способ по любому из пп.17-26, где субъектом является человек.

## Композиции 1-7 в невосстанавливающих условиях



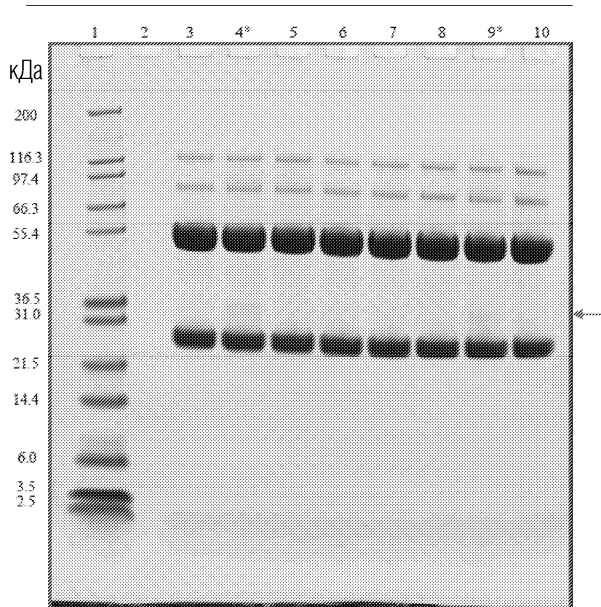
## Полоса Название образца образец #

Полоса	Название образца	образец #
1	mark 12 MW маркер	
2	холостая проба	
3	стандартный образец	
4	14 дней, 40°C F1	
5	14 дней, 40°C F2	
6	14 дней, 40°C F3	
7	14 дней, 40°C F4	
8	14 дней, 40°C F5	
9	14 дней, 40°C F6	
10	14 дней, 40°C F7	

Загрузка образца	10 мкг
SDS-PAGE гель и буфер	4-12% Bis-Tris
Нагрев образца	10' × 70°C
Электрофорез	3.5' × 200V
Окрашивание	Просто синий
Время окрашивания/обесцвечивания	1,5 часа/в течение ночи
Маркер	Mark 12

Фиг. 1А

## Композиции 1-7 в восстанавливающих условиях

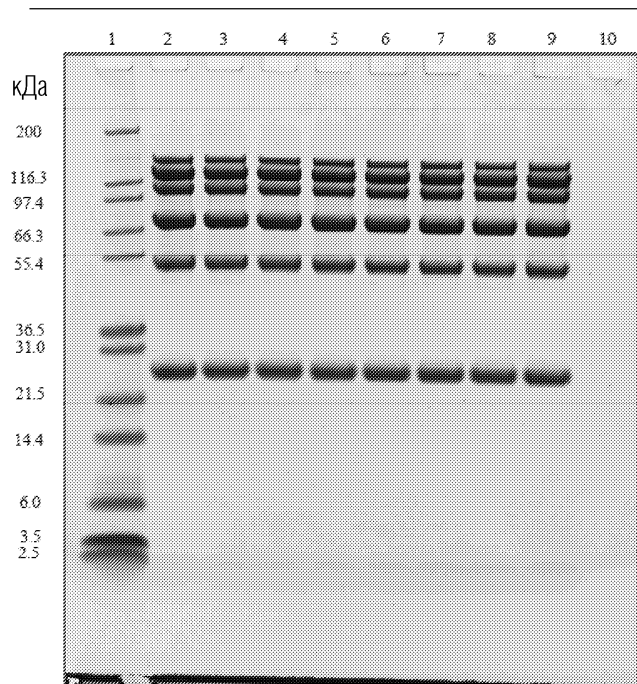


## Полоса Название образца образец #

Полоса	Название образца	образец #
1	mark 12 MW маркер	
2	холостая проба	
3	стандартный образец	
4	14 дней, 40°C F1	
5	14 дней, 40°C F2	
6	14 дней, 40°C F3	
7	14 дней, 40°C F4	
8	14 дней, 40°C F5	
9	14 дней, 40°C F6	
10	14 дней, 40°C F7	

Фиг. 1В

## Композиции 8-14 в невосстанавливающих условиях

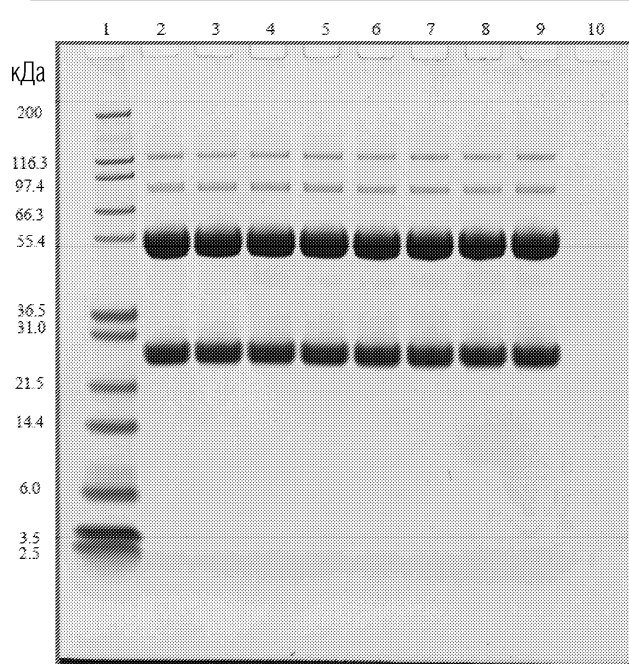


Фиг. 1С

## Полоса Название образца образец #

Полоса	Название образца	образец #
1	mark 12 MW	маркер
2	стандартный образец	
3	14 дней, 40°C	F8
4	14 дней, 40°C	F9
5	14 дней, 40°C	F10
6	14 дней, 40°C	F11
7	14 дней, 40°C	F12
8	14 дней, 40°C	F13
9	14 дней, 40°C	F14
10	холостая проба	

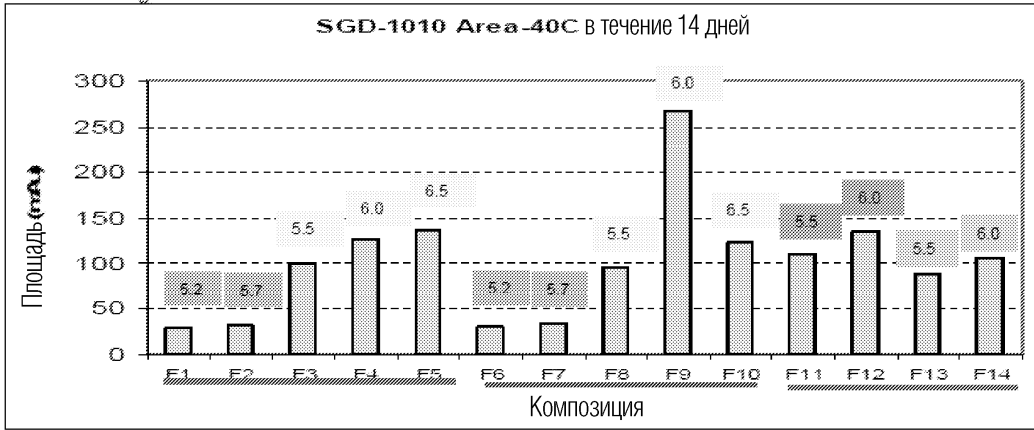
## Композиции 8-14 в восстанавливающих условиях



