

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202393314 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.02.01

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.06.29

(54) СПОСОБ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО СОСТАВА

(31) 63/216,616

(72) Изобретатель:

(32) 2021.06.30

Ци Вэй, Рен Синди (US)

(33) US

(74) Представитель:

(86) PCT/US2022/035533

Медведев В.Н. (RU)

(87) WO 2023/278585 2023.01.05

(71) Заявитель:

ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(57) В данном документе представлен способ, включающий: (а) восстановление лиофилизованного состава, содержащего полипептид, сахарид, поверхностно-активное вещество и буфер, с помощью разбавителя, предусматривающего ароматический спирт, соединение на основе фенола или аминокислоту с ароматической боковой цепью, и (b) введение восстановленного состава нуждающемуся в этом субъекту в течение 12 часов после восстановления, где полипептид представляет собой конструкцию на основе биспецифического антитела, такую как конструкция на основе биспецифического антитела, которая связывает DLL3 человека и CD3 человека, и необязательно содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 9.

A1

202393314

202393314

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579853EA/019

СПОСОБ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО СОСТАВА

Область техники, к которой относится изобретение

[0001] Настоящее раскрытие относится к области терапевтических средств на основе белка и способам их применения.

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ И ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0002] Данная заявка испрашивает преимущество приоритета предварительной заявки на патент США № 63/216616, поданной 30 июня 2021 года, полное содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[0003] Машиночитаемый перечень нуклеотидных/аминокислотных последовательностей, включенный посредством ссылки во всей своей полноте, подается одновременно с данной заявкой и обозначен следующим образом: файл в формате ASCII (текстовый) размером 362 780 байт под названием «56395_Seqlisting.txt», созданный 29 июня 2022 года.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0004] В настоящее время фармацевтические препараты на основе белков, таких как рекомбинантные белки, могут быть получены с высокой степенью чистоты при их первичном изготовлении, благодаря достижениям в способах очистки в промышленном масштабе. Тем не менее, белки обладают низкой степенью стабильности и в высокой степени подвержены как химической, так и физической деградации. Химическая деградация относится к модификациям, в которые вовлечены ковалентные связи, таким как дезамидирование, окисление, расщепление, отщепление/фрагментация, образование новых дисульфидных связей, гидролиз, изомеризация или дегликозилирование. Физическая деградация включает разворачивание белка, нежелательную адсорбцию на поверхностях и агрегацию. Решение проблем, обусловленных такой физической и химической нестабильностью, является одной из наиболее сложных задач при разработке фармацевтических препаратов на основе белков (Chi et al., Pharm Res, Vol. 20, №. 9, Sept 2003, pp. 1325-1336, Roberts, Trends Biotechnol. 2014 Jul;32(7):372-80).

[0005] Агрегация является важным видом физической нестабильности, наблюдаемой в составах на основе белка. Это сборка из изначально нативных и свернутых белков в высокомолекулярные соединения (НМВ). Биспецифические антигенсвязывающие полипептиды с увеличенным периодом полужизни, рекрутирующие Т-клетки, такие как, например, молекулы биспецифического активатора, рекрутирующие Т-клетки (ViTE®), содержащие форму, удлиняющую период полужизни, такую как Fc-молекулы, склонны к агрегации белков и/или другим событиям деградации. Агрегация белков в молекулах ViTE® является проблематичной, поскольку это может ухудшить биологическую активность терапевтических белков. Кроме того, есть опасение, что наличие агрегированных белков (даже гуманизированных или полностью человеческих

белков) может увеличить риск развития у пациента иммунного ответа на активный мономер белка, что приводит к образованию нейтрализующих антител и лекарственной устойчивости или другим неблагоприятным побочным эффектам (Mahler J Pharm Sci. 2009 Sep;98(9):2909-34). Хотя белковые агрегаты удаляются в виде примесей, например, на стадиях тонкой очистки последующей обработки, агрегаты могут образовываться после транспортировки в клинические учреждения и после обращения с ними практикующими врачами.

[0006] В данной области техники существует потребность в составах и способах, позволяющих минимизировать количество высокомолекулярных соединений в составах, полученных для введения пациентам, и связанные с этим неудобства при работе с терапевтическими препаратами на основе белка в пунктах оказания медицинской помощи.

Сущность изобретения

[0007] Настоящее раскрытие предусматривает способ, включающий: (a) восстановление лиофилизированного состава, содержащего полипептид, сахарид, поверхностно-активное вещество и буфер, с помощью разбавителя, предусматривающего ароматический спирт, соединение на основе фенола или аминокислоту с ароматической боковой цепью, и (b) введение восстановленного состава нуждающемуся в этом субъекту в течение 12 часов после восстановления. В различных аспектах полипептид представляет собой конструкцию на основе биспецифического антитела. В различных аспектах полипептид связывает DLL3 человека и CD3 человека, такой как, полипептид, содержащий аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 9. Необязательно разбавитель предусматривает бензиловый спирт, фенол, м-крезол или фенилаланин. Также необязательно pH восстановленного состава составляет от приблизительно 4 до приблизительно 7 и/или восстановленный состав содержит от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл полипептида. В различных аспектах буфер представляет собой глутаматный буфер, сахарид представляет собой сахарозу и/или поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80. Например, в иллюстративном аспекте состав перед лиофилизацией содержит 15 мМ глутамата, 9% (вес/объем) сахарозы и 0,01% (вес/объем) полисорбата 80, где состав характеризуется pH 4,2. В различных аспектах субъект страдает от рака, такого как мелкоклеточный рак легкого (SCLC), немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), глиома, глиобластома, меланома, нейроэндокринный рак предстательной железы, нейроэндокринный рак поджелудочной железы, гепатобластома или гепатоцеллюлярная карцинома.

[0008] Следует понимать, что хотя различные варианты осуществления в данном описании представлены с использованием формулировки «содержащий», при различных обстоятельствах соответствующий вариант осуществления также может быть описан с использованием формулировок «состоящий из» или «состоящий по сути из». В настоящем раскрытии рассматриваются варианты осуществления, описанные как «содержащие» признак, в том числе варианты осуществления, которые «состоят из» или «состоят по сути из» признака. Форма единственного числа относится к одному или нескольким; например,

под «молекулой иммуноглобулина» понимается, что она означает одну или несколько молекул иммуноглобулина. Как таковые, формы единственного числа, выражения «один или несколько» и «по меньшей мере один» могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо.

[0009] Также следует понимать, что при описании диапазона значений описываемая характеристика может представлять собой отдельное значение, которое находится в пределах диапазона. Например, «рН от приблизительно рН 4 до приблизительно рН 6» могло бы составлять без ограничения рН 4, 4,2, 4,6, 5,1, 5,5 и т. п. и любое значение между такими значениями. Более того, выражение «рН от приблизительно рН 4 до приблизительно рН 6» не следует истолковывать как означающее то, что рН рассматриваемого состава варьируется на 2 единицы рН в диапазоне от рН 4 до рН 6 во время хранения, но следует понимать как то, что значение рН раствора может быть выбрано в этом диапазоне, и при этом рН остается буферизованным при приблизительно данном значении рН. В любом из диапазонов, описанных в данном документе, предельные значения диапазона включены в диапазон. Однако описание также предусматривает те же диапазоны, из которых исключено более низкое и/или более высокое предельные значения.

[0010] Если используется термин «приблизительно», он означает указанное число плюс или минус 5%, 10%, 15% или больше от указанного числа. Фактическое предполагаемое отклонение определяется по контексту.

[0011] Дополнительные признаки и вариации настоящего раскрытия будут очевидны специалистам в данной области техники из всего объема данной заявки, включающей фигуры, подробное описание и приложенную формулу изобретения, и все такие признаки предполагаются как аспекты настоящего раскрытия. Подобным образом характеристики настоящего изобретения, описанные в данном документе, могут быть повторно объединены в дополнительные варианты осуществления, которые также предполагаются как аспекты настоящего изобретения, независимо от того, являются ли они комбинацией характеристик, конкретно указанных выше как аспект или вариант осуществления настоящего изобретения. Кроме того, только такие ограничения, которые описаны в данном документе как критичные для настоящего изобретения, следует рассматривать как таковые; варианты настоящего изобретения, лишённые ограничений, которые не были описаны в данном документе как критичные, рассматриваются как аспекты настоящего изобретения.

[0012] Все приведенные в данном документе ссылки, включая патенты, патентные заявки, литературные публикации и т. п., включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0013] На фигуре 1 представлен линейный график, иллюстрирующий процентное содержание высокомолекулярных соединений (HMW%), идентифицированных с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) (y-ось) в зависимости от времени (часы)

(x-ось) с последующим восстановлением лиофилизированного состава с использованием стерильной воды для инъекций (sWFI, темные круги), WFI, содержащей 0,9% бензиловый спирт (bWFI, темные треугольники), солевой раствор («х»), солевой раствор, содержащий 0,9% бензиловый спирт (незакрашенные треугольники), полисорбат 80 (незакрашенные ромбы) или стабилизатор раствора для внутривенного введения (IVSS, темные ромбы). Исследование проводили при 8°C.

[0014] На фигуре 2 представлен линейный график, иллюстрирующий процентное содержание высокомолекулярных соединений (HMW%), идентифицированных с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) (y-ось) в зависимости от времени (часы) (x-ось) с последующим восстановлением лиофилизированного состава при 8°C и 25°C с использованием стерильной воды для инъекций (sWFI, темные круги=8°C, незакрашенные круги=25°C), фенилаланина (темные квадраты=8°C, незакрашенные квадраты=25°C) или WFI, содержащей 0,9% бензиловый спирт (bWFI, темные треугольники= 8°C, незакрашенные треугольники= 25°C).

[0015] На фигуре 3 представлен линейный график, иллюстрирующий процентное содержание высокомолекулярных соединений (HMW%), идентифицированных с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) (y-ось) в зависимости от времени (часы) (x-ось) с последующим восстановлением лиофилизированного состава с использованием стерильной воды для инъекций (sWFI, темные круги), фенилаланина (Phe, темные квадраты), фенола («х»), м-крезола (темные ромбы) или WFI, содержащей 0,9% бензиловый спирт (bWFI, темные треугольники). Исследование проводили при 8°C.

[0016] На фигуре 4 представлен линейный график, иллюстрирующий процентное содержание высокомолекулярных соединений (HMW%), идентифицированных с помощью эксклюзионной хроматографии (SEC) (y-ось) в зависимости от времени (минуты) (x-ось) с последующим восстановлением лиофилизированного состава с использованием WFI, содержащей 0,9% бензиловый спирт. Исследование проводили при 25°C. Измерение SEC проводили при 8°C. Две линии представляют собой отдельные анализы, выполненные на двух лиофилизированных образцах.

[0017] На фигуре 5 представлена гистограмма, иллюстрирующая влияние различных концентраций бензилового спирта на диссоциацию высокомолекулярных соединений с последующим восстановлением лиофилизированной молекулы ViTE®, содержащей SEQ ID NO: 75 и 9. Концентрация бензилового спирта отмечена по x-оси (1,0 mM, 10,0 mM, 41,6 mM и 83,2 mM), а $t_{90\%}$ ч. отмечено по y-оси.

[0018] На фигуре 6 приведена таблица, в которой указаны различные последовательности, упомянутые в данном документе.

Подробное описание

[0019] Несмотря на высокое качество современных терапевтических биотехнологических продуктов и сходство рекомбинантных белков человека и антител с эндогенными белками человека, нестабильность белка остается важной проблемой. Обработка составов терапевтических конструкций на основе антитела связана со

значительными проблемами, поскольку условия должны поддерживать структуру белка высшего порядка при минимизации деградации и агрегации, что негативно влияет на терапевтическую эффективность и повышает потенциальную иммуногенность для пациента. Для решения проблем, связанных с хранением и транспортировкой, многие терапевтические препараты на основе белка подвергаются лиофилизации. Тем не менее, при обработке и получении терапевтического препарата в клинике также создаются условия, способствующие нестабильности, включая образование нежелательных высокомолекулярных соединений, которые могут вызывать нежелательный иммунный ответ, неблагоприятные побочные эффекты или влиять на общую эффективность. Биспецифические антигенсвязывающие полипептиды, рекрутирующие Т-клетки, описанные в данном документе, например, при определенных условиях имеют склонность к образованию агрегатов при восстановлении лиофилизированных составов. Хотя с течением времени уровень HMW соединений может диссоциировать, период времени, необходимый для достижения «равновесия» (т. е. достижения стабильного, целевого уровня HMW соединений), может быть значительным. Например, восстановление лиофилизированного состава, содержащего описанную в данном документе молекулу ViTE®, в воде для инъекций вызывает резкое увеличение образования HMW соединений, для диссоциации которых требуется более 24 часов при 8°C и 12 часов или более при 25°C. Это создает проблемы в клинических учреждениях, поскольку лиофилизированные составы восстанавливаются и хранятся в течение длительного периода времени перед введением субъекту с целью минимизировать HMW соединения. Это доставляет неудобства, требует дополнительных площадей для хранения восстановленных составов и добавляет уровень вмешательства, который может дополнительно повлиять на стабильность. Неожиданно, но восстановление лиофилизированного состава полипептида, описанного в данном документе, с помощью разбавителя, предусматривающего ароматический спирт (например, бензиловый спирт), соединение на основе фенола (например, фенол или м-крезол) или аминокислоту с ароматической боковой цепью (фенилаланин), значительно уменьшает время, необходимое для диссоциации HMW соединений в восстановленной композиции. Таким образом, время между восстановлением и введением сокращается, что дает практическое преимущество практикующим врачам и пациентам.

[0020] Настоящее раскрытие предусматривает способ, включающий: (a) восстановление лиофилизированного состава, содержащего полипептид, сахарид, поверхностно-активное вещество и буфер, с помощью разбавителя, предусматривающего ароматический спирт (например, бензиловый спирт), соединение на основе фенола (например, фенол или м-крезол) или аминокислоту с ароматической боковой цепью (фенилаланин), и (b) введение восстановленного состава нуждающемуся в этом субъекту в течение 12 часов после восстановления. В различных аспектах полипептид связывает DLL3 человека и CD3 человека и необязательно содержит SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 9.