Фиг. 1D

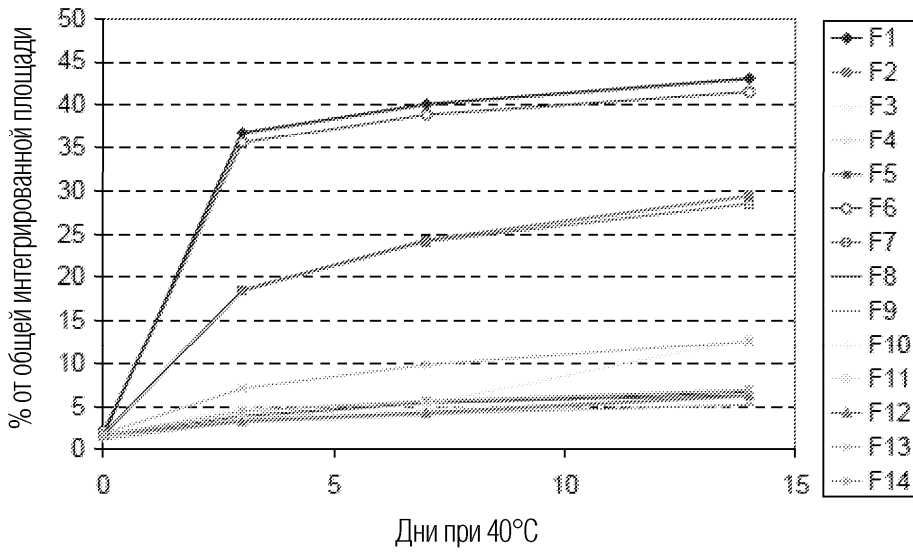
## Полоса Название образца образец #

Полоса	Название образца	образец #
1	mark 12 MW	маркер
2	стандартный образец	
3	14 дней, 40°C	F8
4	14 дней, 40°C	F9
5	14 дней, 40°C	F10
6	14 дней, 40°C	F11
7	14 дней, 40°C	F12
8	14 дней, 40°C	F13
9	14 дней, 40°C	F14
10	холостая проба	



Фиг. 1Е

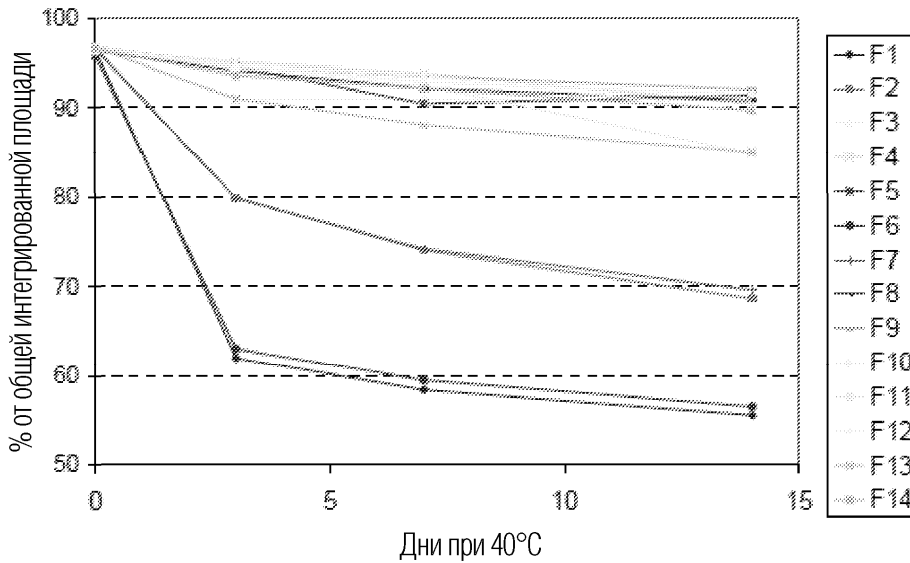
% НМВ пиков 10 мг/мл AGS-22М6Е, инкубированного при 40°C



Дни при 40°C

Фиг. 1F

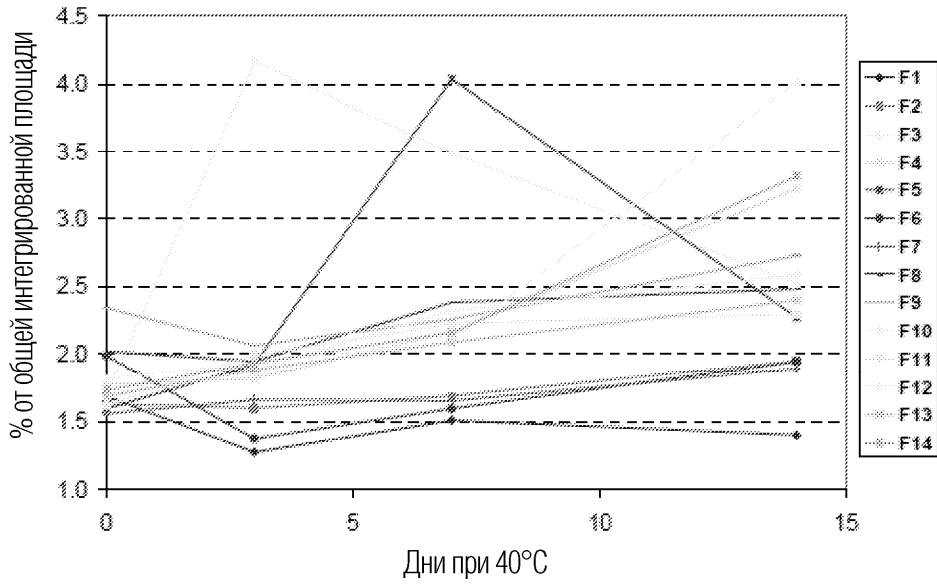
% главного пика 10 мг/мл AGS-AGS-22М6Е, инкубированного при 40°C



Дни при 40°C

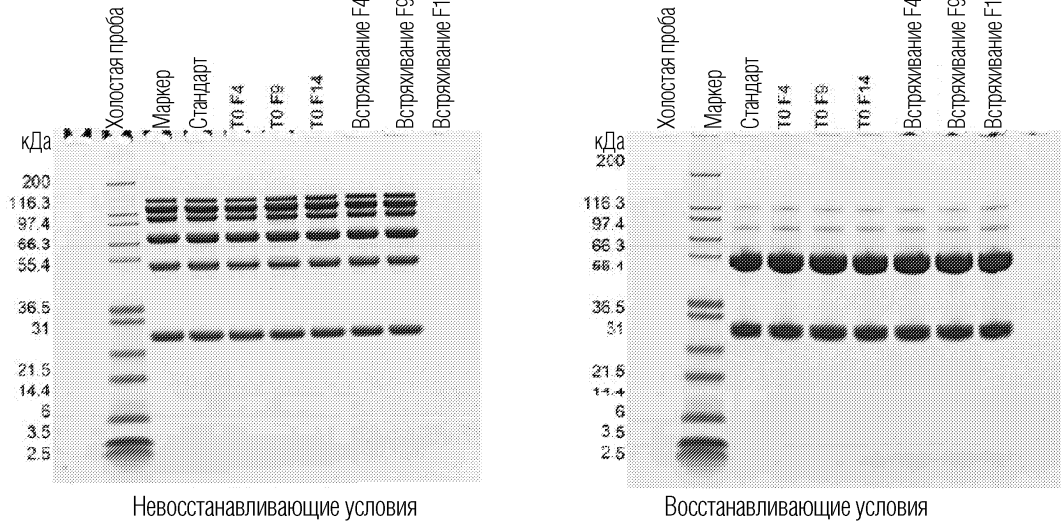
Фиг. 1G

% LMW пиков 10 мг/мл AGS-22M6E, инкубированного при 40°C



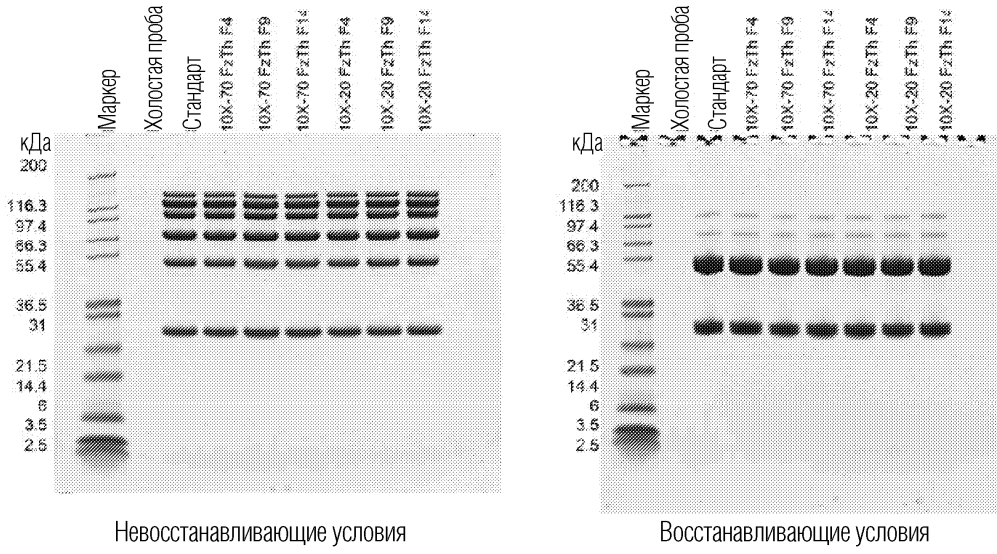
Фиг. 1H

T=0 и испытание при встряхивании

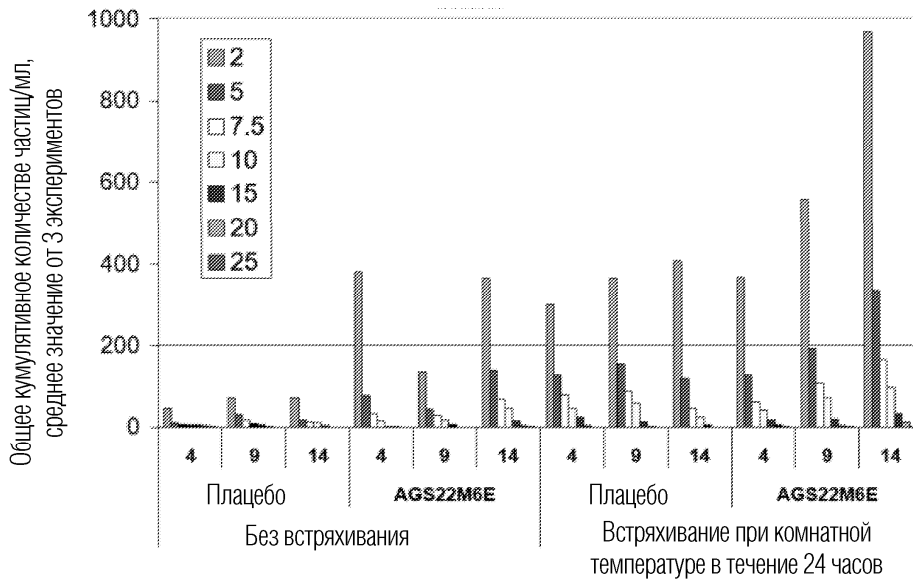


Фиг. 2A

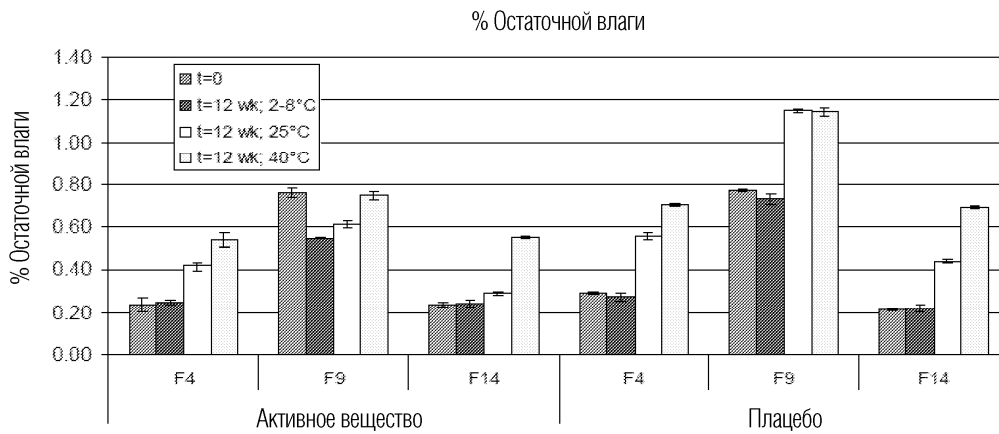
Испытание с использованием 10 циклов  
замораживания-размораживания



Фиг. 2В

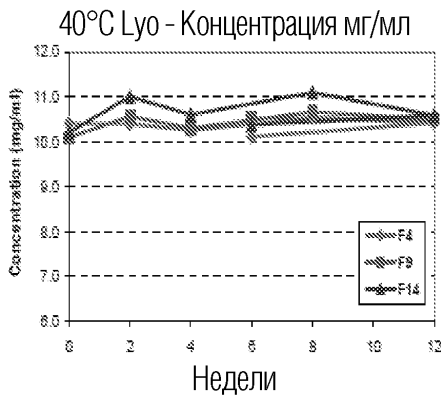
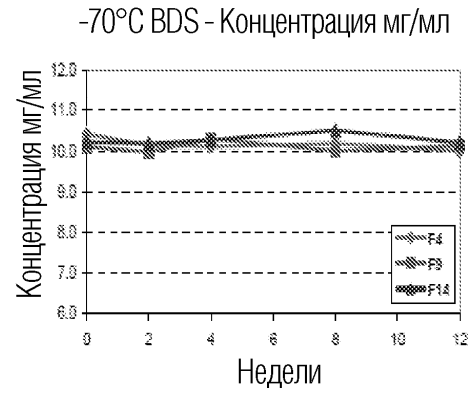
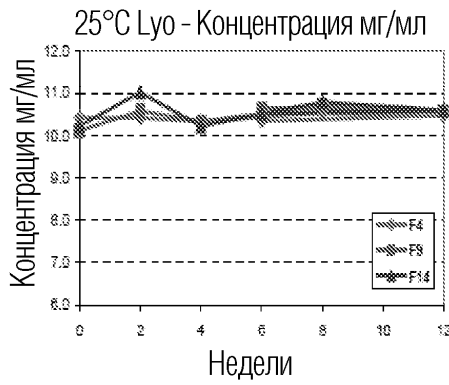
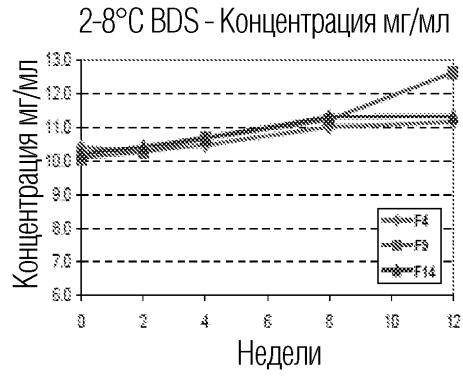
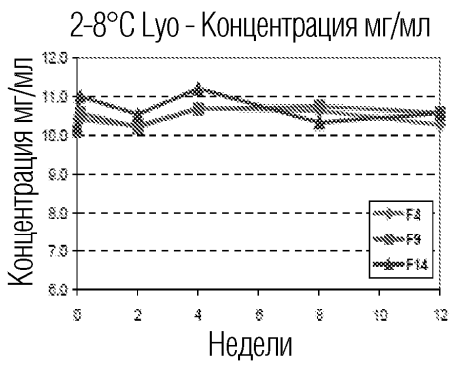