[0021] Различные аспекты настоящего раскрытия описаны ниже. Заголовки

разделов используются только для удобства чтения и не предназначены для ограничения *per se*. Весь документ предназначен для рассмотрения в качестве единого раскрытия, и следует понимать, что предусмотрены все комбинации описанных в данном документе признаков.

[0022] *Полипептиды*

[0023] В иллюстративных аспектах полипептид лиофилизированного состава представляет собой антитело или иммуноглобулиноподобную конструкцию, которая включает традиционные форматы антител и их антигенсвязывающие фрагменты, а также конструкции, основанные на структурных особенностях антител, позволяющих связывать антиген. Термин «антитело» относится к интактному антигенсвязывающему иммуноглобулину. Антитело может представлять собой антитело IgA, IgD, IgE, IgG или IgM, в том числе любое из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В различных аспектах интактное антитело содержит две полноразмерные тяжелые цепи и две полноразмерные легкие цепи. Антитело содержит переменную область и константную область. В форматах IgG переменная область обычно содержит приблизительно 100-110 или больше аминокислот, содержит три области, определяющие комплементарность (CDR), в первую очередь отвечает за распознавание антигена и существенно отличается среди других антител, которые связываются с различными антигенами. Переменная область, как правило, содержит по меньшей мере три CDR тяжелой или легкой цепи (Kabat et al., 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Public Health Service NIH, Bethesda, MD; см. также Chothia and Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia et al., 1989, *Nature* 342: 877-883) в пределах каркасной области (обозначенные как каркасные области 1-4, FR1, FR2, FR3 и FR4 согласно Kabat et al., 1991; см. также Chothia and Lesk, 1987, выше). Константная область позволяет антителу рекрутировать клетки и молекулы иммунной системы.

[0024] Белок или полипептид лиофилизированного состава в различных аспектах является «биспецифическим», поскольку он связывает два различных антигена-мишени. Рассматриваются также «полиспецифические» конструкции, которые связывают более двух различных антигенов-мишеней (например, три различных антигена-мишени). «Биспецифическая» конструкция на основе антитела обычно содержит первый связывающий домен и второй связывающий домен, где первый связывающий домен связывается с одним антигеном или мишенью (например, антигеном поверхности клетки-мишени), а второй связывающий домен связывается с другим антигеном или мишенью (например, CD3). Соответственно, конструкция на основе антитела необязательно обладает специфичностями в отношении двух различных антигенов или мишеней. Термин «поверхностный антиген клетки-мишени» относится к антигенной структуре, которая экспрессируется клеткой и которая присутствует на клеточной поверхности, так что она является доступной для конструкции на основе антитела, описанной в данном документе. Он может представлять собой белок, предпочтительно внеклеточную часть белка, или углеводную структуру, предпочтительно углеводную структуру белка, такого как

гликопротеин.

[0025] Полиспецифические (например, биспецифические) антитела и/или полиспецифические (например, биспецифические) конструкции на основе антитела включают без ограничения традиционные биспецифические иммуноглобулины (например, BsIgG), IgG, содержащий один или несколько присоединенных антигенсвязывающих доменов (например, амино- или карбоксиконцы легкой или тяжелой цепей соединены с дополнительными антигенсвязывающими доменами, такими как однодоменные антитела или спаренные переменные домены антител (например, Fv или scFv)), фрагменты BsAb (например, биспецифические одноцепочечные антитела), полиспецифические (например, биспецифические) слитые полипептиды (например, антигенсвязывающие домены, слитые с эффекторным фрагментом) и конъюгаты BsAb. См., например, Spiess et al., *Molecular Immunology* 67(2) Part A: 97-106 (2015), в которой описаны различные биспецифические форматы и которая включена в данный документ посредством ссылки. Примеры конструкций на основе биспецифического антитела включают без ограничения диатела, одноцепочечные диатела, тандемные scFv, биспецифические форматы активаторов, рекрутирующих Т-клетки (BiTE®) (слитый белок, состоящий из двух одноцепочечных переменных фрагментов (scFv), соединенных линкером), биспецифические Fab₂, одноцепочечные биспецифические Fab₂, а также разработанные конструкции, содержащие полноразмерные антитела (например, полноразмерные антитела с мутациями Fc, облегчающими сборку мультиспецифических конструкций). В настоящем раскрытии также рассматриваются scFv-однодоменные антитела, содержащие по меньшей мере одно отдельное однодоменное антитело (например, два однодоменных антитела) и один scFv, необязательно соединенные линкерами. См. также, например, Chames & Baty, 2009, *mAbs* 1[6]:1-9; и Holliger & Hudson, 2005, *Nature Biotechnology* 23[9]:1126-1136; Wu et al., 2007, *Nature Biotechnology* 25[11]:1290-1297; Michaelson et al., 2009, *mAbs* 1[2]:128-141; публикации международных заявок № 2009032782 и 2006020258; Zuo et al., 2000, *Protein Engineering* 13[5]:361-367; публикацию заявки на патент США № 20020103345; Shen et al., 2006, *J Biol Chem* 281[16]:10706-10714; Lu et al., 2005, *J Biol Chem* 280[20]:19665-19672; и Kontermann, 2012 *MAbs* 4(2):182, все из которых в явной форме включены в данный документ. В различных аспектах полипептид представляет собой конструкцию BiTE® или BiTE® HLE.

[0026] Термин «связывающий домен» относится к домену, который (специфично) связывается с (т. е. взаимодействует с или распознает) указанным эпитопом-мишенью или указанным сайтом-мишенью на молекуле-мишени (антигене), такой как, например, CDH19, MSLN, DLL3, FLT3, EGFRvIII, BCMA, PSMA, CD33, CD19, CD70, CLDN18.2, MUC17 или CD3. В конструкции на основе биспецифического антитела, например, структура и функция первого связывающего домена (распознающего, например, CDH19, MSLN, DLL3, FLT3, EGFRvIII, BCMA, PSMA, CD33, CD19, CD70, CLDN18.2 или MUC17), а также предпочтительно структура и/или функция второго связывающего домена (распознающего CD3), основана/основаны на структуре и/или функции антитела,

например, полноразмерной или целой молекулы иммуноглобулина. В качестве альтернативы структура и функция определяются по доменам вариабельной области тяжелой цепи (VH) и/или вариабельной области легкой цепи (VL) антитела или его фрагмента. Предпочтительно первый связывающий домен характеризуется наличием трех CDR легкой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и CDR3 области VL) и/или трех CDR тяжелой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и CDR3 области VH). Второй связывающий домен предпочтительно также предусматривает минимальные структурные требования к антителу, которые обеспечивают связывание мишени. Более предпочтительно второй связывающий домен содержит по меньшей мере три CDR легкой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и CDR3 области VL) и/или три CDR тяжелой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и CDR3 области VH). В различных аспектах один или несколько антигенсвязывающих доменов являются человеческими, или гуманизированными, или химерными.

[0027] В некоторых аспектах лиофилизированный белок представляет собой конструкцию на основе биспецифического антитела (например, биспецифический антигенсвязывающий полипептид, рекрутирующий Т-клетки), содержащую первый связывающий домен, который связывается с опухолевым антигеном (например, DLL3), второй связывающий домен, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки, и необязательно третий домен, содержащий, в направлении от аминоконца к карбоксильному концу, шарнирная область-домен CH2-домен CH3-линкер-шарнирная область-домен CH2-домен CH3. В некоторых аспектах каждый из первого и второго связывающих доменов содержит область VH и область VL.

[0028] Связывающие домены и вариабельные домены (VH/VL) антигенсвязывающего полипептида могут содержать или не содержать пептидные линкеры (спейсерные пептиды). Пептидный линкер может соединять один вариабельный и/или связывающий домен с другим вариабельным и/или связывающим доменом. Пептидные линкеры также могут быть использованы для слияния третьего домена с другими доменами биспецифического антигенсвязывающего полипептида, рекрутирующего Т-клетки. Среди подходящих пептидных линкеров описаны те, которые приведены в патентах США № 4751180 и № 4935233 или публикации международной заявки WO 88/09344, раскрытие которых включено в данный документ путем ссылки во всей своей полноте. Пептидные линкеры также могут применяться для присоединения других доменов, или модулей, или областей (таких как домены, продлевающие время полужизни) к биспецифическому антигенсвязывающему полипептиду, рекрутирующему Т-клетки, описанному в данном документе.

[0029] В некоторых аспектах белок или полипептид содержит третий домен, содержащий все или часть «Fc», или «области Fc», или «домена Fc», который относится к полипептиду, содержащему константную область антитела, за исключением первого домена иммуноглобулина с константной областью. Таким образом, «домен Fc» относится к последним двум доменам константной области иммуноглобулинов IgA, IgD и IgG, последним трем доменам константной области иммуноглобулинов IgE и IgM и гибкой

шарнирной области, расположенной со стороны N-конца по отношению к этим доменам. В случае IgA и IgM, Fc может включать J-цепь. В случае IgG, домен Fc содержит домены иммуноглобулинов C γ 2 и C γ 3 (C γ 2 и C γ 3) и нижнюю шарнирную область между C γ 1 (C γ 1) и C γ 2 (C γ 2). Биспецифический антигенсвязывающий полипептид, рекрутирующий Т-клетки, предпочтительно представляет собой антитело IgG (которое включает несколько подклассов, включая без ограничения IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4). Хотя границы области Fc могут изменяться, область Fc тяжелой цепи IgG человека обычно определяется по включению остатков C226 или P230 в ее карбоксильный конец, где нумерация соответствует EU-индексу по Kabat. В некоторых аспектах в область Fc вносят аминокислотные модификации, например, для изменения связывания с одним или несколькими рецепторами Fc γ R или с рецептором FcRn.

[0030] В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный состав, описанный в данном документе, содержит конструкцию на основе биспецифического антитела, содержащую первый связывающий домен, который связывается с целевым антигеном клеточной поверхности, и второй связывающий домен, который связывается с CD3 человека на поверхности Т-клетки. В любом из аспектов, описанных в данном документе, поверхностный антиген клетки-мишени представляет собой CDH19, MSLN, DLL3, FLT3, EGFR, EGFRvIII, BCMA, PSMA, CD33, CD19, CD70, MUC17 или CLDN18.2. В различных аспектах конструкция на основе биспецифического антитела содержит третий домен, содержащий, в направлении от аминоконца к карбоксильному концу, шарнирная область-домен CH2-домен CH3-линкер-шарнирная область-домен CH2-домен CH3. В некоторых вариантах осуществления каждый из первого и второго связывающих доменов содержит область VH и область VL. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления составы, описанные в данном документе, содержат конструкцию на основе биспецифического антитела, которая связывает CD3 человека и CDH19 человека, или CD3 человека и MSLN человека, или CD3 человека и DLL3 человека, или CD3 человека и FLT3 человека, или CD3 человека и EGFRvIII человека, или CD3 человека и BCMA человека, или CD3 человека и PSMA человека, или CD3 человека и CD33 человека, или CD3 человека и CD19 человека, CD3 человека и CD70 человека, или CD3 человека и MUC17 человека, или CD3 человека и CLDN18.2 человека.

[0031] В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен конструкции на основе биспецифического антитела содержит набор из шести CDR, представленный под (a) SEQ ID NO: 24-29, (b) SEQ ID NO: 34-39, (c) SEQ ID NO: 78-83, (d) SEQ ID NO: 10-15, (e) SEQ ID NO: 46-51, (f) SEQ ID NO: 88-93, (g) SEQ ID NO: 67-72, (h) SEQ ID NO: 56-61, (i) SEQ ID NO: 112-117, (j) SEQ ID NO: 100-105, (k) SEQ ID NO: 148-153, SEQ ID NO: 157-162, или SEQ ID NO: 166-171, или SEQ ID NO: 175-180, (l) SEQ ID NO: 132-137 или (m) SEQ ID NO: 123-128.

[0032] В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен конструкции на основе биспецифического антитела содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 90%

идентичной (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной) аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 30, 40, 84, 16, 17, 52, 94, 73, 62, 118, 154, 163, 172, 181, 106, 138, 143 или 129. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен конструкции на основе биспецифического антитела содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 30, 40, 84, 16, 17, 52, 94, 73, 62, 118, 154, 163, 172, 181, 106, 138, 143 или 129.

[0033] В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен конструкции на основе биспецифического антитела содержит область VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 90% идентичной (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной) аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 31, 41, 85, 18, 19, 53, 95, 74, 63, 119, 155, 164, 173, 182, 107, 139, 144 или 130. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен конструкции на основе биспецифического антитела содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 31, 41, 85, 18, 19, 53, 95, 74, 63, 119, 155, 164, 173, 182, 107, 139, 144 или 130.

[0034] В некоторых вариантах осуществления первый связывающий домен содержит: (a) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 30, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 31; (b) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 40, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 41; (c) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 84, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 85; (d) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 16 или 17, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 18 или 19; (e) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 52, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 53; (f) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 94, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 95; (g) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 73, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 74; (h) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 62, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 63; (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 118, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную

под SEQ ID NO: 119; (j) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 154, 163, 172 или 181, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 155, 164, 173 или 182; (k) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 106, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 107; (l) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 138 или 143, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 139 или 144; или (m) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 129, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 130.

[0035] В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен конструкции на основе биспецифического антитела содержит набор из шести CDR, представленный под SEQ ID NO: 1-6. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен конструкции на основе биспецифического антитела содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 90% идентичной (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной) аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен конструкции на основе биспецифического антитела содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен конструкции на основе биспецифического антитела содержит область VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 90% идентичной (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной) аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен конструкции на основе биспецифического антитела содержит VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления второй связывающий домен содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8.