Фиг. 2С



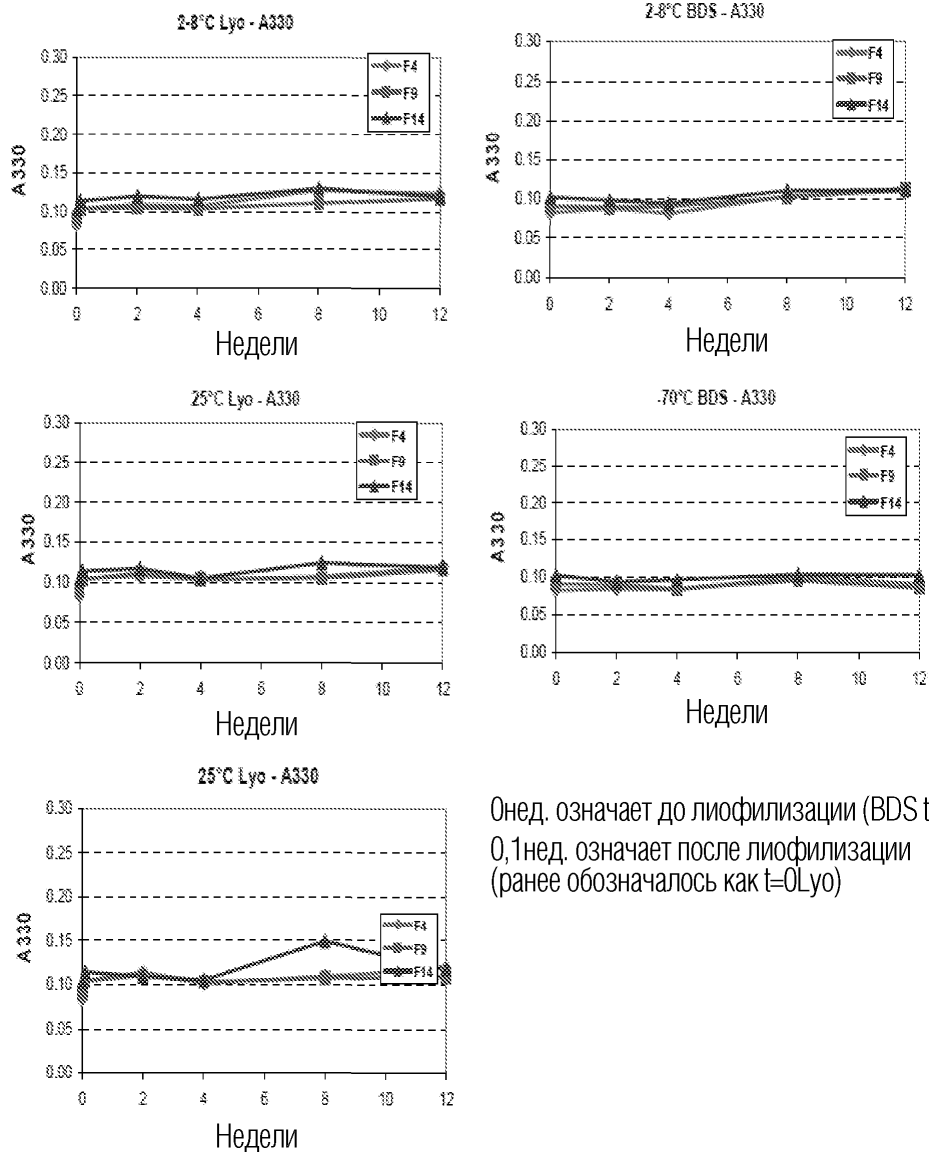
Фиг. 3А





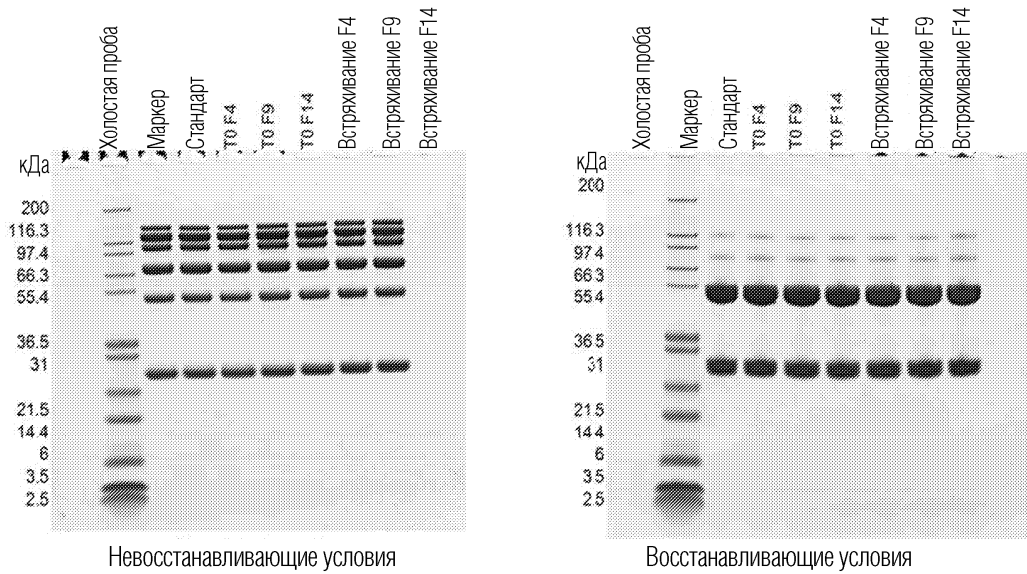
0 нед. означает до лиофилизации (BDS t=0)  
 0,1 нед. означает после лиофилизации  
 (ранее обозначалось как t=0Lyo)

Фиг. 3В

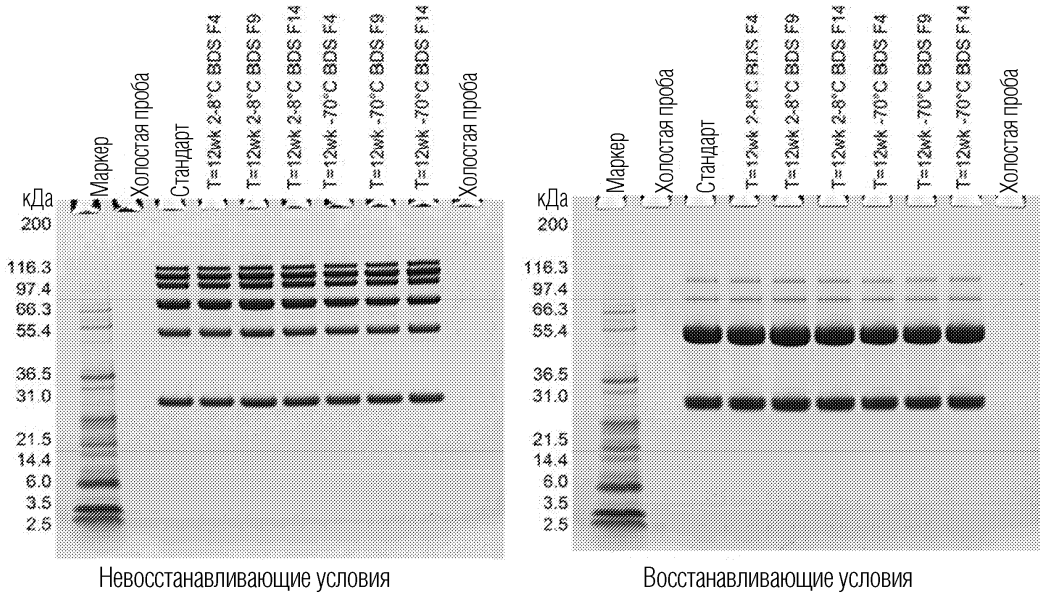


0 нед. означает до лиофилизации (BDS t=0)  
 0,1 нед. означает после лиофилизации  
 (ранее обозначалось как t=0Lyo)