[0036] В некоторых вариантах осуществления конструкция на основе биспецифического антитела содержит первый связывающий домен, который связывает CD19, содержащий переменный домен легкой цепи антитела к CD19, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 85, и переменный домен тяжелой цепи антитела к CD19, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 84, второй связывающий домен, содержащий переменный домен тяжелой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность

цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в одном варианте осуществления конструкция на основе биспецифического антитела содержит первый связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, и второй связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления конструкция на основе биспецифического антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 33.

[0040] В некоторых вариантах осуществления конструкция на основе биспецифического антитела содержит первый связывающий домен, который связывает ВСМА, содержащий переменный домен легкой цепи антитела к ВСМА, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95, и переменный домен тяжелой цепи антитела к ВСМА, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94, второй связывающий домен, содержащий переменный домен тяжелой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в одном варианте осуществления конструкция на основе биспецифического антитела содержит первый связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 96, и второй связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления конструкция на основе биспецифического антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 98 или SEQ ID NO: 97.

[0041] В некоторых вариантах осуществления конструкция на основе биспецифического антитела содержит первый связывающий домен, который связывает PSMA, содержащий переменный домен легкой цепи антитела к PSMA, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 119 или 107, и переменный домен тяжелой цепи антитела к PSMA, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 118 или 106, второй связывающий домен, содержащий переменный домен тяжелой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в одном варианте осуществления конструкция на основе биспецифического антитела содержит первый связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120 или 108, и второй связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления конструкция на основе биспецифического антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 121, 122, 109, 110 или 111.

[0042] В некоторых вариантах осуществления конструкция на основе биспецифического антитела содержит первый связывающий домен, который связывает

CD33, содержащий переменный домен легкой цепи антитела к CD33, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или 19, и переменный домен тяжелой цепи антитела к CD33, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или 17, второй связывающий домен, содержащий переменный домен тяжелой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в одном варианте осуществления конструкция на основе биспецифического антитела содержит первый связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 189 или 190, и второй связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления конструкция на основе биспецифического антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 20, 21, 22 или 23.

[0043] В некоторых вариантах осуществления конструкция на основе биспецифического антитела содержит первый связывающий домен, который связывает CDH19, содержащий переменный домен легкой цепи антитела к CDH19, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53, и переменный домен тяжелой цепи антитела к CDH19, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52, второй связывающий домен, содержащий переменный домен тяжелой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в одном варианте осуществления конструкция на основе биспецифического антитела содержит первый связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54, и второй связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления конструкция на основе биспецифического антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 55.

[0044] В некоторых вариантах осуществления конструкция на основе биспецифического антитела содержит первый связывающий домен, который связывает MUC17, содержащий переменный домен легкой цепи антитела к MUC17, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 155, 164, 173 или 182, и переменный домен тяжелой цепи антитела к MUC17, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 154, 163, 172 или 181, второй связывающий домен, содержащий переменный домен тяжелой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменный домен легкой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в вариантах осуществления конструкция на основе биспецифического антитела содержит первый связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 194, и второй связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 195 (необязательно с доменом Fc,

содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 196). В некоторых вариантах осуществления конструкция на основе биспецифического антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 156, 165, 174 или 183.

[0045] В некоторых вариантах осуществления конструкция на основе биспецифического антитела содержит первый связывающий домен, который связывает cldn18.2, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела к cldn18.2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 139 или 144, и вариабельный домен тяжелой цепи антитела к cldn18.2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 138 или 143, второй связывающий домен, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и вариабельный домен легкой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в одном варианте осуществления конструкция на основе биспецифического антитела содержит первый связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 140 или 145, и второй связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления конструкция на основе биспецифического антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 141, 142, 146 или 147.

[0046] В некоторых вариантах осуществления конструкция на основе биспецифического антитела содержит первый связывающий домен, который связывает CD70, содержащий вариабельный домен легкой цепи антитела к CD70, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 130, и вариабельный домен тяжелой цепи антитела к CD70, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 129, второй связывающий домен, содержащий вариабельный домен тяжелой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и вариабельный домен легкой цепи антитела к CD3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Например, в вариантах осуществления конструкция на основе биспецифического антитела содержит первый связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 191, и второй связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 192 (необязательно с доменом Fc, содержащим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 193). В некоторых вариантах осуществления конструкция на основе биспецифического антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 131.

[0047] В различных аспектах лиофилизированный состав содержит полипептид, который связывается с DLL3 человека (дельта-подобный лиганд 3; UniProtKB - Q9NYJ7) и CD3 человека (кластер дифференцировки 3). В этом отношении полипептид представляет собой антигенсвязывающий белок или полипептид, содержащий остов или каркасную часть, которые позволяют антигенсвязывающему домену принимать конформацию,

способствующую связыванию антигенсвязывающего полипептида с антигеном (т. е. DLL3 или CD3). В различных аспектах настоящего раскрытия полипептид содержит антигенсвязывающие домены, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 75 и 9. Структура и функция антигенсвязывающих доменов может быть основана на структуре и/или функции антитела, например, молекуле полноразмерного или целого иммуноглобулина, и/или получена из доменов переменной области тяжелой цепи (VH) и/или переменной области легкой цепи (VL) антитела. Связывающие домены, как правило, характеризуются наличием трех CDR легкой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и CDR3 области VL) и/или трех CDR тяжелой цепи (т. е. CDR1, CDR2 и CDR3 области VH) вместе с минимальными структурными требованиями, обеспечивающими связывание с мишенью. В некоторых аспектах связывающий домен содержит одноцепочечный антигенсвязывающий полипептид, содержащий, например, переменный домен тяжелой цепи, линкер scFv и переменный домен легкой цепи. Необязательно С-конец переменной области легкой цепи присоединен к N-концу линкера scFv, С-конец которого присоединен к N-концу переменной области тяжелой цепи (N-vh-линкер-vl-C), хотя эта конфигурация может быть переставлена (N-vl-линкер-vh-C). В качестве альтернативы С-конец переменной области тяжелой цепи может быть присоединен к N-концу линкера scFv, С-конец которого присоединен к N-концу переменной области легкой цепи (N-vl-линкер-vh-C), хотя конфигурация может быть переставлена (N-vh-линкер-v-C).

[0048] В различных аспектах состав, описанный в данном документе, содержит полипептид (например, биспецифический антигенсвязывающий полипептид, рекрутирующий Т-клетки), который связывает CD3 человека и DLL3 человека. В некоторых аспектах полипептид содержит первый связывающий домен, который связывает DLL3, и содержит набор из шести CDR, представленный под SEQ ID NO: 67-72. В некоторых аспектах DLL3-связывающий домен содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 90% идентичной (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной) аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 73. В некоторых аспектах DLL3-связывающий домен полипептида содержит область VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 90% идентичной (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной) аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 74. Например, DLL3-связывающий домен может содержать область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 73, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 74, например, связывающий домен, содержащий аминокислоту SEQ ID NO: 75. В некоторых аспектах CD3-связывающий домен полипептида содержит набор из шести CDR, представленный под SEQ ID NO: 1-6. Например, CD3-связывающий домен необязательно содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность, которая

является на по меньшей мере 90% идентичной (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной) аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 7. В некоторых аспектах CD3-связывающий домен полипептида содержит область VL, содержащую аминокислотную последовательность, которая является на по меньшей мере 90% идентичной (например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной) аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 8. В некоторых аспектах, где второй связывающий домен содержит область VH, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7, и область VL, содержащую аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 8, например, связывающий домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9. В некоторых аспектах полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 76 или 77.

[0049] В различных вариантах осуществления биспецифический антигенсвязывающий полипептид, рекрутирующий Т-клетки, представляет собой тарлатамаб (международные непатентованные наименования фармацевтических веществ (INN): предложенное INN: перечень 123, Информация по лекарственным средствам WHO, 34(2): 395-397 (2020)), также известный как AMG 757. Тарлатамаб представляет собой иммуноглобулин scFv-scFv-scFc, антитело к [DLL3 Homo sapiens (дельта-подобный лиганд 3)] и к [CD3E Homo sapiens (CD3-эпсилон, Leu-4)], моноклональное одноцепочечное антитело (scFv)₂-scFc, биспецифическое; одноцепочечный IG scFv-scFv-scFc, антитело к DLL3 и к CD3E (1-982) [антитело к DLL3 scFv-VH-V-каппа (1-241) [VH (Homo sapiens, IGHV4-59*01 G49>C (44) (96,9%) -(IGHD) -IGHJ4*01 (100%)), CDR-IMGT [8.7.12] (26-33.51-57.96-107) (1-118)-15-мерный трис(тетраглицилсерильный) линкер (119-133)-V-КАППА (Homo sapiens, IGKV3-20*01 (91,7%) -IGKJ2*01 Q120>C (234) (90,9%)), CDRIMGT [7.3.9] (160-166.184-186.223-231) (134-241)]-6-мерный серилтетраглицилсерильный линкер (242-247) -scFv-VH-V-лямбда антитела к CD3E (248-496) [VH (Mus musculus, IGHV10-1*02 (91,9%) - (IGHD) -IGHJ3*01 (86,7%)/Homo sapiens, IGHV3-73*01 (87,0%) -(IGHD)-IGHJ5*01 (100%)), CDR-IMGT [8.10.16] (273-280.298-307.346-361) (248-372)-15-мерный трис(тетраглицилсерильный)линкер (373-387)-V-ЛЯМБДА (Homo sapiens, IGLV7-43*01 (85,1%) -IGLJ3*02 (100%)), CDR-IMGT [9.3.9] (413-421.439-441.478-486) (388-496)]-4-мерный тетраглициловый линкер (497-500) - scFc (h-CH2-CH3)-(h-CH2-CH3) (501-982) [Homo sapiens, IGHG1*03 h-CH2-CH3, nG1m1 (шарнир 6-15 (501-510), CH2 R83>C (572), N84.4>G (577), V85>C (582) (511-620), CH3 E12 (636), M14 (638) (621-725), CHS>del) (501-725)-30-мерный гексакис(тетраглицилсерильный)линкер (726-755) -Homo sapiens, IGHG1*03 h-CH2-CH3, nG1m1 (шарнир 6-15 (756-765), CH2 R83>C (827), N84.4>G (832), V85>C (837) (766-875), CH3 E12 (891), M14 (893) (876-980), CHS (981-982)) (756-982), негликозилированный, продуцируемый в клетках яичника китайского хомячка (CHO); иммуномодулятор, антинеопластическое средство.

[0050] Необязательно полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 187 или SEQ ID NO: 188, такую как аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 174 или SEQ ID NO: 183.

[0051] В некоторых аспектах восстановленный состав содержит полипептид (например, биспецифический антигенсвязывающий полипептид, рекрутирующий Т-клетки) в концентрации в диапазоне от приблизительно 0,5 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл (например, от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл или приблизительно 15 мг/мл). В некоторых аспектах восстановленный состав содержит полипептид в концентрации приблизительно 1 мг/мл, приблизительно 2 мг/мл, приблизительно 3 мг/мл, приблизительно 4 мг/мл, приблизительно 5 мг/мл, приблизительно 6 мг/мл, приблизительно 7 мг/мл, приблизительно 8 мг/мл, приблизительно 9 мг/мл, приблизительно 10 мг/мл, приблизительно 11 мг/мл, приблизительно 12 мг/мл, приблизительно 13 мг/мл, приблизительно 14 мг/мл, приблизительно 15 мг/мл, приблизительно 16 мг/мл, приблизительно 17 мг/мл, приблизительно 18 мг/мл, приблизительно 19 мг/мл или приблизительно 20 мг/мл или любой диапазон между этими конечными точками. В качестве альтернативы восстановленный состав содержит полипептид в концентрации приблизительно 25 мг/мл, приблизительно 30 мг/мл, приблизительно 35 мг/мл, приблизительно 40 мг/мл, приблизительно 45 мг/мл или приблизительно 50 мг/мл или любой диапазон между этими конечными точками. В различных аспектах восстановленный состав содержит полипептид в концентрации по меньшей мере приблизительно 1 мг/мл, приблизительно 2 мг/мл, приблизительно 3 мг/мл, приблизительно 4 мг/мл, приблизительно 5 мг/мл, приблизительно 6 мг/мл, приблизительно 7 мг/мл, приблизительно 8 мг/мл, приблизительно 9 мг/мл или приблизительно 10 мг/мл и не выше, чем приблизительно 15 мг/мл, 20 мг/мл, 25 мг/мл, приблизительно 30 мг/мл, приблизительно 35 мг/мл, приблизительно 40 мг/мл, приблизительно 45 мг/мл или приблизительно 50 мг/мл. Например, восстановленный состав необязательно содержит полипептид в концентрации приблизительно 15 мг/мл.

[0052] Буферы

[0053] Состав по настоящему раскрытию содержит буфер, который необязательно представляет собой ацетатный буфер, глутаматный буфер, цитратный буфер, сукцинатный буфер, тартратный буфер, фумаратный буфер, малеатный буфер,

гистидиновый буфер, фосфатный буфер или их комбинацию. Не обязательно буфер представляет собой глутаматный буфер.

[0054] В некоторых аспектах буфер присутствует в составе в концентрации, что поддерживает рН от приблизительно 4 до приблизительно 7, от приблизительно 4 до приблизительно 6, от приблизительно 4 до приблизительно 5 или приблизительно 4,2. Эффект рН в отношении составов может быть охарактеризован с использованием любого одного или нескольких из некоторого количества подходов, таких как ускоренные исследования стабильности и калориметрические скрининговые исследования (Remmele R.L. Jr., et al., *Biochemistry*, 38(16): 5241-7 (1999)). В контексте лиофилизированного состава буфер может присутствовать в предварительно лиофилизированном составе в концентрации от приблизительно 0,1 мМ до приблизительно 1000 мМ (1 М), такой как от приблизительно 5 мМ до приблизительно 200 мМ (например, от приблизительно 5 мМ до приблизительно 100 мМ). Под «предварительно лиофилизированным составом» подразумевается состав, непосредственно предшествующий лиофилизации. В различных аспектах буфер присутствует в предварительно лиофилизированном составе в концентрации от приблизительно 10 мМ до приблизительно 50 мМ. Подходящие концентрации буфера охватывают концентрации приблизительно 200 мМ или меньше. В некоторых аспектах концентрация буфера составляет: (i) по меньшей мере приблизительно 1 мМ, по меньшей мере приблизительно 2 мМ, по меньшей мере приблизительно 3 мМ, по меньшей мере приблизительно 4 мМ, по меньшей мере приблизительно 5 мМ, по меньшей мере приблизительно 6 мМ, по меньшей мере приблизительно 7 мМ, по меньшей мере приблизительно 8 мМ, по меньшей мере приблизительно 9 мМ, по меньшей мере приблизительно 10 мМ, по меньшей мере приблизительно 11 мМ, по меньшей мере приблизительно 12 мМ, по меньшей мере приблизительно 13 мМ, по меньшей мере приблизительно 14 мМ или по меньшей мере приблизительно 15 мМ и (ii) не более приблизительно 20 мМ, не более приблизительно 30 мМ, не более приблизительно 40 мМ, не более приблизительно 50 мМ, не более приблизительно 60 мМ, не более приблизительно 70 мМ, не более приблизительно 80 мМ, не более приблизительно 90 мМ, не более приблизительно 100 мМ или не более приблизительно 200 мМ. В некоторых аспектах буфер в предварительно лиофилизированном составе присутствует в концентрации приблизительно 190 мМ, приблизительно 180 мМ, приблизительно 170 мМ, приблизительно 160 мМ, приблизительно 150 мМ, приблизительно 140 мМ, приблизительно 130 мМ, приблизительно 120 мМ, приблизительно 110 мМ, приблизительно 100 мМ, приблизительно 80 мМ, приблизительно 70 мМ, приблизительно 60 мМ, приблизительно 50 мМ, приблизительно 40 мМ, приблизительно 30 мМ, приблизительно 20 мМ, приблизительно 19 мМ, приблизительно 18 мМ, приблизительно 17 мМ, приблизительно 16 мМ, приблизительно 15 мМ, приблизительно 14 мМ, приблизительно 13 мМ, приблизительно 12 мМ, приблизительно 11 мМ, приблизительно 10 мМ или приблизительно 5 мМ. В некоторых аспектах концентрация буфера (например, глутамата)

в предварительно лиофилизированном составе составляет приблизительно 15 мМ.

[0055] *Поверхностно-активные вещества*

[0056] Описанные в данном документе составы содержат поверхностно-активное вещество. Иллюстративные поверхностно-активные вещества включают без ограничения полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 80, полоксамер 188, полоксамер 407, Triton® X-100 (2-[4-(2,4,4-триметилпентан-2-ил)феноксигруппы]этанол; CAS № 9002-93-1), полиоксиэтилен, PEG 3350 и PEG 4000, а также их комбинации. Необязательно буфер представляет собой полисорбат 80.

[0057] В некоторых аспектах предварительно лиофилизированный состав содержит поверхностно-активное вещество в концентрации от приблизительно 0,001% до приблизительно 5% вес/объем. Например, в различных случаях концентрация составляет от приблизительно 0,001% до приблизительно 0,5% (например, от приблизительно 0,004 до приблизительно 0,5% вес/объем или от приблизительно 0,001 до приблизительно 0,01% вес/объем или от приблизительно 0,004 до приблизительно 0,01% вес/объем). В некоторых аспектах предварительно лиофилизированный состав содержит поверхностно-активное вещество в концентрации: (i) по меньшей мере приблизительно 0,001%, по меньшей мере приблизительно 0,002%, по меньшей мере приблизительно 0,003%, по меньшей мере приблизительно 0,004%, по меньшей мере приблизительно 0,005%, по меньшей мере приблизительно 0,007%, по меньшей мере приблизительно 0,01%, по меньшей мере приблизительно 0,05%, по меньшей мере приблизительно 0,1%, по меньшей мере приблизительно 0,2%, по меньшей мере приблизительно 0,3%, по меньшей мере приблизительно 0,4%, по меньшей мере приблизительно 0,5%, по меньшей мере приблизительно 0,6%, по меньшей мере приблизительно 0,7%, по меньшей мере приблизительно 0,8%, по меньшей мере приблизительно 0,9% или по меньшей мере приблизительно 1,0% вес/объем и (ii) не более чем приблизительно 2,0%, не более чем приблизительно 1,9%, не более чем приблизительно 1,8%, не более чем приблизительно 1,7%, не более чем приблизительно 1,6%, не более чем приблизительно 1,5%, не более чем приблизительно 1,4%, не более чем приблизительно 1,3%, не более чем приблизительно 1,2%, не более чем приблизительно 1,1%, не более чем приблизительно 1,0%, не более чем приблизительно 0,9%, не более чем приблизительно 0,8%, не более чем приблизительно 0,7%, не более чем приблизительно 0,6% или не более чем приблизительно 0,5% вес/объем. В некоторых аспектах состав содержит поверхностно-активное вещество, включенное в концентрации от приблизительно 0,005% до приблизительно 0,01% вес/объем, например, 0,01% вес/объем. В некоторых аспектах поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат-80, и при этом полисорбат-80 присутствует в концентрации приблизительно 0,01% вес/объем.

[0058] *Сахариды*

[0059] Описанный в данном документе состав содержит сахарид. В некоторых аспектах настоящего раскрытия сахарид представляет собой моносахарид или дисахарид. Например, сахарид необязательно представляет собой глюкозу, галактозу, фруктозу,

ксилозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, трегалозу, сорбит, маннит или ксилит или их комбинацию. В некоторых аспектах сахарид представляет собой сахарозу.

[0060] В некоторых аспектах состав содержит сахарид в концентрации от приблизительно 0,01% до приблизительно 20% вес/объем, или от приблизительно 1% до приблизительно 15%, или от приблизительно 5% до приблизительно 12%, или от приблизительно 7% до приблизительно 12% вес/объем перед лиофилизацией. В некоторых аспектах состав содержит по меньшей мере один сахарид в концентрации: (i) по меньшей мере приблизительно 0,5%, по меньшей мере приблизительно 1%, по меньшей мере приблизительно 2%, по меньшей мере приблизительно 3%, по меньшей мере приблизительно 4%, по меньшей мере приблизительно 5%, по меньшей мере приблизительно 6%, по меньшей мере приблизительно 7%, по меньшей мере приблизительно 8%, по меньшей мере приблизительно 9%, по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 11%, по меньшей мере приблизительно 12%, по меньшей мере приблизительно 13%, по меньшей мере приблизительно 14% или по меньшей мере приблизительно 15% вес/объем и (ii) не более чем приблизительно 20%, не более чем приблизительно 18%, не более чем приблизительно 16%, не более чем приблизительно 15%, не более чем приблизительно 14%, не более чем приблизительно 13%, не более чем приблизительно 12%, не более чем приблизительно 11%, не более чем приблизительно 10%, не более чем приблизительно 9%, не более чем приблизительно 8%, не более чем приблизительно 7%, не более чем приблизительно 6% или не более чем приблизительно 5% вес/объем перед лиофилизацией. В еще одном дополнительном аспекте состав содержит по меньшей мере один сахарид в концентрации приблизительно 7%, приблизительно 7,5%, приблизительно 8%, приблизительно 8,5%, приблизительно 9%, приблизительно 9,5%, приблизительно 10%, приблизительно 10,5%, приблизительно 11%, приблизительно 11,5% или приблизительно 12% вес/объем. В некоторых аспектах по меньшей мере один сахарид находится в составе в концентрации приблизительно 9% вес/объем. В некоторых аспектах сахарид представляет собой сахарозу и присутствует в составе в диапазоне от приблизительно 7% до приблизительно 10% вес/объем, например, 9%.

[0061] Необязательно состав перед лиофилизацией содержит 15 мМ глутамата, 9% (вес/объем) сахарозы и 0,01% (вес/объем) полисорбата 80. pH состава необязательно составляет приблизительно 4,2.

[0062] *Агрегация/высокомолекулярные соединения*

[0063] Используемый в данном документе термин «агрегация» относится к прямому взаимному притяжению между молекулами, например, с помощью сил Ван-дер-Ваальса или образования химической связи. В частности, под агрегацией понимается накопление и слипание белков друг с другом. Агрегаты могут включать аморфные агрегаты и олигомеры и, как правило, называются высокомолекулярными (HMW) соединениями, т. е. молекулами с более высокой молекулярной массой, чем молекулы продукта, которые представляют собой неагрегированные молекулы. Белковые агрегаты

(HMW соединения), как правило, могут отличаться по размеру (в диапазоне от небольших (димеры) до крупных скоплений (невидимые или даже видимые частицы) и от нанометрового до микрометрового диапазона в диаметре), по морфологии (от примерно сферической до фибриллярной), по структуре белка (нативная или ненативная/денатурированная), по типу межмолекулярной связи (ковалентная или нековалентная), по обратимости и растворимости. Растворимые агрегаты охватывают диапазон размеров примерно от 1 до 100 нм, а белковые частицы охватывают невидимый (~0,1-100 нм) и видимый (>100 нм) диапазоны.

[0064] Стабильность состава на основе белка может быть оценена несколькими способами. В некоторых аспектах стабильность состава на основе полипептида (например, состава биспецифического антигенсвязывающего полипептида, рекрутирующего Т-клетки) характеризуется с помощью эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC), эксклюзионной сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-UHPLC), катионообменной высокоэффективной жидкостной хроматографии (CE-HPLC), динамического рассеяния света, аналитического ультрацентрифугирования (AUC), проточного фракционирования в поле (FFF), изоэлектрического фокусирования и ионообменной хроматографии (IEX). В некоторых аспектах стабильность состава на основе полипептида характеризуется частичной диссоциацией, измеряемой с помощью капиллярного электрофореза с додецилсульфатом натрия (CE-SDS) и/или гель-электрофореза с додецилсульфатом натрия в полиакриламидном геле (SDS-PAGE). В некоторых аспектах стабильность состава оценивают с помощью капиллярного электрофореза с додецилсульфатом натрия в восстанавливающих условиях (rCE-SDS).

[0065] Стабильность составов может быть охарактеризована количеством высокомолекулярных (HMW) соединений полипептида (например, биспецифический антигенсвязывающий полипептид, рекрутирующий Т-клетки) или скоростью увеличения количества HMW соединений полипептида (например, биспецифический антигенсвязывающий полипептид, рекрутирующий Т-клетки) при заданных температурах и в различные моменты времени (например, в различные моменты времени после восстановления лиофилизированного состава). Например, количество HMW соединений может быть определено в течение одного часа, двух часов, шести часов, 10 часов, 12 часов, 15 часов, 24 часов, 25 часов или более при примерно 8°C или 25°C. В некоторых аспектах скорость снижения HMW соединений определяется в течение одного часа, двух часов, шести часов, 12 часов, 24 часов, 25 часов или более при примерно 8°C или 25°C. В некоторых аспектах HMW соединения биспецифического антигенсвязывающего полипептида, рекрутирующего Т-клетки, в составе измеряются с помощью SE-UHPLC.

[0066] В некоторых аспектах относительные значения любого конкретного соединения полипептида (например, биспецифического антигенсвязывающего полипептида, рекрутирующего Т-клетки), как описано в данном документе, такого как интактная молекула ViTE®, или основное соединение, или высокомолекулярное (HMW)

соединение (т. е. агрегаты), выражены относительно соответствующих значений для всего продукта. Например, в некоторых аспектах состав для восстановления содержит 4% или меньше, 3,5% или меньше, 3% или меньше или 2,5% или меньше (например, 3,5% или 3%, 2,5% или 2%, или 1,9%, или 1,8%, или 1,7%, или 1,6%, или 1,5%, или 1,4%, или 1,3%, или 1,2%, или 1,1%, или 1%, или 0,5%) НМВ соединений биспецифического антигенсвязывающего полипептида, рекрутирующего Т-клетки. В различных аспектах состав для восстановления содержит 3% или меньше НМВ соединений биспецифического антигенсвязывающего полипептида, рекрутирующего Т-клетки. В некоторых аспектах НМВ соединения полипептида (например, биспецифический антигенсвязывающий полипептид, рекрутирующий Т-клетки) в составе измеряются с помощью SE-UHPLC. Необязательно состав для восстановления содержит количество НМВ соединений, указанных выше, при хранении в течение 25 часов при 8°C или при хранении в течение 12 часов при 25°C.

[0067] *Восстановление и введение*

[0068] Способ по настоящему раскрытию включает восстановление лиофилизированного состава с помощью разбавителя, предусматривающего ароматический спирт, соединение на основе фенола или аминокислоту с ароматической боковой цепью, и введение восстановленного состава нуждающемуся в этом субъекту в течение 12 часов после восстановления. Неожиданно, но восстановление лиофилизированной формы, описанной в данном документе, с помощью разбавителя, предусматривающего соединение с бензольным кольцом, такое как ароматический спирт (например, бензиловый спирт), соединение на основе фенола (например, фенол или м-крезол) или аминокислоту с ароматической боковой цепью (например, фенилаланин), значительно снижает время, необходимое для рассеивания НМВ соединений до целевых уровней, что обеспечивает введение восстановленного состава субъекту гораздо раньше после восстановления, чем считалось ранее. В различных аспектах разбавитель предусматривает бензиловый спирт, фенол, м-крезол или фенилаланин или комбинацию любого из вышеуказанного. В качестве альтернативы или дополнительно разбавитель может содержать бензойную кислоту, бензоат натрия, тимеросал, феноксиэтанол, метилпарабен, феноксиэтанол, пропилпарабен, тирозин или триптофан или комбинацию любого из вышеуказанных. В качестве альтернативы или дополнительно разбавитель включает NaCl и бензиловый спирт (например, 0,9% бензиловый спирт) или IVSS (стабилизатор раствора для внутривенного введения). Необязательно разбавитель предусматривает 0,9% бензиловый спирт, 0,8% фенол или 0,9% м-крезол. Необязательно разбавитель содержит от приблизительно 1 мМ до приблизительно 100 мМ любой из описанных в данном документе композиций разбавителя (например, бензиловый спирт, фенол, фенилаланин или м-крезол). Например, в различных аспектах разбавитель содержит по меньшей мере приблизительно 40 мМ бензилового спирта (например, по меньшей мере приблизительно 45 мМ бензилового спирта или по меньшей мере приблизительно 50 мМ бензилового спирта). В качестве разбавителя может быть

использована любая подходящая среда-носитель, такая как стерильная вода или стерильная вода для инъекций. Среда-носитель необязательно не содержит солевого раствора.