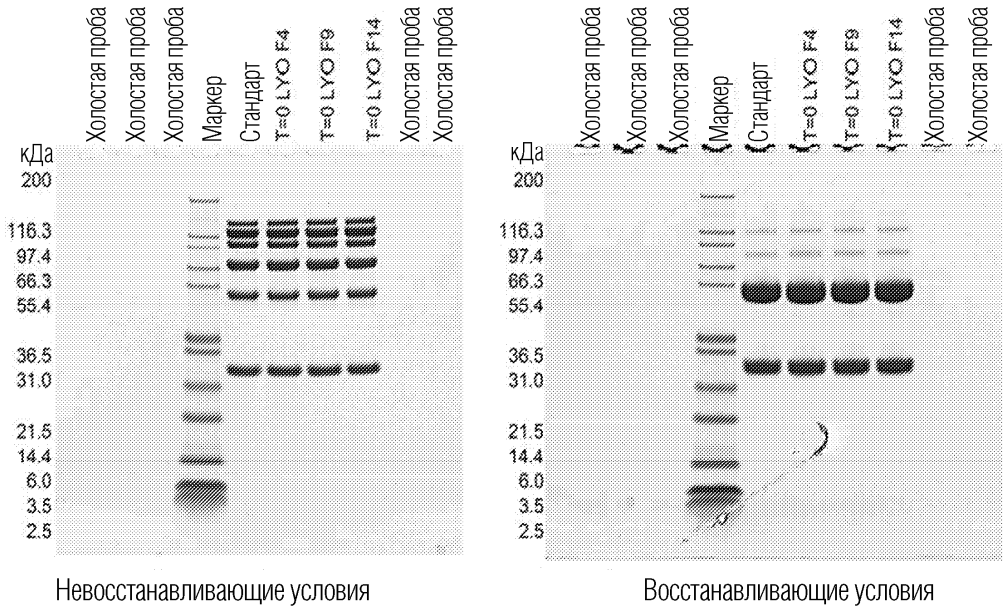
Фиг. 3С



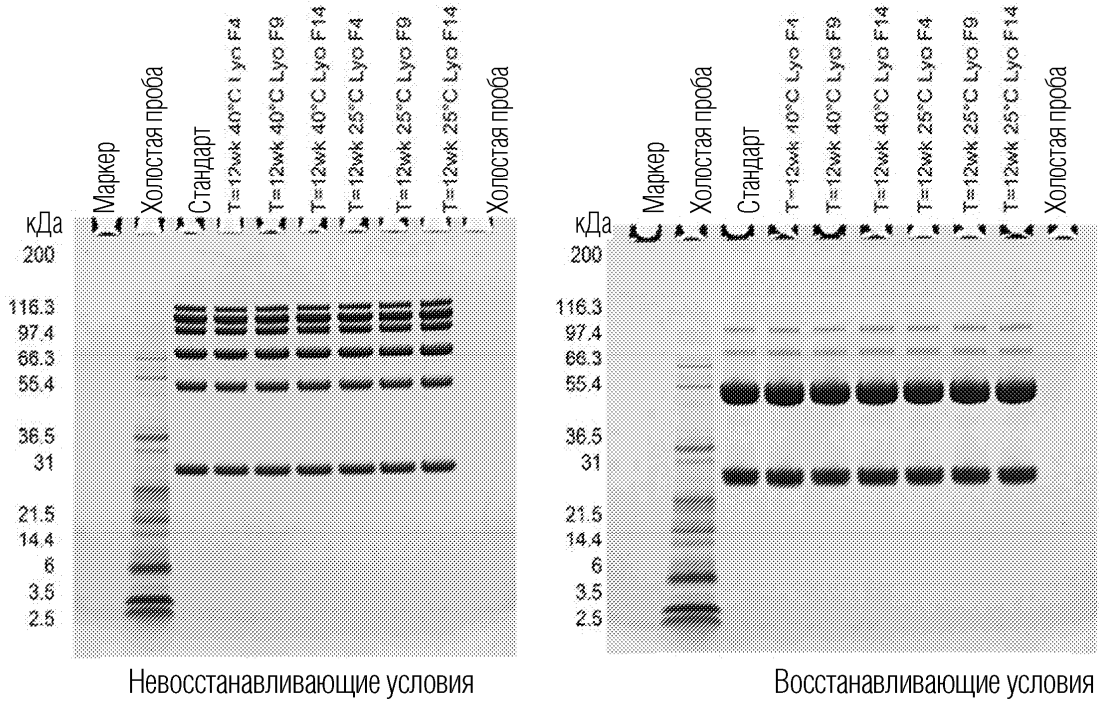
Фиг. 3D



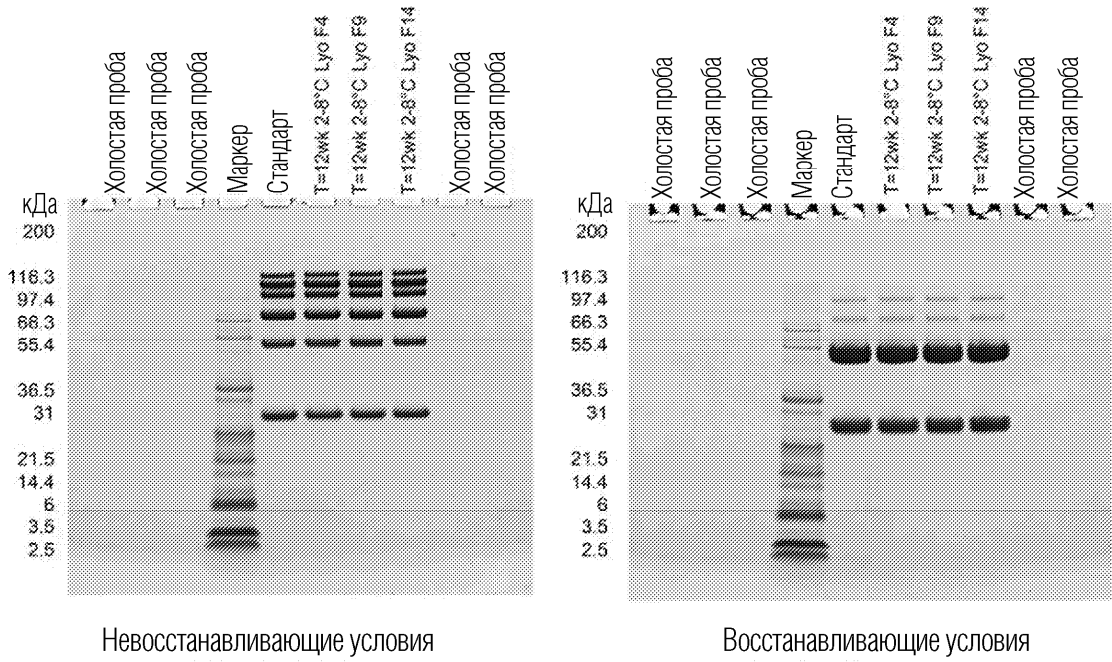
Фиг. 3Е



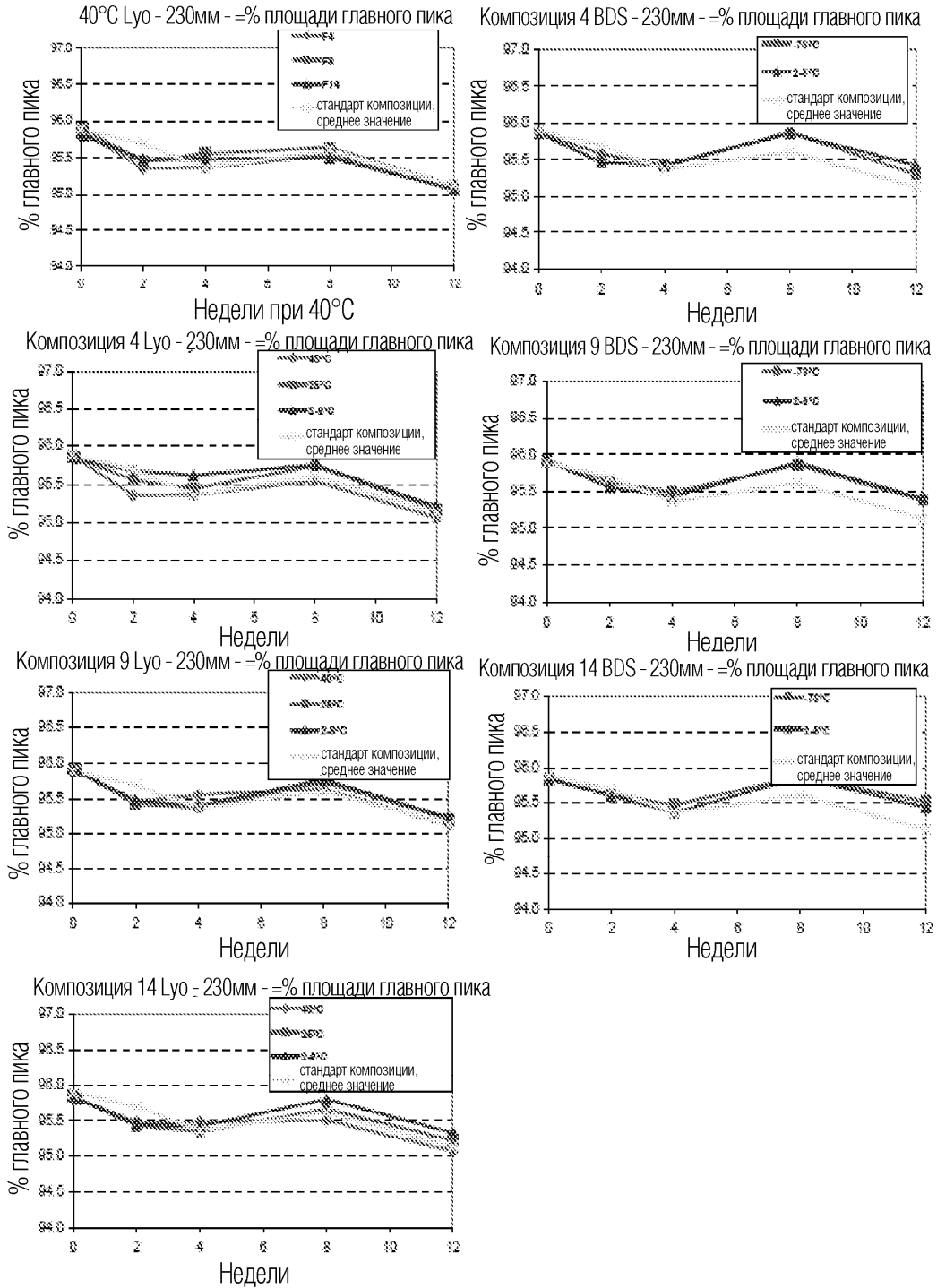
Фиг. 3F



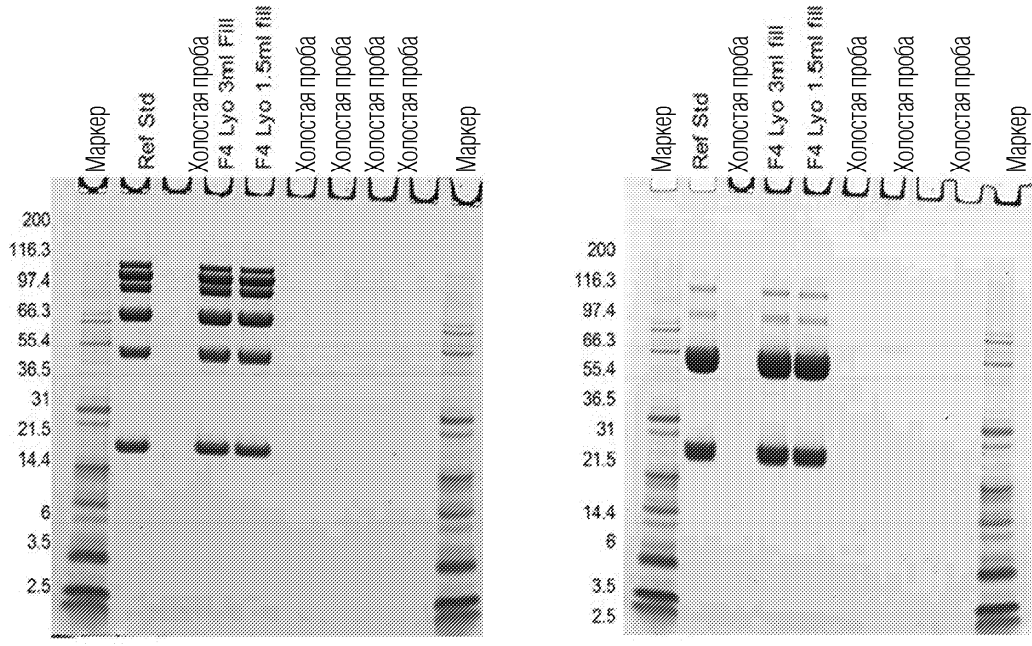
Фиг. 3Г



Фиг. 3Н



Фиг. 3I



Невосстанавливающие условия

Восстанавливающие условия

Фиг. 4

кДНК (SEQ ID NO:1) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:2) 191P4D12.  
 Стартовый метионин подчеркнут. Открытая рамка считывания начинается  
 от аминокислоты 264 по 1796, включая стоп-кодон

```

1  ggccgctcgttggtggccacagcgtgggaagcagctctgggggagctcgggagctcccgatc
61  acggcttcttgggggtagctacggctgggtgtgtagaacggggccggggctggggctggg
121  tcccctagtgagacccaagtgcgagaggcaagaactctgcagcttctgcecttctgggt
181  cagttccttattcaagtctgcagccggctcccagggagatctcgggtggaacttcagaaac
1      M P L S L G A E M W G P E
241  gctgggcagctctgcctttcaaccATGCCCCTGTCCCTGGGAGCCGAGATGTGGGGCCTG
14   A W L L L L L L L A S F T G R C P A G E
301  AGGCCTGGCTGCTGCTGCTGCTACTGCTGGCATCATTACAGGCCGGTGCCCCGCGGGTG
34   L E T S D V V T V V L G Q D A K L P C F
361  AGCTGGAGACCTCAGACGTGGTAACTGTGGTGTGGGCCAGGACGCAAAACTGCCCTGCT
54   Y R G D S G E Q V G Q V A W A R V D A G
421  TCTACCGAGGGGACTCCGGCGAGCAAGTGGGGCAAGTGGGCATGGGCTCGGGTGGACGCGG
74   E G A Q E L A L L H S K Y G L H V S P A
481  GCGAAGGCGCCCAGGAACTAGCGCTACTGCACTCCAAATACGGGCTTCATGTGAGCCCGG
94   Y E G R V E Q P P P P R N P L D G S V L
541  CTTACGAGGGCCGCGTGGAGCAGCCGCGCCCGCCACGCAACCCCTGGACGGCTCAGTGC
114  L R N A V Q A D E G E Y E C R V S T F P
601  TCCTGCGCAACGCAGTGCAGGCGGATGAGGGCGAGTACGAGTGCCGGGTGAGCACCTTCC
134  A G S F Q A R L R L R V L V P P L P S L
661  CCGCCGGCAGCTTCCAGGCGCGGCTGCGGCTCCGAGTGTGGTGCCTCCCCTGCCCTCAC
154  N P G P A L E E G Q G L T L A A S C T A
721  TGAATCCTGGTCCAGCACTAGAAGAGGGCCAGGGCCTGACCTGGCAGCCTCCTGCACAG
174  E G S P A P S V T W D T E V K G T T S S
781  CTGAGGGCAGCCCAGCCCCAGCGTGACCTGGGACACGGAGGTCAAAGGCACAACGTCCA
194  R S F K H S R S A A V T S E F H L V P S
841  GCCGTTCCCTCAAGCACTCCCGCTCTGCTGCCGTCACCTCAGAGTTCCACTGGTGCCTA
214  R S M N G Q P L T C V V S H P G L L Q D
901  GCCGCAGCATGAATGGGCAGCCACTGACTTGTGTGGTGTCCCATCCTGGCCTGCTCCAGG
234  Q R I T H I L H V S F L A E A S V R G L
961  ACCAAAGGATCACCCACATCCTCCACGTGTCTTCTTCTTGGTGTGAGGCCTCTGTGAGGGGCC
254  E D Q N L W H I G R E G A M L K C L S E
1021 TTGAAGACCAAAATCTGTGGCACATTGGCAGAGAAGGAGCTATGCTCAAGTGCCTGAGTG
274  G Q P P P S Y N W T R L D G P L P S G V
1081 AAGGGCAGCCCCCTCCCTCATACAAGTGGACACGGCTGGATGGGCTCTGCCAGTGGGG
294  R V D G D T L G F P P L T T E H S G I Y
1141 TACGAGTGGATGGGGACACTTTGGGCTTTCCCCCACTGACCACTGAGCACAGCGGCATCT
314  V C H V S N E F S S R D S Q V T V D V L
1201 ACGTCTGCCATGTGAGCAATGAGTTCTCCTCAAGGGATTCTCAGGTCACTGTGGATGTTCC
334  D P Q E D S G K Q V D L V S A S V V V V

```

1261 TTGACCCCCAGGAAGACTCTGGGAAGCAGGTGGACCTAGTGTGAGCCTCGGTGGTGGTGG  
 354 G V I A A L L F C L L V V V V V L M S R  