[0069] В различных аспектах способ включает введение восстановленного состава субъекту в течение 12 часов, в течение десяти часов, в течение девяти часов, в течение восьми часов, в течение семи часов, в течение шести часов, в течение пяти часов, в течение четырех часов, в течение трех часов, в течение двух часов или в течение одного часа после восстановления. В данном контексте «восстановление» означает растворение лиофилизированной массы в растворе. В различных аспектах способ включает введение восстановленного состава субъекту в течение 60 минут, в течение 45 минут, в течение 30 минут или в течение 15 минут после восстановления.

[0070] В некоторых случаях восстановленный состав дополнительно разбавляют для введения нуждающемуся в этом субъекту. Например, восстановленный состав может быть смешан с другими носителями в пакете для внутривенного введения (т. е. в данном случае также называется «система для системной доставки») с целью обеспечения повышенной дозы субъекту. В этом отношении восстановленный состав необязательно включен в систему для системной доставки в течение двенадцати часов, в течение 12 часов, в течение десяти часов, в течение девяти часов, в течение восьми часов, в течение семи часов, в течение шести часов, в течение пяти часов, в течение четырех часов, в течение трех часов, в течение двух часов или в течение одного часа после восстановления. В различных аспектах способ предусматривает включение восстановленного состава в систему для системной доставки в течение 60 минут, в течение 45 минут, в течение 30 минут или в течение 15 минут после восстановления.

[0071] Предпочтительно состав вводят парентерально, например, внутривенно, подкожно или внутримышечно. Парентеральное введение может быть осуществлено с помощью инъекции, такой как болюсная инъекция, или с помощью инфузии, такой как непрерывная инфузия. Введение может быть осуществлено посредством депо для длительного высвобождения. В некоторых аспектах состав вводят внутривенно с помощью исходной болюсной инъекции с последующей непрерывной инфузией для поддержания терапевтических циркулирующих уровней продукта, представляющего собой лекарственное средство. В некоторых аспектах состав вводят в виде одноразовой дозы. Примеры устройств медицинского назначения для введения составов описаны в патентах США № 4475196; 4439196; 4447224; 4447233; 4486194; 4487603; 4596556; 4790824; 4941880; 5064413; 5312335; 5312335; 5383851 и 5399163.

[0072] *Применение*

[0073] Описанный в данном документе состав является пригодным в качестве фармацевтического состава для лечения рака у нуждающегося в этом субъекта. Термины «нуждающийся субъект» или «нуждающийся в лечении» включают тех, которые страдают от нарушения, а также тех, у кого нарушение еще клинически не проявлялось. «Субъект» или «пациент» включает человека или других субъектов-млекопитающих, которые

получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение. Субъекты-млекопитающие включают людей, приматов, отличных от человека, собак, кошек, морских свинок, кроликов, крыс, мышей, лошадей, крупный рогатый скот, коров и т. п., причем предпочтительными являются люди. Восстановленный состав по настоящему раскрытию является фармацевтически приемлемым, т. е. способным вызывать требуемый терапевтический эффект, не вызывая значительных нежелательных местных или системных эффектов у субъекта, которому вводят фармацевтический состав. Термин «фармацевтически приемлемый» может означать одобрение регулирующего органа или другой общепризнанной фармакопеи для применения у животных и более конкретно у людей, но не ограничивается теми, которые утверждены регулирующим органом.

[0074] Необязательно субъект страдает от рака (например, опухоли). В различных аспектах рак сверхэкспрессирует DLL3 на поверхности опухоли или раковых клеток по сравнению с нормальными клетками. Примеры опухолей или видов рака включают без ограничения рак легкого (предпочтительно SCLC), рак молочной железы, рак шейки матки, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак головы и шеи, рак печени, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак кожи, рак желудка, рак яичка, рак щитовидной железы, рак надпочечника, рак почки, рак мочевого пузыря, рак матки, рак пищевода, рак уротелия, опухоль или рак головного мозга, лимфому, карциному и саркому, а также метастатические раковые заболевания, полученные из любого из вышеуказанного. В различных аспектах опухоль или рак представляет собой мелкоклеточный рак легкого (SCLC), немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), глиому, глиобластому, меланому, нейроэндокринный рак предстательной железы, нейроэндокринный рак поджелудочной железы, гепатобластому, гепатоцеллюлярную карциному или метастатическое раковое заболевание, полученное из любого из вышеуказанного. Необязательно опухоль или рак представляет собой SCLC, NSCLC, глиому, глиобластому или нейроэндокринный рак предстательной железы.

[0075] Настоящее раскрытие относится к способу лечения рака (например, любого из описанных выше видов рака), включающему введение нуждающемуся в этом субъекту терапевтически эффективного количества восстановленного состава в течение временного интервала после восстановления, предусмотренного в данном документе. Термин «лечение» относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам (например, к лечению, излечению, смягчению, облегчению, изменению, исправлению, снижению интенсивности проявлений, улучшению в отношении заболевания, симптому заболевания или предрасположенности к заболеванию или оказанию воздействия на них). «Лечение» охватывает любое улучшение болезненного состояния пациента со статусом наличия у него опухоли или рака (например, метастатический рак) путем введения восстановленного состава, описанного в данном документе. Такое улучшение может также наблюдаться как замедление или остановка прогрессирования опухоли или рака (например, метастатического рака) у пациента. Используемый в данном документе термин «предупреждение» означает предотвращение

возникновения или повторного возникновения у пациента статуса наличия у него опухоли или рака (например, метастатического рака) путем введения восстановленного состава нуждающемуся в этом субъекту.

[0076] Лечение рака может быть определено одним из нескольких способов. Предполагается любое улучшение самочувствия субъекта (например, снижение по меньшей мере или приблизительно на 10%, снижение по меньшей мере или приблизительно на 20%, снижение по меньшей мере или приблизительно на 30%, снижение по меньшей мере или приблизительно на 40%, снижение по меньшей мере или приблизительно на 50%, снижение по меньшей мере или приблизительно на 60%, снижение по меньшей мере или приблизительно на 70%, снижение по меньшей мере или приблизительно на 80%, снижение по меньшей мере или приблизительно на 90% или снижение по меньшей мере или приблизительно на 95% любого параметра, описанного в данном документе). Например, терапевтический ответ будет относиться к одному или нескольким из следующих вариантов улучшения при заболевании: (1) снижение количества неопластических клеток; (2) повышение уровня гибели неопластических клеток; (3) ингибирование выживаемости неопластических клеток; (5) ингибирование (т. е. замедление до некоторой степени, предпочтительно прекращение) роста опухоли или появления новых очагов поражения; (6) уменьшение размера опухоли или опухолевой нагрузки; (7) отсутствие клинически выявляемого заболевания, (8) снижение уровней маркеров рака; (9) повышение уровня выживаемости пациентов; и/или (10) некоторое облегчение в отношении одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием или состоянием (например, боли). Например, эффективность лечения может быть определена путем выявления изменения массы и/или объема опухоли после лечения. Размер опухоли может сравниваться с исходным размером и величинами, измеренными с помощью СТ, РЕТ, маммограммы, ультразвукового исследования или пальпации, а также с помощью калиперного измерения или патологического исследования опухоли после биопсии или хирургической резекции. Ответ может быть охарактеризован количественно, например, с помощью процентного изменения объема опухоли (например, способ раскрытия приводит к уменьшению объема опухоли по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80% или по меньшей мере на 90%). В различных аспектах способы по настоящему раскрытию дополнительно включают мониторинг лечения у субъекта.

[0077] *Наборы*

[0078] В качестве дополнительного аспекта в данном документе предусмотрены наборы, которые содержат один или несколько описанных в данном документе составов, упакованных таким образом, чтобы облегчить восстановление и/или введение субъектам. Например, такой набор включает лиофилизированный состав, описанный в данном документе, упакованный в контейнер, такой как герметично закрытая бутылка, сосуд, одноразовый или многоразовый флакон, предварительно заполненный шприц или

предварительно заполненное устройство для инъекций, с разбавителем для восстановления, как описано выше. Может быть предусмотрена подходящая среда-носитель или носитель, такой как вода для инъекций, физиологический солевой раствор или искусственная спинномозговая жидкость, возможно, дополненные другими материалами, традиционно используемыми в составах для парентерального введения. В одном аспекте состав упакован в виде стандартной лекарственной формы. Набор может дополнительно содержать устройство, подходящее для введения состава в соответствии с конкретным путем введения. Предпочтительно набор дополнительно содержит этикетку, которая описывает применение полипептида, описанного в данном документе, или состава, описанного в данном документе.

[0079] *Аспекты настоящего раскрытия*

[0080] Ниже представлены различные иллюстративные аспекты настоящего раскрытия:

[0081] Аспект 1. Способ, включающий: (а) восстановление лиофилизованного состава, содержащего полипептид, сахарид, поверхностно-активное вещество и буфер, с помощью разбавителя, предусматривающего ароматический спирт, соединение на основе фенола или аминокислоту с ароматической боковой цепью, и (б) введение восстановленного состава нуждающемуся в этом субъекту в течение 12 часов после восстановления, где полипептид связывает DLL3 человека и CD3 человека.

[0082] Аспект 2. Способ по аспекту 1, где разбавитель предусматривает бензиловый спирт, фенол, м-крезол или фенилаланин.

[0083] Аспект 3. Способ по аспекту 1 или аспекту 2, где pH восстановленного состава составляет от приблизительно 4 до приблизительно 7.

[0084] Аспект 4. Способ по любому из аспектов 1-3, где состав характеризуется pH 4,2.

[0085] Аспект 5. Способ по любому из аспектов 1-4, где восстановленный состав содержит от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл полипептида.

[0086] Аспект 6. Способ по любому из аспектов 1-5, где восстановленный состав содержит приблизительно 15 мг/мл полипептида.

[0087] Аспект 7. Способ по любому из аспектов 1-6, где буфер представляет собой ацетатный буфер, глутаматный буфер, цитратный буфер, лактатный буфер, сукцинатный буфер, тартратный буфер, фумаратный буфер, малеатный буфер, гистидиновый буфер или фосфатный буфер.

[0088] Аспект 8. Способ по аспекту 7, где буфер представляет собой глутаматный буфер.

[0089] Аспект 9. Способ по любому из аспектов 1-8, где буфер присутствует в концентрации в диапазоне от 5 до 200 мМ перед лиофилизацией.

[0090] Аспект 10. Способ по аспекту 9, где буфер присутствует в концентрации в диапазоне от 10 до 50 мМ перед лиофилизацией.

[0091] Аспект 11. Способ по любому из аспектов 1-10, где сахарид представляет

собой моносахарид или дисахарид.

[0092] Аспект 12. Способ по любому из аспектов 1-11, где сахарид представляет собой глюкозу, галактозу, фруктозу, ксилозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, трегалозу, сорбит, маннит или ксилит.

[0093] Аспект 13. Способ по аспекту 12, где сахарид представляет собой сахарозу.

[0094] Аспект 14. Способ по любому из аспектов 1-13, где сахарид присутствует в концентрации в диапазоне от 1 до 15% (вес/объем) перед лиофилизацией.

[0095] Аспект 15. Способ по любому из аспектов 1-14, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 80, полоксамер 188, полоксамер 407, Triton® X-100, полиоксиэтилен, PEG 3350, PEG 4000 или их комбинацию.

[0096] Аспект 16. Способ по аспекту 15, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.

[0097] Аспект 17. Способ по любому из аспектов 1-16, где поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации в диапазоне от 0,001% до 0,5% (вес/объем) перед лиофилизацией.

[0098] Аспект 18. Способ по любому из аспектов 1-17, где состав содержит 15 мМ глутамата, 9% (вес/объем) сахарозы и 0,01% (вес/объем) полисорбата 80 перед лиофилизацией, и где состав характеризуется pH 4,2.

[0099] Аспект 19. Способ по любому из аспектов 1-18, где полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 и SEQ ID NO: 9

[00100] Аспект 20. Способ по любому из аспектов 1-19, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 20.

[00101] Аспект 21. Способ по любому из аспектов 1-20, где разбавитель предусматривает 0,9% бензиловый спирт.

[00102] Аспект 22. Способ по любому из аспектов 1-20, где разбавитель предусматривает фенол.

[00103] Аспект 23. Способ по любому из аспектов 1-20, где разбавитель предусматривает м-крезол.

[00104] Аспект 24. Способ по любому из аспектов 1-20, где разбавитель предусматривает фенилаланин.

[00105] Аспект 25. Способ по любому из аспектов 1-24, где стадия (b) включает введение восстановленного состава нуждающемуся в этом субъекту в течение шести часов после восстановления.

[00106] Аспект 26. Способ по любому из аспектов 1-24, где стадия (b) включает введение восстановленного состава нуждающемуся в этом субъекту в течение четырех часов после восстановления.

[00107] Аспект 27. Способ по любому из аспектов 1-24, где стадия (b) включает введение восстановленного состава нуждающемуся в этом субъекту в течение двух часов

после восстановления.

[00108] Аспект 28. Способ по любому из аспектов 1-24, где стадия (b) включает введение восстановленного состава нуждающемуся в этом субъекту в течение одного часа после восстановления.

[00109] Аспект 29. Способ по любому из аспектов 1-24, где субъект страдает от рака.

[00110] Аспект 30. Способ по аспекту 29, где рак представляет собой мелкоклеточный рак легкого (SCLC), немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), глиому, глиобластому, меланому, нейроэндокринный рак предстательной железы, нейроэндокринный рак поджелудочной железы, гепатобластому или гепатоцеллюлярную карциному.