 1321 TGGGTGTGATCGCCGCACTCTTGTCTGCTTCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGCATGTCCC  
 374 Y H R R K A Q Q M T Q K Y E E E L T L T  
 1381 GATACCATCGGCGCAAGGCCAGCAGATGACCCAGAAATATGAGGAGGAGCTGACCCTGA  
 394 R E N S I R R L H S H H T D P R S Q P E  
 1441 CCAGGGAGAACTCCATCCGGAGGCTGCATTCCCATCACACGGACCCCAGGAGCCAGCCGG  
 414 E S V G L R A E G H P D S L K D N S S C  
 1501 AGGAGAGTGTAGGGCTGAGAGCCGAGGGCCACCCTGATAGTCTCAAGGACAACAGTAGCT  
 434 S V M S E E P E G R S Y S T L T T V R E  
 1561 GCTCTGTGATGAGTGAAGAGCCCGAGGGCCGAGTTACTCCACGCTGACCAACGGTGAAGG  
 454 I E T Q T E L L S P G S G R A E E E E D  
 1621 AGATAGAAACACAGACTGAACCTGCTCTCCAGGCTCTGGGCGGGCCGAGGAGGAGGAAG  
 474 Q D E G I K Q A M N H F V Q E N G T L R  
 1681 ATCAGGATGAAGGCATCAAACAGGCCATGAACCATTTTGTTCAGGAGAATGGGACCCTAC  
 494 A K P T G N G I Y I N G R G H L V \*  
 1741 GGGCCAAGCCCACGGGCAATGGCATCTACATCAATGGGCGGGGACACCTGGTCTGAccca  
 1801 ggcctgcctcccttcocctaggcctggctccttctgttgacatgggagatfcttagctcctc  
 1861 ttgggggctccttbaaacacccccatttcttggcggaagatgctccccatcccactgactg  
 1921 cttgacctttacctccaacccttctgttcctcgggagggctccaccaattgagctctctcc  
 1981 caccatgcatgcaggctcactgtgtgtgtgcatgtgtgacctgtgtgagtggtgactgactg  
 2041 tgtgtgtgtggaggggtgactgtccgtggaggggtgactgtgtccgtggtgtgtattatg  
 2101 ctgtcatatcagagtcaagtgaactgtgggtgtatgtgccacgggattttgagtggttgct  
 2161 gggcaacactgtcagggtttggcgtgtgtgtcatgtggctgtgtgtgacctctgcctgaa  
 2221 aaagcaggatattttctcagaccccagagcagatattaatgatgcagaggttggaggagaga  
 2281 ggtggagactgtggctcagaccccaggtgtgccccatagctggagctggaatctgcctcc  
 2341 ggtgtgagggaaacctgtctcctaccacttcggagccatgggggcaagtgtgaagcagcca  
 2401 gtccctgggtcagccagaggcttgaactgttacagaagccctctgcctctgggtggcctc  
 2461 tgggcctgctgcatgtacatattttctgtaaatatacatgcccgggagcttcttgcagg  
 2521 aatactgctccgaatcacttttaatttttttctttttttttcttgcctttccattagt  
 2581 tgtattttttattttattttttatttttttttttagagatggagctcactatgttgc  
 2641 tcaggctggccttgaactcctgggctcaagcaatcctcctgcctcagcctccctagtagc  
 2701 tgggactttaagtgtacaccactgtgctgcttgaatcctttacgaagagaaaaaaaaa  
 2761 attaaagaaagccttttagatttatccaatgtttactactgggattgcttaaagtgaggcc  
 2821 cctccaacaccaggggttaattcctgtgattgtgaaaggggctacttccaaggcatctt  
 2881 catgcaggcagcccttgggagggcacctgagagctggtagagcttgaaattagggatgt  
 2941 gagcctcgtgggttactgagtaaggtaaaattgcatccaccattgtttgtgataccttagg  
 3001 gaattgcttggacctggtgacaagggctcctgttcaatagtgggttggggagagagaga  
 3061 gcagtgattatagaccgagagagtaggagttgaggtgaggtgaaggaggtgctgggggtg  
 3121 agaatgtgcctttccccctgggttttggatcactaattcaaggctcttctggatgttct  
 3181 tctgggttggggctggagttcaatgaggtttatttttagctggccacccagatacactc  
 3241 agccagaatacctagatttagtaccacaaactcttcttagtctgaaatctgctggatttct  
 3301 ggcctaaggagagaggtcccatccttcgttccccagccagcctaggacttogaatgtgga  
 3361 gcctgaagatctaagatcctaacatgtacattttatgtaaatatgtgcatatttgtacat  
 3421 aaaatgatattctgttttttaataaaacagacaaaacttgaaaa

Фиг. 5А



кДНК (SEQ ID NO:3) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:4) тяжелой цепи Ha22-2(2,4)6.1. Двойной линией подчеркнута лидерная последовательность, подчеркнута вариабельная область тяжелой цепи, и пунктирной линией подчеркнута константная область человеческого IgG1.

M E L G L C W V F L V A I L E

```

1  GGTGATCAGCACTGAACACAGAGGACTCACCATGGAGCTGGGGCTGTGCTGGGTTTCTGTTCCTATTTTAGA
   G V Q C E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S
76  AGCTTCCACAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGCTCCCTGAGACTCTC
   C A A S G F T F S S Y N M N W V R Q A P G K G L E
151  CTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTCACTAGCTATAACATGAAGTGGGTCGGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTCGA
   W V S Y I S S S S S T I Y Y A D S V K G R F T I S
226  CTGGGTTTCAATCATTAGTACTAGTACTAGTACCATATATACTACGCAACTCTGCGAAGGGCCGATTCACCATCTC
   R D N A K N S L S L Q M N S L R D E D T A V Y Y C
301  CAGAGACAAATGCCAAGAACTCACTGTCTCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGACGAGGACACGGCTGTGTATTACTC
   A R A Y Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S A S T K
376  TCCGAGCAGCATACTACTACCGTATGGAGCTCGGGGCTAGGGCAAGCAGCTACCGCTCCCTGAGCTCCACCGAA
   G P S V F P L A P S S K S T S T S G G T A A L G C L V
451  GGGCCCATCGCTCTTCCGCTGGCCCTCTCCAGAGCCACTCTGGGGCCACAGCCGCTCCCTGGCTCTGGCTGGT
   K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P
526  CAAGGACTACTTCCCGAAGCGGTGACGGTCTGCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCCAGCGCTCCACACTTCC
   A V L Q S S S G L V S L S S V V T V P S S S L G T Q
601  GGCTGTCTAGAGTCCGAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAACCCA
   T Y I C N V N H K P S N T R V D R R V E P K S C D
676  GACCTACATCGCAACCTGCAATCAAGCCCAAGCAACCAAGSTGGCAAGAGAGTGGAGCCCAATCTGTGA
   K F H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K
751  CBAACCTCACACATCCCGAAGCTCCAGCAGCTGAACTCTGGGGGAGCCTCACTCTCTCTCTCCCGCCBA
   P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P
826  ACCCAAGCAACCTTCAATGATTCGGGAGCTTCAAGTCAATCCGAGGCTGAGCTTGGAGCTTGGAGCTTGGAGCT
   E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y
901  TBAAGTCAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAG
   N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C
976  CBAAGTCAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAG
   K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P
1051  CBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAG
   Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G
1126  ACBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAGTTCBAAG
   F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K A K T T P P
1201  CTCTCTTCCCGCAGCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCC
   V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N
1276  CCGACTTCCCGCAGCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCC
   V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G
1351  CCGCTTCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCC
   K *
1426  TBBATGA

```

кДНК (SEQ ID NO:5) и аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:6) легкой цепи Ha22-2(2,4)6.1. Двойной линией подчеркнута лидерная последовательность, подчеркнута вариабельная область легкой цепи, и пунктирной линией подчеркнута человеческая константная область каппа.

M D M R V P A Q L L G L L L L W F

```

1  AGTCAGACCCAGTCAAGGACACAGCATGGACATGAGGGTCCCGCCCTCA GCTCCGGGGCTCCCTGCTCTGGGTTTC
   P G S R C D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T
76  CCAGGTTCCAGATGCGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGCTGCACTCTTGGGACACAGATCACC
   I T C R A S Q G I S G W L A W Y Q Q K P G K A P K
151  ATCAGCTTCTGGGGGAGTCAAGGATATTAGCGCTCTGTTAGCCTGTTATCAGCAGAAACCAGCGAAAGCCCTAAG
   F L I Y A A S T L Q S G V P S R P S G S G S G T D
226  TTCCCTGATCCATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
   F T L T I S S L O P E D F A T Y Y C Q Q A N S F P
301  TTCACTCTCACCATCAGCAGCTCCAGCTTGAAGATTCTGCAAGTACTATTGTCAACAGGCTTAACAGTTCCTCT
   P T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P
376  CCGACTTCCCGCAGCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCC
   S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K
451  TCTGATGAGCAGTTCGAATCTGGAAGTCCCTCTGTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
   V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D
526  GTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCCCAATCCGGTAACTCCAGGACAGTGTCA CAGAGCAGGACAGGACAGGAC
   S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E
601  AGCAGCTTACAGCTCCAGCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCCAGCTCC
   V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C *
676  GTACCCATCAGGCGCTGAGCTCCCGCTCCAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG

```

Фиг. 5B

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:7) тяжелой цепи Ha22-2(2,4)6.1.  
 Двойной линией подчеркнута лидерная последовательность, подчеркнута  
 вариабельная область тяжелой цепи, и пунктирной линией подчеркнута константная  
 область человеческого IgG1.

```

1  MELGLCWVFLVAILEGVOCEVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS
51  YNMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLSL
101 QMNSLRDEDTAVYYCARAYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
151 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS
201 LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPA
251 PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
301 VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP
351 IEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
401 ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSVMHEA
451 LHNHYTQKSLSLSPGK

```

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO:8) легкой цепи Ha22-2(2,4)6.1.  
 Двойной линией подчеркнута лидерная последовательность, подчеркнута  
 вариабельная область легкой цепи, и пунктирной линией подчеркнута человеческая  
 константная область каппа.

```

1  MDMRVPAOLLGLLLWFPGSRCDIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQG
51  ISGWLAWYQOKPGKAPKFLIYAASTLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISSL
101 QPEDFATYYCQQANSFPPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
151 TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST
201 LTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

```

Фиг. 5С