[00111] Аспект 31. Способ по аспекту 29, где рак представляет собой SCLC, NSCLC, глиому, глиобластому или нейроэндокринный рак предстательной железы.

[00112] Аспект 32. Способ, включающий: (a) восстановление лиофилизированного состава, содержащего полипептид, сахарид, поверхностно-активное вещество и буфер, с помощью разбавителя, предусматривающего ароматический спирт, соединение на основе фенола или аминокислоту с ароматической боковой цепью, и (b) введение восстановленного состава нуждающемуся в этом субъекту в течение 12 часов после восстановления, где полипептид представляет собой конструкцию на основе биспецифического антитела, такую как биспецифический активатор, рекрутирующий Т-клетки.

[00113] Аспект 33. Способ по аспекту 32, где разбавитель предусматривает бензиловый спирт, фенол, м-крезол или фенилаланин.

[00114] Аспект 34. Способ по аспекту 32 или аспекту 33, где pH восстановленного состава составляет от приблизительно 4 до приблизительно 7, необязательно, например, pH 4,2.

[00115] Аспект 35. Способ по любому из аспектов 32-34, где восстановленный состав содержит от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл полипептида, например, приблизительно 15 мг/мл полипептида.

[00116] Аспект 36. Способ по любому из аспектов 32-35, где буфер представляет собой ацетатный буфер, глутаматный буфер, цитратный буфер, лактатный буфер, сукцинатный буфер, тартратный буфер, фумаратный буфер, малеатный буфер, гистидиновый буфер или фосфатный буфер, необязательно глутаматный буфер.

[00117] Аспект 37. Способ по любому из аспектов 32-36, где буфер присутствует в концентрации в диапазоне от 5 до 200 мМ перед лиофилизацией, например, в концентрации от 10 до 50 мМ перед лиофилизацией.

[00118] Аспект 38. Способ по любому из аспектов 32-37, где сахарид представляет собой моносахарид или дисахарид.

[00119] Аспект 39. Способ по любому из аспектов 32-38, где сахарид представляет собой глюкозу, галактозу, фруктозу, ксилозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, трегалозу,

сорбит, маннит или ксилит, необязательно сахарозу.

[00120] Аспект 40. Способ по любому из аспектов 32-39, где сахарид присутствует в концентрации в диапазоне от 1 до 15% (вес/объем) перед лиофилизацией.

[00121] Аспект 41. Способ по любому из аспектов 32-40, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 80, полоксамер 188, полоксамер 407, Triton® X-100, полиоксиэтилен, PEG 3350, PEG 4000 или их комбинацию, необязательно, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 80.

[00122] Аспект 42. Способ по любому из аспектов 32-41, где поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации в диапазоне от 0,001% до 0,5% (вес/объем) перед лиофилизацией.

[00123] Аспект 43. Способ по любому из аспектов 32-42, где состав содержит 15 мМ глутамата, 9% (вес/объем) сахарозы и 0,01% (вес/объем) полисорбата 80 перед лиофилизацией, и где состав характеризуется рН 4,2.

[00124] Аспект 44. Способ по любому из аспектов 32-43, где разбавитель предусматривает 0,9% бензиловый спирт, фенол, м-крезол и/или фенилаланин.

[00125] Аспект 45. Способ по любому из аспектов 32-44, где стадия (b) включает введение восстановленного состава нуждающемуся в этом субъекту в течение шести часов после восстановления, в течение четырех часов после восстановления, в течение двух часов после восстановления или в течение одного часа после восстановления.

[00126] Аспект 46. Способ по любому из аспектов 32-45, где субъект страдает от рака, такого как мелкоклеточный рак легкого (SCLC), немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), глиома, глиобластома, меланома, нейроэндокринный рак предстательной железы, нейроэндокринный рак поджелудочной железы, гепатобластома или гепатоцеллюлярная карцинома.

[00127] Аспект 47. Способ по любому из аспектов 32-46, где полипептид содержит любую аминокислотную последовательность, представленную в приведенном в данном документе перечне последовательностей, например, аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 187 или SEQ ID NO: 188 (например, аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 174 или SEQ ID NO: 183).

[00128] Следующий пример приведен лишь для иллюстрации настоящего изобретения и не ограничивает каким-либо образом его объем.

Пример

[00129] В данном примере демонстрируется уменьшение времени, необходимого для растворения HMW соединений при восстановлении лиофилизированного состава на основе полипептида (HLE-BiTE®) с использованием способов по настоящему раскрытию.

[00130] Лиофилизированный состав HLE-BiTE® (15 мМ глутамата, 9% (вес/объем) сахарозы и 0,01% (вес/объем) полисорбата 80; молекула BiTE®, содержащая SEQ ID NO: 75 и 9 («BiTE®-A»)), использовали для исследования восстановления. Разбавители, используемые для восстановления, предусматривают стерильную воду для инъекций (sWFI), WFI, содержащую 0,9% бензиловый спирт (bWFI), 0,9% солевой раствор, солевой раствор, содержащий 0,9% бензиловый спирт, sWFI+0,01% PS80, 5% IVSS (стабилизатор раствора для внутривенного введения) + sWFI, фенилаланин в очищенной воде, фенол в очищенной воде и м-крезол в очищенной воде. Для проведения восстановления лиофилизированный состав и разбавители для восстановления сначала уравнивали при 8°C или 25°C в течение одного часа. Затем к лиофилизированному составу в стерильных флаконах добавляли необходимое количество разбавителя для восстановления с получением конечной концентрации белка, составляющей 15 мг/мл. Время восстановления составляло менее трех минут, в течение которых всю лиофилизированную массу полностью растворяли, а раствор осторожно перемешивали вращением до гомогенности образца. Восстановленные образцы немедленно переносили в пробоотборник для сверхэффективной жидкостной хроматографии (UPLC) с предустановленными 8°C или 25°C. Ожидаемое время от момента восстановления до первой инъекции при проведении эксклюзионной сверхэффективной жидкостной хроматографии (SE-UHPLC) составляло менее пяти минут. Для каждой инъекции SE-UHPLC 10 мкг образца загружали в колонку BEH200 UPLC (1,7 мкм, 4,6×150 мм), подключенную к системе ACQUITY UPLC (Waters, Milford, MA). Подвижная фаза представляла собой 100 мМ фосфата натрия с 250 мМ хлорида натрия при pH 6,8 при скорости потока 0,4 мл/мин. Пробоотборник UPLC поддерживали либо при 8°C, либо при 25°C. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения Chromeleon®, а интеграцию пиков рассчитывали по УФ-поглощению при 220 нм. После этого измеряли pH и концентрацию восстановленного разбавителя с помощью стандартного pH-зонда (Mettler Toledo, OH) и УФ-поглощение при 280 нм с использованием коэффициента экстинкции 1,8.

[00131] На фигуре 1 показано исследование восстановления, проведенное при 8°C. Для достижения «равновесия» (т. е. постоянного уровня % HMW соединений) восстановленному составу, в котором использовали sWFI и полисорбат 80 в качестве разбавителя, потребовалось более 24 часов. Солевой раствор, IVSS и солевой раствор+бензиловый спирт значительно увеличивали процентное содержание HMW в восстановленном составе, и уровни HMW продолжали расти в течение всего исследования. Примечательно, что применение bWFI в качестве разбавителя приводило к установлению равновесия в течение часа после восстановления. На фигуре 2 приведены

результаты аналогичного исследования, проведенного при 25°C с использованием sWFI и bWFI, при сравнении времени достижения равновесия при 8°C и при 25°C. HMW соединения диссоциировали быстрее при 25°C как для sWFI, так и для bWFI. При обеих температурах bWFI значительно ускорял процесс диссоциации по сравнению с sWFI, причем равновесие достигалось менее чем за час при 25°C. bWFI приводил к восстановлению составов, содержащих менее 1% HMW соединений. Действительно при 25°C процентное содержание HMW соединений снижалось до приблизительно 1% или меньше в течение 20 минут после восстановления и оставалось на этом уровне по меньшей мере в течение 100 минут. См. фигуру 4.

[00132] Дополнительные разбавители исследовали с получением результатов, представленных на фигуре 3. На фигуре 3 представлены данные, собранные в ходе исследования при 8°C. Фенилаланин, фенол и м-крезол ускоряли диссоциацию HMW соединений по сравнению с sWFI. Применение всех исследуемых разбавителей, за исключением sWFI, приводило к тому, что восстановленный состав содержал менее 1,5% HMW соединений через 10 часов после восстановления, при этом составы на основе bWFI демонстрировали самые низкие уровни HMW соединений.

[00133] Дополнительные исследования проводили с использованием материалов и способов, аналогичных изложенным выше. Четыре лиофилизированных ViTE во флаконах использовали со средами для восстановления, включающими стерильную воду для инъекций (sWFI), бактериостатическую WFI (bWFI), 0,9% солевой раствор и фенол. ViTE®-A содержал SEQ ID NO: 75 и 9 (включая последовательности CDR SEQ ID NO: 67-72 и 1-6); ViTE®-B содержал SEQ ID NO: 156 (включая последовательности CDR SEQ ID NO: 148-153 и 1-6); ViTE®-C содержал SEQ ID NO: 97 (включая последовательности CDR SEQ ID NO: 88-93 и 1-6) и ViTE®-D содержал SEQ ID NO: 98 (включая последовательности CDR SEQ ID NO: 88-93 и 1-6). Кроме того, для ViTE®-A (молекула ViTE®, содержащая SEQ ID NO: 75 и 9) проводили исследования с использованием бактериостатического солевого раствора, sWFI+0,01% PS80, 5% IVSS (стабилизатор раствора для внутривенного введения) + sWFI, фенилаланина и м-крезола. Для восстановления лиофилизированные флаконы с ViTE и все растворы для восстановления сначала уравнивали при заданных значениях температуры, 25°C или 8°C, в течение 1 часа. Затем в лиофилизированные флаконы добавляли соответствующий объем раствора для восстановления. Образцы восстанавливали до трех минут до полного растворения лиофилизированной массы. Затем образец осторожно перемешивали вращением для обеспечения его гомогенности. Затем восстановленные образцы сразу же переносили в пробоотборник UPLC, предварительно установленный на 8°C или 25°C. Ожидаемое время от восстановления до первой инъекции при SE-UHPLC составляло меньше 5 минут. Для SE-UPLC соответствующее количество образца загружали в колонку SEC, подключенную к системе ACQUITY UPLC (Waters, Milford, MA). Пробоотборник UPLC поддерживали либо при 8°C, либо при 25°C. Результаты анализировали с помощью программного обеспечения Chromeleon®, а интеграцию пиков рассчитывали по УФ-поглощению или

флуоресцентной детекции. После этого измеряли рН и концентрацию восстановленных образцов с помощью стандартного рН-зонда (Mettler Toledo, OH) и УФ-поглощение при 280 нм.

[00134] Для сравнения влияния сред восстановления на различные ViTE $t_{90\%}$ определяли как время, необходимое для того, чтобы 90% исходных высокомолекулярных соединений (НМВ) диссоциировали обратно в мономер; $t_{90\%}$ рассчитывали следующим образом:

$$\frac{d[HMW]}{dt} = k[HMW]$$

$$[HMW] = [HMW]_{t0} e^{-kt}$$

$$t_{90\%} = -\frac{\ln(0.1)}{k}$$

[00135] [HMW] представляет собой концентрацию высокомолекулярных соединений, $[HMW]_{t0}$ представляет собой концентрацию высокомолекулярных соединений в нулевой момент времени, при этом для кривой диссоциации было аппроксимировано уравнение первого порядка, а k представляет собой константу скорости.

[00136] Результаты исследований представлены на фигуре 5 и в таблице 1. На фигуре 5 изображено влияние концентрации бензилового спирта на диссоциацию %НМВ ViTE®-А, восстановленного в количестве 15 мг/мл, при 25°C, на что указывает $t_{90\%}$, как определено выше. Диссоциация НМВ соединений была улучшена при всех концентрациях бензилового спирта, а концентрации более 40 мМ (например, 41,6 мМ и 83,2 мМ) приводили к «продолжительному восстановлению» (т. е. времени после восстановления, где 90% образованных исходных высокомолекулярных соединений (НМВ) диссоциировали обратно в мономер), составляющему менее двух часов. Данные показывают, что продолжительность восстановления, составляющая менее 1 часа, может быть достигнута при значениях концентрации бензилового спирта более 41,6 мМ (например, более 42 мМ).

[00137] В таблице 1 ниже обобщены результаты исследований, демонстрирующих влияние исследуемых сред для восстановления на время диссоциации различных ViTEs® при 25°C, которое обозначается $t_{90\%}$, как определено выше. Для всех исследуемых образцов и бензиловый спирт, и фенол значительно сократили период длительности восстановления по сравнению с WFI, обычно менее 1 часа по сравнению с 9+ часами. Для ViTE®-В и ViTE®-С вследствие быстрой кинетики указано время менее 1 часа. В отличие от других условий солевой раствор способствовал агрегации (Агр.) для ViTE®-А, ViTE®-В и ViTE®-С и продлевал $t_{90\%}$ для ViTE®-D с 19,1 часа до 26,1 часа.

[00138] ТАБЛИЦА 1

	WFI (часы)	Бензиловый спирт (часы)	Фенол (часы)	Солевой раствор (часы)

BiTE®-A	9,3	0,3	0,5	Агр.
BiTE®-B	9,0	<1,0	<1,0	Агр.
BiTE®-C	10,0	<1,0	<1,0	Агр.
BiTE®-D	19,1	1,0	1,1	26,1

[00139] В примере показано, что восстановление лиофилизованного состава на основе полипептида (например, состава продукта HLE-BiTE®), описанного в данном документе, с помощью разбавителя, содержащего WFI, содержащей 0,9% бензиловый спирт, фенилаланин, фенол или м-крезол, значительно уменьшало время, необходимое для диссоциации HMW соединений, по сравнению с другими исследованными разбавителями, включая WFI отдельно. Восстановленные составы, содержащие менее 1,5% HMW соединений, получали в течение 15 часов после восстановления при 8°C с использованием этих разбавителей. Разбавитель, содержащий 0,9% бензиловый спирт (bWFI), превосходил другие исследованные разбавители как по сокращению времени, необходимого для диссоциации HMW соединений (т. е. ускорению времени достижения равновесия) после восстановления, так и по получению конечного восстановленного состава с пониженным содержанием HMW соединений. Данные, приведенные в данном документе, дополнительно подтверждают, что применение разбавителя, предусматривающего ароматический спирт, соединение на основе фенола или аминокислоту с ароматической боковой цепью, позволяет достичь необходимой продолжительности восстановления, в том числе менее 1,5 часов. Продолжительность восстановления значительно сокращалась по сравнению с восстановлением с использованием воды для инъекций или солевого раствора для всех тестируемых конструкций.

[00140] Хотя настоящее изобретение было описано с акцентом на предпочтительные аспекты для специалистов в данной области техники будет очевидно, что могут быть использованы различные варианты предпочтительных соединений и способов, а также предполагается, что настоящее изобретение может быть осуществлено на практике иначе, чем конкретно описано в данном документе. Соответственно настоящее изобретение включает все модификации, охватываемые сущностью и объемом настоящего изобретения в соответствии с приведенной ниже формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ, включающий:

(а) восстановление лиофилизованного состава, содержащего полипептид, сахарид, поверхностно-активное вещество и буфер, с помощью разбавителя, предусматривающего ароматический спирт, соединение на основе фенола или аминокислоту с ароматической боковой цепью, и

(б) введение восстановленного состава нуждающемуся в этом субъекту в течение 12 часов после восстановления,

при этом полипептид представляет собой конструкцию на основе биспецифического антитела.

2. Способ по п. 1, где разбавитель предусматривает бензиловый спирт, фенол, м-крезол или фенилаланин.

3. Способ по п. 1 или п. 2, где рН восстановленного состава составляет от приблизительно 4 до приблизительно 7.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где состав характеризуется рН 4,2.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где восстановленный состав содержит от приблизительно 1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл полипептида.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где восстановленный состав содержит приблизительно 15 мг/мл полипептида.

7. Способ по любому из пп. 1-6, где буфер представляет собой ацетатный буфер, глутаматный буфер, цитратный буфер, лактатный буфер, сукцинатный буфер, тартратный буфер, фумаратный буфер, малеатный буфер, гистидиновый буфер или фосфатный буфер.

8. Способ по п. 7, где буфер представляет собой глутаматный буфер.

9. Способ по любому из пп. 1-8, где буфер присутствует в концентрации в диапазоне от 5 до 200 мМ перед лиофилизацией.

10. Способ по п. 9, где буфер присутствует в концентрации в диапазоне от 10 до 50 мМ перед лиофилизацией.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где сахарид представляет собой моносахарид или дисахарид.

12. Способ по любому из пп. 1-11, где сахарид представляет собой глюкозу, галактозу, фруктозу, ксилозу, сахарозу, лактозу, мальтозу, трегалозу, сорбит, маннит или ксилит.

13. Способ по п. 12, где сахарид представляет собой сахарозу.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где сахарид присутствует в концентрации в диапазоне от 1 до 15% (вес/объем) перед лиофилизацией.

15. Способ по любому из пп. 1-14, где поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат 20, полисорбат 40, полисорбат 60, полисорбат 80, полуксамер 188, полуксамер 407, Triton® X-100, полиоксиэтилен, PEG 3350, PEG 4000 или их комбинацию.

16. Способ по п. 15, где поверхностно-активное вещество представляет собой

полисорбат 80.

17. Способ по любому из пп. 1-16, где поверхностно-активное вещество присутствует в концентрации в диапазоне от 0,001% до 0,5% (вес/объем) перед лиофилизацией.

18. Способ по любому из пп. 1-17, где состав содержит 15 мМ глутамата, 9% (вес/объем) сахарозы и 0,01% (вес/объем) полисорбата 80 перед лиофилизацией, и где состав характеризуется рН 4,2.

19. Способ по любому из пп. 1-18, где разбавитель предусматривает 0,9% бензиловый спирт.

20. Способ по любому из пп. 1-18, где разбавитель предусматривает фенол.

21. Способ по любому из пп. 1-18, где разбавитель предусматривает м-крезол.

22. Способ по любому из пп. 1-18, где разбавитель предусматривает фенилаланин.

23. Способ по любому из пп. 1-22, где стадия (b) включает введение восстановленного состава нуждающемуся в этом субъекту в течение шести часов после восстановления.

24. Способ по любому из пп. 1-22, где стадия (b) включает введение восстановленного состава нуждающемуся в этом субъекту в течение четырех часов после восстановления.

25. Способ по любому из пп. 1-22, где стадия (b) включает введение восстановленного состава нуждающемуся в этом субъекту в течение двух часов после восстановления.

26. Способ по любому из пп. 1-22, где стадия (b) включает введение восстановленного состава нуждающемуся в этом субъекту в течение одного часа после восстановления.

27. Способ по любому из пп. 1-22, где субъект страдает от рака.

28. Способ по любому из пп. 1-27, где полипептид связывает DLL3 и CD3.

29. Способ по любому из пп. 1-28, где полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 9

30. Способ по любому из пп. 1-29, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 76 или SEQ ID NO: 77.

31. Способ по любому из пп. 27-30, где рак представляет собой мелкоклеточный рак легкого (SCLC), немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), глиому, глиобластому, меланому, нейроэндокринный рак предстательной железы, нейроэндокринный рак поджелудочной железы, гепатобластому или гепатоцеллюлярную карциному.

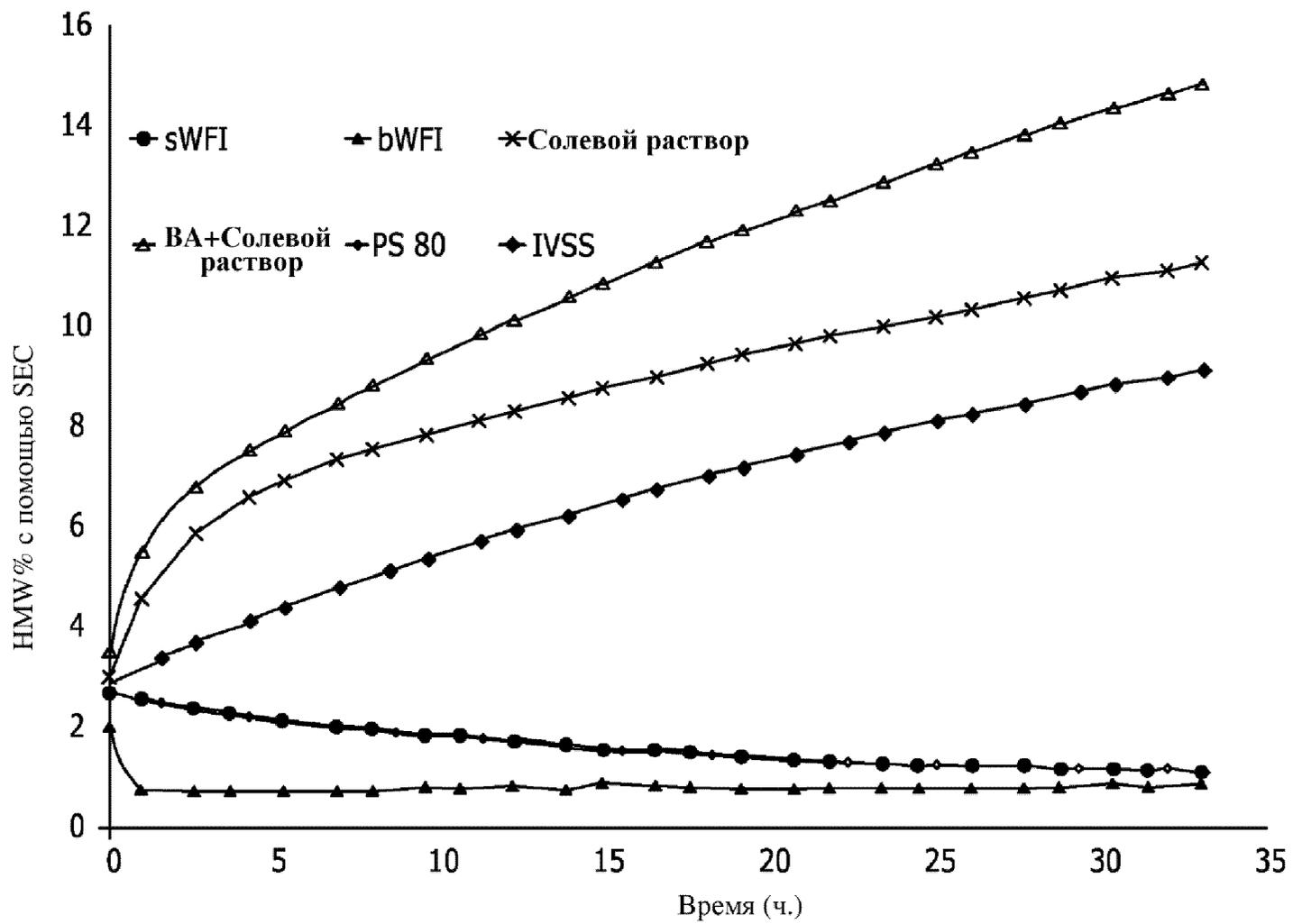
32. Способ по п. 31, где рак представляет собой SCLC, NSCLC, глиому, глиобластому или нейроэндокринный рак предстательной железы.

33. Способ по любому из пп. 1-27, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 87,

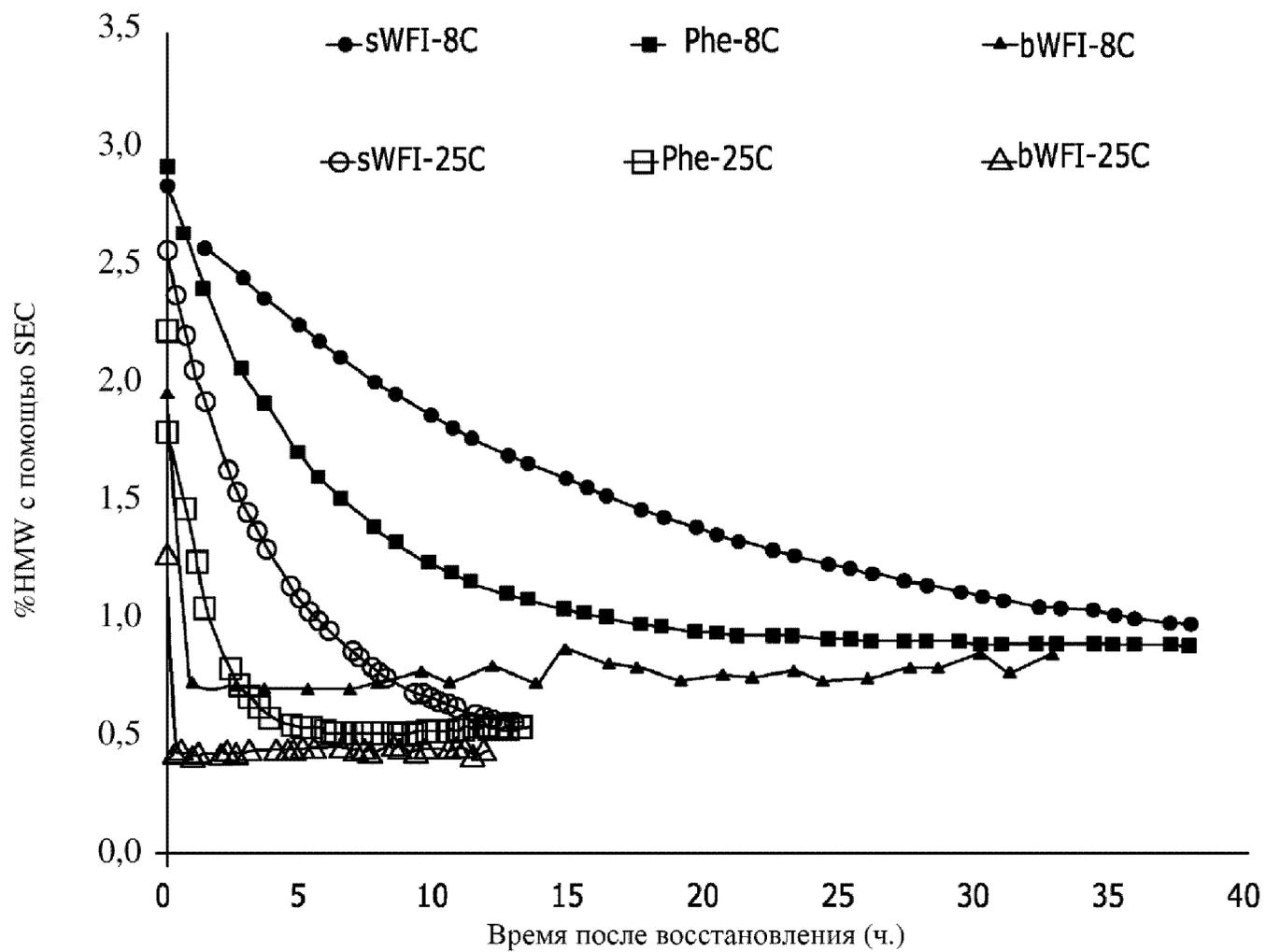
SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185, SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 187 или SEQ ID NO: 188.

34. Способ по п. 33, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 174 или SEQ ID NO: 183.

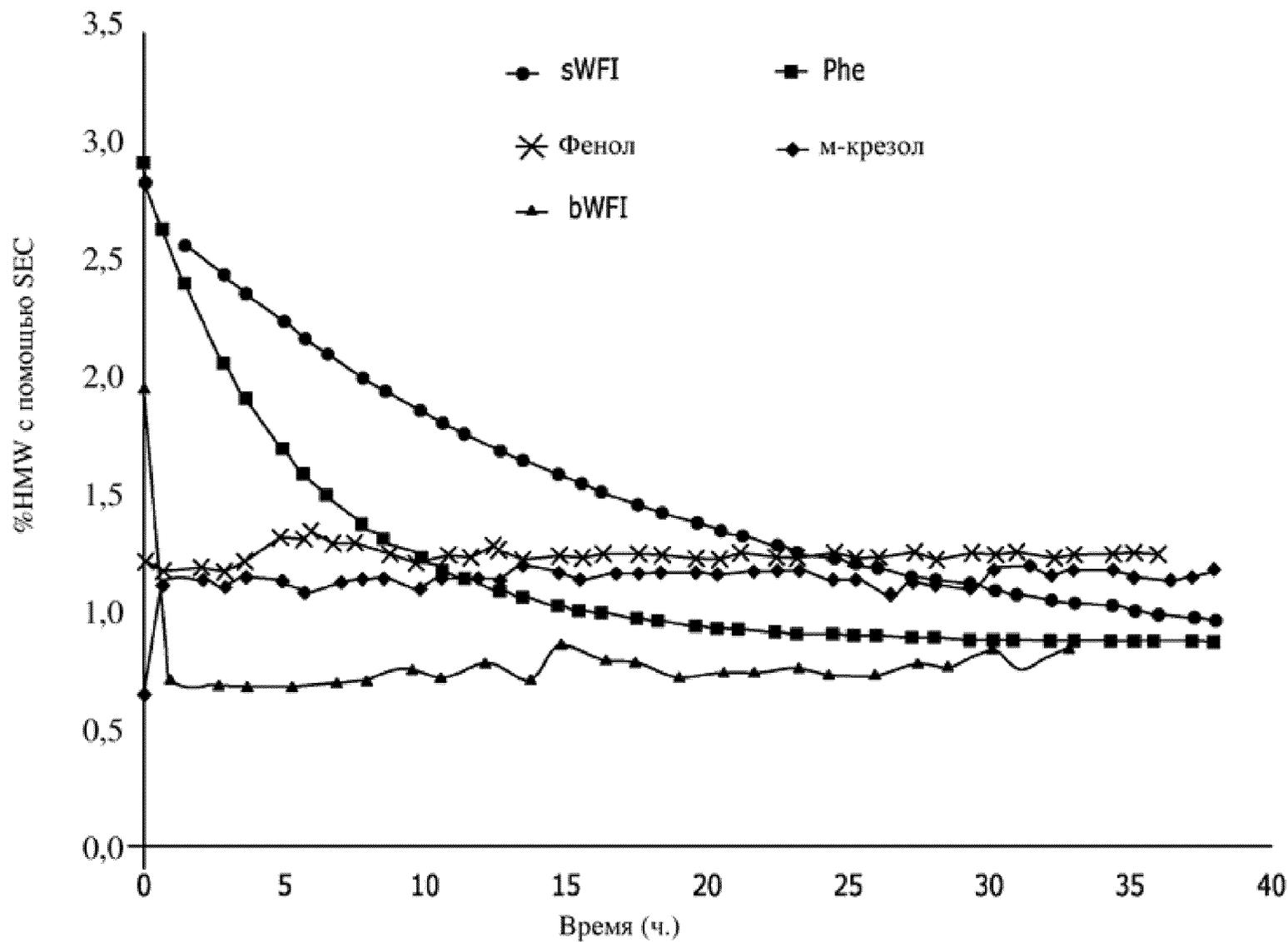
По доверенности



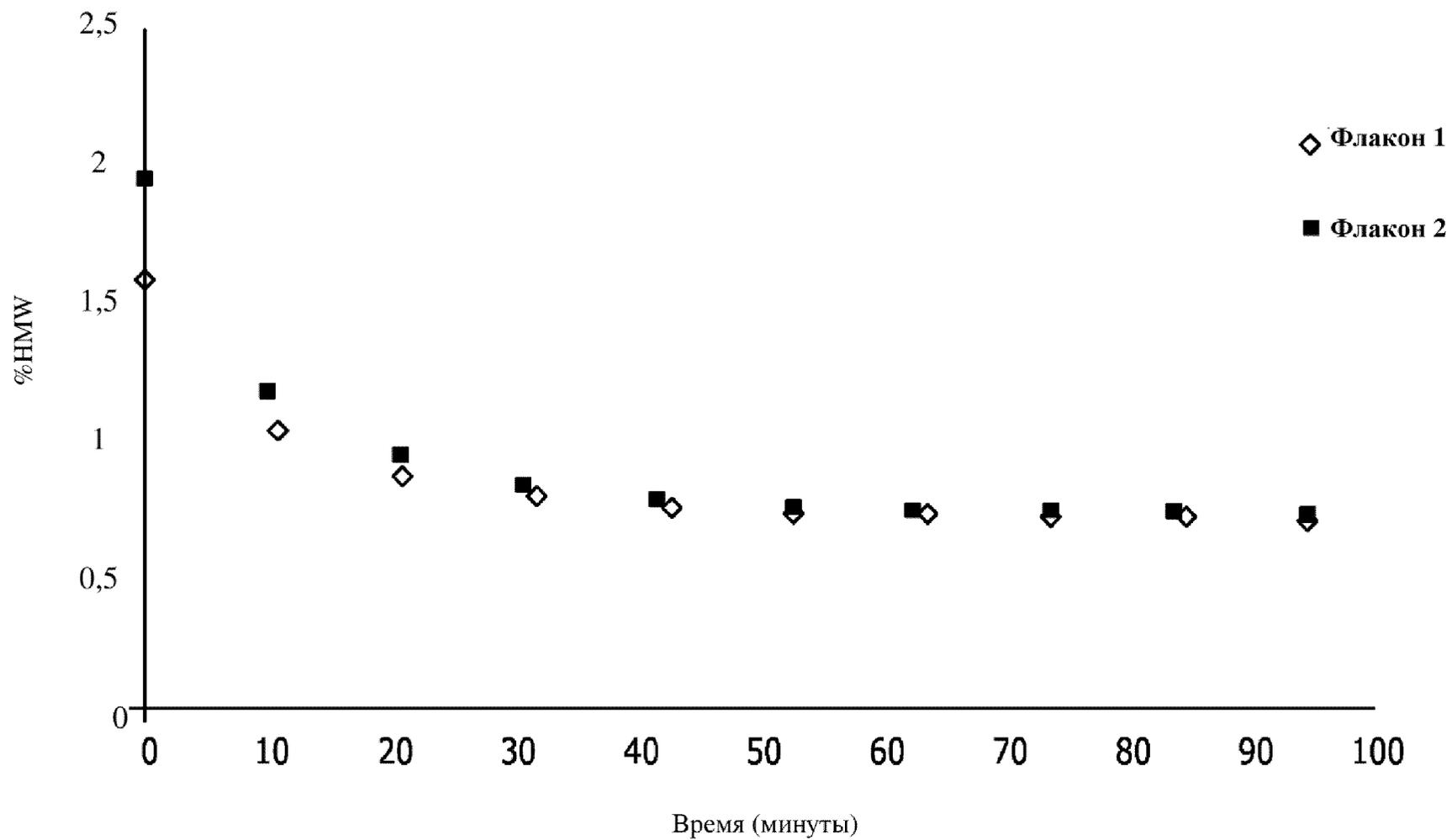
ФИГУРА 1



ФИГУРА 2

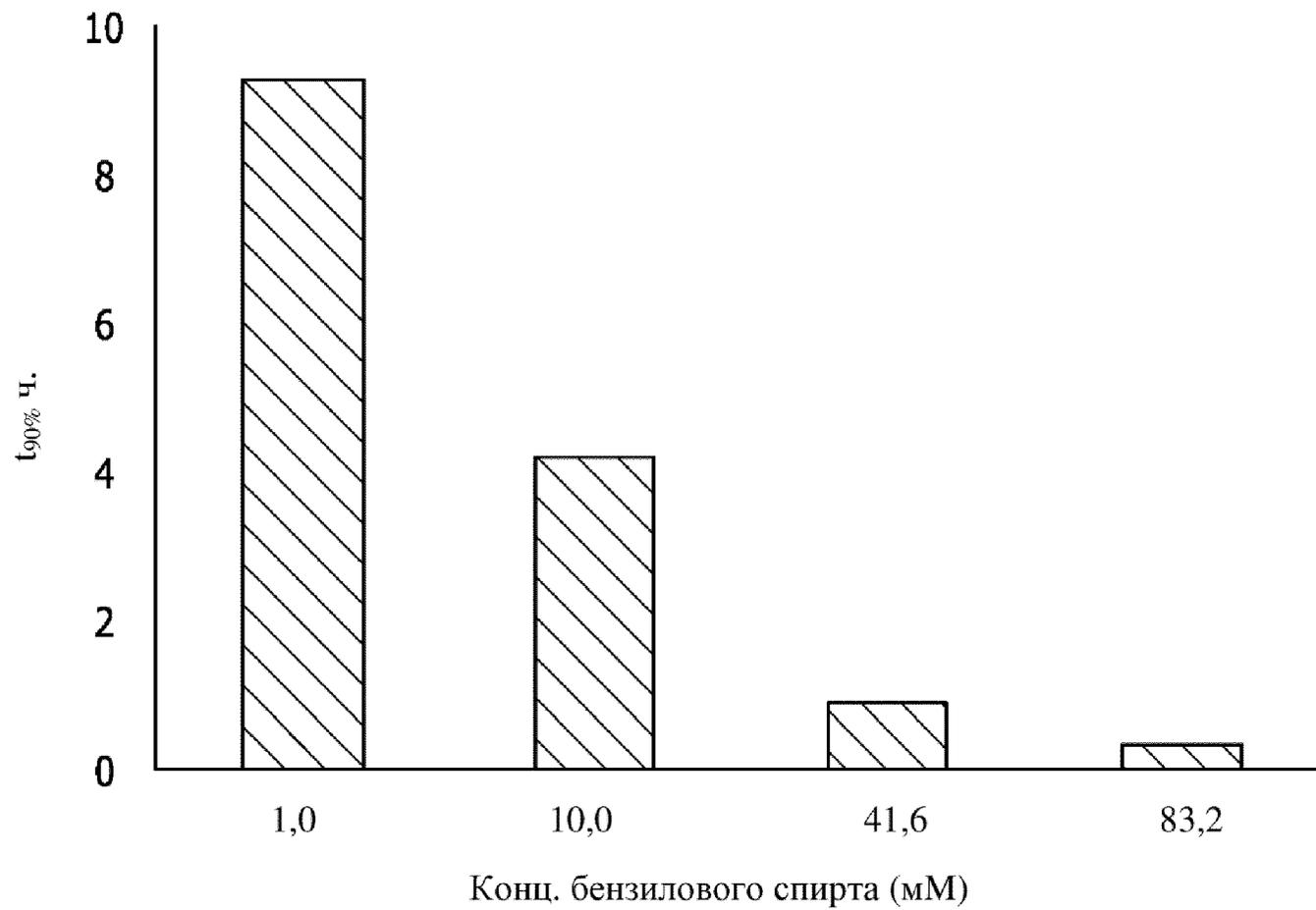


ФИГУРА 3



47

ФИГУРА 4



ФИГУРА 5

SEQ ID	Описание	Последовательность
1	CDR-L1 антитела к CD3	GSSTGAVTSGNYPN
2	CDR-L2 антитела к CD3	GTKFLAP
3	CDR-L3 антитела к CD3	VLWYSNRWV
4	CDR-H1 антитела к CD3	KYAMN
5	CDR-H2 антитела к CD3	RIRSKYNNYATYYADSVKD
6	CDR-H3 антитела к CD3	HGNFGNSYISYWAY
7	VH антитела к D3	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSS
8	VL антитела к CD3	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
9	VH-VL антитела к CD3	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVT QEPSLTVSPGGTVTLTCGSSSTGAVTSGNYPNWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAA LTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
67	HCDR1 антитела к DLL3	SYYS
68	HCDR2 антитела к DLL3	YVYSGTTNYPNPSLKS
69	HCDR3 антитела к DLL3	IAVTGFYFDY
70	LCDR1 антитела к DLL3	RASQRVNNNYLA
71	LCDR2 антитела к DLL3	GASSRAT
72	LCDR3 антитела к DLL3	QQYDRSPLT
73	VH антитела к DLL3 с цистеиновым зажимом	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKCLEWIGYVYYSGTTNYPNPSLKS RVTISVDTSKNQ FSLKLSVTAADTAVYYCASIAVTGFYFDYWGQGLTVTVSS
74	VL антитела к DLL3 с цистеиновым зажимом	EIVLTQSPGTLSPGERVTLSCRASQRVNNNYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYDRSPLTFGCGTKLEIK
75	VH-VL антитела к DLL3 с цистеиновым зажимом	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKCLEWIGYVYYSGTTNYPNPSLKS RVTISVDTSKNQ FSLKLSVTAADTAVYYCASIAVTGFYFDYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERVT LSCRASQRVNNNYLAWYQQRPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDRSP LTFGCGTKLEIK

617

ФИГУРА 6

SEQ ID	Описание	Последовательность
76	DLL3_1_CCxCD3_delGK Биспецифическая молекула	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKCLEWIGYVYYSGTTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSVTAADTAVYYCASI AVTGFYFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERVT LSCRASQRVNNNYLAWYQQRPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDRSP LTFGCGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQT VVTQEPSLTVSPGGTVTLT CGSSTGAVTSGNYPNWWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPA RFGSLLGGKAAL T LSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL
77	DLL3_1_CCxCD3-scFc_delGK Биспецифическая молекула HLE	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKCLEWIGYVYYSGTTNYPNPSLKSRVTISVDTSKNQ FSLKLSVTAADTAVYYCASI AVTGFYFDYWGQGLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERVT LSCRASQRVNNNYLAWYQQRPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDRSP LTFGCGTKLEIKSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGLVTVSSGGGG SGGGGSGGGGSQT VVTQEPSLTVSPGGTVTLT CGSSTGAVTSGNYPNWWVQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPA RFGSLLGGKAAL T LSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS GGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPCEEQYGSTYRCVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK

ФИГУРА 6 (Продолжение)